

Methoden der Proteinforschung

ProFiT: eine MS-basierte Methode zur Skelettmuskelfasertypisierung

SEBASTIAN KALLABIS¹, MARCUS KRÜGER^{1,2}

¹CECAD RESEARCH CENTER, UNIVERSITÄT ZU KÖLN

²ZENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN KÖLN (ZMMK), UNIVERSITÄT ZU KÖLN

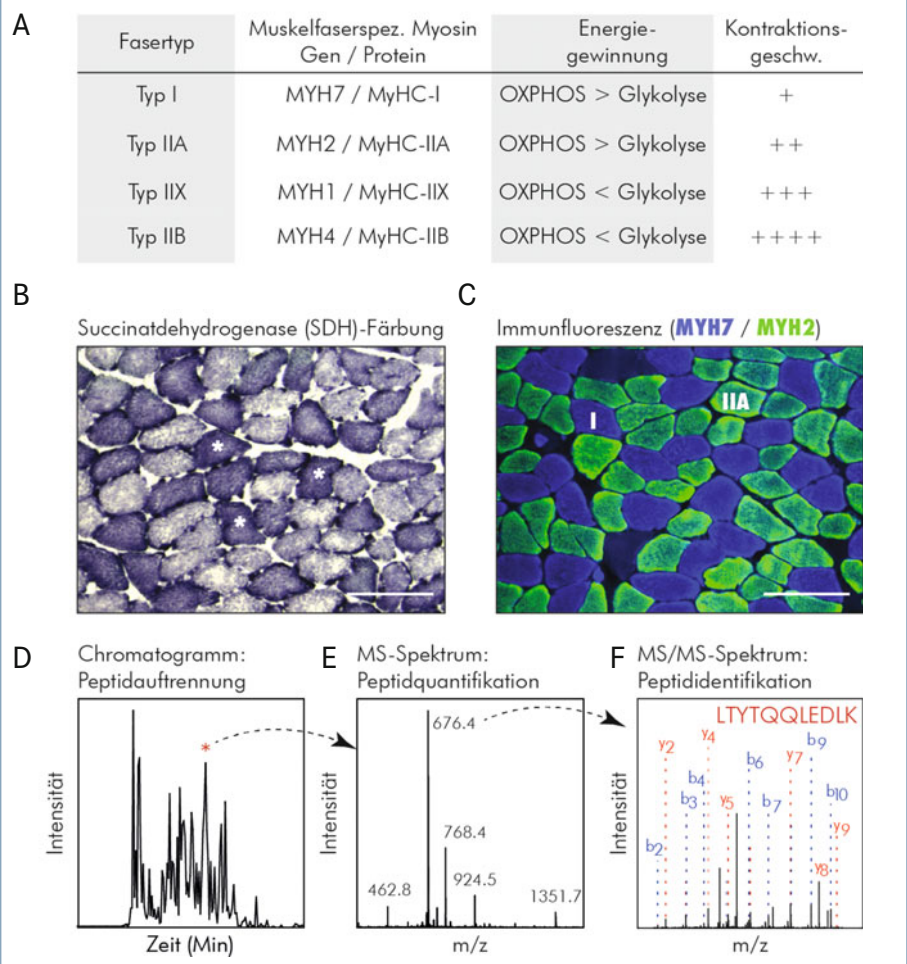
Skeletal muscle tissue is composed of different fiber types which differ in their metabolic activity and molecular expression patterns. Mass spectrometric analyses revealed muscle fiber-specific traits but the number of detected proteins is limited due to low protein abundance and high dynamic range. We have developed a new LC-MS/MS method to circumvent the bottleneck of low protein abundance and we have applied this method to measure fiber type-specific phosphoproteomes for the first time.

DOI: 10.1007/s12268-021-1671-8

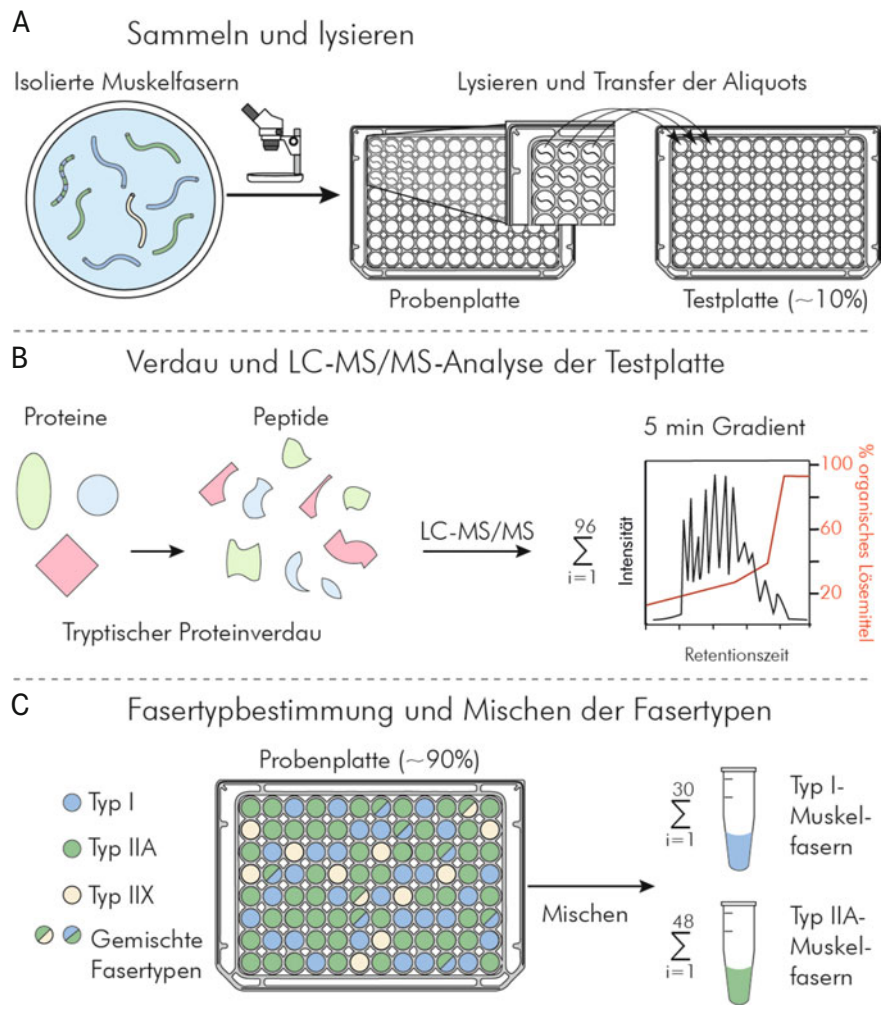
© Die Autoren 2021

■ Der menschliche Körper besteht zu 30–40 Prozent aus Skelettmuskeln, die in mehr als 650 verschiedene Muskeln einteilbar sind. Jeder Muskel besteht aus einer großen Anzahl an Muskelfasern, jede Faser wiederum enthält viele parallel angeordnete Myofibrillen. Diese setzen sich aus aneinander gereihten Sarkomeren zusammen und sind die kleinste funktionelle Einheit eines Muskels. Im Sarkomer erzeugt eine Adenosintriphosphat(ATP)-abhängige Interaktion zwischen Myosin- und Aktinfilamenten schließlich die eigentliche Muskelkontraktion, die auch als *cross bridge cycle* beschrieben wird [1]. Auf molekularer Ebene wird die Einteilung der Skelettmuskelfasern bezüglich ihrer Ausdauer und Kontraktionsgeschwindigkeit u. a. durch die Expression unterschiedlicher Myosine (MYH) reguliert (Abb. 1A). Bei Säugetieren gibt es vier verschiedene Muskelfasertypen. Langsame Typ-

I-Fasern exprimieren MYH7, weisen die geringste Kontraktionsgeschwindigkeit auf und produzieren ATP größtenteils durch oxidative Phosphorylierung innerhalb der Mitochondrien (Abb. 1B, C). Schnelle Typ-IIA-Fasern exprimieren MYH2, Typ-IIX-Fasern MYH1 und Typ-IIB-Fasern MYH4. Die Kontraktionsgeschwindigkeit der IIX-Fasern liegt dabei zwischen den langsameren IIA- und den schnelleren IIB-Fasern [2]. Typ-IIB-Fasern gewinnen ATP hauptsächlich durch Glykolyse und ermüden deutlich schneller als oxidative Typ-I-Fasern. Zusätzlich existieren gemischte Fasertypen, z. B. Typ I/IIA, IIA/IIX oder IIX/IIB, die Merkmale mehrerer Typen aufweisen [3].



► **Abb. 1:** Bestimmung von Muskelfasertypen. **A**, Fasertypcharakteristika. **B**, Detektion oxidativer Fasertypen (gekennzeichnet mit *) mittels des Succinat-Dehydrogenase-Assays. **C**, anti-körperbasierte Immunfluoreszenz gegen fasertypspezifische Myosine. Maßstabsbalken: 100 µm. Arbeitsablauf zur Auftrennung (**D**), Quantifizierung (**E**) und Identifizierung (**F**) tryptischer Peptide mittels LC-MS/MS.



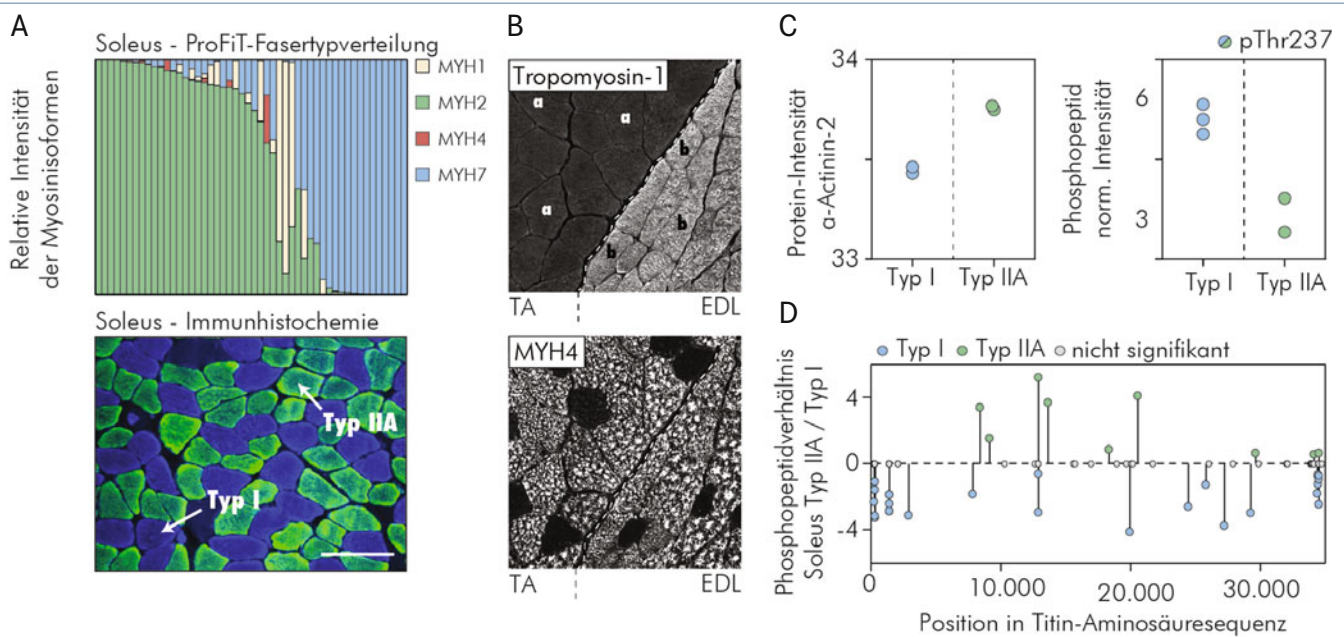
Jeder Muskel hat eine individuelle Zusammensetzung an Fasertypen und reagiert dementsprechend unterschiedlich auf externe Stimuli, z. B. Training, Ernährung oder Erkrankungen. Fasertypspezifische Untersuchungen der Muskeln sind essenziell, um die Physiologie und molekularen Anpassungsmechanismen der Skelettmuskulatur besser zu verstehen.

Biochemische Methoden zur Bestimmung von Muskelfasertypen

Bisher wurde eine Vielzahl biochemischer Methoden zur Bestimmung von Muskelfasertypen entwickelt. Myosin-ATPase-Aktivitätsassays oder immunhistologische Anfärbungen fasertypspezifischer Myosine auf Muskelschnitten haben dazu beigetragen, molekulare Mechanismen der Skelettmuskulatur zu verstehen [4]. In den letzten Jahren hat sich zusätzlich die Massenspektrometrie (MS) als analytisches Werkzeug für eine unvoreingenommene Analyse globaler Proteinexpressionsmuster (Proteomik) in Muskelfasern etabliert [5, 6].

In der von uns verwendeten *shotgun*-Proteomik (LC-MS/MS) werden Proteingemische zunächst enzymatisch mittels der Endoprotease Trypsin verdaut. Nach Aufreinigung der Peptide werden diese mittels Umkehrphasenchromatographie aufgetrennt, um die Komplexität der Probe zu verringern (Abb. 1D). Die Signalintensitäten intakter

▲ **Abb. 2:** ProFiT-Arbeitsablauf. **A,** Isolation einzelner Muskelfasern aus Muskeln und Proteinextraktion. **B,** 10 Prozent der Lysate werden auf eine Testplatte übertragen, tryptisch verdaut und mittels einer kurzen LC-MS/MS-Methode analysiert. **C,** Nach Bestimmung der Fasertypen mittels Myosin-Expressionslevel werden gleiche Fasertypen vereinigt. Adaptiert nach [7].



▲ **Abb. 3:** Anwendungsmöglichkeiten. **A,** Fasertypverteilungen bestimmt durch ProFiT (Balken: % MYH-Isoform/Faser) und Immunhistochemie. **B,** TPM1/MYH4-Expression in TA und EDL der Maus. MYH4-positive Fasern markiert durch a (TA) oder b (EDL). **C,** MYL 1-Protein- und -Phosphopeptidlevel in Typ-I- und Typ-IIA-Muskelfasern. **D,** Titin-Phosphorylierung in Typ-I- und Typ-IIA-Muskelfasern. Adaptiert nach [7].

Peptide werden zur Quantifikation verwendet (**Abb. 1E**) und Peptidfragmentierungsmuster erlauben, nach Abgleich mit einer Proteindatenbank, die Identifikation der Peptidsequenz (**Abb. 1F**).

Trotz vieler Vorteile globaler Proteomikexperimente ist die Analyse komplexer biologischer Proben auch limitiert. In Muskelfasern dominieren einige Dutzend strukturelle und sarkomerische Proteine (u. a. MYH), während der Großteil anderer Proteine deutlich niedriger konzentriert vorliegt. Diese hohe Dynamik erschwert die Detektion gering exprimierter Proteine, da in LC-MS/MS-Analysen hoch konzentrierte Peptide bevorzugt werden. Zusätzlich beeinträchtigt die geringe Menge des Probenmaterials einzelner Muskelfasern die LC-MS/MS-Analyse.

ProFiT – eine robuste Methode zur Charakterisierung von Muskelfasertypen

Um das Problem geringer Proteinmengen einzelner Fasern zu umgehen, haben wir die ProFiT(*proteomics fiber typing*)-Methode zur schnellen und robusten Bestimmung von Muskelfasertypen mittels LC-MS/MS entwickelt [7].

Die Probenvorbereitung erfolgt folgendermaßen: Nach der Isolierung verschiedener Muskeln, wie Soleus und Extensor digitorum longus (EDL) aus dem Hinterbein der Maus, werden einzelne Muskelfasern aus der extrazellulären Matrix mittels Collagenaseverdau gelöst und die Proteine extrahiert. Im nächsten Schritt werden ca. zehn Prozent der Proteinlysate entnommen und für die massenspektrometrische Bestimmung der Muskelfasertypen mittels ProFiT verwendet (**Abb. 2A**). Da Myosine zu den abundantesten Proteinen im Muskel gehören, reichen kurze chromatographische Gradienten von ca. fünf Minuten aus, um die am häufigsten vorkommenden Proteine zu detektieren und daraus den jeweiligen Fasertypen zu bestimmen (**Abb. 2B**). Beispielsweise ist eine Typ-I-Faser dadurch charakterisiert, dass MYH7 zu mehr als 80 Prozent der Gesamtmenge aller muskelspezifischen Myosine beiträgt. Zusätzlich können auch gemischte Fasertypen, die mehrere Myosine exprimieren, akkurat identifiziert werden. Da wir für ProFiT nur ca. zehn Prozent der Muskellysate verwenden, kann das restliche Lysat jeder einzelnen Probe mit Fasern des gleichen Muskelfa-

sertyps vereinigt werden. Dadurch erreichen wir eine Vervielfachung der Proteinmenge der jeweiligen Fasertypen (**Abb. 2C**).

ProFiT zeigt unterschiedliche Fasertypsignaturen in verschiedenen Skelettmuskeln

Die Ergebnisse des ProFiT-Screens können dafür verwendet werden, Fasertypverteilungen zu bestimmen. Beispielsweise entspricht die ermittelte Muskelfaserverteilung im Soleus genau der Faserverteilung, die wir über immunhistochemisches Anfärben mittels MYH-Antikörper bestimmt haben (**Abb. 3A**). Die MS-basierte Analyse gibt hierbei durch die exakte Quantifizierung der Myosinisoformen einen genaueren Aufschluss über gemischte Fasertypen und kann Veränderungen in der Fasertypzusammensetzung akkurater darstellen.

In unserer Studie haben wir schnelle Typ-IIB-Muskelfaserproteome aus verschiedenen Muskeln verglichen. Hier konnten wir eindrucksvoll zeigen, dass gleiche Fasertypen je nach Muskel unterschiedliche Proteine exprimieren. Zum Beispiel zeigen Typ-IIB-Fasern des EDL einen höheren Anteil sarkomerischer Proteine, wie α -Actinin-3 (ACTN3) und Tropomyosin-1 (TPM1), im Vergleich zum Gastrocnemius und Tibialis anterior (**Abb. 3B**). Ob diese Unterschiede ein Indiz für die erhöhte Kontraktionsgeschwindigkeit der EDL-Fasern darstellen, muss durch weitere Untersuchungen in Zukunft adressiert werden.

ProFiT ermöglicht das Anreichern von Phosphopeptiden aus unterschiedlichen Fasertypen

Eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen ist die Phosphorylierung von Proteinen. Aufgrund der geringen Stöchiometrie müssen phosphorylierte Peptide jedoch vor der eigentlichen MS-Analyse angereichert werden. Um aktivierte Signalwege zu beleuchten, haben wir ProFiT für die Generierung eines fasertypspezifischen Phosphoproteoms von Typ-I- und Typ-IIA-Fasern aus dem Soleus verwendet. Nach dem Vereinen von Proteinlysaten aus ca. 150 Fasern des gleichen Muskelfasertyps konnten wir fasertypspezifisch Phosphopeptide anreichern und analysieren. Beispielsweise haben wir für das MYL1 (*myosin light*

Hier steht eine Anzeige.

 Springer

chain 1) eine erhöhte Proteinabundanz in Typ-IIA-Muskelfasern im Vergleich zu Typ-I-Fasern des Soleus beobachtet. Im Gegensatz dazu fanden wir eine verstärkte Phosphorylierung des Serin-2 auf MYL1 in Typ-I-Fasern im Vergleich zu Typ-IIA-Fasern (**Abb. 3C**).

An dem Protein Titin konnten wir insgesamt 89 Phosphorylierungen detektieren und 35 Phosphopeptide zeigten dabei unterschiedliche Signalintensitäten zwischen Typ-I- und Typ-IIA-Fasern (**Abb. 3D**). Titin durchspannt das Sarkomer von der Z-Scheibe zur M-Bande und stellt eines der wichtigsten strukturgebenden Proteine dar. Inwiefern diese Phosphorylierungen zur fasertypspezifischen Funktion des Titin beitragen, ist bisher unklar.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass ProFiT in der Lage ist, akkurat und im Hochdurchsatz Muskelfasertypen zu bestimmen. Die MS-basierte Analyse hunderter Fasern pro Tag ermöglicht einen schnellen Überblick der Muskelfasertypverteilungen in unterschiedlichsten Muskeln. Durch das Mischen gleicher Fasertypen ist es möglich, umfassende Proteome und Phosphoproteome einzelner Muskelfasertypen darzustellen. Neben Phosphopeptiden kann ProFiT auch für andere posttranslationale Modifikationen wie Acetylierungen oder Ubiquitinierungen verwendet werden, die ebenfalls niedrige Stöchiometrien aufweisen und durch spezifische Antikörper angereichert werden müssen.

Zukünftig wird ProFiT helfen, Veränderungen im Muskel auf Fasertypenebene aufzulösen

und regulatorische Mechanismen besser zu verstehen. ■

Literatur

- [1] Spudich J A (2001) The myosin swinging cross-bridge model. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 387–392
- [2] Bottinelli R, Schiaffino S, Reggiani C (1991) Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J Physiol* 437: 655–672
- [3] Schiaffino S, Reggiani C (2011) Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 91: 1447–1531
- [4] Schiaffino S (2018) Muscle fiber type diversity revealed by anti-myosin heavy chain antibodies. *FEBS J* 285: 3688–3694
- [5] Lang F, Khaghani S, Türk C et al. (2018) Single muscle fiber proteomics reveals distinct protein changes in slow and fast fibers during muscle atrophy. *J Proteome Res* 17: 3333–3347
- [6] Murgia M, Nagaraj N, Deshmukh AS et al. (2015) Single muscle fiber proteomics reveals unexpected mitochondrial specialization. *EMBO Rep* 16: 387–395
- [7] Kallabis S, Abraham L, Müller S et al. (2020) High-throughput proteomics fiber typing (ProFiT) for comprehensive characterization of single skeletal muscle fibers. *Skelet Muscle* 10: 7

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>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Marcus Krüger
 CECAD Forschungszentrum
 Universität zu Köln
 Joseph-Stelzmann-Straße 26
 D-50931 Köln
marcus.krueger@uni-koeln.de
www.cecad.uni-koeln.de

AUTOREN



Sebastian Kallabis

2011–2015 Bachelorstudium Biologie, Universität zu Köln. 2015–2017 Masterstudium Biologie, Universität zu Köln. Seit 2017 Doktorand im CECAD Forschungszentrum, Universität zu Köln.



Marcus Krüger

1991–1997 Diplom Chemie & Biologie, TU Braunschweig. 1998–2004 Promotion/Postdoc, Universität Halle-Wittenberg. 2004–2005 Postdoc, Universität Süddänemark, Odense, Dänemark. 2005–2007 Postdoc, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. 2008–2014 Proteomics Facilityleiter, Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim. Seit 2014 Professor, Institut für Genetik/CECAD, Universität zu Köln.

Hier steht eine Anzeige.

 Springer