



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Spin-torch experiment on reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*

Sai Sankar Gupta, K.B.

Citation

Sai Sankar Gupta, K. B. (2011, December 22). *Spin-torch experiment on reaction centers of Rhodobacter sphaeroides*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18271>

Version: Corrected 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/1887/18271>

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

Summaries

Summary in English

Photosynthesis is the physico-chemical process by which plants, algae and photosynthetic bacteria use light energy to drive the synthesis of organic compounds. Light-induced electron transfer in photosynthetic reaction centers (RCs) is highly efficient, having a quantum yield close to unity. In RCs of *Rhodobacter (R.) sphaeroides* wild type (WT), the primary electron donor is a bacteriochlorophyll *a* (BChl) dimer, called the Special Pair P, comprising two dimer halves P_L and P_M . Two additional BChl cofactors called accessory BChls (B_A and B_B), two bacteriopheophytins (Φ_A and Φ_B), two quinones and a non-heme iron are organized into two pseudo-symmetric branches named A and B. After the photo excitation the electron is transferred only via the active “A” branch. On the other hand, in structurally similar RCs, as that of photosystem I, the electron transfer occurs equally over both branches. Neither the reason for the high efficiency nor that of the directionality of the electron transfer has been elucidated so far. To solve these questions, the solid-state photo-chemically induced nuclear polarization (photo-CIDNP) effect with its dramatic enhancement of local NMR signals provides an analytical tool especially suited for studying electron transfer in photosynthetic RCs. In fact, photo-CIDNP MAS NMR has been applied to explore electronic structures of the electron donors and acceptors in RCs.

In this Thesis, the first goal was to reach a complete picture of the electronic ground state of the donor of the RC of *R. sphaeroides* WT. **Chapter 2** reports 2D photo-CIDNP DARR experiments by nanosecond laser flash excitation on ^{13}C labelled bacterial RCs at selected positions in the Special Pair. Combined with previous results, a complete chemical shift assignment of the Special Pair is obtained. The shielding pattern of the ^{13}C nuclei confirms that there is excess electron density towards pyrrole ring III of P_L compared with pyrrole ring III of P_M , and the pattern of ^{13}C shifts for the ring carbons is well in line with the $P_L^{\delta-}P_M^{\varepsilon-}$ charge transfer character, with $\delta > \varepsilon$. Hence symmetry breaking of the electronic

structure with excess negative charge on the P_L is detected in the ground state. The results suggest that asymmetric distribution of electron density mediates the asymmetric electron transfer following excitation.

Functional properties may also depend on dynamic aspects. Therefore, in **Chapter 3**, we probe the dynamics of the Special Pair by a new strategy that is based on photo-CIDNP MAS NMR experiments. Spin-torch based experiments are introduced, where the polarization transfer of enhanced photo-CIDNP signals between ^{13}C - ^{13}C of different isotope labels is observed by spin diffusion process. This experiment, thus allows probing the local mobility in the Special Pair. Polarization transfer among the ^{13}C labelled carbon atoms of the Special Pair in 3-ALA bacterial RCs is studied by 2D photo-CIDNP DARR experiments with continuous illumination. From a series of experiments with different mixing times, dynamic asymmetry in the Special Pair is observed. It appears that the break of the pseudo- C_2 symmetry is related to the entire supermolecule rather than to the individual P_L and P_M molecules. The dynamic picture is compared with polymorphism in terms of Shelnutt's NSD (normal-coordinate structural decomposition) analysis, suggesting that collective modes are localized towards the P_M bacteriochlorophyll. The arising picture is also in line with Redfield's theory approach. Possible implications of the localized dynamics for symmetry breaking and charge transfer are discussed.

In **Chapter 4**, the study of the electronic ground state is extended from the Special Pair to the primary electron acceptor. To this end, bacterial RCs containing $u\text{-}^{13}\text{C}_4\text{-}\delta\text{-aminolevulinic acid}$ ($u\text{-ALA}$) labelled BChl and BPhe are studied under continuous illumination. By comparison with the literature, a full assignment for the bacteriopheophytin (Φ_A) has been obtained. It appears that the electronic structure of Φ_A is very similar to that of a BPhe *a* in solution, with little evidence for packing effects induced by the protein matrix. It is concluded that the Φ_A of the active branch is not tuned in a special manner by its environment.

To explore the protein pocket which might tune the Special Pair, alternative spin-torch experiments are proposed in **Chapter 5**. In this concept, the strong polarization of the donor carbons is transferred to the pocket, which can be

studied at atomic resolution. To this end, the possibility to use ^{13}C photo-CIDNP for ^{13}C - ^1H transfer is explored. In this Chapter, results on polarization transfer between the highly polarized ^{13}C and the thermally polarized ^1H are discussed. An outlook is presented for the application of such spin-torch experiments to study the aromatic environment of the Special Pair.

Summary in Dutch (Samenvatting)

Fotosynthese is het fysisch-chemische proces waarmee planten, algen en fotosynthetische bacteriën licht energie gebruiken voor de synthese van organische bestanddelen. Door licht veroorzaakte elektron overdracht in fotosynthetische reactie centra (RC) is zeer efficiënt, met een kwantum efficiëntie van bijna 100%. In RCs van *Rhodobacter (R). sphaeroides* WT, de primaire elektron donor is een bacteriochlorophyll (BChl) dimeer, het zogenaamde Special Pair P, bestaande uit P_L en P_M . In het RC zijn verder twee extra BChl cofactoren accessory BChls (B_A en B_B) genaamd, twee bacteriopheophytines (Φ_A en Φ_B), twee quinonen en een non-heem-ijzer zijn onderverdeeld in twee pseudo-symmetrische takken A en B. Het elektron wordt alleen overgedragen via de actieve "A" tak. Maar in structureel gelijksoortige RC, zoals in het reactie centrum van fotosysteem I, vindt elektronen overdracht in gelijke mate plaats via beide takken. Het geheim van de hoge kwantum efficiëntie in de richting van de elektronen overdracht is tot op heden ontrafeld. Om deze vraagstukken op te lossen is het photo-CIDNP effect (photo-chemically induced nuclear polarization), met zijn zeer grote versterking van lokale NMR signalen, een uitzonderlijk praktisch analytisch gereedschap dat speciaal geschikt is om elektronen overdracht in fotosynthetische reactie centra te bestuderen. Zo is photo-CIDNP toegepast om de elektronische structuur van de elektron donor in kaart te brengen.

Het eerste doel van dit proefschrift was om een compleet beeld van de elektronische grondtoestand van de donor van het RC van *R. sphaeroides* WT te verkrijgen. **Hoofdstuk 2** doet verslag van 2D photo-CIDNP DARR experimenten met nanosecond laser flash excitatie van bacteriële RC, die op specifieke plaatsen

in het Special Pair zijn verrijkt met ^{13}C isotopen. Samen met eerder behaalde resultaten is een complete chemical shift bepaling van het Special Pair verkregen. Het 'shielding' patroon van de ^{13}C kernen bevestigt dat er een lichte overmaat van elektronen dichtheid is op pyrrool ring III van P_L in vergelijking met pyrrool ring III van P_M , verder is het patroon van de ^{13}C shifts voor de ring koolstoffen in goede overeenkomst met het verwachte karakter van de $\text{P}_\text{L}^{\delta-}\text{P}_\text{M}^{\varepsilon-}$ ladingsoverdracht waarbij geldt dat $\delta > \varepsilon$. Er is dus een breking van de symmetrie in de elektronische grondtoestand met een overmaat van negatieve lading op P_L gedetecteerd. De asymmetrische distributie van elektronen dichtheid draagt mogelijk bij aan de asymmetrie van de elektronen overdracht die na excitatie uitsluitend langs de actieve tak plaatsvindt.

Functionele eigenschappen kunnen ook afhangen van dynamische aspecten. Daarom is in **Hoofdstuk 3** de dynamiek van de Special Pair onderzocht met behulp van een nieuwe strategie die is gebaseerd op photo-CIDNP MAS NMR experimenten. Spin-torch gebaseerde experimenten, waar de polarisatie overdracht tussen verschillende ^{13}C isotopen door spin diffusie mee kan worden geobserveerd, worden in dit hoofdstuk geïntroduceerd. Deze experimenten maken het mogelijk om de locale mobiliteit in het Special Pair te meten. Polarisation overdracht tussen de met ^{13}C isotopen verrijkte atomen van het Special Pair in 3-ALA bacteriële RC is onderzocht met behulp van 2D photo-CIDNP DARR experimenten onder constante belichting. Met behulp van de gepresenteerde serie van experimenten met verschillende 'mixing times' is de dynamische asymmetrie van het Special Pair in kaart gebracht. Het lijkt erop dat de breking van de pseudo- C_2 symmetrie meer is gerelateerd aan het totale supermolecuul dan aan de individuele moleculen P_L en P_M . Het dynamische plaatje is vergeleken met polymorfisme in termen van Shelnutt's NSD analyse die mogelijke variabiliteit in de kristallijne toestanden aangeeft, in de richting van de P_M bacteriochlorophyll. Het resultaat is tevens in lijn met de 'Redfield's theory' benadering. Mogelijke implicaties van de lokale dynamiek van de symmetrie breking en de ladingsoverdracht worden besproken.

In **Hoofdstuk 4** wordt naast de elektronische grondtoestand van het Special Pair ook die van de primaire elektronen acceptor onderzocht. Hiervoor zijn bacteriële RC met $u\text{-}^{13}\text{C}_4\text{-}\delta\text{-aminolevulinic acid}$ ($u\text{-ALA}$) verrijkte BChl en BPhe bestudeerd onder constante belichting. Door vergelijking met al bekende waarden uit de literatuur is een complete toekenning van de signalen van bacteriële pheophytine (Φ_A) gerealiseerd. Het lijkt erop dat de elektronische structuur van Φ_A in sterke mate overeenkomt met die van een BPhe a molecuul in oplossing, en er is weinig bewijs gevonden voor packing effecten van de eiwit matrix. Daarom is geconcludeerd dat de Φ_A van de actieve tak niet op een speciale manier is afgestemd door zijn directe omgeving.

Om het eiwit pocket, dat mogelijk de Special Pair afstemt, te bestuderen, zijn alternatieve spin-torch experimenten voorgesteld (**Hoofdstuk 5**). In dit concept wordt de sterke polarisatie overdracht van de donor koolstoffen aan de pocket tot op atomair nivo bekeken. Hiervoor is de mogelijkheid om ^{13}C photo-CIDNP te gebruiken voor $^{13}\text{C}\text{-}^1\text{H}$ overdracht onderzocht. In dit hoofdstuk worden de resultaten van polarisatie overdracht tussen sterk gepolariseerde ^{13}C atomen en thermisch gepolariseerde ^1H besproken. Een vooruitblik van de mogelijke toepassing van dergelijke spin-torch experimenten om in de toekomst de omgeving van het aromatische systeem van het Special Pair te onderzoeken wordt hier gepresenteerd.

Summary in Tamil (ஆய்வு சுருக்கம்)

தாவரங்கள், பாக்டீரியா மற்றும் ஒளிச்சேர்க்கை செய்யும் பாக்டீரியாக்கள், ஒளிச்சேர்க்கை என்ற இயற்-வேதிய செய்முறையை கொண்டு ஒளி ஆற்றலை உபயோகித்து, கரிமச் சேர்மங்களை உற்பத்தி செய்து கொள்கின்றன. இந்த ஒளிச்சேர்க்கை வினைமைய நிலையங்களில் நிகழும், ஒளியால் தூண்டப்பட்ட எலக்ட்ரான் பரிமாற்றம், மிகவும் சிறப்பாக நடைபெறுகின்ற ஒரு வேதிவினையாகும். மேலும், இந்த வேதிவினையின் குவாண்டம் செயல்திறனின் மதிப்பு இலக்கம் ஒன்றை நெருங்குகிறது. ஆர். ஸ்பொராய்ட்ஸ் WT என்ற நுண்ணுயிரியின் ஒளிச்சேர்க்கை வினைமையத்தில், எலக்ட்ரான் பரிமாற்றத்திற்கு, இணைகாரணியின் இரண்டு சமச்சீர் கிளைகளில், ஒன்று தான் தேர்வு செய்யப்படுகிறது. மற்றொரு பக்கம், அதே அமைப்புடைய போட்டோசிஸ்டம் I-ல் உள்ள ஒளிச்சேர்க்கை வினைமையத்தில், எலக்ட்ரான் பரிமாற்றம், இணைகாரணியின் இரண்டு கிளைகளிலும் நடைபெறுகின்றது. இத்தகைய எலக்ட்ரான் பரிமாற்றத்தின் செயல்திறன் மற்றும் திசை, இன்னும்

அறியப்படாத ஒன்றாகும். இதை கண்டறிய, ஒளிச்சேர்க்கை வினைமையத்திலிருந்து, திண்மநிலை போட்டோ-சி.ஐ.டி.என்.பி என்கின்ற பரிசோதனையின் மூலம் கிடைக்கும், மிகைப்படுத்தப்பட்ட என்.எம்.ஆர் உள்கைகை ஒரு பகுக்கின்ற கருவியாக விழங்குகின்றது. எனவே, இந்த ஆய்வில் போட்டோ-சி.ஐ.டி.என்.பி என்.எம்.ஆர் உத்தி மூலம் எலக்ட்ரான் வழங்கியின் இலத்திரனமைப்பு ஆய்வு செய்யப்பட்டுள்ளது. இந்த ஆய்வுக்கட்டுரை ஐந்து அத்தியாயங்களாக பிரிக்கப்பட்டுள்ளன.

அத்தியாயம் ஒன்று: இந்த ஆய்வு பற்றிய நோக்கம் மற்றும் அதை சார்ந்த பல விபரங்கள் முன்னுரையாக வழங்கப்பட்டுள்ளது.

அத்தியாயம் இரண்டு: இந்த பரிசோதனைக்கு தேர்வு செய்யப்பட்ட சிறப்பு இடங்களில் கதிரியக்க ^{13}C கரிமத்தால் அடையாளம் செய்யப்பட்ட, சிறப்பு இணை கொண்ட ஒளிச்சேர்க்கை வினைமையமானது, நானோ விநாடி ஊடொளி ஒளித்தெரிப்பு கொண்டு, கிளர்வு செய்யப்பட்டது. இந்த பரிசோதனையின் மூலம் சிறப்பு இணையின் முழுமையான வேதி நகர்வின் ஒதுக்கல் பெறப்பட்டது. மேலும், P_M பிரோல் வளையம் III -ஐ விட, P_L பிரோல் வளையம் III-னை நோக்கி, கூடுதல் எலக்ட்ரான் அடர்த்தி இருப்பதால், கதிரியக்க ^{13}C அணுக்கருவின் வேதி நகர்வு அமைப்பு, $P_L^{\delta-} P_M^{\delta-}$ $\delta > \varepsilon$ ன் மின்னுட்ட பரிமாற்ற தன்மைக்கு சமநிலையில் இருக்கின்றது. இதனால் தாழ்நிலை P_L -ல் உள்ள கூடுதல் குறை மின்னுட்டம் அதனின் சமச்சீர் எலக்ட்ரான் அமைப்பை முறிவுசெய்கின்றது. இந்த கண்டறியப்பட்ட சமச்சீரற்ற எலக்ட்ரான் அடர்த்தி பரவல், கிளர்வுற்ற நிலையில் நடைபெறும் சமச்சீரற்ற எலக்ட்ரான் பரிமாற்றத்திற்கு செயல்தூக்கியாக செயல்படலாம்.

அத்தியாயம் மூன்று: ஒரு புதிய உத்தியான, போட்டோ-சி.ஐ.டி.என்.பி மாஸ் என்.எம்.ஆர் பரிசோதனை கொண்டு, சிறப்பு இணையின் இயக்க பண்பு ஆராயப்பட்டுள்ளன. மேலும், இந்த பரிசோதனையின் மூலம் சிறப்பு இணையின் உள் நகர்திறனை ஆய்வு செய்ய முடிகின்றது. தொடர்ச்சியான ஒளியூட்டம் கொண்ட 2D போட்டோ-சி.ஐ.டி.என்.பி DARR பரிசோதனை கொண்டு, 3-ALA பாக்டீரிய வினை மையத்தில் உள்ள, சிறப்பு இணையில், அடையாளமிடப்பட்ட கதிரியக்க ^{13}C கரிம அணுக்கருக்களுக்குள் நடைபெறும் ஒருமுனையாக்கல் பரிமாற்றம் ஆய்வு செய்யப்பட்டுள்ளன. மேற்கண்ட பரிசோதனைகளில் பெறப்பட்ட இயக்கவியல் அமைப்பு பற்றி, Shelnutt's NSD பகுப்பாய்வு கொண்டு விளக்கம் அளிக்கப்பட்டுள்ளது. சமச்சீர் முறிவு மற்றும் மின்னுட்ட பரிமாற்றத்திற்கு தொடர்புடைய, குறிப்பிட்ட இடத்தில் ஏற்படும் இயக்க நிலை பண்பால், ஏற்படக்கூடிய விளைவுகள் பற்றி கருத்துக்கள் தெரிவிக்கப்பட்டுள்ளன.

அத்தியாயம் நான்கு: முதலில், சிறப்பு இணையின் தாழ்நிலை பற்றிய தகவல்கள், முதன்மை எலக்ட்ரான் ஏற்பிக்கு விரிவு செய்யப்பட்டுள்ளன. U-ALA BChl மற்றும் BPhe பாக்டீரியாவின் வினைமையங்கள், தொடர்ச்சியான ஒளியூட்டம் மூலம் பரிசோதனை செய்யப்பட்டுள்ளன. இதன்மூலம், Φ_A -ன் முழுமையான வேதி நகர்வின் ஒதுக்கல் பெறப்பட்டுள்ளன. இதனால் BPhe - யின் உந்தப்பட்ட கிளை, தனது சுற்றத்தால் இசைப்புறவில்லை என்பது உறுதி செய்யப்பட்டுள்ளன.

அத்தியாயம் ஐந்து: சிறப்பு இணையை இசைப்புற வைக்கக்கூடிய புரத வினை மையத்தை, வேறுபட்ட ஸ்பின்-டார்ச் பரிசோதனை கொண்டு ஆய்வு செய்யும் முறைகள், முன்மொழியப்பட்டுள்ளது. மேலும், கதிரியக்க ^{13}C கொண்ட போட்டோ-சி.ஐ.டி.என்.பி பரிசோதனை மூலம், ^{13}C - ^1H அணுக்களின் இடையில் இயலக்கூடிய பரிமாற்றம் விளக்கமாக கொடுக்கப்பட்டுள்ளது. இறுதியாக, ஸ்பின்-டார்ச் பரிசோதனையின் எதிர்கால பயன்பாடாக, சிறப்பு இணையின் அரோமேடிக் கரிம அணுக்களின் சுற்றத்தை, ஆய்வு செய்யக்கூடிய உத்திகள் விளக்கப்பட்டுள்ளன.

