

University of Groningen

## Engineering biological nanopores for proteomics study

Huang, Kevin

DOI:  
[10.33612/diss.102598418](https://doi.org/10.33612/diss.102598418)

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2019

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*  
Huang, K. (2019). *Engineering biological nanopores for proteomics study*. University of Groningen.  
<https://doi.org/10.33612/diss.102598418>

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## **Samenvatting**

## 1. Conclusie

Biologische nanoporiën kunnen worden bereid met een hoge reproduceerbaarheid en op atomair niveau worden ontwikkeld. Nanoporiën zijn met succes geïmplementeerd voor DNA-sequencing. Nanoporie wordt echter veel minder gebruikt voor eiwitanalyse of sequencing vanwege de hoge orde structuur, verschillende ladingscondities van eiwit, dat is samengesteld uit 20 verschillende aminozuren. DNA bevat daarentegen slechts vier soorten nucleotiden en heeft een uniforme negatieve lading. In dit proefschrift hebben we een nieuwe manier voorgesteld om eiwitten met nanoporie te sequencen op een manier die vergelijkbaar is met traditionele massaspectrometrie-sequencing. Het eiwit kan worden omgezet in peptiden met enzymen en de peptidemassa kan worden geïdentificeerd met nanoporiën in plaats van massaspectrometrie. We hebben dit systeem een nanoporie-peptidemassa-identificator genoemd. In vergelijking met de traditionele massaspectrometrische detectie is nanoporie-peptide-identificator een techniek met één molecule die de detectiegevoeligheid zou kunnen verbeteren, waardoor het mogelijk wordt om de ultra-lage overvloed aan eiwitten en post-translatiemodificaties (PTM's) te detecteren. Om de identificatie mogelijk te maken, hebben we eerst gewerkt aan de methode om alle peptiden met verschillende ladingscondities in de nanoporiën te vangen met behulp van Fragaceatoxin C (FraC) nanoporiën (hoofdstuk 2). Wild-type FraC-nanoporiën kunnen peptiden tot 10 AA detecteren, maar het peptide is korter dan dat getransloceerd te snel om te worden gedetecteerd. Daarom richten we ons ook op de engineering van de grootte van FraC-nanoporiën voor kleine poriën (hoofdstuk 3). Wat nog belangrijker is, is dat er een verband moet zijn tussen het ionenstroomsignaal van de nanoporie en de peptidemassa als we een onbekend peptide zouden moeten identificeren om de identificatie van de nanoporiepeptidemassa te maken (hoofdstuk 3). Niet beperkt tot eiwitsequencing-inspanningen, de tweecomponenten pleurotolysine nanoporie (PlyAB) met een 5,5 nm vernauwingsplaats, is gereconstitueerd en geconstrueerd voor detectie van grote gevouwen eiwitten (hoofdstuk 4). Dit werk heeft een belangrijke bijdrage geleverd aan de op nanoporie gebaseerde proteomica. Verschillende belangrijke conclusies uit dit project worden hieronder samengevat samen met toekomstperspectieven.

**Conclusie 1: De uniforme vangst van eiwit of peptide met verschillende ladingen werd efficiënt bereikt door het afstemmen van de elektro-osmotische stroming en ladingafstoting.**

De verschillende lading van peptide staat geen uniforme opname toe door elektroforese te gebruiken. We hebben aangetoond dat de elektro-osmotische stroming in FraC-nanoporiën kan worden ontworpen om peptiden met verschillende ladingen te vangen. Wild type FraC nanoporie bevat een negatief geladen vernauwing en is daarom kationenselectief. Bij neutrale pH is de elektro-osmotische stroom (EOF) gegenereerd door FraC-nanoporiën niet sterk genoeg om de negatief geladen peptiden tegen de elektroforetische kracht op te vangen. Door de pH te verlagen tot 4.5, werd de EOF verlaagd vanwege het verlies van negatieve lading in de vernauwing, en ondertussen werd ook de negatieve ladingsdichtheid van het peptide verminderd. Aldus werd de ladingafstoting samen met de tegengestelde elektroforetische kracht verzwakt voor een negatief geladen peptide bij pH 4.5. In ons experiment werd de verminderde elektro-osmotische stroom dominant en kon het negatief geladen peptide in FraC vangen. In een dergelijke toestand waren de elektroforetische kracht en de elektro-osmotische stroming opgelegd aan een positief geladen peptide in dezelfde richting, waardoor positief geladen peptiden gemakkelijk konden worden gevangen. Daarom bereikten we de uniforme vangst van peptiden met verschillende originele ladingsaanstellingen.

**Conclusie 2: Het nanoporiënsignaal gemeten door FraC nanoporiën zou gecorreleerd kunnen worden met de peptidemassa bij pH 3,8 in de richting van een nanoporie peptidemassa-identificator.**

Aangezien verschillende geladen peptiden kunnen worden gevangen in FraC-nanoporiën bij pH 4.5, is de volgende vraag hoe de identificatie van een onbekend peptide kan worden uitgevoerd. We onderzochten de relatie tussen de ionische stroom van peptideblokkades en de peptide-eigenschap. In theorie moet de uitgesloten stroom evenredig zijn met het uitgesloten volume van het peptide wanneer het de porie doorloopt, en het volume is ook gerelateerd aan de massa. We hebben de correlatie waargenomen tussen het ionensignaal en de peptidemassa voor de meeste peptiden behalve twee negatief geladen peptiden bij pH 4.5. Door de pH te verlagen tot 3.8 hebben we bovendien een correlatie waargenomen tussen de uitgesloten stroom en de peptidemassa voor alle peptiden die we hebben getest. Met de beschikbare correlatie kan de massa van een onbekend peptide worden geïdentificeerd met de ionenstroom gemeten met nanoporie. Op deze manier kunnen FraC-nanoporiën worden gebruikt als peptidenmassa-identificatoren.

**Conclusie 3: De grootte van FraC-nanoporiën kan worden gemanipuleerd door manipulatie van de interactie tussen het FraC-monomeer en de lipidebilaag.**

Een van de nadelen van biologische nanoporiën is hun vaste grootte. Wat betreft wildtype FraC, het kan alleen de peptiden detecteren met een molecuulgewicht hoger dan 1.2 kDa. De peptiden kleiner dan die transloceren te snel om goed te worden bemonsterd. Daarom is het noodzakelijk om biologische nanoporiën met een kleinere grootte te ontwikkelen voor het detecteren van korte peptiden. En engineering van kleinere biologische nanoporie is een uitdaging.

In deze studie hebben we een nieuwe strategie toegelicht om de oligomere samenstelling van FraC nanoporiën te veranderen door de interactie tussen het monomeer en de lipide dubbellaag te verzwakken. FraC-monomeren binden aan sfingomyeline-lipide en assembleren tot oligomeren. Kristalstructuur van FraC onthulde verschillende aromatische aminozuren die zich in de lipidebindingsinterface bevinden, die cruciaal zijn voor de interactie van FraC en het membraan. Daarom hebben we de tryptofaanresten vervangen die belangrijk zijn voor lipidebinding aan serine. Op deze manier werd de effectieve concentratie van FraC-monomeer gebonden aan lipidemembraan verlaagd en werden belonend twee soorten FraC-nanoporiën met kleinere afmetingen bereid. De nieuwe soorten FraC-nanoporiën komen waarschijnlijk overeen met verschillende oligomeren met minder subeenheden. Aldus presenteerde deze methode een eenvoudige manier om de poriegrootte te construeren en zonder de porielumengeometrie te veranderen. De poriën van type III kunnen mogelijk de kleinste nanoporie zijn die ooit is gemaakt voor elektrische detectie met hoge reproduceerbaarheid.

**Conclusie 4: Nieuwe biologische nanoporie met een grotere poriegrootte werd gereconstitueerd in de standaard lipide dubbellaag voor detectie van gevouwen eiwitten.**

B-vat biologische nanoporiën hebben meestal een smalle poriegrootte (1-2 nm in diameter), wat ideaal is voor het sequentiëren van polymeren door ze door de porie te rijgen. Maar de kleine omvang maakt het ook moeilijk om grote gevouwen eiwitten te bestuderen. Hoewel er in de natuur veel grote eiwitkanalen zijn, is de zorg dat de grote membraankanalen waarschijnlijk inhomogene poriën vormen met een variabel aantal subeenheden en onvoorspelbare groottes, wat problematisch is voor detectie van elektrofysiologie. Bovendien hebben deze poriën normaal gesproken specifieke vereisten met betrekking tot de chemische samenstelling van het lipidemembraan om hun functies correct te assembleren en uit te voeren,

waardoor het een uitdaging is om ze te reconstitueren in de kunstmatige lipide-dubbellaag voor detectie van elektrofysiologie.

Hier hebben we met succes de twee componenten pleurotolysine nanoporiën (PlyAB) gereconstitueerd in een standaard lipide dubbellaag. De PlyAB-nanoporiën is een groot eiwitcomplex met 39 monomeren en een totaal molecuulgewicht van ongeveer 1.14 MDa. We hebben een zeer homogene kanaalgeleidingsverdeling waargenomen in elektrofysiologische experimenten. PlyAB-nanoporiën zijn de grootste biologische nanoporiën die worden gebruikt voor detectie met een diameter van 5.5 nm op de smalste plaats, die ongeveer twee keer zo groot is als ClyA-nanoporiën. Dit is de enige andere biologische nanoporiën die kleine gevouwen eiwitten kan bevatten. De eigenschappen van PlyAB, zoals de poriestabiliteit, ionenselectiviteit, eiwitexpressie, zijn met succes gewaarschuwd en verbeterd door gerichte evolutie samen met rationele plaatsgerichte mutagenese. Met een grotere omvang konden PlyAB-nanoporiën grote plasma-eiwitten met een molecuulgewicht tot 80 kDa detecteren en onderscheiden. Het biedt een nieuw hulpmiddel voor de gevoelige detectie van gevouwen eiwitten en karakterisering van de nanofluïdische eigenschap van grote biologische nanoporiën.

## 2. Toekomstperspectief

Omdat de correlatie tussen ionisch signaal en peptidemassa is vastgesteld, is de volgende taak voor het ontwikkelen van een op nanoporie gebaseerde peptidemassaspectrometer het verbeteren van de resolutie van peptidediscriminatie. Momenteel kunnen we onderscheid maken tussen asparaginezuur en alanine (44 Da), maar het identificeren van een kleiner verschil is nog steeds een hele uitdaging. De belangrijkste factor die de resolutie bepaalt, is de signaalhomogeniteit van peptide. Daarom is het zo belangrijk mogelijk om de verspreiding van het peptidesignaal zo nauw mogelijk te maken. Een andere interessante vraag is waarom de correlatie tussen de uitgesloten stroom en de peptidemassa niet meer bestaat wanneer de pH lager is dan 3.8. Een mogelijkheid is het verlies van ladinginteractie tussen de peptiden en de FraC-vernauwing, wanneer asparaginezuur op positie 10 geprotoneerd wordt wanneer de pH lager is dan 3.8, hetgeen de vorm- of conformatie-verandering van peptiden veroorzaakt. Het gedrag en de conformatie van een peptide in de nanoporie zijn nog niet volledig begrepen. Daarom kunnen MD-simulaties waardevolle informatie opleveren. Experimenteel zou het onnatuurlijke aminozuur met extreem lage pKa kunnen worden opgenomen in de FraC-vernauwing. In een dergelijk scenario, wanneer de pH lager is dan 3.8, kan

nanoporie nog steeds enige negatieve lading behouden om te controleren of de ladinginteractie cruciaal is voor de correlatie.

Met de beschikbare FraC-peptide-massa-identificator is het uiteindelijke doel van het bepalen van de sequentie van een eiwit het hele eiwit in peptiden te verteren en te meten met de FraC-nanoporiën. Verschillende proteasen kunnen worden gebruikt om eiwitten te verteren. In proof-of-concept experimenten worden de gedigereerde peptidesequenties voorspeld en bevestigd door massaspectrometrie om te vergelijken met de signalen gemeten met nanoporiën. In het ideale geval zou de peptidemassa geëxtraheerd uit FraC nanoporiëmeting identiek moeten zijn aan de echte peptidemassa. Het is zeer waarschijnlijk dat meer gecompliceerde gegevensanalysemethoden zoals machine learning nodig zijn om de verteerde peptidesequentie te helpen definiëren, rekening houdend met de complexiteit van de sequentie en de huidige resolutie van peptidescheiding met nanoporiën.

Ondanks de pre-vertering van een eiwit, kan een real-time eiwitsequencer ook worden gebouwd door verschillende enzymen zoals unfoldase en protease bovenop de FraC-peptide-massa-identificatie te verankeren. Er zijn verschillende eiwitverteringsmachines in de cellen, zoals het AAA + protease ClpXP-systeem, dat ook assembleert in homomere ringen en dus mogelijk is om de nanoporie-geometrie te evenaren. Het protease moet mogelijk chemisch of genetisch aan de nanoporiën worden bevestigd om dissociatie te voorkomen. Op deze manier kan een eiwit worden ontvouwen, verteerd en het peptide in realtime worden gemeten door nanoporiën.

PlyAB-nanoporiën kunnen meer worden benut voor identificatie van andere gevouwen eiwitten of functie-evaluatie. Eiwit-eiwitinteractie (PPI), detectie van kleine moleculen en enzymologie met één molecuul zijn allemaal interessante onderwerpen voor verdere PlyAB-toepassingen. Maar het vangen of vasthouden van eiwitten in het lumen van PlyAB kan een verdere engineering van de interne ladingstoestand en nanofluidische eigenschap vereisen. Er is bijvoorbeeld een algeheel positief geladen vestibule nodig om het verblijf van negatief geladen eiwit in de porie mogelijk te maken.