

Diss. ETH No. 22813

SPATIALLY CONTROLLED IMMOBILIZATION OF ENZYMES ON SILICA
SURFACES USING DENDRONIZED POLYMER-ENZYME CONJUGATES

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES OF ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

ANDREAS KÜCHLER

MSc ETH Interdisciplinary Sciences, ETH Zurich

born on January 9th, 1986

citizen of Horw (LU) and Sarnen (OW), Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Peter Walde, examiner

Prof. Dr. A. Dieter Schlüter, co-examiner

Prof. Dr. Raffaele Mezzenga, co-examiner

Prof. Dr. André Studart, co-examiner

2015

ABSTRACT

This work presents the synthesis, characterization and application of hybrid structures combining natural enzymes and synthetic dendronized polymers (denpols), bringing together the advantages and possibilities of the specific and efficient protein catalysts with the ability of the denpol to act as a macromolecular scaffold and mediator for stable surface adsorption. A linking chemistry based on the formation of a quantifiable bis-aryl hydrazone (BAH) bond was used for the formation of conjugates containing several copies of an enzyme along a single chain of a second generation denpol (*de*-PG2) dissolved in aqueous solution.

Such denpol-enzyme conjugates were prepared with three different enzymes, horseradish peroxidase (HRP), *Aspergillus* sp. glucose oxidase (GOD), and *Engyodontium album* proteinase K (proK). Additionally, a conjugate containing several copies of two different types of enzymes, GOD and HRP, on the same denpol chain was successfully synthesized. According to the composition determined by UV/vis spectrophotometric quantification of the amount of enzyme bound to the denpol during the conjugation reaction, an average 1400 repeating units long *de*-PG2 chain carried 108 HRP molecules (*de*-PG2₁₄₀₀-BAH-HRP₁₀₈). Similarly, the composition of the other conjugates was determined to be *de*-PG2₁₄₀₀-BAH-GOD_{~50}, *de*-PG2₁₄₀₀-BAH-(GOD_{~25},HRP_{~78}), and *de*-PG2₂₀₀₀-BAH-proK₁₄₀. The attachment of the enzymes along the denpol chain was also confirmed by imaging of single conjugate chains adsorbed on mica with atomic force microscopy (AFM). Even though it was not possible to identify single enzyme molecules in the dry state, the thickness of the conjugates was significantly higher than the corresponding values for *de*-PG2, and was found to be in the range expected for a denpol chain with attached enzyme molecules.

Importantly, the enzymes remained active when attached to the denpols. The property of the denpol to adsorb very stably on unmodified glass surfaces was found to be a property of the denpol-enzyme conjugates as well. The absorption behavior was characterized *in situ* with the transmission interferometric adsorption sensor and the formed layers on glass surfaces were analyzed by AFM, indicating a layer thickness corresponding to a single layer of denpol-enzyme conjugate. The enzyme activity per surface area and the storage stability of the immobilized enzymes immersed in buffer solution were characterized using chromogenic enzyme substrates combined with UV/vis spectrophotometry.

The co-immobilization of GOD and HRP in a controlled ratio, which was possible with the denpol-enzyme conjugate containing both types of enzymes, allowed the observation of the catalysis of a two-step cascade reaction by the co-immobilized enzymes. Additional to the co-immobilization of GOD and HRP in a defined ratio using this two-enzyme conjugate, a system for the localized co-immobilization of GOD and HRP was developed by combination of enzyme immobilization within mesoporous silica nanoparticles (Hiroshima mesoporous materials, HMM) and the denpol mediated immobilization approach. This system resulted in a layered structure on unmodified glass surfaces, where a lower layer contained a first type of enzyme inside HMM particles and a covering layer contained the second type of enzyme in form of the denpol-enzyme conjugate. It was found that such a layered structure resulted in a good catalytic activity for the corresponding cascade reaction if GOD was adsorbed in the HMM particles and HRP added as a covering layer. The system with the HRP adsorbed in the HMM particles resulted in a low HRP activity and no product formation for the cascade reaction was observed. This behavior indicated the importance a proper choice of the enzyme immobilization protocol in such complex systems.

Complementing the results obtained for the activity and storage stability of the immobilized enzymes, a reactor for continuous flow operation was prepared for the characterization of the operational stability of the immobilized enzymes. Good stabilities were observed for reactors involving the two enzymes GOD and HRP in either a sequential setup with a first GOD reactor and a second, connected HRP reactor, or one single reactor containing the co-immobilized enzymes.

For proK, an excellent operational stability was observed in such a continuous flow setup using a tetrapeptide derivative as model-substrate. Additionally, the ability of the immobilized proK to digest a native protein in a microfluidic chip was demonstrated. This indicated the feasibility of the use of such a system for limited proteolysis in biotechnological applications. Additionally, the demonstrated possibility of the use of enzymes immobilized by this denpol-mediated approach together with macromolecular substrates offers also promising possibilities for the immobilization of enzymes used in synthetic applications involving macromolecules, such as for the preparation of modified proteins.

ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit umfasst die Synthese, Charakterisierung und Anwendung von makromolekularen Hybriden, bestehend aus synthetischen dendronisierten polymeren Molekülen und natürlichen Enzymen. Diese hybriden Strukturen kombinieren die Vorzüge der Enzyme als effiziente Katalysatoren mit der Eigenschaft der dendronisierten Polymere, welche mit ihren langen, kettenförmigen und in jeder Wiederholungseinheit verzweigten Molekülen als Gerüst für die Verknüpfung mehrerer Enzymmoleküle dienen und gleichzeitig eine stabile Haftung auf Glasoberflächen vermitteln. Die Verknüpfung der Enzyme mit den Polymerketten wurde durch die Modifizierung beider Strukturen mit selektiv reaktiven Gruppen erreicht, welche miteinander unter Bildung einer bis-Arylhydrazon (BAH) Bindung reagieren. Durch dieses Vorgehen konnte eine Vielzahl von Enzymmolekülen entlang der einzelnen, in wässriger Lösung vorliegenden Polymerketten eines dendronisierten Polymers mit Dendronen der zweiten Generation (*de*-PG2) angebracht werden.

Drei verschiedene Enzyme, Meerrettichperoxidase (HRP), *Aspergillus* sp. Glucose-Oxidase (GOD) und *Engyodontium album* Proteinase K (proK), wurden zur Herstellung solcher Hybride verwendet. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine hybride Struktur, in welcher an den selben Polymerketten gleichzeitig mehrere Moleküle sowohl von der HRP als auch der GOD angeheftet sind, synthetisiert werden kann. Aufgrund der Absorption der während der Kupplung gebildeten BAH-Bindung im Bereich des ultravioletten und sichtbaren Lichtes konnte die Belegungsichte der Polymerketten mit dem Enzym mittels *in situ* UV/vis-Spektralphotometrie bestimmt werden. Eine *de*-PG2 Kette mit einer durchschnittlichen Länge von 1400 Wiederholungseinheiten enthielt demnach 108 angehängte HRP Moleküle (abgekürzt als *de*-PG2₁₄₀₀-BAH-HRP₁₀₈). Analog wurde die Zusammensetzung der weiteren Hybride bestimmt: *de*-PG2₁₄₀₀-BAH-GOD_{~50}, *de*-PG2₁₄₀₀-BAH-(GOD_{~25},HRP_{~78}) und *de*-PG2₂₀₀₀-BAH-proK₁₄₀. Zusätzlich wurden einzelne Polymerketten der erhaltenen Hybride aus einer verdünnten Lösung auf Glimmer adsorbiert und im tockenen Zustand mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) untersucht. Obwohl eine Unterscheidung einzelner Enzymmoleküle im trockenen Zustand nicht möglich war, konnte aufgrund der gemessenen Höhen der Polymerketten der Hybride und dem Vergleich mit der Höhe von unmodifizierten Polymerketten eine Dichte Belegung entlang der Polymere gezeigt werden.

Die Hybride zeigten, ebenso wie *de*-PG2 selbst, eine sehr starke Neigung auf unbehandelten Glasoberflächen zu haften. Dieses Verhalten wurde ausgenützt um die ans Polymer gebundenen Enzyme mittels Adsorption an Glasoberflächen in einer katalytisch

aktiven Form zu immobilisieren. Der Adsorptionsvorgang wurde mittels TInAS (Transmission interferometric adsorption sensor) verfolgt und die adsorbierten Schichten auf der Oberfläche mittels AFM charakterisiert. Die gemessenen Schichtdicken der adsorbierten Hybride waren vergleichbar mit der Höhe einzelner Polymerketten welche auf Glimmer gemessen worden waren. Diese Tatsache bestätigte die Beobachtungen während der TInAS-Messungen, dass die Adsorption kontrolliert erfolgt und nach dem Erreichen einer bestimmten Menge stoppt. Die AFM Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die adsorbierten Schichten einer einzelnen Lage der adsorbierten Hybride entsprechen, und keine mehrlagigen Strukturen gebildet werden. Die Aktivität dieser immobilisierten Enzyme wurde mit Hilfe von chromogenen Enzymsubstraten mittels UV/vis Spektralphotometrie gemessen.

Aufgrund der Möglichkeit, die beiden Enzyme GOD und HRP an die selben Polymerketten anzuhängen, war es möglich durch Adsorption dieser Hybride die beiden Enzyme, welche zwei aufeinanderfolgende Schritte einer enzymatischen Kaskadenreaktion katalysieren, in klar definiertem Mengenverhältnis auf der Oberfläche zu immobilisieren. Zusätzlich zu diesem Ansatz der Co-Immobilisierung wurde ein System zur räumlich kontrollierten Co-Immobilisierung von Enzymen unter Einbezug eines Immobilisiersystems mittels mesoporösen Silikat-Nanopartikeln (Hiroshima Mesoporous Material, HMM) entwickelt. Dabei wurde durch schrittweise Adsorption eine mehrlagige Struktur auf einer unmodifizierten Glasoberfläche abgelagert, in welcher die untere Schicht aus HMM Partikeln aufgebaut war, welche in der porösen Struktur das eine Enzym enthielten, während das zweite Enzym in Form einer darüberliegenden adsorbierten *de*-PG2-Enzym Schicht präsent war. Dabei zeigte sich, dass die Lokalisierung der beiden Enzyme entscheidend für eine erfolgreiche Katalyse der enzymatischen Kaskadenreaktion ist. In einem System, in welchem GOD innerhalb der HMM Partikel immobilisiert wurde und HRP in der darüberliegenden Schicht als *de*-PG2-BAH-HRP Hybrid vorlag, wurde eine effiziente Katalyse der Kaskadenreaktion beobachtet. Im umgekehrten Fall wurde eine stark beeinträchtigte Aktivität der HRP nachgewiesen und die Kaskadenreaktion konnte nicht beobachtet werden. Diese Beobachtung wurde neben der sehr niedrigen HRP Aktivität der Tatsache zugeschrieben, dass das Zwischenprodukt in diesem Fall leichter in die freie Lösung diffundiert, während es im Falle der Produktion in der unteren Schicht durch die obere GOD Schicht diffundieren muss bevor es in die freie Lösung entweichen kann.

Des Weiteren wurden die Stabilitäten der immobilisierten Enzyme bei ständiger Aktivität bestimmt. Dazu wurden die Hybride innerhalb von Glasmikropipetten adsorbiert und so ein Durchflussreaktor hergestellt, durch welchen ein kontinuierlicher Substratfluss

aufrechterhalten wurde. Dabei zeigte sich eine gute Stabilität der Katalyse der Kaskadenreaktion durch HRP und GOD.

Die immobilisierte proK zeigte eine hervorragende Betriebsstabilität bei einem Test in einem solchen Durchflussreaktor mit einem Tetrapeptid-Derivat als Modellsubstrat. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Protease nach der Immobilisierung auch die Verdauung von gefalteten Proteinen katalysieren kann. Dazu wurde die Proteinase im Kanal eines Mikrofluidik-Chips immobilisiert und ein fluoreszenzmarkiertes, gefaltetes Protein als Substrat zugegeben. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die erfolgreiche Hydrolyse des Substratproteins nachgewiesen. Die Möglichkeit, mit den durch die hier beschriebene Immobilisierungsmethode abgelagerten Enzymen auch Reaktionen makromolekularer Substrate zu katalysieren, ist von Bedeutung für mögliche Anwendungen in biotechnologischen und analytischen Systemen, sowie beispielsweise im Bereich der Synthese von modifizierten Proteinen.