

University of Groningen

Biocatalytic engineering of phenylalanine aminomutase

Wu, Bian

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:

2010

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

Citation for published version (APA):

Wu, B. (2010). *Biocatalytic engineering of phenylalanine aminomutase*. s.n.

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.

β -Aminozuren hebben hun aminozuren gebonden aan het β -koolstof atoom in plaats van aan het α -koolstof atoom zoals in de 20 standaard biologische aminozuren. β -Aminozuren komen voor in veel verschillende levende organismen, variërend van bacteriën en planten tot zoogdieren. Gedurende de laatste decennia is duidelijk geworden dat β -aminozuren geweldige kansen bieden voor de ontwikkeling van veel toepassingen waaronder medicijnen. Hoewel sommige β -aminozuren zelfstandig unieke farmacologische eigenschappen vertonen, komen ze meestal voor in meer complexe natuurlijke verbindingen die biologische activiteit vertonen (**Figuur 7-1** op pagina 111). Vanwege de toepassingen in de farmaceutische industrie worden β -aminozuren momenteel onderzocht vanuit verschillende disciplines. De synthese van enantiozuivere β -aminozuren is een forse uitdaging voor organisch chemici. Hoewel veel traditionele chemische synthesemethoden zijn ontwikkeld, hebben biokatalytische routes, waarin enzymen de katalyse uitvoeren, meerdere voordelen: hoge enantioselectiviteit, hoge regioselectiviteit, milde reactie condities en lage benodigde hoeveelheden van de katalysator. Hierdoor kunnen biokatalytische routes de toenemende vraag naar milieuvriendelijke synthesemethoden beantwoorden. Tot voor kort waren de meeste biokatalytische methoden om enantiozuivere β -aminozuren te bereiden gebaseerd op “kinetische resoluties” met hydrolytische enzymen, wat het nadeel heeft dat de maximum opbrengst slechts 50 % is en de bereikte enantiozuiverheid afhangt van de incubatie tijd.

Aminomutasen katalyseren een intramoleculaire migratie van een aminogroep in het substraat. Deze enzymen zijn betrokken bij de biosynthese van verschillende biologische actieve natuurlijke producten, zoals blasticidine, viomycine en taxol. In de afgelopen jaren zijn aminomutasen intensief onderzocht vanwege hun biofysische, structurele en mechanistische eigenschappen. Vanwege hun unieke eigenschappen hebben aminomutases een groot potentieel in de biotechnologie, bijvoorbeeld bij de synthese van β -aminozuren. Dit proefschrift omvat het mechanistische onderzoek, de biotechnologische toepassingen, en de “*protein engineering*” van een aminomutase – “phenylalanine aminomutase” (PAM). PAM katalyseert de omzetting van α -fenylalanine in β -fenylalanine, wat een belangrijke stap is in de biosynthese van de *N*-benzoyl fenylisoserinoyl, de zijketen van het antikanker medicijn taxol. De interne MIO (5-methylene-3,5-dihydroimidazol-4-one) cofactor is essentieel bij deze voor klassieke scheikunde zeer moeilijke α,β -amino migratie.

In **hoofdstuk 1** wordt een overzicht gegeven van gekarakteriseerde aminomutases en de verschillende klassen van aminomutases worden onderverdeeld op grond van hun reactiemechanisme. De enzymatische mechanismen, de uitdagingen en de vooruitzichten voor toekomstige industriële processen worden besproken. Dit overzicht van deze

intrigerende groep enzymen focust op enzymatische mechanismen en hun toepassing in biokatalyse.

In **hoofdstuk 2** beschreven we een nieuwe synthetische strategie, voor de biokatalytische productie van β -fenylalanine, die gebaseerd is op de vinding dat PAM ammonia additie aan (*E*)-kaneelzuur kan katalyseren. Uit ons mechanistisch onderzoek aan PAM was gebleken dat (*E*)-kaneelzuur een tussenproduct was in de mutase reactie en dat het vrij kon komen uit het actieve centrum van het enzym. PAM heeft een hoge enantioselectiviteit met kaneelzuur wat het mogelijk maakte om α - en β -fenylalanine te synthetiseren met een uitstekende enantiozuiverheid (ee > 99 %). De interne MIO cofactor is essentieel voor deze door PAM gekatalyseerde ammonia additie reactie.

In **hoofdstuk 3** beschreven we een aanpak voor de synthese van aromatische α - en β -aminozuren waarbij PAM de zeer enantioselectieve additie van ammonia aan gesubstitueerde kaneelzuur derivaten katalyseert. De reactie heeft een breed substraatbereik en resulteert in gesubstitueerde α - en β -fenylalanines met een uitstekende enantiozuiverheid. De regioselectiviteit van de reactie wordt gedomineerd door de elektronische eigenschappen van de substituenten: substraten met elektron-stuwende groepen op de fenylring worden vooral omgezet in β -fenylalanines, terwijl de kaneelzuurderivaten met elektronzuigende groepen vooral resulteren in α -fenylalanines. Een blokmodel voor het actieve centrum van het enzym wordt voorgesteld, gebaseerd op de invloed van de hydrofobiciteit van substituenten op de bindingsaffiniteit van het enzym voor verschillende substraten.

In **hoofdstuk 4** hebben we nader onderzoek verricht naar het gebruik van PAM als een katalysator in de kinetische resolutie van racemisch β -fenylalanine. PAM zet specifiek (*R*)- β -fenylalanine om in enantiozuivere (*S*)- α -fenylalanine, waarbij (*S*)- β -fenylalanine overblijft. Echter, het evenwicht tussen α - en β -fenylalanine (ongeveer 1:1), wat bereikt wordt in de PAM-gekatalyseerde isomerisatie reactie, zou er voor zorgen dat de omzetting onvolledig is. Om het evenwicht te verschuiven naar de formatie van (*S*)- α -fenylalanine, wordt aan het systeem een tweede enzym toegevoegd, PAL (“Phenylalanine ammonia Lyase”), welke de omzetting van verschillende (*S*)- α -fenylalanines in de overeenkomstige kaneelzuur derivaten katalyseert. Deze nieuw geïntroduceerde enzym reactie is praktisch bruikbaar en heeft vele voordelen, waaronder milde reactie condities, het feit dat geen kostbare cofactoren nodig zijn en de eenvoudige opwerking van de reactieproducten.

Hoofdstuk 5 is een literatuuroverzicht van de enzymen die de additie van een amine of ammonia aan een dubbele binding katalyseren (inclusief PAM). Additie van ammonia en amines aan dubbele bindingen wordt gekatalyseerd door verscheidene microbiële en plantaardige enzymen die behoren tot verschillende EC classificaties en fylogenetische

families. In deze literatuurterugblik worden de verschillende klassen van C-N lyases gegroepeerd volgens hun fylogenetische classificatie. De algemene eigenschappen, structuur, katalytische mechanismen, biokatalytische toepassingen en *protein engineering* van de verschillende lyases worden besproken in dit hoofdstuk.

PAM tolereert een grote verscheidenheid aan substituenten op de aromatische ring van het substraat, maar het accepteert geen hydroxyl groep op de *para* positie. Daarom is PAM ongeschikt voor de biokatalytische synthese van enantiozuivere β -tyrosine of derivaten hiervan. We hebben *protein engineering* toegepast om de substraatspecificiteit van PAM te veranderen. In **hoofdstuk 6** presenteerden we de identificatie op basis van sequentievergelijkingen en structuurmodellering van één aminozuur residu in het actieve centrum van het enzym dat belangrijk is in de substraatselectiviteit van de MIO-gebaseerde aminomutases. Door het vervangen van het actieve centrum residu Cys107 door Ser in PAM, verkreeg het enzym tyrosine aminomutase activiteit, terwijl de fenylalanine aminomutase activiteit en de hoge enantioselectiviteit behouden bleef. Deze mutante enantioselectieve tyrosine aminomutase katalyseerde ook de formatie van β -tyrosine uit "*p*-coumaric acid" en is mogelijk bruikbaar voor de synthese van enantiozuivere β -tyrosine en zijn derivaten.

Samengevat, het werk gepresenteerd in dit proefschrift laat zien dat fenylalanine aminomutase vele interessante katalytische eigenschappen heeft. Terwijl nog niet alle technische problemen zijn opgelost is het nu duidelijk dat PAM veelbelovend is voor de bereiding van enantiozuivere β -aminozuren.