

University of Groningen

## Artificial control of protein activity

Bersellini, Manuela

**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:*

2017

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

*Citation for published version (APA):*

Bersellini, M. (2017). *Artificial control of protein activity*. University of Groningen.

### 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.*

### **Kunstmatige regulatie van eiwitactiviteit**

Translated by Dowine de Bruijn

Goede regulatie van eiwitactiviteit is van cruciaal belang voor het correct functioneren van een cel en is daarom essentieel voor elk levend organisme. Een cel is een begrensde omgeving met een hoge dichtheid aan verschillende moleculen. Biologische processen kunnen hier spontaan verlopen. Een strakke controle over tijd en ruimte is daarom vereist voor elk biologisch proces, metabolische reactie of signaal. Door de jaren heen zijn er veel studies gedaan naar deze natuurlijke regulatiemechanismen. Ook is er veel werk verricht om kunstmatige regulatiemechanismen te ontwerpen voor natuurlijke eiwitten. Kunstmatig gereguleerde eiwitten geven inzicht in de natuurlijke metabolische reactiewegen en signaalnetwerken. Ook vinden ze toepassingen in de synthetische biologie, in het ontwerp van medicijnen en afgiftesysteem ervan en in de ontwikkeling van (bio)sensoren. Met name allosterische regulatie - gedefinieerd als de controle van eiwitactiviteit door binding van een effectormolecuul *op een andere plaats* dan het actieve centrum van het eiwit - is één van de meest bestudeerde natuurlijke regulatiemechanismen. Het ontwerp van kunstmatige allosterie in eiwitten of enzymen maakt het mogelijk om schakelaars te ontwerpen wiens activiteit afhankelijk is van een externe stimulant of verandering in de omgeving.

Het eerste hoofdstuk van dit proefschrift beschrijft kort de verschillende mechanismen voor natuurlijke regulatie van eiwitactiviteit en bevat een uiteenzetting van de technieken die tot dusverre ontwikkeld zijn voor kunstmatige regulatie. Deze technieken maken onder meer het gebruik van kleine effectormoleculen, binding van metalen, licht, DNA en binding van antilichamen. Een andere manier om eiwitactiviteit kunstmatig te reguleren is door katalytische activiteit te introduceren in eiwitten die dit van nature niet bezitten. Op deze manier zijn enzymen ontworpen en beschreven met reactiviteit die niet in de natuur voorkomt. Met name de toevoeging van een transitiemetaal als cofactor aan een eiwit is een succesvolle strategie gebleken om het repertoire van enzymatische chemische reacties te verbreden. Dit proefschrift beschrijft ons aandeel in het veld van kunstmatige regulatie van eiwitactiviteit. Het eerste deel van dit proefschrift beschrijft verschillende methoden om eiwitactiviteit van zowel natuurlijke enzymen (hoofdstuk 2 en 3) als kunstmatige enzymen

(hoofdstuk 4) te reguleren. Het tweede deel van dit proefschrift (hoofdstuk 5 en 6) beschrijft het ontwerp en de karakterisatie van nieuwe kunstmatige metaalenzymen.

Hoofdstuk 2 en 3 beschrijven een poging om zowel met supramoleculaire interacties als met metaalcoördinatie controle uit te oefenen over de herassemblage van een gesplitst enzym. Het gebruik van secundaire interacties om herassemblage te bewerkstelligen van een gesplitst eiwit, wiens twee afzonderlijke fragmenten geen activiteit vertonen, is een gangbare methode om kunstmatige regulatie van eiwitactiviteit te bestuderen. Beide hoofdstukken zijn gefocust op het gesplitste enzym murine dihydrofolate reductase (mDHFR) als modelenzym.

Met het werk beschreven in hoofdstuk 2 is geprobeerd een beter begrip te krijgen van eiwitten, wiens activiteit afhankelijk is van kleine moleculen, door de dirigerende activiteit van DNA te combineren met een supramoleculaire gastheer-gast interactie. Deze combinatie dient als modulair ontwerp om herassemblage van het gesplitste enzym te beïnvloeden met kleine moleculen. Korte oligonucleotiden zijn hiervoor covalent gebonden aan de fragmenten van het gesplitste enzym mDHFR. Twee sequenties complementair aan deze oligonucleotiden zijn vervolgens uitgerust met supramoleculaire receptoren. Hybridisatie van deze receptor-uitgeruste oligonucleotiden met de oligonucleotiden verbonden aan de mDHFR fragmenten en tegelijkertijd binding van een gastmolecuul aan beide supramoleculaire receptoren faciliteren de herassemblage van het gesplitste enzym. De synthese en karakterisatie van de verschillende onderdelen van het gesplitste enzym zijn beschreven, alsmede de eerste resultaten van de herassemblage in aanwezigheid van het doelmolecuul.

In hoofdstuk 3 worden verschillende strategieën besproken van metaalgestuurde herassemblage van het gesplitste mDHFR enzym. In het ontwerp wordt gebruik gemaakt van een chelaat metaalcomplex tussen een metaalion en twee liganden die geïnstalleerd zijn op de fragmenten van mDHFR. De synthese van deze fragmenten, uitgerust met een metaalbindend deel, is beschreven via twee verschillende strategieën: (1) genetische installatie van een onnatuurlijk metaalbindend aminozuur en (2) de introductie van liganden via post-translationele modificaties. In deze laatste strategie werden de mDHFR fragmenten, gefuseerd aan het maltose-bindend-eiwit en uitgerust met een bipyridine-, phenanthroline- of terpyridineligand. Vervolgens zijn verschillende metaalionen ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) gebonden. Helaas bleek de metaalgestuurde herassemblage van het gesplitste enzym uiteindelijk niet succesvol met het

huidige ontwerp. Vervolgstudies zullen moeten worden gedaan om het functionele enzym wel te verkrijgen.

Hoofdstuk 4 beschrijft het ontwerp, de synthese en karakterisatie van een metaalion gereguleerd kunstmatig metaalenzym. In deze studie is er gekozen om gebruik te maken van een supramoleculair geassembleerd kunstmatig metaalenzym gebaseerd op LmrR. In dit ontwerp wordt een katalytisch actief koper-phenanthrolinecomplex gerekruteerd in de hydrofobische opening aan het dimeeroppervlak van het eiwit. Het resulterende enzym vertoont goede activiteit en selectiviteit in de vinyloge Friedel–Crafts alkylatie van indolen. Om de activiteit van dit hybride enzym via metaalionen te reguleren, is een extra regulerende site geïntroduceerd in LmrR door op specifieke posities bipyridineliganden te conjugeren. Deze liganden zorgen voor de vorming van een chelaat metaalcomplex wanneer zij divalent coördineren aan verschillende transitietaalionen ( $\text{Fe}^{2+}$  of  $\text{Zn}^{2+}$ ). Dit levert een inactief enzym op dat kan worden geactiveerd door middel van coördinatie aan  $\text{Fe}^{2+}$  ionen, of licht geactiveerd door middel van  $\text{Zn}^{2+}$  ionen. Deze metaalgestuurde regulatie kan worden vergeleken met natuurlijke allosterische mechanismen voor eiwitactiviteitsregulatie en vertegenwoordigt één van de weinige voorbeelden die tot dusver beschreven zijn voor de regulatie van de activiteit van kunstmatige metaalenzymen.

Hoofdstuk 5 introduceert Multidrug Resistance Regulators (MDRs) als een nieuwe klasse eiwitten om te dienen als bioplatform voor het ontwerp van kunstmatige metaalenzymen. Dankzij de grote diversiteit in structuur en de aanwezigheid van grote hydrofobische holten voor het binden van allerlei verschillende liganden, vormt deze familie van transcriptieregulators een groot scala aan bioplatformen die kunnen worden geselecteerd en getest voor verschillende reacties met gelijksoortige voorschriften. Van drie eiwitten behorend tot de TetR familie van MDRs – QacR, CgmR en RamR – zijn kunstmatige metaalenzymen gecreëerd door gebruik te maken van twee verschillende verankeringsstrategieën ter introductie van het transitietaalcomplex; De supramoleculaire strategie en de genetische installatie van een metaalbindend aminozuur. De reactiviteit van deze kunstmatige metaalenzymen is geëvalueerd in twee verschillende Lewiszuur gekatalyseerde reacties: de vinyloge Friedel–Crafts alkylatie van indolen en de tandem Friedel–Crafts conjugatie additie / enantioselectieve protonering. De *in vivo* installatie van het onnatuurlijk aminozuur (2,2-bipyridine-5yl)alanine (BpyA) leverde een aantal metaalenzymen op die duidelijk verschillende mate

van reactiviteit vertoonden in de twee bestudeerde reacties. Van deze nieuwe metaalenzymen bleek één variant, QacR Y123BpyA, de hoogste enantioselectiviteit te geven van alle metaalenzymen die ooit gecreëerd zijn door middel van *in vivo* installatie van een onnatuurlijk aminozuur voor de vinyloge Friedel–Crafts alkylatie. Het reactieproduct van dit enzym vertoonde een voorkeur voor het tegenovergestelde enantiomeer in vergelijking met de andere QacR- en LmrR gebaseerde metaalenzymen.

De eigenschappen en reactiviteit van deze QacR variant is vervolgens verder bestudeerd in hoofdstuk 6. QacR Y123BpyA wordt verkregen door zuivering uit bacterieculturen waar in de cel al metaalionen binden aan de bipyridineliganden. Het vertoont al katalytisch activiteit in de vinyloge Friedel–Crafts alkylatie van indolen zonder extra metaalionen toe te hoeven voegen. Spectroscopische en katalytische studies die tot dusverre gedaan zijn, suggereren dat  $Zn^{2+}$  in de cellen aan de bipyridinealanine in positie 123 bindt en dat dit verantwoordelijk is voor katalytische activiteit. Studies naar mogelijke toepassingen van dit kunstmatige metaalenzym voor katalyse *in vivo* is ook kort beschreven in dit hoofdstuk. Hoewel het niet mogelijk was om de katalyse met QacR Y123BpyA te bestuderen in afwezigheid van metalen in de *E. coli* cellen, gaf toevoeging van  $Cu^{2+}$  aan alle BpyA bevattende QacR varianten een merkbare hogere hoeveelheid product. Hoewel dit slechts een begin is, is dit werk veelbelovend voor het gebruik van kunstmatige metaalenzymen met metaalbindende onnatuurlijk aminozuren in cellen.

Samenvattend, bevat het werk gepresenteerd in dit proefschrift beide aspecten van kunstmatige controle over eiwitactiviteit. Van het ontwerp van kunstmatige regulatie van eiwitactiviteit in natuurlijke en kunstmatige enzymen tot de introductie van nieuwe reactiviteit in eiwitten die deze activiteit van nature niet bezitten. Een succesvol voorbeeld van het reguleren van de eiwitactiviteit van een kunstmatig enzym met een reactiviteit die niet in de natuur voorkomt, is beschreven en een nieuwe klasse van eiwitten is geïntroduceerd als variabel bioplatform voor het ontwerp van kunstmatige metaalenzymen. Tot slot zijn initiële studies naar de toepassing van kunstmatige metaalenzymen die onnatuurlijke aminozuren bevatten voor katalyse *in vivo* beschreven.