

University of Groningen

## Biocatalytic asymmetric hydroamination by native and engineered carbon-nitrogen lyases

Zhang, Jieli

DOI:  
[10.33612/diss.93007154](https://doi.org/10.33612/diss.93007154)

**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:*  
2019

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

*Citation for published version (APA):*

Zhang, J. (2019). *Biocatalytic asymmetric hydroamination by native and engineered carbon-nitrogen lyases: new enzymes to prepare amino acid precursors to pharmaceuticals and food additives*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.93007154>

### 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

Biokatalyse behelst het gebruik van enzymen of micro-organismen als katalysatoren om chemische reacties te versnellen. De toepassing van enzymen als katalysator biedt meerdere voordelen, zoals een hoge katalytische efficiëntie, goede chemo-, regio- en stereoselectiviteit, milde procescondities en de optie tot verdere aanpassing via moleculair biologische modificaties. Dit alles heeft sterk de aandacht getrokken van zowel de academische wereld als het bedrijfsleven met als resultaat een toenemende inzet van biokatalyse voor chemische synthese. De afgelopen jaren hebben snelle vorderingen laten zien in de biokatalyse waarmee dit inmiddels een algemeen aanvaarde strategie is geworden voor de duurzame en opschaalbare productie van belangrijke organische moleculen, met name farmaceutisch relevante verbindingen. Ontwikkelingen in gerichte evolutie, high throughput screening, bioinformatica en *in silico* ontwerpen hebben de ontdekking en engineering van enzymen sterk versneld resulterend in efficiënte biokatalysatoren met gewenste eigenschappen en hoge selectiviteit voor een bepaalde synthetische stap.

Koolstof-stikstof-lyasen (C-N-lyasen) zijn enzymen die de splitsing van C-N-bindingen katalyseren door een  $\alpha,\beta$ -eliminatiereactie, waarbij  $\alpha,\beta$ -onverzadigde moleculen als producten worden verkregen. C-N-lyasen kunnen ook in omgekeerde richting werken en dus worden gebruikt als synthetische enzymen in C-N-bindingsvormende reacties. Deze enzymen zijn te vinden in een breed spectrum van prokaryote en eukaryote organismen, met een enorme diversiteit aan structurele en mechanistische kenmerken. C-N-lyasen vertonen een groot potentieel als biokatalytische hulpmiddelen voor asymmetrische synthese van niet-natuurlijke  $\alpha$ - en  $\beta$ -aminozuren door middel van hydro-aminering van eenvoudige onverzadigde carbonzuren. Ondanks hun grote synthetische potentieel, zijn slechts een paar C-N-bindingsvormende lyasen geïdentificeerd en gekarakteriseerd met betrekking tot hun substraatspecificiteit en synthetische bruikbaarheid. Het ontwikkelen van nieuwe C-N-lyasen als effectieve C-N-bindingsvormende biokatalysatoren door enzym discovery en engineering, evenals het uitbreiden van de synthetische toepassingen van deze fascinerende groep enzymen, zijn veelbelovende thema's voor onderzoek.

In **hoofdstuk 1** hebben we de biochemische eigenschappen, structuren en katalytische mechanismen besproken van twee biotechnologisch relevante C-N-lyasen, MAL en EDDS-lyase. We bespraken recente synthetische toepassingen van deze twee enzymen bij het bereiden van een breed scala aan L-asparaginezuurderivaten en het bouwen van complexe verbindingen van farmaceutisch en nutraceutisch belang door chemoenzymatische en multienzymatische cascades.

Met het werk beschreven in **hoofdstuk 2**, hebben we EDDS-lyase van *Chelativorans* sp. BNC1 onderzocht als biokatalysator voor (chemo) enzymatische asymmetrische synthese van de belangrijke natuurlijke schimmelproducten aspergillomarasmine A (AMA),

aspergillomarasmine B (AMB) en toxine A, evenals verwante verbindingen. AMA is een krachtige remmer van metallo- $\beta$ -lactamasen zoals NDM-1 en VIM-2, die algemeen worden beschouwd als een belangrijke oorzaak van bacteriële resistentie tegen  $\beta$ -lactam-antibiotica, een van de grootste bedreigingen voor de wereldwijde gezondheid. Aangezien AMA moeilijk chemisch te synthetiseren is, gebruiken wij EDDS-lyase om de koppeling van verschillende aminozuren aan fumaarzuur te katalyseren en zodoende toxine A, de biosynthetische voorloper van AMA, en zeven analogen van toxine A, met hoge omzetting (91- 98%), goede opbrengst (34-82%) en uitstekende regio- en stereoselectiviteit (d.e. >98%, e.e. >99%) te maken. Op basis van dit biokatalytische proces werd een één-pot chemoenzymatische synthetische strategie ontwikkeld voor snelle derivatisering van toxine A en verwante verbindingen door chemische N-alkylering met behulp van broomazijnzuur en broompropaanzuur, waarbij AMB en twee derivaten worden gegenereerd met slechts twee synthetische stappen. Tenslotte werd de biokatalytische synthese van AMA, AMB of derivaten in één asymmetrische stap uitgevoerd door de regio- en stereoselectieve toevoeging van retrosynthetisch ontworpen aminozuursubstraten aan fumaarzuur door EDDS-lyase. Reacties gaven 65-80% omzetting en enzymatische producten werden geïsoleerd met een opbrengst van 20-47% en in de gewenste absolute configuratie (>98% d.e.). Samengevat hebben we aangetoond dat EDDS-lyase een belangrijk synthetisch hulpmiddel is voor de (chemo) enzymatische synthese van de biologisch actieve aminocarbonzuren AMA, AMB, toxine A en hun derivaten. EDDS-lyase vertoont een breed aminebereik, inclusief structureel verschillende aminozuren, en een uitstekende regio- en stereoselectiviteit. Als zodanig heeft dit C-N-lyase een groot potentieel voor praktische synthese van optisch zuivere (metaalchelerende) aminocarbonzuren.

Om onze kennis van EDDS-lyase te verbreden, hebben we EDDS-lyase afkomstig van *Chelativorans* sp. BNC1 gekloneerd en gekarakteriseerd, en voerden we structurele en mechanistische studies uit (**Hoofdstuk 3**). Het gezuiverde EDDS-lyase katalyseerde reversibel een sequentiële tweestaps-aminering van fumaarzuur met ethyleendiamine resulterend in de natuurlijke metaalchelator (*S,S*)-EDDS. EDDS-lyase vertoonde een breed substraatbereik voor een verscheidenheid aan mono- en diaminen. Kristalstructuren van EDDS-lyase in natieve vorm en in complex met formiaat, succinaat, fumaraat, AEAA en (*S,S*)-EDDS werden bepaald, hetgeen onthulde dat het enzym een tertiaire en quaternaire structuur heeft die kenmerkend is voor leden van de aspartase/fumarase-superfamilie. Een algemeen door base gekatalyseerd deamineringsmechanisme wordt door ons gesuggereerd, waarbij een enediolaat-tussenproduct betrokken is dat sterk gestabiliseerd is door waterstofbinding met actieve structurele residuen. Dit werk verbreedt ons begrip van de mechanistische diversiteit binnen de aspartase/fumarase-superfamilie en zal helpen bij de optimalisatie van EDDS-lyase voor asymmetrische synthese van waardevolle aminocarbonzuren. In **Hoofdstuk 4** hebben we het substraatspectrum van de MAL-Q73A-mutant en EDDS-lyase onderzocht in de richting van ring-gesubstitueerde amines voor biokatalytische asymmetrische synthese van N-cycloalkyl-gesubstitueerde L-asparaginezuren. Ringvormige verbindingen, vooral heterocycli, zijn goede modificatoren van eigenschappen

en biologische activiteiten van chemische moleculen. We evalueerden een reeks homo- en heterocyaloalkylamines gesubstitueerd met vier-, vijf- en zesledige ringen voor selectieve enzymatische additie aan fumaarzuur. De MAL-Q73A-mutant vertoonde een betrekkelijk smalle reikwijdte voor cycloalkylaminen, waarbij slechts drie geteste aminen als substraten werden aanvaard, maar toch perfecte enantioselectiviteit vertoonden (>99% e.e.). EDDS-lyase accepteerde alle tien aminesubstraten voor toevoeging aan fumaarzuur, wat de overeenkomstige N-cycloalkyl-L-asparaginezuren met goede conversies en in de gewenste L-configuratie (>99% e.e.) opleverde. EDDS-lyase vertoont aldus uitstekende enantioselectiviteit bij de toevoeging van verschillende cycloalkylaminen aan fumaarzuur. Dit is zeer veelbelovend voor biokatalytische asymmetrische synthese van moeilijke L-asparaginezuurderivaten, welke homo- en heterocycli dragen, die kunnen worden gebruikt voor vervolgsynthese. In **Hoofdstuk 5** beschrijven we het gebruik van enzymtechnologie om de synthetische toepassing van EDDS-lyase uit te breiden voor biokatalytische bereiding van N-(3,3-dimethylbutyl)-L-asparaginezuur, een belangrijke voorloper van de kunstmatige dipeptide-zoetstof neotaam. Goedgekeurd als een caloriearme kunstmatige zoetstof, heeft neotaam brede toepassingen in de voedingsindustrie. Eerst hebben we aangetoond dat wild-type EDDS-lyase lage hydroamineringsactiviteit heeft waardoor de synthese van N-(3,3-dimethylbutyl)-L-asparaginezuur en vijf derivaten mogelijk is via enantioselectieve amine-additie aan fumaarzuur (82-97% omzetting in 7 dagen, 34-74% geïsoleerde opbrengst, e.e. >99%). De activiteit van EDDS-lyase voor synthese van de neotaam-precursor werd verder versterkt door twee rondes van plaatsverzadigingsmutagenese en activiteitsscreening, hetgeen dubbel mutant D290M/Y320M opleverde, die een 1140-voudige toename in activiteit vertoonde. Dit nieuw ontwikkelde C-N-lyase maakte de efficiënte synthese van de neotaam-voorloper mogelijk binnen 2,5 uur (in plaats van 7 dagen) met een lage biokatalysatorbelasting (0,05 mol%) en het bereiken van 96% omzetting en optisch zuiver product (>99% e.e.) met 83% opbrengst. Vijf gerelateerde asparaginezuurderivaten werden ook gesynthetiseerd met goede omzettingen en enantioselectiviteit, waaronder N-[3-(3-hydroxy-4-methoxyfenyl)propyl]-L-asparaginezuur, een belangrijke voorloper van de kunstmatige zoetstof advantaam. Deze studie leverde de eerste biokatalysator die waardevolle aminozuurprecursoren voor neotaam en advantaam synthetiseert in een enkele asymmetrische stap, waardoor nieuwe mogelijkheden worden geboden om praktische multi-enzymatische processen te ontwikkelen voor de meer duurzame en economische synthese van een belangrijke klasse van levensmiddelenadditieven. In **Hoofdstuk 6** demonstreerden we de toepassing van MAL en zijn H194A mutant in de enzymatische cascade synthese van (*R*)-pantotheenzuur (vitamine B5) en zijn derivaten met hoge stereocontrole. (*R*)-Pantotheenzuur en zijn  $\alpha$ -methyl-gesubstitueerde derivaten zijn synthetische precursoren voor pantotheenamides, die veelbelovende antimicrobiële verbindingen zijn. Eerst werd een tweestaps enzymatische cascade gestart uitgaande van onverzadigde carbonzuren met een C-N-lyase (MAL of MAL-H194A) en een aminozuurdecarboxylase [aspartaat- $\alpha$ -decarboxylase (ADC),  $\beta$ -methylaspartaat- $\alpha$ -decarboxylase (CpG) of glutamaatdecarboxylase (GAD)], waarbij  $\beta$ -alanine en beide enantiomeren van  $\alpha$ -methyl- $\beta$ -alanine met goede conversie (75-

## Nederlandse Samenvatting

99%), hoge opbrengst (63-85%) en optische zuiverheid (>99% e.e.) werden verkregen. Vervolgens werd de synthetische route verlengd door pantothenaatsynthetase (PS) op te nemen om een enzymatische cascade met drie stappen in een één-pots omzetting te vormen voor de productie van (*R*)-pantotheenzuur en beide diastereo-isomeren van  $\alpha$ -methyl-(*R*)-pantotheenzuur (75-99% conversie, 46-70% geïsoleerde opbrengst in drie stappen).