

## Zusammenfassung

Photosynthese ist ein Prozess in Pflanzen und einigen Bakterien, bei dem Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt wird. In der Bruttoreaktion wird ein Elektronendonator  $H_2X$  (z.B.  $X = O$  oder  $S$ ) oxidiert und seine Elektronen auf  $CO_2$  übertragen, wobei sich Kohlenhydrate und  $X_2$  bilden. In Bakterien fungieren häufig  $H_2S$  oder organische Verbindungen als Elektronendonator. Höheren Pflanzen und Algen sind dagegen in der Lage,  $H_2O$  zu oxidieren, das auf der Erde im Überfluß vorkommt. Das photosynthetische Reaktionssystem besteht aus zwei getrennt ablaufenden Prozessen: die Licht- und Dunkelreaktion. Bei der Lichtreaktion, die in der Thylakoidmembran stattfindet, wird die Energie von Photonen dazu verwendet, um  $H_2O$  zu oxidieren sowie ATP und NADPH zu bilden. In der Dunkelreaktion wird Energie und Reduktionspotenzial, in Form von ATP bzw. NADPH, für die Synthese von Kohlenhydraten genutzt. Sie verläuft im Stroma, räumlich getrennt von der Lichtreaktion.

Die Photochemie der Lichtreaktion findet in einem Membranprotein statt, dem photosynthetischen Reaktionszentrum (reaction center, RC). Das RC der Purpurbakterien (bacterial reaction center, bRC) ist eines der best untersuchten Systeme. Daneben besitzen Cyanobakterien und höhere Pflanzen in der Thylakoidmembran zwei photosynthetische Protein-Pigment-Komplexe, die Photosystem I (PSI) und Photosystem II (PSII) genannt werden. Beide Reaktionszentren bilden eine Kette von redoxaktiven Kofaktoren mit jeweils unterschiedlichen Redoxpotenzialen, entlang derer Elektronentransfer (ET) Prozesse stattfinden. Das bRC ist in seiner Struktur dem PSII ähnlich, denn beide enthalten vier Chlorophyll-, zwei Pheophytinmoleküle, ein Nicht-Häm-Eisenkomplex (Fe-Komplex) und zwei Chinonmoleküle (ein primäres  $Q_A$  und ein sekundäres  $Q_B$ ). Dagegen finden sich im PSI sechs Chlorophyllmoleküle, zwei Chinone und drei Eisen-Schwefelzentren. In dieser Arbeit wurden die Protonierungszustände titrierbarer Residuen und die Mittelpunktspotenziale ( $E_m$ ) der redoxaktiven Gruppen im bRC, PSI und PSII berechnet, um die Energetik und Mechanismen der ET/PT-Vorgänge im RC zu untersuchen. Die Ergebnisse basieren auf Lösungen der linearen Poisson-Boltzmann-Gleichung (LPB-Gleichung) für alle Atome der verwendeten Kristallstrukturen, die unter immer gleichen Simulationsbedingungen erhalten wurden.

Es wurden die  $E_m$  für die Chinone im bRC (Ishikita et al., 2003; Ishikita and Knapp, 2004, 2005e), PSI (Ishikita and Knapp, 2003) und PSII (Ishikita and Knapp, 2005e) berechnet. Eine Flip-Flop-Wasserstoffbrücke wurde am Ser-L223 entdeckt, deren Orientierung vom Redoxzustand des  $Q_B$  und Protonierungszustand des Asp-L213 abhängt (Ishikita and Knapp, 2004). Der Flip-Flop-Mechanismus wurde als geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der ET-Reaktion von  $Q_A^-$  zu  $Q_B$  im bRC (Graige et al., 1998) vorgeschlagen, was in jüngsten ENDOR- (Paddock et al., 2005) und FTIR-Studien (Nabedryk et al., 2005) experimentell bestätigt werden konnte. Eine äquivalente Flip-Flop-Wasserstoffbrücke wurde auch im PSII zwischen D1-Ser264 und  $Q_B$  identifiziert, die einen gemeinsamen Gating-Mechanismus in Bakterien und höheren Pflanzen nahe legt. Dieser Mechanismus ist wahrscheinlich wegen seiner funktionalen Bedeutung im Laufe der Evolution konserviert worden.

Der ET von  $Q_A^-$  auf  $Q_B$  ist mit einem Protonentransfer (PT) auf  $Q_B$  über einen Cluster titrierbarer Gruppen entlang von Wasserkanälen gekoppelt. Metallbindung oder Mutation am Eintrittspunkt des aus einem Cluster titrierbaren Gruppen bestehenden Protonenkanals inhibieren den PT-Schritt. Die  $pK_a$ -Werte der titrierbaren Gruppen in den Protonenkanälen wurden berechnet, und es konnte gezeigt werden, dass gebundene

Metallionen Konformationsänderungen in ihren Seitenketten induzieren, die ihre  $pK_a$ -Werte beeinflussen (Ishikita and Knapp, 2005c). Die Konformationsänderungen pflanzen sich in einem „Domino-Effekt“ über die titrierbaren Gruppen des Protonenkanals fort (Sebban et al., 1995b). In der gleichen Arbeit wurde überraschend ein sehr geringer direkter elektrostatischer Beitrag der positiven Ladung auf dem Metallion zur  $pK_a$ -Änderung festgestellt (Ishikita and Knapp, 2005c). Derselbe Mechanismus liegt dem  $pK_a$ -Shift zugrunde, der durch Mutationen von Residuen entlang des Protonenkanals induziert wird (Ishikita and Knapp, 2005b).

Es konnte gezeigt werden, dass die große  $E_m$ -Differenz von  $\sim 410$ - $430$  mV zwischen den Chinonen des bRC/PSII und denen des PSI aus der Ladungsdifferenz zwischen dem Eisenzentrum bzw. dem Eisen-Schwefel-Zentrum ( $F_X$ ) im PSI herrührt (Ishikita and Knapp, 2003). Darüber hinaus wurde der elektrostatische Einfluss der Residuen im Protein auf die Redoxpotenziale der Chinone (Ishikita and Knapp, 2003) und von  $F_X$  (Ishikita et al., 2006) im PSI berechnet.

Die Funktion des Eisenkomplexes im bRC und PSII ist bis heute ungeklärt. In PSII ist der Eisenkomplex redoxaktiv, dessen Oxidation die Deprotonierung unbekannter Residuen bewirkt. Es konnten mehrere titrierbare Gruppen identifiziert werden, deren Deprotonierung durch die Oxidation des Eisenkomplexes ausgelöst wurde (Ishikita and Knapp, 2005d). Wird der Eisenkomplex aus dem bRC entfernt, verringerte sich das berechnete Redoxpotenzial von  $Q_A$  (Ishikita and Knapp, 2005f). Dies passt zu spektroskopischen Ergebnissen, welche die Entstehung von Triplettzuständen im bRC, das kein Eisenzentrum enthält, belegen (Debus et al., 1986; Kirmaier et al., 1986).

Bei der Wasseroxidation am Mangan-Cluster (Mn-Cluster) im PSII werden Protonen gebildet, die zur Produktion chemischer Energie genutzt werden, während molekularer Sauerstoff als Abfallprodukt in die Atmosphäre abgegeben wird. Eine Kette polarer Residuen schließt sich beginnend mit D1-Asp61 am Mangan-Cluster an, der sich über  $15 \text{ \AA}$  bis an die zum Lumen gewandte Oberfläche erstreckt und als möglicher Protonenkanal in Frage kommt (Ferreira et al., 2004). Entlang des vermuteten Protonenkanals steigen die berechneten  $pK_a$ -Werte der enthaltenen titrierbaren Residuen in monotoner Weise von innen nach außen an (Ishikita et al., 2005d).

Eines der größten ungelösten Rätsel ist der  $E_m$ -Unterschied von ca.  $600$ - $700$  mV zwischen den Chlorophyllmolekülen im bRC ( $+500$  mV (Ivancich et al., 1998)), PSI ( $+500$  mV (Brettel, 1997)) und PSII ( $+1200$  mV (Rappaport et al., 2002)). In früheren Arbeiten wurde das Redoxpotenzial der Chlorophylle im PSII zu  $1200$ - $1300$  mV berechnet (Ishikita and Knapp, 2005a; Ishikita et al., 2005b). Kürzlich konnten wir die  $E_m$ -Differenz von  $600$  mV zwischen bRC/PSI und PSII auf die Anwesenheit des Mangan-Clusters, die räumliche Lage der Chlorophylle und eine andere Struktur der dem Lumen und Periplasma zugewandten Helices im PSII zurückführen.

Eine hohe lokale Konzentration von oxidierten, positiv geladenen Chlorophyllmolekülen begünstigt die Bildung von Singulett-Sauerstoff über Triplett-Zustände des Chlorophylls. Im PSII kann  $Q_A$  zwei verschiedene  $E_m$ -Werte annehmen, die auf verschiedene Konformationen des  $Q_A$  zurückgeführt werden. Diejenige mit dem höheren Redoxpotenzial unterdrückt einen ET vom  $Q_A$  zurück auf Pheophytin und könnte eine Rolle beim Schutz vor der Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies spielen (Krieger and Weis, 1992; Krieger et al., 1995). In Simulationen haben wir die Ausbildung einer Wasserstoff-Brücke zwischen  $Q_A^-$  und D2-Thr217 beobachtet, die das Redoxpotenzial von  $Q_A$  um ca.  $100$  mV erhöht (Ishikita and Knapp, 2005e). Der berechnete  $E_m$ -Wert von  $\beta$ -Carotin in der Nähe des D2-Proteins in PSII ist kompatibel mit der Vorstellung, dass  $\beta$ -Carotin den Transfer des Elektronenlochs von  $P680^+$  auf Cytochrom  $b_{559}$  vermittelt (Ishikita and Knapp, 2005a).

In der jüngsten Kristallstruktur des PSII wurde ein weiteres  $\beta$ -Carotin in der Nähe des D1-Proteins identifiziert (Loll et al., 2005). Obwohl seine Funktion noch unbekannt ist, haben wir basierend auf dem berechneten Redoxpotenzial vorgeschlagen, dass es ebenfalls dem Schutz vor der Bildung reaktiven Singulett-Sauerstoffs dient (Ishikita et al., 2005a).

## Abstract

Photosynthesis is a process in plants and some bacteria, which converts light energy into chemical energy. The net reaction is the oxidation of an electron donor  $H_2X$  (e.g.  $X = O$  and  $S$ ) and the reduction of an electron acceptor  $CO_2$  to yield carbohydrates and  $X_2$ . In bacteria,  $H_2X$  often corresponds to  $H_2S$  or other organic compounds. On the other hand, higher systems such as alga and green plants have advantage to utilize a more abundant electron donor on earth,  $H_2O$ . The photosynthetic reaction machinery consists of two reaction schemes, a light reaction and a dark reaction. The former refers to the oxidation of  $H_2O$  and the synthesis of ATP and NADPH in the thylakoid membrane protein by solar photon energy, while the latter refers to the synthesis of carbohydrate using ATP and NADPH in the stromal side.

In a membrane protein, the photosynthetic reaction center (RC), the initial photochemical event occurs. RC from purple bacteria (bRC) is one of the most carefully studied systems. In cyanobacteria to higher plants there exist two photosynthetic protein-pigment complexes bound in the thylakoid membrane, photosystem I (PSI) and photosystem II (PSII). These two RC provide a cascade of redox potential ( $E_m$ ) levels for electron transfer (ET) processes with redox-active cofactors. bRC has structural similarity with PSII, each of which possess four chlorophylls, two pheophytins, one non-heme iron complex (Fe-complex) and two quinones (the primary  $Q_A$  and the secondary  $Q_B$ ). On the other hand, RC of PSI possesses six chlorophylls, two quinones, and three iron-sulfur centers. To investigate the energetics and reaction mechanisms of ET/PT events in RC, we calculated protonation patterns of titratable residues and  $E_m$  of redox-active groups in bRC, PSI and PSII. To obtain these values, we uniformly applied the same computational conditions and solved the linearized Poisson-Boltzmann (LPB) equation for all atoms in the crystal structures.

We calculated the  $E_m$  of quinones in bRC (Ishikita et al., 2003; Ishikita and Knapp, 2004, 2005e), PSI (Ishikita and Knapp, 2003) and PSII (Ishikita and Knapp, 2005e). We found a flip-flop H bond of Ser-L223, depending on the redox state of  $Q_B$  and protonation state of Asp-L213 (Ishikita and Knapp, 2004). We proposed that this mechanism is responsible for the rate limiting step of the ET kinetics (Graige et al., 1998) from  $Q_A^-$  to  $Q_B$  in bRC, which was experimentally conformed by recent ENDOR (Paddock et al., 2005) and FTIR (Nabedryk et al., 2005) studies. We also found a corresponding flip-flop H bond between D1-Ser264 and  $Q_B$  in PSII, implying the importance of a common gating mechanism for the ET among purple bacteria to higher plants (Ishikita and Knapp, 2005e).

The ET from  $Q_A^-$  to  $Q_B$  is coupled to proton transfer (PT) at  $Q_B$  via a cluster of titratable residues along water channels. Metal binding at the proton entry point of the PT pathway or mutations of these titratable residues often result in inhibition of the PT event. We calculated the  $pK_a$  values of the titratable residues along PT pathways, and found that metal binding induces a shift of the  $pK_a$  values of the titratable residues by reorientation of their side-chains (Ishikita and Knapp, 2005c), which propagates along the PT pathway as a “domino” effect (Sebban et al., 1995b). Here the  $pK_a$  shift from direct electrostatic influence of the metal positive charge was found to be astonishingly

small (Ishikita and Knapp, 2005c). The same mechanism holds true for the change of  $pK_a$  upon mutation of residues along the PT pathway (Ishikita and Knapp, 2005b).

We demonstrated that the large  $E_m$  difference of quinones between bRC/PSII and PSI is mostly due to the charge difference between the Fe-complex in the former and the iron-sulfur center  $F_X$  in the latter, which yields an  $E_m$  difference of ~410-430 mV (Ishikita and Knapp, 2003). We also calculated the electrostatic influence of protein residues on  $E_m$  of quinones (Ishikita and Knapp, 2003) and  $F_X$  (Ishikita et al., 2006) in PSI.

The role of the Fe-complex in bRC and PSII is yet unknown. In PSII, the Fe-complex is redox-active and its oxidation is accompanied by deprotonation of unknown residues. Upon oxidation of the Fe-complex, we observed deprotonation of several titratable residues (Ishikita and Knapp, 2005d). Upon depletion of the Fe-complex in bRC (Fe-depleted bRC) we observed a down-shift of  $E_m(Q_A)$  (Ishikita and Knapp, 2005f), which is consistent with the increase of triplet state formation in Fe-depleted bRC observed in spectroscopic studies (Debus et al., 1986; Kirmaier et al., 1986).

Water oxidation at the Mn-cluster of PSII generates protons needed for the subsequent processes that built up chemical energy, while oxygen released in the atmosphere is a waste product. Connected to the Mn-cluster and starting at D1-Asp61, a channel of polar residues extending towards the luminal surface at a distance of 15 Å may function as a possible proton exit pathway (Ferreira et al., 2004). Along the prospective proton channel, the calculated  $pK_a$  of titratable residues monotonously increase from the Mn-cluster to the luminal bulk side (Ishikita et al., 2005d).

One of the largest riddles yet unsolved is the significant  $E_m$  difference of ~600-700 mV among the RC chlorophylls of bRC (+500 mV (Ivancich et al., 1998)), PSI (+500 mV (Brettel, 1997)) and PSII (+1200 mV (Rappaport et al., 2002)). In our previous work, the  $E_m$  for RC chlorophylls in PSII was calculated to be ~+1200-1300 mV (Ishikita and Knapp, 2005a; Ishikita et al., 2005b). Very recently, we also succeeded to understand the 600 mV  $E_m$  difference between bRC/PSI and PSII, which are due to the Mn-cluster, different positions of chlorophylls along the transmembrane-helices, and different structures of the other luminal/periplasmic helices (Ishikita et al., 2005c).

Accumulation of positively charged chlorophylls leads to the generation of singlet oxygen via chlorophyll triplet states. PSII exhibits two different  $E_m(Q_A)$  values, the low potential form and the high potential form, which are considered to relate to different  $Q_A$  conformers. The latter suppresses the backward ET from  $Q_A^-$  to pheophytin and may thus play a photoprotective role in PSII (Krieger and Weis, 1992; Krieger et al., 1995). We found that an H bond between  $Q_A$  and D2-Thr217 forms in the  $Q_A^-$  state and up-shifts the  $E_m(Q_A)$  by ~100 mV (Ishikita and Knapp, 2005e). The calculated  $E_m$  of  $\beta$ -carotene near the D2 protein of PSII indicates that  $\beta$ -carotene can mediate the electron hole transfer from  $P680^+$  to cytochrome  $b_{559}$  (Ishikita and Knapp, 2005a). The recent crystal structure of PSII determined a position of  $\beta$ -carotene near the D1 protein (Loll et al., 2005). Although the role of this newly found  $\beta$ -carotene is unknown, we proposed a photoprotective role based on the calculated  $E_m$  (Ishikita et al., 2005a).