



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Ruthenium- and cobalt-based artificial metalloenzymes for photocatalytic water oxidation in artificial photosynthesis**

Polanco Rivas, E.A.

### **Citation**

Polanco Rivas, E. A. (2023, June 7). *Ruthenium- and cobalt-based artificial metalloenzymes for photocatalytic water oxidation in artificial photosynthesis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3619951>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3619951>

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

## Samenvatting in het Nederlands

In **hoofdstuk 2** is een screening methode gerapporteerd voor het bestuderen van interacties tussen water oxidatie katalysatoren op basis van ruthenium en kobalt en twee heem proteïnes, Cytochroom B5 (**CB5**) en Myoglobine (Myb). Dit onderzoek is gericht op de ontwikkeling van nieuwe kunstmatige metallo-enzymen voor foto-katalytische wateroxidatie.<sup>1</sup> De studie demonstreert een nieuwe methode genaamd semi-natieve gelelektroforese, voor de detectie van proteïne-cofactor interacties met de beste en praktische resolutie. In vergelijking met de twee andere soorten geteste gelelektroforese-methoden, namelijk denaturerende en natieve, vertoonde de semi-natieve methode een duidelijkere bandscheiding. Van de bestudeerde eiwitten en complexen vertoonden de apo-vorm van Cytochroom B5, *apoCB5*, en het kobaltcomplex **Co<sup>II</sup>Salen** (Salen = N,N'- Bis(salicylideen)ethyleendiamine) de beste interactie. ESI-MS bevestigde de vorming van een *apoCB5:CoSalen* adduct als mogelijke kunstmatige metallo-enzym kandidaat voor wateroxidatie. Dit werk leverde een efficiënt instrument om de vorming van kunstmatige metallo-enzymen te bestuderen, dat werd gebruikt in andere hoofdstukken van dit proefschrift.

In **hoofdstuk 3** werd een kunstmatig metallo-enzym op basis van kobalt, *apoCB5:CoSalen*, bereid en werd aangetoond dat het de foto-katalytische wateroxidatie bevordert in aanwezigheid van  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  als foto-sensibilisator en natriumpersulfaat als elektronenacceptor. Twee kunstmatige metallo-enzymen genaamd *apoCB5:CoSalen 1:1* en *apoCB5:CoSalen 1:5* werden geïsoleerd en bestudeerd, gedefinieerd door de verschillende stoichiometrie van de kobaltcofactor versus het apo-proteïne dat bij de bereiding werd gebruikt. Met behulp van ICP-MS en ESI-MS kon de effectieve stoichiometrie van beide ArMs worden gekarakteriseerd. In beide soorten monsters (1:1 en 1:5 eiwit:complex) toonde NMR duidelijk de binding aan van één **CoSalen**-molecuul aan de heem-bindende locatie van *apoCB5*. In *apoCB5:CoSalen 1:5* monsters was de plaats van binding van de

overtollige kobaltmoleculen echter moeilijker vast te stellen. Onder foto-katalytische water oxidatieve omstandigheden waren de **apoCB5:CoSalen 1:1** monsters, waarbij **CoSalen** alleen gebonden was aan de heem-bindende locatie van het proteïne, katalytisch inactief, terwijl de **apoCB5:CoSalen 1:5** monsters, waarbij ~3 extra **CoSalen**-moleculen aan de buitenkant van het proteïne gebonden waren, de foto-katalytische wateroxidatie bevorderden. Helaas was de O<sub>2</sub> evolutie met het kunstmatige metallo-enzym **apoCB5:CoSalen 1:5** als katalysator niet verbeterd, vergeleken met analoge foto-katalytische systemen met vrij **CoSalen** als WO katalysator. Het gebruik van het **apoCB5** proteïne als drager van de **CoSalen** katalysator remde echter de vorming van nanodeeltjes, die met vrij **CoSalen** de katalytische activiteit genereerd.<sup>2</sup> Met **apoCB5:CoSalen 1:5** zijn de oplosbare kobalt-bevattende proteïnes die zich tijdens de fotokatalyse vormden tot op heden nog niet geïdentificeerd. Al met al is dit werk één van de eerste studies waarin het effect van de coördinatie van een moleculaire WOC met een *apo* heem-bindend proteïne op de activiteit en stabiliteit in foto-katalytische omstandigheden wordt gepresenteerd.

In **hoofdstuk 4** werd een reeks kunstmatige koolzuuranhydrase metallo-enzymen op basis van ruthenium voor wateroxidatie beschreven. Twee gerapporteerde wateroxidatiekatalysatoren op basis van ruthenium, [Ru(2,2'-bipyridine-6,6'-dicarboxylate)(pyridine)<sub>2</sub>] en [Ru(2,2':6',2''-terpyridine)-6,6''-dicarboxylate)(pyridine)<sub>2</sub>] werden gefunctionaliseerd met twee aryl-sulfonamiden linkers, **L1** of **L2**, wat resulteerde in een reeks van vier kleine moleculaire cofactoren voor de functionalisering van **BCA** met een WOC: twee Ru(bda) analogen, **Ru1** en **Ru2**, en twee Ru(tpyda) complexen, **Ru3** en **Ru4**. Deze complexen werden verankerd via supramoleculaire interactie van het sulfonamide met het zink-centrum van het **BCA**-proteïne, waardoor vier kunstmatige **BCA-Ru** metallo-enzymen ontstonden. In deze reeks werden slechts twee ArM's, **BCA-Ru1** en **BCA-Ru2**, actief bevonden voor foto-katalytische O<sub>2</sub>-evolutie in aanwezigheid van [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> als foto-sensibilisator en natriumpersulfaat als elektronenacceptor. Binding van de

Ru-complexen aan **BCA** verbeterde de stabiliteit van het complex in foto-katalytische omstandigheden, door de TON 4x te verhogen in het geval van **BCA-Ru1** en maakte het mogelijk foto-katalytische wateroxidatie te bevorderen bij lagere rutheniumconcentraties in vergelijking met de vrije rutheniumkatalysator. Het verschil in activiteit tussen **BCA-Ru1** en **BCA-Ru2** wees erop dat de tweede coördinatieschaal van **BCA** de O<sub>2</sub>-productie van de rutheniumkatalysator beïnvloedde, hetgeen werd bevestigd door de activiteit van beide proteïnes bij verschillende pH te bestuderen. Deze pH en structurele variaties in de snelheid van O<sub>2</sub>-productie wezen erop dat een zuur-basemechanisme betrokken zou kunnen zijn bij de foto-katalytische cyclus van wateroxidatie. In het algemeen bewees **hoofdstuk 4** dat het mogelijk is commercieel beschikbare proteïnes te gebruiken voor de ontwikkeling van kunstmatige systemen voor wateroxidatie. Het bevestigde ook de uitstekende eigenschappen van **BCA** als potentiële drager voor de ontwikkeling van kunstmatige metallo-enzymen voor kunstmatige fotosynthese.

In **hoofdstuk 5** werd een systeem beschreven voor foto-katalytische wateroxidatie op basis van twee ruthenium-houdende kunstmatige metallo-enzymen, **BCA-Ru<sub>woc</sub>** en **BSA-Ru<sub>ps</sub>**. Een [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>-achtig complex gefunctionaliseerd met een maleïmide-groep werd gesynthetiseerd, **Ru<sub>ps</sub>**. Deze precursor werd gereageerd met vrij **BSA** om de ruthenium-foto-sensibilisator covalent te binden aan het proteïne door reactie met het vrije Cys34-residu, waardoor een kunstmatig licht-oogstend metallo-enzym, **BSA-Ru<sub>ps</sub>**, ontstond. De proteïne structuur werd niet beïnvloed door de koppeling van het kunstmatige complex, maar de fotochemische eigenschappen van **BSA-Ru<sub>ps</sub>** veranderden in vergelijking met het oorspronkelijke [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> complex, met bijvoorbeeld een verdubbelde levensduur van de aangeslagen toestand. De foto-sensibiliserende eigenschappen van **BSA-Ru<sub>ps</sub>** voor foto-katalytische wateroxidatie werden geëvalueerd in aanwezigheid van het kunstmatige metallo-enzym **BCA-Ru<sub>woc</sub>**, zoals beschreven in **hoofdstuk 4**, met behulp van natriumpersulfaat als elektronenacceptor en blauw licht. In dergelijke

omstandigheden werd de foto-katalytische activiteit waargenomen ten aanzien van wateroxidatie, zelfs bij lage concentraties van zowel de kunstmatige water-oxiderende als de licht-oogstende enzymen. Deze resultaten suggereerden een vorm van interactie tussen **BCA-Ru<sub>WOC</sub>** en **BSA-Ru<sub>PS</sub>** waardoor elektronenoverdracht tussen beide actieve metaalcentra kon plaatsvinden, waardoor de vorming van O<sub>2</sub> werd gestimuleerd. Het gepresenteerde werk toont een alternatieve, biomimetische benadering van kunstmatige fotosynthese.