

## Proteomics

# Das maßgeschneiderte Proteom: Proteinmodifikation durch Proteolyse

FATIH DEMIR<sup>1</sup>, ANDREAS PERRAR<sup>1</sup>, PITTER F. HUESGEN<sup>1, 2</sup>

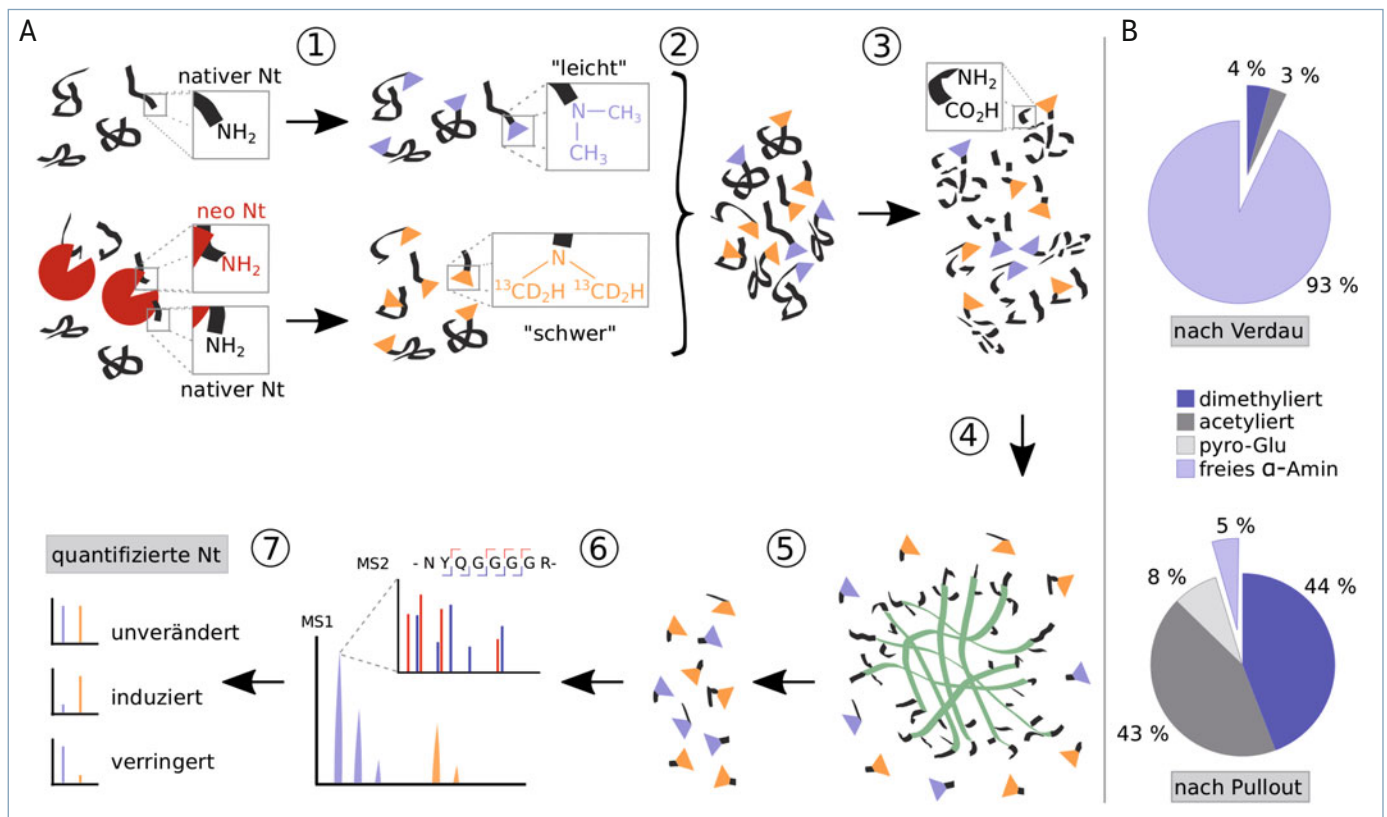
<sup>1</sup> ZENTRALINSTITUT FÜR ENGINEERING, ELEKTRONIK UND ANALYTIK, ZEA-3, FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH

<sup>2</sup> MEDIZINISCHE FAKULTÄT UND UNIKLINIK KÖLN, UNIVERSITÄT ZU KÖLN

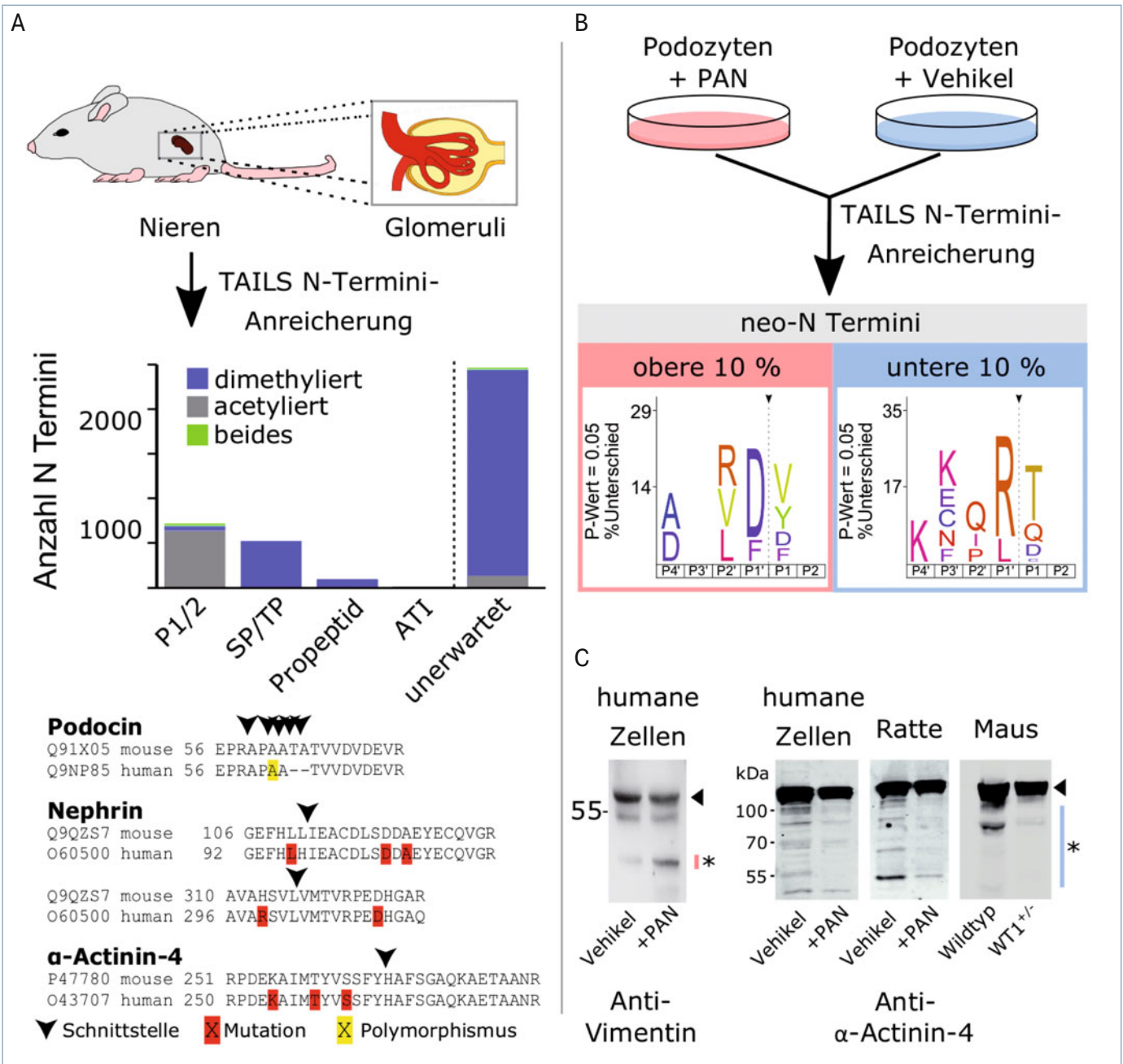
Site-specific proteolytic processing is an irreversible post-translational protein modification with essential regulatory functions. Dedicated methods enable proteome-wide characterization of differentially processed proteoforms based on their distinct protease-generated N termini. Exemplary profiling of murine glomeruli revealed processed forms of proteins with important functions in the renal filtration barrier. Altered processing was observed in cellular and animal models of glomerular disease.

DOI: 10.1007/s12268-019-1003-4  
© Springer-Verlag 2019

■ Zellen reagieren mit dynamischen Veränderungen von Protein-Protein-Wechselwirkungen und Enzymaktivitäten auf äußere Reize wie veränderte Umgebungsfaktoren. Die Proteolyse ist dabei einerseits durch selektiven Abbau biologisch aktiver Proteine beteiligt, modifiziert andererseits aber auch Proteinfunktionen durch spezifische Hydrolyse einzelner Peptidbindungen. Derartige gezielte proteolytische Prozessierung kann Stabilität, Aktivität, subzelluläre Lokalisation und Funktion der Substratproteine maßgeblich verändern; man denke nur an die in Lehrbüchern beschriebene Zymogenaktivierung extrazellulärer Proteasen oder an die Reifung von Peptidhormonen. Unterschiedliche, prozessierte Varianten eines Pro-



▲ **Abb. 1:** Proteomweite Identifizierung von Protein-N-Termini durch negative Selektion. **A,** Schema des Arbeitsablaufs der *Terminal amine isotope labeling of substrates*(TAILS)-Methode. **B,** Die exemplarische Analyse eines Blattextrakts der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) zeigt den Anteil endogen (Acetyl-) und chemisch (Dimethyl-) modifizierter N-terminaler Peptide vor und nach der N-Termini-Anreicherung (Pullout). Pyro-Glu-modifizierte Peptide sind zum Großteil Artefakte aus spontaner Zyclisierung von N-terminaler Glutaminsäure (Glu) nach dem Proteomverdau.



▲ **Abb. 2:** Identifizierung proteolytisch prozessierter Proteine in Nierenkörperchen. **A,** Kartierung von Protein-N-Termini in Nierenkörperchen (Glomeruli) gesunder Mäuse mit Klassifizierung nach der Position in der Proteinsequenz. P1/2: Translationsstart mit intaktem/entfernten Initiator-Met; SP: Signalpeptid; TP: Transitpeptid für mitochondrielles Transitpeptid; ATI: alternative Translationsinitiierungsstelle. Beispiele für unerwartete N-Termini in ausgewählten, mit Nierenerkrankungen assoziierten Proteinen. **B,** differenzielle Prozessierung in Puromycinaminonukleosid(PAN)-geschädigten humanen Podocyten-Zellkulturen. Sequenzlogos zeigen die Schnittstellen der nach einer 24-Stunden-Behandlung am stärksten veränderten zehn Prozent der quantifizierten neo-N-terminalen Peptide. **C,** Immundetektion des verstärkt prozessierten Vimentins in einer humanen Podocyten-Zellkultur sowie der inhibierten Prozessierung von  $\alpha$ -Actinin-4 in Podocyten und in Glomeruli PAN-behandelter Ratten sowie heterozygoten Wilms-Tumor-Protein-1(WT1)-Mäusen. Die Abbildung basiert auf den Ergebnissen in [7].

teins können anhand ihrer durch die Spaltung der Peptidbindung entstandenen neuen Termini, die Neo-Aminotermini (Neo-N-Termini) und Neo-Carboxytermini (Neo-C-Termini), eindeutig unterschieden werden [1].

Aktuelle Verfahren der massenspektrometrie-basierten Proteomanalyse können nicht

nur einen Großteil der im Proteom vorkommenden Proteine identifizieren, sondern auch dynamische Veränderungen posttranslationaler Modifikationen erfassen [2]. Dabei werden Proteine zunächst mit einer sequenzspezifischen Endoprotease, wie beispielsweise Trypsin, in Peptide verdaut und mittels Flüssigchromatographie-gekoppelter Tandem-

Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert. Aufgrund der hohen Komplexität der verdauten Proben können jedoch nur für einen Teil der Peptide Fragmentspektren aufgenommen werden, deren Sequenzen dann durch Abgleich mit theoretischen Spektren bestimmt werden. Dabei werden die theoretischen Spektren aus einer zur Probe pas-

senden Genom- oder Proteinsequenzdatenbank unter Berücksichtigung der Sequenzspezifität des Verdauenzym berechnet. Für N-terminale Peptide ergeben sich dabei zwei Probleme: Einerseits sind N-Termini nur eine kleine Minderheit der durch Proteomverdau entstandenen Peptide, wodurch ihre Identifizierung unwahrscheinlich ist. Andererseits werden Neo-N-Termini bei Standarddatenbankabfragen nicht berücksichtigt, da beidseitig zur Spezifität der Verdau-protease passende Schnittstellen vorausgesetzt werden, wobei sich diese auf der N-terminalen Seite der Neo-N-Termini unterscheidet. Vergleichbar zur Analyse anderer posttranslationaler Proteinmodifikationen, wie z. B. Phosphorylierungen, ist daher eine Anreicherung N-terminaler Peptide sowie eine modifizierte Datenanalyse unabdingbar.

### Anreicherung N-terminaler Peptide aus komplexen Proteomen

Im Laufe der letzten Jahre wurden mehrere Methoden zur Anreicherung und Identifizierung von N-Termini aus komplexen Proteomen entwickelt, wobei die meisten dieser *Degradomics*-Verfahren N-terminale Peptide durch negative Selektion anreichern [3]. Dabei werden zunächst primäre Amine der Protein-N-Termini und Lysin-Seitenketten chemisch modifiziert (**Abb. 1A**, 1. Schritt), sofern sie nicht bereits durch endogene Modifikationen wie Acetylierungen blockiert sind. In vergleichenden Analysen werden mehrere Proteome, beispielsweise Protease- und Kontroll-behandelte Proben, mit verschiedenen stabilen Isotopen modifiziert [4, 5], vereinigt (2. Schritt), und mit einer spezifischen Protease verdaut (3. Schritt). Die neu entstehenden Peptide enthalten freie, reaktive N-terminale Aminogruppen, die auf vielfältige Weise zur Abtrennung von den durch endogene oder chemische Modifizierung geschützten N-terminalen Peptiden des Proteins genutzt werden [3]. In der vermutlich am weitesten verbreiteten Methode, dem *Terminal amine isotope labeling of substrates* (TAILS)-Verfahren [4], werden Peptide mit freien Aminen kovalent an ein hochmolekulares Aldehyd-modifiziertes Polyglycerolpolymer gebunden (4. Schritt) und durch Größenausschlussfiltration von den

geschützten unreaktiven N-terminalen Peptiden abgetrennt (5. Schritt). Derart angereicherte N-terminale Peptide werden mittels LC-MS/MS analysiert und durch „semi-spezifischen“ Datenbankabgleich identifiziert (6. Schritt). Gleichzeitig können isoto-penmarkierte N-Termini vergleichend quantifiziert und so Unterschiede zwischen verschiedenen Behandlungen oder Genotypen erkannt werden (7. Schritt). Die Effizienz solcher Verfahren wird durch eine vergleichende Analyse der mit semi-spezifischen Suchparametern identifizierten Peptide vor und nach der Anreicherung deutlich: Nach dem Proteomverdau sind nur sieben Prozent dimethylierte oder acetylierte N-terminale Peptide zu finden, wohingegen deren Anteil nach der Anreicherung 87 Prozent beträgt (**Abb. 1B**). Dadurch können in unterschiedlichen Ansätzen einerseits physiologisch relevante Substrate einzelner Proteasen bestimmt [1, 3, 4], andererseits auch proteolytisch prozessierte Proteinformen und stimulusspezifische limitierte Proteolyse erkannt werden, wie im Folgenden anhand eines Beispiels aus der Nierenforschung gezeigt wird.

### Identifikation proteolytisch prozessierter Proteine *in vivo*

Podocyten sind spezialisierte Zellen der Nierenkörperchen (Glomeruli), die mit ihren verzahnten, neuronartigen Zellfortsätzen einen wichtigen Bestandteil des Nierenfilters bilden. Sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Proteasen sind an der Aufrechterhaltung der Podocytenfunktion beteiligt, jedoch sind nur wenige Substrate bekannt [6]. Mittels TAILS konnten wir nun erstmals einen Katalog proteolytisch modifizierter Proteine in Nierenkörperchen gesunder Mäuse erstellen [7]. Insgesamt wurden 3.815 N-terminale Peptide identifiziert, von denen nur 1.367 auf bekannte Protein-N-Termini zurückgeführt werden konnten (**Abb. 2A**). Diese „erwarteten“ Protein-N-Termini beginnen an Position 1 oder 2 der vorhergesagten Proteinsequenz oder stellen bekannte Reifungsschritte durch Abschneiden von Signal-, Transitsequenzen nach Sekretion oder Import in Mitochondrien sowie Propeptidspaltungen dar (**Abb. 2A**). Eine Mehrzahl von 2.448 N-Termini resultierte aus proteolytischen Schnitten an „unerwar-

teten“ Stellen im Proteom, unter anderem auch in den für die Filtrationsbarriere wichtigen Proteinen Podocin und Nephrin sowie in zahlreichen cytoskelettalen Proteinen, einschließlich des Aktin-Bindeproteins  $\alpha$ -Aktinin-4 (**Abb. 2A**). Interessanterweise lagen mehrere prozessierte N-Termini in der Nähe von bekannten, mit chronischen Nierenerkrankungen, wie der Fokal-segmentalen Glomerulosklerose (FSGS), assoziierten Mutationen und Polymorphismen [8].

Die Behandlung einer humanen Podocyten-Zellkulturlinie mit Puromycinaminonukleosid (PAN), einem etablierten künstlichen Trigger von Nephropathien, führte zu zahlreichen Änderungen in den beobachteten Prozessierungen [7]. Eine Sequenzmotivanalyse der am stärksten induzierten Neo-N-Termini wies ein markantes DxVD-Motiv vor der Schnittstelle auf (**Abb. 2B**), die der Spezifität Zelltod-auslösender Caspasen entspricht. Tatsächlich konnte diese Caspase-Aktivierung mittels Immunoblotting bestätigt werden [7]. Die PAN-Behandlung führte jedoch ebenfalls zu einer verminderten Prozessierung cytoskelettaler Proteine wie  $\alpha$ -Aktinin-4. Eine Sequenzanalyse der am stärksten betroffenen Neo-N-Termini zeigt eine Inhibierung argininspezifischer Proteasen (**Abb. 2B**). Schließlich konnte die inhibierte  $\alpha$ -Aktinin-4-Prozessierung auch *in vivo* in zwei FSGS-Tiermodellen, PAN-behandelten Ratten sowie heterozygoten Wilms-Tumor-Protein-1 (WT1)-Mäusen, nachgewiesen werden (**Abb. 2C**). Die physiologische Funktion dieser Prozessierungen kann nun in weiterführenden Studien aufgeklärt werden.

## Zusammenfassung

Sequenzspezifische proteolytische Prozessierung ist eine weitverbreitete irreversible Proteinmodifikation, die in allen Organismen – von Einzellern über Pflanzen bis hin zum Menschen – auftritt, essenzielle biologische Prozesse reguliert und auch in vielen Krankheiten eine wichtige Rolle spielt. Effektive Anreicherungstechniken für Protein-N-Termini ermöglichen zusammen mit hochauflösender Massenspektrometrie eine systematische Charakterisierung proteolytischer Aktivitäten *in vivo*. Darüber hinaus ermöglicht eine Anreicherung mittels negativer Selektion auch eine Charakterisierung bislang wenig untersuchter N-terminaler Proteinmodifikationen und alternativer Translationsinitiation. Wir erwarten, dass die zunehmende Verbreitung solcher Verfahren unser Verständnis von regulatorischen Protease-Netzwerken und N-terminalen Proteinmodifikationen stark verbessert und dadurch neue Möglichkeiten zur Diagnose und Therapie komplexer Krankheiten eröffnet.

## Danksagung

Wir danken Dr. Markus Rinschen, Prof. Dr. Bernhard Schermer, Prof. Dr. Thomas Benzing und ihren Mitarbeitern vom Nephrologischen Forschungslabor der Uniklinik Köln für die hervorragende Zusammenarbeit und dem Europäischen Forschungsrat für finanzielle Unterstützung aus Mitteln des Horizont-2020-Programms der Europäischen Union (Grant ID 639905). ■

## Literatur

- [1] Klein T, Eckhard U, Dufour A et al. (2018) Proteolytic cleavage – mechanisms, function, and „omic“ approaches for a near-ubiquitous posttranslational modification. *Chem Rev* 118:1137–1168
- [2] Aebersold R, Mann M (2016) Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 537:347–355
- [3] Niedermaier S, Huesgen PF (2018) Positional proteomics for identification of secreted proteoforms released by site-specific processing of membrane proteins. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, doi: 10.1016/j.bbapap.2018.09.004
- [4] Kleifeld O, Doucet A, auf dem Keller U et al. (2010) Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-Termini and protease cleavage products. *Nat Biotechnol* 28:281–288
- [5] Demir F, Niedermaier S, Kizhakkedathu JN et al. (2017) Profiling of protein N-termini and their modifications in complex samples. *Methods Mol Biol* 1574:35–50
- [6] Rinschen MM, Huesgen PF, Koch R (2018) The podocyte protease web: uncovering the gatekeepers of glomerular disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, doi: 10.1152/ajprenal.00380.2018
- [7] Rinschen MM, Hoppe AK, Grahmmer F et al. (2017) N-degradomic analysis reveals a proteolytic network processing the podocyte cytoskeleton. *J Am Soc Nephrol* 28:2867–2878
- [8] Kaplan JM, Kim SH, North KN et al. (2000) Mutations in ACTN4, encoding  $\alpha$ -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 24:251–256

## Korrespondenzadresse:

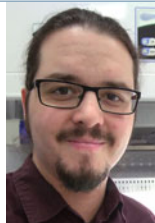
Dr. Fatih Demir  
 Andreas Perrar  
 Prof. Dr. Pitter Huesgen  
 Zentralinstitut für Engineering, Elektronik und Analytik  
 ZEA-3 Analytik  
 Forschungszentrum Jülich GmbH  
 Wilhelm-Johnen-Straße  
 D-52425 Jülich  
 Tel.: 02461-61-6010, -4184, -6873  
 Fax: 02461-61-2560  
 f.demir@fz-juelich.de  
 a.perrar@fz-juelich.de  
 p.huesgen@fz-juelich.de

## AUTOREN



### Fatih Demir

2001–2006 Biologiestudium an der Universität Heidelberg. 2007–2010 Promotion in Pflanzenphysiologie an der Universität Würzburg. 2011–2014 Postdoc am Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie des Uniklinikums Düsseldorf. 2014–2015 Postdoc in der Neurologischen Klinik des Uniklinikums Düsseldorf. Seit 2015 Postdoc am Forschungszentrum Jülich.



### Andreas Perrar

2009–2011 Ausbildung zum biologisch-technischen Assistenten. 2011–2014 Bachelorstudium Biologie an der Universität zu Köln. 2014–2016 Masterstudium *Plant Sciences* an der Universität Bonn. Seit 2017 Doktorand am Forschungszentrum Jülich und an der Universität zu Köln.



### Pitter Huesgen

1998–2002 Chemiestudium an den Universitäten Marburg und Stockholm, Schweden. 2003–2007 Promotion in Biologie und 2007–2008 Postdoc an der Universität Konstanz. 2008–2014 Postdoc an der University of British Columbia in Vancouver, Kanada. Seit 2014 Teamleiter am Forschungszentrum Jülich. Seit 2019 Professor für Proteindynamik und Proteolyse an der Universität zu Köln.