

DISS. ETH NO. 27123

**Protein Cages: Mimicry, Repurposing and Beyond**

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

presented by

STEPHAN TETTER

MSc Biotechnology, University of Bologna

born on 24.03.1989

citizen of Italy

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Donald Hilvert

Prof. Dr. Nenad Ban

2020

---

## Abstract

Proteins are versatile tools for engineering on the nanoscale. Reproducible assembly, evolvability, and a broad range of chemical functions have made them the material of choice for widely diverse tasks in nature. Inspired by these systems, researchers have emulated and expanded on their natural catalytic, sensing, and structural capabilities. The ability to precisely adapt and redesign protein structure and function for our needs has benefitted many fields, including catalysis, materials science, and medicine. Protein cages are particularly suited for such applications, as they provide shells for confining catalytic processes, capsules for synthesis and storage, scaffolds for the construction of new meta-materials, and vehicles to deliver cargo to cells. In this thesis, we examine the potential of natural and designer capsids to create new functional materials and structures, both inspired by nature and beyond.

Ferritins, one class of widely used protein cages, naturally circulate in our own bodies to store and distribute iron in mineral form. The last several decades have shown that these cages have considerable technological and medical potential owing to their stability and tolerance to modification, as well as their ability to template nanoparticle synthesis and incorporate small molecules. In Chapter 3, we show that it is possible to extend their cargo range to the encapsulation of proteins. By exploiting electrostatic interactions with the negatively charged interior of the cage, a positively supercharged green fluorescent protein variant is efficiently taken up by an archaeal ferritin in a tunable fashion. Genetic tethering of enzymes to the fluorescent protein afforded complexes with ferritin that retained high catalytic activity and showed increased tolerance to proteolysis and heat. A chimera between this archaeal and human ferritin was explored for the delivery of proteins to cultured human cancer cells, but complex stability was insufficient to prevent leakage of the cargo under transfection conditions, and will require further engineering. These findings extend the cargo range of a broadly used class of protein cages, and may provide useful capsules for confined catalysis and protein delivery, paving the way for many new nanotechnological and pharmacological applications.

Protein cages are further interesting as building blocks for the design of new scaffolds and materials. Designing supramolecular structures with protein cages as building blocks

allows hierarchical organization of cargo, providing control over cargo properties and behavior. In Chapter 4, we report a Russian doll-like protein architecture that exploits electrostatic attractions between two complementarily supercharged protein nanocages. Cage-within-cage complexes spontaneously self-assemble upon mixing positively supercharged ferritin compartments with AaLS-13, a larger shell-forming protein with a negatively supercharged lumen. Both the AaLS-13 and the ferritin lumen can be individually further functionalized, providing spatial control over the arrangement of different cargo species. Additionally, we show that the two-component system assembles *in vivo*. Such designer structures open up new avenues for creating hierarchically organized supramolecular assemblies for application as delivery vehicles, reaction chambers, and artificial organelles.

While our ability to design and engineer capsids has rapidly improved over the last decades, natural capsids still outperform manmade designs with respect to precision and complexity. To learn how nature evolved sophisticated protein cage structures, our laboratory recently emulated the emergence of rudimentary viruses from cellular proteins in the laboratory. A bacterial protein cage was evolved experimentally into a nucleocapsid that packages, in a fraction of its capsids, a minimal mRNA genome encoding just the coat protein itself. In Chapter 5, we show that this primordial virus-like cage can be further evolved into an artificial nucleocapsid that selectively and quantitatively packages its own full-length ssRNA genome *in vivo*. Detailed structural and biochemical characterization of variants along the evolutionary trajectory reveals how the bacterial 60-subunit cage evolved via expanded, porous intermediates into an icosahedral, 240-subunit nucleocapsid with twice the diameter of the precursor. This rearrangement entails complete reorganization of the protomer topology through a domain swap, highlighting the remarkable structural plasticity of this protein cage. Concomitant with the evolution of the virus-like coat, the genome itself co-evolved to display new stem-loop packaging signals in addition to those introduced by design, driving efficient and selective encapsulation over host RNA. Such convergent evolution towards virus-like nucleocapsids from a bacterial enzyme scaffold supports the facile emergence of viral capsids from host cell proteins. Construction of artificial nucleocapsids augurs well for the development of tailored virus-inspired delivery agents.

Protein cages provide adaptable tools for many modern-day challenges, including green chemistry, smart new materials and tailored delivery vehicles. This thesis demonstrates the feasibility of expanding the range of accessible cage structures and functions. The lessons learned from evolution and engineering have substantially extended our ability to create tailor-made protein capsules with broad practical potential.



---

## Zusammenfassung

Proteine sind vielseitige Werkzeuge zur Manipulation und Transformation von Materie im Nanobereich. Reproduzierbarer Aufbau, Evolvierbarkeit und ein breites Spektrum chemischer Funktionen haben sie zum Material der Wahl für die unterschiedlichsten Aufgaben in der Natur gemacht. Inspiriert von diesen Systemen haben Forscher ihre natürlichen katalytischen, sensorischen und strukturellen Fähigkeiten nachgeahmt und erweitert. Unsere Fähigkeit, die Struktur und Funktion von Proteinen präzise an unsere Bedürfnisse anzupassen und neu zu entwerfen kommt vielen Bereichen zugute, darunter der Katalyse, der Materialwissenschaft und der Medizin. Kapsidproteine sind für solche Anwendungen besonders geeignet, da sie als Käfige für die Begrenzung katalytischer Prozesse, Kapseln für die Synthese und Lagerung verschiedener Moleküle, Gerüste für die Konstruktion neuer Meta-Materialien und Vehikel für den Transport von therapeutischem Gut verwendet werden können. Inspiriert von natürlichen Proteinkäfigen, aber auch geleitet durch innovatives Design, untersuchen wir in dieser Arbeit das Potenzial von natürlichen und modifizierten Kapsiden zur Schaffung neuer funktioneller Materialien und Strukturen.

Ferritine, eine weit verbreitete Klasse von Proteinkäfigen, zirkulieren auch in unseren Körpern, um Eisen in mineralischer Form zu speichern und zu verteilen. Die letzten Jahrzehnte haben gezeigt, dass diese Käfige ein beträchtliches technologisches und medizinisches Potenzial besitzen, und zwar aufgrund ihrer Stabilität und Toleranz gegenüber Modifikationen, sowie ihrer Fähigkeit, niedermolekulare Verbindungen zu verpacken und die Synthese von Nanopartikeln zu steuern. In Kapitel 3 zeigen wir, dass es möglich ist, die Bandbreite ihrer Gastmoleküle auf Proteine auszuweiten. Durch die Nutzung elektrostatischer Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Käfiginneren wird eine stark positiv geladene Variante des grün fluoreszierenden Proteins effizient vom Ferritin eines Archaeons in regulierbarer Weise aufgenommen. Die genetische Verlinkung von Enzymen an das fluoreszierende Protein ermöglichte die Bildung von Komplexen mit Ferritin, die die hohe katalytische Aktivität der Enzyme beibehielten und eine erhöhte Toleranz gegenüber Proteolyse und Hitze aufwiesen. Eine Chimäre des archaealen Ferritins mit menschlichem Ferritin, beladen mit dem fluoreszierenden Protein, wurde für die Transfektion in menschliche Krebszellen in Zellkultur erforscht. Die Stabilität der

Komplexe war allerdings nicht ausreichend um die Verpackung des Gastmoleküls unter Transfektionsbedingungen zu gewährleisten, und bedarf daher weiterer Modifikationen. In Summe erweitern diese Ergebnisse das Frachtspektrum einer weit verbreiteten Klasse von Proteinkäfigen. Dies bereichert unsere Möglichkeiten zur Katalyse in begrenztem Raum und bietet potenziell ein neues Vehikel zur Transfektion von Proteinen und ebnet somit den Weg für neue nanotechnologische und pharmakologische Anwendungen.

Darüber hinaus sind Proteinkäfige als Bausteine für das Design neuer Gerüste und Materialien interessant. Der Entwurf supramolekularer Strukturen mit Proteinkäfigen als Strukturelementen ermöglicht die hierarchische Organisation der Gastmoleküle, wodurch die Eigenschaften und das Verhalten der Letzteren kontrolliert werden können. In Kapitel 4 berichten wir über eine Matryoschka-artige Proteinarchitektur, die durch elektrostatische Anziehung zwischen zwei komplementär geladenen Proteinkäfigen zustande kommt. Die verschachtelten Komplexe assemblieren spontan aus einer extern positiv geladene Ferritinvariante und AaLS-13, einem größeren Proteinkäfig mit negativem Lumen. Das Innere beider Käfige kann weiterhin individuell funktionalisiert werden, wodurch die räumliche Kontrolle über die Anordnung der verschiedenen Gastmoleküle ermöglicht wird. Zusätzlich zeigen wir, dass sich das Zweikomponentensystem auch *in vivo* zusammensetzt. Solche Designerstrukturen eröffnen neue Wege zur Schaffung hierarchisch organisierter supramolekularer Architekturen für die Anwendung als Transportkapseln, Reaktionskammern und zur Erschaffung künstlicher Organellen.

Obwohl sich unsere Fähigkeit Kapside zu entwerfen und zu konstruieren in den letzten Jahrzehnten rapide verbessert hat, werden von Menschenhand geschaffene Proteinkäfige sowohl in Präzision als auch Komplexität von den natürlichen immer noch weit übertroffen. Um zu erfahren, wie die Natur solch komplexe Kapside evolviert hat, hat unser Labor vor kurzem die Entstehung rudimentärer Viren aus zellulären Proteinen im Labor nachgeahmt. Ein Proteinkäfig bakteriellen Ursprungs wurde im Labor zu einem Nukleokapsid evolviert, das in einem Bruchteil seiner Kapside ein minimalistisches mRNA-Genom verpackt, welches nur das Hüllprotein selbst kodiert. In Kapitel 5 zeigen wir, dass dieser primitive virusähnliche Käfig zu einem Nukleokapsid weiterevolviert werden kann, das sein eigenes RNA-Genom in voller Länge selektiv und quantitativ verpackt. Eine detaillierte strukturelle und biochemische Charakterisierung der Varianten entlang der evolutionären Laufbahn

zeigt, wie sich der bakterielle Käfig aus 60 Untereinheiten über expandierte, poröse Zwischenprodukte zu einem doppelt so grossen, ikosahedralen Nukleokapsid aus 240 Untereinheiten entwickelt hat. Diese Transformation basiert auf einer vollständigen Neuorientierung der Proteintopologie durch einen Domänen austausch, was die bemerkenswerte strukturelle Plastizität dieses Proteinkäfigs unterstreicht. Parallel zur Evolution der virusähnlichen Hülle evolvierte sich auch das Genom selbst. Zusätzlich zu den designten Verpackungsmotiven werden im evolvierten Kapsid neue Verpackungssignale in Form von RNA-Haarnadelstrukturen exponiert, die die effiziente und selektive Verkapselung des Genoms ermöglichen. Eine solche konvergente Evolution hin zu virusähnlichen Nukleokapsiden aus einem bakteriellen Enzymgerüst belegt die Einfachheit der Entstehung von viralen Kapsiden aus Wirtszellproteinen. Derartige Bildung künstlicher Nukleokapside ist ein gutes Omen für die Entwicklung maßgeschneiderter virus-inspirierter Transportkomplexe.

Proteinkäfige bieten vielseitige Werkzeuge für viele Herausforderungen der heutigen Zeit, einschließlich grüner Chemie, intelligenter neuer Materialien und maßgeschneiderter Transportvehikel für medizinische Zwecke. Diese Arbeit erweitert das Spektrum an zugänglichen Käfigstrukturen und -funktionen. Die Lehren, welche wir aus Evolution und Design ziehen können, haben unsere Fähigkeit zur Herstellung maßgeschneiderter Proteinkapseln mit breitem praktischem Potenzial erheblich erweitert.