



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Engineering retinal-based phototrophy via a complementary photosystem in *Synechocystis* sp. PCC6803

Chen, Q.

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Chen, Q. (2017). Engineering retinal-based phototrophy via a complementary photosystem in *Synechocystis* sp. PCC6803.

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <http://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Summary

To achieve success in setting up sustainability applications, organisms are required that convert solar energy with the high efficiency. A widely proposed method to maximize the photosynthetic efficiency is the expansion of its effective absorption spectrum into the infrared region of the spectrum of electromagnetic radiation (*i.e.* beyond 700 nm). As the first step to this, this thesis worked on expressing of retinal-based phototrophy, like proteorhodopsin (PR) and *Gloeobacter* rhodopsin (GR) into *Synechocystis* PCC 6803 and Δ PSI derivative of *Synechocystis*, thereafter exploring their stimulatory effect on the growth of the host. Beyond that, to functionally express PR and GR in *Synechocystis*, this thesis also investigated the all-*trans* retinal metabolism in *Synechocystis*.

In **chapter 1**, the importance of oxygenic photosynthesis in sustainability applications and the current approaches to improving the efficiency of oxygenic photosynthesis are briefly reviewed. Moreover, the (dis)advantages of three proposed methods on expanding the absorption spectrum of *Synechocystis* to the infrared region have been intensively discussed. Beyond that, the chapter summarizes the studies on three popular light-driven proton pumps (BR, PR and GR).

In **chapter 2**, the different types of photosynthesis (oxygenic- and anoxygenic or chlorophyll based- and retinal based- photosynthesis) and their difference are summarized. Moreover, the conception of 'direct conversion' is explained through natural photosynthesis and its application in biofuel-production in Cyanobacteria, its limitations, and potential further improvement are intensively discussed.

In **chapter 3**, functional expression of the archetype PR in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is reported. Upon use of the moderate-strength *psbA2* promoter, *holo*-PR is expressed in this cyanobacterium, at a level of up to 10^5 molecules per cell, presumably in a hexameric quaternary structure, and with approximately equal distribution (on a protein-content basis) over the thylakoid and the cytoplasmic membrane fraction. These results also demonstrate that *Synechocystis* sp. PCC 6803 has the capacity to synthesize all-*trans*-retinal. Expressing a substantial amount of a heterologous opsin membrane protein causes a substantial growth retardation *Synechocystis*, as is clear from a strain expressing PROPS, a non-pumping mutant derivative of PR. Relative to this latter strain, PR expression, however, measurably stimulates its growth.

In **chapter 4**, as an extension of our initial studies, comparison of the effect of expressing two different bacterial rhodopsins (*i.e.* PR and GR) in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 is investigated, with special emphasis on the pigments bound by the respective *apo*-opsins, and the oligomeric state of the corresponding *holo*-rhodopsins, in *Escherichia coli* and in the cyanobacterial membranes. These studies suggest that the two proton-pumping rhodopsins were predominantly present as hexamers and trimers, respectively. Furthermore, GR is able to bind (an antenna) carotenoid, in addition to retinal, and also has a higher turnover rate of proton pumping at a given light intensity than PR. The smaller amount of GR expressed, however, would decrease its effectiveness. It still remains to be established which of these two bacterial rhodopsins can give the highest stimulatory effect on the growth rate of their cyanobacterial host.

In **chapter 5**, we have studied the *in vivo* role of these five enzyme(s) (activities) presumably involved in retinal metabolism in the model cyanobacterium *Synechocystis*. The results confirmed the role of SynACO as the decisive enzyme for retinal synthesis in *Synechocystis*, via asymmetric cleavage of β -*apo*-carotenal. Knocking out the gene encoding SynACO fully abolishes the ability of *Synechocystis* to synthesize retinal. Such mutants could be used for the reconstitution of *holo*-PR with exogenously added retinal or retinal analogues, as we demonstrated in this study with all-*trans* 3,4-dehydroretinal and the 3-methylamino-16-nor-1,2,3,4-didehydroretinal analogue. Furthermore, it suggests that *slr0574* played a role in the retinal degradation pathway. Preliminary results obtained with [¹³C]-NMR analysis, however, suggested that also conversion to retinol plays a role.

In **chapter 6**, to further increase the energy contribution from retinal-based phototrophy, two retinal-based proton pumps, PR and GR were expressed in a Δ PSI strain of *Synechocystis* sp. PCC6803. Growth-rate measurements, competition experiments and physiological characterization of the rhodopsin-expressing strains, relative to the Δ PSI control strain, allow us to unambiguously conclude that the retinal-based proton pump PR can enhance the rate of photoheterotrophic growth of this *Synechocystis* derivative strain. In contrast, the GR did not show this stimulatory effect despite the expression levels achieved. The latter rhodopsin did, however, strongly modulate levels of carotenoid synthesis in the transformed strain. The physiological characteristics obtained are consistent with the concept that the proton-pumping PR provides the cells with the additional capacity to generate proton motive force. For GR this positive effect on the physiology of *Synechocystis* presumably is

SUMMARY

negated by negative consequences of the expression of this heterologously expressed protein. The inability of the PR-expressing Δ PSI strain of *Synechocystis* to grow photoautotrophically is most likely due to a kinetic, rather than a thermodynamic, limitation of its NADPH-dehydrogenase NDH-1 in its NADP⁺-reducing activity.

In **chapter 7**, we summarized the results in this thesis and emphasized the potential application of PR-based phototrophy in optimizing the ATP/NADPH ratio, artificial photosynthesis, in industrial biofuel-production and constructing an infrared-absorbed bacterial rhodopsin. Beyond that, we also pointed out the challenges in exploring the physiological effect of PR *in vivo*.

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 rodopsines 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 promoter 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 rodopsines 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 rodopsines 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 fofoheterotrofe 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 ki-

netische 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*.