

How do proteins control cofactor function?  
A Multifrequency Time Resolved ESR study of modified  
Photosystem I complexes.

**Inaugural Dissertation**

**Zur Erlangung der Doktorwürde**

Vorgelegt dem Fachbereich

Biologie, Chemie and Pharmazie

Der Freien Universität Berlin

von Yulia N. Pushkar

aus Primorsko-Achtarsk, Russland

Berlin, im Juni 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2001 bis May 2003 unter Anleitung von Prof. Dr. D. Stehlik im Institut für Experimentalphysik im Fachbereich Physik der Freien Universität Berlin durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. D. Stehlik

2. Gutachter: Prof. Dr. H. H. Limbach

Eingereicht am

Tag der mündlichen Prüfung: 16.7.2003



This thesis is dedicated to the memory of my first scientific advisor Prof. Lunina Elena Vadimovna, Department of Chemistry of the Moscow State University. Her untimely passing away is a great loss to her family, friends and to the scientific community.

**Parts of the following thesis are published:**

1. J. H. Golbeck, Wu Xu, B. Zybailov, A. van der Est, J. Pushkar, S. G. Zech, D. Stehlik, P. Chitnis “Electron Transfer Through the Quinone Intermediate Electron Acceptor in Photosystem I” PS 2001 Proceedings, 12th International Congress on Photosynthesis, Brisbane, CSIRO Publishing, ISBN 0643 06711 6, www.publish-csiro.au/ps**2001**; S6-001
2. A. van der Est, S. Brown, P. Ragogna, J. Pushkar, S. G. Zech, D. Stehlik, P. Chitnis, G. Shen, J. Golbeck “Transient EPR studies of Photosystem I containing non-native quinones” PS 2001 Proceedings, 12th International Congress on Photosynthesis, Brisbane, CSIRO Publishing, ISBN 0643 06711 6, www.publish-csiro.au/ps**2001**; S6-005
3. Yulia N. Pushkar, Stephan G. Zech, Sarah Brown, Art van der Est, Herbert Zimmermann, Dietmar Stehlik “Orientation and protein-cofactor interactions of monosubstituted n-alkyl naphthoquinones in the A<sub>1</sub> binding site of Photosystem I” J. Phys. Chem. B **2002**; *106*(46); 12052-12058
4. Wu Xu, Parag Chitnis, Alfia Valieva, Art van der Est, Yulia N. Pushkar, Macej Krzystyniak, Christian Teutloff, Stephan G. Zech, Robert Bittl, Dietmar Stehlik, Boris Zybailov, Gaozhong . Shen, and John H. Golbeck “Electron Transfer in Cyanobacterial Photosystem I. **I.** Physiological and Spectral Characterization of Site-Directed Mutants in a Putative Electron Transfer Pathway from A<sub>0</sub> through A<sub>1</sub> to F<sub>X</sub>” Journal of Biological Chemistry, **2003**.
5. Wu Xu, Parag Chitnis, Alfia Valieva, Art van der Est, Klaus Brettel, Mariana Guergova-Kuras, Yulia N. Pushkar, Stephan G. Zech, Dietmar Stehlik, Gaozhong Shen, Boris Zybailov, and John H. Golbeck “Electron Transfer in Cyanobacterial Photosystem I. **II.** Determination of Forward Electron Transfer Rates of Site-Directed Mutants in a Putative Electron Transfer Pathway from A<sub>0</sub> through A<sub>1</sub> to F<sub>X</sub>” Journal of Biological Chemistry, **2003**
6. Kev M. Salikhov, Yulia N. Pushkar, John H. Golbeck, Dietmar Stehlik “Interpretation of Multifrequency Transient-EPR spectra of the  ${}^?_{700}{}^+{}^?_0\text{Q}_K^-$  state in Photosystem I Particles using a Sequential Correlated Radical Pair Model: Wild Type *versus* A<sub>0</sub> Mutants.” Applied Magnetic Resonance **2003**
7. Yulia N. Pushkar, Herbert Zimmermann, Dietmar Stehlik “Asymmetric binding of the quinone cofactor in Photosystem I as probed using <sup>13</sup>C labeled naphthoquinones” J. Phys. Chem. B **2003**
8. Xu W., Chitnis P., Valieva A., van der Est A., Pushkar J., Stehlik D., Cohen R, Shen G, and Golbeck J.H. “Analysis of a Methionine to Leucine Mutation of the Ligand to the Primary Electron Acceptor A<sub>0</sub>“ **2003** (in preparation)

9. Boris Zybailov, Yumiko Sakuragi, Gaozhong Shen, Mahir D. Mamedov, Alexey Yu. Semenov, Irina Karygina, Yulia N. Pushkar, Dietmar Stehlik, Bruce A. Diner, Donald A. Bryant and John H. Golbeck "Recruitment of a Foreign Quinone into the A<sub>1</sub> Site of Photosystem I Spectroscopic Evidence for an Endothermic Electron Transfer Step Between Plastoquinone-9 and F<sub>X</sub> in *menA* and *menB* mutants" **2003** (in preparation)

### **Conference contributions:**

1. Julia N. Pushkar, Mikhail Antonkine, John H. Golbeck, Dietmar Stehlik *Control of functional properties of Photosystem I by the protein environment* Boden Research Conference on Artificial Photosynthesis, January 9-11, 2003, Sydney, Australia.
2. Julia N. Pushkar, John H. Golbeck, Art van der Est, Dietmar Stehlik *Multifrequency Time resolved ERP study of Photosystem I A<sub>0</sub> binding site mutants. Evidence for high asymmetrical electron transfer in cyanobacteria.* 31-st Congress Ampere, July 14-19, 2002, Poznan Poland.
3. M. Antonkine, F. Muh, J.N. Pushkar, P. Tian, S. Zech, D. Stehlik *Functional cofactor states in Photosystem I* International Symposium on Protein-Cofactor Interaction 15-17 November, Berlin, Germany 2001
4. Yulia N. Pushkar, John H. Golbeck, S. Zech, D. Stehlik *Tr\_ESR of artificial quinones in the PhQ site of Photosystem I* Priority Program: High-Field ESR in Biology, Chemistry and Physics, 16-19 September, Caputh, Germany 2001

## Contents

### Abstract/Zusammenfassung

<b>1 Introduction</b> .....	1
<b>2 Photosystem I</b> .....	5
2.1 Structure of PS I.....	5
2.2 Function of PS I.....	8
2.2.1 P <sub>700</sub> primary donor.....	9
2.2.2 A <sub>0</sub> primary acceptor.....	11
2.2.3 Phylloquinone secondary acceptor.....	12
2.2.4 Protein induced asymmetric spin density distribution over the phylloquinone.....	14
2.2.5 Electron transfer to external electron carriers.....	15
<b>3 Phylloquinone exchange in PS I</b> .....	17
3.1 <i>Biosynthetic pathway mutants</i> .....	17
3.2 <i>In vivo</i> and <i>in vitro</i> quinone substitution in the biosynthetic pathway mutants.	20
3.3 Quinone substitution after organic solvent extraction of native phylloquinone.	21
<b>4 Theory of spin correlated radical pairs</b> .....	23
4.1 Hamiltonian for the two-spin system.....	23
4.2 Eigenvalues and eigenstates of the system.....	24
4.3 Transition frequencies and intensities.....	27

4.4 Theoretical description of consecutive radical pairs.....	29
<b>5 Materials and Methods.....</b>	<b>31</b>
5.1 Material.....	31
5.2 Quinones.....	31
5.3 Preparation of Photosystem I samples with artificial quinones.....	33
5.3.1 Quinone reconstitution into PS I after organic solvent extraction.....	33
5.3.2 Substitution of plastoquinone –9 in the PS I trimers isolated from the <i>menB</i> mutant.....	34
5.4 Time resolved EPR spectroscopy.....	37
5.5 Pulsed ENDOR studies of the $P_{700}^+A_1^-$ state.....	39
5.6 Electron transfer kinetics from phylloquinone to iron-sulphur clusters.....	41
5.7 Room Temperature Transient EPR measurements.....	42
5.8 Selective point mutagenesis in PS I protein complex.....	42
<b>Results.....</b>	<b>45</b>
<b>Part A: Photosystem I with artificial quinones.....</b>	<b>45</b>
<b>6 Orientation and protein-cofactor interactions of monosubstituted n-alkyl naphthoquinones in the <math>A_1</math> binding site of Photosystem I.....</b>	<b>47</b>
6.1 General strategy.....	47
6.2 Test of functionality of PS I particles after $A_1$ extraction / substitution.....	50
6.3 PS I containing 2- alkyl NQ derivatives.....	53

6.4 Orientation of alkyl NQ's in A <sub>1</sub> site.....	56
6.5 Evaluation of hyperfine coupling.....	60
6.6 Influence of asymmetric substitution on quinone binding in PS I.....	63
7 Asymmetric binding of the quinone cofactor in Photosystem I as probed using <sup>13</sup> C labelled quinones.....	67
7.1 Efficiency of quinone replacement.....	67
7.2 TR-EPR investigation of PS I contained <sup>13</sup> C label 2-methyl-1,4- naphthoquinones.....	68
7.3 <sup>13</sup> C hyperfine tensor parameters from spectral simulations.....	71
7.4 Interplay between the asymmetric hydrogen bond and high spin density on the C(4) atom in the quinone in PS I.....	74

<b>Part B: Site-Directed Mutants in a Putative Electron Transfer Pathway from A<sub>0</sub> through A<sub>1</sub> to F<sub>X</sub>.....</b>	<b>79</b>
---	-----------

<b>8 Electron Transfer in Cyanobacterial Photosystem I: Spectroscopic Characterization of Site-Directed Mutants in a Putative Electron Transfer Pathway from A<sub>0</sub> through A<sub>1</sub> to F<sub>X</sub>.....</b>	<b>81</b>
8.1 Rationale for the choice of the mutant strains.....	82
8.2 Physiological Characterization of the Mutant Strains.....	84
8.3 Spin polarisation patterns of P <sub>700</sub> <sup>+</sup> A <sub>1</sub> <sup>-</sup> at X- and Q-band.....	86
8.4 Pulsed ENDOR of P <sub>700</sub> <sup>+</sup> A <sub>1</sub> <sup>-</sup> .....	90
8.5 Effect of the Mutations on the Spin Density Distribution in the Phylloquinone Molecule.....	93



8.6 PsaA branch is EPR active at low temperature.....	95
<b>9 Determination of Forward Electron Transfer Rates of Site-Directed Mutants in a Putative Electron Transfer Pathway from A<sub>0</sub> through A<sub>1</sub> to F<sub>X</sub>.....</b>	<b>97</b>
9.1 Time-Resolved Optical Measurements in Whole Cells and Isolated PS I Complexes.....	98
9.2 Room temperature electron spin polarized EPR spectra at X-band.....	101
9.3 EPR Studies of the Slowing of A <sub>1</sub> <sup>-</sup> Oxidation at 260 K.....	108
9.4 Asymmetry of electron transfer in PsaA <i>versus</i> PsaB branches.....	113
<b>10 Methionine to Leucine Mutation of the Ligand to the Primary Electron Acceptor A<sub>0</sub>.....</b>	<b>117</b>
10.1 Transient EPR characterisation of P <sub>700</sub> <sup>+</sup> A <sub>1</sub> <sup>-</sup> radical pair at X- and Q-Band.....	118
10.1.1 Efficiency of Electron Transfer at Low Temperature.....	118
10.1.2 Spin polarisation patterns of P <sub>700</sub> <sup>+</sup> A <sub>1</sub> <sup>-</sup> .....	121
10.2 Observation of <sup>3</sup> P <sub>700</sub> due to Charge Recombination by Time-Resolved EPR Spectroscopy.....	124
10.3 Influence of Met to Leu Mutation in the A <sub>0</sub> Binding Site on the Electron Transfer in Photosystem I.....	126
<b>11 Concluding discussion.....</b>	<b>129</b>
<b>Abbreviations.....</b>	<b>137</b>
<b>Bibliography.....</b>	<b>139</b>
<b>Acknowledgements</b>	
<b>Curriculum Vitae</b>	



## Abstract

The breakthrough of a Photosystem I (PS I) structure at 2.5Å resolution in 2001 was a key achievement of research teams within the Berlin collaborative research center (Sfb 498). It initiated intense structure-based design and interpretation of spectroscopic work as exemplified in this thesis. This work is devoted to the determination of essential protein-cofactor interactions responsible for the control of cofactor function. In addition, the role of the two C<sub>2</sub>-symmetric electron transfer (ET) branches from the primary acceptor P<sub>700</sub> via the symmetrically located phylloquinones (A<sub>1</sub>) to the stromal iron-sulphur centers (FeS) is addressed. Systematic modifications of the cofactor-protein interactions are introduced in two ways: firstly substitution of the native cofactor either chemically or via biosynthetic pathway mutants, secondly controlled changes of the protein environment via deletion or site-directed mutants. As direct observables the sequential radical pair intermediates P<sub>700</sub><sup>+</sup>A<sub>1</sub><sup>-</sup>FeS and P<sub>700</sub><sup>+</sup>A<sub>1</sub>FeS<sup>-</sup> are used as they occur during light induced charge separation. Their spectral and kinetic properties are determined by a variety of advanced Time Resolved Electron Paramagnetic Resonance (TR-EPR) techniques. Complementary information from optical spectroscopy is considered as well.

The combined results from PS I samples with a series of artificial quinones and from site-directed mutants reveal that all essential structural and functional characteristics like location and orientation of the quinone, details of protein-cofactor interactions and mechanistic details remain largely conserved in spite of major changes of either the cofactor itself or its protein environment. The results with substituted 1,4-naphthoquinones (NQ) demonstrate: i) a wide variety of quinones, including those native to type II RC, can function in PS I at the characteristic highly reducing (negative) redox potential; ii) neither the phytyl-tail nor the methyl group in the quinone molecule are necessary for maintaining

the essential native quinone characteristics in PS I; however, at least one asymmetric substituent between the C=O groups is necessary; iii) a single saturated alkyl tail ( $n=2$ ) as NQ substituent assumes a ring position different from the native phytyl and otherwise unsaturated side chain.

A highly asymmetric spin density distribution is identified and mapped over the quinone ring by selective isotope  $^2\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  labeling. It indicates a single and fairly strong hydrogen bond between the quinone and the protein. This protein-quinone interaction remains largely unaffected by any of the changes introduced, just PsaA mutations (Trp to Phe W697F<sub>PsaA</sub>, Ser to Cys S692C<sub>PsaA</sub>, Arg to Ala R694A<sub>PsaA</sub>) show systematic weak changes as demonstrated by pulsed Electron Nuclear Double Resonance (ENDOR). The single H-bond to the stroma-faced C=O group of  $A_1$  as modeled in the ground state structure is thus confirmed for the functional  $P_{700}^+A_1^-$  state and proven to be a highly stable protein cofactor interaction under all modifications studied. Detailed comparisons of protein-cofactor interaction in PS I and the bacterial reaction center are presented and possible reasons for the unusual strength of the hydrogen bond in PS I are discussed.

A comprehensive study of eight specific site-directed mutants in the putative ET pathway from  $P_{700}$  through  $A_0$  and  $A_1$  to  $F_X$  confirms that the EPR detectable functional charge-separated  $P_{700}^+A_1^-$  state is associated with the PsaA branch. In particular, the Met to Leu mutants concerning the  $A_0$  ligand show a high PsaA specificity. Only the PsaA mutant (M688L<sub>PsaA</sub>) results in a major decrease in  $P_{700}^+A_1^-$  quantum yield accompanied by  $^3P_{700}$  formation as product of  $P_{700}^+A_0^-$  recombination. In contrast, TR-EPR fails to detect any differences between the symmetric M668L<sub>PsaB</sub> mutant and the wild type.

TR-EPR detects a considerable lengthening of the 'slow' ET kinetic phase ( $A_1^-$  to  $F_X$ ) specifically for the PsaA mutants (W697F<sub>PsaA</sub>, S692C<sub>PsaA</sub>); however, by the same amount for both mutants R694A<sub>PsaA</sub> and R674A<sub>PsaB</sub>. EPR detected ET-kinetics, their

mutation induced changes and temperature dependence are in excellent agreement with those observed for the ‘slow’ optical phase of the  $A_1$  reoxidation kinetics. The existence of a minor ‘fast’ phase (10-30 ns) is confirmed by complementary optical studies of the same samples. However, in EPR neither direct nor indirect evidence could be obtained although specifically suited TR-EPR experiments have been employed. Our results point towards a clear asymmetry in ET pathways, consistent with forward ET predominantly along the PsaA branch in cyanobacterial PS I. The same kinetics for both Arg to Ala mutants ( $R694A_{PsaA}$  and  $R674A_{PsaB}$ ) represent a special case, because those mutations influence the kinetically relevant  $F_X$  properties in a fully symmetric way.

All results are combined in a general discussion chapter and subjected to a critical review in the context of related published material.

## Zusammenfassung

Mit der Photosystem I (PS I) Struktur bei 2.5Å Auflösung (2001) war den beteiligten Teilprojekten im Berliner Sonderforschungsbereich Sfb 498 ein entscheidender Durchbruch gelungen. Struktur-basierte Planung und Interpretation von Spektroskopie-Experimenten waren damit möglich, wofür diese Doktorarbeit ein Beispiel gibt. Ziel der Arbeit ist die Charakterisierung von Protein-Kofaktor Wechselwirkungen, welche die Kofaktor-Funktion kontrollieren. Außerdem wird die Frage nach der Rolle der beiden C<sub>2</sub>-symmetrischen Elektrontransfer(ET)-Äste vom primären Donor P<sub>700</sub> über die symmetrisch angeordneten Chinone (A<sub>1</sub>) zu den stroma-seitigen Eisen-Schwefel Zentren aufgegriffen. Systematische Modifizierungen von Protein-Kofaktor Wechselwirkungen werden auf zwei Weisen vorgenommen: erstens Substitution des nativen Kofaktors entweder chemisch oder über Mutanten des Biosyntheseweges, zweitens kontrollierte Veränderungen der Proteinumgebung durch "deletion-" und Punkt-Mutanten. Als Beobachtungssonde werden aufeinander folgende Radikalpaare P<sub>700</sub><sup>+</sup>A<sub>1</sub><sup>-</sup>FeS und P<sub>700</sub><sup>+</sup>A<sub>1</sub>FeS<sup>-</sup> genutzt, wie sie im Verlauf der lichtinduzierten Ladungstrennung im Reaktionzentrum (RZ) entstehen. Ihre spektralen und kinetischen Eigenschaften werden mit der Methode der zeitauflösenden Elektronenspin-Resonanz Spektroskopie (TR-EPR) bestimmt. Komplementäre Information von optischer Spektroskopie wird ebenfalls einbezogen.

Ingesamt zeigen die Ergebnisse an PS I - Proben mit einer Serie von künstlichen Chinonen und von Punkt-Mutanten, dass alle wesentlichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften, wie Lage und Orientierung des Chinons, Details der Protein-Kofaktor-Wechselwirkungen und mechanistische Details weitgehend erhalten bleiben, trotz erheblicher Änderungen am Kofaktor selbst bzw. in seiner Proteinumgebung. Die Ergebnisse mit substituierten 1,4-Naphtochinonen (NQ) zeigen: i) eine Vielfalt von

Chinonen einschließlich solcher, die für Typ II RZ nativ vorkommen, kann in PS I die Funktion von  $A_1$  übernehmen, und dies bei dem für Typ I RZ stark reduzierenden (negativen) Redoxpotential; ii) weder der Phytyl- noch der Methyl-Rest der Chinon Moleküle ist für die Beibehaltung der Chinon-Eigenschaften von Wildtyp PS I erforderlich, jedoch ist mindestens ein asymmetrischer Substituent zwischen den C=O Gruppen notwendig; iii) ein einzelner gesättigter Alkyl-Rest als NQ-Substituent nimmt die zum nativen Phytyl-Schwanz oder zu anderen ungesättigten Seitenketten entgegengesetzte Ringposition ein.

Eine stark asymmetrische Spindichteverteilung in dem Chinon-Ring wird mit der Hilfe von gezielter  $^2\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ - Isotopenmarkierung abgesichert und einer einzelnen, starken H-Brücke zwischen Chinon und Protein zugeordnet. Diese Protein-Chinon Wechselwirkung bleibt nahe unbeeinflusst von jeder der eingeführten Veränderungen; lediglich die PsaA Mutanten (Trp zu Phe W697F<sub>PsaA</sub>, Ser zu Cys S692C<sub>PsaA</sub>, Arg zu Ala R694A<sub>PsaA</sub>) zeigen kleine systematische Änderungen der Chinon-Hyperfeinstruktur die mit der Hilfe der gepulsten Elektron-Kern-Doppel-Resonanz ausgemessen wurden. Die einzelne H-Brücke zu der Stroma-seitigen Chinon C=O Gruppe, wie sie in der Grundzustandsstruktur identifiziert ist, wird hier für den funktionellen  $\text{P}_{700}^+\text{A}_1^-$  Zustand bestätigt und erweist sich als eine besonders stabile Protein-Kofaktor Wechselwirkung gegenüber allen hier getesteten Modifizierungen. Die Protein-Kofaktor Wechselwirkung in Typ I (PS I) und Typ II (bRZ) Reaktionzentren werden verglichen und mögliche Gründe für die ungewöhnlich starke H-Brücke diskutiert.

Die Untersuchung von acht Punkt-Mutanten im mutmaßlichen ET-Weg von  $\text{P}_{700}$  über  $A_0$  und  $A_1$  bis  $F_X$  stellt sicher, dass der EPR-detektierbare, funktionelle ladungsgetrennte  $\text{P}_{700}^+\text{A}_1^-$  Zustand zu  $\text{Q}_K$  im PsaA-Ast gehören. Speziell die Met zu Leu Mutanten, die den Liganden zum  $A_0$  Kofaktor betreffen, zeigen eine hohe PsaA-

Spezifität. Nur die PsaA-Mutante (M688L<sub>PsaA</sub>) führt zu einer starken Verringerung der ( $P_{700}^+A_1^-$ )-Quanten-Ausbeute, verbunden mit der Bildung eines  $^3P_{700}$  Triplett-Rekombinationsproduktes aus dem  $P_{700}^+A_0^-$  Zustand. Im Gegensatz dazu werden keine Unterschiede zwischen M668L<sub>PsaB</sub> und WT festgestellt.

TR-EPR findet eine beträchtliche Verlängerung der sog. "langsamen" optischen Phase in der  $A_1^-$  Reoxidationskinetik, speziell für die PsaA Mutanten (W697F<sub>PsaA</sub>, S692C<sub>PsaA</sub>); dagegen wird Verlängerung um den gleichen Faktor sowohl für die PsaA Mutante (R694A<sub>PsaA</sub>) als auch für PsaB Mutante (R674A<sub>PsaB</sub>) beobachtet. Die EPR-detektierten ET-Kinetiken, ihre Mutations-bedingten Veränderungen und die Temperaturabhängigkeiten sind mit den Ergebnissen für die optisch beobachtete "langsame" kinetische Phase der  $A_1^-$  Reoxidation in ausgezeichneter Übereinstimmung. Die Existenz einer "schnellen" Phase (10-30 ns) ist für die gleichen Proben in einer komplementären optischen Untersuchung bestätigt worden. Dagegen konnte mit EPR weder direkte noch indirekte Evidenz für einen signifikanten Beitrag der schnelle Phase gefunden werden, obwohl besonders geeignete TR-EPR Techniken zum Einsatz kamen. Diese Ergebnisse weisen daher klar auf eine Asymmetrie im Vorwärts ET hin, wobei in Cyanobakterien der PsaA-Ast bevorzugt ist. Die identische Kinetik für beide Arg zu Ala Mutanten (R694A<sub>PsaA</sub> und R674A<sub>PsaB</sub>) stellt einen besonderen Fall dar, denn bei diesen Mutanten werden die kinetisch relevanten  $F_X^-$  Eigenschaften in völlig symmetrischer Weise beeinflusst.

Alle Ergebnisse werden in einem Kapitel "General Discussion" einander gegenüber gestellt und einer kritischen Durchsicht im Zusammenhang mit anderen Ergebnisse in der Literatur unterzogen.