



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Enzymatic reduction of oxygen by small laccase. A rapid freeze-quench EPR study

Nami, F.

Citation

Nami, F. (2017, March 7). *Enzymatic reduction of oxygen by small laccase. A rapid freeze-quench EPR study*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/50245>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/50245>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/50245> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Nami, F.

Title: Enzymatic reduction of oxygen by small laccase. A rapid freeze-quench EPR study

Issue Date: 2017-03-07

Samenvatting

Vanaf de ontdekking van enzymen als biologische katalysatoren houden enzymologen zich bezig met de vraag naar het mechanisme van enzymatische reacties. Om dergelijke reacties te begrijpen is het van belang de kinetiek en de aard van intermediairen te bestuderen. De beperkte levensduur van deze intermediairen, meestal in de orde van milliseconden tot seconden, vormt daarbij een uitdaging. Het is nodig een geschikte methode te vinden om de intermediairen te onderscheppen. De daarvoor toegepaste techniek gaat onder de naam “rapid freeze-quench (RFQ)”, waarmee standaard intermediairen op de tijdschaal van milliseconden bestudeerd kunnen worden. In het algemeen wordt deze techniek gecombineerd met electron paramagnetische resonantie (EPR) spectroscopie om de aard van de paramagnetische intermediairen betrokken in enzymatische reacties te bestuderen. In het onderzoek beschreven in dit proefschrift verbeteren wij de traditionele RFQ/EPR methode en breiden die uit naar EPR bij microgolffrequenties van 275 GHz ter karakterisering van de intermediairen betrokken in de enzymatische reductie van zuurstof door het enzym “small laccase (SLAC)”.

Het SLAC enzym behoort tot de groep van “multicopper oxidases (MCO’s)”. Het werd ontdekt in 2004 bij een verkenning van het genoom van *Streptomyces coelicolor* naar de aanwezigheid van kopereiwitten. Karakterisering van het eiwit liet zien dat het structureel verschilt van andere laccasen. De actieve plaats van SLAC had daarentegen dezelfde samenstelling als bij andere MCO’s, met een type 1 (T1) koperatoom en een cluster van drie koperatomen (TNC). Het SLAC bestaat uit slechts twee cupredoxine domeinen (2dMCO) en is actief als trimeer, terwijl MCO’s in het algemeen uit drie domeinen bestaan (3dMCO) en actief zijn als monomeer. Met het oog op deze structurele verschillen is het

Samenvatting

interessant de mogelijke mechanistische verschillen en overeenkomsten tussen SLAC, een 2dMCO, en 3dMCO's te onderzoeken. In dit kader is de reactie van gereduceerd SLAC zonder koper in de T1 plaats (T1D SLAC) met zuurstof bestudeerd met behulp van EPR op de tijdschaal van minuten. Daarbij is een biradikaal waargenomen dat niet eerder gedetecteerd was bij 3dMCO's. De hypothese luidde dat het biradikaal correspondeert met de spins van twee electronen die gekoppeld zijn door een "exchange"-interactie. Eén van de electron spins zou gelokaliseerd zijn op het type 2 (T2) koper en de andere op een radikaal afgeleid van een aminozuur, waarschijnlijk een tyrosine. De karakterisering van dit en mogelijke andere intermediairen gevormd in de reoxidatie van wild-type SLAC en mutanten van dit eiwit op de tijdschaal van milliseconden is het onderwerp van het onderzoek beschreven in dit proefschrift.

In hoofdstuk 2 beschrijven wij een methode ter verbetering van het verzamelen van RFQ-deeltjes uit isopentaan en de pakking van die deeltjes in een buisje voor X-band EPR spectroscopie. De methode is gebaseerd op het opzuigen van de deeltjes in een EPR-buisje voorzien van een filter. Vergeleken met de conventionele methode is veel minder materiaal nodig wat met name gunstig is in het geval van eiwitten die niet in grote hoeveelheden beschikbaar zijn. De zuigmethode blijkt efficiënt en snel te zijn en reproduceerbare resultaten op te leveren.

Hoofdstuk 3 beschrijft de uitbreiding van de conventionele RFQ/EPR techniek naar hogere microgolffrequenties op basis van de zuigmethode geïntroduceerd in hoofdstuk 2. Deze methode maakt het mogelijk de RFQ-deeltjes te verzamelen in een nauw capillair met een binnendiameter van 150 micrometer dat past in de cilindrische trilholte die gebruikt wordt voor EPR bij 275 GHz.

Wij laten zien dat slechts één RFQ-monster nodig is voor EPR experimenten bij verschillende microgolffrequenties. Dat de methode toegepast kan worden op biologische preparaten demonstreren wij door de binding van azide aan myoglobine te volgen op de tijdschaal van milliseconden met EPR bij 9, 94 en 275 GHz.

Na de ontwikkeling van de RFQ multifrequente EPR techniek komen wij in hoofdstuk 4 toe aan de bestudering van de zuurstofreductie door SLAC. Wij beschrijven de isolatie en karakterisering van de intermediairen die gevormd worden gedurende de reacties van volledig gereduceerd T1D SLAC en T1D Y108F SLAC met zuurstof op de tijdschaal van milliseconden. De X-band EPR-spectra van het T1D SLAC intermediair met een reactietijd van milliseconden blijken identiek aan het spectrum dat eerder afgeleid was als verschil van spectra bij verschillende tijden op de tijdschaal van minuten, dat wil zeggen tijdens het verval van het intermediair. De gecombineerde analyse van de EPR-spectra bij 9, 94 en 275 GHz van RFQ-monsters van T1D SLAC laat ondubbelzinnig zien dat het intermediair bestaat uit de T2 koper gekoppeld met het tyrosyl 108 radikaal. Voor T1D Y108F SLAC vinden wij geen teken van een biradikaal tijdens het reoxidatieproces op de tijdschaal van milliseconden. Deze waarneming bevestigt onze conclusie dat tyrosine 108 een cruciale rol speelt in de reactie van T1D SLAC met moleculaire zuurstof. In het geval van T1D Y108F SLAC vinden wij in het X-band EPR-spectrum een klein signaal van een radikaal, dat wij voorlopig toekennen aan een tryptofanyl radikaal.

In hoofdstuk 5 gaan wij over naar het wild-type SLAC en bestuderen dat onder condities als toegepast voor T1D SLAC. De vraag is of ook in dit geval sprake is van een tyrosyl radikaal en of het zogenaamde natieve intermediair (NI),

Samenvatting

bekend van 3dMCO's, optreedt tijdens de reoxidatie van het wild-type enzym. De EPR-spectra van volledig gereduceerd wild-type SLAC gemengd met zuurstof op een tijdschaal van milliseconden en langer kunnen beschreven worden als de som van de spectra van T1 en T2 koperionen. Wij vinden geen aanwijzingen voor een tyrosyl radikaal, noch voor een NI voor wild-type SLAC. Dat betekent dat deze intermediären voor wild-type SLAC niet gevormd worden of een levensduur hebben korter dan 8 milliseconden.

In hoofdstuk 6 stellen wij een mechanisme voor ten aanzien van de reductie van zuurstof door gereduceerd T1D SLAC gebaseerd op onze RFQ multifrequente EPR resultaten voor T1D SLAC en T1D Y108F SLAC beschreven in hoofdstuk 4 en eerder verkregen optische data voor deze mutanten. De mechanistische verschillen en overeenkomsten van SLAC, een 2dMCO, met de 3dMCO's worden besproken. Voor wild-type SLAC lijken onze resultaten tegenstrijdig, en vooralsnog kunnen wij geen conclusie trekken met betrekking tot de rol van Y108. Aanvullende experimenten zijn nodig onder verschillende reactieomstandigheden om uit te maken of een mechanisme als beschreven voor T1D SLAC ook voor wild-type SLAC geldt.