

VU Research Portal

Enzymatic Activity and Excited State Processes in Protochlorophyllide Oxidoreductase

Sytina, O.

2010

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Sytina, O. (2010). *Enzymatic Activity and Excited State Processes in Protochlorophyllide Oxidoreductase*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift is gewijd aan het ophelderen van het moleculaire mechanisme van de katalytische reactie in het enzym protochlorofyllide oxidoreductase (POR). Het fotoactieve complex, bestaande uit het POR enzym, de substraat protochlorofyllide (Pchlide) en de cofactor NADPH, kan worden gevormd in het donker, en, na absorptie van een foton door PChlide, worden een proton en een hydride getransporteerd van een tyrosine residu en NADPH, respectievelijk, naar PChlide. Op deze manier wordt de C=C dubbele binding in Pchlide vervangen door een C-C enkele bond, en is PChlide gereduceerd in chlorofyllide (Chlide), een directe chemische voorloper van chlorofyl. Omdat de reactie licht nodig heeft om te verlopen vormt het een belangrijke regulatiestap in de ontwikkeling van het fotosynthetische complex. Dankzij de unieke benodigdheid van licht voor het verloop van de katalytische reactie, kan de reactie gestart worden met een korte laserpuls, en kunnen de snelle enzymatische gebeurtenissen gevolgd worden 'in real time' via de geassocieerde spectroscopische veranderingen.

Het 'donkere' fotoactieve complex en de producten hebben goed te onderscheiden absorptie spectra. De spectrale veranderingen geassocieerd met de conversie van de donkere naar de producttoestand zijn gemeten (i) als functie van tijd en (ii) als functie van belichtingsgeschiedenis. Door het toepassen van speciaal ontwikkelde optische experimenten en een geïntegreerde analyse van de volledige datagegevens, zijn zowel de reactie kinetica kwantitatief gekarakteriseerd, over een tijdschaal lopend van honderden femtoseconden (10^{-13} s) tot aan een paar nanoseconde (10^{-9} s), als de vorming van het katalytische product onder verschillende belichtingscondities. Deze resultaten zijn beschreven in **hoofdstukken 2, 3 en 4** en vormen de eerste helft van dit proefschrift.

In hoofdstukken 2 en 3 wordt beschreven dat de gevormde hoeveelheid van het product Chlide niet-lineair afhangt van de belichting van het sample. Door het meten van de respons op een eerste, tweede en derde (etc.) foton, op een picoseconde tijdschaal kunnen we laten zien dat de absorptie van een eerste foton de, aanvankelijk inactieve enzymen, actief maakt, en dat pas na de absorptie van een tweede foton de katalytische reactie verloopt. De spectrale veranderingen, geassocieerd met de eerste stap, in het midinfrarode deel van het spectrum zijn voornamelijk toe te schrijven aan eiwitsignalen, wat impliceert dat een herschikking in de eiwitstructuur plaats vindt om het eiwit te activeren. De absorptieveranderingen geassocieerd met de vorming van product vinden alleen plaats nadat het sample is blootgesteld aan meer licht. Het activeringsproces lijkt, bij kamertemperatuur, efficiënter te zijn in mesofiele enzymen dan in thermofiele enzymen. Dit laat zien dat de efficiëntie van de aktivatie van het enzym afhangt van de flexibiliteit in de structuur, en de conformationele toestand van het eiwit. Verschuivingen in de vibratiefrequentie van de Pchlide C=O groep, voor Pchlide gebonden aan het eiwit en in oplossing geven aan dat de residuen in het eiwit in de nabijheid van PChlide sterke waterstofbruggen vormen met Pchlide, en mogelijk is dit een essentiële factor voor de katalyse. De katalyse in geactiveerde enzymen start met de bi-fasische vorming van een intermediair in de aangeslagen toestand, I675*, met effectieve snelheden van $\sim (4 \text{ ps})^{-1}$ en $(180 \text{ ps})^{-1}$, deze intermediair wordt geconverteerd in het eindproduct Chlide met een $\sim 30\%$ efficiëntie. De formatiesnelheden van I675* hebben beiden een kinetisch isotoop effect wat aangeeft dat protonen betrokken zijn bij deze reactie.

Om de dynamica van PChlide in het enzym beter te begrijpen, hebben we de intrinsieke aangeslagen toestandsdynamica van PChlide in verscheidene oplosmiddelen bestudeerd. Hiertoe hebben we oplosmiddelen met verschillende elektron en proton donerende eigenschappen gebruikt. Metingen van de ultrasnelle absorptieverschilsignalen in het zichtbare en midinfrarode deel van het spectrum, en van de fluorescentie emissie signalen, van Pchlide in tetrahydrofuran, methanol, gebufferde en puur water oplossingen, maken duidelijk hoe de lokale omgeving de dynamica van de aangeslagen toestand beïnvloedt. Deze resultaten vormen de tweede helft van dit proefschrift en worden beschreven in **hoofdstukken 5, 6, 7**.

De experimenten laten zien dat er een duidelijk verschil is in de optische spectra en de dynamica wanneer het Pchlide in geaggregeerde toestand is. De verschillende aspecten van Pchlide in monomere toestand worden beschreven in **hoofdstuk 5**. In organische oplosmiddelen heeft de Pchlide aangeslagen toestand een levensduur van een paar nanoseconde, waarna het vervalt naar de triplet toestand met een quantum opbrengst van 23%, of de grondtoestand. In de aangeslagen toestand (AT) vermindert de gestimuleerde emissie, hetgeen we toeschrijven aan het verminderen van het overgangsdipoolmoment ten gevolge van solvatie van de AT, die een gemengd intern ladingsoverdrachtskarakter heeft⁽⁴¹⁾, in een toestand met een nog sterker ladingsoverdrachtskarakter. De dynamica en spectrale eigenschappen van Pchlide in methanol blijken erg te lijken op die van Pchlide in het inactieve POR enzym. Dus, in het enzym kan de intrinsieke dynamica van Pchlide duidelijk onderscheiden worden van de spectrale dynamica ten gevolge van de katalytische reactie. De intermediair I675* wordt niet gevormd in oplossing, maar uitsluitend in het enzym. Aanvankelijk suggereerden we dat de vorming van I675* het gevolg was van het vormen van een sterk waterstofbrug gebonden complex (in hoofdstuk 2). Als we de resultaten gemeten aan het Pchlide in oplossing en in het enzym tezamen nemen, en rekening houden met het feit dat er een KIE is voor de vorming van I675* is het echter waarschijnlijker dat I675* correspondeert met de proton transfer reactie van de tyrosine donor naar Pchlide (hoofdstuk 3).

Hoofdstukken 6 en 7 geven een gedetailleerde beschrijving van de spectroscopische signatuur en dynamica van Pchlide in water. Uit de niet-lineaire verzadiging van het tijdsafhankelijke absorptieverschilsignaal als functie van de laserpulsenergie blijkt dat Pchlide in water aggregaten vormt met een gemiddelde grootte van vier moleculen, dientengevolge bepalen excitonische interacties tussen de Pchlide moleculen de optische eigenschappen. In hoofdstuk 7 worden de veranderende spectrale eigenschappen als de excitatiedichtheid toeneemt, gemodelleerd in termen van de populatie van de multi-exciton manifolds van een excitonisch gekoppelde lineaire keten van parallel georiënteerde Pchlide moleculen. Een kwantitatieve simulatie van de data laat zien dat de exciton toestanden worden bevolkt tot aan de 4-exciton toestand. Het verval van het multi-exciton manifold is relatief langzaam (in de orde van 10 ps), daarom suggereren we dat de exciton toestanden gekoppeld zijn met toestanden waarin er een gedeeltelijke ladingsscheiding plaats heeft gevonden (aangegeven met CTS), in overeenstemming met de resultaten beschreven in hoofdstuk 5. De vorming van een CTS toestand is een intrinsieke eigenschap van Pchlide, en in oplosmiddelen met protonen gebeurt dit tezamen met een versterking van de waterstofbruggen. Het is duidelijk dat in ieder geval de keto C=O groep in Pchlide betrokken is bij deze waterstofbruggen, zowel in oplosmiddelen als in het eiwit, en dat de versterking van deze bruggen en de CTS solvatie gecorreleerde gebeurtenissen zijn. Op verschillende plekken in dit proefschrift wordt de mogelijkheid besproken dat het CTS karakter van de Pchlide aangeslagen toestand belangrijke factoren zijn voor het triggeren van de eiwit conformationele veranderingen en voor het initiëren van de proton en elektron transfer reacties.

We concluderen dat de gezamenlijk analyse van een verscheidenheid aan spectroscopische meetgegevens heeft geleid tot een beter begrip van de katalytische reductieprocessen in het POR enzym complex op een picoseconde tijdschaal, en in het bijzonder heeft geleid tot het identificeren van de speciale rol van het eiwit in deze. De resultaten beschreven in dit proefschrift creëren een solide basis voor toekomstig werk, dat zal leiden tot een volledige identificatie van de reactiepaden, de intermediaire toestanden en de structurele veranderingen die ten oorsprong liggen aan de aktivatie van het eiwit. Het aantonen van het feit dat het POR enzym geactiveerd wordt door licht, en licht nodig heeft voor katalyse maken van POR een uniek en belangrijk modelsysteem voor het bestuderen van de rol van eiwit conformationele dynamica in activiteit. Bovendien zijn de resultaten gerapporteerd voor de Pchlide aggregaten relevant voor het begrijpen van de optische eigenschappen en dynamica van fotosynthetische complexen.