



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## **Artificial metallo-proteins for photocatalytic water splitting: stability and activity in artificial photosynthesis**

Opdam, L.V.

### **Citation**

Opdam, L. V. (2024, March 26). *Artificial metallo-proteins for photocatalytic water splitting: stability and activity in artificial photosynthesis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3729067>

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/1887/3729067>

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

# SAMENVATTING

---

Klimaatverandering vormt een enorme bedreiging voor de mensheid en, wanneer er niets aan gedaan wordt, zullen de gevolgen ernstig zijn. Daarom wordt er actief gezocht naar een vervanging voor fossiele brandstoffen. Moleculair waterstof wordt gezien als een goed alternatief voor fossiele brandstoffen omdat bij de verbranding ervan alleen water vrijkomt. Er wordt daarom onderzoek gedaan naar duurzame manieren om moleculair waterstof te verkrijgen. Het fotokatalytisch splitsen van water in artificiële fotosynthese is een duurzame manier om moleculair waterstof te verkrijgen, waarbij de energie voor de reactie direct geleverd kan worden door zonlicht. Deze methode heeft daarom goede potentie om zowel efficiënt als duurzaam te zijn. Echter, om fotokatalytische watersplitsing in de praktijk te kunnen gebruiken, zullen de synthetische katalysatoren en fotosensibilisatoren die gebruikt worden in de wateroxidatie en waterstof evolutie half reacties verder geoptimaliseerd moeten worden. De grootste uitdagingen daarbij, vooral voor de wateroxidatie katalysatoren, zijn de stabiliteit en oplosbaarheid van deze metaalcomplexen. Artificiële metaalenzymen (ArMen) zouden gebruikt kunnen worden om deze beide problemen aan te pakken. Een eiwit kan de wateroplosbaarheid van het metaalcomplex verbeteren en biedt ook controle over de directe omgeving, het zogenoemde tweede coördinatie gebied van het metaalcomplex. Het eiwit biedt bovendien een manier om de activiteit van de katalysator verder te optimaliseren en om schadelijke nevenreacties te voorkomen. In deze thesis wordt van verschillende eiwitten onderzocht in hoeverre ze in staat zijn om metaalcomplexen met katalytische of fotosensibilisator activiteit te ondersteunen. Tijdens onze analyse hebben we speciale aandacht besteed aan de stabiliteit van de ArMen gedurende wateroxidatie en waterstof evolutie.

In **hoofdstuk 1** worden waterstof evolutie en wateroxidatie geïntroduceerd, allereerst door de natuurlijke eiwit systemen die beide reacties kunnen katalyseren te introduceren. Voor waterstof evolutie zijn deze eiwitten de hydrogenases, een eiwit klasse met verscheidene cofactoren die zowel de evolutie als het gebruik van waterstof kunnen katalyseren. Beide reacties worden gekatalyseerd door verschillende clusters van ijzer, nikkel, en zwavel. In elk geval zijn deze clusters, in ieder geval voor een deel, direct gecoördineerd door aminozuren van het eiwit, dat op die manier een directe

invloed op de reactiviteit uitoefent. Voor het aandrijven van de meer uitdagende wateroxidatie reactie heeft de natuur slechts één oplossing: fotosysteem II (PSII). De actieve kern van dit eiwit bestaat uit een mangaancluster en een chlorofyl-bevattende heterodimeer van eiwitten. Hier wordt de uitdaging voor dit eiwitsysteem, het beperken van de schade die ontstaat door overbelichting, besproken. Hierna worden artificiële metaalenzymen (ArMen) geïntroduceerd. In een ArM worden de voordelen van synthetische katalysatoren, de variatie van (niet-)natuurlijke reacties die gekatalyseerd kunnen worden en het relatief eenvoudige ontwerp, gecombineerd met de sterke eigenschappen van natuurlijke metaaleiwitten. Natuurlijke metaaleiwitten geven controle over de directe omgeving van de gebonden katalysator zodat reacties uitgevoerd kunnen worden onder mildere condities (bijvoorbeeld pH en temperatuur), bovendien kan de selectiviteit voor de reactant en het gevormde product verbeterd worden (bijvoorbeeld de chiraliteit). De toepassing van deze ArMen voor elektron transport wordt besproken, met extra aandacht voor hoe iedere laag van de coördinatie omgeving van het gebonden metaal invloed kan uitoefenen op de reactiviteit en stabiliteit van het metaalcomplex. Ten slotte worden de eiwitten, fotosensibilisatoren, en katalysatoren die in deze thesis gebruikt worden gepresenteerd.

In **hoofdstuk 2** wordt een nieuwe screening methode geïntroduceerd voor het bestuderen van interacties tussen heem-bindende eiwitten en synthetische metaalcomplexen. Semi-natieve gel elektroforese wordt geïntroduceerd om interactie tussen metaalcomplexen en heem-bindende eiwitten, waaruit het heem verwijderd is (*apo*-eiwitten), te detecteren. In semi-natieve gel elektroforese wordt een eiwit in een bufferoplossing op een gel geladen die het denaturerende detergens SDS bevat. De scheiding in de gel vindt vervolgens plaats als een gevolg van het verschil in de stabiliteit tussen een eiwit waaraan een metaalcomplex gebonden zit met het eiwit alleen. Wanneer het eiwit zich door de gel matrix beweegt wordt het blootgesteld aan SDS, wat tot ontvouwing van het eiwit leidt. Hoe langer het eiwit in staat is in compacte, gevouwen toestand te blijven, hoe verder het op de gel eindigt. We laten de effectiviteit van deze methode zien aan de hand van de volgende eiwitten: cytochroom *b<sub>5</sub>* (CB5), heem acquisitie systeem A van *Pseudomonas aeruginosa* (HasAp), en myoglobine (Mb) in combinatie met de kobalt-bevattende wateroxidatie katalysatoren CoSalen en CoPhthalocyanine. Daarnaast wordt de algemene toepasbaarheid van de eiwitten gedemonstreerd door CB5 te combineren met drie ruthenium-bevattende metaalcomplexen en twee andere kobalt complexen. Daarbij

bleken de grootte van de complexen en de axiale liganden vooral van belang te zijn bij het succesvol vormen van een ArM. Hierbij hadden we het meeste succes met de kobalt complexen.

Op basis van de bovenstaande screening werd de combinatie van CB5 en CoSalen geselecteerd als ArM voor foto-geactiveerde wateroxidatie katalyse, dit wordt beschreven in **hoofdstuk 3**. Drie ArMen werden gemaakt van CB5 en CoSalen, de eerste werd gevormd met een 1:1 reactie van *apo*CB5:CoSalen, bij de tweede werd een 1:5 ratio gebruikt, en bij de laatste werd heem-bevattend (*holo*-)CB5 1:5 gereageerd met CoSalen. In *apo*CB5:CoSalen 1:1 was een enkele CoSalen gebonden in de heem-bindende pocket van het eiwit, terwijl in zowel *apo*- als *holo*CB5:CoSalen 1:5 ook binding aan de buitenkant van het eiwit plaatsvond. *Apo*CB5:CoSalen 1:1 had geen wateroxidatie activiteit onder de gemeten condities, terwijl *apo*- en *holo*CB5:CoSalen 1:5 beide wateroxidatie konden katalyseren in aanwezigheid van Ru(bpy)<sub>3</sub> als fotosensibilisator en Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> als elektron acceptor, alhoewel met een lagere activiteit dan CoSalen in oplossing. CoSalen is een zogenoemde pre-katalysator; onder foto-katalytische condities worden CoO/CoOH nanodeeltjes gevormd die de werkelijke katalysator vormen. In de ArMen werden daarentegen geen nanodeeltjes geobserveerd, ondanks de destabilisatie van de CoSalen-eiwit interactie gedurende fotokatalyse. Onze data suggereren dat onder fotokatalytische condities oplosbare eiwit-Co deeltjes gevormd worden waarin de interactie tussen Co en eiwit zwak is, en dat deze deeltjes de werkelijke katalysator zijn. In CB5 werd beperkte oxidatie van de aminozuren, crosslinking, en gedeeltelijke ontvouwing van het eiwit geobserveerd tijdens de katalytische reactie, maar over het algemeen genomen bleef het eiwit verbazend intact en was het in staat om de oplosbaarheid van CoSalen sterk te verbeteren. De CB5:CoSalen ArMen behoren tot de eerste water oxiderende ArMen en de analyse die hier gepresenteerd wordt laat zowel de mogelijkheden als de uitdagingen van het gebruik zien van een eiwit om een actieve katalysator te binden die werkt onder oxiderende fotokatalytische condities.

In **hoofdstuk 4** werden vier volledig op eiwit-gebaseerde systemen voor fotokatalytische waterstof evolutie ontworpen en gekarakteriseerd. In twee van deze systemen fungeert myoglobine, waarin de heem cofactor vervangen was voor kobalt protoporfyrine IX (CoPPIX), ArM3, als H<sub>2</sub> evolutie katalysator (HEC). Deze HEC ArM werd gecombineerd met HasAp waarin het heem vervangen was door ZnPPIX, ArM1, or door RuPPIX, ArM2, in de rol van fotosensibilisator ArM. In beide systemen werd waterstof evolutie gemeten

onder belichting en in de aanwezigheid van elektronen mediator methylviologen ( $MV^{2+}$ ) en elektron donor triethanolamine (TEOA). Samples met RuPPIX werden belicht bij 385 nm en samples met ZnPPIX werden belicht bij 435 nm. Het ArM1/ArM3 systeem was in staat om waterstof evolutie te katalyseren met een turnover nummer (*TON*) van 212 per katalysator en bleef actief voor 42 uur. In het systeem met ArM2 als PS was de gemeten activiteit in het begin vergelijkbaar met het ArM1-bevattende systeem, maar na ~13 uur werd een veel actievere katalysator gevormd. Dit systeem liet geen teken van verlies van activiteit zien en dat leidde tot een *TON* van 1069 na 42 uur. Reactie van ArM1 met CoPPIX leidde tot het vormen van een mengsel van HasAp-ZnPPIX en HasAp-CoPPIX. Dit mengsel werd ArM5 genoemd. Reactie van ArM2 met CoPPIX leidde tot vorming van CoPPIX-HasAp-RuPPIX, genaamd ArM4. De waterstof evolutie activiteit van ArM5 was iets hoger dan die van ArM1/ArM3, met een *TON* van 349. De activiteit van ArM4 was hoger dan die van ArM2/ArM3 voor 17 uur, waarna de activiteit van het ArM2/ArM3 systeem die van ArM4 inhaalde. Het *TON* van ArM4 was 492 na 42 uur. Alle types van op HasAp-gebaseerde ArMen lieten hoge foto- en thermostabiliteit zien, al werd na 42 uur fotokatalyse minimale eiwitafbraak geobserveerd. Mb kon na fotokatalyse niet meer op gel geobserveerd worden in de monsters die ArM3 bevatte, de CoPPIX cofactor was daarentegen nog wel te zien. Een hypothese hiervoor is dat bij neerslag van Mb CoPPIX vrijkwam en kon herbinden aan ArM2, waarbij een complex gevormd werd dat superieure eigenschappen als waterstof evolutie katalysator had ten opzichte van ArM3, vergelijkbaar met ArM4. Samenvattend zijn er succesvol twee  $H_2$ -evolutie systemen gemaakt gebaseerd op protoporphyrine IX met veelvoorkomende aardmetalen die actief zijn onder blauw licht bestraling. De activiteit van deze systemen was wel lager dan die van de op ruthenium-gebaseerde analoge systemen. Ten slotte kan geconstateerd worden dat HasAp veelbelovende eigenschappen heeft als eiwit scaffold in zowel waterstof evoluerende als fotosensibiliserende ArMen met een lange levensduur.

In **hoofdstuk 5** werd een analyse gepresenteerd voor de optimale positionering van een fotosensibilisator ten opzichte van de heem-bindende pocket van CB5 bij het ontwerpen van een ArM waarin in licht absorptie en fotokatalyse gecombineerd worden. CB5 werd hierbij gebruikt om een  $Ru(bpy)_3$ -afgeleide fotosensibilisator te binden, via een covalente verbinding van een maleimide-groep met een cysteïne aminozuur dat via gerichte mutagenese in CB5 geïntroduceerd was. Dit laat de heem-bindende pocket vrij zodat daarin in toekomstige experimenten een katalysator

gecoördineerd kan worden in plaats van heem. Een dergelijk systeem, waarin de katalysator en fotosensibilisator in een zorgvuldig uitgekozen positie ten opzichte van elkaar zitten, kan gebruikt worden om de activiteit en stabiliteit van zowel het eiwit als de katalysator te optimaliseren. Vier cysteine mutanten werden geproduceerd en gekarakteriseerd: V66C, S69C, T70C, en L75C. Elk van deze mutanten bleek goed gevouwen en in staat om heem te binden. De efficiëntie van het transport van elektronen van de fotosensibilisator naar heem werd getest aan de hand van de kinetiek van de opbouw van heem in de Fe(II) staat. Hier bleken de T70C en L75C mutanten het efficiëntst te zijn. Een vergelijking van de fluorescentie van de ArMen leidde tot de conclusie dat binden van de fotosensibilisator aan een cysteine die niet naar de eiwit pocket gericht is, terug-transport van elektronen vermindert doordat de interactie tussen de elektron donor in oplossing (EDTA) en de fotosensibilisator verbetert. Met overweging van al het bovenstaande werd de L75C mutant gezien als het beste eiwit voor een toekomstige ArM waarin een katalysator en fotosensibilisator geïntegreerd zijn.