



Engineering Retinal-Based Phototrophy Via a Complementary Photosystem in Synechocystis sp. PCC6803.

Q. Chen

Samenvatting

Om de verduurzaming van onze samenleving te realiseren is een organisme nodig dat zonne-energie om kan zetten met hoge efficiëntie. Een breed gedragen voorstel voor het maximaliseren van de efficiëntie van fotosynthese is het vergroten van het effectieve spectrum dat gebruikt kan worden, met name in de richting van het infrarode deel van elektromagnetische straling (700 nm en langer). Een eerste stap hiervoor wordt uiteengezet in dit proefschrift met de beschrijving van retinal-gebaseerde fototropie, met behulp van proteorodopsine (PR) en *Gloeobacter* rodopsine (GR), welke tot expressie gebracht werden in *Synechocystis* sp. PCC 6803 en een daarvan afgeleide mutant waarin fotosysteem I ontbreekt (Δ PSI). Dit proefschrift verkent het stimulerende effect van deze rodopsine op de groei en de volledig-*trans* retinal-stofwisseling van de gastheer *Synechocystis*.

In **hoofdstuk 1** worden het belang van oxygene fotosynthese in duurzame toepassingen en de huidige stand van de techniek voor het verbeteren van de efficiëntie ervan kort samengevat. Verder worden de voor- en nadelen van de voorgestelde methoden voor het uitbreiden van het bruikbare spectrum naar het infrarood uitvoerig besproken. Daarnaast vat het hoofdstuk het onderzoek naar drie populaire licht-gedreven protonpompen (BR, PR en GR) samen.

Hoofdstuk 2 vat de verschillende typen van fotosynthese, waarbij wel (chlorofyl) of niet (retinal) zuurstof ontwikkeld wordt, samen en beschrijft de verschillen daartussen. Voorts wordt het concept van 'directe omzetting' door natuurlijke fotosynthese en haar toepassing voor het produceren van biobrandstof in Cyanobacteriën uitgelegd. De beperkingen en potentiële verbeteringen worden uitvoerig besproken.

Hoofdstuk 3 rapporteert over de functionele expressie van het PR-archetype in *Synechocystis*. Bij gebruik van een promotor van gemiddelde sterkte, *PpsbA2*, wordt functioneel PR tot een aantal van 10^5 moleculen per cel tot expressie gebracht, vermoedelijk in een hexamere quaternaire structuur met een evenredige verdeling (op basis van eiwitinhoud) over het thylakoid- en cytoplasmamembraan. Deze resultaten demonstreren tevens dat *Synechocystis* de capaciteit heeft om volledig-*trans* retinal te synthetiseren. Expressie van een substantiële hoeveelheid opsin, een membraaneiwit, veroorzaakt een sterke vermindering van de groei in *Synechocystis*, zoals blijkt in een stam die PROPS, een niet-pompende afgeleide van PR, tot expressie brengt. In verhouding tot deze stam zorgt PR echter voor een meetbare stimulans op de groei.

In **hoofdstuk 4** wordt, als extensie van ons initiële onderzoek, gekeken naar het verschil tussen twee verschillende bacteriële rodopsine (PR en GR) in de modelcyanobacterie *Synechocystis*. Met name de pigmenten die gebonden worden door de respectievelijke eiwitten om functioneel te worden, en hun quaternaire structuur in functionele vorm, zowel in *Escherichia coli* als in de cyanobacteriële membranen, zijn onderzocht. Deze studie

suggereert dat de twee proton-pompende rodopsine voornamelijk bestaan uit respectievelijk hexameren en trimeren. Daarnaast blijkt dat GR in staat is een extra (antenne)carotenoïde te binden naast retinal en daarmee een hogere pompsnelheid weet te bereiken dan PR bij gelijke lichtintensiteit. De kleinere hoeveelheid GR die tot expressie gebracht wordt zou de effectiviteit verminderen ten opzichte van PR, maar het blijft een open vraag welke van deze bacteriële rodopsine de grootste stimulans op de groeisnelheid van hun gastheer oplevert.

In **hoofdstuk 5** hebben we de *in vivo*-rol onderzocht van vijf enzymen die vermoedelijk betrokken zijn bij retinalmetabolisme in *Synechocystis*. De resultaten bevestigden de rol van SynACO als het kritieke enzym in de retinalsynthese door middel van het doorknippen van β -*apo*-carotenal. Het verwijderen van het gen dat codeert voor SynACO heft het vermogen om retinal te synthetiseren volledig op. Deze mutanten zouden gebruikt kunnen worden om functioneel PR te maken met extern toegevoegde retinal of analogen daarvan, zoals gedemonstreerd in deze studie waarin volledig-*trans* 3,4-dehydroretinal en 3-methylamino-16-nor-1,2,3,4-didehydroretinal deze rol op zich nemen. Verder suggereert dit dat het gen *slr0574* betrokken is bij de afbraak van retinal. Voorlopige resultaten met [¹³C]-NMR-analyse suggereren echter dat omzetting in retinol ook een rol speelt.

In **hoofdstuk 6** wordt beschreven hoe de expressie van PR en GR bij kan dragen aan de energievoorziening in Δ PSI. Metingen van de groeisnelheid, competitie en fysiologische karakterisering van rodopsine-bevattende stammen, in vergelijking met Δ PSI als controle, maken het mogelijk onomstotelijk vast te stellen dat de retinal-gebaseerde protonpomp PR de fotoheterotrofe groei kan verbeteren van deze afgeleide van *Synechocystis*. In tegenstelling tot PR liet GR dit stimulerende effect niet zien, ondanks het expressieniveau dat bereikt is, hoewel het een sterk effect had op de carotenoïdesynthese. De fysiologische karakterisering is consistent met het concept dat de protonpomp PR de cellen voorziet van extra capaciteit om een protonengradiënt te genereren. Voor GR is dit positieve effect mogelijk tenietgedaan door de negatieve consequenties van de expressie van dit heterologe eiwit. Het onvermogen om fotoautotroof te groeien van Δ PSI met PR is waarschijnlijk eerder een kinetische dan een thermodynamische limitatie van de NADPH-dehydrogenase NDH-1 in zijn NADP⁺-reducerende activiteit.

In **hoofdstuk 7** vatten we de resultaten van dit proefschrift samen en benadrukken we de potentiële toepassing van PR-gebaseerde fototrofie voor het optimaliseren van de ATP/NADPH-ratio, kunstmatige fotosynthese, industriële biobrandstofproductie en het maken van een infrarood-absorberende bacteriële rodopsine. Daarnaast benoemen we de uitdagingen van het verkennen van de fysiologische effecten van PR *in vivo*.