

Split-BioID für kontextabhängige Proteomik

Proteomik-Analyse von dynamischen Proteinkomplexen

STEFANIE EGETEMAIER, JULIEN BÉTHUNE
BIOCHEMIE-ZENTRUM HEIDELBERG, UNIVERSITÄT HEIDELBERG

Analytical methods are required to characterize the protein-protein interactions that underlie all biological processes. Beside affinity purification/mass spectrometry approaches, proximity-dependent labeling techniques rely on the biotinylation of interacting proteins in living cells for their proteomic analysis. We summarize here the principles of these approaches and present a split proximity-dependent labeling assay that allows the analysis of context-dependent protein complexes.

DOI: 10.1007/s12268-019-1004-3
© Springer-Verlag 2019

Identifizierung aufbereitet werden. Viele Labore haben dieses Verfahren bzw. Variationen davon in den letzten Jahrzehnten erfolgreich eingesetzt. Der AP-MS-Ansatz hat jedoch mehrere technische Einschränkungen. So wird beispielsweise der AP-Schritt nach der Zellyse durchgeführt, dies bedeutet, dass die Zielproteinkomplexe der Zellyse standhalten müssen. Darüber hinaus müssen die Wechselwirkungen stabil genug sein, um den gesamten Reinigungsprozess durchzuhalten. Infolgedessen führt der AP-MS-Ansatz typischerweise zu einer schlechteren Leistung bei unlöslichen Pro-

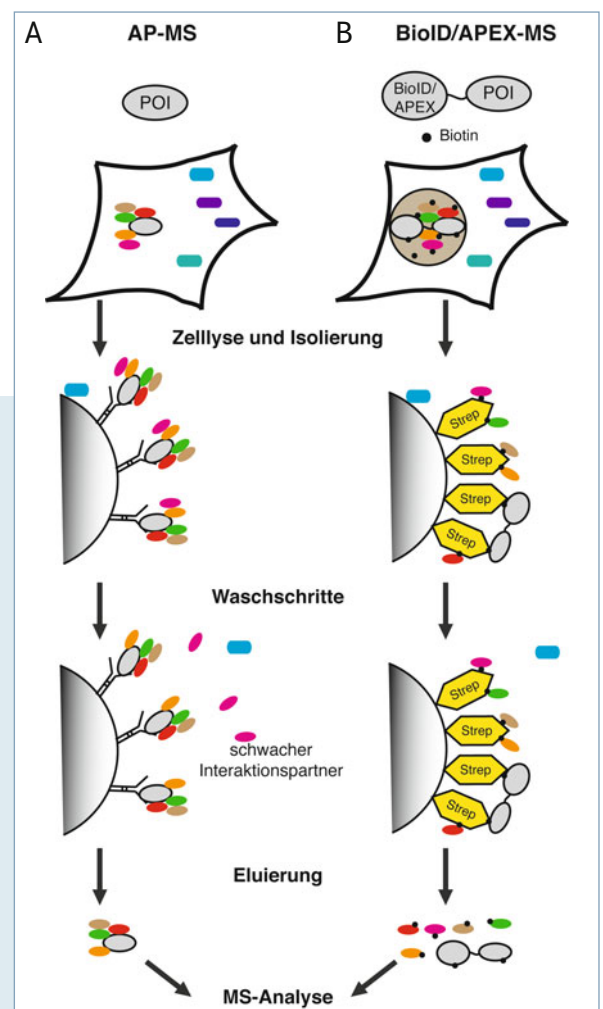
■ In der molekularen Zellbiologie konzentrieren sich viele Projekte auf die funktionelle Charakterisierung von Proteinen. In der Regel interagieren Proteine miteinander, um makromolekulare Komplexe zu bilden, die funktionelle Einheiten darstellen. Ein üblicher Ausgangspunkt, um die Funktion eines bestimmten Proteins (*protein of interest*, POI) zu verstehen, ist daher die Identifizierung von Interaktionspartnern. Nach dem Motto „mitgefangen, mitgegangen“ kann aus diesen Protein-Protein-Interaktionen (PPI) die vermeintliche Funktion eines bestimmten POI abgeleitet werden.

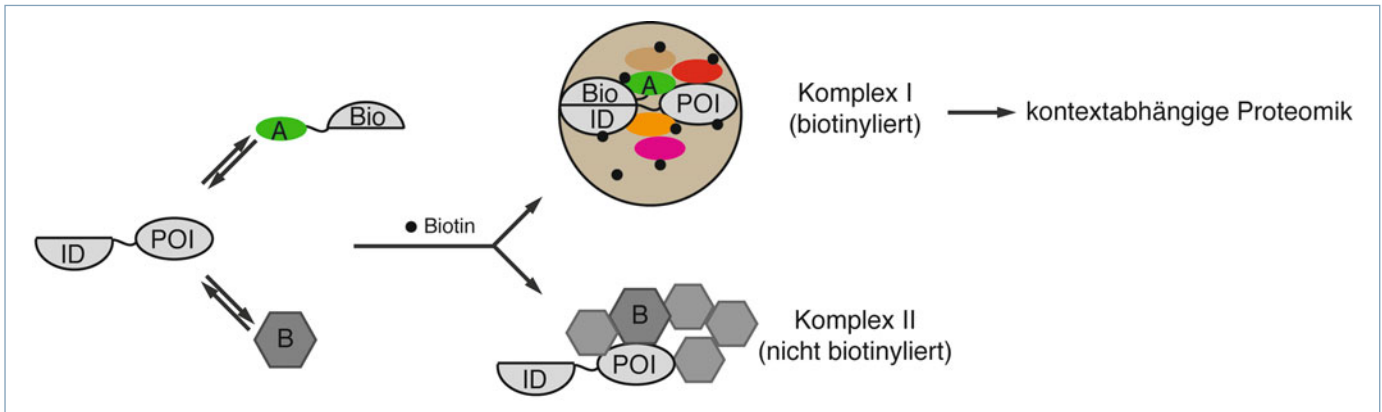
AP-MS als Goldstandard für Protein-Protein-Interaktionen

Der Affinitätsreinigungsansatz (*affinity purification*, AP) wurde zur Goldstandardmethode für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen. Im AP wird ein spezifischer Antikörper an eine feste Matrix gekoppelt und zur Isolierung eines POI aus einem komplexen Zellysats verwendet (Abb. 1A). Alternativ kann das POI, wenn kein geeigneter Antikörper verfügbar ist, mithilfe gentechnischer Ansätze mit einem Affinitäts-Tag wie dem FLAG- oder Strep-Tag fusioniert und dann auf der entsprechenden Affinitätsreinigungsmatrix isoliert werden. In beiden Fällen werden dann Waschschritte durchgeführt, die stringent genug sind, um kontaminierende, nicht verwandte

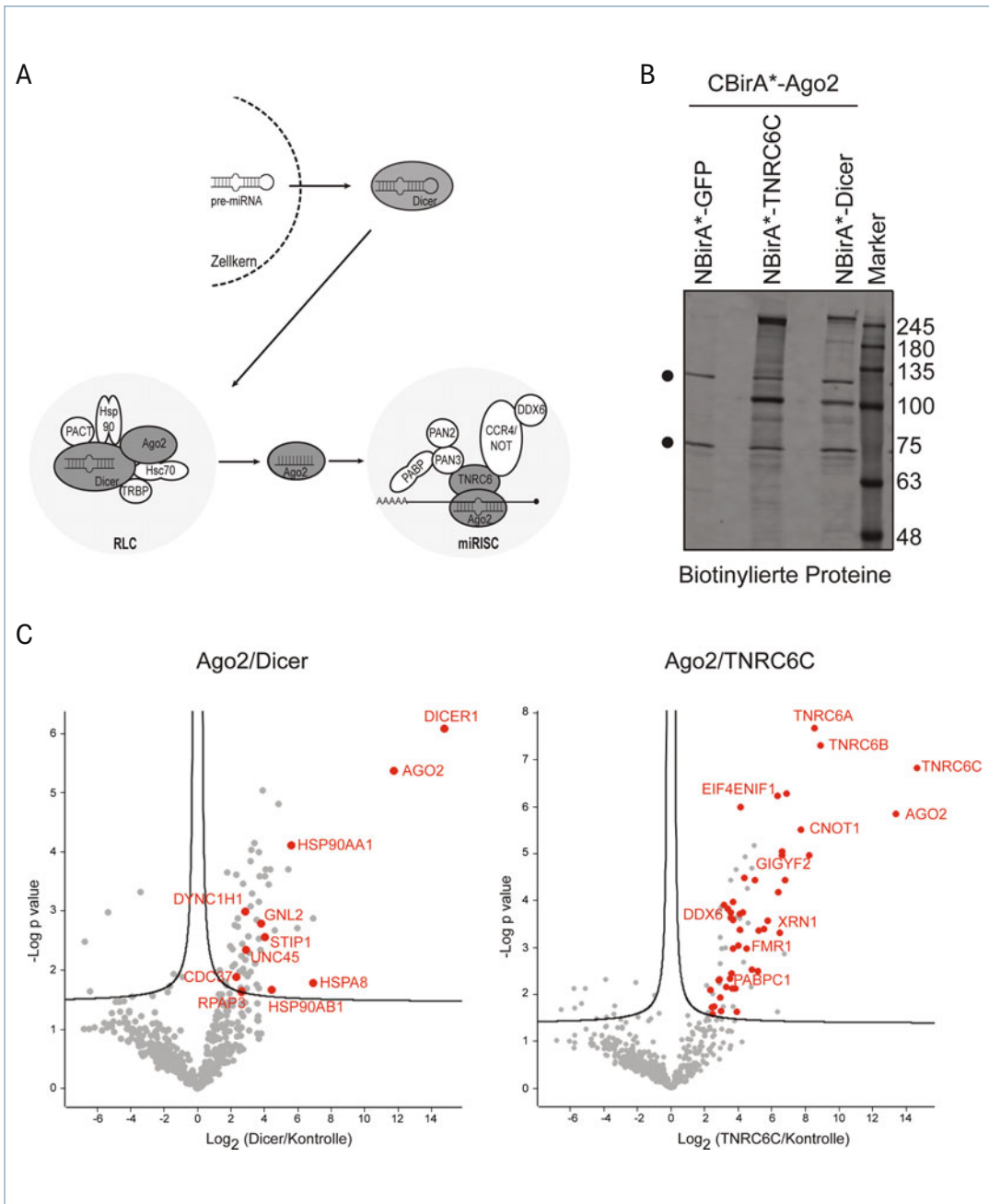
Proteine zu entfernen, aber mild genug, um Proteine zu erhalten, die mit dem POI interagieren. In einem nächsten Schritt können die POI und ko-purifizierten Proteine aus der Affinitätsreinigungsmatrix eluiert und für die Massenspektrometrie (MS) zur unvoreingenommenen

► **Abb. 1:** Überblick über die AP- und APEX/BioID-MS-Verfahren. **A**, In der AP-MS (*affinity purification-mass spectrometry*) werden Proteinkomplexe nach sanfter Zellyse mit einem POI (*protein of interest*)-spezifischen Antikörper isoliert. Transiente Interaktionen können während der Waschschritte verloren gehen. **B**, In der APEX/BioID-MS werden proximale Proteine zum POI in lebenden Zellen biotinyliert. Im Gegensatz zur AP-MS werden anschließend markierte Proteine nach denaturierender Zellyse auf Streptavidin-gekoppelten Beads isoliert. Damit werden auch die transienten interagierenden Proteine gefangen.





▲ **Abb. 2:** Überblick über das Split-BioID-MS-Verfahren. Das POI interagiert entweder mit Protein A als Teil von Komplex I oder mit B als Teil von Komplex II. Nur wenn POI und Protein A interagieren, können sich die BirA*-Fragmente wieder zu einem aktiven Enzym zusammensetzen.



◀ **Abb. 3:** Kontextabhängige Proteomik mit Split-BioID. **A**, Überblick über den Mikro-RNA(miRNA)-Weg. Nach dem Export aus dem Kern werden die Prä-miRNAs von der Endoribonuklease Dicer verarbeitet, wodurch miRNAs entstehen. Ago2 interagiert mit Dicer, um mit einer miRNA in einem vermeintlichen *RISC-loading complex* (RLC) beladen zu werden. Einmal geladen, dissoziiert Ago2 von Dicer und bildet mit einem TNRC6-Protein den *miRNA-induced silencing complex* (miRISC), der die Ziel-mRNAs reprimiert. **B**, Western-Blot-Analyse von biotinylierten Proteinen nach Expression von CBirA*-Ago2 und NBirA*-GFP (Kontrolle), -TNRC6C oder -Dicer. Schwarze Punkte zeigen endogene biotinylierte Proteine an. Die induzierte Biotinylierung wird nur beobachtet, wenn Ago2 mit seinen bekannten Interaktionspartnern gepaart wird. **C**, Die MS-Analyse zeigt die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Dicer- und TNRC6C-haltigen Komplexe. Rot markiert sind die Treffer, die in den angezeigten Proben im Vergleich zur GFP-Probe und zu einem Kontroll-BioID-Datensatz signifikant angereichert wurden. (Abbildung beruht auf Abb. 5 und 7 aus [8]; *Creative Commons Attribution 4.0 International License*).

teinkomplexen und transienten Wechselwirkungen.

Proximitätsabhängige Markierungstechniken

Vor Kurzem wurden alternative Methoden zur AP-MS für die Untersuchung von PPI-Netzwerken eingeführt. Dazu gehören proximitätsabhängige Markierungsansätze, die die Biotinylierung von Proteinen in lebenden Zellen basierend auf ihrer Entfernung zum POI ermöglichen [1]. Bei diesen Techniken wird ein POI mithilfe von Gentechnik mit einem Enzym fusioniert, das die Fähigkeit hat, ein kurzlebiges aktiviertes Biotinderivat-Zwischenprodukt zu erzeugen. Diese reaktive Chemikalie diffundiert dann um das Fusionsprotein und kann unspezifisch und nicht-enzymatisch mit jedem benachbarten Protein reagieren, das anschließend mit Biotin markiert wird. Diese biotinylierten Proteine können auf einer Streptavidin-gekoppelten Matrix isoliert und dann mittels MS identifiziert werden (**Abb. 1B**). Im Gegensatz zur AP-MS zielt der Isolationschritt nicht auf zusammengesetzte Komplexe, die das POI enthalten, sondern auf Proteine, die in lebenden Zellen in ihrer natürlichen Umgebung markiert wurden, unabhängig davon, ob sie nach der Zellyse noch mit dem POI interagieren oder nicht. Folglich schneiden proximitätsabhängige Proteomikansätze bei schwerlöslichen Komplexen [2] oder transienten Wechselwirkungen [3] typischerweise besser ab als die AP-MS. Zwei Hauptenzymfamilien ermöglichen proximitätsabhängige Proteomik. APEX und sein Derivat APEX2 [4] sind Peroxidasen, die Biotin-Phenol (auch bekannt als Biotinylytyramid) als Substrat verwenden, das sie mithilfe von H_2O_2 oxidieren. Der durch diese Reaktion erzeugte Biotin-Phenoxyrest kann mit mehreren Aminosäuren, aber auch mit Nukleinsäuren reagieren. Darüber hinaus ist eine sehr kurze Markierungszeit (eine Minute) ausreichend, um eine geeignete Biotinylierung benachbarter Proteine zu erreichen. Einschränkungen von APEX(2) sind die Toxizität des exogenen H_2O_2 , das den Zellen zugesetzt werden muss, und die Tatsache, dass Biotin-Phenol nicht von allen Zelltypen aufgenommen wird. BioID und seine Derivate sind Varianten von bakteriellen Biotin-Proteinligasen [5–7]. Sie

verwenden reines Biotin als Substrat zur Erzeugung von reaktivem Biotinyl-AMP, das mit der ϵ -Aminogruppe von Lysinresten im Umkreis von ca. zehn Nanometern reagiert. Im Gegensatz zu APEX(2) wird Biotin von nahezu allen Zelltypen leicht aufgenommen und ist nicht toxisch. Während die erste Generation der BioID-Enzyme lange Markierungszeiten (sechs bis 24 Stunden) erforderte, ermöglichen neue Enzyme nun die Markierung im Minutenbereich [5].

Split-BioID: kontextabhängige Proteomik

Proteine sind oftmals Teil mehrerer dynamischer Proteinkomplexe mit unterschiedlicher oder überlappender Proteinzusammensetzung, die sich entsprechend dem zellulären Bedarf bilden. Sollen kontextbezogene Informationen über Protein-Protein-Interaktionen gewonnen werden, stoßen bisherige Methoden wie BioID oder AP-MS an ihre Grenzen. Denn diese Methoden geben lediglich einen allgemeinen Überblick über alle Proteininteraktionen des jeweiligen POI, erlauben jedoch keine Zuordnung zu einem spezifischen Komplex.

Um dieses Problem zu lösen, wurden die zwei bestehenden Methoden BioID und *protein-fragment complementation assay* (PCA) miteinander zur Split-BioID-Methode kombiniert [8, 9]. Hierzu wurde die *Escherichia coli*-Ligase-Variante BirA* in zwei nicht-funktionelle Fragmente geteilt (die katalytische Domäne NBirA* und die Wiederaktivierungsdomäne CBirA*). Basierend auf dem Prinzip eines PCA bilden die beiden Fragmente ein aktives BirA*-Enzym, wenn sie sich in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Dies wird ausgenutzt, indem jeweils ein BirA*-Fragment mit einem von zwei interagierenden POIs fusioniert wird. Interagieren die beiden POIs miteinander, bildet sich ein funktionelles BirA*-Enzym, welches analog zur BioID-Methode benachbarte Proteine biotinyliert (**Abb. 2**).

Der Vorteil der neuen Untersuchungsmethode Split-BioID liegt besonders in der räumlichen und zeitlichen Auflösung. Dadurch wird eine Zuordnung von Interaktionspartnern zu einem spezifischen Proteinkomplex möglich. Dies ist besonders für kurzlebige Protein-Protein-Interaktionen interessant, da die Mar-

kierung mittels Biotin bestehen bleibt, auch wenn die beiden Interaktionspartner beim Zeitpunkt der Analyse nicht mehr miteinander interagieren. Ähnlich zur BioID-Methode mit sechs bis 24 Stunden Biotinylierungszeit benötigt auch die Split-BioID-Methode eine lange Biotinylierungszeit und eignet sich daher nicht für Proteine mit kurzer Halbwertszeit.

Erste Versuche bestätigten die Funktionsweise der Split-BioID-Methode bei der Auflösung zweier unterschiedlicher Proteinkomplexe im *miRNA-mediated gene-silencing pathway*. Je nachdem, ob das Argonaut-Protein mit dem Dicer-Protein oder dem TNRC6-Protein interagiert, konnten spezifische Proteine des RISC (*RNA-induced silencing complex*)-loading complex (Dicer) oder des *miRNA-induced silencing complex* (TNRC6) mittels MS-Analysen identifiziert werden (**Abb. 3**).

Insgesamt handelt es sich bei der Split-BioID-Methode um einen einfachen Ansatz, welcher keine spezielle Laborausstattung erfordert. Lediglich die beiden POIs müssen in spezielle Split-BioID-Plasmide kloniert werden. Dabei ist zu beachten, dass für jedes Protein alle möglichen Kombinationen (Fusion N-/C-terminal an NBirA*/-CBirA*-Fragment) getestet werden sollten, um die bestmögliche Biotinylierungsbedingung zu wählen. Anschließend werden lediglich die Plasmide in Zellen transfiziert und dem Zellkulturmedium zusätzliches Biotin hinzugefügt. Die Zellen werden lysiert und biotinylierte Proteine über Streptavidin-gekoppelte Beads angereichert und analysiert. Die MS-Analyse liefert eine Liste potenzieller Interaktionspartner eines spezifischen Komplexes. Da aber theoretisch alle Proteine im näheren Umkreis der beiden POIs biotinyliert werden und somit auch zufällige, sollte parallel ein Paar nicht-verwandter

interagierender Proteine als Kontrollreaktion verwendet werden, um den Datensatz zu filtern.

Zusammenfassend wurde mit Split-BioID eine Methode entwickelt, die die kontextspezifische Zuordnung von Proteininteraktionen in dynamischen Komplexen in der zellulären Umgebung erlaubt, unter der Voraussetzung, dass ein zusätzliches interagierendes Protein des Proteinkomplexes bekannt ist.

Danksagung

Die Autoren wurden durch die Exzellenzinitiative des Bundes und der Länder (Exzellenzcluster CellNetworks DFG-EXC81) unterstützt. ■

Literatur

- [1] Lönn P, Landegren U (2017) Close encounters – probing proximal proteins in live or fixed cells. *Trends Biochem Sci* 42:504–515
- [2] Morriswood B, Havlicek K, Demmel L et al. (2013) Novel bilobe components in *Trypanosoma brucei* identified using proximity-dependent biotinylation. *Eukaryot Cell* 12:356–367
- [3] Lambert JP, Tucholska M, Go C et al. (2015) Proximity biotinylation and affinity purification are complementary

- approaches for the interactome mapping of chromatin-associated protein complexes. *J Proteomics* 118:81–94
- [4] Lam SS, Martell JD, Kamer KJ et al. (2015) Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nat Methods* 12:51–54
 - [5] Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD et al. (2018) Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol* 36:880–887
 - [6] Kim DI, Birendra KC, Zhu W et al. (2014) Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:E2453–2461
 - [7] Roux KJ, Kim DI, Raida M et al. (2012) A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol* 196:801–810
 - [8] Schopp IM, Amaya Ramirez CC, Debeljak J et al. (2017) Split-BioID a conditional proteomics approach to monitor the composition of spatiotemporally defined protein complexes. *Nat Commun* 8:15690
 - [9] De Munter S, Gornemann J, Derua R et al. (2017) Split-BioID: a proximity biotinylation assay for dimerization-dependent protein interactions. *FEBS Lett* 591:415–424

Korrespondenzadresse:

Dr. Julien Béthune
Universität Heidelberg
Biochemie-Zentrum Heidelberg (BZH)
Im Neuenheimer Feld 328
D-69120 Heidelberg
Tel.: 06221-54-4749
julien.bethune@bzh.uni-heidelberg.de

AUTOREN



Stefanie Egetemaier

2012–2016 Bachelorstudium Biochemie an der Universität Tübingen. 2016–2018 Masterstudium an der Universität Tübingen, Masterarbeit am Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg.



Julien Béthune

Chemie und Biochemiestudium an der Universität Montpellier, Frankreich, und der Universität Louisville, KY, USA. 2006 Promotion an der Universität Heidelberg. 2007 Laborleiter bei Novartis Pharma, Basel, Schweiz. 2008–2013 Postdoc am Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Basel. Seit 2013 Nachwuchsgruppenleiter am Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg.