



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Fluorescence correlation spectroscopy on electron transfer reactions : probing inter- and intramolecular redox processes

Sen, S.

### Citation

Sen, S. (2016, June 30). *Fluorescence correlation spectroscopy on electron transfer reactions : probing inter- and intramolecular redox processes*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/40761>

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/1887/40761>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/40761> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Sen, S.

**Title:** Fluorescence correlation spectroscopy on electron transfer reactions : probing inter- and intramolecular redox processes

**Issue Date:** 2016-06-30

# Samenvatting

Biologische processen zoals fotosynthese, oxidatieve fosforylering en ademhaling geschieden via elektronenoverdracht (ET). Om deze functies uit te kunnen voeren heeft een cel, over het algemeen, een aantal onmisbare componenten nodig. Kopereiwitten behoren tot deze hoofdrolspelers. Ze zijn bij een hele reeks redoxprocessen betrokken, voornamelijk bij de biologische energieproductie en de metabole processen. De laatste decennia zijn wij getuige geweest van grote inspanningen om de electronoverdrachtmechanismen te begrijpen. Baanbrekend onderzoek betrof de theorie en moleculaire modellen van eiwitten. Hoe ET, met behulp van donor en acceptor, in deze eiwitten verloopt en wat de specificiteit bepaalt: deze vragen zijn tot op heden onderwerp van discussie. Azurine is een klein blauw kopereiwit dat bij ET-processen in Gramnegatieve bacteriën een belangrijke rol speelt. In dit proefschrift werd azurine gekozen vanwege zijn hoge stabiliteit en vooral vanwege zijn bekende structurele, spectroscopische en mechanische eigenschappen.

De beschikbaarheid van detectietechnieken die op fluorescentie gebaseerd zijn, heeft geleid tot een doorbraak in de optische studies van de eigenschappen van biomoleculen zoals enzymmechanisme, eiwitvouwing enz. Fluorescentie correlatiespectroscopie (FCS) is toegepast om gedetailleerde informatie over ET reacties in azurine te verkrijgen. Deze methode kan ook op andere redox-eiwitten gemakkelijk worden toegepast. Tevens heeft deze methode ook potentiële toepassingen voor het onderzoek van biosensoren die op fluorescentie berusten, maar ook in moleculaire elektronica. In het huidige proefschrift wordt een aantal FCS experimenten met ATTO655-gelabeld azurine beschreven. Het doel hiervan was om meer inzicht te krijgen in de elektronoverdrachtprocessen.

In de inleiding (**Hoofdstuk 1**) worden de kenmerken van blauwe kopereiwitten in het algemeen, en van azurine in het bijzonder, gepresenteerd. Vervolgens wordt er een overzicht van de methoden gegeven die voor dit proefschrift relevant zijn. Voorbeelden van die methoden zijn: fluorescentie resonantie-energieoverdracht (FRET), fluredox principe, fluorescentie correlatiespectroscopie (FCS). Dit hoofdstuk bevat ook een overzicht van de theorie over elektronoverdracht.

In **Hoofdstuk 2** wordt de kalibratie van de experimentele opstelling beschreven, die gebruikt werd om de elektronoverdracht in azurine te bestuderen. ATTO655, een rood-absorberend label, werd gekozen voor het kalibreren van de opstelling. De belangrijkste doelstelling van dit werk was de nauwkeurige bepaling van de driedimensionale parameters ( $k$  en  $r_0$ ) van de experimentele opstelling. Eerst wordt een overzicht gegeven van de autocorrelatiefunctie (ACF), ' $D$ ' de diffusie coëfficiënt van het onderzochte molecuul, ' $\tau_D$ ' de verblijftijd van het molecuul in het onderzochte volume, de drie dimensionele parameters ( $k$  en  $r_0$ ) en hoe ze door FCS vergelijkingen aan elkaar zijn gerelateerd. Vervolgens wordt de kalibratie uitgevoerd in zuivere buffer en in een 57% (w/w) sacharoseoplossing die verschillende

concentraties van ATTO655 label bevat. Twee benaderingen werden gehanteerd om het werkelijke volume van de opstelling te bepalen. De eerste benadering was het gemiddelde aantal moleculen in het onderzochte volume uit te zetten als een functie van de concentraties van de label en de andere benadering was de verkregen gegevens uit de autocorrelatie te fitten met de FCS vergelijkingen. De eerste benadering leverde  $V_{eff} = 2.3 \pm 0.2$  fL in buffer en  $2.9 \pm 0.1$  fL in 57% (w/w) sucroseoplossing. De uitkomst bij de tweede benadering was  $V_{eff} = 2.1 \pm 0.5$  fL in buffer en  $V_{eff} = 1.3 \pm 0.2$  fL in 57% (w/w) sacharoseoplossing. De experimenteel verkregen 'k' waarde in 57% (w/w) sacharoseoplossing werd gebruikt bij de fitting van de ACFs van gelabelde azurine samples (hoofdstuk 3, 4 en 5). Op basis van de fittings van ACFs werd  $\tau_D$  van het label bepaald. De gemiddelde diffusietijd van het label was  $0.10 \pm 0.01$  ms in buffer en  $2.9 \pm 0.3$  ms in 57% w/w sucrose oplossing. Het effectieve volume werd ook bepaald door afbeelding van nanostaafjes van goud. Het berekende volume bleek vergelijkbaar te zijn met de waarden van de twee bovengenoemde benaderingen. We hebben vervolgens gekeken naar de diffusietijd van gelabelde eiwitten en de snelheid van de bimoleculaire reactie tussen het gelabelde azurine en redox middelen. Deze bimoleculaire reacties hebben een zeer kleine activeringsbarrière en ze zijn door diffusie gecontroleerd met snelheden van  $k_d = 10^9 - 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  in waterige oplossing bij kamertemperatuur. Een ruwe schatting van de snelheid in een sacharoseoplossing werd gemaakt met behulp van Smoluchowski's principe. Deze kan de waarden van  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  in hoge viskeuze vloeistof bereiken. Vervolgens hebben we met behulp van een Jablonski diagram de fotogeïnduceerde processen van het label besproken. Uiteindelijk kon een overzicht gegeven worden van de thermodynamica van de fotogeïnduceerde elektronoverdracht (PET) en ook van de belangrijke bijdragen in het begrijpen van PET reacties in metaaleiwitten zoals azurine.

**Hoofdstuk 3** beschrijft een uitgebreid onderzoek van de producten van de labelingsreactie van zink-azurine met het fluorescerende label ATTO655. Eerst hebben we het effect van viscositeit op de translationele diffusietijden van gelabelde Zn-azurine in afwezigheid van redoxchemicaliën onderzocht. De diffusietijd van het gelabelde molecuul nam toe naarmate de sucrose concentratie in de buffer hoger werd [200  $\mu\text{sec}$  in zuivere buffer (0% sucrose) en  $12 \pm 2$  ms in 57% (w/w) sucrose-oplossing]. Daarna werden FCS experimenten uitgevoerd om het gedrag van de gelabelde producten onder variërende redoxomstandigheden te begrijpen. We hebben de PET reacties onderzocht met behulp van twee varianten: de ene was gelabeld aan de N-terminus en de andere op de Lys122 positie. Omdat Zn-azurine redoxinactief is, werden er alleen intermoleculaire ET reacties tussen de label en de redox-chemicaliën waargenomen. Oxiderende middelen hadden geen effect op de autocorrelatiefuncties van gelabeld Zn-azurine en ze konden worden gefit met de FCS vergelijking die de diffusie-term als enige component bevat. Maar de ACFs onder reducerende omstandigheden konden gefit worden met een FCS vergelijking die een diffusie-term bevat en een  $G_I(\tau)$  term. De analyse van deze resultaten toonde aan dat de voorwaartse reactiesnelheid lineair afhankelijk was van de reducerende concentraties overeenkomstig de één-electron reductie van het label door de reductant [natrium ascorbaat of kaliumhexacyanoferraat (II)]. Dit geeft aan dat reducerende verbindingen de "blinking" van het label veroorzaakten. De bimoleculaire ET reactiesnelheid tussen de label en de redox-

chemicaliën was  $10^7$ - $10^8$   $M^{-1}s^{-1}$ , kleiner dan de diffusie-gecontroleerde reactiesnelheden in pure buffer ( $10^9$   $M^{-1}s^{-1}$ ). Dit onderbouwt de conclusie dat reacties in 57% (w/w) sucrose-oplossing langzaam verlopen. De oxidatie van het gereduceerde label terug naar de niet-gereduceerde vorm lijkt in overeenstemming te zijn met het idee dat opgeloste zuurstof verantwoordelijk is voor de reoxidatie van de label omdat zuurstof in de sucrose oplossing in grote overmaat aanwezig is en de zuurstofconcentratie in de loop van het experiment niet aanzienlijk verandert.

Een gedetailleerd onderzoek van de uitkomsten van de labelingsreactie van wild type Cu-azurine met het fluorescerende label ATTO655 wordt in **Hoofdstuk 4** beschreven. Fluorescentie correlatiespectroscopie werd uitgevoerd om het gedrag van de gelabelde producten onder variërende redoxomstandigheden te begrijpen. In deze studie hebben we ook geprobeerd twee varianten te gebruiken om de PET reacties te begrijpen: één was gelabeld aan de N-terminus en een andere op de Lys122 positie. In het eerste geval werd alleen de “blinking” van het label of de intermoleculaire ET reactie tussen de label en de reducerende middelen waargenomen. Oxiderende chemicaliën hadden geen effect. In Cu-azurine die op Lys122 gelabeld werd, hebben wij ET dynamics waargenomen op microseconde tijdschaal en de reactie bleek onafhankelijk van redox concentraties te zijn. Deze reactie werd aangemerkt als intramoleculaire ET reactie tussen de label en het redox-centrum. Er wordt verondersteld dat twee verschillende mechanismen bij ET betrokken zijn. Door de theorie van Marcus over ET-overdracht toe te passen en door middel van de experimenteel waargenomen voorwaartse en achterwaartse snelheden, werden de waarden van de reorganisatie-energie berekend. Met behulp van  $k_1^f = 4.8 \times 10^4$   $s^{-1}$  en  $k_1^b = 7.5 \times 10^2$   $s^{-1}$  onder oxiderende omstandigheden, verkrijgt men  $\lambda = 0.75$  eV. Onder reducerende omstandigheden werd  $\lambda = 1.16$  eV verkregen met behulp van de experimentele waarden  $k_2^f = 4.2 \times 10^6$   $s^{-1}$  en  $k_2^b = 1.3 \times 10^4$   $s^{-1}$ . De belangrijkste conclusie uit het huidige werk is dat er geen PET reacties met aminozuren in het eiwit worden waargenomen, maar PET naar het metaal wordt wel waargenomen als Cu de actieve site bezet en als het label dichtbij het metaalcentrum (op Lys122) is. Als laatste werd er een covalent routemodel voor de ET reactie tussen Cu en label voorgesteld ter ondersteuning van de experimentele gegevens.

Ook **hoofdstuk 5** beschrijft een uitgebreid onderzoek naar fotogeïnduceerde ET reacties in de gelabelde producten van K122S en K122Q Cu-azurine varianten onder redox omstandigheden. Hier hebben we geprobeerd de ET reactie te begrijpen door gebruik te maken van een specifieke mutant waarbij het label wordt verondersteld gebonden te zijn aan het Lysine-oppervlak. In het geval van deze varianten, werd er geen extra verval in de FCS curven waargenomen. De lage ET snelheden toonden aan dat de labelingspositie op het oppervlak van het eiwit op minimaal 20 Å afstand van het kopercenter moest zijn. Dit geeft ook aan dat het label op het oppervlak van het eiwit waarschijnlijk op andere lysine residuen bijv. Lys 24/Lys27/Lys128 gebonden is. Met behulp van Marcus theorie over ET-overdracht en door middel van de experimenteel waargenomen voorwaartse en achterwaartse snelheden, werden de waarden van de reorganisatie-energie berekend. In dit hoofdstuk is tevens aangegeven hoe de snelheid van PET tussen label en

redox site, afhankelijk van de positie van de label op het oppervlak van het eiwit, kan variëren. Aangezien de ET parameters (drijvende kracht, reorganisatie-energie) experimenteel werden bepaald, werden voor een aantal gevallen de variatie van de snelheden berekend. Het is nu van belang om te zien hoe deze snelheden met de deactivering van de geëxciteerde labels door FRET kunnen worden vergeleken. Onze berekening laat zien dat de PET snelheid, afhankelijk van drijvende kracht en reorganisatie-energie, de millisecondeschaal bereikt bij Cu-label afstanden tussen 15-20 Å, terwijl de FRET snelheid een veel minder geprononceerde afstandsafhankelijkheid vertoont. Omdat er geen gedetailleerde structurele informatie beschikbaar is voor de posities van de labels in K122S en K122Q-ATTO655 gelabeld species, hebben wij het model van een "organic glass" van Moser en Dutton voorgesteld voor de berekening van de ET-snelheid in het eiwit.