

University of Groningen

Sustainable membrane biosynthesis for synthetic minimal cells

Exterkate, Marten

DOI:
[10.33612/diss.98704569](https://doi.org/10.33612/diss.98704569)

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:
2019

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

Citation for published version (APA):
Exterkate, M. (2019). *Sustainable membrane biosynthesis for synthetic minimal cells*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.98704569>

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).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

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.

CHAPTER 6

Summary

Samenvatting

SUMMARY

One of the main challenges in synthetic biology is the bottom-up construction of a synthetic minimal cell from lifeless, individual components¹. Only once we can faithfully construct a synthetic cell that is capable of reproducing, we will be able to fully understand the molecular basis of life and how the individual processes together are able to form a living entity². Elementary for calling such a cell alive is its ability to reproduce, which includes growth and division of the surrounding boundary layer. In nature, such a boundary layer exists of phospholipids that orient into a bilayer structure, with their hydrophobic tails inwards, thereby separating the water-soluble cellular interior from the exterior. Besides forming a barrier, membranes have other functions as well, as they serve as a matrix for membrane proteins, thereby supporting their folding and activity. Often, the general properties of a membrane are insufficient to support full protein functioning and interactions with specific lipid species are needed. The inner-membrane of *Escherichia coli* is relatively well defined, in which only the presence of the phospholipid species phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylglycerol (PG) are essential for full functionality³. A membrane consisting of only these two lipid species would therefore form an excellent basis for a boundary layer of a synthetic minimal cell. In this thesis, we have focused on one of the aspects of cellular boundary layer reproduction, which is growth of the membrane, with the aim to create a fully functional module that can be readily implemented into a synthetic minimal cell.

Chapter 1 provides a general introduction into (self-)replication of synthetic compartments/ minimal cells. Here, mainly boundary layers that exist out of phospholipids are discussed, but other building blocks are considered as well, such as fatty acids⁴. Fatty acid-based membranes are far more suitable for self-replication, as they can grow and divide spontaneously. However, fatty acid vesicles are also intrinsically unstable and lack to support any membrane protein activity, thereby making phospholipids the preferred building block of a synthetic minimal cell. Phospholipids membranes do not spontaneously grow by insertion of new lipids, therefore membrane growth is coupled to phospholipid biosynthesis⁵. As an example, these coupled processes are extensively described for the model organism *E. coli*. In short, phospholipid synthesis starts with the formation of acyl-chains, that form the hydrophobic tails. Subsequently, the chains get coupled to a glycerol-3-phosphate (G3P) and inserted into the membrane. Finally, headgroup specificity is introduced, resulting in a wide variety of phospholipid species, among which PE and PG. This pathway is a template for many of the research regarding synthetic cellular phospholipid membrane expansion (including the work presented in **chapter 2**), for which the state of the art is summarized. Besides natural phospholipids, chemical phospholipid analogues are also experimented with as building blocks for a synthetic minimal membrane⁶. They are particularly of interest, as non-enzymatic synthesis steps can be introduced as well, thereby even enabling *de novo* membrane formation. This is not possible for natural enzymatic phospholipid biosynthesis, as the involved enzymes (e.g. glycerol-phosphate acyl-transferase) require the presence

of a membrane to function ⁷. The second part of **chapter 1** focusses on another step in boundary layer replication, which is membrane division. In *E. coli* this occurs via contraction of a membrane interacting protein ring, existing of, among others, FtsZ, FtsA and ZipA ⁸. The ring is positioned in the middle of the cell by the oscillating Min-system ⁹. Although, the *in vitro* division of phospholipid membrane-surrounding compartments is still in the early stages, some initial steps have been made, with respect to proto-ring formation and the reconstitution of encapsulated oscillating Min-waves.

Chapter 2 forms the framework of this thesis, as it describes the development of an *in vitro* phospholipid biosynthesis pathway that is utilized to expand liposomal membranes. The design of this phospholipid biosynthesis pathway is based on the template pathway present in *E. coli*, with a couple of modifications. Instead of generating acyl chains via the multi-complex Fatty acid Synthase (FAS) II, an alternative approach was used based on the catabolic enzyme FadD, which is involved in β -oxidation of fatty acids (FAs) ¹⁰. FadD uses already pre-made FAs in a simple two-step conversion, resulting in the direct production of FA-CoA, thereby skipping the complex, cycled chain elongation-based synthesis of fatty acids. Furthermore, the phosphatidylserine synthesizing enzyme PssA from *Bacillus subtilis* was used instead of the *E. coli* equivalent ¹¹. In this chapter, first the step-wise development of this *in vitro* phospholipid synthesis pathway is described. By the step-wise reconstitution of the purified proteins into preexisting liposomes, a cascade is built existing of eight different enzymes, that generates phospholipids from simple fatty acid building blocks. Depending on the substrate feed, this reconstituted system yields multiple phospholipid species that vary in acyl chain and polar head group composition (PA, PS, PG, PE, etc.), thereby emphasizing the versatility of this pathway. Moreover, the system is efficient as it converts large quantities of substrate (millimolar) completely into the phospholipid end-products, meanwhile making use of an internal CoA recycling loop, that ensures ongoing synthesis. Next the ability of this *in vitro* phospholipid synthesis pathway to expand membranes is discussed. The fidelity of the system allows for the synthesis of sufficient amount of phospholipid, such that appreciable membrane growth can be observed. However, it should be noted that the current amount of fatty acid substrate was about the maximum tolerable concentration, which is forming a block towards a continuously expanding system. For continuous phospholipid biosynthesis and membrane growth, we therefore envision a controlled feeding system in which oleic acid and other FAs are continuously added to the reaction vessel, such not to exceed inhibitory concentrations.

The engineered *in vitro* phospholipid biosynthesis described in **chapter 2** yields among others the phospholipids PE and PG. These two are the essential species present in the inner membrane of *E. coli*, which contains one other main lipid species: cardiolipin (CL). Depending on the growth phase, the membrane can contain up to 10% CL, thereby forming

a considerable part of the *E. coli* inner membrane¹². In **chapter 3** the previously engineered *in vitro* phospholipid synthesis pathway was further extended with the synthesis of CL. By implementing the cardiolipin synthase A (ClsA) from *E. coli*, two PG molecules can be converted into CL and a glycerol. As this reaction requires no additional energy, the reverse reaction starting from cardiolipin occurs as well, in which besides glycerol other substrates can be implemented as phosphatidyl-headgroup as well. In fact, almost any primary alcohol can serve as a headgroup, although compatibility with the binding pocket (size of sidechains) does influence the enzyme its functionality. This promiscuity gives rise to new functional opportunities of this enzyme, i.e. for the synthesis of natural relevant phospholipid species. Although commonly appearing phospholipid species, such as PE, PC and PS, could only be produced in very small quantities, the sensitivity of ClsA to such a wide variety of primary alcohols, could make it an interesting candidate to generate a synthetic boundary layer with a diverse phospholipid-headgroup composition.

The versatility of this enzyme is not only limited to its susceptibility to a wide variety of alcohol-headgroups, but includes the phospholipid-tail and glycerol-backbone as well. This is demonstrated by the ability of this enzyme to recognize archaeal phosphatidylglycerol (AG) and archaeal cardiolipin (aCL) as well, in which the tails consist of isoprenoid chains that are linked to a G1P backbone. Remarkably, mixing of PG and AG in the presence ClsA results in the formation of an additional hybrid-cardiolipin species (containing one pair of the archaeal-isoprenoid chains and one pair of the bacterial-fatty acid chains), thereby creating a novel lipid species.

The addition of ClsA towards the *in vitro* phospholipid biosynthesis pathway, PE, PG and CL can be synthesized, thereby completing the synthesis of all three main phospholipid species of the inner membrane of *E. coli*. Although a growing phospholipid bilayer is a great step forward towards a boundary layer in a synthetic minimal cell, additional functionality has to be implemented in the form of membrane proteins. Proteins embedded in, or associated with, the membrane play a pivotal role in membrane functions, as they facilitate regulatory processes of exchange and communication inside the cell, as well as, in between the interior and the environment¹³. Evidently, a synthetic minimal cell should comprise membranes containing membrane proteins. As a first preliminary step towards such a communicating membrane, in **chapter 4** the Sec-translocase (involved in protein excretion) from *E. coli* was introduced in the previously mentioned *in vitro* phospholipid biosynthesis pathway (**chapter 2**)¹⁴. For its functionality, the Sec-translocase is dependent on anionic phospholipids. Although the type of anionic lipid seems to be of hardly any influence on the translocase its activity, translocation becomes faster with an increasing concentration of anionic lipid all the way up to 30%. Interestingly, the well-established anionic lipid-dependent docking of the motor protein SecA onto SecYEG shows a different anionic lipid concentration-dependent behavior than the overall activity of the translocase, indicating a

second event in translocation that is dependent on the concentration of the anionic lipids. Molecular dynamic simulations show that anionic lipid is enriched around the lateral gate of SecY, in which the anionic lipid headgroup accesses the lateral gate, thereby stabilizing the pre-open state of the channel. Speculating further on the exact functions of anionic lipid in this position, electrostatic contribution of the anionic phospholipids at the lateral gate may directly stabilize positively charged residues of the signal sequence of an incoming preprotein, thereby possibly correctly positioning the entrant peptide.

The anionic lipid dependency of Sec-mediated translocation was utilized together with the aforementioned phospholipid biosynthesis pathway (**chapter 2**) to introduce extra functionality into an expanding membrane. SecYEG, as well as the *in vitro* phospholipid biosynthesis pathway, were reconstituted into proteoliposomes containing only PE and PC, but no anionic lipid. By feeding fatty acids, the anionic lipid PG was synthesized in large quantities, thereby activating the Sec-translocase mediated transport of the precursor protein pro-OmpA as a first step toward a communicating growing membrane boundary layer.

The research described in this thesis forms a framework for a membrane expansion module in a synthetic minimal cell, but growth is obstructed by the limited amount of substrate that can be added. Therefore, the next critical aspect would be to engineer a system that can continuously expand. In **chapter 5** the design of such a system is described. Continuous expansion means that a constant feed of building blocks is needed. Therefore, substrates have to be transported, passively or actively via membrane proteins, across the membrane into the synthetic compartment. Continuous synthesis also means a significant build-up of by-products, which in large quantities may become inhibiting. The preferred way to deal with these by-products is by recycling, as additional excretion can be avoided, meanwhile reducing the amount of building blocks that need to be imported. However, the excretion of some by-products seems unavoidable, for which again extra membrane proteins will be needed. Altogether, the transition from the *in vitro* phospholipid biosynthesis pathway described in **chapter 2** to a continuously expanding system cannot be achieved by simply adding more building blocks, but involves many additional aspects, for which many more (membrane) proteins are required. As a consequence, a continuously expanding system easily becomes a highly complex entity, which is difficult to engineer. To maintain simplicity, more controversial approaches should be considered as well, which includes chemical (non-enzymatic) synthesis of building blocks, as well as incorporation of exterior building blocks into the outer-leaflet of the membrane. Embedding such an inside-out membrane expansion approach in a continuous flow system would circumvent the usage of (some) building block and reduce the need of by-product transport, thereby keeping systems more simple and avoiding the usage of additional complex membrane proteins.

Eventually, a complete synthetic cellular continuously expanding membrane module

should be based on an *in vitro* transcription/translation system, in which not only lipids are synthesized, but the lipid synthesizing proteins as well. A critical aspect in this process will not only be the synthesis of these proteins, but also their correct insertion into the membrane. As current *in vitro* transcription/translation systems are not yet fully compatible with the reconstitution of functional membrane proteins, any approach toward *in vitro* transcription/translation-based membrane expansion should first focus on correct folding and membrane insertion of the involved proteins¹⁵. Naturally other protein complexes are required for these processes, thereby adding another layer of complexity, which further complicates the engineering. Therefore, maintaining simplicity will be key in the development of an expanding membrane module in a synthetic minimal cell. A realistic approach would be to first build initial sub-models based on purified proteins, meanwhile developing the *in vitro* transcription/translation coupled membrane insertion and biogenesis pathways in a functional form. Finally, all sub-modules should be integrated, and form a complete expanding membranes module suitable for a synthetic minimal cell based on a replicating genome.

REFERENCES

1. Schwille, P.; Spatz, J.; Landfester, K.; Bodenschatz, E.; Herminghaus, S.; Sourjik, V.; Erb, T. J.; Bastiaens, P.; Lipowsky, R.; Hyman, A.; et al. MaxSynBio: Avenues Towards Creating Cells from the Bottom Up. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2018**, *57* (41), 13382–13392. <https://doi.org/10.1002/anie.201802288>.
2. Zwart, H. From Primal Scenes to Synthetic Cells. *eLife* **2019**, *8*. <https://doi.org/10.7554/eLife.46518>.
3. Dowhan, W. Molecular Basis for Membrane Phospholipid Diversity: Why Are There so Many Lipids? *Annual Review of Biochemistry* **1997**, *66*, 199–232. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.199>.
4. Blain, J. C.; Szostak, J. W. Progress toward Synthetic Cells. *Annual review of biochemistry* **2014**, *83*, 615–640. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-080411-124036>.
5. Zhang, Y.-M.; Rock, C. O. Membrane Lipid Homeostasis in Bacteria. *Nature reviews. Microbiology* **2008**, *6* (3), 222–233. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1839>.
6. Brea, R. J.; Hardy, M. D.; Devaraj, N. K. Towards Self-Assembled Hybrid Artificial Cells: Novel Bottom-up Approaches to Functional Synthetic Membranes. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2015**, *21* (36), 12564–12570. <https://doi.org/10.1002/chem.201501229>.
7. Exterkate, M.; Caforio, A.; Stuart, M. C. A.; Driessen, A. J. M. Growing Membranes In Vitro by Continuous Phospholipid Biosynthesis from Free Fatty Acids. *ACS synthetic biology* **2018**, *7* (1), 153–165. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00265>.
8. Adams, D. W.; Errington, J. Bacterial Cell Division: Assembly, Maintenance and Disassembly of the Z Ring. *Nature reviews. Microbiology* **2009**, *7* (9), 642–653. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2198> [doi].
9. Lutkenhaus, J. Min Oscillation in Bacteria. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **2008**, *641*, 49–61.
10. Black, P. N.; DiRusso, C. C. Transmembrane Movement of Exogenous Long-Chain Fatty Acids: Proteins, Enzymes, and Vectorial Esterification. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **2003**, *67* (3), 454–472, table of contents.
11. Caforio, A.; Jain, S.; Fodran, P.; Siliakus, M.; Minnaard, A. J.; van der Oost, J.; Driessen, A. J. Formation of the Ether Lipids Archaeidylglycerol and Archaeidylethanolamine in Escherichia Coli. *The Biochemical journal* **2015**, *470* (3), 343–355. <https://doi.org/10.1042/BJ20150626> [doi].
12. Hiraoka, S.; Matsuzaki, H.; Shibuya, I. Active Increase in Cardiolipin Synthesis in the Stationary Growth Phase and Its Physiological Significance in Escherichia Coli. *FEBS letters* **1993**, *336* (2), 221–224.
13. Dowhan, W. The Role of Phospholipids in Cell Function. *Advances in Lipobiology*. 1997, pp 79–107. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1874-5245\(97\)80006-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1874-5245(97)80006-7).
14. Driessen, A. J. M.; Nouwen, N. Protein Translocation across the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *Annual review of biochemistry* **2008**, *77*, 643–667. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061606.160747>.
15. de Keyzer, J.; van der Laan, M.; Driessen, A. J. Membrane Protein Insertion and Secretion in Bacteria. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2007**, *390*, 17–31.

SAMENVATTING

Een van de belangrijkste uitdagingen in de synthetische biologie is de constructie van een synthetische minimale cel¹. Alleen als we zo'n cel vanaf de grond af kunnen opbouwen uit zijn individuele componenten, zullen we in staat zijn de moleculaire basis van het leven te begrijpen². Hoe vormen alle levenloze individuele processen tezamen een levende eenheid? Een van de belangrijkste pijlers om zo'n synthetische cel levend te kunnen noemen is het vermogen te reproduceren. Daartoe behoort ook groei en deling van de omringende laag die het cellulaire lumen (het binnenste van de cel) scheidt van de omgeving. In de natuur bestaat zo'n scheidingslaag uit een fosfolipide bi-laag (membraan), waarin de staarten een waterafstotend segment vormen. Een membraan vormt niet alleen een barrière, maar functioneert ook als matrix voor membraaneiwitten. Soms is de algehele structuur van een membraan voldoende om de vouwing en activiteit van membraaneiwitten te ondersteunen, maar vaak genoeg zijn er ook interacties met een specifieke fosfolipide soort noodzakelijk. Een goed voorbeeld is het binnen-membraan van *Escherichia coli*, waarin de aanwezigheid van de fosfolipiden fosfatidylethanolamine (PE) en fosfatidylglycerol (PG) essentieel is voor volledige functionaliteit³. Aangezien dit de enige twee noodzakelijke fosfolipiden zijn, vormt het binnen-membraan van *E. coli* een uitstekende basis voor de ontwikkeling van een scheidingslaag van een synthetische cel. In dit proefschrift hebben we ons voornamelijk geconcentreerd op de groei van zo'n membraan, waarbij het uiteindelijke doel was een functionele module te ontwikkelen die geschikt is voor de vorming van een membraan in een synthetische minimale cel.

In **hoofdstuk 1** wordt een algemene introductie gegeven betreffende (zelf-)replicatie van synthetische compartimenten of minimale cellen. Hier worden met name scheidingslagen besproken die bestaan uit fosfolipiden, maar ook uit andere bouwstenen, zoals vetzuren⁴. Membranen bestaande uit vetzuren zijn uitermate geschikt voor zelf-replicatie, omdat ze spontaan kunnen groeien en delen. Echter, in de vesikel vorm maken de vetzuren het membraan ook instabiel, waardoor ze ontvankelijk zijn voor lekkage. Daarnaast ondersteunen de uit vetzuren bestaande vesikels geen membraaneiwit activiteit, waardoor fosfolipiden de voorkeur hebben als bouwstenen voor een synthetisch celmembraan. Fosfolipide membranen kunnen niet groeien door spontane insertie van nieuw lipiden. Vandaar dat de insertie van fosfolipiden gekoppeld is aan hun biosynthese⁵. Dit wordt in **hoofdstuk 2** geïllustreerd aan de hand van het model organisme *E. coli*, waarin de koppeling van deze twee processen uitvoerig is bestudeerd. Kort samengevat begint fosfolipide synthese met de productie van acyl-ketens die fungeren als hydrofobe staarten. Deze staarten worden gekoppeld aan een glycerol-3-fosfaat (G3P), een proces waarbij gelijktijdig insertie van het product (het lyso-fosfolipide) in het membraan plaatsvindt. Tot slot kunnen er verschillende kopgroepen worden geïntroduceerd, wat uiteindelijk resulteert in de productie van een verscheidenheid aan fosfolipide soorten, waaronder PE en PG. Momenteel fungeert deze syntheseroute als een template voor veel van het huidige onderzoek naar groeiende

fosfolipide membranen in de context van de synthetische cel (waaronder het werk in **hoofdstuk 2**), waarvan de laatste ontwikkelingen worden beschreven. Naast de natuurlijk voorkomende fosfolipiden wordt er ook geëxperimenteerd met chemische analogen van fosfolipiden als bouwstenen voor een membraan ⁶. Deze alternatieve lipiden zijn vooral interessant doordat er synthese kan plaatsvinden in afwezigheid van enzymen, wat *de novo* membraan formatie mogelijk maakt. Dit is niet mogelijk met natuurlijke enzymatische fosfolipide biosynthese, omdat de daarbij betrokken enzymen (bijvoorbeeld het glycerol-phosphate acyl-transferase) een membraan nodig hebben voor functionaliteit ⁷. Het tweede gedeelte van **hoofdstuk 1** focust op het andere onderdeel van membraanrepletie: deling. In *E. coli* vindt celdeling plaats doormiddel van contractie van een membraan interacterende eiwit ring. Deze ring bestaat uit onder andere FtsZ, FtsA en ZipA ⁸. De ring wordt in het midden van de cel gepositioneerd door het oscillerende Min-systeem ⁹. Ondanks dat *in vitro* deling van compartimenten omringd door fosfolipide membranen nog in de kinderschoenen staat, zijn er toch al een paar beginnende stappen gezet aangaande proto-ring formatie en de reconstitutie van oscillerende Min-golven.

Hoofdstuk 2 vormt het raamwerk van dit proefschrift. Allereerst wordt de ontwikkeling van een *in vitro* fosfolipide biosynthese route uitvoerig beschreven. Deze route wordt vervolgens gebruikt voor de groei van een liposomaal membraan. Het ontwerp van de fosfolipide biosynthese route is gebaseerd op de natuurlijke biosynthese van fosfolipiden in *E. coli* met uitzondering van een paar modificaties. Allereerst wordt niet het multi-enzymcomplex vetzuursynthase (Fatty acid Synthase, FASII) gebruikt voor de synthese van de vetzuurstaarten, maar in plaats daarvan worden al aanwezige vetzuren benut in combinatie met FadD ¹⁰. Dit katabole enzym kan via een simpele twee-staps reactie vetzuren omzetten in het derivaat acyl-CoA. Hierdoor wordt de complexe synthese van vetzuurstaarten overgeslagen en de totale syntheseroute versimpeld. Immers, FadD is niet specifiek voor een gegeven vetzuur en kan dus een breed scala aan vetzuren activeren. Verder wordt er gebruik gemaakt van het enzym fosfatidylserine synthase (PssA) van *Bacillus subtilis* en niet van *E. coli* ¹¹. Dit hoofdstuk begint met de stapsgewijze opbouw van de *in vitro* fosfolipide biosynthese route. Door de betrokken enzymen één voor één te reconstitueren in al bestaande liposomen, wordt uiteindelijk een cascade gebouwd bestaande uit 8 verschillende enzymen, die in staat is simpele vetzuur bouwstenen om te zetten in fosfolipide eindproducten. Afhankelijk van de enzymen en substraten die wordt toegevoegd, kan dit systeem verschillende fosfolipide soorten synthetiseren die kunnen variëren in zowel kopgroep type (PA, PE, PG, PS etc.) als acyl-staart (verzadigingsgraad en lengte). Daarnaast is dit systeem in staat om grote hoeveelheden vetzuren (milli-molair) volledig om te zetten in de fosfolipide eindproducten, waarbij voor continue synthese gebruik wordt gemaakt van een CoA-recycling mechanisme. Al met al is dit systeem erg veelzijdig en efficiënt, wat het aantrekkelijk maakt voor fosfolipide synthese in een

synthetische minimale cel. Naast de synthese van fosfolipiden, wordt ook het vermogen van deze enzymatische cascade om membranen te groeien behandeld. Aangezien het systeem robuust is, wordt er genoeg fosfolipide geproduceerd om duidelijke membraangroei te zien. Echter, tot op heden wordt stapsgewijs de maximaal toelaatbare hoeveelheid vetzuur gebruikt, wat de continuïteit van de expansie belemmert. Om daadwerkelijk een systeem te ontwikkelen waarin membranen constant groeien, zal dan ook gecontroleerde toevoeging van vetzuren (en andere substraten) noodzakelijk zijn, zodat de maximale waarden niet overschreven worden.

De in **hoofdstuk 2** beschreven *in vitro* fosfolipide biosynthese route produceert onder andere de lipiden PE en PG. Deze twee zijn essentieel voor de binnen-membraan van *E. coli* die daarnaast nog 1 andere grote lipide klasse bevat: cardiolipine (CL). Afhankelijk van de groeifase kan het membraan tot wel 10% CL bevatten¹². In **hoofdstuk 3** wordt de *in vitro* fosfolipide biosynthese route (**hoofdstuk 2**) verder uitgebreid met de synthese van CL. Door het enzym cardiolipine synthase A (ClsA) van *E. coli* toe te voegen aan de cascade van enzymen, kunnen twee gesynthetiseerde PG moleculen worden omgezet tot één CL molecuul en het restproduct glycerol. Aangezien dit een evenwichtsreactie is, kan ook de teruggaande reactie plaatsvinden, waarbij naast glycerol ook andere substraten door ClsA kunnen worden ingebouwd als fosfatidyl-kopgroep. In principe zou elke primaire alcohol kunnen worden ingebouwd, mits er compatibiliteit met de bindingsplaats is. Als voorbeeld, de grote van een substraat zijgroep kan een remmend effect hebben op de werking van ClsA. De veelzijdigheid van dit enzym brengt een aantal nieuwe mogelijkheden met zich mee, namelijk de synthese van zowel relevante natuurlijke fosfolipide soorten, als ook de synthese van nog niet eerder beschreven fosfolipiden soorten. Echter een aantal veelvoorkomende lipide soorten, zoals PE, PC en PS, kon alleen op minimale schaal worden geproduceerd en daarom zal optimalisatie nodig zijn. Desalniettemin blijft ClsA een interessante kandidaat om via een simpele route een membraan te bouwen met een grote verscheidenheid aan lipiden en dit is mogelijk toepasbaar in een synthetische cel.

De veelzijdigheid van dit enzym blijft niet alleen beperkt tot het inbouwen van allerlei kopgroepen, aangezien verschillende soorten lipide staarten en stereovormen van glycerol-fosfaat ook kunnen worden geïmplementeerd. Dit wordt in **hoofdstuk 3** gedemonstreerd aan de hand van de productie van archaeale cardiolipine (aCL) vanuit archaeale fosfatidylglycerol (AG), waarin de lipide staarten via een ether binding gekoppeld zijn aan een glycerol-1-fosfaat (G1P). Bovendien kan ClsA een mengsel van PG en AG omzetten in een hybride-cardiolipine soort die bestaat uit één paar archaeale isoprenoïde staarten die via een ether-binding gekoppeld zijn aan G1P, en één paar bacteriële vetzuur staarten middels een ester-binding gekoppeld aan G3P. Dit is een opmerkelijk fenomeen aangezien deze nieuwe lipide soort tot op heden nog niet in de natuur gevonden is.

Door toevoeging van ClsA aan de *in vitro* fosfolipide biosynthese route, kunnen nu PE, PG en CL geproduceerd worden en daarmee is de synthese van de drie belangrijkste lipide klassen in het *E. coli* binnenmembraan compleet. Een groeiend membraan met deze drie lipiden is al een goede stap in de richting van een functionele barrière voor een synthetische cel. Echter, extra functionaliteit zal moet worden ingebouwd in de vorm van membraaneiwwitten. Eiwitten gelegen in, of geassocieerd met, het membraan spelen een centrale rol in de algehele functionaliteit van membranen. Ze zijn betrokken bij allerlei processen met betrekking tot uitwisseling en communicatie in de cel alsmede tussen de cel en zijn omgeving¹³. Het is dan ook noodzakelijk dat een synthetische minimale cel membranen moet bevatten met daarin membraaneiwwitten. In **hoofdstuk 4** wordt een eerste inleidende stap naar zo'n communicerend membraan ondernomen, door het Sec-translocon (betrokken bij eiwit excretie), van *E. coli* aan de syntheseroute uit **hoofdstuk 2** toe te voegen¹⁴. Het Sec-translocon is alleen actief in de aanwezigheid van anionische fosfolipiden. Hierin is het type anionische lipide nauwelijks van invloed op de activiteit, in tegenstelling tot de concentratie. De translocatie blijft versnellen met het verhogen van de anionische lipide concentratie tot wel 30%. Daarbij laat de al bekende anionische lipide-afhankelijke binding van het motor eiwit SecA met SecYEG een ander profiel zien dan de algehele activiteit van het translocon, wat duidt op nog een andere anionische lipide afhankelijke stap in het translocatie proces. Aan de hand van moleculaire dynamica simulaties wordt aangetoond dat anionische lipide verrijkt is rondom de laterale poort van SecY. Hier steekt de kopgroep van een anionische lipide door de opening van de poort, wat deze toestand stabiliseert. Verder speculerend over de exacte functie van anionische lipide in deze positie, zou het kunnen dat elektrostatische interacties van de negatieve lipide kopgroep met de positief geladen N-terminus van het translocerende eiwit bijdragen aan de correcte lokalisatie van de inkomende peptide.

The anionische afhankelijkheid van Sec-gemedieerd transport is in combinatie met de *in vitro* fosfolipide biosynthese route (**hoofdstuk 2**) gebruikt als eerste model voor additionele functionaliteit in een groeiend membraan. SecYEG was gezamenlijk met de fosfolipide synthetiserende enzym cascade gereconstitueerd in proteoliposomen bestaande uit PE en PC, maar zonder anionisch lipide. Door vervolgens vetzuren aan te dienen, kon het anionische lipide PG in voldoende hoeveelheid worden gesynthetiseerd om het Sec-translocon te activeren, waardoor vervolgens het eiwit proOmpA kon worden getransloceerd. Dit systeem vormt de eerste stap naar een volwaardig communicerend en groeiend membraan zoals noodzakelijk is in een synthetische minimale cel.

Al met al vormt het onderzoek beschreven in dit proefschrift een raamwerk voor een membraan expansie module in een synthetische minimale cel. Desalniettemin wordt de groei momenteel nog belemmerd door de een maximaal toelaatbare substraat hoeveelheid. Een volgende stap is dan ook om het huidige systeem door te ontwikkelen tot een continu

groeïend membraan zonder limitatie. In **hoofdstuk 5** wordt het design van zo'n systeem besproken. Continue expansie betekent dat een constante toevoer van bouwstenen nodig is. Om dit te realiseren, zullen substraten passief of actief over het membraan moeten worden getransporteerd naar het lumen van het synthetische compartiment. Bij actief transport zullen transporterende membraaneiwitten een cruciale rol vervullen. Continue synthese betekent ook dat er een significante hoeveelheid aan restproducten zal worden geproduceerd. Naar verloop van tijd kan ophoping daarvan een remmend effect hebben op de algehele synthese. De beste manier om met deze restproducten om te gaan is door ze te recyclen. Op deze manier kan additionele secretie worden voorkomen en tegelijkertijd hoeven er minder bouwstenen te worden geïmporteerd. Echter, excretie van een aantal restproducten is onoverkomelijk, wat betekent dat wederom extra membraaneiwitten nodig zullen zijn. Alles tezamen zal de overgang van de *in vitro* fosfolipide biosynthese route (**hoofdstuk 2**), naar een continu groeiend membraan systeem veel meer voeten in de aarde hebben dan simpelweg extra bouwstenen toevoegen. Bij de transitie zijn vele andere aspecten betrokken (transport, recycling, etc), waarvoor de introductie van extra membraaneiwitten noodzakelijk zal zijn. Door deze benodigde extra uitbreidingen, zal een continu groeiend membraan al snel een complexe eenheid worden, wat de ontwikkeling van zo'n systeem lastig kan maken. Vandaar dat een meer simpele aanpak via controversiële benaderingen ook in overweging moet worden genomen. Hierbij moet men denken aan de chemische (niet enzymatische) synthese van bepaalde bouwstenen, of het van buitenaf inbouwen van bouwstenen in de buitenste laag van een membraan, waarbij transport en recycling via extra (membraan-) eiwitten kan worden vermeden.

Uiteindelijk zal een complete continu groeiende membraan module voor een synthetische cel gebaseerd moeten zijn op een transcriptie/translatie systeem dat gecodeerd wordt door synthetisch genoom. In zo'n systeem worden niet alleen de lipiden gesynthetiseerd, maar ook de lipide producerende eiwitten. Daarbij is naast de synthese van deze betrokken eiwitten ook correcte vouwing en membraaninsertie van belang. De huidige *in vitro* transcriptie/translatie systemen zijn slechts beperkt compatibel met de reconstitutie van functionele membraaneiwitten. Vandaar dat er bij de ontwikkeling van zo'n systeem eerst de focus zal moeten liggen op de juiste vouwing en insertie van de betrokken eiwitten ¹⁵. Uiteraard zijn hier ook weer extra eiwitcomplexen bij betrokken, waardoor er weer een extra laag van complexiteit wordt toegevoegd. Aangezien dit op zijn beurt de constructie van zo'n systeem verder compliceert, zal eenvoud cruciaal zijn voor de succesvolle ontwikkeling van een synthetische cel. Een realistische aanpak zou daarom eerst moeten focussen op het bouwen van sub-modules die gebaseerd zijn op gezuiverd eiwit. In de tussentijd, kan dan een *in vitro* transcriptie translatie module worden ontwikkeld die compatibel is met membraaneiwit insertie en functionele biogenese routes. Tot slot zullen dan alle sub-modules moeten worden geïntegreerd in één systeem om dan uiteindelijk een complete

expanderende membraan module te vormen die geschikt is voor een op het replicerend genoom-gebaseerde synthetische minimale cel.

REFERENTIES

1. Schwille, P.; Spatz, J.; Landfester, K.; Bodenschatz, E.; Herminghaus, S.; Sourjik, V.; Erb, T. J.; Bastiaens, P.; Lipowsky, R.; Hyman, A.; et al. MaxSynBio: Avenues Towards Creating Cells from the Bottom Up. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2018**, *57* (41), 13382–13392. <https://doi.org/10.1002/anie.201802288>.
2. Zwart, H. From Primal Scenes to Synthetic Cells. *eLife* **2019**, *8*. <https://doi.org/10.7554/eLife.46518>.
3. Dowhan, W. Molecular Basis for Membrane Phospholipid Diversity: Why Are There so Many Lipids? *Annual Review of Biochemistry* **1997**, *66*, 199–232. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.199>.
4. Blain, J. C.; Szostak, J. W. Progress toward Synthetic Cells. *Annual review of biochemistry* **2014**, *83*, 615–640. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-080411-124036>.
5. Zhang, Y. M.; Rock, C. O. Thematic Review Series: Glycerolipids. Acyltransferases in Bacterial Glycerophospholipid Synthesis. *Journal of lipid research* **2008**, *49* (9), 1867–1874. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800005-JLR200> [doi].
6. Brea, R. J.; Hardy, M. D.; Devaraj, N. K. Towards Self-Assembled Hybrid Artificial Cells: Novel Bottom-up Approaches to Functional Synthetic Membranes. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2015**, *21* (36), 12564–12570. <https://doi.org/10.1002/chem.201501229>.
7. Exterkate, M.; Caforio, A.; Stuart, M. C. A.; Driessen, A. J. M. Growing Membranes In Vitro by Continuous Phospholipid Biosynthesis from Free Fatty Acids. *ACS synthetic biology* **2018**, *7* (1), 153–165. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00265>.
8. Adams, D. W.; Errington, J. Bacterial Cell Division: Assembly, Maintenance and Disassembly of the Z Ring. *Nature reviews.Microbiology* **2009**, *7* (9), 642–653. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2198> [doi].
9. Lutkenhaus, J. Min Oscillation in Bacteria. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **2008**, *641*, 49–61.
10. Black, P. N.; DiRusso, C. C. Transmembrane Movement of Exogenous Long-Chain Fatty Acids: Proteins, Enzymes, and Vectorial Esterification. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **2003**, *67* (3), 454–472, table of contents.
11. Caforio, A.; Jain, S.; Fodran, P.; Siliakus, M.; Minnaard, A. J.; van der Oost, J.; Driessen, A. J. Formation of the Ether Lipids Archaetidylglycerol and Archaetidylethanolamine in Escherichia Coli. *The Biochemical journal* **2015**, *470* (3), 343–355. <https://doi.org/10.1042/BJ20150626> [doi].
12. Hiraoka, S.; Matsuzaki, H.; Shibuya, I. Active Increase in Cardiolipin Synthesis in the Stationary Growth Phase and Its Physiological Significance in Escherichia Coli. *FEBS letters* **1993**, *336* (2), 221–224.
13. Dowhan, W. The Role of Phospholipids in Cell Function. *Advances in Lipobiology*. 1997, pp 79–107. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1874-5245\(97\)80006-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1874-5245(97)80006-7).
14. Driessen, A. J. M.; Nouwen, N. Protein Translocation across the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *Annual review of biochemistry* **2008**, *77*, 643–667. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061606.160747>.
15. de Keyzer, J.; van der Laan, M.; Driessen, A. J. Membrane Protein Insertion and Secretion in Bacteria. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2007**, *390*, 17–31.

