

Disassembly and Reassembly of the Manganese Complex of Photosystem II



Inaugural-Dissertation
to obtain the academic degree
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
Submitted to the Department of Biology, Chemistry and Pharmacy
of Freie Universität Berlin

by
Marcos Patricio Barra Cabello
From Valparaíso, Chile

November 2007

1st Reviewer: Prof. Dr. H. Dau

2st Reviewer: Prof. Dr. W. Saenger

Date of defence: 20 Dec 2007

*A Ina y Anatole
construyendo un mañana con esperanzas...
...Quién dijo que todo está perdido...?*

ABSTRACT

Light is essential for photosynthetic oxygen evolution not only as a source of energy to oxidize water, but also as a stimulus to activate the system for oxygen evolution. The water oxidizing complex of chloroplast photosystem II (PSII) is located on the luminal side of the thylakoid membrane, where it performs the decomposition of water into molecular oxygen, protons and electrons. The active site is composed of a Mn_4Ca cluster that can accumulate four oxidizing redox equivalents. These are 'neutralized' through the oxidation of two water molecules. The precise organization of the Mn_4Ca cluster and its association with the PSII polypeptides are still under debate.

The present work includes the results of recent experimental studies on disassembly and reassembly of the Manganese complex (Mn complex) in PSII and their biological implications. Combining a variety of biochemical and biophysical methods enabled me to examine in detail the intermediate states of both processes. By employing a trigger event characterized by a stepwise increase in temperature (temperature jump to 47°C) it was possible to initiate a relatively slow and stepwise disassembly of the Mn complex of PSII, involving several distinct intermediates.

By combining oxygen polarography, X-ray absorption spectroscopy (XAS) at the Mn K-edge, electron paramagnetic resonance (EPR), atomic absorption spectroscopy (AAS) and recombination chlorophyll fluorescence techniques, it was shown that the heat-induced disassembly process involves at least three steps. (1) The first most rapid step occurs within ~5 min and is coupled to the release of the extrinsic protein with 18 kDa molecular weight from PSII; circumstantial evidence suggested that concomitantly the affinity of the essential Ca^{2+} ion which is bound at the Mn complex is lowered, leading to the observed inactivation of oxygen evolution. (2) In a second step, two Mn ions are reduced to Mn^{II} and released from their binding sites into the bulk within ~15 min; the remaining binuclear complex contains two Mn^{III} ions connected by a di- μ -oxo bridge. (3) The third step occurs only within hours and leads to the reduction and liberation of the remaining two Mn ions as Mn^{II} whereby apo-PSII with an empty Mn/Ca site is formed.

The second part of this work includes the results obtained on the photoassembly process of the Mn_4Ca complex. The complex spontaneously is assembled in the light; a process denoted as photoactivation. Recovery of oxygen evolution activity after photoactivation was monitored by O_2 -polarography and delayed chlorophyll fluorescence measurements, starting from various states as obtained by the previous heat treatment. Oxidation state and

structural features of the intermediates of the Mn complex during photoactivation were assayed by X-ray absorption spectroscopy at the Mn K-edge. The Mn^{III}_2 complex obtained after ~ 15 min of heating and apo-PSII with an empty Mn/Ca site present after 2 h of heating effectively could be photoactivated to form the O_2 -evolving tetra-Mn complex within ~ 40 min in the presence of stoichiometric amounts of two and four respectively exogenous Mn^{II} ions per PSII. Starting with apo-PSII, a lag-phase of about 5 min duration was detected in the recovery of O_2 activity during photoactivation. Within this lag phase a similar semi-stable Mn^{III}_2 complex is created as obtained after ~ 15 min of heating. Therefore, the $\text{Mn}^{\text{III}}_2(\text{di-}\mu\text{-oxo})$ state is a key intermediate both in the assembly and disassembly of the Mn complex.

ZUSAMMENFASSUNG

Licht ist essentiell sowohl als Energieressource für die photosynthetische Wasseroxidation als auch als Stimulus für die Aktivierung des Sauerstoffbildungssystems. Der Wasseroxidationskomplex des Photosystems II (PSII) auf der Lumenseite der Thylakoidmembran im Chloroplasten spaltet Wasser in molekularen Sauerstoff, Protonen und Elektronen. Der Mn_4Ca -Komplex des aktiven Zentrums kann vier oxidierende Redoxäquivalente akkumulieren, die simultan durch die Oxidation zweier Wassermoleküle neutralisiert werden. Der genaue Aufbau des Mn_4Ca -Komplexes und seine Assoziierung mit den PSII Polypeptiden werden noch kontrovers diskutiert.

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Ergebnisse experimenteller Untersuchungen zur Disassemblierung und zur Assemblierung des Mangankomplexes (Mn Komplex) im PS II. Die Kombination vielfältiger biochemischer und biophysikalischer Methoden ermöglichte detaillierte Untersuchungen der intermediären Stadien beider Prozesse. Durch die Anwendung einer Temperaturerhöhung (Temperatursprung auf 47°) wurde es möglich, die relative langsame schrittweise Zerlegung des Mn Komplexes im PS II zu studieren, wobei verschiedene Intermediatzustände auftreten.

Zunächst wurden die Inaktivierung und der schrittweise Abbau des Mn-Komplexes durch Erwärmung auf 47°C für ansteigende Zeitintervalle untersucht. Die Wärmebehandlung wurde gewählt, um den normalerweise langsamen Abbauprozess des Mn Komplexes zu beschleunigen und klar vom Abbauprozessen der PSII-Proteine abzugrenzen. Durch die kombinierte Anwendung von Polarographie, Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS) an der Mn K-Kante, Paramagnetisches Elektronen resonanz (EPR), Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) und Rekombinations-Chlorophyll-Fluoreszenztechniken konnte gezeigt werden, dass beim wärmeinduzierten Abbau mindestens drei Schritte ablaufen. (1) Der schnellste Schritt ereignet sich innerhalb von fünf Minuten und ist an die Freisetzung des extrinsischen 18 kDa Proteins des PSII gekoppelt. Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass gleichzeitig die Affinität des essentiellen Ca^{2+} Ions am Mn Komplex reduziert wird und zu der beobachteten Inaktivierung der Sauerstoffbildung führt. (2) In einem zweiten Schritt, werden innerhalb von fünfzehn Minuten zwei Mn Ionen zu Mn^{II} reduziert und aus ihrer Bindung gelöst: der verbleibende binukleare Komplex beinhaltet zwei über eine di- μ -oxo Brücke verbundene Mn^{III} Ionen. (3) Der dritte Schritt erfolgt erst nach Stunden und führt zur Reduktion und Freisetzung der verbleibenden beiden Mn Ionen als Mn^{II} , wobei sich der apo-PSII mit einer leeren Mn/Ca Bindungsstelle bildet.

Der zweite Teil dieser Arbeit beinhaltet die Ergebnisse zur Assemblierung des Mangankomplexes. Der Aufbau erfolgt im Licht durch die sogenannte Photoaktivierung. Ausgehend von den durch Temperatursprung erhaltenen Intermediaten wurde die Wiederherstellung der Sauerstoffbildungsaktivität nach Photoaktivierung durch Sauerstoffpolarographie und Messungen der verzögerten Fluoreszenz beobachtet. Der Oxidationszustand und strukturelle Eigenschaften der Intermediate des Mn Komplexes wurden mit Röntgenabsorptionsspektroskopie an der Mn K-Kante untersucht. Sowohl der nach ca. fünfzehn Minuten Wärmebehandlung erzeugte Mn^{III}_2 Komplex als auch das nach zweistündiger Wärmebehandlung erzeugte apo-PSII mit leerer Mn/Ca Bindungsstelle konnten zum sauerstoffbildenden Mn Komplex innerhalb von ca. vierzig Minuten bei Anwesenheit stoichiometrischer Mengen von zwei bzw. vier exogenen Mn^{II} Ionen pro PSII photoaktiviert werden. Ausgehend vom apo-PSII wurde eine Verzögerung von ca. fünf Minuten bis zur Wiederherstellung der Sauerstoffbildungsaktivität durch Photoaktivierung beobachtet. In dieser Verzögerungsphase wurde ein semi-stabiler Mn^{III}_2 Komplex gebildet. Ein ähnlicher Komplex entsteht auch nach ca. fünfzehn Minuten Wärmebehandlung. Das $\text{Mn}^{\text{III}}_2(\text{di-}\mu\text{-oxo})$ Stadium ist also ein Schlüsselintermediat sowohl im Abbau- als auch im Photoaktivierungsprozess des Mangankomplexes.

TABLE OF CONTENTS

ABSTRACT.....	i
ZUSAMMENFASSUNG	iii
TABLE OF CONTENTS	v
LIST OF ABBREVIATIONS	vii
1 INTRODUCTION.....	1
1.1. Photosynthesis.....	1
1.2 Photosystem II	5
1.3 Disassembly of the Mn complex of PSII by elevated temperatures.	22
1.4 Assembly of the Catalytic Manganese Cluster in PSII.....	25
1.5 Objectives of this thesis	29
2 MATERIALS AND METHODS.....	30
2.1 Buffers.....	30
2.2 Preparative procedures	30
2.2.1 Isolation of Oxygen-Evolving PSII-enriched membranes.....	30
2.2.2 Betaine-effect in PSII membrane particles.....	31
2.2.3 Depletion of extrinsic polypeptides (18 and 23 kDa).....	31
2.2.4 Extraction of Manganese from PSII.....	31
2.2.5 Extraction of the functional Calcium from PSII (Citrate wash).....	32
2.2.6 Disassembly of PSII by a temperature jump (heat treatment)	32
2.2.7 Heat treatment of multilayer samples.....	34
2.2.8 Heat treatment of PSII membranes in solution.....	34
2.2.9 Photoactivation	34
2.3 Analytical Methods.....	36
2.3.1 Chlorophyll determination.....	36
2.3.2 Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamid Gel Electrophoresis.....	36
2.3.3 Densitometry analysis.....	37
2.3.4 Oxygen evolution measurements	38
2.3.5 Western Blotting	38
2.3.6 Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy (GF-AAS).....	40
2.3.7 Delayed fluorescence measurements.....	40
2.3.8 EPR Spectroscopy.....	41
2.3.9 XANES and EXAFS measurements	41

3 RESULTS.....	43
3.1 Heat-induced disassembly of the manganese complex of PSII.....	43
3.1.1 Deactivation of O ₂ -evolution capacity by the heat treatment.....	43
3.1.2 Effects of glycinebetaine on the heat treatment	44
3.1.3 Effects of the heat treatment on the extrinsic polypeptides.....	45
3.1.4 Delayed fluorescence experiments in heated-samples.....	48
3.1.5 Manganese released from its binding site monitored by EPR spectroscopy.....	52
3.1.6 Quantification of Mn by Atomic Absorption Spectroscopy (AAS)	54
3.2 Assembly by photoactivation after thermally accelerated disassembly of the manganese complex of PSII	55
3.2.1 Photoactivation starting at various disassembly stages.	56
3.2.2 Kinetics of photoactivation in previously heated samples.....	59
3.2.3 Mn requirement for reassembly of the Mn ²⁺ complex.....	61
3.2.4 Stability of the Mn ²⁺ intermediate of photoactivation.	62
3.2.5 DF measurements confirm intermediate formation.....	63
3.2.6 X-ray absorption spectroscopy	65
4. CONCLUSIONS	69
5. REFERENCES	72
6. ACKNOWLEDGMENT.....	85
7. LIST OF PUBLICATIONS	87
8. CURRICULUM VITAE	89
9. APPENDICES.....	91

LIST OF ABBREVIATIONS

AAS	atomic absorption spectroscopy
ADP	adenosine diphosphate
APS	ammonium persulfate
ATP	adenosine triphosphate
BioXAS	x-ray absorption spectroscopy of biological samples
BSA	bovine serum albumin
Chl	chlorophyll
DMSO	dimethyl sulfoxide
DCMU	3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EPR	electron paramagnetic resonance
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
EXAFS	extended x-ray absorption fine structure
FT	fourier transformation
HEPES	N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(ethane sulfonic acid)
kDa	kilodalton
LHC	light harvesting complex
LHCII	light harvesting complex of PSII
MES	2-(N-morpholino)ethane sulfonic acid
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
OEC	oxygen evolving complex
P680	the primary electron donor of photosystem II
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PPBQ	phenyl-p-benzoquinone
PSI	photosystem I
PSII	photosystem II
PVC	polyvinyl chloride
PVDF	polyvinyl difluoride
Q _A	primary quinone electron acceptor molecule in PSII
Q _B	secondary quinone electron acceptor molecule in PSII
RT	room temperature
SDS	sodium dodecyl sulfate
S _i	oxidation state of the OEC with i=number of oxidant equivalents (i= 0..4)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
Tris	tris(hydroxymethyl) amino methane
XANES	x-ray absorption near edge spectroscopy
XAS	x-ray absorption spectroscopy
Tyr _D or Y _D	redox active tyrosine 160 of the D2 polypeptide of PSII
Tyr _Z or Y _Z	redox active tyrosine 161 of the D1 polypeptide of PSII