

University of Groningen

Mutability-landscape guided enzyme engineering

van der Meer, Jan Ytzen

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

van der Meer, J. Y. (2016). *Mutability-landscape guided enzyme engineering: Improving the promiscuous C-C bond-forming activities of 4-oxalocrotonate tautomerase*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

Copyright

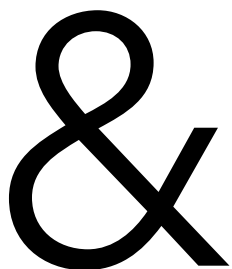
Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.



NEDERLANDSE SAMENVATTING

SAMENVATTING VOOR DE GEÏNTERESSEERDE LEEK

Enzymen zijn de katalysatoren van de biologie. Dat wil zeggen dat vrijwel alle chemische omzettingen die plaatsvinden in een cel worden versneld of überhaupt mogelijk gemaakt door enzymen. Zo zijn er in onze lever enzymen die gifstoffen afbreken, in onze celkernen enzymen die DNA aanmaken, in planten zijn enzymen die de fotosynthese mogelijk maken en zo zou ik nog wel even door kunnen gaan. Kortom, waar leven is, zijn enzymen aanwezig. In de loop van de evolutie hebben enzymen zich ontwikkeld tot zeer efficiënte en specifieke (bio)katalysatoren. Dit is voor mensen niet onopgemerkt gebleven, waardoor wij een lange traditie hebben van het gebruik van enzymen in katalyse, met name in de voedseltechnologie. Een bekend en oud voorbeeld hiervan is het gebruik van stremsel in de kaasproductie. Stremsel is eigenlijk een mengsel van eiwit-afbrekende enzymen (proteasen), die ervoor zorgen dat melkeiwitten in kleinere delen gesplitst worden, wat er toe leidt dat ze samenklonteren. Naast dit soort toepassingen in de voedselindustrie worden enzymen tegenwoordig ook steeds meer gebruikt in andere vakgebieden zoals bijvoorbeeld de wasmiddeltechnologie, bio-ethanolproductie of de farmaceutische industrie. De reden dat enzymen steeds meer gebruikt worden is niet alleen omdat het zeer effectieve en duurzame katalysatoren zijn, maar ook omdat we tegenwoordig over de technologie beschikken om enzymen aan te passen en te optimaliseren voor biotechnologische toepassingen. Het verbeteren of optimaliseren van enzymen wordt ook wel 'enzyme engineering' genoemd. Hierbij kan bijvoorbeeld het doel zijn om enzymen de juiste reactie te laten katalyseren, stabiel te maken of om de activiteit van een enzym te verhogen.

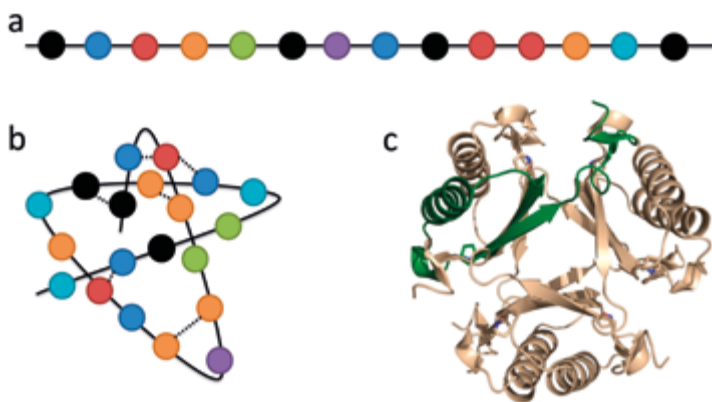
Mijn promotie onderzoek bestond uit 'enzyme engineering' met als doel een specifiek enzym te verbeteren voor toepassing als katalysator in de productie van geneesmiddelen of smaakstoffen. Hiervoor heb ik een bijzondere techniek gebruikt, genaamd 'mutability landscape guided enzyme engineering'. Om goed uit te kunnen leggen hoe dit werkt, geef ik eerst wat meer achtergrondinformatie over enzymen.

Hoe zien enzymen eruit?

Een enzym is een eiwit dat zich onderscheidt van andere eiwitten doordat het een reactie kan katalyseren. Net als elk eiwit bestaat een enzym uit een reeks van aaneengeschakelde aminozuren. Dit is te vergelijken met een parelketting, waarbij elke parel een andere aminozuur voorstelt (Fig. 1a). Er is een grote variatie in de lengte van enzymen, zo zijn er enzymen die kleiner zijn dan 100 aminozuren maar er zijn ook enzymen die meer dan 1000 aminozuren lang zijn. Naast de lengte is ook de volgorde, oftewel sequentie, van de aminozuren erg belangrijk. Een aminozuur sequentie is uniek voor elk enzym en is bepalend voor de eigenschappen van het enzym. Eiwitten zijn opgebouwd uit 20 verschillende aminozuren die verschillende eigenschappen hebben. Zo zijn er bijvoorbeeld aminozuren die waterafstotend (hydrofoob) zijn en aminozuren die juist graag interacties met water aangaan (hydrofiel). Ook zijn er

aminozuren die een positieve of negatieve lading hebben en er zijn aminozuren van verschillende groottes.

Een actief enzym is nooit aanwezig in de vorm van een rechte lineaire streng aminozuren zoals het in Figuur 1a is weergegeven; zodra het namelijk in aanraking komt met water gaat het op een bepaalde manier vouwen. De vouwing vindt zodanig plaats dat de hydrofobe aminozuren aan de binnenkant van het eiwit zitten, afgeschermd van water, en de hydrofiele delen aan de buitenkant. Daarnaast zijn er nog tal van interacties tussen aminozuren die ervoor zorgen dat de vouwing gestabiliseerd wordt; zo worden bijvoorbeeld positief en negatief geladen aminozuren door elkaar aangetrokken (Fig. 1b en 1c). De vouwing van een enzym is hierdoor sterk afhankelijk van de aminozuur sequentie, daarom zullen twee enzymen met nagenoeg dezelfde sequentie in principe ook altijd op dezelfde manier vouwen. Daarnaast is de vouwing ook zeer belangrijk voor de activiteit van het enzym. Door de vouwing krijgt het enzym namelijk een driedimensionale structuur waarin één (of meerdere) klein gebied (vaak een holte) zit wat de 'active site' genoemd wordt. Dit is het actieve centrum van een enzym waar daadwerkelijk de reacties gekatalyseerd worden.



Figuur 1 – De structuur van een enzym. a) Een ongevouwen enzym, vergelijkbaar met een parelketting waarbij elke parel een ander aminozuur voorstelt. b) Schematische weergave van een gevouwen enzym/eiwit, waarbij de stippellijnen interacties tussen aminozuren weergeven. c) Een schematische weergave van een gevouwen enzym, waarbij structuur elementen worden aangegeven.

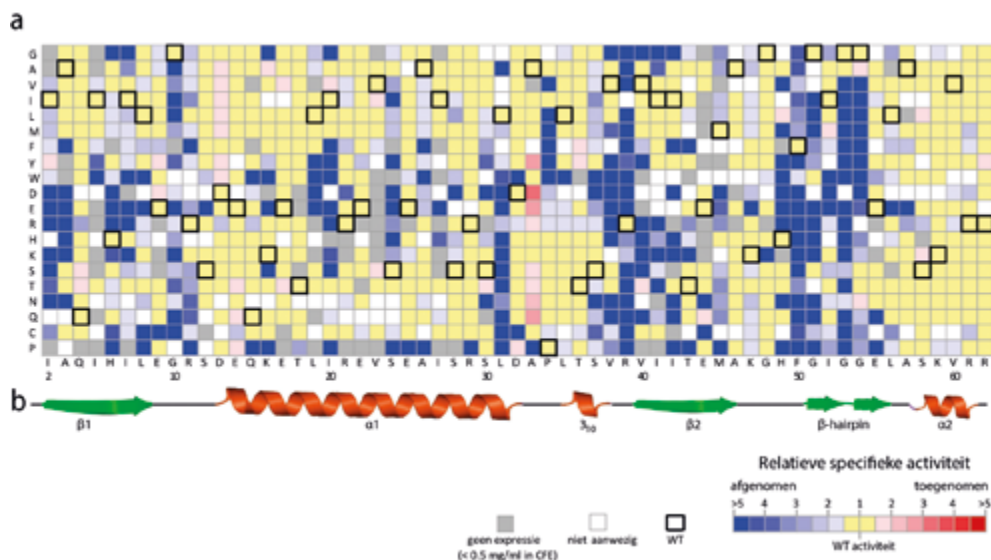
“Mutability landscape” gestuurde enzyme engineering

Zoals gezegd, heb ik gebruik gemaakt van mutabiliteitslandschappen voor ‘enzyme engineering’. Het maken van zo’n mutabiliteitslandschap houdt in dat je de effecten van alle mogelijke enkelvoudige aminozuur substituties in kaart brengt. Om weer even terug te grijpen naar de metafoer met de parelketting van Figuur 1a, dit betekent dat je elke parel in de ketting één voor één vervangt door alle 19 andere parels/aminozuren en dan bekijkt wat het effect is van deze aminozuursubstitutie (oftewel mutatie) op de activiteit van het enzym. Als je dus een enzym zou hebben van 100

aminozuren lang, betekent dit dat je 1.900 mutanten moet analyseren. Een belangrijk kenmerk van een mutabiliteitslandschap is dat je niet alleen mutaties in kaart brengt die een positief effect hebben op de activiteit, maar ook mutaties die geen effect of juist een negatief effect hebben. Er zijn namelijk ook methodes waarbij alleen gezocht wordt naar mutanten met positieve effecten. Dit is voldoende wanneer je een verbeterd enzym wilt maken, maar je verliest hierdoor waardevolle informatie over gebieden in het enzym waar mutaties mogelijk zijn zonder dat dat effect heeft op het enzym en over mutaties die een negatief effect hebben. Ook deze negatieve mutaties kunnen zeer belangrijke informatie geven over essentiële aminozuren in het enzym. Als bijvoorbeeld blijkt dat één specifiek aminozuur door geen enkel ander aminozuur vervangen kan worden zonder verlies van activiteit, geeft dit aan dat dit aminozuur zeer belangrijk is voor de activiteit of vouwing van het enzym. Dit kan je informatie geven over hoe het enzym werkt.

Als je al die positieve, neutrale en negatieve enkelvoudige mutaties in het enzym in kaart hebt gebracht, kan je die weergeven in een datamatrix met kleuren (Fig. 2a). Dit noem je het mutabiliteitslandschap. Zo'n landschap kan vervolgens dienen als leidraad voor het verbeteren van het enzym. Zo kan gemakkelijk worden afgelezen welke mutaties een positief effect hebben op de activiteit en welke combinaties van die positieve mutaties het enzym mogelijk nog verder kunnen verbeteren. In **Hoofdstuk 1** heb ik hiertoe een literatuurstudie gedaan naar het gebruik van mutabiliteitslandschappen om enzymen te verbeteren. Tot op heden wordt deze niet heel veel gebruikt en het gebruik ervan beperkt zich tot de kleinere eiwitten, maar wij vermoeden dat deze techniek in de toekomst meer toegepast zal worden. Dit omdat de technieken die gebruikt kunnen worden voor het genereren van mutabiliteitslandschappen steeds beter worden en omdat de informatie die je uit een mutabiliteitslandschap kan halen zeer waardevol is voor het maken van betere enzymen.

In **Hoofdstuk 2** heb ik mutabiliteitslandschappen gemaakt van een klein enzym, genaamd 4-oxalocrotonate tautomerase (4-OT), met als doel om dit enzym bruikbaar te maken als katalysator voor de productie van een bepaald type geneesmiddelen. 4-OT is een heel bijzonder enzym. Met een lengte van slechts 62 aminozuren is het namelijk één van de kleinste enzymen die we kennen, waardoor het uitermate geschikt is om mutabiliteitslandschappen van te maken. Een andere zeer bijzondere eigenschap van 4-OT is dat het verschillende reacties kan katalyseren, dit wordt ook wel katalytische promiscuïteit genoemd. De natuurlijke reactie van 4-OT is een zogenaamde tautomerisatie reactie die een rol speelt bij de afbraak van aromatische koolwaterstoffen zoals toluen en benzeen. Van nature wordt 4-OT dan ook gevonden in een groundbacterie die deze stoffen kan gebruiken als voedingsbron. De promiscue reacties die 4-OT kan katalyseren, zijn onder meer een aldolreactie en een Michael-type additie reactie. Wij zijn erg geïnteresseerd in deze twee reacties omdat er in deze reacties een nieuwe verbinding wordt gemaakt tussen twee koolstof atomen. Dat betekent dat we deze reacties kunnen gebruiken om nieuwe stoffen te maken



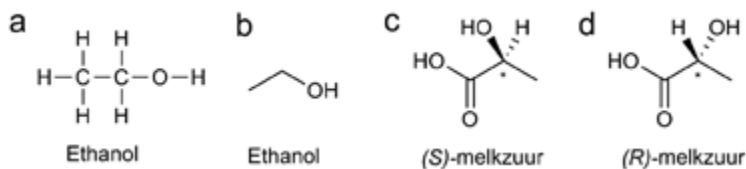
Figuur 2 – Mutabiliteitslandschap van 4-OT. a, Mutabiliteitslandschap van 4-OT’s Michael-type additie activiteit. Op de horizontale as van de datamatrix staat de aminozuursequentie van wildtype (WT) 4-OT en op de verticale as staan alle natuurlijke aminozuren. Elk vakje staat dan voor een specifieke enkelvoudige 4-OT mutant en de kleur van dat vakje geeft aan hoe snel die mutant de Michael-type additie reactie kan uitvoeren. Geel geeft aan dat die mutant net zo actief is als WT 4-OT, blauw geeft aan dat die mutant een verlaagde activiteit heeft en rood geeft een verbeterde activiteit weer. Grijs vakjes staan voor mutanten waarbij geen oplosbare expressie kon worden waargenomen waardoor we geen activiteit konden bepalen en de witte vakjes geven aan de we die mutant niet tot ons beschikking hebben. b, De secundaire structuur elementen van 4-OT.

(synthetiseren). Vooral de Michael-type additie reactie die 4-OT kan katalyseren is erg interessant omdat hiermee stoffen (γ -nitroaldehydes) gemaakt kunnen worden die als bouwstenen kunnen dienen voor de productie van gamma-aminoboterzuur (GABA)-analogen. Dit is een klasse van medicijnen die werkt op het centraal zenuwstelsel en bevat stoffen die kunnen worden gebruikt als spierverslapper (bv baclofen), angstremmer (bv phenibut) of tegen epilepsie (bv pregabaline).

Het doel van mijn promotieonderzoek was dan ook om inzicht te krijgen in deze door 4-OT gekatalyseerde Michael-type additie en aldol reacties en deze inzichten te gebruiken om deze promiscue activiteiten van 4-OT te verbeteren.

Hiertoe heb ik eerst mutabiliteitslandschappen van 4-OT gemaakt om de effecten van enkelvoudige mutaties op de natuurlijke tautomerase activiteit en de promiscue ‘Michaelase’ activiteit in kaart te brengen. In dit mutabiliteitslandschap (Fig. 2a) hebben we één enkelvoudige mutant gevonden met een sterk verbeterde activiteit, deze mutant kon de Michael-type additie ongeveer vier keer sneller uitvoeren dan het ongemuteerde (wildtype) enzym. In het wildtype enzym zit op aminozuur positie 33 een alanine (A) en in de verbeterde mutant zit op die plek een asparaginezuur (D),

we noemen deze mutant dus A33D. Na verder onderzoek naar deze mutant bleek dat A33D gebruikt kon worden voor de productie van een hele reeks γ -nitroaldehydes en dat deze mutant bovendien een sterk verhoogde enantioselectiviteit had. Dit is iets waarin wij zeer geïnteresseerd waren, maar om dit goed uit te kunnen leggen, zal ik eerst een paar basisprincipes uit de scheikunde behandelen.



Figuur 3 – Chemische structuren. a en b, verschillende weergaves van een ethanol molecuul. c, Linksdraaiend melkzuur. d, Rechtsdraaiend melkzuur.



Links en rechts draaiende moleculen?

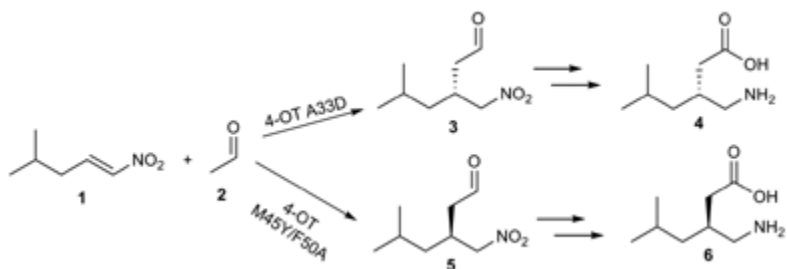
Ik begin bij de moleculen, dit namelijk zijn de kleinste deeltjes van een stof die nog dezelfde chemische eigenschappen hebben van die stof. Moleculen zijn opgebouwd uit atomen. De atomen die het belangrijkste zijn binnen de organische chemie zijn: koolstof (C), zuurstof (O) en waterstof (H). Een koolstofatoom heeft altijd vier verbindingen met andere atomen, een zuurstofatoom heeft altijd twee verbindingen en een waterstofatoom (H) slechts één. Dit is duidelijk te zien in Figuur 3a waar de structuurformule van een ethanol molecuul is weergegeven. Chemici versimpelen deze figuur door de waterstofatomen niet te laten zien in een structuurformule en de koolstofatomen als hoekpunten of eindpunten van een lijn weer te geven. Op die manier is in Figuur 3b hetzelfde ethanol molecuul weergegeven. Je zou deze structuurformules kunnen zien als een soort bouwtekening van een molecuul. Net zoals bij een echte bouwtekening is het een platte, tweedimensionale weergave van een driedimensionale, ruimtelijke structuur. Om diepte aan te geven in zo'n structuurformule worden dikgedrukte en onderbroken driehoekige verbindingsslijntjes gebruikt zoals te zien is in Figuur 3c en d. Hierbij geeft de dikgedrukte lijn een verbinding aan die, als het ware, uit het papier steekt in de richting van de lezer, terwijl de doorbroken lijn een groep aangeeft die naar achteren steekt.

Het aangeven van zo'n driedimensionale structuur is alleen van belang als er vier verschillende groepen aan één koolstof atoom zitten. Als er 2 gelijke groepen aan één koolstof zitten maakt het namelijk niet uit welke naar voren of naar achteren steekt, ze zijn immers toch gelijk. Een koolstofatoom met vier verschillende groepen wordt ook wel een asymmetrisch koolstofatoom genoemd. Zodra een molecuul een asymmetrisch koolstofatoom heeft, zijn er altijd twee varianten (of enantiomeren) van dat molecuul mogelijk. Een simpel voorbeeld van een molecuul met één zo'n koolstofatoom is melkzuur (Fig. 3c,d). Het asymmetrisch koolstofatoom is hier met een sterretje aangegeven: de OH-groep in Figuur 3c steekt naar voren, terwijl die groep

in Figuur 3d naar achteren steekt. Het enantiomeer waarbij de OH-groep naar voren steekt is (*S*)-melkzuur, oftewel linksdraaiend melkzuur en het enantiomeer waarbij de OH-groep naar achteren steekt is (*R*)-melkzuur oftewel rechtsdraaiend melkzuur. Samengevat zijn enantiomeren dus varianten van moleculen met een asymmetrisch koolstofatoom die alleen van elkaar verschillen op basis van de ruimtelijke oriëntatie van atomen op dat asymmetrisch koolstof atoom (ze zijn elkaars spiegelbeeld).

Enantiomeren lijken dus enorm op elkaar. Niet alleen qua atomen en structuur, maar ook wat betreft chemische eigenschappen. Toch zijn er een aantal toepassingen waarvoor het belangrijk is om slechts één van de twee enantiomeren in handen te krijgen, met name bij geneesmiddelen. Zo zijn er een groot aantal medicijnen waarbij het ene enantiomeer biologisch actief is, terwijl het andere enantiomeer helemaal niks doet of zelfs vervelende bijwerkingen veroorzaakt. Daarom is het noodzakelijk om alleen het actieve enantiomeer van een medicijn aan de patiënt toe te dienen. We spreken dan van een enantiozuiver medicijn. Het chemisch produceren van enantiozuivere stoffen en dus ook medicijnen is erg lastig en nog steeds een grote uitdaging. Zoals gezegd was uit het mutabiliteitslandschap voor de Michaelase activiteit van 4-OT een mutant naar voren gekomen (A33D) die enantioselectief was en dus gebruikt kan worden voor productie van enantiozuivere stoffen. Daarom waren wij hierin zeer geïnteresseerd.

Helaas waren we er nu nog niet helemaal, want hoewel A33D enantiozuivere γ -nitroaldehydes produceerde, werd het verkeerde enantiomeer gemaakt. A33D produceert daardoor niet de γ -nitroaldehydes die gebruikt kunnen worden voor de productie van medicijnen (GABA-analogen). Ik leg dit verder uit aan de hand van een reactievergelijking (Figuur 4). Tijdens de Michael-type additie reactie wordt een molecuul nitroalkeen (**1**) aan een molecuul acetaldehyde (**2**) gekoppeld. Dit acetaldehyde molecuul kan of aan de "achterkant" van **1** vastgemaakt worden, wat γ -nitroaldehyde **3** oplevert of aan de "voorkant", wat γ -nitroaldehyde **5** oplevert. Als de mutant A33D de reactie uitvoert wordt vrijwel alleen maar **3** gevormd. Als we de γ -nitroaldehyde (**3** of **5**) willen omzetten naar een GABA-analoog (**4** of **6**), zijn twee chemische stappen nodig. Tijdens deze chemische stappen wordt de NO_2 -groep omgezet in een NH_2 -groep en de CO-groep (aldehyde) in een COOH-groep (carbonzuur). Hoewel deze groepen worden verandert, blijft de ruimtelijk structuur van het molecuul ongewijzigd. Dat wil zeggen dat als de aldehydegroep naar achteren steekt (**3**), de carbonzuurgroep ook naar achteren zal steken in het GABA-analoog (**4**) (zie Fig. 4). Dit is helaas het inactieve enantiomeer van het medicijn. Bij de actieve enantiomeer (**6**) staat deze carbonzuurgroep namelijk juist naar voren. Om dit farmaceutisch relevante enantiomeer te kunnen produceren hebben we dus een 4-OT mutant nodig die de omgekeerde enantioselectiviteit heeft ten opzichte van A33D en waarmee we γ -nitroaldehydes kunnen maken waarbij de aldehyde groep naar voren staat (zoals **5**).



Figuur 4 – Reactievergelijkingen van de 4-OT gekatalyseerde Michael-type additie reacties.

Mutabiliteitslandschap voor enantioselectiviteit

Om inzicht te krijgen in mutaties die de enantioselectiviteit van 4-OT omkeren, hebben we in **Hoofdstuk 2** ook mutabiliteitslandschappen gemaakt voor enantioselectiviteit. Voor zover bij ons bekend, is dit nog nooit eerder gedaan. Door meer dan 1000 enkelvoudige mutanten van 4-OT te analyseren, hebben we verschillende posities in dit enzym in kaart gebracht waar mutaties leidden tot een omkering in enantioselectiviteit. Door verschillende combinaties van deze mutaties te maken, hebben we uiteindelijk een 4-OT mutant gevonden met twee mutaties (M45Y/F50A) die zeer selectief was voor het juiste enantiomeer van de γ -nitroaldehydes (zoals 5). Ook hebben we gezien dat we deze mutant kunnen gebruiken voor de productie van een hele reeks verschillende γ -nitroaldehydes, waarbij in alle gevallen het gewenste enantiomeer gevormd wordt. We kunnen deze M45Y/F50A dus gebruiken voor de productie van de farmaceutisch actieve enantiomeer van verschillende GABA-analogen zoals 6.

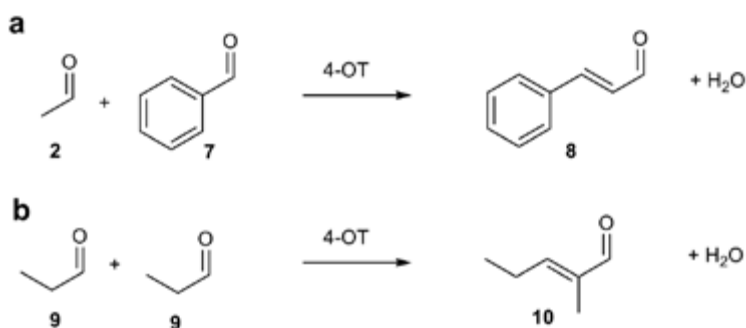
Vervolgens hebben we onderzocht hoe het kan dat deze mutant een omgekeerde enantioselectiviteit heeft ten opzichte van wildtype 4-OT en A33D. Hiervoor hebben we vastgesteld wat het effect van de mutaties M45Y/F50A is op de structuur van 4-OT door middel van röntgendiffractie. Dit is een methode waarbij extreem kleine structuren zichtbaar gemaakt kunnen worden. De resolutie die met deze techniek behaald kan worden is rond de 1 ångstrom. Ter vergelijking; 1 millimeter is 10 miljoen ångstrom. Met de röntgendiffractie kwamen we erachter dat in het actieve centrum van M45Y/F50A een holte geopend is die niet in wildtype 4-OT en A33D zit. Deze holte is precies groot genoeg om een substraat molecuul (een nitroalkeen) te kunnen binden. Het is dus zeer aannemelijk dat deze nieuw geopende holte een rol speelt bij de omgekeerde enantioselectiviteit van M45Y/F50A.

Verbetering van de aldolase activiteit van 4-OT

Zoals gezegd, waren we geïnteresseerd in twee promiscue activiteiten van 4-OT. Enerzijds was dat de Michael-type additie activiteit die hierboven uitgebreid besproken is en anderzijds was dat de aldolase activiteit. In **Hoofdstukken 3 en 4**

hebben we ons gericht op deze aldolase activiteiten. De eerste reactie waar we naar gekeken hebben, is de aldolkoppeling van acetaldehyde (2) en benzaldehyde (7) wat leidt tot cinnamaldehyde (8), een veel gebruikte geur- en smaakstof (Figuur 5a). We hebben opnieuw bijna alle enkelvoudige mutanten van 4-OT geanalyseerd, op zoek naar mutanten met een verbeterde efficiëntie voor deze aldol reactie. Door middel van deze analyse hebben we drie posities gevonden waar mutaties leiden tot verbeterde activiteit, dat waren positie H6, M45 en F50. Deze aminozuurposities liggen alle drie erg dicht bij het actieve centrum van 4-OT. Door op deze drie posities tegelijkertijd (random) alle mogelijke mutaties te maken en de resulterende collectie van mutanten te analyseren voor verhoogde aldolase activiteit, hebben we uiteindelijk een mutant gevonden (H6F/M45T/F50A) die ruim 5000 maal efficiënter was in deze aldolreactie. Opvallend genoeg ging deze sterke verhoging in promiscue aldolase activiteit ten koste van de natuurlijke tautomerase activiteit van deze mutant, deze was namelijk bijna 5000 maal lager.

In **Hoofdstuk 4** hebben we ook gekeken naar de aldolase activiteit van 4-OT. Ditmaal naar de zelf-aldolkoppeling van propanal (9) waarbij 2-methyl-2-pentenal (10) gevormd wordt (zie Fig. 5b). Opnieuw hebben we systematisch gezocht naar enkelvoudige mutanten met een verhoogde activiteit. Weer vonden we dat op posities H6, M45 en F50 mutaties leidden tot verbeterde aldolase activiteit. Echter, nadat we opnieuw tegelijkertijd random mutaties op deze posities gingen maken en deze collectie van mutant gingen analyseren op zoek naar verbeterde mutanten, vonden we een andere mutant dan beschreven in **Hoofdstuk 3**, namelijk M45Y/F50V, die een sterk verbeterde activiteit had voor zelf-aldolkoppelingsreacties. Uit deze resultaten, samen met die uit **hoofdstuk 3**, kan dus worden opgemaakt dat door de juiste mutaties te maken op posities H6, M45 en F50, 4-OT kan worden 'gefinetuned' om specifieke aldolreacties uit te voeren met verschillende substraten.



Figuur 5 – Reactievergelijkingen van de 4-OT gekatalyseerde aldol reacties.

Algemene conclusies en toekomstperspectief

Zoals gezegd hebben we op basis van 4-OT twee enantiocomplementaire 'Michaelases' ontwikkeld. Eén van deze 'Michaelases' (M45Y/F50A) kan gebruikt worden als katalysator voor de synthese van het farmaceutisch relevante enantiomeer van verschillende γ -nitroaldehydes. Hoewel M45Y/F50A het juiste enantiomeer maakt van verschillende γ -nitroaldehydes met een enantiozuiverheid van 62:38 tot 97:3, vereist deze enantioselectiviteit verdere verbetering voordat M45Y/F50A industrieel toegepast zou kunnen worden. Het verbeteren van deze enantioselectiviteit zou gedaan kunnen worden door de reactie condities te optimaliseren. Nu wordt gebruik gemaakt van een mengsel van water/ethanol of water/DSMO om deze reacties in uit te voeren, maar we weten niet wat het effect hiervan is op de enantioselectiviteit van M45Y/F50A. Daarbij komt nog dat wij graag DMSO zouden willen vervangen door een 'groener' co-oplosmiddel dat makkelijker te verwijderen is uit het eindproduct. Om dit te optimaliseren zou een systematische analyse van het effect van verschillende (co-)oplosmiddelen gedaan moeten worden. Daarbij kan bijvoorbeeld gedacht worden aan oplosmiddelen met een laag kookpunt, ionische vloeistoffen of sterk polaire oplosmiddelen die gemakkelijk te verwijderen zijn. De effecten van het gebruik van deze oplosmiddelen op de enantioselectiviteit van M45Y/F50A zouden erg nuttig kunnen blijken. Hierbij is het ook van belang om naar de oplosbaarheid van de substraten (nitroalkenen) te kijken. De lage substraat oplosbaarheid is namelijk één van de beperkende factoren voor industriële toepassing. Een andere aanpak om de enantioselectiviteit van M45Y/F50A te verbeteren, zou kunnen zijn door extra mutaties aan te brengen in dit enzym. Om aminozuur posities te selecteren voor het aanbrengen van mutaties kan gekeken worden naar de structuur van 4-OT, die we hadden opgehelderd met behulp van röntgendiffractie, of naar het mutabiliteitslandschap van 4-OT voor enantioselectiviteit.

Naast verschillende 4-OT mutanten die verbeterde 'Michaelase' of aldolase activiteit hebben, geeft dit proefschrift ook kennis en inzicht over de manier waarop mutabiliteitslandschappen gemaakt en gebruikt kunnen worden om enzymen te verbeteren. Daarnaast is er met dit werk een grote hoeveelheid experimentele mutatie data gegenereerd van 4-OT. Deze data kan gebruikt worden om beschikbare computer tools voor 'enzyme engineering' te valideren en mogelijk verder te verbeteren.

