



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Unraveling the mechanism of multicopper oxidases : from ensemble to single molecule

Gupta, A.

Citation

Gupta, A. (2014, April 29). *Unraveling the mechanism of multicopper oxidases : from ensemble to single molecule*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/25397>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/25397>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/25397> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Gupta, Ankur

Title: Unraveling the mechanism of multicopper oxidases : from ensemble to single molecule

Issue Date: 2014-04-29

Samenvatting

Multi-copper oxidases (MCO's) zijn in alle levende organismen aanwezig zoals planten, schimmels en de mens. De meest bestudeerde vertegenwoordigers van deze 'MCO-familie' zijn de laccases (LC's) en ascorbaat oxidase (AO). Hoewel de biologische functie van het grootste deel van deze eiwitten niet precies bekend is, weten we wel dat ze oxidatie-reductie reacties katalyseren zoals de oxidatie van fenolen tot aromatische aminen en de oxidatie van metaalionen in een lage oxidatietoestand naar metaalionen met een hogere oxidatietoestand (bv. van Fe(II) naar Fe(III) of van Cu(I) naar Cu(II)). Bij de oxidatie-reacties komen electronen vrij die worden overgedragen aan zuurstof (O_2), dat tot water (H_2O) wordt gereduceerd. Voor elke enzymatische turnover zijn vier donormoleculen nodig die elk één electron aanleveren, één zuurstofmolecuul (O_2) dat de electronen opneemt, en vier protonen.

Dit proefschrift beschrijft het onderzoek naar de relatie tussen de structuur en de functie van een recent ontdekt lid van de MCO-familie: 'small laccase' (SLAC) afkomstig van *Streptomyces coelicolor*. Het relaas van de reis die met de ontdekking van dit eiwit begint en daarna de eigenschappen van dit eiwit in kaart brengt, wordt hieronder samengevat.

Dr. Michael Machczynski ontdekte in 2004 dat de groeimedia van *S. coelicolor* een nog niet eerder beschreven fenoloxidase activiteit vertoonden (Protein Sci. 2004, 13, 2388). De uitschakeling van het gen dat in de bacterie voor SLAC codeert, bleek deze activiteit te stoppen. Ter verdere bestudering van dit SLAC eiwit werd het desbetreffende gen gekloneerd in een pET vector in *E.coli* zodat het eiwit tot hoge expressie gebracht kon worden. Het zo verkregen (recombinante) eiwit bleek vier Cu-ionen per eiwitmolecuul te bevatten en ook laccase-activiteit te vertonen. Het eiwit bleek opgebouwd te zijn uit slechts 343 aminozuren in tegenstelling tot de grotere laccases (LC's) en ascorbaatoxidase (AO). Vervolgonderzoek van de drie-dimensionale structuur van het eiwit (uitgevoerd m.b.v. Röntgendiffractie) toonde aan dat dit eiwit opgebouwd is als een homotrimeer, en dat elke monomeer uit twee zgn. cupredoxine domeinen bestaat (in tegenstelling tot de drie domeinen van de LC's en AO). Deze

ontdekking leidde tot een aanpassing van de evolutionaire stamboom van de MCO's op basis waarvan vroeger het voorkomen van zgn 'two-domain MCO's' was voorspeld maar nog nooit was bevestigd. De voor de hand liggende vraag was nu: de structurele gelijkenissen tussen deze verschillende MCO-soorten ('two-domain' vs. three-domain' MCO's) zijn evident maar werken deze enzymen ook volgens hetzelfde mechanisme?

De eerste in onze groep die dit onderzocht was Dr. Armand Tepper. Hij toonde aan dat zich een 'biradicaal intermediair' vormt wanneer volledig gereduceerd SLAC, ontdaan van één van zijn koper atomen (zgn. T1D SLAC, waarin het type-1 Cu niet meer aanwezig is) reageert met zuurstof (J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 11680). Een dergelijk biradicaal was nog niet eerder waargenomen bij de laccases (LC's). Wel leidt bij de T1D-laccases de reactie met zuurstof tot de vorming van een langlevend peroxide intermediair. Op basis van kinetische en spectroscopische metingen werd geconcludeerd dat de twee spins in het biradicaal van SLAC zich bevinden op twee naast elkaar liggende cofactoren: type-2 (T2) koper en mogelijk een tyrosine, vermoedelijk Y108. Hoewel het duidelijk was dat de reactiviteit van SLAC met O₂ verschilt van die van de andere laccases, vergt deze waarneming nader onderzoek naar het mechanisme van het enzym. De uitdaging was om de locatie van de spins te bepalen d.w.z. dat er nagegaan moest worden of één van de ongepaarde spins op Y108 zit of niet en of dit residu (Y108) een rol speelt bij de enzymkatalyse.

Hoofdstuk 2 beschrijft het onderzoek dat is uitgevoerd om de aard en locatie van het organische radicaal (Y108[•]) te identificeren. Mutanten werden gemaakt waarbij het tyrosine-residu op positie 108 was vervangen door een alanine (Y108A) of een fenylalanine (Y108F) in zowel het oorspronkelijke ('*wild type*') als T1D SLAC. Om de enzymactiviteit en de spectroscopische eigenschappen van het wild-type enzym en de varianten goed te kunnen analyseren, werden de kristalstructuren van de nieuwe varianten bepaald. Die toonden aan dat de structuur van het actieve centrum en de gehele 3-dimensionale structuur van de varianten grotendeels identiek zijn aan die van het wild-type enzym. De gemeten 'steady-state' kinetiek toonde aan dat zowel de Y108A- als de Y108F-variant minder actief waren dan wild-type SLAC (in overeenstemming met een

mogelijke rol van het Y108 residu in het enzymmechanisme). De reactie van volledig gereduceerd T1D–Y108A SLAC met O_2 leidde niet tot de vorming van een biradicaal. Integendeel, een nieuw soort intermediair dat op het peroxide intermediair lijkt werd waargenomen. Dit peroxide ontstaat uit O_2 door opname van 2 elektronen. Dit vormde de bevestiging dat Y108 geoxideerd wordt in het wild-type enzym en daarmee verandert in een radicaal. Ook werd aangetoond dat dit tyrosine aanwezig is in alle bekende ‘two-domain’ MCO-homologen en ook in menselijk ceruloplasmine. Wij veronderstellen dat Y108 geoxideerd wordt om te voorkomen dat er vorming van reactieve zuurstofproducten optreedt onder omstandigheden waarbij in het milieu de reducerende en oxiderende equivalenten niet in balans zijn. Dit roept nochtans onmiddellijk een nieuwe vraag op: heeft SLAC werkelijk vijf redoxactieve componenten nodig (vier Cu’s en Y108) om op elk willekeurig moment vier elektronen aan O_2 over te kunnen dragen om H_2O te vormen? Als dat niet het geval is, welke van deze componenten zijn dan onmisbaar?

Hoofdstuk 3 bevat voorlopige gegevens die de bovengenoemde vraag gedeeltelijk beantwoorden. Het type-2 (T2) Cu van SLAC werd selectief verwijderd. De verwijdering van type-2 Cu werd m.b.v. Elektron Paramagnetische Resonantie (EPR) en Atomaire Absorptie Spectroscopie (AAS) bevestigd. Uit werk van anderen was al gebleken dat ascorbaat oxidase en laccases, ontdaan van type-2 Cu (T2D), hun katalytische activiteit verliezen. Maar T2D–SLAC bezit nog bijna 1/3 van de activiteit van het wild-type enzym. De veronderstelling was dat Y108 de functie van het type-2 Cu overneemt wanneer dit Cu wordt verwijderd. Om deze aanname te bevestigen, hebben wij bij de bereiding van T2D SLAC een alternatieve procedure gevolgd. Door middel van mutaties werd één van de type-2 Cu coördinerende histidines (H102) door een glycine (H102G), tyrosine (H102Y), fenylalanine (H102F) of glutamine (H102Q) vervangen. Opmerkelijk genoeg toonden EPR en AAS aan dat het T2 Cu in deze varianten nog steeds aanwezig was. Maar de activiteit van de varianten was meer dan 2 ordes van grootte lager dan de activiteit van het wild-type enzym. Hieruit konden we concluderen dat H102 cruciaal is voor de enzymactiviteit. Nadere experimenten zijn nodig om inzicht te krijgen in de wijze waarop H102 de enzymactiviteit reguleert en om een antwoord te krijgen op de

vraag: kan een redox-actief aminozuur werkelijk de rol van een Cu co-factor overnemen?

Hoofdstuk 4 van dit proefschrift is complementair aan de vorige twee hoofdstukken. In hoofdstuk 4 hebben we niet gekeken naar de reactiviteit van het eiwit met O₂, maar in plaats daarvan hebben we geprobeerd inzicht te krijgen in hoe de uitwisseling van elektronen tussen het T1 Cu en het trinucleaire Cu-cluster (TNC) van SLAC verloopt. Het belangrijkste doel hiervan was om onderzoek te doen naar de kinetiek van de elektronenoverdracht (ET) tussen de twee Cu-centra tijdens steady-state turnover. Daarvoor hebben wij gebruik gemaakt van single-molecule technieken. Een methode die onlangs door Sofya Kuznetsova werd geïntroduceerd (Anal. Biochemie. 2006, 350, 52 werden), is toegepast om aan de hand van de fluorescentie van een covalent aangebracht fluorescerend label de redox toestand van het T1 Cu af te lezen. Door het meten van de fluctuaties in de fluorescentie-intensiteit van één enkel molecuul, kon de levensduur van een bepaalde redox toestand van het T1 Cu worden afgeleid en daarmee de snelheid van de electronoverdracht. SLAC varianten werden geconstrueerd om plaatsspecifiek een label te kunnen aanbrengen en om immobilisatie van het eiwit op een transparant glasoppervlak mogelijk te maken. De intensiteitsfluctuaties van individuele SLAC-moleculen werden geregistreerd met behulp van een confocale microscoop. Uit deze gegevens werden de elektron-overdracht snelheden van T1 naar TNC (en omgekeerd) afgeleid en vervolgens uitgezet in een histogram. De verdeling van de snelheden blijkt een normale log-distributie met gemiddelden van 460 en 85 s⁻¹ te vertonen, corresponderend met activeringsenergieën van resp. 347 en 390 meV voor de voorwaartse en achterwaartse elektron-overdracht. M.b.v. van Marcus theorie werden een “driving force” en een “reorganisatie-energie” berekend van respectievelijk 0.043eV en 1.5eV. De elektron-overdracht snelheden distributie toont een spreiding van meer dan één orde van grootte overeenkomend met een kleine 30 meV spreiding in de activeringsenergie, of met 0.1 eV in de reorganisatieenergie. De hier gevolgde aanpak om individuele moleculen te bestuderen heeft dus niet alleen het volgen van de interne dynamica van enzymen onder steady-state condities mogelijk gemaakt, maar hij is bovendien

veel informatiever gebleken dan metingen die op macroscopische schaal worden uitgevoerd (bv. aan oplossingen).

Hoofdstuk 5 geeft de algemene conclusies weer van het werk dat in dit proefschrift is gepresenteerd. Verder bevat het suggesties voor onderzoek dat meer inzicht kan geven in het enzymatische mechanisme van SLAC en van het mechanisme van MCO's in het algemeen.

