



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Towards in-cell structural study of light-harvesting complexes : an investigation with MAS-NMR

Azadi Chegeni, F.

Citation

Azadi Chegeni, F. (2019, March 12). *Towards in-cell structural study of light-harvesting complexes : an investigation with MAS-NMR*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/69726>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/69726>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/69726> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Azadi Chegeni, F.

Title: Towards in-cell structural study of light-harvesting complexes : an investigation with MAS-NMR

Issue Date: 2019-03-12

Samenvatting

Light-Harvesting Complex II (LHCII) is verantwoordelijk voor lichtabsorptie en excitatie-energieoverdracht in planten en fotosynthetische algen, maar bij te veel licht ondergaat het conformationele veranderingen waardoor het excitaties dissipeert om zo lichtschade te voorkomen. Het onderliggende moleculaire beeld van deze conformationele veranderingen is nog niet opgehelderd. Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is om de conformationele dynamica van het fotosynthetische *Light Harvesting Complex II* en de rol van de membraanomgeving te onderzoeken. Hiertoe heb ik NMR-gebaseerde methoden verkend die uiteindelijk de moleculaire structuur en dynamica van de fotosynthetische componenten *in vivo* kunnen meten in functionele membranen of celsystemen.

In **Hoofdstuk 1** wordt een algemene introductie gegeven over fotosynthetische antennecomplexen en fotoprotectiemechanismen. Ik beschrijf verder de methodologische achtergrond van kernspin resonantie (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) spectroscopie en de op *cross polarization* (CP) en INEPT (insensitive nuclei enhanced by polarization transfer) gebaseerde NMR dynamische spectrale bewerkingsmethoden.

CP en INEPT polarisatieoverdracht vaste-stof NMR-methoden aangevuld met biosynthetische isotopen verrijking en NMR-relaxatiemethoden worden met succes toegepast in **Hoofdstuk 2** voor het bepalen van eiwit- en lipide moleculaire dynamica in natieve thylakoïde membranen. Onze resultaten bieden een microscopisch dynamisch beeld van thylakoïde membranen van wildtype (WT) en van de zeaxanthine (*Zea*)-accumulerende *npq2* mutant van *Chlamydomonas reinhardtii* (*Cr.*). Voor zowel WT als *npq2* thylakoïde membranen wordt een grotere fractie van geordende lipiden dan van mobiele lipiden waargenomen, wat aangeeft dat de meerderheid van de lipiden binnen of tussen supercomplexen is geïmmobiliseerd. Bovendien is het mogelijk om lipide-isomerisatie te detecteren van all-trans naar trans-gauche configuratie bij hogere temperaturen, voor zowel WT als *npq2* thylakoïde membranen. Daarnaast is gevonden dat *npq2* membranen meer rigide xanthofylen en een fractie van rigide eiwitten bevatten alsmede geordende lipiden die minder gevoelig zijn voor temperatuurveranderingen. Dit suggereert een algehele stijfheid van de thylakoïde membranen als gevolg van *Zea* accumulatie, en dit xanthofyl speelt dus een rol bij membraanstabilisatie.

Om de plasticiteit van LHC's en de rol van de thylakoïde omgeving in het controleren van hun functie om licht te oogsten te onderzoeken, is het essentieel om hun dynamisch gedrag in hun eigen membraanomgevingen te bestuderen. In **Hoofdstuk 3** worden 2D CP- en INEPT-gebaseerde experimenten gebruikt

om gedetailleerd inzicht te verkrijgen in conformationele dynamica van LHCII in gereconstitueerde membranen en in natieve thylakoïde membranen. Interessant is dat de NMR-signalen van LHCII kunnen worden detectedeerd in natieve thylakoïde membranen en dat de chemische verschuivingen in selectieve spin-systemen gedeeltelijk kunnen worden toegekend. Bovendien kunnen lipide signalen en signalen van verschillende Lhcbm-polypeptiden worden geïdentificeerd door vergelijking van de 2D ^{13}C NMR-spectra van LHCII gereconstitueerd in een lipide bilaag en van gehele thylakoïde membranen. Verschillende eiwit-geassocieerde glycolipiden worden onderscheiden op basis van hun galactosyl ^{13}C - ^{13}C correlatiesignalen. De flexibiliteit van LHCII in natieve thylakoïde membranen is aanzienlijk verminderd in vergelijking met LHCII in gereconstitueerde membranen, wat het belang van de natuurlijke membraan-omgeving benadrukt. Membraan-gereconstitueerde LHCII bevat flexibele delen gelokaliseerd in de N- of C-terminus. Het zou, op basis daarvan, thermisch geïnduceerde conformationele overgangen kunnen ondergaan, waardoor reversibel schakelen tussen licht-oogstende en licht-dovende staten mogelijk is. LHCII heeft echter aanzienlijk minder flexibiliteit in natieve, gestapelde thylakoïde membranen, waardoor het de vraag is of spontane overgangen plaatsvinden *in vivo*. De gedetecteerde dynamische sites in LHCII bevinden zich in de nabijheid van de xantofyl-cyclus carotenoïde en van luteïne 2,, waarvan is voorgesteld dat ze betrokken zijn bij licht uitdoving in de fotoprotectie toestand.

In hoofdstuk 2 wordt het effect van Zea accumulatie op thylakoid membraan dynamica beschreven. Het effect van Zea uitwisseling op de interne moleculaire dynamica van LHCII wordt verder onderzocht in **Hoofdstuk 4** door monomere Zea-houdend LHCII van *npq2* te vergelijken met WT trimere LHCII. Interessant is dat Zea uitwisseling op eiwitniveau leidt tot een algeheel verminderde dynamiek van het eiwit en tot binding van veel lipiden. Bovendien is waargenomen dat Zea-houdend *npq2* LHCII anders gevouwen is dan WT LHCII in een lipide bilaag. Verschillende Ser residuen vouwen tot strengen en de NMR spectra van *npq2* LHCII missen drie Ala signalen die worden toegeschreven aan de Ala in de N-terminus, wat suggereert dat ofwel de aanwezigheid van Zea danwel het effect van monomerisatie de vouwing van de N terminus verandert. Deze resultaten suggereren dat conformationele veranderingen van LHCII na het binden van Zea algehele stijfheid van thylakoïde membranen zoals beschreven in hoofdstuk 2 kunnen veroorzaken.

De op polarisatie-overdracht gebaseerde dynamische spectrale bewerkings-NMR experimenten worden uitgebreid voor het screenen van fotosynthetische cel-componenten in **Hoofdstuk 5**. We zijn erin geslaagd om de signalen van lipide kopgroepen, CH_2 - en CH -koolstofatomen van de lipide staarten, eiwit

backbone en zijketens, en koolhydraten van celwand componenten te onderscheiden. Opmerkelijke overeenkomsten worden waargenomen tussen de lipide NMR-signalen in ^{13}C spectra van thylakoïde membranen van gehele *Cr.* cellen. Dit suggereert dat de meerderheid van de cellulaire lipiden is opgenomen in de thylakoïde membranen en dat deze kunnen worden gedetecteerd tegen de achtergrond van andere cellulaire componenten, wat ons in staat stelt om thylakoïde lipide-eigenschappen te analyseren *in vivo*. Inzichten in membraan thermodynamica zijn verkregen door spectra op te nemen over een fysiologisch temperatuurbereik. Kwantitatieve analyse van de moleculaire dynamica van thylakoïde componenten en van cellulaire bestanddelen is verkregen door vergelijking van de experimenteel bepaalde NMR spectra met gesimuleerde INEPT- en CP- NMR intensiteiten als functie van de orde parameter en van rotationele correlatietijden.

Ten slotte wordt in **Hoofdstuk 6** een algemene discussie over de resultaten gepresenteerd in de context van bestaande literatuur, en worden perspectieven voor toekomstig onderzoek gepresenteerd.