

University of Groningen

Exploring deazaflavoenzymes as biocatalysts

Kumar, Hemant

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:

2018

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

Citation for published version (APA):

Kumar, H. (2018). *Exploring deazaflavoenzymes as biocatalysts*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

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.

8

Nederlandse samenvatting

Hemant Kumar and Marco W. Fraaije

(Translated by Friso S. Aalbers)

Flavine-afhankelijke enzymen vormen een belangrijke klasse van enzymen die in staat zijn om een breed scala aan reacties te katalyseren. Als biokatalysatoren staan ze vooral bekend om hun vermogen om oxidaties en reducties op een enantio- en regioselectieve manier te katalyseren. Middelen voor enzym ontdekking en enzyme engineering zoals genome mining, computational design, directed evolution en structurele biologie hebben in belangrijke mate bijgedragen aan het verbeteren van de prestaties van flavoenzymen voor industriële toepassingen, en blijven dit doen. Er zijn echter nog steeds veel enzymen verborgen in de genoom-databanken die mogelijk veelbelovend zijn. Naast flavine-afhankelijke enzymen zijn er ook andere enzymklassen met kandidaten voor de ontwikkeling van redox-biokatalysatoren. Cofactor F_{420} -afhankelijke enzymen behoren tot een dergelijke klasse van enzymen die nauwelijks zijn onderzocht. Cofactor F_{420} is een natuurlijk deazaflavine-analoog van flavine cofactoren, en het heeft een hoger reducerend vermogen dan de conventionele flavines vanwege het lagere redoxpotentieel. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift richtte zich op het onthullen van het biokatalytisch potentieel van F_{420} -afhankelijke enzymen, deaza-flavoenzymen.

Hoofdstuk 1 geeft een algemene inleiding over cofactor F_{420} : de chemische eigenschappen en biosyntheseweg in archaea en bacteriën, en details over F_{420} -afhankelijke enzymen die veelbelovend zijn vanuit biokatalytisch oogpunt. F_{420} -afhankelijke enzymen kunnen slechts twee elektronen (hydride) overdrachtsreacties katalyseren, dus hun toepasbaarheid is enigszins beperkt. Toch kunnen ze vanwege de redox-eigenschappen van de cofactor (in theorie) moeilijkere hydride-overdrachtsreacties katalyseren, ten opzichte van met enzymen die een flavine- of nicotinamide-cofactor gebruiken. Van $F_{420}H_2$ -afhankelijke reductasen is aangetoond dat ze recalcitrante aflatoxinen afbreken, pro-geneesmiddelen activeren voor de behandeling van tuberculose (zoals PA-824) en enantioselectieve biotransformaties uitvoeren (hoofdstuk 5), welke getuigen geven van hun potentieel als biokatalysatoren. Het is daarom aantrekkelijk om genome mining, proteomics, structurele biologie en enzymtechnieken te gebruiken om F_{420} -afhankelijke enzymen te identificeren, karakteriseren en te ontwikkelen. Dergelijke nieuwe enzymen zullen de huidige verzameling beschikbare redox-biokatalysatoren aanvullen, in het bijzonder de collectie van enzymen die worden gebruikt voor selectieve reducties.

We hebben een recentelijk ontwikkelde techniek voor proteomics gecombineerd met een cofactor-affiniteitschromatografie stap, om nieuwe F_{420} -bindende eiwitten te identificeren (hoofdstuk 2). De methode werd gevalideerd met behulp van celextract van *Mycobacterium smegmatis*. Covalent geïmmobiliseerde cofactor F_{420} was in staat F_{420} -afhankelijke eiwitten te vissen uit het celvrije extract van *M. smegmatis*, en door

massaspectrometrie werden de eiwitsequenties bepaald. Voor deze methode werd de deazaflavincofactor covalent geïmmobiliseerd op een reeks verkrijgbare kolommaterialen met variërende tussenlengtes. De vrije carboxylgroepen van F_{420} reageerden met de amine-geactiveerde kolommaterialen. Hoewel de polyglutamyl-staart covalent is gebonden aan het dragermateriaal, blijft het deel van de cofactor dat essentieel is voor binding aan de apo-eiwitten beschikbaar voor binding. Het bleek dat het type kolommateriaal een belangrijke rol speelde bij niet-specifieke binding van eiwitten. Hydroxylgroepen van agarose bleken verantwoordelijk te zijn voor dergelijke niet-specifieke binding. Andere kolommateriaaltypen, zoals polymethacrylaat, gaven betere resultaten. Massaspectrometrie resultaten bevestigden de specifieke binding van bekende en voorspelde F_{420} -afhankelijke eiwitten aan het F_{420} -polymethacrylaat kolommateriaal. Het resulteerde ook in het identificeren van eiwitten zonder bekende functie; ze kunnen werkelijk nieuwe deazaflavoenzymen vertegenwoordigen met onontgonnen katalytische eigenschappen.

Het feit dat cofactor F_{420} niet commercieel verkrijgbaar is, en slechts in zeer lage hoeveelheden ($1 \mu\text{mol } F_{420} / \text{L}$) kan worden geïsoleerd van een conventionele gastheer (*M. smegmatis*), vormt één van de uitdagingen voor het bestuderen en toepassen van F_{420} -afhankelijke enzymen. Om biokatalyse met behulp van $F_{420}H_2$ -afhankelijke reductasen uit te voeren zonder een aanzienlijke hoeveelheid F_{420} te gebruiken, zijn enzymen die $F_{420}H_2$ regenereren hard nodig. We hebben een thermostabiel F_{420} : NADPH-oxidoreductase (FNO) (hoofdstuk 3) geïdentificeerd door genome mining van de mesofiele bacterie *Thermobifida fusca*. Voor zover ons bekend is Tfu-FNO de eerste bacteriële FNO waarvoor een kristalstructuur is opgehelderd ($1,8 \text{ \AA}$ resolutie). Tfu-FNO werd op heterogene wijze tot expressie gebracht in Topio-cellen van *E. coli* met hoge opbrengst ($200 \text{ mg} / \text{l}$). Aangezien NADPH, het natuurlijke substraat van FNO, tien keer duurder is dan NADH, hebben we de engineering van de NADPH-bindingsplaats uitgevoerd om het NADH te laten accepteren. Residuen die een interactie hadden met de 2'-fosfaatgroep van NADP^+ (T28, S50, R51 en R55) werden gemuteerd tot andere aminozuren. De resultaten toonden aan dat deze residuen belangrijk zijn bij het discrimineren van NADP^+ van NAD^+ . Mutant S50E was in staat om de K_m bijna driemaal te verlagen ten opzichte van wild type FNO. Wild type FNO en mutant S50E kunnen worden gebruikt voor recycling van $F_{420}H_2$ ten koste van respectievelijk NADPH en NADH.

In hoofdstuk 4 onderzochten we evolutionaire aspecten van F_{420} -afhankelijke enzymen behorend tot de kenmerkende enzym familie. Cofactor F_{420} werd voor het eerst ontdekt in methanogenen, en het werd ook aangetroffen in archaea, waar het een belangrijke rol

speelt in het metabolisme. Dit geeft de indruk dat de cofactor F_{420} -afhankelijke enzymen primitief kunnen zijn, of zelfs de voorouders van de flavoenzymen. Door middel van een gedetailleerde fylogenetische analyse kwamen we erachter dat de vorige verklaring niet waar is. F_{420} -afhankelijke enzymen blijken eigenlijk voort te zijn gekomen uit een gemeenschappelijke FMN-afhankelijke voorouder. Tijdens de fylogenetische analyse van F_{420} -afhankelijke dehydrogenases identificeerden we een nieuwe subgroep van dehydrogenases die in staat zijn om substraten anders dan glucose-6-fosfaat accepteren, en zijn daarom suiker-6-fosfaat dehydrogenases (FSD) genoemd. De herrezen voorouder van FSD en FGD (F_{420} -afhankelijke glucose-6-phosphate dehydrogenase) was thermotolerant en flexibel wat betreft substraat acceptatie.

Het reducerende vermogen van cofactor F_{420} wordt benut door $F_{420}H_2$ -afhankelijke reductasen. In hoofdstuk 5 rapporteren we voor de eerste keer over het vermogen van F_{420} -afhankelijke enantio- en regioselectieve *een*-reducties (van C=C bindingen) met behulp van $F_{420}H_2$ -afhankelijke reductasen (FDR's). Deze relatief kleine deazaflavoenzymen kunnen α , β -onverzadigde aldehyden en ketonen omzetten met uitstekende enantioselectiviteit (vaak met >99% ee). Interessant is dat de enantioselectiviteit die kan worden verkregen met behulp van deze enzymen tegengesteld is aan die van de welbekende en onderzochte flavine-afhankelijke *een*-reductasen. Helaas is de snelheid waarmee de reducties worden gekatalyseerd tamelijk laag. Deze nieuw bestudeerde $F_{420}H_2$ -afhankelijke enzymen zijn een goed startpunt voor toekomstige pogingen tot enzym-engineering om efficiëntere biokatalysatoren te verkrijgen.

Flavine-bevattende Baeyer-Villiger monooxygenases (BVMOs) zijn voorbeelden van goed bestudeerde flavoenzymen die worden gebruikt voor biokatalytische oxidaties. In hoofdstuk 6 rapporteren we over het vermogen van BVMO's om op furanoïde aldehyden in te werken, een klasse van verbindingen die nog niet eerder met BVMO's zijn getest. Verrassend genoeg bleek dat een groot deel van de geteste BVMO's furfural als substraat te accepteren. Furfural en verschillende andere furanoïde aldehyden werden omgezet in het zuur, in plaats van te worden omgezet in de verwachte formiaatesters via een typische Baeyer-Villiger-oxidatie. Dit levert een nieuwe biokatalytische route op voor het produceren van een belangwekkende polymeerprecursor, 2,5-furandicarbonzuur (FDCA).

