Proteomanalyse

Zelltypspezifische Proteommarkierung *in vivo*

BEATRIZ ALVAREZ-CASTELAO, CHRISTOPH SCHANZENBÄCHER,
SUSANNE TOM DIECK, JULIAN LANGER, ERIN SCHUMAN
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR HIRNFORSCHUNG, FRANKFURT A. M.

Cells carry out their functions using proteins. In response to stimuli they change the complement and number of proteins – the proteome. Although the proteome of mixed cell populations is accessible, it has not been possible to isolate the proteomes of individual cell types from living animals. We made transgenic mice with cell type specific expression of a modified enzyme incorporating an artificial amino acid. Proteins with this tag can be either visualized or identified by mass spectrometry.

DOI: 10.1007/s12268-018-0897-6
© Die Autoren

■ Da alle Zellen eines Organismus die gleiche DNA teilen, unterscheiden sich verschiedene Typen von Zellen erst durch die Expression spezifischer Proteine. Selbst wenn ein

Protein von mehr als einem Zelltyp exprimiert wird, ist seine Expression – wann, wo und wieviel hergestellt wird – oft sehr unterschiedlich. Zelltypidentität entsteht daher

sowohl durch zelltypspezifische Proteine als auch durch spezifische Expressionslevel weit verbreiteter Proteine.

Im Gehirn unterscheidet man zwei generelle Zellkategorien, Neuronen und Glia, innerhalb derer sich eine Vielfalt an weitgehend wenig charakterisierten Zelltypen findet. Durch Methoden wie RNA-Sequenzierung, die den zellulären mRNA-Bestand (das Transkriptom) entschlüsseln, werden momentan ständig neue Zelltypen in vielen Geweben entdeckt. Trotz der Rolle von mRNA als Bauvorlage für Proteine, ist das Transkriptom nur eine ungenaue Vorhersage für diejenigen Proteine, die tatsächlich von einer Zelle gemacht werden (das Proteom). Diese Diskrepanz beruht auf unterschiedlichen Translationsraten verschiedener mRNAs bzw. der gleichen mRNA unter bestimmten zellulären Bedingungen, wie Stress oder neuronaler Aktivität. Auch Proteinabbau und damit wiederum die Proteinlevel werden durch die Umwelt beeinflusst [1]. Eine Methode zur direkten Identifikation des tatsächlichen Proteoms eines Zelltyps ist daher für das Forschungsfeld erforderlich.

Bioorthogonale Strategien

Bioorthogonale Strategien verwenden künstliche, chemische Prozesse in Zellen, ohne mit nativen biochemischen Prozessen zu interferieren. Wir nutzen eine solche Strategie, um Zellen mit nicht-kanonischen, also künstlichen Aminosäuren zu markieren (Abb. 1). Diese tragen eine Azidgruppe und können daran, nach Einbau der Aminosäure in ein Protein, kovalent über eine Klick-Reaktion mit einem Alkin modifiziert werden. Die konjugierbaren Alkine wiederum können viele verschiedene Tags tragen, die hinterher zur Aufreinigung oder Visualisierung der markierten Proteine verwendet werden können. Die Markierungsstrategien werden als BONCAT (*bio-orthogonal non-canonical amino acid tagging*) [2] zur Proteinaufreinigung und FUNCAT (*fluorescent non-canonical amino acid tagging*) [3] für die mikroskopische Analyse bezeichnet (Abb. 1). Da der Einbau der künstlichen Ami-

▲ **Abb. 1:** Prinzip von allgemeinem und Zell-selektivem NCAT (*non-canonical amino acid tagging*). **A,** Die künstliche Aminosäure Azidohomoalanin (AHA) wird als Methionin-Analog von endogener Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS) auf Methionin-tRNA geladen und in Proteine aller Zellen inkorporiert (allgemeines NCAT). **B,** Das größere Azidonorleucin (ANL) wird von MetRS nicht als Substrat akzeptiert. Die MetRS*-Mutante (MetRS-L274G) dagegen kann ANL auf Methionin-tRNA laden. Die selektive Expression von MetRS* führt zu selektiver Markierung von Proteinen (Zell-selektives NCAT). Klick-Chemie mit einem Alkin-Tag ermöglicht in beiden Varianten BONCAT (Aufreinigung) oder FUNCAT (Visualisierung) (modifiziert nach [10]).

Tab. 1: Vergleich der Einsatzspektren metabolischer Proteommarkierungsmethoden.

Methode	Mikroskopie	Mikroskopie spezifischer Proteine	Proteinaufreinigung	Zelltypspezifische Markierung	Markierung <i>in vivo</i>	Markierung <i>in vitro</i>
Radioaktivität	ja	nein	ja ¹	nein	ja ²	ja
SILAC	nein	nein	nein	nein	ja	ja
Puromycin	ja	ja ³	ja	nein	ja ⁴	ja
MetRS*	ja	ja	ja	ja	ja	ja ⁵

¹ nur kandidatenbasiert² möglicherweise gesundheitsschädlich, problematisch durch kontaminierten Abfall³ generierte Proteine sind oft trunkiert: verkomplizierte Proteintransport-/Halbwertszeitmessungen⁴ nur kurze Markierungszeiten aufgrund von Toxizität⁵ MetRS* (MetRS-L274G) kann exogen in jedem Zelltyp exprimiert werden

nosäure Azidohomoalanin (AHA) die zell-eigene Proteinsynthesemaschinerie nutzt (**Abb. 1A**, [4, 5]), ist diese bioorthogonale Strategie genetisch manipulierbar. Das Enzym Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS), das die Aminosäure Methionin (oder auch AHA) auf ihre Transfer-RNA lädt, kann beispielsweise durch Austausch einer einzigen Aminosäure so mutiert werden (MetRS-L274G, hier: MetRS*), dass die Methionin-tRNA anschließend mit der künstlichen Aminosäure Azidonorleucin (ANL) beladen werden kann [6]. Endogene MetRS kann ANL dagegen nicht in Proteine einbauen. Die Expression des Gens für MetRS* unter der Kontrolle von zelltypspezifischen Promotoren ermöglicht daher einen zelltypspezifischen Einbau von ANL in neu synthetisierte Proteine, die hinterher über Klick-Chemie modifiziert werden können (**Abb. 1B**, [7]).

Vorteile bioorthogonaler Strategien

Von den existierenden Methoden zur Markierung und Identifizierung neu synthetisierter Proteine hat der hier beschriebene Ansatz das größte Anwendungsspektrum (**Tab. 1**). Neben dem zelltypspezifischen Markieren ermöglicht die MetRS*-Methode sowohl eine *in vivo*- als auch eine *in vitro*-Identifizierung. Die Analyse von Proteomdynamik kann damit sowohl über Massenspektrometrie als auch über Mikroskopie erfolgen.

Zelltypspezifische Proteommarkierung *in vivo*

Zur Expression von MetRS* im Modellorganismus Maus haben wir eine Mauslinie etabliert, in der die konditionale Expression von MetRS* unter der Kontrolle von Cre-Rekombinase (Cre) steht. In diesem System ist die MetRS*-Expression zunächst unterdrückt. Wird die Mauslinie mit Tieren gekreuzt, die Cre unter einem zelltypspezifischen Promotor exprimieren, wird auch die MetRS*-

Expression im Cre-exprimierenden Zelltyp angeschaltet.

Die Verfügbarkeit unzähliger Cre-Mauslinien ermöglicht die metabolische Markierung von Proteinen in allen Zelltypen, für die eine solche Cre-Treiberlinie existiert. Mit dieser Methode haben wir die Proteome exzitatorischer Prinzipalneuronen im Hippocampus und inhibitorischer Purkinje-Zellen des Cerebellums markiert, visualisiert und identifiziert. Dazu erzeugten wir zwei Mauslinien, die MetRS* in diesen spezifischen neuronalen Populationen exprimieren. Um die Proteine zelltypspezifisch *in vivo* zu markieren, bekamen Wildtyp-Mäuse und Mäuse, die MetRS* in den entsprechenden Neuronen exprimieren, mit ANL versetztes Trinkwasser. Nach 21 Tagen mit ANL im Trinkwasser erfolgten die Gewebeentnahme und eine entsprechende Klick-Chemie zur Visualisierung bzw. Proteinaufreinigung (**Abb. 2A**). Die aufgereinigten Proteine und damit die Proteome dieser beiden Zelltypen wurden über Flüssigkeitschromatographie-gekoppelte Tandem-Massenspektrometrie identifiziert und hinterher verglichen (**Abb. 2B**). Eine Funktionsanalyse zeigte eine signifikante Anreicherung von Proteinen mit Bezug zum Metabolismus in den inhibitorischen Neuronen. Dieses Resultat steht in Übereinstimmung zu den bekannten hohen metabolischen Anforderungen an Purkinje-Zellen.

Zelltypspezifische Proteomdynamik

Externe Stimuli führen zu Veränderungen im zellulären Proteom, die eine Antwort oder eine Anpassung an den Stimulus repräsentieren. Um die Sensitivität unserer Methode für eine solche Proteomdynamik zu untersuchen, setzten wir MetRS*-Mäuse einer sensorisch angereicherten Umwelt mit Labyrinth, Laufrad und Spielzeug mit verschiedenen Texturen aus. Für diese Umweltbedingungen ist bekannt, dass sie Neuronennetzwerke modi-

fizieren, Synapsendichten ändern und das Volumen des cerebralen Cortex erhöhen. Beim Vergleich exzitatorischer Proteome aus dem Hippocampus von Mäusen, die 21 Tage in dieser sensorisch angereicherten Umwelt aufwuchsen, mit denen von Mäusen aus Standardkäfigen, fanden wir 225 signifikant regulierte Proteine. Die Umweltbedingungen führten also zu Veränderungen im Proteom des Hippocampus, vor allem bei Proteinen mit einer Funktion an neuronalen Synapsen (**Abb. 2C**). Darunter befanden sich Proteine des synaptischen Vesikelzyklus, Synapsenorganisierende Zelladhäsionsmoleküle und *scaffold*-Proteine sowie Untereinheiten inhibitorischer Neurotransmitterrezeptoren. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die genetisch vermittelte Proteinmarkierung in MetRS*-Mäusen hinreichend sensitiv ist, um adaptive Veränderungen in zelltypspezifischen Proteomen *in vivo* zu verfolgen.

Visualisierung zelltypspezifisch markierter Proteine

In Kombination mit FUNCAT kann unsere Methode auch zur Visualisierung neu synthetisierter Proteine aus definierten Zelltypen eingesetzt werden. Gewebeschnitte aus transgenen, MetRS*-exprimierenden Mäusen lassen sich *in vitro* markieren. Über eine Transfektion primärer Neuronen mit einem DNA-Konstrukt für die MetRS* kann man neu synthetisierte Proteine einer bestimmten Zelle natürlich auch gänzlich *in vitro* anfärben. Eine äußerst interessante Modifikation der FUNCAT-Methode bietet die Möglichkeit, definierte neu synthetisierte Proteine räumlich und zeitlich zu verfolgen. Dafür kombinierten wir FUNCAT mit einem *proximity ligation assay* (PLA) [8]. PLA ermöglicht die Koinzidenzdetektion von zwei Epitopen in enger räumlicher Nähe – also z. B. im gleichen Protein – über zwei Antikörper. Wir nutzten PLA, um neu synthetisierte Proteine einer

Abb. 2: Zelltypspezifische Proteome *in vivo*. **A**, Schema zum experimentellen Ablauf der zelltypspezifischen Markierung mit Azidonorleucin (ANL) und der nachfolgenden Analyse: Über Cre-Expression in spezifischen Neuronenpopulationen wird MetRS* (MetRS-L274G) in diesem Zelltyp in einer Mauslinie exprimiert. ANL wird über das Trinkwasser zugeführt. Das Gewebe von Interesse wird danach entweder für Immunhistochemie/FUNCAT oder für Lyse/BONCAT mit nachfolgender Massenspektrometrie (MS) präpariert. **B**, Vergleich isolierter Proteome von exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen. **C**, regulierte Synapsenproteine aus exzitatorischen Neuronen von Mäusen, die in sensorisch angereicherter Umgebung gehalten wurden (modifiziert nach [9]).

bestimmten Zelle sichtbar zu machen, und zwar über die räumliche Nähe eines protein-spezifischen Epitops und des Alkin-Tags – als Markierung für (Neu-)Synthese in dieser Zelle. Durch die Kombination von Antikörpern gegen Proteine aus unterschiedlichen neuronalen Kompartimenten mit Antikörpern gegen den Alkin-Tag konnten wir so bestätigen, dass die ANL-markierten Proteine auch tatsächlich korrekt lokalisiert werden.

Ausblick

Die Anwendung unserer konditionalen MetRS*-Mauslinie erlaubte uns, zwei verschiedene Neuronenproteome aufzureinigen und zu identifizieren: zum einen das von exzitatorischen Neuronen im Hippocampus, einer Gehirnstruktur, die für die Navigation bei Tieren und für Lernen und Gedächtnis wichtig ist, und zum anderen das Proteom inhibitorischer Neuronen im Cerebellum, einer Struktur, die mit motorischem Verhalten in Verbindung steht. Wir zeigten weiterhin, dass das experimentelle System geeignet ist, Veränderungen in Gehirnproteomen als Antwort auf Veränderungen in der Umwelt zu detektieren [9].

Von Kreuzungen dieser Mäuse mit Mausmodellen für Krankheiten versprechen wir uns die Entwicklung einer Plattform für die molekulare Medizin sowie die zelltypspezifische Untersuchung des Einflusses von Proteinen auf Entwicklung, Lernen und Gedächtnis. Ähnliche Anwendungen sind selbstverständlich auch in Gebieten außerhalb der

Neurobiologie unter Einsatz der Mauslinie und bioorthogonaler Markierungsstrategien denkbar und eröffnen der biologischen Forschung einen neuartigen Zugang zur Proteomanalyse.

Danksagung

Wir danken den restlichen Autoren der Originalpublikation [9], insbesondere Prof. Dr. Daniela Dieterich und Dr. Anke Müller für die Gestaltung der Abbildung 2.

Literatur

- [1] Alvarez-Castelao B, Schuman EM (2015) The Regulation of Synaptic Protein Turnover. *J Biol Chem* 290:28623–28630
- [2] Dieterich DC, Link AJ, Graumann J et al. (2006) Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proc Natl Acad Sci USA* 103:9482–9487
- [3] Dieterich DC, Hodas JJ, Gouzer G et al. (2010) *In situ* visualization and dynamics of newly synthesized proteins in rat hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 7:897–905
- [4] Hinz FI, Dieterich DC, Tirrell DA et al. (2012) Noncanonical amino acid labeling *in vivo* to visualize and affinity purify newly synthesized proteins in larval zebrafish. *ACS Chem Neurosci* 3:40–49
- [5] Schanzbächer CT, Sambandan S, Langer JD et al. (2016) Nascent Proteome Remodeling following Homeostatic Scaling at Hippocampal Synapses. *Neuron* 92:358–371
- [6] Mahdavi A, Hamblin GD, Jindal GA et al. (2016) Engineered aminoacyl-tRNA synthetase for cell-selective analysis of mammalian protein synthesis. *J Am Chem Soc* 138:4278–4281
- [7] Erdmann I, Marter K, Kobler O et al. (2015) Cell-selective labelling of proteomes in *Drosophila melanogaster*. *Nat Commun* 6:7521
- [8] tom Dieck S, Kochen L, Hanus C et al. (2015) Direct visualization of newly synthesized target proteins *in situ*. *Nat Methods* 12:411–414
- [9] Alvarez-Castelao B, Schanzbächer CT, Hanus C et al. (2017) Cell-type-specific metabolic labeling of nascent proteomes *in vivo*. *Nat Biotechnol* 35:1196–1201
- [10] Müller A, Stellmacher A, Freitag CE et al. (2015) Monitoring astrocytic proteome dynamics by cell type-specific protein labeling. *PLoS One* 10:e0145451

Open Access:

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits use, duplication, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

Open access funding provided by Max Planck Society.

Korrespondenzadresse:

Dr. Beatriz Alvarez-Castelao
Prof. Dr. Erin Schuman
Abteilung Synaptische Plastizität
Max-Planck-Institut für Hirnforschung
Max-von-Laue-Straße 4
D-60438 Frankfurt a. M.
Tel.: 069-850033-1000
Fax: 069-850033-1099
beatriz.alvarez-castelao@brain.mpg.de
erin.schuman@brain.mpg.de

AUTOREN

Die Gruppe um Erin Schuman am Max-Planck-Institut für Hirnforschung (v. l. n. r.: Julian Langer, Erin Schuman, Beatriz Alvarez-Castelao, Susanne tom Dieck, Christoph Schanzbächer) beschäftigt sich mit der Analyse von neuronalen Proteomen bei synaptischer Plastizität. Ein Fokus liegt auf der Entwicklung neuer Methoden zur Proteinmarkierung und -analyse.