

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20273> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Elmalk, Abdalmohsen

Title: Exposing biomolecular properties one molecule at a time

Date: 2012-12-13

Samenvatting

Eiwitten spelen een essentiële rol in allerlei processen in de levende cel. Ze zijn betrokken bij enzymatische catalyse, gerichte verplaatsing en transport, de werking van het immuunsysteem, signalering via het zenuwstelsel, groei en differentiatie van cellen, om maar enkele te noemen. Ons begrip van biologische systemen wordt beperkt door de kennis van de structuur en functie van de daarin voor komende eiwitten. In het afgelopen decennium zijn nieuwe, krachtige technieken ontwikkeld om de verdeling, de dynamica en de wisselwerking van eiwitten en andere componenten zowel *in vivo* als *in vitro* zichtbaar te maken en in kaart te brengen. De gevoeligheid daarvan maakt het mogelijk om zelfs individuele moleculen te detecteren en te volgen. De snel toenemende kennis van biologische processen en het groeiend inzicht in genetische aspecten veroorzaken een revolutie in de biotechnologie, het gebruik van biologische processen om bruikbare producten te maken. Biotechnologie wordt nu op brede schaal toegepast in de industrie waarbij het scala van toepassingen zich snel uitbreidt.

Nieuwe detectiemethoden maakten het mogelijk om de activiteit en werking van één enkel enzym-molecuul te bestuderen. Hierdoor gaan de waarnemingen verder dan het gemiddeld gedrag van een ensemble, en kan een eventuele heterogeniteit in de eigenschappen van dergelijke complexe systemen aan het licht worden gebracht. Ook het gedrag in de tijd kan rechtstreeks worden geregistreerd zonder synchronisatie. Het aantal systemen dat m.b.v. één-molecuul technieken bestudeerd is is tot nu toe echter beperkt omdat ze gebruik maken van licht-detectie van fluorescerende substraten of producten. Die beperking is een gevolg van de noodzaak om geschikte substraten te ontwerpen en te synthetiseren die passen in het catalytisch profiel van het betrokken enzym. In dit proefschrift beschrijven we de toepassing van een nieuwe methode waarvoor deze beperking niet geldt. Deze is veelbelovend voor de ontwikkeling van een nieuwe generatie van biosensoren met hoge gevoeligheid.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift is specifiek gericht op redoxeiwitten en enzymen, eiwitten die in staat zijn om electronen uit te wisselen met een reactiepartner. Electron-overdracht van individuele moleculen kan per electron zichtbaar gemaakt worden door middel van fluorescentiedetectie zonder dat het fluorescerende molecuul (aan het eiwit gebonden als een extern label) bij de reactie zelf betrokken is. De uitdaging hier is de electronische manipulatie van de redoxtoestand van het eiwit in combinatie met deze detectiemethode. Daarvoor moet het eiwit of enzym in contact zijn met een electrode, meestal een of ander metaaloppervlak. De wisselwerking tussen een (gelabeld) eiwit en

een metaaloppervlak is daarom van belang, ook vanwege de toepassing van oppervlaktegebonden eiwitten in de bionanotechnologie, zoals biosensoren.

Hoofdstuk 1 geeft een kort overzicht van de relevante methoden en experimentele technieken voor waarneming van individuele moleculen met behulp van fluorescentie-microscopie. De belangrijkste eigenschappen van de biomoleculen die in dit proefschrift aan bod komen worden in dit hoofdstuk samengevat.

In Hoofdstuk 2 wordt beschreven hoe de fluorescentiespectra van individuele phycobiosomen (PBsomes) veranderen in de tijd onder invloed van meer of minder sterke belichting. Intens, groen excitatielicht veroorzaakt zowel een afname van de fluorescentie van het phycobio-eiwit allophycocyanine (APC) als een gelijktijdige toename van de fluorescentie van phycoerythrin (PE) in het eerste stadium van bleking. Dit is een aanwijzing dat de energieoverdracht van PE naar het naburige APC verbroken wordt. Op langere tijdschaal neemt de fluorescentie van PE weer af, wat aantoont dat dit pigment gebleekt wordt als de energieoverdracht geblokkeerd is. Energieoverdracht van PE naar APC blijft intact in PBsomes die gefixeerd worden met gutraldehyde. Geconcludeerd wordt dat de ont koppeling van PE en APC verband houdt met een specifieke disassociatie van de pigmenten in de PBsome structuur. Tevens werd aangetoond dat deze ont koppeling intensiteits- en zuurstofafhankelijk is.

Hoofdstuk 3 betreft het onderzoek van de redox-activiteit van individuele azurine-moleculen op een goud-oppervlak door middel van op FRET[§] gebaseerde fluorescentie detectie. De fotofysische eigenschappen van individuele, fluorescerend gelabelde azurine moleculen zijn gemeten met een goed gedefiniëerde orientatie, o.a. als functie van de afstand (op nm schaal) tot het goudoppervlak. Afstanden kleiner dan 2.5 nm geven aanleiding tot diving van de fluorescentie, die oploopt tot 80% wanneer het eiwit in direct contact is met de goudlaag. Op grotere afstanden wordt een fluorescentie-toename waargenomen, tot een factor 4, als de ruwheid van het goudoppervlak toeneemt. Dit wordt toegeschreven aan lokale veld-effecten die worden geïnduceerd door (nano)structuren in het goudoppervlak. Tevens zijn fluorescentie-levensduren van individuele azurine moleculen gemeten. Onder reducerende condities is de levensduur bijna een factor 2 langer dan onder oxiderende condities: de nabijheid van het goudoppervlak lijkt de redox-activiteit van azurine niet te belemmeren. Het blijkt dus dat fluorescentie-diving kan

[§] FRET: fluorescence resonant energy transfer

worden beperkt, en dat fluorescentie-detectie kan worden gebruikt om de redox-toestand van een eiwit in de nabijheid van een goudoppervlak met hoge gevoeligheid te meten.

In hoofdstuk 4 worden de resultaten beschreven van het onderzoek naar de wisselwerking tussen fluorescerend gelabeld azurine (CuAz) en goud-nanodeeltjes (AuNPs) op één-molecuul niveau. Hierbij wordt de fluorescentie-intensiteit gebruikt om de redox-toestand van het eiwit te registreren. Waarnemingen zijn geverifiëerd met een azurine variant waarin Cu is vervangen door Zn; deze is niet redox-actief. Gelabelde azurine moleculen zijn gebonden aan AuNPs met variërende afmetingen (1.4-80 nm). Fluorescentie-intensiteiten en -levensduren zijn kwantitatief geanalyseerd om het effect te bepalen van de AuNPs op de excitatie-snelheid en de quantum-yield van het eiwit-gebonden, fluorescerend label. De binding van het gelabelde CuAz aan een AuNP blijkt te resulteren in een tien-voudige verhoging van de detectiegevoeligheid van redoxveranderingen van het eiwit. Deze resultaten openen nieuwe wegen voor het onderzoek van mechanistische aspecten van de werking van oxidoreductases, en voor mogelijke toepassingen in bijvoorbeeld biosensoren.

Hoofdstuk 5 beschrijft de toepassing van het recent ontwikkelde FluRedox principe (zie Hoofdstuk 1) in het onderzoek naar kinetische parameters en het mechanisme van enzymactiviteit op één-molecuul niveau. We richtten ons specifiek op de zogenaamde Type 1 (T1) redox-actieve centra van koper-houdende oxidoreductases. We onderzochten met name blauw nitriet reductase (bNiR) van *Alcaligenes xylosoxidans* dat een T1-Cu centrum heeft met een sterke absorptie bij 600 nm, maar alleen in de geoxideerde toestand. Dit resulteert in een hoog FRET contrast van het eiwit-gebonden label tussen de gereduceerde en geoxideerde toestanden van the T1-Cu centrum van bNiR. Aan de hand van tijdafhankelijk metingen van de redoxveranderingen via fluorescentiedetectie kan worden geconcludeerd dat twee populaties van bNiR kunnen worden onderscheiden met verschillende reactiesnelheden. De relatieve grootte van de populaties is afhankelijk van de nitriet concentratie. De twee populaties worden toegeschreven aan het bestaan van twee reactiepaden voor het enzym: het 'reductie-eerst' en 'het binding-eerst' mechanisme.

