

University of Groningen

Nanopore spectrometry for the detection of proteins and their modifications

Versloot, Roderick

DOI:
[10.33612/diss.568483425](https://doi.org/10.33612/diss.568483425)

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:
2023

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

Citation for published version (APA):

Versloot, R. (2023). *Nanopore spectrometry for the detection of proteins and their modifications*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.568483425>

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.

Chapter 7

Nederlandse samenvatting

Het eerste gedeelte van **hoofdstuk 1** beschrijft een algemene achtergrond van het onderzoeksveld van proteomics, bediscussieerd technieken om eiwitten te detecteren en hun beperkingen en focust op recent ontwikkelde enkel-molecuul technieken. Proteomics is sterk afhankelijk van massa spectrometrie (MS) voor het identificeren van eiwitten, maar een aanzienlijk aantal eiwitten en eiwitvarianten is nog nooit gedetecteerd. Dit 'donkere proteoom' kan worden geanalyseerd met preciezer enkel-molecuul technieken. In het afgelopen decennium zijn enkele van deze technieken ontwikkeld om eiwitten te identificeren, die allemaal gebruik maken van labels om de specifieke positie van aminozuren te bepalen.

In het tweede gedeelte van **hoofdstuk 1** worden nanoporiën gepresenteerd als label-vrije enkel-molecuul techniek om eiwitten te identificeren. Nanoporiën zijn minuscule gaatjes in dunne membranen die enkele moleculen identificeren die aanwezig zijn in de porie. Nanoporiën zijn succesvol ingezet om DNA te sequensen, en kunnen mogelijk breder worden ingezet om eiwitten te sequensen. Echter, het sequensen van eiwitten is aanzienlijk uitdagender dan het sequensen van DNA vanuit biofysisch oogpunt. Het is lastig om het vangen en de translocatie van eiwitten en peptiden te controleren vanwege hun chemische heterogeniteit. Desondanks laten studies zien dat nanoporiën gebruikt kunnen worden om gevouwen eiwitten te vangen, wat ze in staat stelt de grootte van het eiwit en de eiwit dynamiek te bepalen. Verder kunnen nanoporiën gefunctionaliseerd worden met enzymcomplexen die de polypeptiden ontvouwen en transporteren. Als laatste kunnen nanoporiën gebruikt worden als spectrometers om eiwitten te detecteren via peptide profilering.

In **hoofdstuk 2** wordt de detectie van peptiden in β -barrel nanoporiën bestudeerd. We vonden dat wild-type aerolysin en Cytotoxin K (CytK) poriën peptiden van getrypsiniseerd lysozyme slecht vingen. Echter, de introductie van een zuur aminozuur samen met een aromatisch aminozuur verhoogde de verblijfsduur van peptiden in de nanoporie, wat de resolutie van de nanoporie voor peptiden verhoogde. Zulk zuur-aromatische detectiegebied heeft waarschijnlijk interacties met de peptiden via π - π stacking en cation- π interacties. Dit effect was het meest significant als de aromatische aminozuur dichtbij het zure aminozuur werd geplaatst. Met aerolysin en CytK nanoporiën konden peptiden van getrypsiniseerd lysozyme geïdentificeerd worden in het nanoporie spectrum. Metingen van de ion selectiviteit lieten zien dat het vangen van peptiden in aerolysin werd gedomineerd door de elektro-osmotische stroom, terwijl in CytK de elektroforetische kracht dominant was. Ondanks dit verschil in de belangrijkste drijvende kracht achter het vangen van peptiden, zorgden een vergelijkbare set van mutaties ervoor dat de detectie van peptiden verbeterde, wat aanduidt dat de introductie van zuur-aromatische detectie regio's ook in andere β -barrel nanoporiën een verbetering van peptide detectie kan bewerkstelligen.

In **hoofdstuk 3** bestuderen we het gebruik van nanoporiën om eiwit glycosylering te detecteren. Ondanks dat Fragaceatoxin C (FraC) nanoporiën een grootte spectrum van peptiden kunnen vangen, vonden we dat hydrofiele glycopeptiden te snel verplaatsen om accuraat gedetecteerd te worden door de nanoporie. Een combinatie van veel zout, een lage pH en een zuur-aromatische constrictie verhoogde de verblijfsduur van glycopeptiden, wat ons in staat stelde ze te onderscheiden op basis van het nanoporie signaal. Gebruikmakend van deze condities detecteerden we arginine rhamnosylering op cyclische peptiden en we toonden aan dat de mate van rhamnosylering kon worden gekwantificeerd met biologische nanoporiën. Als laatste toonden we aan dat de aanwezigheid van rhamnosylering op elongation factor P (EF-P) kon worden gedetecteerd en gekwantificeerd vanuit het peptide profiel na geknipt te zijn door Lys-C. Met deze studie tonen we aan dat eiwit glycosylering direct gekwantificeerd kan worden met nanoporiën, wat aangeeft dat nanoporie spectrometrie gebruikt kan worden om modificaties na translatie (PTMs) in eiwitten te detecteren en kwantificeren.

Het gebruiken van nanoporie spectrometrie om PTMs te detecteren wordt verder onderzocht in **hoofdstuk 4**, waar we de detectie van isobarische peptide modificaties in biologische nanoporiën bestuderen. Deze modificaties zijn extreem lastig te detecteren met massa spectrometrie. Echter, we vonden dat ze gedetecteerd kunnen worden door middel van het nanoporie signaal. Als eerste laten we zien dat peptiden met dezelfde massa, maar met een andere chiraliteit totaal verschillende event clusters geven in het nanoporie spectrum. Dit resulteerde in de detectie van een enkel *D*-aminozuur in Enkephalin peptiden. Het is interessant dat CytK^{Wt} niet in staat was het verschil tussen *D*- en *L* peptiden te zien, maar verschillende Lys128 mutanten konden dit wel, wat suggereert dat peptide-porie interacties belangrijk zijn voor onderscheiding van de peptiden. Het verschil in nanoporie signaal komt waarschijnlijk van verschillende posities van peptiden in de nanoporie. Als laatste laten we zien dat nanoporiën de formatie van ring structuren in lanthipeptiden direct kunnen aantonen, iets waar anders tijdrovende experimenten voor nodig zouden zijn. Nanoporie experimenten zouden op termijn gebruikt kunnen worden voor de ontwikkeling van therapeutische en antimicrobiële peptiden als een snelle methode om direct isobarische peptide modificaties te kunnen maken.

In **hoofdstuk 5** worden een discussie en enkele toekomstperspectieven over het gebruik van nanoporiën voor de identificatie en het sequensen van eiwitten gepresenteerd. In de werken gepresenteerd in dit proefschrift was de interactie tussen de peptide en de nanoporie belangrijk voor de accurate detectie van peptiden in biologische nanoporiën. Het aanpassen van nanoporiën kan deze interacties verder vergroten of aanpassen, opdat betere scheiding tussen de peptiden in de porie behaald kan worden. Verder kan significant meer informatie uit de nanoporie events gehaald worden door te kijken naar multi-dimensionele nanoporie spectra,

in plaats van de relatieve blokkade en de verblijfsduur, welke vaak in de literatuur worden gepresenteerd. De integratie van nanoporiën in microfluidische apparaatjes kan de doorvoersnelheid verhogen en maakt het wellicht mogelijk om substraten door verschillende poriën te laten meten op hetzelfde moment. Zo'n geïntegreerde nanoporie spectrometer kan uiteindelijk gebruikt worden in de zorg voor de snelle detectie van eiwitten, peptiden en andere biomarkers.