



Universiteit
Leiden
The Netherlands

T-CYCLE EPR Development at 275 GHz for the study of reaction kinetics & intermediates

Panarelli, E.G.

Citation

Panarelli, E. G. (2018, December 10). *T-CYCLE EPR Development at 275 GHz for the study of reaction kinetics & intermediates*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/68233>

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/1887/68233>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/68233> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Panarelli, E.G.

Title: T-CYCLE EPR Development at 275 GHz for the study of reaction kinetics & intermediates

Issue Date: 2018-12-10

Samenvatting

Kinetische studies kunnen een rijkdom aan informatie opleveren omtrent chemische reacties. Kennis van reactiesnelheden en tussenproducten verschaft inzicht in reactiemechanismen en, meer in het algemeen, in de functie van het (bio)chemisch systeem onder studie in relatie tot zijn omgeving. Een intrinsieke moeilijkheid in dergelijk onderzoek is echter de korte tijdschaal waarop veel reacties plaatsvinden en de korte levensduur van de tussenproducten.

"Rapid Freeze-Quench" (RFQ) is een van de meest toegepaste technieken bij de kinetische studie van chemische reacties. Gegeven het paramagnetische karakter van de tussenproducten van veel reacties is het gewenst deze techniek te koppelen aan Electron Paramagnetische Resonantie (EPR) om de structuur, het mechanisme en de functie van reagerende systemen als enzymen te ontrafelen. In het bijzonder geldt dit voor EPR spectroscopie bij hoge microgolffrequentie (HF-EPR), omdat deze techniek een hoog spectraal oplossend vermogen heeft en een nauwkeurige bepaling van magnetische parameters mogelijk maakt. Anderzijds is het maken van monsters voor HF-EPR niet zonder problemen gezien de sub-millimeter afmetingen van de monsterhouder bij hoge microgolffrequenties. In **Hoofdstuk 2** wordt de geslaagde koppeling van RFQ aan HF-EPR bij 275 GHz beschreven. Monstervoorbereiding volgens een eerder ontwikkelde methode blijkt redelijk efficiënt en reproduceerbaar in deze experimenten. Bovendien maakt deze benadering het mogelijk om met één enkele reeks monsters experimenten uit te voeren bij verschillende microgolffrequenties, hetgeen de effectiviteit van EPR zeer ten goede komt. Een belangrijk voordeel is dat minder materiaal nodig is dan in het standaard RFQ-EPR experiment, in het bijzonder relevant voor biologische monsters, en dat de resultaten van experimenten bij verschillende microgolffrequenties direct te koppelen zijn.

Een alternatieve benadering is echter gewenst, aangezien RFQ lastig blijft in de uitvoering, met name ten aanzien van monstervoorbereiding en reproduceerbaarheid. **Hoofdstuk 3** beschrijft de ontwikkeling van "Temperature-Cycle EPR" (T-Cycle EPR), een nieuwe hoog-frequent EPR techniek waarin laser geïnduceerde temperatuursprongen van een monster gekoppeld wor-

den aan 275 GHz EPR spectroscopie. Op die manier kunnen in waterige oplossing kortlevende paramagnetische tussenproducten worden gedetecteerd en kan de kinetiek van chemische reacties worden bestudeerd. In T-Cycle EPR wordt een mengsel van uitgangsstoffen – initieel bij een temperatuur waarbij geen reactie plaatsvindt – *in situ* op een homogene, reproduceerbare en controleerbare manier verwarmd door middel van een infrarood laserpuls. Daarbij bereikt het mengsel een temperatuur waarbij de reactie plaatsvindt gedurende een zekere, korte tijdsduur. Door toepassing van een reeks van infraroodpulsen, dat wil zeggen een reeks van temperatuursprongen, ontwikkelt de reactie zich verder en is een kinetische studie mogelijk. Hoofdstuk 3 laat eerst zien dat het principe werkt op een tijdschaal van minuten. Vervolgens worden een aantal experimenten beschreven die laten zien dat met T-Cycle EPR reacties bestudeerd kunnen worden bij verschillende temperaturen, in tegenstelling tot de RFQ-EPR techniek die werkt bij kamertemperatuur. Als laatste wordt een methode beschreven voor de calibratie van het monster in de EPR spectrometer. Belangrijke voordelen van T-Cycle EPR zijn dat één monster volstaat voor een volledige kinetische studie, waardoor reproduceerbaarheid van de monstervoorbereiding geen issue meer is en zeer weinig materiaal nodig is. Dit maakt de techniek superieur aan andere methoden die veel materiaal en/of meer monsters vragen, zoals RFQ.

Hoofdstuk 4 beschouwt de toepassing van T-Cycle EPR op een modelreactie die verloopt in een tijd van honderden milliseconden, waarmee de techniek bruikbaar wordt voor de bestudering van veel (bio)chemische systemen. Een nieuwe “hand-mixing” methode wordt geïntroduceerd waarmee uitgangsstoffen gemakkelijk en efficiënt gemengd kunnen worden bij lage temperatuur zonder dat deze al reageren, waardoor RFQ in principe overbodig wordt. Een kwantitatieve kinetische studie vereist een analyse van het temperatuurprofiel van het monster gedurende de laserpuls. Daarmee wordt het mogelijk de kinetische data te analyseren, en enerzijds deze data te interpreteren in termen van een effectieve reactietijd per temperatuursprong, anderzijds de temperatuurafhankelijkheid van de reactiesnelheid te bepalen. In zijn huidige vorm biedt T-Cycle EPR de voordelen van HF-EPR met een tijdsresolutie die al optimaal is voor een breed scala aan (bio)chemische systemen. In gevallen waarin de bestudering van de ontwikkeling van paramagnetische tussenproducten het doel is en niet zozeer een kwantitatieve kinetiek, kan T-Cycle EPR al ingezet worden op de tijdschaal van tientallen milliseconden. Tot slot worden simulaties met COMSOL besproken ter verkenning van de mogelijkheden om de tijdsresolutie verder te verbeteren door aanpassing van het monstervolume, de temperatuur van de cryostaat en het materiaal van de monsterhouder.

Een verkennende poging tot de bestudering van een enzymatische reactie met behulp van de nieuw ontwikkelde T-Cycle EPR techniek op een sub-seconde tijdschaal is het onderwerp

van **Hoofdstuk 5**. Bekeken is Small Laccase (SLAC), een enzym dat zuurstof reduceert onder oxidatie van verscheidene substraten. In het bijzonder betreft het een mutant van SLAC die de Type1 koper site mist (T1D SLAC). T-Cycle EPR experimenten bij 275 GHz zijn uitgevoerd aan de re-oxidatie van volledig gereduceerd T1D SLAC, om te laten zien dat de methode werkt voor de bestudering van een enzymatische reactie zonder dat gebruik gemaakt hoeft te worden van RFQ van het monster. De experimenten beschreven in Hoofdstuk 5 suggereren dat het enzym T1D SLAC niet lijdt onder de blootstelling aan temperatuurcycli, waardoor T-cycle EPR mogelijk wordt. Voorlopige resultaten van de toepassing van laser geïnduceerde temperatuursprongen van de orde van honderden milliseconden laten zien dat T-Cycle EPR aan enzymatische systemen inderdaad uitvoerbaar is.

