

University of Groningen

Exploiting Catalytic Promiscuity for Biocatalysis

Miao, Yufeng

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:
2015

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

Citation for published version (APA):

Miao, Y. (2015). *Exploiting Catalytic Promiscuity for Biocatalysis: Carbon-Carbon Bond Formation by a Proline-Based Tautomerase*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of 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

Sleutelen aan de ‘duistere kant’ van een enzym

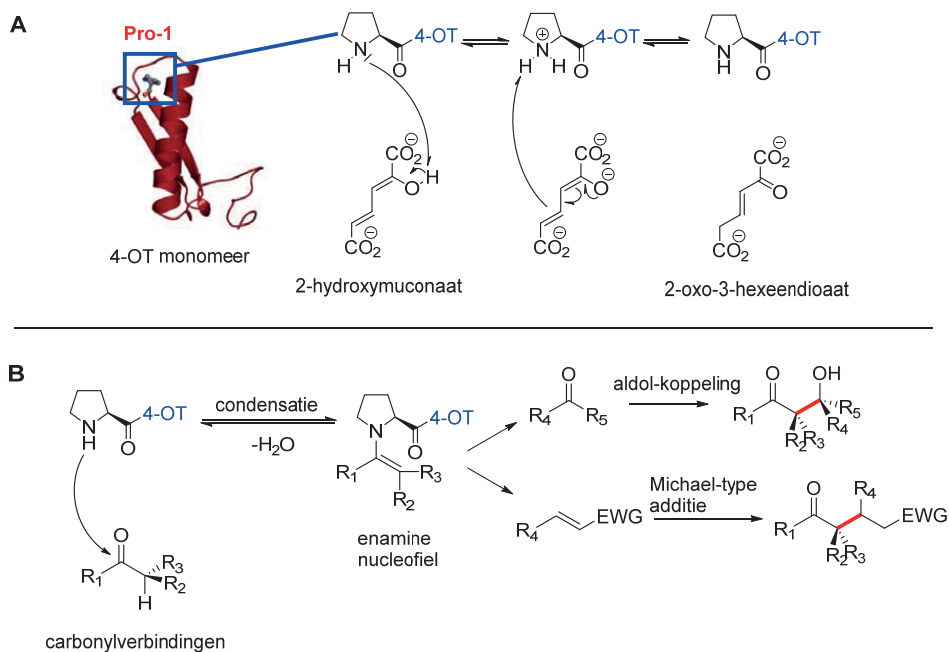
Zoals in zoveel biochemieboeken wordt beschreven, zijn enzymen specifieke katalysatoren, zowel voor de reacties die ze katalyseren als voor de substraten waar ze op ageren. Toch zijn er enzymen ontdekt die andere reacties katalyseren dan degene waarvoor ze zijn geëvolueerd, of die substraten accepteren die anders zijn dan hun natuurlijke substraat. Dit fenomeen wordt gedefinieerd als enzym promiscuïteit. Langetijd werd enzym promiscuïteit gezien als de ‘duistere kant’ van enzymkatalyse, immers, deze secundaire activiteiten kunnen leiden tot de vorming van ongewenste bijproducten. Tegenwoordig wordt dat anders gezien, promiscuïteit vormt juist een bron van nieuwe enzymatische activiteiten waarmee chemische transformaties kunnen worden gerealiseerd die uitdagend zijn en bruikbare producten op kunnen leveren. Veel enzymen trekken daarom de aandacht juist vanwege de promiscue activiteiten die ze bezitten. Bijvoorbeeld trypsine, dit is een klassiek voorbeeld van een zeer specifiek enzym omdat het enkel een peptidebinding verbreekt aan de carbonyl-zijde van lysine en arginine residuen. Trypsine wordt echter ook gebruikt vanwege de promiscue C-C binding vormende reacties die het kan katalyseren. Enzym promiscuïteit heeft een grote bijdrage geleverd aan het verruimen van de ‘toolbox’ voor het ontwikkelen van praktisch toepasbare enzymen. Sleutelen aan de ‘duistere zijde’ van enzymkatalyse middels rationele of willekeurige mutagenese is een beproefde methode geworden voor het ontwikkelen van nieuwe biokatalysatoren.

In het recente verleden zijn verschillende biokatalytische procedures gerapporteerd die gebaseerd zijn op enzym promiscuïteit, zoals prominente voorbeelden van C-C binding vormende reacties waaronder aldol-koppeling, Michael(-type) addities, Mannich, Henry en Knoevenagel condensatie reacties. Hoewel de meerderheid van promiscue enzymen een beperkt substraatbereik en een slechte enantioselectiviteit bezit, zijn in de afgelopen vijftig jaar toch een paar enzymen beschreven die een goede enantioselectiviteit bezitten voor de promiscue C-C binding vormende reacties die ze katalyseren. Deze promiscue enzymen kunnen worden gebruikt als startpunt voor de evolutie van efficiënte biokatalysatoren voor toepassing in de synthese van waardevolle, chirale producten (**Hoofdstuk 1**).

Een N-terminale proline: de schoonheid van 4-oxalocrotonaat tautomerase (4-OT)

De meeste biokatalytische procedures die zijn gebaseerd op enzym promiscuïteit zijn ontwikkeld door naar de gewenste activiteiten te zoeken in een collectie van commercieel verkrijgbare enzymen. De niet-natuurlijke C-C binding vormende activiteit van 4-OT werd daarentegen ontdekt door een vooraf beredeneerd mechanisme. Het enzym 4-OT is een lid van de tautomerase superfamilie en maakt deel uit van een katabole route voor de afbraak van aromaten in *Pseudomonas putida* mt-2. In deze route katalyseert het de omzetting van 2-hydroxymuconaat naar 2-oxo-3-hexendioaat (Figuur 1A). 4-OT is een homohexameer, het is een klein enzym (62 residuen per monomeer) en wordt gekarakteriseerd door de aanwezigheid van een N-terminaal proline residu in de active site.





Figuur 1. De natuurlijke tautomerisatie reactie (A) en de voorgestelde C-C binding vormende reacties (B) gekatalyseerd door 4-OT. Ter verduidelijking wordt de β - α - β -bouwsteen met N-terminale proline weergegeven (in plaats van het functionele homohexameer). EWG, elektron zuigende groep.

Geïnspireerd door het succes van proline en derivaten van proline als organokatalysatoren in asymmetrische enamine katalyse, hebben wij onderzocht of het Pro-1 residu van 4-OT, dat de juiste protoneringstoestand heeft ($pK_a \sim 6.4$) om als nucleofiel op te treden bij neutrale pH, enamines kan vormen met carbonylverbindingen. Een dergelijk enzymatisch gegenereerd enamine zou dan vervolgens verschillende C-C binding vormende reacties kunnen ondergaan door te reageren met elektrofielen (Figuur 1B). Door het enamine te vangen middels $NaCNBH_3$, gevolgd door analyse middels massaspectrometrie hebben wij kunnen aantonen dat Pro-1 van 4-OT inderdaad kan reageren met aldehyden en ketonen om enamines te vormen. Na het testen met verschillende potentiële elektrofielen kon vervolgens worden aangetoond dat 4-OT inderdaad C-C binding vormende reacties katalyseert, waaronder de Michael-type additie van acetaldehyde aan *trans*-nitrostyreen en de aldolcondensatie van acetaldehyde en benzaldehyde.

4-OT is de nieuwe ‘Michaelase’ van de tautomerase superfamilie

Aangespoord door de ontdekking van de door 4-OT gekatalyseerde Michael-type additie van acetaldehyde aan *trans*-nitrostyreen, hebben wij ons gefocust op het substraatbereik van 4-OT voor deze synthetisch nuttige reactie. Als eerste hebben we het bereik van de enamine-donoren onderzocht en kwamen tot de ontdekking dat lineaire aldehydes van

acetaldehyde tot octanal door 4-OT worden geaccepteerd als donor-substraten voor de additie aan *trans*-nitrostyreen. In alle relevante gevallen werd het syn-isomeer verkregen als meest voorkomende diastereoisomeer, wat in overeenstemming is met het model voor de transitietoestand zoals voorgesteld voor asymmetrische Michael-type addities van aldehydes aan nitro-olefines. Als algemene trend hebben we geobserveerd dat met toenemende lengte van de lineaire aldehyde-donor, de reactiesnelheid en enantioselectiviteit van 4-OT wordt verlaagd (**Hoofdstuk 2**). Vervolgens hebben we het bereik van de elektrofiel-acceptor (het elektrofiel substraat) onderzocht middels een serie aromatische en alifatische nitro-olefines. Tot onze verbazing werd een groot aantal nitro-olefines door 4-OT geaccepteerd als Michael-acceptoren in reacties met acetaldehyde, resulterend in γ -nitroaldehydes in hoge opbrengst (tot 74%) met een goede tot excellente enantiozuiverheid (tot 98% *ee*). Deze γ -nitroaldehydes zijn waardevolle precursors voor verschillende reeds op de markt gebrachte GABA-based pharmaceuticals zoals phenibut (kalmeringsmiddel), baclofen (spierverlapper, middel tegen alcoholverslaving) en pregabalin (anti-epilepticum) (**Hoofdstuk 3 en 4**). Dit betekent dat de synthesesmethode die wij ontwikkeld hebben een waardevolle biokatalytische benadering is voor de Michael-type addities van aldehydes aan nitro-olefines in waterhoudende oplosmiddelsystemen. De reacties worden op promiscue wijze gekatalyseerd door een tautomerase, omvatten een breed scala aan donor-acceptorsubstraten, en vinden plaats met hoge stereoselectiviteit. Om deze op 4-OT gebaseerde methodologie voor het produceren van nuttige γ -nitroaldehydes verder te verbeteren, hebben wij substraat engineering toegepast door verschillende *ortho*-, *meta*- en *para*-gesubstitueerde nitrostyreenderivaten te testen voor de Michael-type additie van acetaldehyde. Intrigerend genoeg bleken alle onderzochte derivaten als substraat te worden geaccepteerd door 4-OT voor acetaldehyde addities, wat in hoge mate enantioverrijke (*R*)- en (*S*)- γ -nitroaldehydes (tot aan 97 en 95% *ee*, respectievelijk) opleverde met goede tot excellente opbrengsten (tot 96%). De aanwezigheid van elektron zuigende of donerende substituenten op de aromatische ring van het substraat lijken de reactiesnelheid van deze door 4-OT gekatalyseerde reacties te beïnvloeden. Over het algemeen kan worden gezegd dat elektrondonerende groepen zoals methoxyl- en hydroxylgroepen op de aromatische ring van het substraat de reactiesnelheid van de gekatalyseerde reactie verhogen en daarmee de reactietijd verlagen, terwijl electronzuigende substituenten het tegenovergestelde effect hebben. De enantioselectiviteit bleek te worden beïnvloed door de positie van de substituenten. Als algemene trend werd geobserveerd dat substituties op de *meta*-positie van het substraat de enantioselectiviteit van 4-OT licht verhogen terwijl *para*-substituties deze juist verlagen. Een interessante observatie was dat substituties op de *ortho*-positie op de aromatische ring van het substraat juist een tegenovergestelde enantioselectiviteit van 4-OT opleveren wat de formatie van (*S*)- γ -nitroaldehydes tot gevolg heeft, wat vermoedelijk wordt veroorzaakt door een stereo-afschermend effect (**Hoofdstuk 5**).



Nog een sprekend voorbeeld van enzym promiscuïteit: de aldolase-activiteit van 4-OT

De aldolcondensatie tussen acetaldehyde en benzaldehyde welke cinnamaldehyde als product oplevert, is een andere door 4-OT gekatalyseerde C-C binding vormende reactie die wij voorheen hebben ontdekt. Recent hebben wij aangetoond dat zowel de aldol-koppeling als de aldol-dehydratie worden gekatalyseerd door 4-OT. Deze lage aldolase activiteit van 4-OT kan met een factor 600 worden verhoogd in termen van katalytische efficiëntie (k_{cat}/K_m) door middel van slechts één enkele puntmutatie (F50A). Omdat de aldolreactie één van de meest breed toegepaste C-C binding vormende reacties is binnen de organische chemie, zijn wij begonnen om de substraatscope van de door 4-OT gekatalyseerde aldolreacties in kaart te brengen. We hebben ontdekt dat 4-OT verschillende typen aldolreacties katalyseert waaronder de zelfcondensatie van propanal, de koppeling van propanal en benzaldehyde en propanal en pyruvaat en de intramoleculaire cyclisatie van hexaandial en heptaandial. In alle gevallen vertoonde de F50A mutant verhoogde aldolase activiteit in vergelijking met wild type 4-OT. In aanvulling hierop hebben we eveneens de H-D uitwisseling van de zure protonen van de onderzochte aldehyde- en keton-substraten geobserveerd, welke wordt gekatalyseerd door 4-OT en volledig afhankelijk is van het katalytisch Pro-1 residu van 4-OT. Deze H-D uitwisselingsactiviteit geeft aan dat de active site van 4-OT carbonylverbindingen kan deprotoneren, wat verder bewijs is voor een mechanisme van de door 4-OT gekatalyseerde aldol- en Michael-type reacties waarbij het aldehyde substraat voor nucleofiele additie wordt geactiveerd door middel van Pro-1-afhankelijke formatie van een enamine (of enolaat-anion) intermediair (**Hoofdstuk 6**).

Conclusies en uitdagingen voor de toekomst

Samenvattend kan worden gezegd dat de resultaten in dit proefschrift een nieuwe biokatalytische methodologie demonstreren voor C-C binding formatie in waterige media middels het enzym 4-OT, dat een hoge stereospecificiteit en een groot substraatbereik bezit. Deze enzym gebaseerde methodologie heeft de potentie om te worden geïmplementeerd in industriële toepassingen en wel om de volgende redenen: 1) biokatalytische en enantioselectieve C-C binding vormende Michael-type addities zijn zeldzaam; 2) enzymen die een aldol-additie gevolgd door een dehydratiestap kunnen katalyseren zijn bepaald niet veelvoorkomend; en 3) de γ -nitroaldehyde producten van de door 4-OT gekatalyseerde Michael-type addities zijn waardevolle precursors voor een aantal op de markt gebrachte GABA-gebaseerde medicijnen waaronder pregabalin, het actieve ingrediënt van Lyrica (wereldwijde omzet: 4.6 miljard Amerikaanse dollars in 2013). Desalniettemin bestaan er verschillende uitdagingen die geadresseerd moeten worden om 4-OT te ontwikkelen tot een voor de industrie toepasbare biokatalysator. Ten eerste is de reactiesnelheid van de door 4-OT gekatalyseerde aldol- en Michael-type reacties lager ($k_{\text{cat}} \ll 1 \text{ s}^{-1}$) dan de standaard voor industriële biokatalysatoren, waardoor het momenteel nog niet kosteneffectief is voor industriële toepassingen. Het is daarom absoluut noodzakelijk om deze niet-natuurlijke

activiteiten van 4-OT te verhogen. ‘Random’ mutagenesetechnieken, zoals error-prone PCR, of het construeren van complete ‘protein mutability landscapes’, kunnen worden gebruikt om functionele ‘hotspots’ in 4-OT te lokaliseren. ‘Site-saturation’ mutagenese of ‘combinatorial libraries’ kunnen worden samengesteld op basis van geïdentificeerde ‘hotspots’ welke dan kunnen worden gescreend voor 4-OT varianten met verhoogde activiteit. Ook kan mutagenese gebaseerd op 3D kristalstructuren worden toegepast wanneer kristalstructuren van 4-OT in complex met deze onnatuurlijke substraten in de toekomst beschikbaar zullen komen. Ten tweede behoren veel van de chirale ‘GABA-based pharmaceuticals’ tot de γ -aminozuren en de biologische activiteit van deze medicijnen is vaak afhankelijk van de configuratie van hun chirale centra. Helaas bezitten de γ -nitroaldehydes die wij met 4-OT produceren niet de juiste stereochemie om te kunnen worden omgezet in actieve GABA-analogen. Dit houdt in dat, om deze waardevolle farmaceutische precursors te kunnen synthetiseren, wij de stereoselectiviteit van 4-OT moeten omkeren om de gewenste enantiomeren in handen te kunnen krijgen. ‘Enzyme engineering’ zou een goede optie zijn om dit te kunnen bereiken, aangezien veel succesvolle voorbeelden van het omkeren van de enantioselectiviteit van een enzym middels directed evolution in de literatuur te vinden zijn. Ten derde, om de bestaande procedures te vereenvoudigen en de efficiëntie van vervolgstappen te optimaliseren, is het essentieel om de co-solvent en pH-condities van de reactiemedia te optimaliseren. Op dit moment wordt DMSO (tot 50% v/v) gebruikt als co-solvent voor verschillende 4-OT gekatalyseerde Michael-type additiereacties, waardoor hogere concentraties van de uitgangsstoffen (de nitroalkenen) kunnen worden toegepast in waterige reactiemedia. Aangezien DMSO relatief kostbaar is en het verwijderen van dit oplosmiddel met een hoog kookpunt (189 °C) uit het reactiemedium arbeidsintensief is, wordt het vinden van milieuvriendelijke en meer economische co-solvents essentieel voor het verder ontwikkelen van deze 4-OT-methodologie naar een toepasbaar niveau. Wanneer nodig, zijn ‘enzyme engineering’, enzym immobilisatie en/of het gebruik van tweefasensystemen goede opties om de stabiliteit en compatibiliteit van 4-OT te verbeteren voor nieuw geselecteerde co-solvents. Wanneer de snelheid van de gekatalyseerde reactie, de enantioselectiviteit en de operationele stabiliteit van 4-OT in de toekomst met succes kunnen worden verbeterd zodat aan de eisen voor industriële toepassing op grote schaal kan worden voldaan, dan beschikken we niet alleen over een praktische biokatalysator voor synthetisch nuttige C-C binding vormende reacties, maar zullen we ook waardevolle kennis hebben vergaard over hoe promiscue activiteiten van enzymen kunnen worden geïdentificeerd en verhoogd, welke kunnen worden gebruikt in de ontwikkeling van nieuwe biokatalysatoren.



