

ROZPRAWA DOKTORSKA

The influence of endogenous and exogenous factors on the activity of photosystem II and its heterogeneity

Autor: mgr inż. Sonia Krysiak

Pierwszy promotor: prof. dr hab. Květoslava Burda

Drugi promotor: prof. dr hab. Nika Spiridis

Streszczenie

Kierunek rozwoju życia na Ziemi został zdeterminowany przez fotosyntezę tlenową. Pierwsze organizmy zdolne do jej przeprowadzenia pojawiły się ponad 3 mld lat temu. Sinice, glony i rośliny wyższe potrafią wykorzystywać światło słoneczne do pobierania elektronów z wody, gdyż posiadają fotosystem II (PSII). Produktem ubocznym tego procesu jest O_2 . PSII jest nie bez powodu nazywane "sercem" fotosyntezy, której dalsze etapy są uzależnione od aktywności kompleksu wydzielającego tlen (OEC - oxygen evolving complex). Zrozumienie struktury i mechanizmu działania OEC pozostaje największym wyzwaniem współczesnej nauki, pomimo ogromnego postępu, jaki dokonał się w ostatnich latach dzięki połączonym wysiłkom wielu grup badawczych z różnych dyscyplin i stosujących różne podejścia badawcze. Trudność w zrozumieniu funkcjonowania OEC, który stanowi kompleks Mn_4CaO_5 , polega na pozyskiwaniu eksperymentalnych danych, które pozwalałyby jednoznacznie przypisać je do jego pośrednich stanów katalitycznych. Nie ma wciąż spójnego modelu OEC, który dałoby się stworzyć w oparciu o dostępne dane. Głównym problemem jest rozpad kompleksu Mn_4CaO_5 podczas procesu izolacji z PSII, jego struktura ulega degradacji. Tylko wtedy, gdy jest związany z matrycą białkową PSII, istnieje jako wysoce aktywny związek zdolny do gromadzenia czterech ładunków dodatnich i ekstrakcji elektronów z wody. Pytania, które pozostają wciąż otwarte: (i) jak zmieniają się stany kompleksu Mn_4CaO_5 w cyklu Koka, (ii) jakie są drogi odprowadzania protonów i O_2 oraz przyłączania cząsteczek wody, (iii) jakie mechanizmy regulujące są odpowiedzialne za wysoką efektywność OEC i wreszcie (iv) który etap w cyklu Koka jest 'wąskim gardłem' (ang. *bottleneck*) i co jest tego przyczyną.

Mechanizm działania OEC jest niezwykle inspirujący i poznanie go będzie miało ogromny wpływ na projektowanie wydajnych ogniw paliwowych. Obecnie jednymi z najbardziej rozpowszechnionych układów są związki półprzewodnikowe bazujące na metalach, zdolne do utleniania wody. Między innymi zalicza się do nich związki wolframu. Niestety ich wydajność w produkcji O_2 jest zwykle o ok. pięć rzędów wielkości mniejsza niż ta

osiągana przez naturalny układ PSII wyposażony w kompleks Mn_4CaO_5 . Innym problemem jest wąski zakres długości fal promieniowania elektromagnetycznego, które je aktywują, podczas gdy superkompleksy PSII przyswajają światło w szerokim zakresie spektralnym (w zakresie światła widzialnego) z dużą wydajnością dzięki obecności kompleksów antenowych. Dlatego też podejmowanych jest coraz więcej prób wytwarzania układów bio-nano-hybrydowych z połączenia półprzewodników z izolowanymi bądź całymi strukturami aparatu fotosyntetycznego.

Niniejsza praca koncentruje się na badaniu wpływu czynników endogennych i egzogennych na wydajność i heterogeniczność wytwarzania tlenu przez PSII BBY (tylakoidy wzbogacone w PSII). W pierwszym przypadku badany był wpływ białek zewnętrznych (PsbO, PsbP i PsbQ), o których wiadomo z jednej strony, że stabilizują kompleks Mn_4CaO_5 , a z drugiej strony, że mogą być odpowiedzialne za formowanie kanałów, którymi dostarczana jest woda w pobliże kompleksu manganowego i odbierane są protony i O_2 . Jako czynnik egzogeny zostały wybrane nanocząstki (NPs) WO_3 , gdyż znana są ich zdolność do utleniania wody i odporność na środowisko wodne. Czyni je to atrakcyjnym kandydatem do wytwarzania układu hybrydowego PSII BBY – WO_3 NPs, który mógłby wykazywać zwiększone wydzielanie tlenu stymulowane oddziaływaniami z PSII w porównaniu do czystego układu półprzewodnikowego. Ze względu na rozmiary nanocząstek od ok. 1-3 nm można było się spodziewać, że będą się one wbudowywać w błony i będą mogły oddziaływać zarówno ze strona donorową, jak i akceptorową PSII. Aby móc bezpośrednio badać udział oraz kinetykę wydzielania tlenu w PSII wolną i szybką ścieżką, opracowano nowy protokół pomiarowy wykorzystujący szybką polarografię trójelektrodową (elektrodę typu Joliot). Eksperymenty przeprowadzono na PSII BBY izolowanych ze świeżych liści tytoniu (*Nicotiana tabacum* var. *John William's Broadleaf* (JWB)) w przypadku badań wpływu białek zewnętrznych na aktywność PSII oraz ze świeżych liści szpinaku (*Spinacia oleracea*) w badaniach układów hybrydowych PSII BBY – WO_3 NPs. W żadnym z eksperymentów nie dodawano akceptorów zewnętrznych, które mogłyby wpłynąć na pracę PSII.

W pracy osiągnięto dwa ważne wyniki. Jeden jest związany z bezpośrednimi pomiarami heterogeniczności uwalniania tlenu przy użyciu szybkiej polarografii i identyfikacją czynników wpływających na przełączanie PSII między szybkimi i wolnymi fazami produkcji tlenu. Drugie osiągnięcie dotyczy nowego podejścia do rozwoju systemów biohybrydowych wykorzystujących mechanizmy PSII niezbędne do optymalizacji wydajności hybrydy w warunkach zbliżonych do naturalnych, tj. środowiskowych.

Wykorzystując heterogeniczny 5-cio stanowy rozszerzony model Koka, uwzględniający istnienie metastabilnego stanu S_4 , przeprowadzono analizę oscylacji ewolucji tlenu pod wpływem krótkich wysycających błysków białego światła uzyskanych dla PSII BBY niepoddanego wymyciu białek i pozbawionego zewnętrznych białek otaczających kompleks Mn_4CaO_5 . W próbie kontrolnej wszystkie przejścia pomiędzy stanami $S_i \rightarrow S_{i+1}$ są wysoce efektywne poza przejściem ze stanu S_2 do S_3 , co świadczy o jego wyjątkowym charakterze. Co więcej, prawdopodobieństwo tego przejścia jest niezależne od obecności białek

zewnętrznych. Zaobserwowano, że usunięcie dwóch białek PsbQ i PsbP powoduje w różnym stopniu spadek prawdopodobieństwa przejścia pomiędzy stanami $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_2$ i $S_3 \rightarrow S_0$. Największe zmiany zaobserwowano dla przejścia $S_0 \rightarrow S_1$. Usunięcie dodatkowo trzeciego białka spowodowało znaczny spadek aktywności PSII BBY o ok. 60%. Nie miało to jednak wpływu na efektywność przejść pomiędzy stanami $S_i \rightarrow S_{i+1}$. Natomiast ponad 80% udział szybkiej fazy wydzielania tlenu w kontrolnej próbce PSII BBY zmniejszył się prawie 4-krotnie w PSII pozbawionych PsbP i PsbQ. Wymycie wszystkich trzech białek spowodowało prawie całkowity zanik fazy szybkiej wydzielania O_2 . Także wyniki z pomiarów zależności zmian amplitudy wydzielania tlenu pod wpływem trzeciego błysku w funkcji odległości pomiędzy pierwszym i drugim błyskiem, jak i pomiędzy drugim i trzecim błyskiem potwierdziły podobny zanik szybkiej fazy uwalniania O_2 w badanych próbkach. Jednocześnie jego niezależność od przyjętego protokołu pomiarowego potwierdza sekwencyjny przebieg cyklu Koka. Stała czasowa szybkiej ścieżki wydzielania tlenu wyznaczona dla próbki kontrolnej z ok. 4 ms wzrosła do ok. 6 ms w PSII BBY pozbawionych dwóch białek zewnętrznych. Zaskakująca jest zmiana wolnej stałej czasowej, która w próbce kontrolnej wynosi ok. 60 ms, a następnie przyspiesza odpowiednio prawie 2 i 4-krotnie w PSII – PsbQ, PsbP i PSII – PsbQ, PsbP, PsbO. Wszystkie zaobserwowane zmiany zostały omówione w odniesieniu do przyjętej wiedzy na temat budowy kompleksu Mn_4CaO_5 i funkcjonowania PSII oraz istniejących modeli opisujących przejścia pomiędzy stanami $S_i \rightarrow S_{i+1}$. Wyjaśnienie tych zjawisk wymagało wzięcia pod uwagę zarówno zmian organizacyjnych kompleksu Mn_4CaO_5 z uwzględnieniem bliższych i dalszych sfer koordynacyjnych manganu i wapnia, jak i zmian w funkcjonowaniu rozpoznanych kanałów O1, O4 i Cl1 oraz ich roli kontrolnej w doprowadzaniu H_2O do i odprowadzaniu protonów i O_2 poza OEC.

Praca ta dostarcza również nowych informacji na temat projektowania systemów nano-biohybrydowych wykorzystujących fotosystem II do produkcji O_2 . Powszechnie badane nanostruktury półprzewodnikowe 2D/3D wymagają dużej powierzchni aktywnej wykazującej wysoce specyficzne połączenie z PSII w celu uzyskania prawidłowo zorientowanych systemów PSII o wysokiej gęstości upakowania. Wymaga to, z jednej strony, funkcjonalizacji tych mezo-nano powierzchni, a z drugiej strony, genetycznej modyfikacji samego PSII. Zazwyczaj wprowadza się mediatory elektronowe, aby zapewnić cykliczny obieg elektronów. Niemniej jednak, najwyższe tempo uwalniania tlenu zarejestrowane dla tych systemów, które osiągnęły w początkowej fazie działania, przeliczone na g katalizatora, tj. superkompleksu PSII, pozostaje o 2-3 rzędy wielkości niższe niż to wykazywane przez izolowane systemy PSII w ich natywnych warunkach. W niniejszej pracy zademonstrowano nowe podejście do konstruowania systemów hybrydowych opartych na naturalnym PSII BBY, który wykazuje najwyższą zdolność do ewolucji tlenu zademonstrowaną do tej pory. Superdrobne nanocząstki WO_3 zostały wprowadzone do PSII BBY. Wykazano zależny od ich stężenia wpływ na organizację tych błon i funkcjonowanie PSII. Największe zmiany wywołane działaniem NPs zaobserwowano dla procesu ewolucji O_2 . Maksymalną wydajność O_2 na poziomie 70% odnotowano dla próbki kontrolnej oraz dla stężeń 0,02-0,03 μg NPs/ μg Chl i 0,15-0,3 μg NPs/ μg Chl. Korelowało to z niewielkim spadkiem wydajności fotochemicznej, co pozwoliło zidentyfikować mechanizm

odpowiedzialny za to zjawisko. Mianowicie, wysoce specyficzne działanie WO_3 NPs po stronie donorowej, ich zdolność do pobierania elektronów z OEC oraz tworzenie łańcuchów przewodzących docierających do strony akceptorowej PSII, umożliwiło im przenoszenie elektronów do chinonów związanych w miejscach Q_A i Q_B . Wpływ NPs na zwartość superkompleksów PSII ma ogromne znaczenie. W ten sposób NPs mogą modyfikować potencjały redoks Q_A i Q_B , a także regulować dostęp PQ z zewnętrznej puli chinonów do miejsca wiązania Q_B . Zaproponowane podejście może przynieść korzyści w projektowaniu systemów biohybrydowych, które przekształcają energię słoneczną w paliwo. Pozwala ono na wykorzystanie całego spektrum długości fal emitowanych przez słońce w zakresie UV-VIS z wysoką wydajnością kwantową reakcji rozszczepiania wody i produkcji tlenu na poziomie natywnej aktywności PSII. System działa przy pH 6,5 i nie wymaga dodatkowych akceptorów elektronów. Oczywiście stabilność takiego układu hybrydowego jest kluczowa i zależy między innymi od szybkości wychwytu O_2 (mniejszy wychwyt O_2 = mniejsza generacja ROS) oraz zdolności do regeneracji PQ_{ox} , co może wymagać zewnętrznego mediatora elektronów. W tym drugim przypadku wymaga to interakcji dwóch systemów, z których drugim może być system zdolny do produkcji H_2 (wymagałoby to ich separacji przestrzennej) lub energii elektrycznej przy użyciu odpowiedniej elektrody zdolnej do ekstrakcji elektronów z PQH_2 .

Paula Kryniah