



Doctoral Thesis

Assembly and Properties of Enzyme-Capsid Complexes

Author(s):

Zschoche, Reinhard

Publication Date:

2016

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010694355> →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 23295

Assembly and Properties of Enzyme-Capsid Complexes

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

REINHARD MATTHIAS ZSCHOCHÉ
MSc Chemistry, ETH Zurich
born on 19.05.1987
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Donald Hilvert
Prof. Dr. Helma Wennemers

2016

faster than the rate-determining step for methodol cleavage, as does dissociation of the other product 6-methoxy-2-naphthaldehyde. With product release excluded as the slow step in catalysis, carbinolamine formation and carbon-carbon bond cleavage remain as candidates, with the former being more likely given that the intermediate preceding C-C bond fission could not be reductively trapped with a variety of borohydride reagents. Additionally, kinetic profiling of the synthetic aldol reaction by RA95.5-8 revealed substantial inhibition by 6-methoxy-2-naphthaldehyde. The susceptibility of RA95.5-8 toward reversible inactivation by the aldehyde product reflects a flexible active site, tightening of which might improve overall enzyme performance.

The engineered capsid variant AaLS-13 is a promising artificial encapsulation system that exploits electrostatic interactions for cargo loading. Before using AaLS-13 variants to construct aldolase-containing nanoreactors, the principles underlying formation of host-guest complexes between positively charged guests and the negatively charged capsid protein were investigated. As described in Chapter 3, a pair of fluorescent proteins was developed, which allows spectroscopic determination of the extent of encapsulation by Förster resonance energy transfer (FRET). The encapsulation process is generally complete within a second, suggesting low energetic barriers for proteins to cross the capsid shell. Formation of intermediate aggregates upon mixing host and guest *in vitro* complicates capsid loading at low ionic strength, but can be sidestepped by increasing salt concentrations or diluting the components. Encapsulation of guests is completely reversible, and the position of the equilibrium is easily tuned by varying the ionic strength. These results, which challenge the notion that AaLS-13 is a continuous rigid shell, provide valuable information about cargo loading that will guide ongoing efforts to engineer functional host-guest complexes.

Chapter 3 was concluded with experiments addressing the assembly of AaLS-13 capsids in the cytosol of *E. coli* as well as the subunit composition of AaLS capsid variants *in vitro*. Given the high local charge density on the capsid subunits, increased salt concentrations, which reduce Coulombic repulsion between fragments, were found to facilitate capsid formation. Purification of heterologously expressed capsid protein at low ionic strength ($I = 250$ mM, yet higher than physiological ionic strength ~ 150 mM) yielded capsid fragments exclusively. In contrast, when AaLS-13 subunits were co-expressed with positively charged guest proteins and purified under the same conditions, assembled capsids were found. These findings suggest that positively charged proteins, much like sodium chloride, shield the negative charges of the capsid protein. In collaboration with the group of Albert Heck at the Universiteit Utrecht, native mass spectrometry was employed to deter-

mine the number of subunits in various AaLS variants. Consistent with the dodecahedral structure that had previously been determined by X-ray crystallography, wild-type AaLS was found to contain 60 subunits, whereas AaLS-neg, endowed with four additional charges per monomer, is constructed from 180 monomers, consistent with a T=3 icosahedral capsid. An evolutionary intermediate between AaLS-neg and AaLS-13, AaLS-RR was found as a mixture of 180-mers, 210-mers and 240-mers. Although it has not yet been possible to resolve the charge envelope of AaLS-13, its position in the mass spectrum relative to AaLS-RR indicates that this capsid is composed of more than 240 subunits.

The loading of AaLS-neg and AaLS-13 with enzymes fused to positively charged tags is described in Chapter 4. Supercharged green fluorescent protein was found superior to a deca-arginine peptide for directing a broad variety of enzymes, including the retro-aldolase RA95.5-8, to the lumen of these capsids. However, encapsulation of oligomeric enzymes still poses a challenge. For example, it was not possible to load AaLS-13 capsids with dimeric or tetrameric alcohol dehydrogenases. On the other hand, AaLS-neg capsids proved far more tractable. Nanoreactors were therefore created by co-encapsulating the RA95.5-8 retro-aldolase and a horse liver alcohol dehydrogenase fusion protein in AaLS-neg. Substrate channeling was tested using the competition method, utilizing external aldehyde dehydrogenase to compete with the encapsulated alcohol dehydrogenase for the 6-methoxy-2-naphthaldehyde product formed by the retro-aldolase. Analysis of the metabolite composition in the presence and absence of capsids by ultra-performance liquid chromatography revealed no advantage from co-encapsulation. Although these results argue against an important role for substrate channeling, there is still room for tweaking this system. Employing more proficient enzymes and charged substrates that can interact favorably with the charged capsid shell, for example, may promote substrate channeling.

During our analysis of the AaLS-neg and AaLS-13 encapsulation systems, the question arose how the natural inclusion complex between trimeric riboflavin synthase and 60-meric lumazine synthase, which lacks the engineered electrostatic interactions, assembles *in vivo*. Experiments addressing this puzzle are described in Chapter 5. Heterologous co-expression of *Aquifex aeolicus* riboflavin synthase and lumazine synthase in *E. coli* was shown to give intact complexes. Inspired by the threefold symmetry shared by the C-termini of the guests and the hydrophobic clefts on the luminal side of the capsid shell, we tested whether the C-terminal pseudo-coiled-coil of riboflavin synthase might direct cargo proteins to the interior of wild-type AaLS. Indeed, size-exclusion chromatography of superfolder green fluorescent protein tagged with C-terminal peptides derived from riboflavin synthase

revealed association of a single guest protein to wild type AaLS capsids. The resulting complexes are complementary to the engineered cages filled with many cargo molecules and might be potentially useful for stabilizing fragile enzymes.

The strategies developed in the course of this thesis to create and characterize host-guest complexes between enzyme-fusion proteins and protein containers lay the groundwork for constructing functional organelle-like entities. These systems will be invaluable for investigating the effect of enzyme co-confinement on substrate channeling *in vitro* and eventually might serve as self-contained synthetic biological building blocks for applications *in vivo*. A hallmark of capsid-guest assemblies based on AaLS-neg and AaLS-13 is the seamless interchange between assembly *in vitro* and *in vivo*, so that the exact same complexes can be used for intracellular experiments and detailed characterization outside the cell. Because guest encapsulation has been found to be fully reversible, engineered AaLS capsids are not only promising scaffolds for the development of nanoreactors, but may also serve as effective vehicles for the delivery of therapeutic and diagnostic agents in medicine.

Zusammenfassung

Enzyme, die aufeinanderfolgende Reaktionen eines Stoffwechselweges katalysieren, sind in der Natur häufig in Komplexen organisiert. Dies erlaubt nicht nur die koordinierte Regulierung aller Enzyme, sondern es wird auch vermutet, dass ihre unmittelbare Nachbarschaft dem Organismus einen metabolischen Vorteil verschafft, indem Metabolite direkt zwischen den aktiven Taschen der Enzyme transportiert werden können ohne sie im Zytosol zu verdünnen. Gegenwärtig versuchen Forscher die Voraussetzungen für einen derartigen direkten Metabolittransfer zu verstehen. Diese Problemstellung würde von kinetischen Experimenten mit gut charakterisierten, künstlichen Multienzymkomplexen profitieren, für die man Parameter wie ihre Grösse, Packungsdichte oder die Geschwindigkeit der einzelnen katalysierten Reaktionen systematisch variieren kann.

Zu diesem Zweck beschreibt diese Dissertation den Einschluss verschiedener Enzyme in der umfunktionalisierten Proteinschale des Kapsid bildenden bakteriellen Enzyms Lumazinsynthase (AaLS). Kapitel 1 gibt einen Überblick über den Wissensstand zu Enzymkomplexen – *in vitro* wie *in vivo* – und beschreibt Methoden, mit denen der direkte Substrattransfer zwischen Katalysatoren untersucht werden kann. Für die erfolgreiche direkte Substratübertragung scheinen zwei grundsätzliche Strategien zu dominieren. Zum einen können kovalente Bindungen oder starke supramolekulare Wechselwirkungen den Aufenthalt von Zwischenprodukten auf die direkte Umgebung der nacheinander geschalteten Enzyme beschränken. Zum anderen können dicht gepackte Netzwerke von Enzymen, deren Dimensionen häufig 100 nm übersteigen, die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass ein Metabolit enzymatisch verarbeitet wird, bevor er aus einer solchen Enzymmikrodomäne diffundiert.

Retroaldolase RA95.5-8, welche mit Rechner gestützten Methoden entworfen und anschliessend im Labor evolviert wurde, um die Retroaldolreaktion von 4-Hydroxy-4-(6-methoxynaphthyl)-2-butanon (Methodol) mit einer mehr als 3×10^8 -fachen Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit zu katalysieren ($k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$), wurde als Modellsystem gewählt. Die Verfügbarkeit vieler Varianten dieses Enzyms deren katalytische Parameter ein breites Spektrum abdecken, macht es zu einem geeigneten Kandidaten, um die Auswirkung des Einschlusses in Kapsiden auf die Effizienz von Kaskadenreaktionen zu untersuchen. Ausserdem kann das Produkt der katalysierten Retroaldolreaktion, ein fluoreszierender Naphthaldehyd, der leicht in komplexen Mischungen detektiert werden kann, als Substrat für diverse Enzyme verwendet werden, wie zum Beispiel Alkoholdehydrogenasen, Aldehyddehydrogenasen oder Transaldolasen.

Kapitel 2 beschreibt die Charakterisierung des Mechanismus von RA95.5-8. Ebenso wie natürliche Typ-I-Aldolasen verwendet dieses Enzym eine Lysinseitenkette zur kovalenten Katalyse. Die Identifizierung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts dieses aus mehreren Einzelschritten bestehenden Mechanismus ist wichtig um die molekularen Grundlagen der Katalyse zu verstehen, den Katalysator durch gerichtete Evolution weiter zu verbessern, sowie ihn für Kaskadenreaktionen zu verwenden. Die Dissoziationskonstante des Produkts Aceton wurde über dessen Inhibierungskonstante für die Retroaldolreaktion bestimmt. Die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung und die Hydrolyse der Schiffschen Base zwischen Aceton und Lysin 83 wurden über den Isotopenaustausch zwischen $\text{H}_2[^{16}\text{O}]$ und dem $[^{18}\text{O}]$ -markierten Carbonylsauerstoff ermittelt. Deprotonierung und Reprotonierung am α -Kohlenstoffatom des Imins wurden über Wasserstoffisotopenaustausch mittels Kernmagnetresonanzspektroskopie beobachtet. All diese Schritte und die Dissoziation des zweiten Produkts, 6-Methoxynaphthaldehyd, laufen schneller als die gesamte Retroaldolreaktion ab und können deshalb nicht geschwindigkeitslimitierend sein. Nachdem die Dissoziation der Produkte als langsamster Schritt abgeschlossen werden kann, verbleiben noch die Bildung des Carbinolamins oder die Spaltung der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung als mögliche Kandidaten. Da das Intermediat vor der Spaltung der C-C-Bindung nicht reduktiv abgefangen werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass dieser Schritt verhältnismässig schnell ist und die Bildung des Carbinolamins somit geschwindigkeitsbestimmend. Die kinetische Analyse der von RA95.5-8 katalysierten synthetischen Aldolreaktion hat ausserdem ergeben, dass die Reaktion stark durch Substratinhibition beeinträchtigt wird. Die Anfälligkeit des Enzyms für die reversible Deaktivierung durch den Aldehyd spiegelt die Flexibilität der aktiven Tasche wider, so dass die Enzymaktivität durch deren Versteifung vermutlich erheblich gesteigert werden könnte.

Das Designerkapsid AaLS-13 ist ein vielversprechender Proteinkontainer, dessen Beladung auf elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Fracht beruht. Bevor AaLS-13 zur Herstellung von Aldolase-Nanoreaktoren verwendet werden konnte, musste die Bildung von Gast-Wirt-Komplexen zwischen positiv geladenen Gästen und dem negativ geladenen Kapsid genauer untersucht werden. Wie in Kapitel 3 beschrieben ist, wurde ein Paar fluoreszierender Proteine entwickelt, welches ermöglicht das Ausmass der Kapsidbeladung mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) spektroskopisch zu beobachten. Der Einschluss von Gästen in Kapsiden ist generell bereits innerhalb einer Sekunde abgeschlossen, was darauf schliessen lässt, dass Proteine nur geringe Energiebarrieren überwinden müssen, um die Kapsidhülle zu durchqueren. Die zwischenzeitliche Bildung von Proteinaggregaten unmittelbar nach dem Mischen von Wirt und Gast in vitro erschwert die

Beladung der Kapside bei geringer Ionenstärke, kann aber durch Erhöhung der Salzkonzentration oder Verdünnung der Proteinkomponenten vermieden werden. Der Einschluss von Gästen in den Kapsiden ist vollständig reversibel und die Lage des Gleichgewichts kann durch Anpassung der Ionenstärke eingestellt werden. Diese Ergebnisse nähren Zweifel daran, dass AaLS-13 eine kontinuierliche, starre Hülle besitzt, und liefern gleichzeitig wertvolle Einblicke in die Kapsidbeladung, mit deren Hilfe funktionale Gast-Wirt-Komplexe entwickelt werden können.

Der zweite Teil des dritten Kapitels beschreibt Experimente zur Assemblierung des AaLS-13 Kapsids im *E. coli* Zytosol, sowie zur Bestimmung der Anzahl an Untereinheiten verschiedener AaLS Kapsidvarianten. Dabei wurde festgestellt, dass sich angesichts der hohen lokalen Ladungsdichte auf den Kapsiduntereinheiten eine erhöhte Salzkonzentration positiv auf die Kapsidbildung auswirkt, weil sie die Coulomb-Abstossung zwischen den Fragmenten reduziert. Die Aufreinigung von heterolog exprimierten Kapsidproteinen bei niedriger Ionenstärke ($I = 250$ mM, was die physiologische Ionenstärke von etwa 150 mM immer noch massgeblich übersteigt) ergab ausschliesslich Kapsidfragmente. Wenn AaLS-13 Untereinheiten allerdings gemeinsam mit positiv geladenen Gastproteinen exprimiert wurden, erhielt man nach der Aufreinigung intakte Kapside. Diese Ergebnisse zeigen, dass die negative Ladung der Kapsidfragmente durch positiv geladene Gäste ebenso gut wie durch Natriumchlorid abgeschirmt werden kann. Die Zahl der Untereinheiten pro Kapsid wurde in einer Kollaboration mit der Gruppe von Albert Heck von der Universität Utrecht durch native Massenspektrometrie bestimmt. Im Einklang mit der Kristallstruktur, welche Wildtyp-AaLS als Dodekahedron zeigt, wurden für diese Variante 60 Untereinheiten pro Kapsid festgestellt. AaLS-neg Kapside, welche im Vergleich zu AaLS-wt vier zusätzliche negative Ladungen pro Monomer aufweisen, bestehen hingegen aus 180 Untereinheiten, was einem ikosahedral-symmetrischen Kapsid mit Triangulationszahl $T=3$ entspricht. Für AaLS-RR, eine evolutionäre Zwischenstufe zwischen AaLS-neg und AaLS-13, wurde eine Mischung aus 180-meren, 210-meren und 240-meren gefunden. Obwohl es noch nicht gelungen ist, das Massenspektrum von AaLS-13 eindeutig einer Partikelgrösse zuzuordnen, deutet die Position der Signale auf ein Kapsid hin, das aus zwischen 240 und 420 Untereinheiten besteht.

Die Beladung von AaLS-neg und AaLS-13 mit Enzymen, die mit positiv geladenen Peptiden oder Proteinen versehen wurden, ist in Kapitel 4 beschrieben. Um eine Bandbreite von Enzymen, inklusive der Retroaldolase RA95.5-8, ins Innere der Kapside zu dirigieren, wurde eine superpositiv geladene Variante des grünfluoreszierenden Proteins für geeigneter befunden als ein Dekar-Argininpeptid. Nichtsdestotrotz stellt die Beladung mit oligomeren Enzymen immer noch eine Herausforderung dar. Beispielsweise war es nicht möglich AaLS-13 Kapside mit dimeren oder

tetrameren Alkoholdehydrogenasen zu beladen. AaLS-neg war vergleichsweise einfacher zu handhaben, weshalb Nanoreaktoren durch den gemeinsamen Einschluss von Fusionsproteinen mit RA95.5-8 und einer Alkoholdehydrogenase in diesem Kapsid hergestellt wurden. Die direkte Übertragung des Metaboliten zwischen den beiden Enzymen wurde mit Hilfe der Kompetitionsmethode untersucht, wobei externe Aldehyddehydrogenasen mit den eingeschlossenen Alkoholdehydrogenase um das von der Retroaldolase gebildete 6-Methoxynapthaldehyd-Zwischenprodukt kompetierten. Die Analyse der Reaktionsmischungen mit Flüssigkeitschromatographie hat gezeigt, dass der gemeinsame Einschluss der Enzyme in ein Kapsid für diesen Versuchsaufbau keinen Vorteil bringt. Obwohl dieses Ergebnis gegen eine entscheidende Rolle für den direkten Metabolittransfer spricht, ist das Potential für die Optimierung dieses Systems noch nicht ausgeschöpft. Der Einsatz schnellerer Enzyme und geladener Substrate, welche vorteilhaft mit der geladenen Kapsidhülle interagieren sollten, könnte die direkte Substratübertragung begünstigen.

Während der Untersuchung der künstlichen AaLS-neg und AaLS-13 Beladungssysteme, kam die Frage auf, wie der natürliche Komplex zwischen trimerer Riboflavinsynthase und 60-mere Lumazinsynthase ohne gezielt eingebaute elektrostatische Wechselwirkungen *in vivo* gebildet wird. Experimente zur Lösung dieses Rätsels sind in Kapitel 5 beschrieben. Die heterologe gemeinsame Expression von Riboflavinsynthase und Lumazinsynthase aus dem hyperthermophilen Bakterium *Aquifex aeolicus* in *E. coli* hat zur Bildung intakter Komplexe geführt. Angeregt durch die dreifache Rotationssymmetrie, die sowohl am C-Terminus der Gastproteine, wie auch in der Anordnung der hydrophoben Bindetaschen auf der Innenseite der Kapsidhülle gefunden wird, legten nahe, dass der C-terminale Pseudo-Coiled-Coil der Riboflavinsynthase diese in das Innere des Lumazinsynthasekapsids dirigiert. In der Tat konnte mittels Grössenausschlusschromatographie gezeigt werden, dass grünfluoreszierendes Protein, welches mit dem C-terminalen Peptid der Riboflavinsynthase versehen wurde, in AaLS-wt eingeschlossen wird. Die Eigenschaften dieser Komplexe sind von denjenigen, die mit den modifizierten, negativ geladenen Kapsiden gebildet werden, grundsätzlich verschieden. Der Einschluss in stabile AaLS-wt Kapside könnte für die Stabilisierung empfindlicher Enzyme hilfreich sein.

Die Strategien zur Bildung und Charakterisierung von Gast-Wirt-Komplexen zwischen Enzymfusionsproteinen und verschiedenen Kapsiden, die im Zuge dieser Dissertation entwickelt worden sind, legen den Grundstein für die Entwicklung funktionaler künstlicher Zellorganellen. Solche Systeme werden wertvolle Beiträge für die Untersuchung von Multienzymkomplexen und der Auswirkung des gemeinsamen Einschlusses von Enzymen auf den Metabolittransfer leisten. Schlussendlich könnten solche Komplexe als eigenständige Komponenten für Anwendungen in der

synthetischen Biologie verwendet werden. Ein Alleinstellungsmerkmal von AaLS-neg und AaLS-13 ist die Bildung identischer Gast-Wirt-Komplexe in vitro und in vivo, so dass die gleichen Systeme ausgiebig ausserhalb der Zelle charakterisiert und für intrazelluläre Experimente verwendet werden können. Weil ihre Beladung reversibel ist, sind diese Kapside nicht nur geeignete Kandidaten für die Entwicklung von Nanoreaktoren, sondern können auch als molekulare Transporter von therapeutischen und diagnostischen Substanzen in der Medizin Anwendung finden.