



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Functional flexibility of photosystem I in cyanobacteria

Yeremenko, N.

Publication date
2004

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Yeremenko, N. (2004). *Functional flexibility of photosystem I in cyanobacteria*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam]. Universiteit van Amsterdam - IBED.

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: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, P.O. Box 19185, 1000 GD Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Samenvatting

In de afgelopen 15 jaar heeft de cyanobacterie *Synechocystis* sp. PCC 6803 zich ontwikkeld tot een favoriet organisme voor wetenschappers over de hele wereld. Dit organisme is in staat om vreemd DNA te incorporeren in het genoom door middel van homologe recombinatie (waardoor gerichte vervanging van een gen mogelijk wordt), hierdoor is deze bacterie geschikt voor genetische manipulaties. Bovendien kan deze bacterie overleven en groeien onder een grote variëteit aan condities. Deze cyanobacterie heeft in het hier beschreven onderzoek gediend als modelsysteem voor het ophelderen van functionele relaties van het Fotosysteem I (PSI) complex van de oxygene fotosynthese, welke wat betreft structuur equivalent is aan het PSI 'core' complex van hogere planten.

Ons primaire doel was om de routes van de PSI gedreven cyclische elektronenoverdracht te onderzoeken, welke één van de laatste onopgehelderde fenomenen is van de oxygene fotosynthese. Tijdens oxygene fotosynthese werken fotosysteem II en I samen om een lineaire elektronenoverdracht van H_2O naar $NADP^+$ te bewerkstelligen en daardoor een trans-membraan protonengradiënt te genereren die de ATP-synthese aandrijft. ATP kan bovendien ook uitsluitend door PSI worden geproduceerd door middel van een cyclische elektronenoverdrachtsreactie. Dit mechanisme maakt het mogelijk om een protonengradiënt over het thylakoid membraan te genereren zonder $NADP^+$ -reductie, waarvoor elektronen van gereduceerde PSI acceptors worden teruggevoerd naar dragers in het thylakoid membraan. Door het relatieve aandeel van de lineaire elektronenoverdracht ten opzichte van de cyclische elektronenoverdracht aan te passen, kunnen organismen die over een actieve fotosynthese beschikken hun energie-opwekking (door ATP synthese) en reductievermogen (door $NADP^+$ -reductie) reguleren naar behoefte. Versnelling van de PSI cyclische elektronenoverdracht is al eerder waargenomen in cyanobacteriën die aan zoutstress waren blootgesteld. Rond die tijd trok de DNA-'array'-analyse de aandacht van vele wetenschappers als een krachtige methode om de expressie van een heel genoom te meten. Deze benadering kan alleen maar worden toegepast met organismen waarvan de volledige DNA basenvolgorde van het genoom is bepaald. *Synechocystis* sp. PCC 6803 was het eerste organisme dat over een oxygene fotosynthese beschikt waarvan de volledige DNA basenvolgorde was bepaald. Desondanks bestond ten tijde van aanvang van deze studie (2000) geen commercieel verkrijgbare DNA 'microarrays' voor *Synechocystis*. Een DNA 'array' bibliotheek van M13 klonen die alle genen van *Synechocystis* bevat (beschikbaar gesteld door Dr. Tabata, Kasuza Laboratorium Japan) werd gekozen om analyses aan het hele transcriptoom uit te voeren in cellen die waren blootgesteld aan zoutstress (0.5 M NaCl). De methodes werden geoptimaliseerd om de

achtergrond van hybridisaties te reduceren in experimenten door de cDNA 'probe' te zuiveren door middel van het verwijderen van cDNA gegenereerd door rRNA. Er werd een speciale benadering voor de evaluatie van statistische data toegepast, die het mogelijk maakt om een betrouwbare voorspelling te doen van verschillend tot expressie komende genen uit sets van data met een klein aantal herhalingen. Om te bepalen of de waargenomen respons van het gen uniek is voor de NaCl stress of dat het een meer algemene stressrespons is, zijn ook andere types van stress toegepast als stikstof- en fosforstarving. Na het vergelijken van de data bleek dat 'up'-regulatie zeer algemeen voorkomt bij alle toegepaste vormen van stress. De gereguleerde genen bleken vooral te behoren tot de categorie met een functionele rol in het celmetabolisme. Het patroon van genen die werden geïnduceerd gedurende adaptatie aan zoutstress werd gebruikt om kandidaten voor mutagenese te vinden voor het onderzoek naar de functie van PSI. Een specifieke 'up'-gereguleerde kloon welke twee genen bevat coderend voor de hypothetische eiwitten *slr1208* en *ssr2016* trok onze aandacht. Om de potentiële rol van *ssr2016* en *slr1208* in cyclische elektronenoverdracht in cyanobacteriën te bestuderen, werden enkele en dubbele 'knockout' mutanten gemaakt in *Synechocystis*. De fenotypen van de mutanten verkregen uit deze studie en de eerder beschreven mutanten M55 (*ndhB* 'knockout'), SM8 (getrunceerd FNR) en M55-SM8 werden bestudeerd op de cyclische capaciteit van PSI onder normale condities en condities met een hoge zoutconcentratie in de aanwezigheid van geselecteerde remmers. Analyses werden gedaan met puls amplitude modulatie (PAM) reflectie spectroscopie om P700⁺ reductie te bepalen, met foto-akoestische energie opslag (PAS) en door de licht geïnduceerde pH veranderingen te meten met behulp van een fluorescente acridine kleurstof. De snelheid van P700⁺ reductie van alle mutanten was significant langzamer dan in het wild type. De resultaten in PAM werden grotendeels bevestigd door PAS. Het fenotype van de *ssr2016* mutant werd bevestigd, de uitschakeling ('knock out') van dit hypothetische genproduct leverde ongevoeligheid voor antimycine A op. Een potentiële rol voor *slr1208* in ferredoxine oxidatie wordt voorgesteld als een werkhypothese voor toekomstig onderzoek. Daarbij komt ook de vraag of het product van *slr1208* op functioneel niveau interacties aangaat met het product van *ssr2016* aan de orde komt. Een mogelijk schema van elektrontransferroutes en de functionele positie van deze eiwitten in de cel werd uit de resultaten afgeleid.

Een andere mutant van *Synechocystis*, welke onze aandacht trok vanwege veranderde kinetische eigenschappen van de cyclische electronentransfer van PSI, was een mutant die de F en J subunits van PSI mist. In onze studie hebben we een verschil in fenotype tussen de *psaFJ* mutant en het wild type waargenomen, resulterend in een langere adaptatieperiode

na overbrenging van cellen in de exponentiële groeifase van een standaard medium naar een medium met een hoge zoutconcentratie. Uit onderzoek naar de fotosynthese van de mutant blijkt een beschadigde functionaliteit van PSI. Onderdrukking van PSI in de *psaFJ* mutant gaat samen met een verminderde elektronenflux van de acceptorkant van PSI naar het PQ-cytochroom *b₆f* complex (cyclische transfer) en gaat tevens samen met de de-repressie van het *isiAB* operon. De laatste codeert voor de door ijzerstarving geïnduceerde eiwitten IsiA (of CP43') en IsiB (flavodoxine). Het IsiA gen komt veel voor in cyanobacteriën in mariene ecosystemen, waar de naam *isiA* is ontstaan: *iron stress inducible*. Door de grote hoeveelheid ijzerbevattende eiwitten in de elektrontransportketen heeft een ijzerlimitatie een groot effect, in het bijzonder op PSI, wat waarschijnlijk resulteert in een toegenomen productie van reactieve zuurstofverbindingen. Om deze reden stellen we voor dat oxidatieve stress, voortkomend uit een vermindering in elektronenflux van het stroma naar PQ, met als gevolg ophoping van electronen met lage redoxpotentiaal die reactief zijn met zuurstof aan de acceptorkant van PSI, als trigger functioneert voor de inductie van het *isiAB* operon. Onze experimenten, waarin kunstmatig opgewekte oxidatieve stress in ijzerloos medium een overmatige aanwezigheid van het *isiA* transcript liet zien, hebben sterk bijgedragen aan deze link tussen oxidatieve beschadiging en *isiA* expressie. Deze observatie demonstreerde dat de inductie van de *isiAB* expressie waarschijnlijk optreedt bij oxidatieve stress als secundair gevolg van een stress als ijzerlimitatie of een hoge zoutconcentratie of de afwezigheid van de PsaF/J subunits.

Het feit dat IsiA eiwitten in cellen voorkomen is een fenomeen op zichzelf. Het *isiA* gen (*sll0247*) codeert voor een hydrofoob eiwit van ca. 37 kDa, dat voor een groot gedeelte overeenkomt met het CP43 (PsbC) eiwit van PSII en wordt daarom ook vaak CP43' genoemd. Recent onderzoek heeft laten zien dat in *Synechocystis* sp. PCC 6803 en in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 onder een ijzerlimitatie een gesloten ring van 18 IsiA eiwitten het trimere PSI omgeven. Elke IsiA subunit bindt aan 16-17 chlorofyl-*a* moleculen en dient als een snelle en efficiënte antenne voor PSI in het supercomplex. Het is gesuggereerd dat Chlorofyl-*a* moleculen, welke zich binden aan de lichte eiwitten van PSI, een rol te spelen in de energie-overdracht van de buitenste IsiA-ring naar het reactiecentrum. Om de rol van deze kleine PSI-subunits in het PSI-IsiA supercomplex te kunnen onderzoeken hebben we de *psaFJ* mutant onder ijzerloze condities gekweekt. Analyses van de individuele deeltjes met behulp van een elektronenmicroscop lieten zien dat circulaire PSI-IsiA-complexen uit een centrale PSI trimeer bestaan omgeven door een ring van 17 IsiA-units, één minder dan het wild type supercomplex. Deze resultaten tonen aan dat IsiA kan binden aan PSI in

verschillende schikkingen en dat de grootte van het PSI-complex het aantal IsiA-units in de omliggende ring bepaalt. Een ijzerlimitatie was niet noodzakelijk om de vorming van PSI-IsiA supercomplexen te induceren in de *psaFJ* mutant, maar de hoogste opbrengst van supercomplexen was na een ijzerlimitatie van 48-64 uur. Na langere groei onder ijzerloze condities verandert de situatie: PSI verdwijnt vrijwel geheel en het IsiA-eiwit wordt veruit het meest voorkomende chlorofyleiwit-complex in de mutant. Een partiele zuivering en daaropvolgende karakterisatie door middel van massaspectrometrie, spectroscopie en elektronenmicroscopie liet de aanwezigheid zien van verschillende typen van IsiA-aggregaten, van welke een donutvormig complex dat niet met PSI was geassocieerd het meest opzienbarend is. Dit ringvormig complex is kleiner dan de normale ring van 18 IsiA-eiwitten rond een wild type trimeer PSI-complex of de 17-meer homoloog die we in de *psaFJ* mutant hebben waargenomen, maar groot genoeg om een monomeer PSI-complex te omvatten. Wij concluderen hieruit dat de combinatie van oxidatieve stress en een ijzerlimitatie, waaraan PSI in de *psaFJ* mutant blootgesteld wordt, in de accumulatie van IsiA resulteert in een vorm die niet bijdraagt aan het opvangen van licht voor PSI. Verdergaand onderzoek bracht aan het licht dat het aantal gebonden IsiA-eiwitten sterk gecorreleerd was aan de mate van ijzer-stress. In het wild type kan het variëren van 7 units per PSI-trimeer tijdens kortdurende ijzer-stress tot aan 35 units in een dubbele ring om een PSI-monomeer na een langere periode van ijzer-stress. Deze grote antenne zou 560 chlorofyl-moleculen bevatten en zou een verzeenvoudiging betekenen van de lichtopvangcapaciteit van PSI. Tegelijkertijd vormt een significant gedeelte van IsiA supercomplexen zonder PSI, waarschijnlijk om fotoprotectie te bewerkstelligen. Het IsiA-eiwit is zeker uniek te noemen, vanwege het feit dat het flexibele supramoleculaire structuren van variabele grootte kan vormen om afhankelijk van de mate van ijzer-stress te reageren.

De observaties in dit proefschrift laten een opmerkelijke en onvoorziene functionele flexibiliteit in cyanobacteriën zien. Een gedeelte van deze flexibiliteit is afkomstig van de aanwezigheid van alternatieve routes in cyclische elektronenoverdracht van Fotosysteem I. Verder hebben we bewijs gepresenteerd voor het feit dat een specifiek molecuul dat met Fotosysteem I is geassocieerd, namelijk het door ijzerstarvering geïnduceerde eiwit IsiA, verschillende structuren kan aannemen die afhankelijk zijn van de omgevingscondities en die waarschijnlijk ook een opmerkelijk bredere functionaliteit van het IsiA chlorophyll eiwitcomplex inhoudt dan het oogsten van licht voor de fotosynthese.