

University of Groningen

## Pathogenic, versatile and tunable activity of sortase, a transpeptidation machine

Wójcik, Magdalena

DOI:  
[10.33612/diss.119637108](https://doi.org/10.33612/diss.119637108)

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*  
Wójcik, M. (2020). *Pathogenic, versatile and tunable activity of sortase, a transpeptidation machine*.  
<https://doi.org/10.33612/diss.119637108>

### Copyright

Other than for strictly personal use, 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), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Bacteriële sortasen zijn een zeer interessant, maar ook uitdagend onderwerp van studie. De hele familie bestaat uit zes verschillende groepen en elke groep bestaat uit honderden verschillende leden. Ondanks de algemene kennis over sortasen, voornamelijk verkregen uit studies uitgevoerd op *Staphylococcus aureus* sortase A (SrtA), zal elk lid van de sortase-familie afzonderlijk moeten worden onderzocht op specificiteit en activiteit. Sortasen zijn bovendien een groep enzymen met twee kanten, ze kunnen worden gebruikt als een doel voor nieuwe antibiotica-strategieën en als een hulpmiddel voor biotechnologische toepassingen. Dergelijke mogelijkheden laten de deur wijd open voor een groot aantal onderzoeken die op dit enzym kunnen worden uitgevoerd; het onderzoek beschreven in dit proefschrift richtte zich op SrtA van twee stammen van Gram-positieve bacteriën, *Staphylococcus aureus* en *Streptococcus pyogenes*. Ik onderzocht het potentieel van SrtA als een doelwit voor antimicrobiële geneesmiddelen en als hulpmiddel voor site-specifieke conjugaties. Tijdens het verkennen en verbeteren van de functies van SrtA, maakte ik gebruik van verschillende eiwittechnieken. Daarnaast heb ik gekeken naar de recente ontwikkelingen in high-throughput screening systemen en een van deze methoden op de evolutie van SrtA uit *S. aureus* toegepast.

### Sortase als een doelwit

Gram-positieve micro-organismen, in het bijzonder bacteriën die behoren tot een groep van Gram-positieve cocci, vormen een ernstige bedreiging voor de menselijke gezondheid. Het brede spectrum van ziekten waarvoor zij verantwoordelijk zijn omvat onder meer longontsteking, toxisch shock syndroom, huidinfecties en hersenvliesontsteking. Een van de belangrijkste verschillen tussen Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën is de samenstelling van de polymeerlaag aan de buitenkant van het plasmamembraan, het peptidoglycaan. Grampositieve bacteriën hebben een veel dikkere peptidoglycaanlaag dan de Gram-negatieve bacteriën. Moleculen die aan het peptidoglycaan binden zijn onder meer verschillende virulentiefactoren - eiwitten die een rol spelen in het binnendringen van de gastheer, kolonisatie en ontwikkeling van infecties. Hoewel virulentiefactoren sterk kunnen variëren in hun functie en doel, moeten de meeste van hen dezelfde transpeptidatie reactie ondergaan voordat ze succesvol kunnen binden aan de peptidoglycaanlaag. De "machine" verantwoordelijk voor deze reactie bestaat uit leden van de sortase superfamilie die gevonden kunnen worden in de meeste stammen van Gram-positieve bacteriën.

Tot nu toe hebben gen knock-out studies in muismodellen aangetoond dat *S. aureus* mutanten die het SrtA gen missen niet meer in staat zijn om te kunnen infecteren.

Dat komt door het ontbreken van virulentiefactoren aan de oppervlakte van de cel. Ook hebben studies op *S. pyogenes* aangetoond dat een SrtA-knockout stam gevoelig is voor fagocytair doding. Mutanten zonder SrtA enzym vertoonden geen groeistoornissen wat suggereert dat het enzym niet essentieel is voor de levensprocessen van bacteriën. Dus door te kiezen voor Sortase als doelwit voor nieuwe antibiotica-therapieën kan de selectieve druk op de overleving van bacteriën worden verminderd, waardoor het potentieel voor antibiotica resistentie wordt verlaagd.

Hoofdstuk 2 richt zich op het onderzoek op SrtA uit *S. pyogenes* als therapeutisch doelwit voor de ontwikkeling van antimicrobiële geneesmiddelen. Hiervoor werd een bank ontworpen van stikstof bevattende aromatische verbindingen met verschillende substitutiegroepen en gescreend op een krachtige remmer. De meest veelbelovende remmer, C10 met een  $IC_{50} = 10 \mu M$ , werd geselecteerd voor verder onderzoek, dat bestond uit de bepaling van het remmingsmechanisme en de relatie tussen de structuur en de activiteit. Interessant is dat de remmer C10 een hoge specificiteit vertoonde voor *S. pyogenes* SrtA terwijl het de verwante SrtA van *S. aureus* niet remde. Hoewel het effect van remming van SrtA alleen in vitro getest was, zijn we ervan overtuigd dat deze op indole gebaseerde verbinding kan helpen bij de verdere ontwikkelen van sortaseremmers.

### **Sortase als een gereedschap**

Enzym manipulatie is het aanbrengen van veranderingen van de genetische informatie van enzymen die kunnen leiden tot aanpassing of verbetering van hun eigenschappen en toepassingen. Er zijn verschillende methoden die op dit gebied kunnen worden gebruikt, waaronder gerichte mutagenese en chemische modificatie. Om uit de enzymenpool de beste variant(en) te kunnen vinden, is een betrouwbare selectie methode op residuen bestemd voor modificatie belangrijk, evenals een geschikt screeningplatform. Al meer dan dertig jaar van enzym manipulatie heeft niet alleen veel eiwitten met verbeterde eigenschappen gebracht, maar ook vooruitgang in het proces van engineering.

Het grootste deel van dit proefschrift draait om technische aspecten van SrtA. De sortase-gemedieerde transpeptidatiereactie, ook wel "sortagging" genoemd, heeft een groot potentieel om te worden gebruikt in verscheidenheid van op biotechnologie gebaseerde toepassingen: bv. voor het labelen of modificeren van recombinant tot expressie gebrachte eiwitten en eiwitten op de oppervlakte van levende cellen, en covalente verankering van eiwitten aan een stevig platform.

Na productie van oplosbare, verkorte SrtA van *S. aureus* en *S. pyogenes* is de transpeptideringsreactie met succes in vitro gebruikt. Desalniettemin is de katalytische efficiëntie van sortase erg slecht en verlaagt daarom het potentieel van sortagging.

Zoals beschreven in hoofdstukken 3, 4 en 5 werden eiwit manipulatie methoden, zowel rationeel als willekeurig, met succes toegepast om SrtA eigenschappen te verbeteren. Het doel van hoofdstuk 3 was de verbetering van *S. pyogenes* SrtA activiteit en de verbreding van zijn substraatspecificiteit. Met behulp van een semi-rationele methode als Rosetta-modellering en herhalende verzaadigingsmutagenese (ISM), werd een drievoudige SrtA mutant gevonden met een tweevoudige verhoogde affiniteit in de herkenning van het LPETA-substraat in vergelijking met het wildtype enzym. Bovendien werden in hoofdstuk 4 loop grafting studies uitgevoerd op *S. pyogenes* SrtA. De studie gaf inzicht in het ontwerp en de functie van de  $\beta 7/\beta 8$ -lus van dit enzym. Indirect bevestigde deze studie het belang van enkele aminozuren die zich in de  $\beta 7/\beta 8$ -lus van de *S. aureus* SrtA bevinden, waarvan de lus in de grafting experimenten was afgeleid. Helaas is de kristalstructuur van de SpSrtA WT alleen opgelost voor het vrije enzym zonder het substraat analoog (PDB 3FN5). Informatie over het gedrag van SpSrtA WT in aanwezigheid van het substraat was afkomstig van modelleringsstudies en manipulatiestudies met behulp van lusruil.

De evolutie van eiwit thermostabiliteit is een complex proces dat bestaat uit verschillende evolutionaire routes die leiden tot een verhoogde stabiliteit. Met andere woorden, homologe eiwitten gevonden in twee organismen die zich in verschillende omgevingen bevinden, kunnen zich aanpassen aan de omstandigheden die zich voordoen met behulp van verschillende stabilisatiemechanismen, waardoor variabele modificaties in hun structuur worden gegenereerd. De focus van hoofdstuk 5 lag op de verkenning en aanpassing van *S. aureus* SrtA in termen van thermostabiliteit. Het enzym werd onderworpen aan een consensus ontwerp benadering; uit deze benadering werden specifieke mutaties in het enzym geïntroduceerd en hun effect op de thermostabiliteit van SrtA werd geëvalueerd met behulp van circulaire dichroïsme spectroscopie (CD). Twee mutaties, M155V en V193R, bleken de thermostabiliteit van SrtA te verhogen en de activiteit van het enzym te verbeteren. In combinatie met een bekende pentamutant, verleende de M155V mutatie ook een  $\text{Ca}^{2+}$ -onafhankelijkheid aan het enzym. Deze studie liet zien hoe een consensus ontwerp kon worden toegepast voor de verbetering van SrtA-stabiliteit. We kunnen ons voorstellen dat de in dit onderzoek verkregen

varianten kunnen worden gebruikt voor het uitvoeren van de conjugatie reactie in een intracellulaire omgeving met een lage  $\text{Ca}^{2+}$  concentratie.

Aangezien collectie screening op mutanten met gewenste eigenschappen een aanzienlijk hoeveelheid tijd en middelen vereist, biedt hoofdstuk 6 een overzicht van twee high-throughput-technieken die zijn ontstaan op het gebied van eiwittechnologie samen met de ontwikkeling van compartimentering: Fluorescentie-geactiveerde cel sortering (FACS) en microfluidics. Het review richt zich vooral op de voordelen in de toepassingen van deze methoden in de context van eiwittechnologie, met een nadruk op toepassingen in enzymtechnologie. Een voorbeeld van een FACS gebaseerde techniek, de zogenoemde oplosbaarheid in cellulaire inkapseling en screening (CHESS), en de toepassing ervan in sortase engineering wordt beschreven in hoofdstuk 7. Dit hoofdstuk onderzoekt de implementatie van de CHESS-techniek om de screeningstijd van een collectie van SrtA mutanten te verkorten. Hoewel het inkapselingsproces succesvol was, bleek de standaardisatie van deze methode voor de ontwikkeling van SrtA uitdagender dan verwacht; het transpeptidatie product kon niet worden gedetecteerd door FACS, noch door confocale microscopie.

### **Toekomst perspectief**

Nu de moleculaire functies van sortasen zijn opgehelderd, komen door deze verworven kennis nieuwe onderzoeken van de grond voor het ontwikkelen van nieuwe antimicrobiële middelen en diagnostische hulpmiddelen. De sortase-superfamilie vertegenwoordigt voor antibiotica een uniek nieuw doelwit en een begin van de zoektocht naar krachtige remmers van dit enzym. Dit proefschrift toonde aan dat de slimme screening van SrtA van *S. pyogenes* in remmingsstudies resulteerde in de ontdekking van een krachtige remmer. De remming van SrtA is echter alleen in vitro aangetoond. Voor het vaststellen van de antimicrobiële werking van de remmers zijn in vivo studies op *S. pyogenes* cellen nodig. Bovendien, het introduceren van een infectiemodel als *Galleria mellonella* bij de SrtA remming studie zou een beter inzicht kunnen geven tussen de interactie van klein molecuul remmers en het SrtA enzym in een veel natuurlijkere omgeving. Hoewel het geselecteerde kleine molecuul de beste oplosbaarheidseigenschappen toonde in vergelijking met andere hits, moet het vermogen van de verbinding om door de peptidoglycaanlaag binnen te dringen en het sortase enzym te bereiken nog worden onderzocht. Tenslotte, co-kristallisatie van het enzym met de remmer(s) zou een beter beeld van de interactie tussen het enzym en het molecuul of moleculen geven en een leidraad vormen bij het verkennen van bestaande en nieuwe

sortaseremmers. Tenslotte moet de soortspecificiteit van remmers inzicht geven in het potentiële spectrum van pathogenen dat met sortase remmers kan worden bestreden.

Wat betreft de engineering van sortasen voor transpeptidatiereacties is al wat werk verzet, maar er is nog ruimte voor verbetering. Toekomstige doelen betreffen het verbreden van substraatspecificiteit en het aantal acceptor herkenningsequenties van sortase. Dit kan leiden tot de ontwikkeling van nieuwe eiwitfusies, bv. vertakte polypeptiden, polyeiwitten, cyclische peptiden en nieuw of verbeterde toepassingen in de in vivo eiwitligatie of chemo-enzymatische plaats-specifieke labeling van histologische monsters. Tevens zou een betere controle over de reactieomstandigheden het effect van nevenreacties kunnen minimaliseren waar andere nucleofielen concurreren met het gewenste nucleofiel tijdens de transpeptidatiereactie uitgevoerd door sortase. In de toekomst kan dit de hoeveelheid reactiecomponenten die nodig zijn voor de optimale uitvoering van transpeptidatiereactie verlagen. Tenslotte, maar even belangrijk, afgezien van SrtA zijn er een aantal andere leden van de sortase-familie, die potentieel plaats-specifiek zou kunnen zijn voor conjugatiereacties. Sortasen die behoren tot klasse C, die verantwoordelijk zijn voor de assemblage van pili, kunnen bijvoorbeeld isopeptidebindingen vormen. Een van de mogelijke toepassingen van deze reactie is de verbreding van plaats specifieke antilichaam-geneesmiddel koppelingen en dubbele plaats-specifieke labeling van eiwitten.

Natuurlijk kan een eenvoudige en high-throughput techniek voor het screenen van alle gegenereerde mutanten het engineeringproces van SrtA nog verder verbeteren. Hiervoor moet er worden gewerkt aan de ontwikkeling van nieuwe methoden op basis van flow cytometrie of microfluidica. Een van de belangrijkste onderdelen van deze vooruitgang is de voortgang van compartimenteringstechnieken. Geïnspireerd door de compartimenten van de natuur, zoals prokaryotische of eukaryotische cellen, zijn verschillende strategieën ontwikkeld. Een van de technieken was het genereren van door de mens gemaakte, op polymeer gebaseerde compartimenten genaamd cellulaire high-throughput inkapseling, solubilisatie en screening (CHESS). Tot dusverre werd deze methode met succes toegepast op de evolutie van transmembraanreceptoren en oplosbare eiwitten, maar niet op de evolutie van enzymen. Omdat SrtA een relatief klein enzym is, heeft het in toekomstige experimenten mogelijk een extra voorbereidingsstap nodig om groot genoeg te zijn om in de capsules te blijven. Bovendien is de keuze en afgifte van de geschikte reactiecomponenten aan de capsule een ander uitdagend aspect voor de opzet van CHESS-methodologie.

