

DISS. ETH NO. 27558

From Imaging to Proteomics – Using Photoactivatable Probes to Study Enzymes

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

presented by
Zacharias Thiel

MSc ETH in Chemistry, ETH Zürich

born on 29.12.1990
citizen of Austria

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Jeffrey W. Bode, examiner
Prof. Dr. Jean-Christophe Leroux, co-examiner
Prof. Dr. Pablo Rivera-Fuentes, co-examiner

2021

Abstract

Studying the subcellular organization and activities of enzymes is fundamental for understanding their roles in biological processes and diseases. Many enzymes are known to cluster in microdomains, which defines their biological function. Sophisticated super-resolution fluorescence microscopy techniques, in combination with special chemical probes, allow the visualization of the formation and reorganization of such clusters in live cells with nanometer-precision. Most of these chemical probes reveal the position of enzymes precisely but fail to distinguish between their active and inactive forms.

Recently, we reported a dual-activatable probe for the detection of enzymatic activity with unprecedented resolution using single-molecule localization microscopy (SMLM). This probe combines a photoactivatable diazoindanone-modified xanthene dye with an enzyme-activatable reporter group. Photoactivation produces a fluorescent signal only in the presence of active enzymes.

In this thesis, we describe the design and synthesis of a novel probe for imaging nitroreductase activity based on this proof-of-principle study. Nitroreductases are enzymes that reduce nitroaromatic compounds to their corresponding anilines and are involved in detoxification processes and the activation of prodrugs. These enzymes are mainly known from bacteria, but nitroreductase activity was also observed in mammalian cells, in particular in hypoxic tumors. Their subcellular organization, however, remains incompletely characterized. We used the photoactivatable probe described in this thesis to create super-resolved maps of nitroreductase activity in mammalian cells. Two-color SMLM experiments in combination with a photoactivatable marker for mitochondria, revealed that nitroreductase activity clusters in microdomains within mitochondria.

Since it was unclear at that point which enzymes display nitroreductase activity, we further set out to identify the enzymes that catalyze this reaction. We performed a fluorescence microscopy-based high throughput RNA interference assay, targeting several hundred mitochondrial proteins including potential nitroreductases. We used a fluorogenic reporter to detect knockdown of nitroreductases by measuring differences in resulting fluorescence signal. As knockdown of the target proteins only resulted in insignificant changes of fluorescence intensity, we were not able to identify nitroreductases. We concluded that reduced activation of the fluorogenic reporter caused by knockdown of a single nitroreductase could be compensated by the presence of other enzymes with nitroreductase activity. Consequently, the

applicability of fluorescence readout is hampered rendering the RNA interference screen unsuitable to identify nitroreductases.

Pursuing an alternative strategy to explore which enzymes can reduce nitroaromatic compounds in mammalian cells, we developed a chemical proteomics approach to label and isolate these enzymes. We envisioned that once isolated, we could identify nitroreductases using mass spectrometry. Our design was inspired by our observation that the photoactivatable probe that we used for imaging nitroreductase activity photo-crosslinks to biomacromolecules in its vicinity upon irradiation. We prepared an analog of this probe, equipped with a “clickable” alkyne moiety, and showed that proteins that are labeled by this probe can subsequently be modified with azides in a copper-catalyzed alkyne azide cycloaddition. We developed a protocol for intracellular labeling of enzymes with nitroreductase activity and their subsequent isolation using avidin-biotin affinity purification with the goal to identify the labeled enzymes using mass spectrometry analysis.

Furthermore, we worked on extending the substrate scope of the dual-activatable probes. We designed photoactivatable probes for the detection of reactive oxygen species in live cells. Cuvette assays, diffraction-limited live cell imaging experiments, and initial SMLM experiments revealed that these probes can in fact be used for the detection of hydrogen peroxide but further optimization is necessary.

Zusammenfassung

Das Erforschen der subzellulären Organisation und die Aktivitäten von Enzymen ist die Grundlage, um die Rolle von Enzymen in biologischen Prozessen und Krankheiten zu verstehen. Von vielen Enzymen ist bekannt, dass sie Cluster bilden wodurch deren biologische Funktion grundlegend beeinflusst wird. Mittlerweile wurden neuartige hochauflösende Fluoreszenzmikroskopietechniken entwickelt, die es, in Kombination mit speziellen chemischen Sonden ermöglichen, die Bildung und Reorganisation solcher Cluster in lebenden Zellen mit Nanometerpräzision zu visualisieren. Die meisten dieser chemischen Sonden zeigen die Position der Enzyme präzise an, können jedoch nicht zwischen aktiven und inaktiven Enzymen unterscheiden.

Kürzlich berichteten wir über eine doppelt aktivierbare Sonde zur Detektion von enzymatischer Aktivität mit bisher unerreichter Auflösung unter Anwendung von Einzelmoleküllokalisierungs-Fluoreszenzmikroskopie. Diese Sonde kombiniert einen lichtaktivierbaren Xanthenfarbstoff, welcher eine Diazoindanongruppe enthält und mit einer enzymaktivierbaren Reportergruppe ausgestattet ist. Lichtaktivierung führt nur in Anwesenheit aktiver Enzyme zu einem messbaren Fluoreszenzsignal.

Basierend auf diesen ersten Forschungsergebnissen, berichten wir in dieser Dissertation über die Entwicklung und die Synthese einer neuartigen Sonde für das Visualisieren von aktiven Nitroreduktasen. Nitroreduktasen sind Enzyme, die nitroaromatische Verbindungen zu ihren entsprechenden Anilinen reduzieren und an Entgiftungsprozessen und der Aktivierung von Prodrugs beteiligt sind. Diese Enzyme sind hauptsächlich aus Bakterien bekannt, Nitroreduktaseaktivität wurde jedoch auch in Säugetierzellen (gleich wie unten), insbesondere in hypoxischen Tumoren, beobachtet. Die subzelluläre Anordnung dieser Enzyme ist jedoch nur unvollständig erforscht. Wir verwendeten die in dieser Dissertation beschriebene lichtaktivierbare Sonde, um hochaufgelöste Bilder von Nitroreduktaseaktivität in Säugerzellen zu erstellen. Zweifarbige Einzelmoleküllokalisierungs-Fluoreszenzmikroskopie-Experimente in Kombination mit einer lichtaktivierbaren Markierung für Mitochondrien zeigten, dass Nitroreduktaseaktivität vermehrt in Mikrodomänen innerhalb der Mitochondrien auftritt.

Da noch nicht erforscht wurde, welche Enzyme Nitroreduktaseaktivität aufweisen, war es das nächste Ziel, diese Enzyme zu identifizieren. Wir versuchten dies mittels eines auf Fluoreszenzmikroskopie basierenden Hochdurchsatz-Ribonukleinsäure-Interferenz-Assays,

welcher auf mehrere Hundert mitochondriale Proteine abzielte. In diesem Assay wurden Intensitätsunterschiede der Fluoreszenz eines Reporters, hervorgerufen durch Knockdown von Enzymen mit Nitroreduktaseaktivität, detektiert. Es gelang uns allerdings nicht, Nitroreduktasen zu identifizieren, da der Knockdown der Zielproteine nur zu unbedeutenden Änderungen der Fluoreszenzintensität führte. Wir folgerten, dass eine reduzierte Umsetzung des fluorogenen Reporters, die durch den Knockdown einer einzelnen Nitroreduktase verursacht wird, durch die Anwesenheit anderer Enzyme mit Nitroreduktaseaktivität kompensiert werden kann. Folglich ist die Auswertung mittels Fluoreszenz beeinträchtigt, was den RNA-Interferenz-Screen ungeeignet macht, Nitroreduktasen zu identifizieren.

Auf der Suche nach einer alternativen Herangehensweise zur Identifizierung von Enzymen, die nitroaromatische Verbindungen in Säugetierzellen reduzieren können, entwickelten wir eine auf Chemoproteomik basierende Methode zur spezifischen Markierung und Isolierung ebendieser Enzyme. Wir erwarteten, die Nitroreduktasen nach der Isolierung mittels Massenspektrometrie identifizieren zu können. Unser Ansatz fußte auf der Beobachtung, dass die lichtaktivierbare Sonde, die wir zur Visualisierung der Nitroreduktaseaktivität verwendet haben, bei Bestrahlung an Biomakromoleküle in ihrer Umgebung vernetzt. Wir entwickelten eine strukturell ähnliche Sonde, welche mit einem modifizierbaren terminalen Alkin ausgestattet ist, und zeigten, dass Proteine, die mit dieser Sonde markiert sind, anschließend in einer kupferkatalysierten Alkin-Azid-Zykloaddition mit diversen Aziden modifiziert werden können. Darauf basierend entwickelten wir ein Protokoll zur intrazellulären Markierung von Enzymen mit Nitroreduktaseaktivität und deren anschließender Isolierung mittels Avidin-Biotin-Affinitätsanreicherung, um die markierten Enzyme mittels massenspektrometrischer Analyse zu identifizieren.

Des Weiteren arbeiteten wir an der Erweiterung des Substratspektrums der doppelt aktivierbaren Sonden. Wir entwickelten lichtaktivierbare Sonden für den Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies in lebenden Zellen. Experimente in Küvetten, beugungslimitierte Mikroskopie-Experimente an lebenden Zellen und erste Einzelmoleküllokalisierungs-Fluoreszenzmikroskopie-Experimente zeigten, dass diese Sonden tatsächlich für die Detektion von Wasserstoffperoxid verwendet werden können, aber weiterer Optimierungen bedürfen.