



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

**Photo-CIDNP studies on reaction centers of rhodobacter sphaeroides**  
Prakash, Shipra

**Citation**

Prakash, S. (2006, September 13). *Photo-CIDNP studies on reaction centers of rhodobacter sphaeroides*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4555>

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/1887/4555>

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

# Samenvatting

---

Vaste-stof “magische hoek roterend”, oftewel *magic angle spinning* (MAS), NMR ontwikkelt zich snel als een belangrijke techniek voor het bestuderen van grote membraaneiwitssystemen. Het inherente probleem van deze techniek is de lage gevoeligheid en selectiviteit (**Hoofdstuk 1**). Photo-chemically induced dynamic nuclear polarization (photo-CIDNP) MAS NMR verhoogt NMR intensiteiten door middel van de inductie van fotochemische reacties die het nucleaire spinsysteem uit zijn Boltzmann evenwicht brengen. Kennis en ontwikkeling van photo-CIDNP MAS NMR kunnen hierdoor een methode opleveren om de intrinsieke ongevoeligheid en non-selectiviteit van MAS NMR te ondervangen. Tot nu toe werd photo-CIDNP in de vaste toestand alleen waargenomen in natuurlijke fotosynthetische reactiecentra. In de fotosynthetische bacterie *Rhodobacter sphaeroides* vindt het primaire fotosynthetische proces plaats in het pigment-eiwitcomplex, ook wel reactiecentrum (RC) genaamd. Vier bacteriochlorofyl *a* moleculen (BChl *a*), twee bacteriofeofytine *a* moleculen (BPhe *a*), twee ubiquinon-10 moleculen (Q), een niet-haem ijzer ( $\text{Fe}^{2+}$ ), en een carotenoïde molecuul (C) vormen de cofactoren van het RC. Het lichtgeïnduceerde elektronenoverdrachtsproces begint bij de primaire donor, die wordt gevormd door de twee BChl moleculen  $P_L$  en  $P_M$ . Het special pair P geeft een electron aan het BPhe molecuul  $\Phi_A$ .

Er zijn drie verschillende mechanismen voorgesteld om photo-CIDNP in vaste stoffen te beschrijven.

- Het *electron-electron-nucleaire three-spin mixing* (TSM) mechanisme: Volgens dit mechanisme ontstaat er een netto nucleaire polarisatie als gevolg van de aanwezigheid van anisotrope hyperfijn-interactie en -koppeling tussen de twee electronen *spins* in het *spin*-gecorrleerde radicaalpaar.
- Het *differential decay* (DD) mechanisme: In dit mechanisme wordt een netto photo-CIDNP effect veroorzaakt als gevolg van de anisotrope hyperfijn-koppeling wanneer de singuleet- en triplet-toestanden van de spin-gecorrleerde radicaalparen verschillende levensduren hebben.
- Het *differential relaxation* (DR) mechanisme: Dit vindt plaats als gevolg van het significante verschil in relaxatie tussen de nucleaire spins in het  $^3P$  triplet van het *special pair* en de nucleaire spins in het singuleet van de grondtoestand van P.

De reconstructie van de lokale electronen-spin-dichtheden uit photo-CIDNP intensiteiten vergt een diepgaand begrip van de betrokken mechanismen. Kennis van het photo-CIDNP

---

proces is dus equivalent aan het verkrijgen van informatie over de eerste stap in de fotosynthese.

In **Hoofdstuk 2** wordt  $^{13}\text{C}$  photo-CIDNP MAS NMR onderzoek aan RC's van *Rhodobacter sphaeroides* WT beschreven. Photo-CIDNP is bij drie verschillende magnetische veldsterktes waargenomen. Bij een magnetische veldsterkte van 4,7 Tesla (200 MHz protonfrequentie) is de sterkste verhoging van meer dan 10.000 maal de Boltzmann polarisatie waargenomen. Bij hogere velden neemt de verhoging af. De lichtgeïnduceerde NMR geeft emissie signalen (negatief) bij alle velden en konden worden toegekend aan  $P_L$  en  $P_M$  van de donor en de acceptor  $\Phi_A$ . De photo-CIDNP MAS NMR spectra bij de drie verschillende magnetische veldsterktes zijn gesimuleerd onder de aanname dat er twee concurrerende mechanismen zijn waarbij de polarisatie wordt overgedragen van elektronen naar kernen, *three-spin mixing* (TSM) en *differential decay* (DD). De lichtgeïnduceerde signalen zijn toegekend met behulp van simulaties. De gesimuleerde spectra komen goed overeen met de photo-CIDNP MAS NMR spectra, wat aantoont dat het photo-CIDNP effect in de RC's van *Rb. sphaeroides* WT kan worden geïnterpreteerd door middel van de TSM en DD mechanismen.

De photo-CIDNP studies aan de mutant stam *Rhodobacter sphaeroides* R26 worden besproken in **Hoofdstuk 3**. Vergeleken met het WT is de levensduur van de donor triplet in de R26 RC's langer omdat er geen carotenoïde molecuul aanwezig is. Het effect van de magnetische veldsterkte op photo-CIDNP is vergelijkbaar voor beide RC's. Toch zijn de lichtgeïnduceerde signalen die zijn toegekend aan de donor P in de RC's van de R26 stam *absorptie signale*, wat niet kon worden verklaard door de TSM en DD mechanismen. Hierdoor hebben we overwogen of het DR mechanisme actief kon zijn in R26, naast de twee andere mechanismen. Simulaties waarbij het DR mechanisme is inbegrepen, konden de verandering in het teken van de lichtgeïnduceerde signalen van donor P reproduceren. Om die reden is het polarisatiepatroon van de WT RC's geïnterpreteerd door de spin-dichtheidsverdeling van de radicaal paar toestand te beschouwen, en is de verandering in polarisatie tussen de WT en R26 spectra geïnterpreteerd via de spin-dichtheidsverdeling in de triplettoestand van de donor.

De sterke photo-CIDNP verhoging bij een veldsterkte van 4,7 T maakt het mogelijk om zonder isotoopverrijking cofactor moleculen met een concentratie van  $\sim 100$  nM in intacte R26 cellen te bestuderen (**Hoofdstuk 3**). Het globale photo-CIDNP intensiteitspatroon wijkt op sommige details af van de geïsoleerde reactiecentra bij 4,7 T. De overeenkomst tussen het photo-CIDNP spectrum van de geïsoleerde RC's en de intacte cellen duidt erop dat de elektronenstructuur van de grondtoestand van het special pair niet sterk wordt beïnvloed door de omringende eiwitcomplexen in de natuurlijke omgeving van een intacte cel. Kortom, photo-CIDNP MAS NMR heeft zich bewezen als methode om de elektronenstructuur van

fotosynthetische cofactoren te bestuderen, zowel met moleculaire en atomaire resolutie als bij cellulaire concentraties.

In **Hoofdstuk 4** zijn  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  dipolaire correlatie photo-CIDNP MAS NMR studies uitgevoerd aan RC's van *Rhodobacter sphaeroides* WT, selectief isotoop gelabeld in alle BChl en BPhe cofactoren op de posities C-4, 5, 9, 10, 14, 15, 16 en 20, om zodoende een uitgebreid beeld te krijgen van de elektronenstructuur van de grondtoestand van de cofactoren die betrokken zijn bij het elektronenoverdrachtsproces. Er zijn drie sterke componenten waargenomen in de  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  dipolaire correlatie photo-CIDNP MAS NMR spectra. Deze zijn toegekend aan twee BChls, P1 en P2, en een BPhe,  $\Phi_A$ . Daarnaast is er een zwakke component waargenomen die is toegekend aan een andere BChl, aangeduid met P3. Er zijn duidelijke verschuivingen naar hoog veld aanwezig voor P2 in de pyrrool ring I vergeleken met P1 en P3. De grote verschuivingen kunnen worden verklaard door een waterstofbrug met His L168, die zich in de buurt van de 3-acetyl groep van  $P_L$  bevindt. Zodoende kan  $P_L$  worden toegekend aan P2, waardoor het een *special* BChl wordt in het special pair. Vervolgens kan  $P_M$  worden toegekend aan P1 en de zwakke component P3 aan  $B_A$ . De elektronenstructuur van het *special pair* is dus asymmetrisch in de grondtoestand.

Photo-CIDNP studies zijn verder uitgebreid naar de membraangebonden complete fotosynthetische unit (PSU) die selectief  $^{13}\text{C}$ -isotoop gelabeld is in alle BChl en BPheo cofactoren op posities C-1, 3, 6, 8, 11, 13, 17 en 19 (**Hoofdstuk 5**). Alle lichtgeïnduceerde NMR pieken van het membraangebonden PSU zijn absorptie signalen. Toevoeging van detergens leidde tot dissociatie van PSU uit het chromatofoomembraan en dat gaf significante veranderingen in het teken en het intensiteitpatroon van het lichtgeïnduceerde MAS NMR spectrum. Daarentegen vertonen de in detergens opgeloste PSU en RC's met hetzelfde patroon van isotopenlabels nagenoeg dezelfde chemische verschuivingen, met slechts geringe verschillen in het intensiteitpatroon. De duidelijke verschillen tussen de intacte membraangebonden en de met detergens opgeloste fotosynthetische units kan worden verklaard door het verlies van zelforiëntatie van de membraangebonden samples ten gevolge van het oplossen.

**Hoofdstuk 6** geeft een toekomstperspectief voor photo-CIDNP studies aan de RC's van *Rhodobacter sphaeroides*. Het eerste deel van het hoofdstuk is gewijd aan het toenemen van de photo-CIDNP respons. Dit baant een weg voor tijdopgeloste photo-CIDNP experimenten. Het tweede deel beschrijft toekomstige ontwikkelingen in vier verschillende richtingen, van biofysische studies naar Magnetic Resonance Force Microscopy. De biofysische studies hebben informatie opgeleverd over het bouwen van kunstmatige fotosynthetische machines. Photo-CIDNP kan als een 'spin torch' worden gebruikt om de bindingsplaats en diens invloed op de cofactoren te onderzoeken. 'Spin torches' zouden ook gebruikt kunnen worden als contrastmiddel in Magnetic Resonance Imaging (MRI). Photo-CIDNP in combinatie met

---

Magnetic Resonance Force Microscopy (MRFM) zou de detectie van geïsoleerde kernspins in de nabije toekomst mogelijk kunnen maken.