

## University of Groningen

### Peptides of interest

Huang, Chenxi

DOI:  
[10.33612/diss.136545068](https://doi.org/10.33612/diss.136545068)

**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:*  
2020

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

*Citation for published version (APA):*

Huang, C. (2020). *Peptides of interest: Editing of Lactococcus lactis proteolytic system to increase its bioactive potential*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.136545068>

#### 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).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

#### 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.

## **Appendices**

中文总结

**Nederlandse samenvatting**

**Acknowledgements**

## 中文总结

追本溯源的审视这本博士论文,会发现我们主要是想回答的是这样一个科学问题:我们能够通过编辑乳酸乳球菌的水解系统来提高其产生生物活性肽的潜力吗?我们的主线研究(第二章节)即是为了解答此问题而展开。而这个问题中的数个关键词,又为我们衍生出了几个其它的科学问题:第一,生物活性肽(第一章):我们对生物活性肽这个概念了解多少?对于从牛奶中,或说更具体些,对 $\beta$ -酪蛋白中衍生的生物活性肽了解多少?第二,乳酸乳球菌的水解系统(第三章):我们对这个系统了解多少?尤其是,我们对这个系统中的细胞内肽酶了解多少?再具体来说,对于它们在乳酸乳球菌体内的活性以及其对细胞的生长和肽的水解的影响了解多少?第三,乳酸乳球菌的基因编辑(第四、五章):对乳酸乳球菌来说,现有的基因编辑工具是否易于使用?如果不是的话,我们需要开发新的工具吗?对以上的数个科学问题,我们进行了数年的探索,在本书的第一章,我们全面回顾了已有的 $\beta$ -酪蛋白衍生的生物活性肽的相关知识以及利用乳酸菌生产这些肽的潜力;在第二章节,即整个研究的开篇,我们通过基因编辑手段,构建了大量的乳酸乳球菌胞内肽酶多重突变体的组合,对乳酸乳球菌的水解系统进行改造,并利用这些突变体水解 $\beta$ -酪蛋白,增加其水解产物中的生物活性肽的数量及种类;在第三章节中,我们拓宽了对乳酸乳球菌水解系统的知识,证明了二肽酶PepV除了已知的功能外,还作为细胞内氮代谢和细胞壁合成之间的纽带,在肽聚糖的生物合成中具有重要作用;在第四章节中,我们为乳酸乳球菌开发了基于质粒和基因组的CRISPRi系统,扩大了乳酸乳球菌的遗传工具箱。当我们研究的基因是必要基因,即难以用传统的同源重组方法敲除时,我们可以利用此工具快速的抑制此基因的表达,从而使研究得以继续,正如第五章中我们使用了CRISPRi系统抑制 $usp45$ 基因的表达。

在第一章中,我们对 $\beta$ -酪蛋白衍生的生物活性肽的功能、乳酸菌在发酵过程中产生生物活性肽的能力、以及在乳酸菌使用CRISPR/Cas技术的可能性进行了全面的回顾。在第二章中,我们设计并制备了16个细胞内肽酶的基因敲除质粒,并构建了一系列的单肽酶和多肽酶敲除的突变体。我们的主要目的有两个:第一,敲除尽可能多的肽酶基因;第二,敲除来自同一特异性组别的肽酶基因,即敲除所有内肽酶、所有氨基肽酶、所有二/三肽酶、所有脯氨酸特异性肽酶。前者的原因是,如果一个乳酸乳球菌的突变体,拥有尽可能少的肽酶基因,那么它就有可能拥有尽可能多的未被水解的肽段,即有更多的可能性得到更多数量和种类的生物活性肽,但在如果同一组别的肽酶在功能上存在冗余,那么当我们哪怕敲除了大部分肽酶基因,但各个组别均留有一到两个基因,那么仍有可能肽段可以被正常的水解为氨基酸,基于此我们有了第二个目标。最终,我们分别获得了六个突变体,其中两个分别有7个肽酶基因被删除,分别为MG $\Delta pepNXOTCF_2O_2$ 和MG $\Delta pepNXOTCVD_A$ ,另外四个,则分别删除了上述四个肽酶组中的全部基因,分别为

MG $\Delta$ pepOF<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MG $\Delta$ pepXPQ, MG $\Delta$ pepANCpcp, 和MG $\Delta$ pepVD<sub>A</sub>TD<sub>B</sub>。而后, 我们开发了一个用于大规模乳酸乳球菌胞内肽组分析的工作流程, 我们将乳酸菌视为水解 $\beta$ -酪蛋白的工具, 将 $\beta$ -酪蛋白分别与乳酸乳球菌的野生型和六个多肽酶突变体混合培养, 再对乳酸菌的胞内肽组进行分析。我们观察到乳酸乳球菌胞内的生物活性肽的积累与胞内肽酶的组合相关, 且内肽酶都被敲除的突变体, 其胞内的生物活性肽的数量和种类都有明显的提高。这项工作表明, 通过对乳酸乳球菌的蛋白水解系统进行基因编辑, 可以增加生物活性肽的数量和生物活性的种类。

在构建二/三肽酶突变体MG $\Delta$ pepVD<sub>A</sub>TD<sub>B</sub>的过程中, 我们发现了一个有趣的现象: 二肽酶突变体MG $\Delta$ pepV在SMGG生长培养基中过夜不能生长, 而且这种现象在敲除其他单个肽酶是都没有发生。于是在第三章中, 我们探讨了这一现象背后的原因: 乳酸乳球菌的蛋白水解系统在其氮代谢中起着至关重要的作用, 而二肽酶PepV则在蛋白水解的最后阶段发挥作用。MG $\Delta$ pepV的表型(在SMGG中过夜培养后, 在显微镜下能观察到细胞裂解和缺陷表型)揭示了乳酸乳球菌的氮代谢和肽聚糖的生物合成之间的联系。后续实验证明了这种表型是由丙氨酸的短缺引起的, 因为添加丙氨酸可以恢复其生长并恢复细胞形状的缺陷。此外, 菌株MG $\Delta$ pepV对万古霉素(一种靶向肽聚糖D-Ala-D-Ala末端的抗生素)的耐药性更强, 这也证实了MG $\Delta$ pepV具有异常的肽聚糖组成。通过反复将MG $\Delta$ pepV接入SMGG环境, 我们获得了以MG $\Delta$ pepV为野生型背景的突变体, 其生长抑制和细胞形状缺陷得到缓解。通过基因组测序表明, 该菌株相对于其亲本有一个单点突变, 在调控因子codY的基因中。于是我们进行了转录组测序(RNA-seq)来进一步探索PepV活性、CodY调控和肽聚糖合成之间的联系。

如上所述, 为了编辑乳酸乳球菌的水解系统, 我们构建了大量的肽酶敲除的突变体。这些突变体是经由传统的同源重组方法构建的, 每个基因的敲除大约耗时三周到一个月, 而多重突变体的构建不能平行进行, 而是需要一个接一个的进行基因敲除, 这也使得耗时成倍增加, 而在获得突变体之前, 我们并不能够预知此突变体在水解 $\beta$ -酪蛋白时是否能带来更多的生物活性肽。如果能在较短的时间内敲除或抑制多个肽酶, 那么我们就可以利用第二章开发的肽组学 workflow 来测试和进一步研究更多的组合。于是在第四章中, 我们构建了乳酸乳球菌平台上的CRISPRi系统。我们使用nisin诱导的启动子P<sub>nisA</sub>来驱动dCas9, 用常量表达的启动子P<sub>usp45</sub>启动子来驱动sgRNA, 使用In-fusion和Golden gate assembly这两种克隆方法对sgRNA中标靶目的基因的20bp进行快速替换。在乳酸乳球菌中有许多能影响细菌表型的基因, 我们挑选了其中三个作为测试CRISPRi系统的示例: 参与细胞自溶的acmA基因, 参与细胞分裂的ftsZ基因, 以及参与细胞伸长的pbp2b基因。当使用我们开发的CRISPRi分别抑制上述基因表达时, 我们观察到了相应的表型, 即acmA/ftsZ的抑制系有大量长链细胞出现, 而pbp2b的靶细胞则出现球形表型。此外, 我

们还发现,当我们使用pNZ8048质粒作为*dcas9*的载体时,即使不加入nisin,也能够观察到相应的表型,而当我们*dcas9*整合到基因组上时,则可以避免此现象,这很可能是因为pNZ8048作为的拷贝数过高,成倍增加了P<sub>*nisA*</sub>启动子泄漏的后果。因此,基因组表达的*dcas9*能得到更严格的nisin诱导体系,是比质粒体系更好的选择。在第五章中,我们使用CRISPRi系统来帮助研究了神秘的Usp45的功能。Usp45是乳酸乳球菌的主要分泌蛋白,而*usp45*基因不能通过双交叉重组删除,因此该基因很可能是一个必需基因,我们使用CRISPRi来抑制*usp45*基因的表达。通过研究抑制和过表达*usp45*基因对乳酸乳球菌的生长、表型和细胞分裂的影响,我们证明了*usp45*基因对乳酸乳球菌细胞的正常分裂至关重要,该蛋白可能通过作为一种肽聚糖水解酶来介导细胞分离。

第6章总结和讨论了本论文所述工作的最重要的发现和未来的展望。

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het doel van dit proefschrift was om één vraag in het bijzonder te beantwoorden: kan men de hoeveelheid of de diversiteit (of beide) van bioactieve peptiden in melk verhogen door het proteolytische systeem van *Lactococcus lactis* te moduleren? De hoofdonderzoekslijn heeft die vraag onderzocht. Bovendien worden drie kwesties die voortkomen uit deze hoofdvraag afzonderlijk behandeld in dit proefschrift: (i) bioactieve peptiden: hoeveel weten we over bioactieve peptiden die zich in melk bevinden en, meer specifiek, over bèta-caseïne? (ii) het modificeren van *L. lactis*: welke tools zijn er en zijn ze goed genoeg, of kunnen we nieuwe / betere ontwikkelen; (iii) 3. Het proteolytische systeem van *L. lactis*: wat weten we over dit systeem en, vooral, wat weten we over de *in vivo* (complementerende) activiteiten van de peptidasen met betrekking tot celgroei en peptideafbraak. Hoofdstuk 1 geeft een uitgebreid overzicht van de kennis over bioactieve peptiden afkomstig van  $\beta$ -caseïne en de mogelijkheid om melkzuurbacteriën te gebruiken om dergelijke peptiden te produceren; In Hoofdstuk 2, het eerste hoofdstuk van dit proefschrift, hebben we het proteolytische systeem van *L. lactis* aangepast door een grote verzameling van verschillende combinaties van peptidase mutanten te maken, en die mutanten te gebruiken om de hoeveelheid en diversiteit van bioactieve peptiden afgeleid van  $\beta$ -caseïne te vergroten; In Hoofdstuk 3 verbreden we de kennis over het proteolytische systeem van *L. lactis*, en bewijzen we dat de dipeptidase PepV een belangrijke rol speelt in de biosynthese van peptidoglycaan door te fungeren als link tussen stikstofmetabolisme en celwandsynthese. In Hoofdstuk 4 breiden we de genetische toolbox voor *L. lactis* uit door plasmide- en genoom-gebaseerde CRISPRi-systemen te ontwikkelen die het mogelijk maken om snel biologische routes aan te passen of essentiële genen te karakteriseren, zoals werd onderzocht in Hoofdstuk 5.

In Hoofdstuk 1 geven we een uitgebreid overzicht van de functionaliteit van bioactieve peptiden afkomstig van  $\beta$ -caseïne van de koe, het vermogen van melkzuurbacteriën om bioactieve peptiden te produceren tijdens het fermentatieproces, en de mogelijkheid om CRISPR / Cas-gebaseerde technologie in te zetten voor modificatie van het genoom van melkzuurbacteriën. In Hoofdstuk 2 hebben we een gen knock-out plasmide bibliotheek ontworpen en gemaakt voor 16 intracellulaire peptidasen en een verscheidenheid aan enkele en meervoudige knock-out mutanten gemaakt. De twee belangrijkste doelen waren: A) zoveel mogelijk peptidase genen uitschakelen; B) om peptidasen uit dezelfde

specificiteitsgroep uit te schakelen, d.w.z. alle endopeptidasen, aminopeptidasen, di- / tripeptidasen of alle proline-specifieke peptidasen. Uiteindelijk hebben we twee peptidase mutanten verkregen waarin zeven peptidase genen zijn verwijderd en vier mutanten waarin alle genen van een van de bovengenoemde peptidase groepen zijn verwijderd. Vervolgens hebben we een analytische pijplijn ontwikkeld voor grootschalige intracellulaire peptidomics van *L. lactis*. De zes meervoudige peptidase mutanten die we verkregen, werden met behulp van deze pijplijn onderzocht en er werd een stamafhankelijke accumulatie van bioactieve peptiden waargenomen. Dit werk suggereert dat zowel het aantal verschillende bioactieve peptiden als de diversiteit aan bioactiviteit kan worden verhoogd door het proteolytische systeem van *L. lactis* genetisch te veranderen.

Bij het maken van de di- / tripeptidase mutant werd een interessante observatie gedaan: de dipeptidase mutant *MGΔpepV* groeit niet in SMGG groeimedium gedurende incubatie overnacht. In hoofdstuk 3 hebben we de reden achter dit fenomeen onderzocht. Het proteolytische systeem speelt een vitale rol in het stikstof metabolisme van *L. lactis*, waarbij de dipeptidase PepV een rol speelt in de laatste stadia van proteolyse. Een verband tussen het stikstofmetabolisme en de biosynthese van peptidoglycaan (PG) werd aan het licht gebracht door het fenotype van *MGΔpepV* (het uiteenvallen van cellen en vormdefecten wanneer deze gedurende de nacht in SMGG werd gekweekt). Dit fenotype bleek te worden veroorzaakt door een tekort aan alanine, omdat het toevoegen van alanine de groei kan redden en de defecten in celvorm kan herstellen. Bovendien is stam *MGΔpepV* meer resistent tegen vancomycine, een antibioticum dat zich richt op PG D-Ala-D-Ala-uiteinden, wat bevestigde dat *MGΔpepV* een abnormale PG samenstelling heeft. Een mutant van *MGΔpepV* werd verkregen die geen vertraging in groei en geen defecten in celvorm toonde. Door analyse van het genoom werd aangetoond dat de stam een enkele puntmutatie heeft, in het gen voor de hoofdregulator CodY, ten opzichte van de ouderlijke stam. Transcriptoom analyse (RNA-seq) werd gebruikt om de verbanden tussen PepV activiteit, CodY regulatie en PG synthese in *L. lactis* te ontrafelen.

Zoals hierboven vermeld, hebben we verschillende meervoudige peptidase knock-out mutanten geconstrueerd. We gebruikten de traditionele methode die uitgaat van homologe recombinatie en dubbele 'crossover', die behoorlijk arbeidsintensief en tijdrovend is. Als meerdere peptidasen in een korter tijdsbestek uitgeschakeld of gedereguleerd kunnen worden, kunnen er meer combinaties van verminderde peptidase

activiteit getest en verder onderzocht worden door de peptidomics pijplijn die we hebben ontwikkeld. Daarom hebben we in Hoofdstuk 4 zowel een chromosoom-gebaseerde als een plasmide-gebaseerde CRISPR-interferentieplatform opgesteld, die nuttig zal zijn voor toekomstige aanpassingen van het genoom van *L. lactis*. We gebruikten het NICE-systeem om de expressie van dCas9 te stimuleren en de constitutieve Lactococcus promotor Pusp45 om de productie van verschillende sgRNAs te reguleren. Zowel 'in-fusion' klonering als 'golden gate-assembly' methoden kunnen worden gebruikt voor snelle vervanging van de sgRNA sequentie van 20 basenparen in de vector. We hebben sgRNA sequenties ontworpen voor genen die betrokken zijn bij autolyse in *L. lactis* (*acmA*), celdeling (*ftsZ*) of verlenging van de celwand (*pbp2b*). We observeerden alle bijbehorende fenotypes (lange ketens die ook worden gezien in deletiemutanten van *acmA* / *ftsZ*, en bolvormige vormen voor *pbp2b* mutanten). In Hoofdstuk 5 hebben we het CRISPRi-systeem gebruikt om de functie van Usp45, het belangrijkste uitgescheiden eiwit van *L. lactis*, te bestuderen. Het *usp45* gen kan niet worden verwijderd via dubbele crossover recombinatie, aangezien het gen blijkbaar essentieel is. We gebruikten CRISPRi om de expressie van *usp45* geleidelijk te verlagen. Door het effect van verlaagde of verhoogde expressie van *usp45* op de groei, het fenotype en de celdeling van *L. lactis* te onderzoeken hebben we aangetoond dat Usp45 cruciaal is voor een goede celdeling. Het eiwit bemiddelt in de scheiding van cellen, waarschijnlijk door te werken als een peptidoglycaan hydrolase.

Hoofdstuk 6 vat de belangrijkste bevindingen en toekomstperspectieven van het werk beschreven in dit proefschrift samen en bediscussieert deze.



## ACKNOWLEDGEMENTS

This 5-year journey finally has come to the end, of course there were ups and downs but at this moment, I am appreciating all. I would like to express my thanks for all the people that helped me to accomplish my PhD.

First and foremost, I would like to acknowledge my dear promoter, Jan Kok and my co-promoter Oscar P. Kuipers. **Jan**, I want to thank you for offering me the opportunity to start my PhD in Molgen, it is an honour to work in this historical group. You are a classical scientist who knows how to do and how to teach science. For every scientific question we met, your rigorous logical thinking, in-depth knowledge base, and insistence of knowing not only how but also why, all of these impresses me and definitely will impact me for what scientist I will become in the future. Thank you for your continuous supports with your immense knowledge, for offering me the freedom exploring my research projects and for your patience helping me with writing this thesis. **Oscar**, thank you for your supports through these 5 years and especially my last year. We have such a lively, enjoying, inspiring, fantastic environment to work in Molgen, it provides not only a working place, but also an international community for making friends, and I think these should be attributed to you.

Next, I would like to thank **Jan-Willem** and **Danny**, for expanding my knowledge in *Streptococcus pneumoniae* and RNA structure, respectively. Additionally, **Prof. A.J.M. Driessen**, **Prof. I.J. van der Klei**, and **Prof. E.J. Smid**, thank you for the time spent as members of the assessment committee.

I want to express my gratitude to my office mates, I feel lucky to have you all: Angel, Lieke, Manolo, Harma, Ruben, and Xinghong. **Angel**, I am grateful for your help in every aspect in the beginning of my PhD, and I enjoyed all the time we spent, as officemates and as friends. I still can recall the lab tour you guided me, the tasty coffee you made for us, the lunches and dinners and the fun time we had together with **Patri** and Lianghui, I wish you all the best in your career and your life and hope you would visit me in China someday. **Lieke**, **Manolo**, and **Harma**, we didn't get a long time to be office mates, but you all were very nice to me and easy to get along with, I enjoyed the time we were office mates. **Ruben**, when you first came here, Angel was still here. We had a lot of fun for our "always delicious but taking long time to prepare" office lunch. You are helpful and hospitable person, we had innumerable discussions in my research and you always give me nice suggestions, but what impressed me more, is your cooking and barbeque skills. I want to thank you for your kindness help in my research, for your very delicious paella

and pork ribs, also for being my paranymp. I wish you and **Marta** all the best, come and visit me in China someday! **Xinghong**, you have a clear life plan and are working towards it, I admired that as well as your working attitude and am thankful that I was actually got inspired by you at the late stage of my PhD. You are also very willing to help and gave nice suggestions in my research, I enjoyed our office time and wish you success in your research and future career.

To all Molgen'ers and Molgen'exers, it was a pleasure to work together with you. Mentioned or not mentioned, you all are the reasons why Molgen is such a fantastic place to work.

**Siger**, thank you a lot for keeping the lab and my PC working efficiently. **Anne**, **Auke** and **Tycho**, thank you for your precious help with the bioinformatics problems. **Manon** and **Jannet**, thank you for helping me with all the emails and paperwork. **Peter**, **Anna**, and **Jesse**, thank you for your work in the kitchen that makes our lab work easier. Angel, Harna, **Sjoerd**, **Anne-Marie**, **Eduardo**, and Meishan, thank you for being nice lab mates.

**Zhibo**, you are not only a Molgen'exer but also a Nitrogen-lab'exer, we've been colleagues and friends for more than 7 years. We three applied the DPSD project together, arrived Groningen together. We were supportive to each of others since the very beginning of our PhD. I am happy that I was both of your paranymps and was seeing you two finish this journey. **Xin**, you are the first Molgen-Chinese I knew when I came here, you are such nice person and I really appreciated your kindness help. **Xue**, although our research differs, you helped me a lot for my cloning work and I would say that you almost like my daily supervisor back to that time. You are the kindest, most helpful, and most diligent (yes, more than Xinghong) person I have ever seen, I am honored to be your friend. Thank you for all members of our Euroaisa table tennis club: **Yi**, **Zhibo**, **Robin**, and **Jelle**. We enjoyed those skip-out lunch time playing ping-pong with you guys. **Chunxu**, we had a lot of fun learning ice skating together, and of course swimming. Apart from sports, you are a generous and cheerful person, as a senior researcher, you gave me worthy advices in my scientific research and as friends, we had a lot of fun with you and **Wei**, I wish you two all the best. **Qian**, it is nice to know someone in Molgen who come from the same city as me, it's good to know and be friends with you. **Jingqi**, thank you for the nice discussions of lactococcal, I am appreciated for your help with my cloning work. **Reiza**, thank you and Jelle for the nice discussions and suggestions for my transcriptomic experiment. **Jhonatan**, it was a pleasant collaboration with you, thank you for your help with the Time-lapse and I wish you the best for your life and

career. **Luiza**, thank you for help me with the microscope. **Jakob**, thank you for always willing to answer my questions, you helped my find the rotating machine that helped me a lot! **Jingjing**, you are a living encyclopedia who always know where to buy what in Groningen and a kitchenware-rich person that we had nice numerous hotpots at your place. You are very kind and generous to me, I am really appreciated your guiding me using HPLC and your helping me in the chemical parts of my research. I wish you and **Yuanze** all the best in Guangzhou. You said you will visit us in Wuhan and I am expecting it. **Amanda**, of course firstly I must thank you to be my paranymp, we share quite some similarities thus we knew each other and soon became friends. You are a thoughtful, sympathetic and benevolent person, I've been enjoying talking with you and I liked the girl's nights and the nice trip in Grou you organized, I wish someday you would visit me in China. **Meishan**, I still can recall the day I picked you from the station, and now you are in your 3rd year. You are thoughtful and sweet while at the same time, opinionated. I am grateful for you accompany in my last stage of my PhD.

I also like to thank a lot of friends outside of Molgen: **Wanli**, I will not able to start my PhD without you, since you initiated the DPSD project and offer me this opportunity. You are kind and supportive throughout my PhD time. **Bin**, thank you for your help when we were still heading to the Netherlands, you answered a lot of our questions with great patience and hosted us when we arrived Groningen. **Shuxian** and **Jinrui**, I feel so lucky to be neighbors with you. Thank you for all the happy weekends, the games, the meals, and the Iceland trip, we had a lot of fun with you. **Yu**, thank you for hosting us in Paris. **Lifei**, I am glad that we chose to meet in Barcelona, it was a relishing trip. **Shiqi** and **Beiyi**, thank you for visiting me in Groningen. You three are old friends of mine, we are friends since our middle/high school, I am so grateful that you were, at different time spots, involved in my PhD journey here. **Lianghui**, we were roommates for the last 7 years while our lifelong friendship started together since my master in CAU. We had such fantastic time here in Europe, we went abroad together for the first time, we moved together for the first time, we worried about trivial things and we fixed them together, we travelled to so many countries and see such a colorful world together, we lived a real life together. Finally, we obtained our PhD degrees here. You wrote in your acknowledgement that you don't know whether you will be here without me, I am telling you that I definitely won't be able to finish my PhD this fast without you. I am appreciated for your encouraging and pushing for my thesis writing, and your advising and supporting of me chasing my dream career. Like you said, we have been supported each other in both life and research, and I believe that we will do the same in the future.

