

Structural investigation of a computationally designed and in vitro optimized retro-aldol enzyme

Doctoral Thesis

Author(s):

Caner, Sami

Publication date:

2011

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006666879>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 19942

**STRUCTURAL INVESTIGATION OF A
COMPUTATIONALLY DESIGNED AND *IN VITRO* OPTIMIZED
RETRO-ALDOL ENZYME**

A dissertation submitted to

ETH ZÜRICH

for the degree of

Doctor of Sciences (Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

Sami Caner

Dipl.-Biol. Universität Heidelberg

born February 16th, 1977

citizen of

Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Nenad Ban, Examiner

Prof. Dr. Raimund Dutzler, Co-Examiner

Prof. Dr. Donald Hilvert, Co-Examiner

2011

Summary

Enzymes catalyze essential chemical reactions in every living organism. Without them, the reactions they accelerate would take too long to sustain life. That is why enzymes are exceptional molecules that recognize substrates with high specificity and catalyze reactions with high efficiency. If it were possible to efficiently design these biomolecules, many possibilities would emerge in biological, chemical, and medical applications. There are currently some promising approaches that strive to create enzymes from scratch, capable of catalyzing any desired reaction. One of these approaches involves computationally designing enzymatic motifs, which are subsequently fitted into an existing inert protein scaffold. Once measurable activity is accomplished by this technique, *in vitro* evolution methods can be employed to refine the computer-derived model. Although some success has been achieved with this dual approach, the large gap in activity between natural and designed enzymes is still a major limitation for research in this field. Because of this, only few model systems exist to date, for investigating the structure-function relationship of biocatalysis. Since nature has created many super-efficient enzymes by evolution, protein engineers often start their design with one of the reactions catalyzed by these enzymes as the basis for their design. Today's large abundance of structural and sequence information is an excellent starting point for the creation of such designs.

The retro-aldol reaction is currently one of the favorite reactions chosen for enzyme design studies. Retro-aldol enzymes are particularly interesting, because they provide a mechanism for C-C bond cleavage, which can be potentially used in pharmaceutical synthesis and various other industrial applications. In light of the current research struggling to improve the catalytic proficiency of designed enzymes our collaborators (Lars Giger, group of Prof. Donald Hilvert, ETH Zürich, Switzerland) demonstrated that it was possible to evolve computationally designed retro-aldol enzymes to achieve levels of efficiency far better from what has been previously reached for this model system (Jiang et al. 2008). To understand this significant boost in catalytic efficiency, we investigated the *in vitro* evolved aldolase (RA95.5-5) by X-ray

crystallography. Surprisingly, we discovered that this enzyme employed an active site that was not part of the *in silico* design. Since the examined aldolase represented a highly evolved enzyme version, we decided to trace back structural changes in the preceding enzyme variants along the series of evolutionary steps that gave rise to the alternative active site and the significant increase in catalytic efficiency. For this purpose, two additional aldolase variants were purified, crystallized and the structures were determined by X-ray crystallography. All of the obtained aldolase crystals diffracted to high resolution. The structure of the enzyme obtained by the initial computational design reveals that the active site geometry deviates from the prediction. Furthermore, the *in vitro* evolved enzyme structures explain how the introduced mutations gave rise to the alternative catalytic site and eventually rendered the designed site inactive. Our results demonstrate why the design failed to generate the predicted active site. Furthermore, the structures of the evolved enzymes allow identifying the determinants, which led to the significant activity increase, with implications for our understanding of enzyme design principles and the evolution of enzymatic active sites.

Zusammenfassung

Enzyme katalysieren essentielle chemische Reaktionen in allen Lebewesen. Ohne sie würden die Reaktionen, die sie katalysieren zu viel Zeit beanspruchen, um Leben zu erhalten. Die unübertroffene Spezifität gegenüber Substraten bei gleichzeitig hoher katalytischer Effizienz macht Enzyme zu aussergewöhnlichen Biomolekülen. Wäre man in der Lage diese Moleküle effizient selber zu konstruieren, dann gäbe es viele Möglichkeiten für biologische, chemische und medizinische Anwendungen. Zurzeit existieren einige vielversprechende Methoden um Enzyme für beliebige Reaktionen zu kreieren. Eine dieser Methoden ist das computergestützte Design eines enzymatischen Motifs, welches in ein inertes Proteingerüst modelliert wird. Sobald mit dieser Methode ein Enzym mit signifikanter Aktivität erzeugt wurde, kann das computergenerierte Modell mit Evolutionsmethoden optimiert werden. Trotz einiger vielversprechender Ergebnisse mit diesem dualen Ansatz, ist man immer noch weit von der katalytischen Effizienz natürlicher Enzyme entfernt. Aus diesem Grund versucht man mit Hilfe von Modellsystemen mehr Details über die Struktur-Funktions-Beziehung von Biokatalysatoren zu erfahren. In der Natur existieren sogenannte „Super-effiziente Enzyme“, die aufgrund ihrer besonders hohen katalytischen Effizienz als Basis für Designstudien verwendet werden. Zudem stehen umfangreiche Struktur- und Sequenzinformationen zur Verfügung, die eine exzellente Hilfestellung für Proteindesignstudien bieten.

Derzeit ist die Retro-Aldol Reaktion eine der populärsten Reaktionen in Enzymdesignstudien. Retro-Aldol Enzyme sind besonders interessant, weil sie einen Mechanismus für die Spaltung von C-C Bindungen aufzeigen, welche für pharmazeutische Synthesen und andere industrielle Anwendungen nützlich sein können. Um die katalytische Leistung von designten Enzymen zu verbessern, haben unsere Kollaborationspartner (Lars Giger, aus der Gruppe von Prof. Donald Hilvert, ETH Zürich, Schweiz) mit Hilfe von *in vitro* Evolution gezeigt, dass die Effizienz des untersuchten *in silico* designten Retro-aldol Enzyms signifikant verbessert werden konnte. Die Effizienz dieser evolvierten Aldolasen lag dabei höher, als bisher für dieses Modellsystem erreicht werden konnte (Jiang, Althoff et al. 2008). Um diesen signifikanten Anstieg in katalytischer

Effizienz besser zu verstehen, haben wir die Struktur der *in vitro* evolvierten Aldolase (RA95.5-5) mittels Röntgenkristallografie gelöst. Die Kristallstruktur zeigte überraschenderweise, dass das Enzym ein Reaktionszentrum besitzt, welches nicht im computergenerierten Modell vorgesehen war. Da die untersuchte Aldolase eine in hohem Masse evolvierte Enzymversion darstellte, entschieden wir uns in den Vorläuferenzymen aus der Optimierungsstrategie nach strukturellen Veränderungen zu suchen, die letztendlich zu der unerwarteten Änderung des Reaktionszentrums führte. Zu diesem Zweck wurden zwei weitere Aldolase-Varianten gereinigt, kristallisiert und deren Strukturen bei hoher Auflösung gelöst. Die Struktur des Enzyms, welches durch das Computermodell entstanden ist zeigte auf, dass die Geometrie des aktiven Zentrums von dem vorhergesagten Modell abweicht. Weiter erklären die *in vitro* evolvierten Strukturen, wie die eingeführten Mutationen zu dem alternativen Reaktionszentrum führten und zudem das designte Zentrum inaktivierten. Unsere Ergebnisse demonstrieren, weshalb das computergenerierte Designmodell nicht das vorhergesagte Reaktionszentrum aufweist. Zudem zeigen die evolvierten Enzymstrukturen Determinanten, welche zu der signifikanten Aktivitätssteigerung führten. Diese liefern zugleich Anhaltspunkte für das Verständnis von Enzymdesignprinzipien und Evolution von enzymatischen Reaktionszentren.