



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The heart of oxygenic photosynthesis illuminated

Janssen, G.J.

Citation

Janssen, G. J. (2013, December 4). *The heart of oxygenic photosynthesis illuminated*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/22697>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/22697>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22697> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Janssen, Geertje Jacoba

Title: The heart of oxygenic photosynthesis illuminated

Issue Date: 2013-12-04

SAMENVATTING

Fotosynthese is het proces waarmee fotosynthetische organismen zonne-energie omzetten in chemische energie. Tijdens de fotosynthetische reacties in planten, algen en cyanobacteriën komt zuurstof vrij, dit wordt oxygene fotosynthese genoemd. De primaire fotosynthetische processen van energieomzetting vinden plaats in het reactiecentrum (RC), een pigment-eiwitcomplex gelokaliseerd in het hart van het fotosynthetische complex. Van alle RC bezit uitsluitend fotosysteem II (PSII) een reductieve kracht die sterk genoeg is om water te oxideren. PSII bestaat uit een eiwitmatrix met zeer nauwkeurig afgestelde cofactoren die de elektron overdracht faciliteren met een kwantumefficiëntie van bijna 100%. De ordening van de cofactoren in het PSII RC vertoont sterke overeenkomsten met die in bacteriële RC van purperbacteriën terwijl de oxidatieve potentialen sterk verschillen. Ondanks uitgebreid onderzoek is het geheim achter deze buitengewone hoge redox potentiaal en de rol van de omringende eiwitmatrix nog niet ontrafeld. De elektronen stromen van PSII naar PSI, een complex met een sterk reductieve kracht, die wordt gebruikt voor het aanmaken van NADPH. Hoewel de elektronenstroom in PSII strikt asymmetrisch is, vertoont PSI een veel grotere flexibiliteit en kan elektron overdracht via beide cofactor takken plaatsvinden. De vraag die hieruit voortvloeit, is of the elektronische architectuur van het PSI complex varieert tussen verschillende plantsoorten en ook de elektronische grondtoestand van P700 beïnvloedt.

Photo-CIDNP (photo-chemically induced nuclear polarization) is non-Boltzmann kernmagnetisatie die wordt veroorzaakt door fotochemische reacties en kan met behulp van NMR spectroscopie worden geobserveerd als zeer versterkte negatieve en positieve NMR signalen. Photo-CIDNP is een uitstekend geschikt gereedschap voor het bestuderen van fotosynthetische RC. Het biedt de mogelijkheid tot selectieve excitatie van cofactoren, het construeren van elektrondichtheidprofielen via de intensiteit van de signalen en het verschaft ook inzicht in de kinetische stabilisatie van fotosynthetische intermediären en andere transiente soorten. Toegepast in de tijdopgeloste modus, geeft photo-CIDNP via gecorreleerde signalen in 2-dimensionale dipolaire spectroscopie toegang tot de moleculaire dynamiek.

Photo-CIDNP studies van PSI en PSII waren vooralsnog beperkt tot het meten van geïsoleerde complexen vanwege de moeilijkheid om planten RC-selectief te labelen met ^{13}C - en ^{15}N -isotopen. In dit proefschrift is photo-CIDNP vaste stof NMR in combinatie met

selectieve isotoopverrijking toegepast om directe toegang tot het hart van de grote PSII en PSI complexen binnenin zowel intacte en geïsoleerde systemen van kroos en *Synechocystis* sp. PCC 6803 te krijgen en selectieve atomen in het RC te bestuderen. Hiermee kon het behoud van de elektronische structuur van de PSII elektron donor in verschillende biologische preparaties worden onderzocht en de elektronspindichtheid (ρ_i) in de actieve cofactoren van PSI worden geconstrueerd. Daarnaast is de functionele heterogeniteit van de PSI elektron donor in verschillende planten soorten onderzocht.

Hoofdstuk 2 rapporteert over de resultaten die zijn verkregen middels het uitvoeren van experimenten op selectief ^{13}C - isotoop gelabelde hele cellen van de cyanobacterie *Synechocystis* sp. PCC 6803. De in dit hoofdstuk besproken resultaten tonen voor het eerst het vaste-stof photo-CIDNP effect in cyanobacteriën aan. Daarnaast suggereren de geobserveerde photo-CIDNP signalen een buitengewoon complete overeenkomst van de elektronische eigenschappen van de fotosynthetische machinerie tussen planten en cyanobacteriën. Het feit dat het photo-CIDNP effect direct kan worden geobserveerd middels experimenten met hele cellen, betekent dat photo-CIDNP MAS NMR studies van oxygene fotosystemen niet zijn beperkt tot geïsoleerde plantfotosystemen.

In **Hoofdstuk 3** worden de resultaten van experimenten met uniform ^{15}N - isotoop gelabelde PSI-110 deeltjes van spinazie en kroos besproken. De resultaten demonstreren een stikte conservatie van de elektronische grondtoestand van de PSI elektrondonor tussen verschillende plantsystemen terwijl tegelijkertijd een zeer grote flexibiliteit wordt geconstateerd wat betreft de elektronische architectuur. Ondanks de zeer geoptimaliseerde redox eigenschappen van P700, vertoont PSI functionele heterogeniteit wat betreft de relatieve participatie van de twee cofactor takken in elektron overdracht. De besproken resultaten in dit hoofdstuk laten zien dat deze variaties de P700 niet beïnvloeden maar zich beperken tot de periferie.

Hoofdstuk 4 beschrijft de experimenten die zijn gedaan met D1D2 en PSII core-complexen van spinazie en kroos en met selectief ^{13}C - isotoop gelabeld kroos. Het vaste stof photo-CIDNP effect in conjunctie met selectieve ^{13}C isotoop verrijking maakt het mogelijk om NMR signalen van het primaire radicaalkoppel van PSII te observeren direct in preparaties van thylakoide membranen en ook hele kroosplanten. De besproken data demonstreren dat de fotosynthetische machinerie opmerkelijk robuust is en in essentie niet wordt beïnvloed door verschillende sample bereidingsprocedures en isolatie. Dit is belangrijk bij het valideren van resultaten die zijn verkregen van het uitgebreid bestudeerde D1D2

complex. Verder tonen de in dit hoofdstuk besproken resultaten aan dat de elektronische structuren van de PSII elektron donor in spinazie en kroos identiek zijn. Analyse van de verkregen spectra van selectief ^{13}C - gelabeld thylakoide membraan toont duidelijk aan dat het radicaalkoppel in PSII wordt gevormd door een enkele Chl *a* en één Phe *a* molecuul. Daarnaast is in dit hoofdstuk de invloed van de eiwitmatrix en het mechanisme achter de photo-CIDNP opbouw in grotere PSII systemen besproken.

In **hoofdstuk 5** zijn tijd opgeloste ns-flash photo-CIDNP MAS NMR experimenten aan PSI en PSII besproken. De resultaten zijn in overeenstemming met een elektronoverdracht via beide cofactortakken en de opbouw van photo-CIDNP in PSI is in dit hoofdstuk uiteengezet. Een significante bijdrage van het DR mechanisme in de opbouw van photo-CIDNP is geobserveerd in PSII maar niet gedetecteerd bij photo-CIDNP opbouw in PSI. De resultaten tonen aan dat de opbouw van photo-CIDNP in PSII overeenkomt met de opbouw in *Rb. sphaeroides* R26 vanwege de lange levensduur in beide systemen.

Tenslotte bevat **hoofdstuk 6** een vooruitblik naar de toepassing van photo-CIDNP op selectief gelabeld PSII en PSI en worden mogelijke 2- en 3-dimensionale MAS NMR experimenten voorgesteld. Het waargenomen veldeffect en de licht geïnduceerde veranderingen in de verschillende experimenten op PSI deeltjes worden besproken en de eerste data die zijn verkregen van selectief ^{15}N -ALA gelabeld PSII worden gepresenteerd.

Gebaseerd op de preliminaire data in hoofdstuk 6 wordt de relatieve participatie van de twee cofactor takken in de elektron overdracht in PSI en de betrokkenheid van een histidine met partiële spindichtheid (ρ_i) besproken.