



*Design, Construction and Testing of a Photoactivatable and Diffusive Protein Network in Saccharomyces Cerevisiae*

A.E. Bury

Het belangrijkste doel van het werk dat beschreven is in dit proefschrift is de constructie van een uniek moleculair hulpmiddel dat gebruikt kan worden om ons begrip van diffusie van eiwitten, en eiwit netwerken, in het cytoplasma van eucaryote cellen, op een hoger plan te brengen. Dit hulpmiddel zou moeten bestaan uit een fusie eiwit, opgebouwd uit een lichtgevoelig input domein translationeel gefuseerd met een cytoplasmatisch histidine-specifiek eiwit kinase uit de bakkersgist *Saccharomyces cerevisiae*.

Hoofdstuk 1 is een algemene inleiding in de achtergrondkennis die beschikbaar was rond dit onderwerp bij de start van het onderzoek. Met name wordt ingegaan op issues die te maken hebben met (i) biologische signaaloverdracht, (ii) cytoplasmatische diffusie in ruimtelijk gedifferentieerde cellen (eucaryote) cellen en (iii) optogenetika. Dit laatste is een recent ontstaan onderzoeksveld waar het ontwerpen en gebruik van fusie eiwitten centraal staat, waarin met (zichtbaar) licht de output functie van het eiwit (zoals bijvoorbeeld een kinase activiteit) gemoduleerd kan worden.

In hoofdstuk 2 wordt een karakterisering gepresenteerd van de redox transitie van de flavine chromofoor van zo'n fusie-eiwit, in dit geval bestaande uit het LOV-domein van LovK en STAS-domein van een stressosoom eiwit van *B. subtilis*. We laten zien dat de redox transitie van dit flavine plaatsvindt bij een redox potentiaal die dicht ligt bij de redox potentiaal waarbij een aantal belangrijke intracellulaire metabolieten ook zo'n overgang vertonen. Bovendien laten we zien dat de redox toestand van de chromofoor van zo'n LOV-domein ook waargenomen kan worden *in vivo*, i.e. wanneer het eiwit zich bevindt in het cytoplasma van *Escherichia coli*. Maar onder geen van de geteste condities vond een overgang van deze flavine chromofoor naar de (volledig) gereduceerde toestand plaats.

In hoofdstuk 3 wordt het ontwerpen, de constructie en synthese, en de *in vitro* biochemische karakterisering gepresenteerd van de beoogde functionele fusie eiwitten. Deze bestaan uit een N-terminaal LOV-domein (van het stressosoom eiwit YtvA uit *Bacillus subtilis*), translationeel gefuseerd, via een coiled-coil linker structuur, met het Sln1 histidine kinase domein van het osmostress respons systeem van *S. cerevisiae*. In de meeste van deze fusie eiwitten zorgt blootstelling aan blauw licht voor een verlaging van de histidine kinase activiteit. Maar via rationele engineering van de lengte van de coiled-coil linker structuur is ook een licht-moduleerbaar kinase verkregen waarin belichting leidt tot een verhoging van de kinase activiteit.

Hoofdstuk 4 beschrijft *in vivo* tests van de functionaliteit van één van de geconstrueerde kinases beschreven in hoofdstuk 3, C9, het fusie eiwit waarin belichting aanleiding gaf tot de sterkste verlaging van de autokinase (i.e. 'zelf-fosforylering' m.b.v. ATP) activiteit. Dit

orthogonale licht-afhankelijke systeem kan in *Saccharomyces cerevisiae* zowel gebruikt worden om genexpressie te stimuleren, alsook om repressie van genexpressie te bewerkstelligen, via een specifieke keus van de respectievelijke target promotor. Daarenboven kan dit geconstrueerde hybride kinase ook gebruikt worden om de accumulatie van signaaltransductie componenten in de kern van de gistcellen met een puls van blauw licht te in gang te zetten.

In hoofdstuk 5 wordt in detail ingegaan op de toepassing van een recent geïntroduceerde methode (de 'Phos-tag' methode) om te meten in welke mate specifieke eiwitten, zoals de kinases en response regulators van twee-componenten systemen, gefosforyleerd zijn (op respectievelijk de zijketen van een histidine en een asparaginezuur in de katalytisch centrum van deze twee eiwitten). We beschrijven een serie experimenten waaruit we moeten concluderen dat, ondanks vele pogingen, het niet gelukt is om met deze techniek de fosforyleringsgraad van de beide response regulatoren van het Sln1 systeem van *S. cerevisiae* te bepalen, terwijl dit voor het controle eiwit, ArcA, wel mogelijk was. Mogelijke verklaringen hiervoor moeten gezocht worden in problemen om de gefosforyleerde en niet-gefosforyleerde vorm van deze eiwitten op een SDS-PAA gel van elkaar te scheiden, of in de intrinsieke instabiliteit van de fosfo-aspartyl binding. Uit een screening van de recente literatuur bleek dat toepassing van deze phos tag methode nog voor geen enkele eucaryote response regulator gerapporteerd is.

Tot slot worden in hoofdstuk 6 een aantal zaken die uit de uitgevoerde experimenten naar voren kwamen, en die nog niet in de discussie paragraaf van de afzonderlijke hoofdstukken aan de orde gekomen waren, bediscussieerd in het licht van de kennis die hieromtrent beschikbaar is in de recente wetenschappelijke literatuur. Dit betreft vooral zaken die te maken hebben met de diffusie van signaal moleculen in het cytoplasma van eucaryote cellen en het ontwerp van lichtgevoelige fusie-eiwitten waarmee dit proces verder bestudeerd kan worden via in ruimte en tijd gelimiteerde belichting.