

## Abstract

Protein cages are widespread in nature, notably as nanocontainers which play crucial roles in functioning of living organisms. They can act as reaction vessels or store various materials inside their lumens. Their interiors are mainly used as a protective cavities and the exterior for interactions with the outside environment whereas the interface between constituent proteins is responsible for assembly and disassembly processes which lead to cargo release and is critical for morphology and stability of the structure. Examples of natural protein cages include viral capsids, ferritins and lumazine synthase amongst others. Due to the ease of modification, high stability and well-known structure, these supramolecular assemblies are often chosen as a basis for production of novel structures and materials for bio-nanotechnology and led researchers to develop artificial versions with enhanced properties.

There is considerable interest within the protein cage engineering field in designing protein-protein interfaces so that they can disassemble upon certain stimuli. Such a property would be especially desirable for cargo delivery and release at desired times and locations. To form a protein cage with such enhanced properties, our group used a cysteine mutated, toroidal 11-mer TRAP as a building block and triggered its assembly into higher-order structures via reaction with monovalent gold ions. The cryo-EM reconstruction of the resulting structures revealed the formation of hollow, monodisperse protein cages consisting of 24 rings connected to each other via thiol-Au(I)-thiol coordination bonds between cysteines on neighboring rings. TRAP-cage is unique among artificial protein cages: It is extremely stable under harsh conditions but at the same time, it is readily disassembled after treatment with mild reducing agents.

Such characteristics hold promise for its development as a potent drug delivery vehicle. Nevertheless, targeted drug delivery is still challenging. The main aim of this research project was to design, produce and characterize novel artificial protein cages with varying, triggerable disassembly properties and the ability to encapsulate exemplar guest molecules. Simple coordination chemistry between Au(I) atoms and thiols in the TRAP-cage was an inspiration to use a different type of linking molecules which could potentially bridge cysteines together to form a protein cage. Homo-bifunctional cross-linkers which react specifically with sulfhydryl groups: DTME and BMH were the first choice. Simple mixing of cross-linkers with TRAP-rings(K35C/R64S) resulted in a successful TRAP-cage formation. It was also shown that this process is not universal and strongly depends on the maleimide cross-linker used.

Dibromo-cross-linkers are another type of linking agents that can react with sulfhydryl groups at physiological pH which were chosen to test for ability to promote TRAP-cage formation. For initial trials m-DBX and DBB were chosen which did not result in cage formation after mixing them with TRAP-rings (K35C/R64S). Another approach was tested where dibromo-cross-linkers were added to the already formed gold-induced TRAP-cage (TRAP-cage<sup>Au(I)</sup>) instead of TRAP-rings (K35C/R64S) which was named a 'templating reaction' and proved to be successful. Obtained structures of cross-linked TRAP-cages were analyzed using various methods which showed the rigidity of the assemblies and high stability. Maleimide cross-linked TRAP-cages were encapsulated with two fluorescent proteins, mOrange2 and mCherry serving as a FRET donor and acceptor respectively. Presence of these proteins in close proximity inside TRAP-cages allowed the observation of FRET between cargo molecules which enabled the tracking of cage disassembly upon the addition of various reducing agents. Development of a 'templating reaction' allowed incorporation of UV-photocleavable 1,2-BBN inside the TRAP-cage structure which led to obtaining the first (to our knowledge) protein cage whose disassembly can be controlled by light. For potential future applications of photocleavable TRAP-cage in living organisms, the photocleavage reaction was also investigated for different cross-linkers wherein the cleavage wavelength was shifted towards the visible light range.

Packaging methods were improved by incorporating the SpyCatcher protein into the TRAP-rings structure which, after cage assembly, could encapsulate SpyTag-cargo. 1,2-BBN induced SpyCatcher-TRAP-cages (SpyC-TRAP-cage<sup>1,2-BBN</sup>) were encapsulated with the computationally designed mimic of IL-2- NL-2/15 equipped with SpyTag. Simple mixing of SpyTag-NL-2/15 with SpyC-TRAP-cage<sup>1,2-BBN</sup> resulted in the encapsulation of approx. 20 cargo molecules per cage. To test the cellular response of encapsulated NL-2/15, HEK-Blue cell-based assay was performed which showed a positive response and stimulation of IL-2 R pathway after TRAP-cage<sup>1,2-BBN</sup> - NL-2/15 loaded irradiation.

In summary, the research conducted in this PhD Thesis resulted in obtaining novel methods for TRAP-cage formation and functionalization based on the variety of cross-linking agents. This resulted in obtaining the first to our knowledge UV photocleavable protein cage. Successful and efficient encapsulation methods were also developed leading to creating the novel tool for tracking the kinetics of TRAP-cage disassembly and to packaging active NL-2/15 molecules, which showed a clear medical potential of TRAP-cage.

J Heddle  
(Jonathan Heddle)

Isabella  
Stupka

## Streszczenie

Klatki białkowe są szeroko rozpowszechnionymi w przyrodzie, nano-strukturami, które odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu żywych organizmów. Mogą pełnić funkcje naczyń reakcyjnych lub przechowywać w swoim wnętrzu różne molekuly. Ich wnętrze wykorzystywane jest głównie w celach ochronnych, strona zewnętrzna do interakcji ze środowiskiem, natomiast połączenia między białkami budulcowymi odpowiadają za procesy montażu i demontażu klatek, które prowadzą do uwolnienia załadunku i mają kluczowe znaczenie dla morfologii i stabilności konstrukcji. Przykłady naturalnych klatek białkowych obejmują między innymi kapsydy wirusowe, ferrytyny i syntazę lumazyny. Ze względu na łatwość modyfikacji, wysoką stabilność i dobrze znaną strukturę, te supramolekularne nanopojemniki są często wykorzystywane jako materiał do produkcji nowatorskich materiałów dla bio-nanotechnologii. Na ich podstawie opracowano również sztuczne klatki białkowe o ulepszonych właściwościach.

Istnieje duże zainteresowanie inżynierią klatek białkowych w projektowaniu połączeń białko-białko, tak aby mogły one ulegać demontażowi pod wpływem określonych bodźców. Taka właściwość byłaby szczególnie pożądana w przypadku dostarczania i uwalniania załadunku w danym czasie i miejscu. Aby utworzyć klatkę białkową o tak ulepszonych właściwościach, nasza grupa wykorzystwała jako element budulcowy 11-merowe białko TRAP z wprowadzoną mutacją cysteinową, aby wywołać jego składanie w struktury wyższego rzędu poprzez reakcję z jednowartościowymi jonami złota. Rekonstrukcja cryo-EM ujawniła tworzenie się pustych, monodispersyjnych klatek białkowych, składających się z 24 pierścieni połączonych ze sobą wiązaniami koordynacyjnymi tiol-Au(I)-tiol między cysteinami na sąsiednich pierścieniach. Klatka TRAP ma unikalne właściwości: jest wyjątkowo stabilna, ale jednocześnie łatwo ją rozmontować w łagodnym środowisku redukującym. Takie cechy są obiecujące dla rozwoju klatki jako nośnika dostarczania leków. Niemniej jednak ukierunkowane dostarczanie leków nadal stanowi wyzwanie. Głównym celem tego projektu badawczego było zaprojektowanie, wyprodukowanie i scharakteryzowanie nowych sztucznych klatek białkowych o różnych, wyzwalaalnych na żądanie właściwościach demontażu i zdolności do zamykania przykładowych cząsteczek w ich wnętrzu. Prosta chemia koordynacyjna między atomami Au(I) i tiolami w klatce TRAP była inspiracją do zastosowania innego typu cząsteczek, które mogą potencjalnie łączyć cysteiny na sąsiadujących pierścieniach. Pierwszym wyborem były homo-bifunkcjonalne łączniki (linkery), które reagują

specyficznie z grupami sulfhydrylowymi: DTME i BMH. Zmieszanie ich z pierścieniami TRAP (K35C/R64S) zaowocowało pomyslnym utworzeniem klatki TRAP. Wykazano również, że proces ten nie jest uniwersalny i silnie zależy od zastosowanego maleimidowego łącznika. Pochodne dibromowe są innym rodzajem linkerów, które mogą reagować z grupami sulfhydrylowymi w fizjologicznym pH, które wybrano do testowania ich zdolności do tworzenia klatek TRAP. Do wstępnych prób wybrano m-DBX i DBB, które nie doprowadziły do powstania klatki po zmieszaniu ich z pierścieniami TRAP (K35C/R64S). Przetestowano inne podejście, w którym do już utworzonej klatki TRAP indukowanej złotem (TRAP-cage<sup>Au(I)</sup>) dodano dibromo-linkery, w tak zwanej „reakcji szablonowej”. Otrzymane w ten sposób struktury klatek TRAP poddano analizie metodami, które wykazały ich wysoką stabilność.

Klatki TRAP złożone z linkerami maleimidowymi zenkapsulowano dwoma białkami fluorescencyjnymi, mOrange2 i mCherry, służącymi odpowiednio jako donator i akceptor FRET. Obecność tych białek w bliskim sąsiedztwie wewnątrz klatek TRAP umożliwiła obserwację FRET między cząsteczkami, co umożliwiło śledzenie rozpadu klatki po dodaniu różnych związków redukujących.

Opracowanie „reakcji szablonowej” umożliwiło wprowadzenie foto-degradowalnego w promieniowaniu UV linkera 1,2-BBN co doprowadziło do uzyskania pierwszej (według naszej wiedzy) klatki białkowej, której rozpad można kontrolować za pomocą światła. W przypadku potencjalnych przyszłych zastosowań klatki TRAP w żywych organizmach zbadano również reakcję foto-rozpadu dla innych linkerów, w których długość fali została przesunięta w kierunku zakresu światła widzialnego.

Metody pakowania zostały ulepszone poprzez włączenie białka SpyCatcher do struktury pierścieni TRAP, które po złożeniu klatki mogą enapsulować ładunek zawierający metkę SpyTag. Klatki SpyCatcher-TRAP indukowane 1,2-BBN (SpyC-TRAP-cage<sup>1,2-BBN</sup>) zenkapsulowano komputerowo zaprojektowanym białkiem podobnym do IL-2-NL-2/15 z metką SpyTag. Zmieszanie SpyTag-NL-2/15 ze SpyC-TRAP-cage<sup>1,2-BBN</sup> poskutkowało enkapsulacją około 20 cząsteczek ładunku na klatkę. Aby przetestować odpowiedź komórkową enapsulowanego NL-2/15, przeprowadzono test na komórkach HEK-Blue, który wykazał pozytywną odpowiedź i stymulację szlaku IL-2R po potraktowaniu komórek naświetlonymi SpyC-TRAP-cage<sup>1,2-BBN</sup>-NL-2/15.

Podsumowując, badania przeprowadzone w niniejszej rozprawie doktorskiej zaowocowały uzyskaniem nowatorskich metod tworzenia i funkcjonalizacji klatek TRAP w oparciu o różnorodne czynniki linkujące. Dzięki temu uzyskano pierwszą według naszej wiedzy foto-degradowalną pod wpływem UV klatkę białkową. Opracowano również skuteczne i wydajne metody enkapsulacji, co doprowadziło do stworzenia nowego narzędzia do śledzenia kinetyki demontażu klatki TRAP i pakowania aktywnych cząsteczek NL-2/15, które wykazały wyraźny potencjał dla zastosowania medycznego klatek TRAP.

J Heddle

(Jonathan Heddle)

Isabella Stupka