

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/57991> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Rossius, S.G.H.

Title: Q-wires': Synthesis, electrochemical properties and their application in electro-enzymology

Issue Date: 2017-09-26

SAMENVATTING/SUMMARY

1. Nederlandse samenvatting

Redoxenzymen spelen een fundamentele rol in het metabolisme van alle organismen. Bij de door redoxenzymen gekatalyzeerde reacties worden elektronen van het ene naar het andere substraat overgebracht. Deze enzymen bevatten daartoe doorgaans enkele cofactoren, die als het ware een transportketen voor elektronen tussen de verschillende *active sites* vormen. Aan deze *active sites* vinden de oxidatie- en reductieprocessen van de substraten plaats. Aan het intramoleculaire transport van elektronen kunnen eventueel andere processen gekoppeld zijn, bijvoorbeeld protontranslocatie over het plasmamembraan van bacteriën, waarbij een protonconcentratiegradiënt en daarmee een *proton motive force* wordt opgebouwd, die dan weer gebruikt kan worden voor bijvoorbeeld ATP synthese. Een voorbeeld van een dergelijk enzym is cytochroom bo_3 uit *E. coli*. Dit enzym oxideert ubiquinol, de laatste stap in de zogenoemde 'ademhalingsketen', brengt de vrijgemaakte elektronen over naar zuurstof en draagt tevens bij aan het protongradiënt. Naast dit enzym werden er in dit onderzoek nog een drietal andere ademhalingsenzymen bestudeerd, te weten: *E. coli* succinaat dehydrogenase; *E. coli* DMSO reductase en *E. coli* fumarate reductase.

Aangezien redoxenzymen in feite elektronen als substraat gebruiken, is het een voor de hand liggend idee om ze direct aan een elektrode te koppelen, zodat directe elektrochemische experimenten (zoals cyclische voltammetrie) aan het enzym uitgevoerd kunnen worden. Dit is in feite wat *protein film voltammetry* (PFV) inhoudt: het vormen van een stabiele monolaag geïmmobiliseerde enzymen aan een elektrodeoppervlak, waarbij alle enzymen correct georiënteerd zijn en het elektronentransport tussen enzym en elektrodeoppervlak niet snelheidslimiterend is. Op deze manier kan de katalyse aan de *active site*, die niet met het elektrodeoppervlak is geassocieerd, worden bestudeerd, en kunnen aan het interne elektronentransport gekoppelde processen worden bestudeerd. Bovendien is voor PFV slechts zeer weinig enzympreparaat nodig, wat voordelig is. Daarnaast kan de enzymmonolaag bijvoorbeeld kortstondig blootgesteld worden aan zeer extreme condities (zoals pH), aangezien de

gemodificeerde elektrode snel naar een andere buffer kan worden overgeplaatst.

Om PFV daadwerkelijk te realiseren moet echter een aantal hindernissen worden overwonnen. Zo kan de *active site* van een enzym bijvoorbeeld te diep begraven liggen, waardoor directe uitwisseling van elektronen tussen het enzym en de elektrode niet mogelijk is. In veel gevallen denatureren enzymen wanneer ze in contact komen met het elektrodeoppervlak. In het geval van goudelektroden kan dit euvel verholpen worden door het aanbrengen van een zogeheten *self-assembled monolayer* (SAM) van bijvoorbeeld alkaanthiolen op het elektrodeoppervlak, een strategie die ook in dit onderzoek is toegepast. De vraag rijst nu echter of er in dit geval nog sprake is van elektronentransport tussen enzym en elektrode dat niet snelheidslimiterend is, aangezien de onderlinge afstand alleen maar vergroot is. Verder is er waarschijnlijk geen sprake van immobilisatie van het enzym en kan correcte oriëntatie eveneens niet worden gewaarborgd. In dit onderzoek is daarom een strategie ontwikkeld die direct en goed gedefinieerd elektronentransport tussen enzym en elektrode garandeert.

Door toepassing van geleidende *molecular wires* is er in dit onderzoek gepoogd de afstand tussen enzym en elektrodeoppervlak te overbruggen. Deze *molecular wires* bestaan uit een stuk *oligo(phenylenevinylene)* (OPV), een sterk π -geconjugeerd systeem dat niet snelheidslimiterend is voor elektronentransport. Aan weerszijden zijn deze *wires* gemodificeerd met functionele groepen: een thiolgroep aan de ene zijde maakt binding met het oppervlak van een goudelektrode mogelijk, terwijl een chinogroep aan de andere zijde interacties met een chinonbindende *active site* faciliteert. De hiergenoemde *molecular wires* worden in dit proefschrift regelmatig aangeduid als *Q-wire* (naar het Engelstalige *quinone*). Tussen de chinonkopgroep en het OPV-gedeelte is een extra sp^3 -koolstofaatom opgenomen om de conjugatie te onderbreken, zodat de natuurlijke eigenschappen van de chinogroep gehandhaafd blijven en er daarnaast enige flexibiliteit mogelijk is tijdens de interacties tussen een bepaald enzym en de betreffende *Q-wire*. Samengevat zorgen SAMs gevormd met

deze *Q-wires* voor een goed gedefinieerd en snel elektrontransport tussen elektrodeoppervlak en enzym.

Voor dit onderzoek is een reeks *Q-wires* met verschillende chinonkopgroep (ubichinon of menachinon) en van verschillende lengte gesynthetiseerd. Daarnaast is een *wire* gemaakt die, in plaats van een OPV-systeem, een volledig verzadigd stuk alkaan bevat. In hoofdstuk 4 wordt deze *wire* met de geconjugeerde *wires* vergeleken om na te gaan of het OPV-systeem inderdaad aan een sneller elektrontransport bijdraagt. Dat de synthese van de *Q-wires* niet zonder slag of stoot is verlopen, blijkt uit hoofdstuk 2, waar een greep uit de problemen die zijn tegengekomen wordt besproken. De ontwikkeling van de uiteindelijke synthesesmethode, die in hoofdstuk 3 in detail wordt behandeld, wordt hier eveneens beschreven, naast enkele aanbevelingen voor eventueel vervolgonderzoek. In de uiteindelijke synthesesmethode staat de Grubbs alkeenmetathese reactie centraal: een gemodificeerde chinogroep wordt met een allylgroep of vinylgroep gekoppeld aan de vinylgroep van de rest van het molecuul, dat eveneens de goudbindende thiolgroep bevat (in geacetylerde vorm).

In hoofdstuk 4 worden de *Q-wires* onderworpen aan experimenten die de elektrochemische eigenschappen van de *wires* moeten vaststellen. Aan de hand van een serie 'Laviron plots' werden enkele belangrijke kinetische parameters bepaald, waaronder de *apparent rate constant* (k_{app}), die de uitwisselingssnelheid van elektronen tussen de chinogroep en de elektrode beschrijft. Deze *rate constants* bleken zowel van de pH als van de *Q-wire* lengte af te hangen. Dit laatste heeft waarschijnlijk te maken met het verbreken van de conjugatie door toevoeging van het extra sp^3 -koolstofatoom. Hoewel bij zeer hoge pH de *apparent rate constants* sterk toenemen en deze waarden (toebehorend aan *wires* van verschillende lengte) zelfs lijken te convergeren, zijn ze erg klein in het biologische relevante pH-gebied. Op basis van deze waarden, die sterk gekoppeld blijken te zijn aan de snelheid van protonuitwisseling, zou geconcludeerd kunnen worden dat de snelheid van het elektrontransport tussen de elektrode en het enzym door de *wires* wel degelijk snelheidsbeperkend kan zijn. Zoals uit hoofdstuk 5 echter blijkt, katalyseren enzymen eveneens

protonuitwisseling, en zijn de gevonden waarden voor de *apparent rate constants* (bij neutrale pH) niet representatief voor de daadwerkelijke snelheid van het elektrontransport door de *wires*. Verder levert een *proton-coupled electron transfer* (PCET) model de waarden voor de microscopische parameters (potentialen en pK_a 's) die in het 9-ledige vierkante schema van Laviron voorkomen. Dit schema beschrijft de twee-elektron/twee-proton redoxreactie die de chinongroep ondergaat. Aan de hand van deze potentialen en pK_a 's kon bepaald worden welke volgorde van elektron- en protonuitwisseling bij een bepaalde pH dominant is (bijvoorbeeld: elektron-elektron-proton-proton bij $pH > 12$).

Tenslotte wordt in hoofdstuk 5 bestudeerd of de *Q-wires* inderdaad in staat zijn om elektronen met enzymen uit te wisselen. Zeker voor succinaat dehydrogenase bleek dit het geval. Vooral wanneer langere *Q-wires* werden gebruikt, werd regelmatig een overtuigend katalytisch signaal waargenomen. Dit was in mindere mate het geval voor fumaraat reductase en DMSO reductase (hoewel in het laatste geval wildtype membranen werden gebruikt, die niet verrijkt waren met DMSO reductase). De resultaten die zijn behaald met cytochroom bo_3 zijn moeilijker te interpreteren, aangezien de gemeten signalen een convolutie van verschillende processen zijn, waaronder enzymgekatalyseerde zuurstofreductie en aspecifieke zuurstofreductie door het elektrodeoppervlak. In alle gevallen geldt echter dat de resultaten uitsluitend kwalitatief van aard zijn, aangezien experimenten nooit exact herhaald konden worden. Om experimenten die kwantitatieve resultaten leveren te kunnen verwezenlijken is daarom nog veel optimalisatie en vervolgonderzoek nodig. Desondanks is hier overtuigend aangetoond dat een goed gedefinieerde elektronuitwisseling tussen *Q-wires* en enzymen inderdaad mogelijk is.

2. English summary

Redox enzymes play a fundamental role in the metabolism of all organisms. The reactions that are catalyzed by this class of enzymes are characterized by the transfer of electrons between substrates. To facilitate electron transfer, these enzymes contain several cofactors that together form an

'electron pathway' through the enzyme, connecting the different active sites where substrate oxidation or reduction processes occur. Other processes, such as proton translocation across the bacterial plasma membrane, may be coupled to the intramolecular electron transfer. This proton translocation results in a proton concentration gradient across the membrane and the build-up of a 'proton motive force', which can be subsequently used for e.g. ATP synthesis. The *E. coli* enzyme cytochrome *bo₃*, for example, catalyzes the final step of the respiratory chain: it oxidizes ubiquinol, transfers the liberated electrons to oxygen and contributes to the proton gradient. In addition to this enzyme, three other respiratory enzymes were studied in this research: *E. coli* succinate dehydrogenase; *E. coli* DMSO reductase and *E. coli* fumarate reductase.

Considering the fact that redox enzymes can accept electrons as a substrate, the idea to directly link them to an electrode might occur, enabling direct electrochemical experiments (e.g. cyclic voltammetry) on the enzyme. Such experiments may be referred to as 'protein film voltammetry' (PFV), where a stable monolayer of immobilized enzyme is formed on an electrode surface, all enzymes are positioned correctly and where electron transfer between electrode surface and enzyme is non-rate-limiting. In this scenario, catalysis at the other active site – which is not associated with the electrode surface – can be studied, along with processes coupled to internal electron transfer. PFV requires only very small amounts of enzyme, which is advantageous. Furthermore, PFV allows for measurements under extreme circumstances (e.g. pH), since the modified electrode can be rapidly exchanged between different buffers.

However, in order to accomplish PFV, several obstacles need to be overcome. For example, the enzyme's active site may be too deeply buried, preventing direct electron exchange between electrode and enzyme. Furthermore, denaturation often occurs when the enzyme comes in direct contact with the (metallic) electrode surface. When using gold electrodes, this problem can be circumvented by modifying the electrode surface with a 'self-assembled monolayer' (SAM) of e.g. alkanethiols, a strategy also applied in this study. However, since the SAM now prevents close contact

between enzyme and electrode surface, non-rate-limiting electron transfer can no longer be guaranteed. Additionally, it is unlikely that an alkanethiol SAM can achieve enzyme immobilization and proper enzyme orientation by itself.

In this study, a strategy was developed that ensures direct, well-defined electron transfer between enzyme and electrode. Conducting 'molecular wires', consisting of a highly π -conjugated 'oligo(phenylenevinylene)' (OPV) system, were used to span the distance between enzyme and electrode and facilitate non-rate-limiting electron transfer. Both extremities of the wires are modified: a thiol moiety anchors the wire to the gold electrode surface, while, at the opposite end of the wire, a quinone moiety allows for interaction with the quinone-binding pocket of certain enzymes – the wires are therefore designated as 'Q-wires'. The quinone moiety is not directly connected to the OPV system: a methylene bridge interrupts the π -conjugation, preserving the natural electrochemical properties of the quinone group. In addition, the additional sp^3 carbon allows for more flexibility during interactions between Q-wire and enzyme, enhancing their binding.

For this research, a series of Q-wires was synthesized, differing in length and quinone moiety (either menaquinone or ubiquinone). Additionally, a fully saturated wire, composed of an alkane tether instead of an OPV tether, was prepared. In chapter 4, this wire is compared to the conjugated Q-wires to assess whether the OPV system indeed contributes to fast electron transfer. In chapter 2, a selection of the many complications encountered during the Q-wire synthesis is discussed. The development of the definitive synthesis strategy, which is treated in chapter 3, is also discussed here, together with a number of recommendations for follow-up research. The ultimate synthesis strategy outlined in chapter 3, predominantly features a Grubbs olefin metathesis reaction: in a final step, a modified quinone moiety is connected to the rest of the wire (containing the terminal thiol) using this reaction.

In chapter 4, the electrochemical characteristics of the Q-wires are treated. A series of 'Laviron plots' provides important kinetic parameters, such as

the 'apparent rate constant' (k_{app}), which represents the rate of electron exchange between electrode and quinone moiety. These rate constants proved to be dependent on both pH and Q-wire length, the latter presumably caused by the aforementioned inclusion of the sp^3 carbon, which disrupts the conjugation in the molecule. Although the apparent rate constants increase drastically at very alkaline pH, and these rate constants – pertaining to wires of different length – even appear to converge, at biologically relevant pH values, the observed rate constants are very low. Based on these values, which suggest a strong coupling to proton exchange rates, non-rate-limiting electron transfer through these wires can no longer be guaranteed. However, as discussed in chapter 5, enzymes additionally catalyze proton exchange. Therefore, the apparent rate constants cannot be considered a suitable measure for 'pure' electron transfer rates. Finally, a 'proton-coupled electron transfer' (PCET) model provides values for the microscopic parameters (potentials and pK_a s) encountered in Laviron's nine-member square scheme, which describes the two-electron/two-proton redox reaction of the quinone moiety. Based on these parameters, the sequence of electron and proton transfers predominant at a certain pH could be elucidated (e.g. electron-electron-proton-proton at pH > 12).

Finally, in chapter 5, it is investigated whether electron exchange indeed occurs between the Q-wires and the studied enzymes. Convincing catalytic signals were indeed observed, especially in case of succinate dehydrogenase in combination with longer Q-wires. To a lesser extent, this was also observed for fumarate reductase and DMSO reductase, although in the latter case, wild-type membranes were used, which were not enriched in DMSO reductase. The results obtained using cytochrome bo_3 are less readily interpreted, since the measurements represent a convolution of several different processes, such as enzyme catalyzed oxygen reduction and nonspecific oxygen reduction by the electrode surface. Because of overall poor reproducibility, the obtained results can only be considered to be of qualitative nature. Substantial optimizations are therefore still required to achieve quantitative results. Nevertheless, well-defined electron exchange between Q-wires and enzymes has been convincingly demonstrated.