



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Deciphering the complex paramagnetic NMR spectra of small laccase

Dasgupta, R.

Citation

Dasgupta, R. (2021, June 15). *Deciphering the complex paramagnetic NMR spectra of small laccase*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3188356>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3188356>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3188356> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Dasgputa, R.

Title: Deciphering the complex paramagnetic NMR spectra of small laccase

Issue Date: 2021-06-15

Samenvatting

Enzymatische biobrandstofcellen (EBS's) beloven een duurzame toekomst. Ze gebruiken enzymen om substraten aan de anode te oxideren en om zuurstof aan de kathode te reduceren. Laccases zijn ideale enzymen voor de reductie van zuurstof, maar ze verliezen stabiliteit wanneer ze gebruikt worden voor oppervlakte-functionaliseren van een elektrode. Bio-geïnspireerde katalysatoren zijn ontworpen om deze uitdaging het hoofd te bieden, maar dat gaat ten koste van de katalytische efficiëntie. Bewegingen in het actieve centrum van laccase kunnen van invloed zijn op deze efficiëntie. Specifieke bewegingen kunnen het enzym helpen om een conformatie aan te nemen die de energiebarrière van een katalytische stap verlaagt door gunstige interacties te hebben met de overgangstoestand. Deze bewegingen lijken onvermijdelijk voor de complexe reductiereactie van zuurstof, die uit meerdere stappen bestaat. Dit proefschrift vormt de basis voor het bestuderen van dergelijke bewegingen in het actieve centrum van laccase met behulp van NMR-spectroscopie. Hoofdstuk 1 geeft een samenvatting van de eigenschappen van het tri-nucleaire kopercentrum (TNC), waar zuurstofreductie plaatsvindt, van verschillende laccases, en vergelijkt het TNC met de gerapporteerde kunstmatige katalysatoren.

In deze studie wordt gebruikt gemaakt van de kleine laccase van *Streptomyces coelicolor* (SLAC), een trimeer van een eiwit met twee domeinen. Vanwege de paramagnetische aard van de koperionen in het TNC is niet mogelijk om de dynamiek te karakteriseren en de resonanties toe te kennen met standaard NMR-experimenten. NMR-experimenten aangepast voor paramagnetische monsters en mutaties in de tweede coördinatieschil van het enzym zijn gebruikt om deze uitdagingen te overwinnen. De natieve intermediaire (NI) toestand en de geoxideerde rusttoestand (RO) van het TNC zijn uitvoerig bestudeerd (Hoofdstukken 2 t/m 4). Het NMR-spectrum van SLAC laat een combinatie zien van deze twee toestanden (Hoofdstukken 3 en 4). De NI-toestand is bestudeerd door gebruik te maken van een variant die het koperion in het type 1-centrum mist (SLAC-T1D), omdat de relatieve intensiteiten in het NMR-spectrum laten zien dat die toestand voor deze variant de hoofdtoestand is. Vijf uitwisselingsprocessen werden ontdekt en toegeschreven aan rotatie van de ringen van histidineliganden (Hoofdstukken 2 en 3). De Y108F mutatie in de tweede coördinatieschil hielp bij het toekennen van twee van deze processen aan twee histidineliganden in de NI-toestand (Hoofdstuk 3). De RO-toestand is bestudeerd met het wild-type (wt) SLAC, omdat deze toestand daarin de hoofdtoestand is (Hoofdstuk 4). Een tweede mutatie, Q291E in SLAC-T1D, blijkt ervoor te zorgen dat SLAC slechts in de RO-toestand voorkomt, wat aangeeft dat er een subtiel evenwicht bestaat tussen de RO- en NI-toestanden (Hoofdstuk 4). Door gebruik te maken van SLAC-wt en SLAC-T1D/Q291E werden resonanties toegekend aan twee histidine liganden in de RO-toestand (Hoofdstuk 4). In zowel de NI- als de RO-toestand zijn alle

histidineliganden waargenomen, dit zijn respectievelijk acht (T3 + T2-centra) en zes (alleen T3-centrum) liganden.

Kwantumberekeningen kunnen helpen bij het toekennen van de resonanties in paramagnetische systemen, maar dit vereist een goede beschrijving van de geometrie van het TNC. Door voort te borduren op eerdere studies, kon de geometrie van de RO-toestand worden gemodelleerd en de elektronische structuur berekend. Dit werk laat zien dat de oriëntatie van de hydroxylgroep van Y108 belangrijk is voor de spin-dichtheidsverdeling in het TNC (Hoofdstuk 5).

Vaste-stof-NMR kan informatie geven over de dipolaire koppeling tussen kernen nabij het metaalcentrum. De dipolaire koppelingssterkte kan worden gebruikt om anisotrope bewegingen in het actieve centrum van laccase te onderzoeken. Hoofdstuk 6 toont aan dat een pulssequentie die gebaseerd is op rotatie-echo dubbele resonantie (REDOR) gebruikt kan worden bij het bepalen van de dipolaire koppeling in een paramagnetische omgeving in de modelverbinding $\text{Cu-DL-(Ala)}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$. Nauwkeurige afstandsinformatie kan zo worden verkregen uit REDOR-experimenten (Hoofdstuk 6).