

University of Groningen

## Creation and evolution of organocatalytic artificial enzymes

Leveson-Gower, Reuben Boddington

DOI:  
[10.33612/diss.821833269](https://doi.org/10.33612/diss.821833269)

**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:*  
2023

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

*Citation for published version (APA):*  
Leveson-Gower, R. B. (2023). *Creation and evolution of organocatalytic artificial enzymes*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.821833269>

### 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.

---

## English Summary

Life requires chemical reactions to occur for all its various functions, and in many of these cases these reactions need to be accelerated because otherwise they would be extremely slow. To do this, nature uses proteins (long chains of amino acids which fold into three dimensional structures) called enzymes which have a specific placement of chemical groups in an arrangement referred to as the 'active site'. Here, chemical compounds may be bound and their reaction is speed-up through interactions with the protein. Remarkably, enzymes can produce a greater degree of acceleration than any catalyst made by human-kind, leading to great interest in using them for our own needs, to make chemicals that are useful for society. However, most enzymes are quite specific about which reactions they catalyse, and are simply not effective for many reactions of societal interest. Therefore, there is a drive to create enzymes that can help accelerate new kinds of reactions, and amongst these efforts is the creation of so-called 'artificial enzymes' which is the topic of this thesis.

This name refers to the unnatural chemical groups which are placed in the 'active site' of such enzymes to impart them with the ability to accelerate reactions which natural enzymes cannot. In many cases, this has involved placing metal ions in the active site, since chemists have discovered many useful reactions which are accelerated by various metals which are not found in nature. In more recent decades, there has been a boom in chemical reactions discovered that can be accelerated by small organic molecules, referred to as 'organocatalysts'. In this thesis, unnatural amino acids containing chemical groups found in organocatalysts were incorporated into an enzyme 'active site', by installing them in the binding pocket of a non-enzymatic protein to create artificial enzymes. Just like natural enzymes, these artificial enzymes can be subjected to evolution in order to make them more efficient catalysts.

In **chapter 1**, an overview of the importance of so-called 'promiscuity' in enzymes (the ability of them to catalyse several different reactions) for allowing them to be used for new types of reactions. In **chapter 2**, an overview of all enzymes, natural and artificial, which catalyse a particular

---

type of chemical reaction called Friedel-Crafts reactions was presented in order to show what value artificial enzymes can bring compared to natural ones.

In **chapter 3**, an artificial enzyme containing an organocatalytic unnatural amino acid called *para*-aminophenylalanine in its active site was shown to catalyse a Friedel-Crafts alkylation and the selectivity and efficiency with which it performed catalysis was improved through evolution. In **chapter 4**, this reactivity was expanded upon by showing that this artificial enzyme can create chirality (that is the property of molecules to be non-superimposable mirror images of one another) in the chemical products it produces by careful delivery of a proton during the reaction.

In **chapter 5**, the evolution of artificial enzymes presented in this thesis and previous works was investigated for a specialisation phenomenon that it produced. The evolved artificial enzymes became much less efficient in accelerating reactions that they were not evolved for throughout evolution. The three-dimensional structure of some of these evolved artificial enzymes was revealed, and computer simulations were used to understand how chemicals may bind in their 'active sites'.

In **chapter 6**, an unnatural amino acid containing boron, the fifth element in the periodic table was used to create an artificial enzyme. This is a particularly significant development because no enzyme in nature contains boron. By installing *para*-boronophenylalanine in the 'active site' chemical reactions were accelerated by this artificial enzyme which occur by mechanisms which are not known in natural enzymes, and again the performance was improved by evolution.





---

## Nederlandse Samenvatting

Leven is afhankelijk van chemische reacties die allerlei verschillende functies mogelijk maken, en veel van deze reacties moeten worden versneld omdat ze anders extreem traag zouden zijn. Om dit te bereiken gebruikt de natuur eiwitten (lange ketens van aminozuren die zich vouwen in driedimensionale structuren) genaamd enzymen, die een specifieke organisatie van chemische groepen hebben die het 'actieve centrum' of 'active site' wordt genoemd. Hier kunnen stoffen binden en door de interacties met het enzym kunnen de reacties met die stoffen worden versneld. Wat enzymen zeer bijzonder maakt is dat ze een grotere mate van versnelling kunnen teweegbrengen dan welke door mens gemaakte katalysator dan ook, en dit leidt tot veel interesse voor de toepassing van enzymen voor andere doeleinden, om chemicaliën te maken die nuttig zijn voor de samenleving. De meeste enzymen zijn echter vrij specifiek in welke reacties ze kunnen katalyseren, en zijn simpelweg niet effectief voor veel reacties van maatschappelijk belang. Daarom is er een verlangen om enzymen te creëren die nieuwe soorten reacties kunnen versnellen, en onder deze inspanningen valt het ontwikkelen van zogenaamde 'kunstmatige enzymen' of 'artificial enzymes', het onderwerp van dit proefschrift.

Deze term verwijst naar de onnatuurlijke chemische groepen die in het 'actieve centrum' van dergelijke enzymen worden geplaatst om hen het vermogen te geven reacties te versnellen die natuurlijke enzymen niet kunnen versnellen. In veel gevallen gaat het om het plaatsen van metaalionen in het actieve centrum, aangezien chemici veel nuttige reacties hebben ontdekt die worden versneld door verschillende metalen die niet in de natuur worden gevonden. In de afgelopen decennia is er een explosieve groei geweest van ontdekte chemische reacties die kunnen worden versneld door kleine organische moleculen, die 'organokatalysatoren' worden genoemd. In dit proefschrift werden onnatuurlijke aminozuren met chemische groepen die in organokatalysatoren voorkomen opgenomen in het 'actieve centrum' van een enzym, door ze in het actieve centrum van een niet-enzymatisch eiwit te installeren om zo kunstmatige enzymen te creëren. Net als natuurlijke

---

enzymen kunnen deze kunstmatige enzymen worden onderworpen aan evolutie om ze efficiëntere katalysatoren te maken.

In **hoofdstuk 1** is een overzicht gegeven van het belang van zogenaamde ‘promiscuïteit’ in enzymen (hun vermogen om verschillende reacties te katalyseren) om ze te gebruiken voor nieuwe soorten reacties. In **hoofdstuk 2** geeft een overzicht van alle enzymen, zowel natuurlijke als kunstmatige, die een bepaald type chemische reactie genaamd Friedel-Crafts-reacties katalyseren, om te laten zien welke waarde kunstmatige enzymen kunnen brengen in vergelijking met natuurlijke enzymen.

In **hoofdstuk 3** werd aangetoond dat een kunstmatig enzym met een organokatalytisch onnatuurlijk aminozuur genaamd para-aminofenylalanine in zijn actieve centrum een Friedel-Crafts-alkylering kan katalyseren, en de selectiviteit en efficiëntie waarmee het katalyse uitvoerde, werd verbeterd door evolutie. In **hoofdstuk 4** werd deze reactiviteit uitgebreid door te laten zien dat dit kunstmatige enzym chiraliteit kan creëren (dat wil zeggen, de eigenschap van moleculen om niet-passende spiegelbeelden van elkaar te zijn) in de chemische producten die het produceert door zorgvuldige afgifte van een proton tijdens de reactie.

In **hoofdstuk 5** werd de evolutie van kunstmatige enzymen die in dit proefschrift en eerdere werken werden gepresenteerd, onderzocht op een specialisatiefenomeen dat plaatsvond. De geëvolueerde kunstmatige enzymen werden veel minder efficiënt in het versnellen van reacties waar ze niet voor waren geëvolueerd gedurende de evolutie. De driedimensionale structuur van sommige van deze geëvolueerde kunstmatige enzymen werd onthuld, en computersimulaties werden gebruikt om te begrijpen hoe chemicaliën kunnen binden in hun ‘actieve centra’.

In **hoofdstuk 6** werd een onnatuurlijk aminozuur met boor, het vijfde element in het periodiek systeem, gebruikt om een kunstmatig enzym te creëren. Dit is een bijzonder significante ontwikkeling omdat er geen enzymen in de natuur boor bevatten. Door para-boronofenylalanine in het ‘actieve centrum’ te installeren, werden chemische reacties versneld door dit kunstmatige enzym, die plaatsvonden via mechanismen die niet bekend zijn in natuurlijke enzymen, en opnieuw werd de prestatie verbeterd door

---

evolutie.



