

SAMENVATTING

De inhoud van dit proefschrift is gebaseerd op single-molecule spectroscopie experimenten en heeft als doel om de kloof tussen geïsoleerde lichtopvangscomplexen (LHC's) met slechts een klein (10-20) aantal chlorofyl moleculen en een heel fotosysteem II met vele honderden aangesloten pigmenten te overbruggen. De fotofysica van individuele fotosynthetische complexen werd onderzocht met betrekking tot het omgeving en de structurele rangschikking. De geïmplementeerde meettechnieken bestrijken een breed tijdsbereik van picoseconden tot seconden.

Fotosynthetische pigment-eiwitcomplexen van planten zijn integrale membraaneiwitten en worden daarom meestal geïsoleerd in detergens micellen om ze van een hydrofobe interface te voorzien en om aggregatie te voorkomen. Het fluorescentie verval van een trimeer LHCII-complex in een dergelijke detergent omgeving wordt gepresenteerd en toegelicht in hoofdstuk 2. De dominante fluorescentie levensduur van ongeveer 3,5 ns is gelijk aan de langzaamste levensduur component in ensemble metingen. Het verval bevat verder een snelle levensduur component van ongeveer 35 ps die wordt geassocieerd met een significante bijdrage van singlet-triplet annihilatie. Het bi-exponentieel verval wordt kwantitatief verklaard door een stochastisch model dat het schakelen tussen een singlet toestand en een of meerdere triplet toestanden beschrijft.

Fotosynthetische complexen kunnen ook worden geïsoleerd door styreenmaleïnezuur (SMA), zoals aangetoond in hoofdstuk 3. Dit SMA copolymeer lost nanodisk deeltjes op die een eiwitcomplex in zijn natuurlijke lipiden omgeving bevatten. De verkregen resultaten tonen de succesvolle isolatie van trimeer complexen in SMA-nanodisks aan en bevestigen de trimeer structuur als een native configuratie. De overlevingstijd van complexen voordat zij kapot gaan is verhoogd in SMA in vergelijking met detergens. Dit kan verklaard worden door een stabiliserend effect van co-gezuiverde lipiden in SMA-nanodisks. Vergelijking van de spectroscopische eigenschappen van LHCII-complexen in detergent en SMA-nanodisks levert informatie op over het effect van de natuurlijke omgeving voor de functie van lichtopvangscomplexen. LHCII in SMA-nanodisks vertoont ook een fluorescentie levensduur van 3,5 ns die overeenkomt met met geïsoleerd detergent complexen, maar is langer dan de 2 ns die doorgaans wordt gevonden in native thylakoid structuren. De conformatie en energetische flexibiliteit van deze complexen in zowel detergent als ook SMA-

nanodisks kan direct worden waargenomen door het grote dynamisch bereik van gedeeltelijk gedoofde complexen. Dit is verdere onderbouwing voor de hypothese dat fluorescentie knippen, dat wil zeggen de significante veranderingen in fluorescentie intensiteit als gevolg van conformationele veranderingen, een intrinsieke eigenschap is van LHCII, die betrokken kan zijn bij overtollige energie dissipatie in lichtopvangprocessen van planten.

De dubbele functie van LHC-complexen (lichtopvang en fotoprotectie) is uitgebreid bestudeerd in detergent micellen en ensemble experimenten hebben aangetoond dat de eigenschappen van LHC-complexen verschillen in een lipide omgeving. Door een combinatie van ensemble en single-molecule metingen worden de fluorescentie kenmerken van LHC's in liposomen (een bolvormige blaasje, bestaand uit een lipide schil rond een waterige kern) onderzocht in hoofdstuk 4 met betrekking tot het aantal LHC-complexen per liposoom. Dit experiment toonde aan dat de eigenschappen van individuele LHC's vergelijkbaar blijven met die in detergens, in overeenstemming met de resultaten van LHC's in SMA-nanodisks. Echter, clustering van meerdere LHC's binnen een liposoom leidt tot fluorescentiedoving en de fluorescentie levensduur neemt af met een toenemende dichtheid van LHC's. De waarschijnlijke interpretatie is dat eiwit interacties van LHC complexen en de mate van verdringing de fluorescentie levensduur moduleren. Een interessante vraag is of en hoeveel LHC's worden gedoofd als gevolg van clustering. Een ander intrigerend resultaat was de monomerisatie bij laag eiwit/lipide ratio's die verwijst naar de invloed van membraankromming op de structurele integriteit van LHCII trimeren of zelfs grotere eiwitcomplexen.

Hoofdstuk 5 is een excursie in de elektronische eigenschappen van monomere LHCII complexen. De gereconstitueerde mutant LHCII-A2, die geen Chls *a611* en *a612* van het gekoppelde Chl cluster *a610-a611-a612* bindt, vertoont twee overlappende fluorescentiebanden, waarvan de relatieve verhouding afhankelijk is van de temperatuur. De verstoring van de Chl-trimeer resulteert in een verhoogde gevoeligheid van het energielandschap. Exciton-delokalisering in de wild-type configuratie vermindert de invloed van statische wanorde en zorgt zo voor een goede energieoverdracht tussen LHC's. De gevestigde verklaring voor het moleculaire mechanisme in NPQ is dat vormveranderingen in antenne complexen verval kanalen openen. Knippen van fluorescentie wordt waarschijnlijk door hetzelfde of een vergelijkbaar mechanisme veroorzaakt. Een andere manier om de natuurlijke functie van het thylakoid membraan tenminste gedeeltelijk te benaderen is om individuele fotosysteem II deeltjes te meten die meerdere antenna complexen en twee reactie centra bevatten (zie hoofdstuk 6). De gemiddelde excitatie levensduur van ongeveer 100-150 ps kan

worden verklaard door meerdere gedoofde LHC's, wat in overeenstemming is met SMS resultaten op geïsoleerde antennes. De waargenomen omkeerbaar en licht-geïnduceerde veranderingen van de gemiddelde levensduur en de bijbehorende veranderingen in de fluorescentie-intensiteit op een milliseconde tijdschaal laten direct zien hoe fluctuerende LHC's de lichtopvang van fotosynthese in planten kunnen reguleren. De beschreven experimenten kunnen worden gebruikt om wiskundige modellen te bouwen in een bottom-up benadering, die vervolgens op grotere en volledig geassembleerde systemen kunnen worden getest. Ze demonstreren ook duidelijk de algemene eigenschap van biologische systemen om hetzelfde effect voor verschillende doeleinden te gebruiken: LHC's zijn nanodeeltjes die de energie door de absorptie van zonlicht optimaal en efficiënt naar de RC doorgeven. De belangrijkste eigenschappen zijn een lange levensduur van elektronische excitaties op de dicht op elkaar gepakte pigmenten in een eiwit omgeving en hun efficiënte energie-overdracht zonder aanzienlijke verliezen. Tegelijkertijd biedt hun conformationele flexibiliteit de mogelijkheid om energiedissipatie kanalen te induceren voor lichtbescherming op een omgeving gecontroleerde manier.