

Heterogeneous & Homogeneous & Bio- & Nano-

CHEM **CAT** CHEM

CATALYSIS

Accepted Article

Title: From the Amelioration of a NADP⁺-dependent Formate Dehydrogenase to the Discovery of a New Enzyme: Round Trip from Theory to Practice

Authors: Marina Simona Robescu, Rudy Rubini, Elisa Beneventi, Michele Tavanti, Chiara Lonigro, Francesca Zito, Francesco Filippini, Laura Cendron, and Elisabetta Bergantino

This manuscript has been accepted after peer review and appears as an Accepted Article online prior to editing, proofing, and formal publication of the final Version of Record (VoR). This work is currently citable by using the Digital Object Identifier (DOI) given below. The VoR will be published online in Early View as soon as possible and may be different to this Accepted Article as a result of editing. Readers should obtain the VoR from the journal website shown below when it is published to ensure accuracy of information. The authors are responsible for the content of this Accepted Article.

To be cited as: *ChemCatChem* 10.1002/cctc.201902089

Link to VoR: <http://dx.doi.org/10.1002/cctc.201902089>

WILEY-VCH

www.chemcatchem.org



("5\$75\$ (B " :&) %& : ; , &7) B& : ; , 5& + , 7) %?& :) JUV` HUUaL0&e%4 , 4& > UUA1& @UUv& " %4& KUU [& " # , & - ; \$1 : , 4& :) & , %7 " #? , & : ; , & " : \$9 , & - \$: , & ? " : , 1& () # , & - \$? % \$1\$. " % : 75& \$ % & " 7 " % \$ % , & " % 4& - , # \$ % , & (/ : " % : - & : ; , % & \$ % & ? 7 / : " (\$ % , &) % , 0& e% : , # , - : \$ % ? 751& : ; , & " M\$4 , & \$ % ; \$ + \$:) # 1& : ; " : &) . / B\$, - & : ; , & \$ % : , # % " 7&1) # (" : , & + \$ % 4 \$ % ? & - \$: , & " % 4& \$ - & 9 , # 5& P , 7& 4 , 1 \$ % , 4& \$ % & " 77& : ; , & - : # / . : / # , - & B # , - , % : , 4& ; , # , 1& , NB , # \$, % . , & " & - 7 \$? ; : & - ; \$ 1 : 1& : ; " : & \$ - & (\$ % \$ (" 7& \$ % & : ; , & . " - , &) 1& FUUU ' fg UUZ * & " % 4& B #) ? # , - - \$ 9 , 75& () # , & , 9 \$ 4 , % : & \$ % & FUUUefg UUZ * & " % 4& FUUUgfg UUZ * 0& < ; \$ - & + , ; " 9 \$) # & H& 4 \$. : " : , 4& + 5& - 7 \$? ; : & . : ; " % ? , - & B , # : / # + \$ % ? & : ; , &) 9 " # 77& " : \$ 9 , & - \$: , & H& .) / 74& ^ / - : \$ 15& : ; , & ?) 4& " 11 \$ % \$: 5& # , : " \$ % , 4& + 5& : ; , & - , # \$ % , & 9 " # \$ " % : & " % 4& P) # - , & B , # 1) # (" % . , &) 1& : ; , &) ; ; , # - 0&

H# - 9* @8# - 8%

E:: , (B : - & :) & \$ (B #) 9 , & : ; , & . " : " 75 : \$. & , 11 \$. \$, % . 5&) 1& , % M5 (, - &) 1 : , % & , % .) / % : , # & -) 7 / + \$ 7 \$: 5& " % 4& - : " + \$ 7 \$: 5& B #) + 7 , (- & : ; " : & " . .) / % : & 1) # & ; / ? , & 7 \$ (\$: - & \$ % & +) : ; & - . # , , % \$ % ? & " % 4& B #) 4 / . \$ % ? & : ; , & + , - : & ' S * 9 ' . " 1& , 9) 79 , 4& 9 " # \$ " % : - 0& T ; " : & B #) : , \$ % & , % ? \$ % , , # \$ % ? & - : # " : , ? \$, - & ? , % , # " 775& - : # / ? ? 7 , & :) & .) % - \$ 4 , # 1& +) ; & " : & : ; , & .) (B / : " : \$) % " 7& " % 4& () 7 , . / 7 " # & 7 , 9 , 71& " # , & .) (B , % - " :) # 5& (/ : " : \$) % - & : ; " : 1& \$ % - : , " 41& " # , & # \$?) #) / - & 4 , : ; # (\$ % " % : - &) 1& F " # P \$ % \$ " % & , 9) 7 / : \$) % 0& < ; \$ - & P) # C& # , B # , - , % : - & " % & , N " (B 7 , &) 1& :) P) & - 5 % : ; , : \$. & + \$) 7) ? 5& B #) ^ , : & . " % & : " . c 7 , & : ; ,) # \$. " 7& , % ? \$ % , , # \$ % ? & \$ - / , - & + 5& , N " (\$ % \$ % ? & B # " : \$. " 7& # , - / 7 : - &) 1& \$ % : / # " 7& , 9) 7 / : \$) % & J " : & " & 9 , # 5& . 7) - , & B) \$ % : &) 1& 9 \$, P 1& \$ % &) / # & . " - , 1& & =) 0& : P) & B " # " 7) ? & ? , % , - L0& e % 4 , 41& : ; , & . ;) \$. &) 1& . : ; " % ? \$ % ? & : ; , & - : # " : ; ? 5& B #) 9 , 4& - / . . , - - 1 / 7 n& P , & - ; \$ 1 : , 4& 1 #) (& : ; , # # , H - ; " B \$ % ? &) 1& : ; , & 7) P & , 11 \$. \$, % : 1& " 7 :) / ? ; & 9 % " : / # " 775& D E F G ^ 0 H " . . , B : \$ % ? 1& , % M5 (, & ! " # @ F K & :) & : ; , & () 4 \$ 1 \$. " : \$) % &) 1& : ; , & (/ . ; & () # , & , 11 \$. \$, % : 1& - : # \$. : 75& D E F ^ 0 H 4 , B , % 4 , % : 1& ! " # @ F K U 0 & < ; , & # " : \$) % " 7& , % ? \$ % , , # \$ % ? &) 1& : ; \$ - & 7 " : ; , # & , % M5 (, 1& . : ; " % ? \$ % ? & \$: - & .) 1 " :) # & - B , . \$ 1 \$. \$: 51& B , # (\$: , 4& : ; , &) + : " \$ % \$ % ? &) 1& " & 9 % , P & , % M5 (, & , % 4) P , 4& P \$: ; & : , & -) / ? ; : & . ; " # " : ; , # \$ - \$. - 0& e % & B " # : \$. / 7 " # 1& : ; , & ! " # @ F K U H F U U U ' fg UUZ * & 89 " # \$ " % : & # , : " \$ % - & " & ?) 4& " 11 \$ % \$: 5& 1) # & 1) # (" : , 1& P ; \$ 7 , & " . Y / \$ # \$ % ? & D E F G ^ 0 & - B , . \$ 1 \$. \$: 50& @ \$ % " 7751& .) % . , # & \$ % ? & & " B B \$. " + \$ 7 \$: 51& : ; \$ - & P) # c & B #) 9 \$ 4 , - & : ; , & + \$) . " : " 75 - \$ - & .) ((/ % \$: 5& P \$: ; & " & 9 % , P & D E F G K & # , ? , % , # " : \$) % & , % M5 (, 1& P ; \$: ; & \$ - & " 7 # , " 45& " () % ? & : ; , & + , - : & 4 , 9 , 7) B , 4& -) & 1 " # & " % 41& () 9 \$ % ? & 1 #) (& : ; , & 1 \$ % , & - : # / . : / # " 7& . ; " # " : ; , # \$ M " : \$) % & ; , # , & B # , - , % : , 41& (\$? ; : & + , & 1 / # : ; , # & \$ (B #) 9 , 4& + 5& & , N : & , % ? \$ % , , # \$ % ? 0&

2

!

I+7@("0&=":#:))%&# , B# , - , % : " : \$) % &) 1& ! " # @ F K U & . # 5 - : " 7& - : # / . : / # , - n& \$ % & B " % , 7&) % ! " # @ F K U & P : & \$ - & - :) P % & \$ % & B ") & 1) # (& J ? # , 5L& " " % 4& \$ % & .) (B 7 , N& P \$: ; & D E F ^ 0 & " % 4& & D " D z & J 1) # , - : & ? # , , % L& \$ - & .) (B " # , 4& :) & (/ : " % : & F U U U ' fg UUZ * & - : # / . : / # , & \$ % & .) (B 7 , N& P \$: ; & D E F G ^ 0 & " % 4& & D " D z & J 5 , 7) P L U 0 & T " : ; , # & () 7 , . / 7 , - & \$ % : , # " : \$ % ? & P \$: ; & D E F G ^ 0 & .) 1 " :) # & " # , & - ;) P % & " - & # , 4& - B ; , # , & - & - & P , 77& " - & : ;) - , & 1) # (\$ % ? & " % & ; 54 #) ? , % & +) % 4 \$ % ? & & % , : P) # C & P \$: ; & ' , # \$ % , & J U U U & " % 4& .) 1 " :) # B ;) - B ; " : , & \$ % & : ; , & F U U U ' fg UUZ * & 89 " # \$ " % : 0& G " % , 7& H & - :) P - & " & .) (B " # \$ -) % &) 1& : ; , & = H : , # (\$ % / - & 1) 74 \$ % ? &) 1& P : & ! " # @ F K U & ;) 7) & - : # / . : / # , & " % 4& ;) 7) & - : # / . : / # , - &) 1& 9 " # \$ " % : - 0&

!
!
!
!
!

&

A, B*(%0&q%, :\$. &B"# (, : , #-&) l&; , &+, - :&# , B)#: , 4&DEFG^H4, B, %4, %:&@FK-0&

6%M5 (, &	c. -&!)# (" :. &) J_-^Vl&	q &!)# (" :. &) J (! l&	c. -&ffq && J ! ^V&-^Vl&	c. -&DEFG0& J_-^Vl&	q &DEFG0& J (! l&	c. -&ffq & J ! ^V&-^Vl&	* , l , # , % , &
! "#@FKU& FUUU'fgUUZ* &	Z0QZ&	UZ0aa&	V0QW&N&VW^U&	Z0WS&	W0V [&	U0Ua&N&VWl&	< ; \$ - &P)#c&
-2@FK&	[0Z` &	Q0aa&	_0SIW&N&VW^U&	[0W [&	V0V_ &	Z0 [Q&N&VW^&	2VU3&
@3@FK&	U0QW&	[`0SIW&	Q0WW&N&VW^U&	Z0QV&	W0VU&	U0`U&N&VWl&	2S3&
! "#@FK&	a0VV&	V`V0UQ&	Z0WW&N&VW^U&	Z0`a&	W0SQ&	[0aa&N&VW^&	2a3&
87@FK? [! *	%0#0&	`W0W&	%0#0&	Z0WS&	W0V [&	U0VW&N&VWl&	2VQ3&
87@FK?Z ! *	%0#0&	VVZ0W&	%0#0&	_0`W&	V0VW&	S0QS&N&VW^&	2VQ3!
- . @FK&	%0#0&	Q0Q0W&	%0#0&	[0_Q&	W0Va&	U0`_&N&VWl&	2VW3&
- , 5ZSZ@FK&	a0VU&	VUa0` &	Q0WW&N&VW^U&	U0_ &	W0_` &	Z0WW&N&VW^&	2`3&
- , 5VS [@FK*	U0UV&	VQ_ &	V0 [W&N&VW^U&	Z0W_ &	V0VW&	U0`_&N&VWl&	2`3&
-#@FK&	%0#0&	Z`0V&	%0#0&	V0W_ &	Z0QW&	Z0VW&N&VW^U&	2VZ3&
631@FKH FV`QgfhV`a*fgV`_D*	%0#0&	%0#0&	%0#0&	W0_` &	W0WZ&	U0_U&N&VWl&	2VS3&
@&@FK&	V0ZW&	a0VW&	U0VW&N&VW^U&	W0WQ&	U`0Q&	W0V_ &	2VV3&
8%.?4,)@FK&	%0#0&	`0W&	%0#0&	U0QW&	W0VQ&	V0a_&N&VWl&	2ZU3&
B()@FK&FV`aEfhV`_**	%0#0&	VWWW&	%0#0&	W0VZ&	_0aW&	U0VW&N&VW^U&	2ZU3&
6+)@FK&FV`Q` &	%0#0&	%0#0&	%0#0&	%0#0&	%0#0&	S0Z&	2ZZ3&

v"/7, -&# , &-;)P%&l)#&+ : ; &l)# (" :. &)N&4" :&)%&P\$; : &DEFG^H4) %& : ; , &7, l:l&"%4&l)#&DEFG^H4) %& : ; , &? : ; l0& ! "#& ! "#\$%&'()*&#+&#&)\$, ' , l& -20* -%/01&2)""# 21&l , #& G=Q[Z! * @3& @#(.13#(%& , * 3%(0\$)"" D * * > & 8HZW`U`l& 87(0* 87(13#(.)""* + * 9#((#& DVWl& - , n& -%/01&2)""# , #3& , l&- , 5ZSZn& -%/01&2)""# , 5ZSZl& - , 5DEFn& -%/01&2)""# , 5VS [l& -#(n` -#(%& , , 5-@Vl&631n&6#S2*312*\$0* @40* @1. % , #51S` (% , l&4 ,)n&G ,)%21 + 1\$# , , 5-VWVl`B()n&B#((0#1 + 7 () , * ()'9 , #)l&6 +)n&6#S2*2#+) .07` (#&) %0#0& : &# , B)# : , 4&

&

<J5 (" + \$ (- & , *%P(9&+ # - %

K (- (%9* - + - 7%

D# \$ * # 76%Q#4 (**+ - 7% , - 4% , - , *68+8%#% (* (9& , &9&5#&l (- &+ , *8%

< ; , & .) 4\$?&- , Y / , % . , &) l& ! "#@FKU&JD = {WVaZV0Vl&P" -& \$ -) 7" : , 4&l#} (& : ; , & ? , %) (\$. &FDE&) l& ! "#\$%&'()*&#+&#&)\$, ' , & ! GQE = <RSZa&P ; \$; & P" -& c&4/5& l / #& \$ - ; , 4& + 5&F#0& 0& * " P" : &JF , B" : (, % : &) l&8\$) . ; (\$ - : #5& "%4&l \$. #) + \$) 7) ? 5l& ' . :)) 7& l&6%9\$#) % (, % : " 7& "%4&l8\$) 7) ? " 7& " . \$, % , - l& < ; , & ' : " : , &m%\$9 , # - : 5&) l& D , P&w , # - , 5l&m` EL0&E&l\$# - : &G = * & / - \$%&R ;) { U { 1 } #& "%4&l D . } { U { # , 9&B#& (, # - & P" - & B , #1) # (, 4&) & \$ -) 7" : , & : ; , &4 , - \$# , 4& = F` & "%4&l :) & \$% - , # : & : P) & # , - : # \$: \$) %& \$ - ; , -n&JVL& " & / %\$Y / , & D .) e& - \$: , & ' : & : ; , & % : " / # 7& E < \ & .) 4) %l& (, " %P ; \$7 , & : ; , & % : " / # 7& - :) B& .) 4) %&P" - & # , () 9 , 4& "%4&l\$%& : ; " : &B - \$ \$) %&JUL& " & % , P&R ;) e& - \$: , & P" - & \$% : #) 4 / . , 40& E%& " 44\$: \$) % 7& X9 , # 7& B& 6N : , % - \$) %&G = * & JX6HG = * l& P" - & B , #1) # (, 4& \$%&) #4 , #& :) & - / B# , - & # %& \$% : , # % 7& R ;) e& # , - : # \$: \$) %& - \$: , & / - \$%& ? & R ;) ' / B { U { 1 } } #& "%4&l R ;) ' / B { U { # , 9& B#& (, # - & < ; , & , % ? \$% : , # , 4& ! "#@FKU& 9" # \$ % : - & JFUURfgUUZRL& P , # , & B#) 4 / . , 4& l) 7) P\$% ? & : ; , & - " (, & B# :) .) 7l& , N , B : & l) #& 4\$ll , # , #& \$% : , # % 7& (/ : ? , %& , & B#& (, # - & J ! "#@FKU { RR { 1 } } #& "%4&l ! "#@FKU { RR { # , 9l& - , Y / , % . , &) l& " 7&B#& (, # - & " , # , B) # : , 4& \$%& < " + 7 , & ' ZL0& < ; , & l \$% 7& X6HG = * & B#) 4 / . : - & P , # , & . 7) , 4& \$%&) & : ; , & B6 < US " J0L&B7" - (\$4& + , ; P , %& : ; , & D .) e& "%4&l R ;) e& # , - : # \$: \$) %& - \$: , - l& : ; / - & B#) 4 / . \$% ? & B6 < US " H ! "#@FKU& "%4&l B6 < US " H ! "#@FKUHUUURfgUUZR& , NB# , - : \$) %& B7" - (\$4 - 0& < ; , & .) (B7 , : , & \$% - , # - & - , Y / , % . \$% ? & P" - & . " # \$, 4&) / & / - \$% ? & < { # , 9&B#& (, # - & + 5& 8 ! * & \ , %) (\$. - & JG " 4 / " l& e : " 75L0& E7& G = * & " (B7&l\$. " : \$) %& - & P , # , & B , #1) # (, 4& / - \$% ? & : ; , & G ; / - \$) %& l& K \$? ; Hl&4 , 7& : 5& FDE&B) 75 (, # , - , & JD68l& } & # , - : # \$: \$) %& "%4&l

!
!
!
!
!
!

K),=EWW]18PR18aaQbaa_08
 2ZQ38 608w/##/-18F086%?,718q08':"#18q08!)%-%)18w088#"%4\$18>08608@;7+,#?18F08K08
 8#)c,-18>08T\$7-)18w08=;,%18q08>\$7,-18!08=;/%18G08>\$18F08T08\);"#18<08
 F)79%-c518*08q)%,%518F08*08q),-18w08608D\$,7-,%18<08K,"4H\)#4)18T08
 \,%?18*08q#"-%518\08T08T,\$18!08w08K)7-:18w08E08!..="()%18D08E088"c,#18
 4"1.)\$*B(=EWF\18RV18VVUubVUS08
 2Za38 K08E08*,75,"18w08!08v#:\$-18*08T))45,#18'08E08*\$ (c/-18T08E089"%84,#8F)%c18
 -'1(O)+',="7EWWZ18FF18aa[Wbaa[`08
 2Z_38 !08T08G"%:78"%18608=08G;#;77"18w08F08qP"-%) -c\$18v08'08>)+"%918w08
 !5-78c18608\#118<08=#9,#18608E-,718808E08'B#9%?,#18G08>"%,18@08*08
 '7,(,18X*- '1+18="B(")\$=EWWF18718[U`b[[W08
 2ZS38 T08q"+-.;18H(.#6"7,.##11"Z"-18="6"7,.##11"=EWF187718VUQbVZU08
 2Z`38 !08F08T\$%18=08=088"77"#418q08F08=P:"%18608w08F)4-)18G086(-7,518G08*08
 69"%-18*08!08q,? "%18608808q#--\$%,718E08\08T08>,-78,18E08!..=)518'08w08
 !.D\$.;77"-18\08D08!/#-;/4)918D08'08G"%%/18608E08G)::#:%18K08*08G)P,7718
 08w08, "418E08v"?9%18q08'08T\$7-)18H(.#6"7,.##11"Z"-18="6"7,.##11"=E
 WFF187V18UZQbU[U08

2[W38 G08F08E4"(-18G08v08E1)%\$%,18\088/%c\$.M\$18v08808=;,%18e08T08F"9%-18D08
 6.;)7-18w08w08K,"4418>08T08K/%?18\08w08q"B#"718*08T08\#)--,Hq/%-:7,9,18
 E08w08!.=)518D08T08!)#%"518*08X,11%,#18*08w08*, "418F08=08*\$.; "#4-)%18
 w08'08*\$.; "#4-)%18<08=08<,#P\$78?,#18G08K08AP"#18H(.#6"7,.##11"Z"-18="6"7,
 .##11"=EWF187718UVZbUUV08
 2[V38 E08w08!.=)518*08T08\#)--,Hq/%-:7,9,18G08F08E4"(-18!08F08T\$%18>08=08
 ':)%\$18*08w08*, "418X="H55="6"7,.##11"=EWWX18FU18aQSBa_[08
 2[U38 G086(-7,518q08=P:"%18H(.#6"7,.##11"Z"-18="6"7,.##11"=EWW]18TU18
 UVUabUVZU08
 2[Z38 \08D08!/ #-;/4)918G08'c/+...c18E08E08>+,4,918D08'08G"%%/18*08E08':,%18
 *08E08D\$.;77-18!08F08T\$%18@08>)%?18E08E08v"?9%18H(.#6"7,.##11"Z"-18="6"7,
 .##11"=EWF187V18ZQbZa_08
 2[38 G08v08E1)%\$%,18*08T08\#)--,Hq/%-:7,9,18D086.;)7-18w08w08K,"4418D08T08
 !)#%"518!08!/ -:5"cl()918<08=08<,#P\$78?,#18E08m#M;/(:- ,918G08K08AP"#18
 G08F08E4"(-18H(.#6"7,.##11"Z"-18="6"7,.##11"=EWF187E18ZQbZa_08
 &

!
 !
 !
 !
 !
 !

