



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Improvisations in phototrophy. Protein engineering and functional investigation of rhodopsin proton-pumps

Ganapathy, S.

Citation

Ganapathy, S. (2017, December 12). *Improvisations in phototrophy. Protein engineering and functional investigation of rhodopsin proton-pumps*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/57985>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/57985>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/57985> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Ganapathy, S.

Title: Improvisations in phototrophy. Protein engineering and functional investigation of rhodopsin proton-pumps

Issue Date: 2017-12-12

Samenvatting

Zonne-energie is een alom voorkomende en de meest krachtige bron van duurzame energie die beschikbaar is op onze planeet. Zonne-energie wordt benut door de meeste planten en een deel van de micro-organismen voor hun groei en voortbestaan. Fotosynthetische organismen vangen zonlicht in om atmosferische kooldioxide vast te leggen en chemische energie te genereren, die in principe ook bio-economisch toegepast kan worden voor de productie van biodiesel, duurzame chemicaliën, secundaire metabolieten en biomassa. Echter, de industriële toepasbaarheid van fotosynthese wordt beperkt door de opbrengst van de reactie. Een significant deel van de foton-energie wordt gebruikt door het fotosynthetische organisme voor groei en onderhoud en is nodig om het fotosynthetische bedrijf in werking te houden. Daarnaast kan de fotosynthese vrijwel geen gebruik maken van het nabije-infrarood (NIR) deel van het zonnenspectrum, dat ongeveer de helft levert van de fotonen-flux op het aardoppervlak.

In dit proefschrift, propageren we het gebruik van microbiële rhodopsines als een alternatief fotosysteem, met tegelijkertijd een complementaire aanpak voor efficiënter gebruik van de fotonen in het zonnenspectrum. Microbiële rhodopsines zijn lichtgevoelige pigmenten die een rol spelen bij groei en adaptatie van een grote populatie micro-organismen. Dit relatief simpele, moduleerbare fotosysteem gebruikt een retinal molecuul als chromofoor om de omzetting van zonlicht naar chemische energie te faciliteren. Er zijn duidelijke aanwijzingen, dat fototrofie gebaseerd op rhodopsines van significant belang is voor de balans tussen de verschillende biosferen en bovendien meerdere biotechnologische toepassingen heeft. In dit proefschrift beschrijven we de aanpassing van twee proton-pompende rhodopsines, namelijk proteorhodopsine (PR) en *Gloeobacter* rhodopsine (GR), met het doel hun actie-spectrum te verschuiven naar het NIR gebied. In hoofdstuk 1, wordt een korte introductie over dit type protonpompen en hun onderliggende mechanisme gegeven. Daarnaast beschrijven we het onderzoeksdoel, namelijk

het genereren en toepassen van NIR-actieve protonpompen als aanvulling op de natuurlijke fotosynthese.

In **hoofdstuk 2**, introduceren we de eerste stap naar spectrale aanpassing van PR en GR door modificatie van zowel het eiwitgedeelte als de chromofoor te combineren. We maken gebruik van retinal analoga, die verschillen qua structurele en elektronische eigenschappen. Combinatie van deze analoga met specifieke eiwitmutanten blijkt een synergistisch effect te geven op de spectrale eigenschappen van de pigment analoga. We zijn daarmee in staat om zowel rood- als blauwverschuivingen in de absorptie-spectra van PR en GR te genereren met slechts een gering effect op de protonpompactiviteit. In dit hoofdstuk beschrijven we onder meer het, dankzij een extra dubbele binding in de koolstofring, bathochrome analogon retinal A2, dat geschikt is als sjabloon voor verdere bathochrome chromofoor aanpassingen.

We concentreren ons in **hoofdstuk 3** op verdere modificatie van retinal A2 met het doel het bathochrome effect te versterken. De conjugatie met de koolstofring in retinal A2 is uitgesmeerd door introductie van elektronenzuigende groepen op de C3 positie. Van alle analoga die zijn getest bleek degene met een 3-monomethylamino subsituent, het MMAR, de grootste roodverschuiving te bewerkstelligen. PR en GR pigment analoga verkregen met MMAR blijken nog actief in NIR licht (730 nm) en zijn daarmee de eerstbekende NIR-actieve protonpompen. Opmerkelijk is dat MMAR zeer gevoelig is voor de elektrostatische omgeving in zijn bindingsplaats. Dit blijkt uit de reusachtige ~220 nm roodverschuiving in de absorptieband bij aanzuren. Een vergelijkbare verschuiving wordt ook bewerkstelligd in combinatie met een specifieke mutatie in het actieve centrum. Het resulterende pigment-analoon PR-D212N,F234S:MMAR vertoont zonder aanzuring al een absorptieband met een piek bij 750 nm en is daarmee het meest rood-verschoven nog actieve microbiële rhodopsine tot nu toe beschreven.

De invloed van een aantal specifieke mutaties op het absorptieprofiel en de activiteit van PR en GR zijn in de loop van dit project getest. Een nadeel inherent aan deze benadering is dat het bijna onmogelijk is om de novo te voorspellen of en hoe een bepaalde mutatie de spectrale eigenschappen en/of functie van deze eiwitten zal beïnvloeden. In een alternatieve aanpak hebben wij een “Directed Evolution” (Gestuurde Evolutie) strategie ontwikkeld om spectrale varianten van PR en GR te genereren, zoals gedetailleerd wordt beschreven in **hoofdstuk 4**. Hiertoe zijn verschillende selectiecriteria getest, waarbij bacteriële chemotaxis het meest effectief blijkt. Dit heeft geresulteerd in een nieuw, op chemotaxis gebaseerd, Gestuurde Evolutie protocol, waarmee de eerste resultaten veelbelovend zijn. Dit protocol biedt de mogelijkheid om spectrale en/of meer actieve varianten van rhodopsine protonpompen te ontwikkelen.

De verschillende mutanten en pigment analoga die beschreven zijn in dit proefschrift vormen een zeer geschikt doelwit voor gedetailleerde biofysische karakterisatie. Door het amfipathische karakter van membraaneiwitten is een vetachtige micro-omgeving vereist, die mede hun structuur en dynamiek bepaalt. In dit verband hebben we de invloed van verschillende op detergentia of lipiden gebaseerde model-systemen getest op stabiliteit, spectrale eigenschappen en oligomerisatie van PR en GR, zoals beschreven in **hoofdstuk 5**. We concluderen dat de keuze van een geschikte micro-omgeving afhangt van de onderzoeksvraag en de bijbehorende methodologie. Daarbij laten we voorbeelden zien van biofysische karakterisatie van PR en GR, waarvoor de verschillende membraan-modelsystemen geschikt zijn.

Hoofdstuk 6 bespreekt de perspectieven van het onderzoek beschreven in dit proefschrift. Samengevat hebben we aanzienlijke vooruitgang geboekt in de ontwikkeling en karakterisatie van NIR-actieve rhodopsine protonpompen. Vervolgstudies gericht op meer theoretische en biofysische karakterisatie van deze pigmenten zijn al in gang gezet. Het op chemotaxis gebaseerde “Gestuurde Evolutie” protocol, beschreven in dit proefschrift, biedt de mogelijkheid tot verdere ontwikkeling van deze pigmenten, en kan in het

algemeen worden toepast op energie-genererende lichtgevoelige systemen. Onze conclusie is, dat de in dit proefschrift beschreven NIR-actieve protonpompen een belangrijk perspectief kunnen bieden bij meerdere biotechnologische toepassingen, zoals in bio-economische en kunstmatige fotosynthese, optogenetica en membraansensor technologie.