

Nanopore Engineering

Das FuN Screen-Prinzip zur experimentellen Analyse von Nanoporen in *E. coli*

WADIM WEBER^{1,2}, TOBIAS PROBANOWSKI^{1,2}, KLARA EISENHAEUER^{1,2},
PHILIPP KEMP^{1,2}, VIKTOR STEIN^{1,2,*}

¹ FACHBEREICH BIOLOGIE, TU DARMSTADT

² CENTRE FOR SYNTHETIC BIOLOGY, TU DARMSTADT

Nanopores constitute an important class of biotechnologically relevant proteins. Unlike binders and enzymes, their experimental characterization is limited to high-resolution, yet low throughput biophysical methods. Addressing this technological gap, the functional nanopore (FuN) screen now provides a versatile assay to study and engineer nanopores in *Escherichia coli* combining quantitative resolution with the ease, scalability, and throughput of cellular assays.

DOI: 10.1007/s12268-023-1933-8

© Die Autorinnen und Autoren 2023

■ Nanoporen beziehen sich auf eine weitläufige Klasse von Membranproteinen, die wässrige Kanäle in zellulären Membranen ausbilden und folglich einen Austausch großer bzw. geladener Stoffe ermöglichen. Neben einer Reihe wichtiger physiologischer Funktionen bergen Nanoporen auch großes biotechnologisches Potenzial, z. B. in der Biosensorik, indem mithilfe chemischer und biomolekularer Rezeptoren Analyten mit hoher Sensitivität und Spezifität detektiert werden [1]. Paradebeispiel ist die Sequenzierung von DNA [2] und kürzlich auch von Proteinen [3]. Darüber hinaus werden Nanoporen zunehmend im Kontext künstlicher Zellen eingesetzt – mit dem Ziel, die zugrunde liegende Membran selektiv zu permeabilisieren und den Austausch spezifischer Stoffe zu ermöglichen [4]. Anwendungen sind äußerst vielfältig und reichen von künstlichen Kommunikationssystemen bis zu biochemischen Reaktionskompartimenten.

Im Gegensatz zu anderen biotechnologisch relevanten Proteinen, insbesondere Bindern aber auch Enzymen, gestaltet sich die experimentelle Charakterisierung von Nanoporen als technisch anspruchsvoll. Primär ist dies bedingt durch die Notwendigkeit einer Membran, um Nanoporen funktional zu rekonstituieren. Folglich sind experimentelle Studien von Nanoporen häufig auf künstliche Mem-

bransysteme und hochauflösende optische bzw. elektroanalytische Messverfahren eingeschränkt – d. h. aufgrund ihrer porenbildenden Eigenschaften gestaltet sich die rekombinante Expression von Nanoporen in lebenden Zellen grundsätzlich als toxisch. Des Weiteren kann der Einbau von Nanoporen sowohl in Zellen als auch *in vitro* auf zusätzliche molekulare Faktoren angewiesen sein, die die Komplexität der zugrunde liegenden experimentellen Protokolle erhöht. Folglich bleiben kombinatorischer Ansätze auf Basis von Hochdurchsatzassays im Nanopore Engineering weitestgehend unerschlossen.

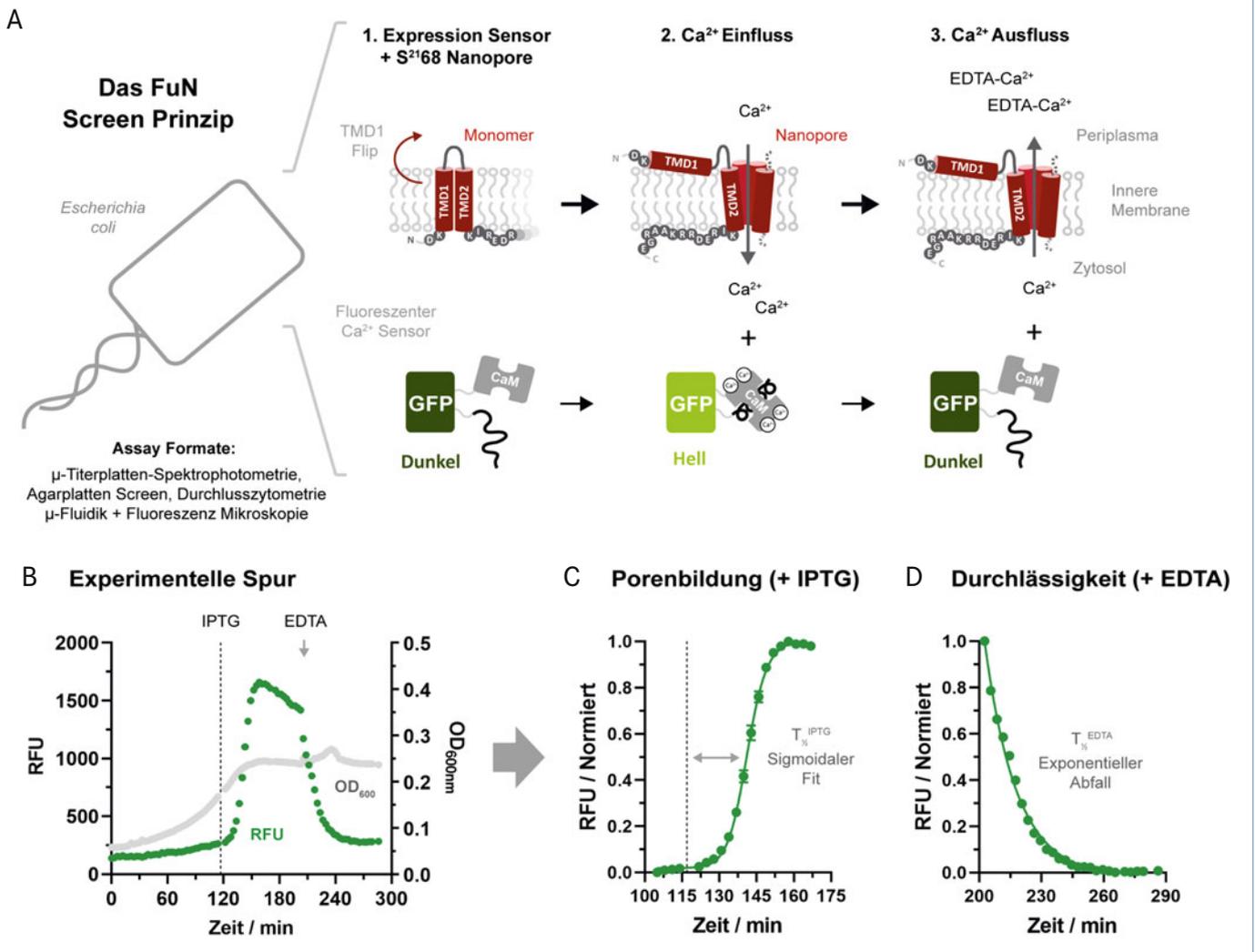
Das FuN Screen-Prinzip

Nanoporen können nun mithilfe eines neuentwickelten zellulären Assays – dem funktionalen Nanoporen (FuN) Screen – direkt in *Escherichia coli* vermessen werden [5]. Der FuN Screen nutzt dabei genetisch codierte fluoreszente Proteinsensoren, die abhängig von den funktionalen Eigenschaften einer Nanopore spezifische Ca^{2+} -Ströme über die innere Membran von *E. coli* experimentell auflösen (Abb. 1A, B). Die porenbildenden Eigenschaften können dabei mittels eines sigmoidalen Fits quantitativ ausgewertet und miteinander verglichen werden. Von besonderem Interesse ist die Zeit, in der das halbmaximale Signal nach Induktion einer Nano-

pore erreicht wird (Abb. 1C). Die $T_{1/2}^{\text{IPTG}}$ hängt dabei maßgeblich von der Fähigkeit einer Nanopore ab, sich in Folge einer Expression einen Ca^{2+} -durchlässigen Kanal in der inneren Membran zu bilden. Des Weiteren können die funktionalen Eigenschaften einer Nanopore durch die extrazelluläre Hinzugabe von EDTA erschlossen werden (Abb. 1D). In diesem Fall chelatiert EDTA die Ca^{2+} -Ionen und quencht folglich das fluoreszente Signal. Die Halbwertszeit des abfallenden fluoreszenten Signals, die $T_{1/2}^{\text{EDTA}}$, spiegelt dabei die Ca^{2+} -Durchlässigkeit einer Nanopore unabhängig von der langsameren Expressions- und z. T. auch Insertions- und Assemblierungskinetik wider. Darüber hinaus ist der FuN Screen grundsätzlich in der Lage, die Ionenspezifizität unterschiedlicher Nanoporen und Ionenkanäle zu rekapitulieren. Beispielfhaft erweisen sich große Nanoporen durchlässig für Ca^{2+} , während die aus Viren abgeleiteten K^{+} - und H^{+} -spezifischen Ionenkanäle $\text{K}_{\text{CV}}\text{NTS}$ und BM2 kein fluoreszentes Signal bewirken.

Funktionale Charakterisierung porenbildender Membranpeptide

In einer ersten Machbarkeitsstudie wurde der FuN Screen angewendet, um die porenbildenden Eigenschaften des S^{2168} -Pinholins molekulargenetisch zu sezieren. Das S^{2168} -Pinholin bezieht sich dabei auf ein prototypisches Membranpeptid, das sich aus dem Bakteriophagen P21 ableitet [6]. Dort initiiert es durch die Bildung von Nanoporen in der inneren Membran die Lyse infizierter Zellen. Die Bildung von Nanoporen unterliegt dabei einem präzisen Timing. Konkret akkumuliert S^{2168} in der inneren Membran, bis es eine kritische Konzentration erreicht und der N-Terminus der ersten Transmembrandomäne (TMD1) über die Membran flippt und sich einzelne Monomere zu einer heptameren Nanopore zusammenfügen (Abb. 1A). Die zweite Transmembrandomäne (TMD2) bildet dabei den Stamm der Nanopore. Um den Beitrag der TMD1 zur Bildung und Stabilität von S^{2168} -Nanoporen weiter zu sezieren, konnten mithilfe des FuN Screens umfangreiche



▲ Abb. 1: Das FuN Screen-Prinzip. **A,** Nach Expression und Bildung einer Nanopore in der inneren Membran wird der damit verbundene Ein- bzw. Ausfluss von Ca^{2+} in das Cytosol mithilfe fluoreszenter Proteinsensoren experimentell aufgelöst. Die entsprechenden fluoreszenten Signale geben folglich Auskunft über die funktionalen Eigenschaften einer Nanopore. **B,** beispielhafte experimentelle Spur einer FuN Screen-Messung. **C,** Der Einbau einer funktionalen Nanopore in die innere Membran von *E. coli* bewirkt einen Einstrom von Ca^{2+} und folglich einen Anstieg des fluoreszenten Signals. **D,** Nach Hinzugabe von EDTA wird das Signal gequencht. Der Signalabfall spiegelt folglich die funktionalen Eigenschaften einer Nanopore unabhängig von der langsameren Expressions- und z. T. Insertions- und Assemblierungskinetik wider. Übernommen (angepasst) mit Genehmigung aus [5]. © 2022 American Chemical Society.

Mutagenesestudien durchgeführt und quantitative Struktur-Funktions-Eigenschaften bestimmt werden. Im Gegensatz zur vorherrschenden Meinung regelt TMD1 dabei nicht nur das Timing, sondern trägt zusätzlich zur Stabilität der S^{2168} -Nanopore bei – d. h. TMD2 ist nur in der Lage, transiente bzw. un stabile Nanoporen auszubilden. Bestätigt wurden die Ergebnisse durch Leitfähigkeitsmessungen mit chemisch synthetisierten Peptiden in denen gezeigt wurde, dass nur Wildtyp S^{2168} homogene Nanoporen bildet und TMD2 primär Membrandefekte hervorruft.

Konstruktion rekombinanter Nanoporen mit neuen Eigenschaften

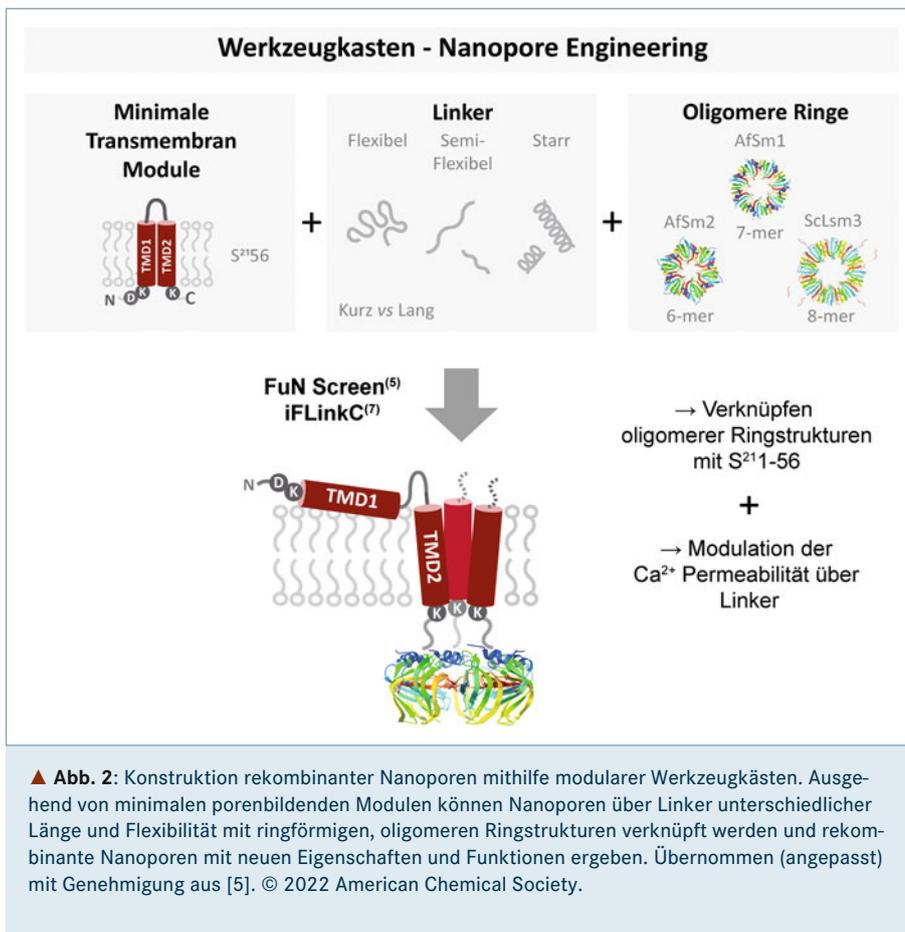
Über grundlegende Studien hinaus kann der FuN Screen angewendet werden, um rekombinante Nanoporen zu konstruieren

(**Abb. 2**). Ausgehend von einer destabilisierten Variante, S^{2156} , wurde ein minimales porenbildendes Modul über Linker unterschiedlicher Länge und Flexibilität mit ringförmigen oligomeren Proteinstrukturen mithilfe des iFLinkC-Verfahrens [7] verknüpft. Eine experimentelle Charakterisierung mithilfe des FuN Screens ergab dabei rekombinante Nanoporen mit sehr unterschiedlichen strukturellen und funktionalen Eigenschaften. Zunächst beschleunigt die Oligomerisierung die Bildung von Nanoporen gemäß einer erheblich verkürzten $T_{1/2}^{\text{IPTG}}$. Dabei verfügt der Nanoporenstamm von S^{2168} über eine beträchtliche Plastizität auch nicht native hexa- und oktamere Geometrien auszubilden. Darüber hinaus konnte die Durchlässigkeit rekombinanter Nanoporen maßgeblich über die Komposition der verbindenden Linker moduliert werden. So wiesen halbflexible

Linker mittlerer Länge ähnlich schnelle $T_{1/2}^{\text{EDTA}}$ -Werte auf wie Wildtyp S^{2168} . Im Gegensatz dazu engten lange, starre Poly-Pro-Linker-Nanoporen sterisch ein und bewirkten folglich erheblich verlangsamte $T_{1/2}^{\text{EDTA}}$ -Werte.

Experimentelle Vermessung weiterer Nanoporen

Über das S^{2168} -Pinholin hinaus konnten nachfolgend weitere porenbildende Membranpeptide mithilfe des FuN Screens in *E. coli* vermessen werden [8]. Dies umfasste Varianten des natürlich vorkommenden D29-Holins [9] und mit computergestützten Methoden entworfene Nanoporen [10, 11]. Insgesamt ergaben 11 von insgesamt 13 porenbildenden Varianten ein fluoreszentes Signal im FuN Screen. Dabei konnte eine vergleichsweise hohe Kongruenz mit vorigen



biophysikalischen Studien, insbesondere elektrochemischen Messungen, etabliert werden und kann nun in zukünftigen Funktionsstudien als Referenz dienen.

Ausblick

Der FuN Screen ermöglicht erstmalig Nanoporen in *E. coli* funktional zu vermessen. Der FuN Screen ergänzt dabei biophysikalische Ansätze auf Basis elektroanalytischer und optischer Messverfahren, bietet dabei eine Reihe von Vorteilen. Zunächst ist der FuN Screen mit einer Vielzahl unterschiedlicher optischer Assays kompatibel. Diese reichen von konventionellen Messungen in Mikrotiterplatten bis zur durchflusszytometrischen Analyse einzelner Zellen für extrem hohen Durchsatz. Darüber hinaus sind alle Komponenten genetisch codiert und ein Read-out folglich nicht auf die Hinzugabe externer Reagenzien angewiesen. Außerdem ist der FuN Screen angesichts eines ständig wachsenden Repertoires an fluoreszenten Pro-

teinsensoren leicht skalierbar, um die Durchlässigkeit verschiedener Analyten durch die innere Membran experimentell zu untersuchen. Mögliche Anwendungsgebiete des FuN Screens sind ebenfalls vielfältig und reichen von grundlegenden auf Erkenntnisgewinn orientierten Studien zu komplexen Konstruktionsvorhaben. Beispielhaft können Nanoporen nun vergleichsweise einfach durch Rekombination mit löslichen Domänen mit neuen Eigenschaften und Funktionen versehen werden. Potenziell umfasst dies die Entwicklung therapeutischer Wirkstoffe auf Basis porenbildender Membranpeptide oder auch Nanoporen mit neuen regulatorischen oder auch sensorischen Funktionen. ■

Literatur

- [1] Wang S, Zhao Z, Farzin, F et al. (2018) Engineering of protein nanopores for sequencing, chemical or protein sensing and disease diagnosis. *Curr Opin Biotechnol* 51: 80–89
 [2] Deamer D, Akeson M, Branton D (2016) Three decades of nanopore sequencing. *Nature Biotechnol* 34: 518–524

- [3] Brinkerhoff H, Kang ASW, Liu J et al. (2021) Multiple rereads of single proteins at single-amino acid resolution using nanopores. *Science* 374: 1509–1513
 [4] Boyd MA, Kamat NP (2021) Designing Artificial Cells towards a New Generation of Biosensors. *Trends Biotechnol* 39: 927–939
 [5] Weber W, Roeder M, Probanowski T et al. (2022) Functional Nanopore Screen: A Versatile High-Throughput Assay to Study and Engineer Protein Nanopores in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol* 11: 2070–2079
 [6] Park T, Struck DK, Deaton JF et al. (2006) Topological dynamics of holins in programmed bacterial lysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 19713–19718
 [7] Gräwe A, Ranglack J, Weyrich A et al. (2020) iFLinkC: an iterative functional linker cloning strategy for the combinatorial assembly and recombination of linker peptides with functional domains. *Nucleic Acids Res* 48: e24
 [8] Eisenhauer K, Weber W, Kemp P et al. (2022) Systematic Evaluation of Self-Assembling Membrane Peptides to Form Nanopores in the context of the Functional Nanopore Screen. *bioRxiv*, DOI: 10.1101/2022.12.16.520551
 [9] Lella M, Mahalakshmi R (2016) Engineering a Transmembrane Nanopore Ion Channel from a Membrane Breaker Peptide. *J Phys Chem Lett* 7: 2298–2303
 [10] Mahendran KR, Niitsu A, Kong L et al. (2017) A monodisperse transmembrane α -helical peptide barrel. *Nat Chem* 9: 411–419
 [11] Scott AJ, Niitsu A, Kratochvil HT et al. (2021) Constructing ion channels from water-soluble α -helical barrels. *Nat Chem* 13: 643–650

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Wadim Weder, Tobias Probanowski, Klara Eisenhauer, Philipp Kemp und Viktor Stein (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Viktor Stein
 Juniorprofessur „Protein Engineering von Ionenleitenden Nanoporen“
 TU Darmstadt
 Fachbereich Biologie
 Schnittpahnstraße 3
 D-64287 Darmstadt
 stein@bio.tu-darmstadt.de