

Organellen-Proteomik

Synaptische Vesikel als Modell

HENNING URLAUB, MADS GRØNBORG, REINHARD JAHN
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE, GÖTTINGEN

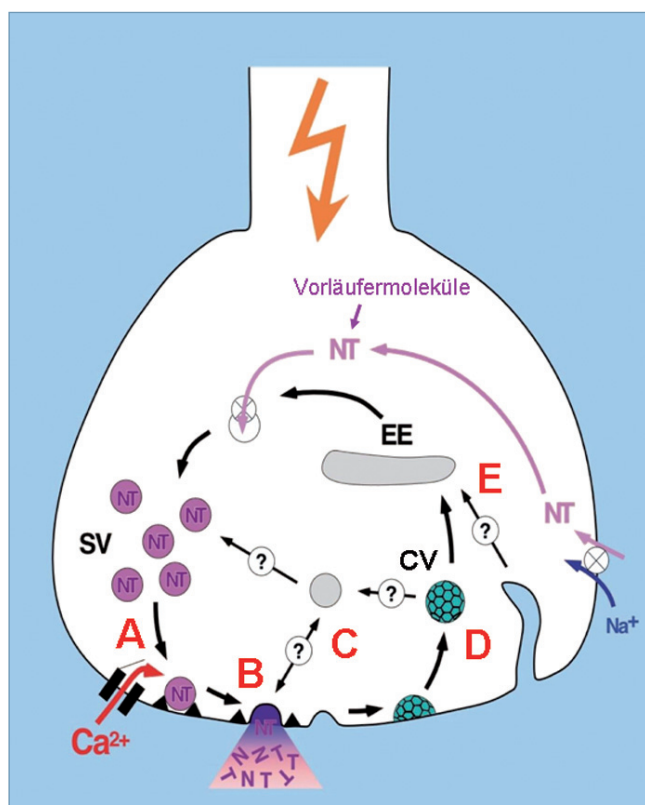
In Neuronen werden Neurotransmitter in synaptischen Vesikeln (SV) gespeichert, die bei Erregung durch Exozytose freigesetzt werden. Neuere Proteom-Analysen haben eine überraschende Protein-Vielfalt in SVs ergeben. Quantitative Bestimmung von Proteinen und Lipiden erlaubten erstmalig, ein Molekularmodell eines Transportvesikels zu entwickeln.

In neurons, neurotransmitters are stored in synaptic vesicles, which are released by exocytosis upon stimulation. Proteomics and quantitative protein- and lipid analysis allowed to develop the first molecular model of a trafficking organelle.

Das Proteom synaptischer Vesikel

■ Synaptische Vesikel (SV) sind membranumschlossene Organellen mit ca. 40 nm Durchmesser. Sie enthalten spezifische Membranproteine, die in zwei Gruppen unterteilt werden können. Die erste Gruppe umfasst die Proteine, die für die Beladung der Vesikel mit Neurotransmittern erforderlich sind.

Dazu gehören spezifische Transporter für Glutamat (VGLUT), GABA/Glycin (VGAT), Acetylcholin (VACHT) und Monoamine/Serotonin (VMAT) sowie die aus vielen Unter-einheiten bestehende V-ATPase, die Protonen in das Vesikelinnere pumpt und die Energie für die Neurotransmitteraufnahme bereitstellt. Die zweite Gruppe umfasst Proteine,



◀ **Abb. 1:** Exo-endozytischer Membrankreislauf synaptischer Vesikel (SV). Bei Depolarisation öffnen sich spannungabhängige Ca^{2+} -Kanäle (A), und es kommt zur Exozytose wobei die Neurotransmitter (NT) in den synaptischen Spalt entlassen werden (B). Anschließend wird die SV-Membran durch Endozytose wieder aufgenommen und SVs werden regeneriert. Dabei wird seit Jahren kontrovers diskutiert, zu welchem Anteil Clathrin-abhängige (durch Clathrin-Vesikel, CV) (D) und -unabhängige Transportwege beteiligt sind (C), und ob die Regeneration der SV endosomale Intermediate (EE) erfordert (E).

die an den Schritten des vesikulären Membrankreislaufs (**Abb. 1**) beteiligt sind, darunter Rab-Proteine, SM-Proteine, SNAREs, und Synaptotagmin^[1].

Die raschen Fortschritte der Proteomanalyse durch Massenspektrometrie erlauben es, das Proteom ganzer Organellen zu erfassen^[2]. Synaptische Vesikel sind ein ideales Modell für eine umfassende Proteomanalyse, da sie sowohl durch konventionelle Zellfraktionierung wie durch Immunisolierung hochrein isoliert werden können (**Abb. 2**) und viele der Hauptproteine seit Jahren gut bekannt sind. Die Anzahl der bei der Analyse des SV-Proteoms identifizierten Proteine war jedoch unerwartet hoch. Während die erste Untersuchung (unter Verwendung immunisolierter Vesikel) bereits über 80 Proteine identifizierte^[3], fanden wir in konventionell isolierten SVs mehr als 400 Proteine^[4]. Erfreulich dabei war, dass – mit Ausnahme einiger nur in Subpopulationen vorkommender Transporter – alle bislang bekannten Vesikelproteine erfasst wurden, darunter zahlreiche integrale Membranproteine.

Da über 90 % der identifizierten Proteine bekannt sind, lässt sich der größte Teil des Vesikel-Proteoms bestimmten Zellfunktionen zuordnen. So gehört ein Drittel (ca. 130) zu den *trafficking* Proteinen, für die eine Funktion beim vesikulären Transport nachgewiesen ist oder zumindest vermutet wird. Die Diversität dieser Proteine war jedoch unerwartet: So fanden wir mehr als 20 verschiedene SNARE- und mehr als 30 Rab-Proteine. Weiterhin wurden ca. 20 Proteine nachgewiesen, die an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligt sind, darunter die Komponenten des AP-2- und AP-3-Adapter-Komplexes, Dynamin, Synaptojanin, nicht aber Clathrin selbst.

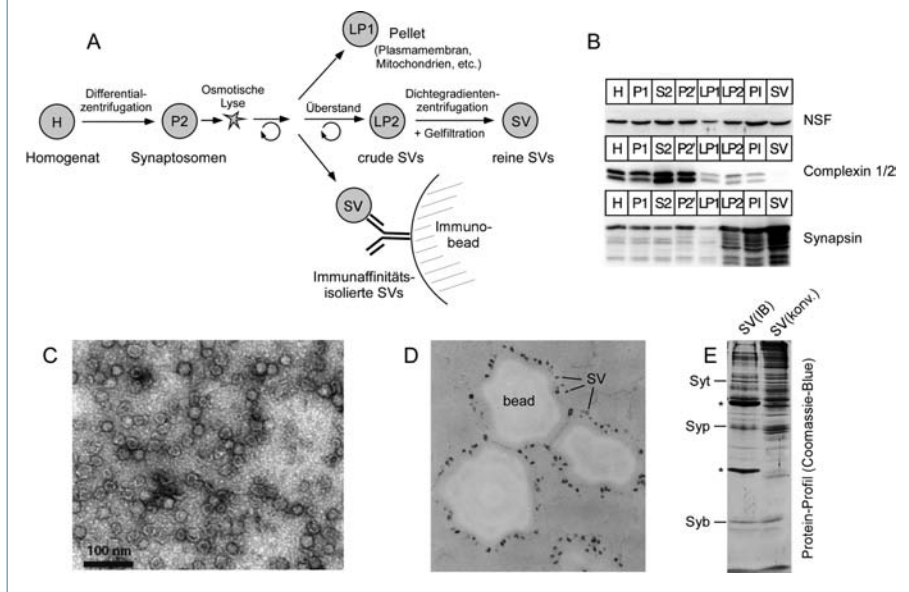
Wie ist diese Vielfalt zu erklären? Wie in **Abbildung 1** gezeigt, sind SV Bestandteil eines Membrankreislaufs, der nach der Exozytose über mehrere Zwischenschritte Exozytose-fähige SV regeneriert. Dieser Kreislauf wird durch Proteine gesteuert, die nur an bestimmten Schritten des Kreislaufs mit SVs interagieren. Dazu zählen Proteine, die an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligt sind, endosomale Proteine (z. B. EEA1),

sowie SNARE-aktivierende und -regenerierende Proteine (NSF, SNAPs, SM-Proteine). Offensichtlich enthält jede SV-Präparation Vesikel, die aus verschiedenen Stadien des Kreislaufs „herausgerissen“ wurden, sie repräsentiert also eine Mischpopulation mit teilweise unterschiedlichem Proteinbesatz. Schwieriger wird eine „biologische Erklärung“ bei Enzymen des Energie- und Intermediärmetabolismus, von denen mehr als 40 gefunden wurden. Möglicherweise sind diese Enzyme in Nervenenden mit SVs assoziiert, jedoch ist wenig wahrscheinlich, dass diese Proteine direkt in den Vesikelkreislauf involviert sind.

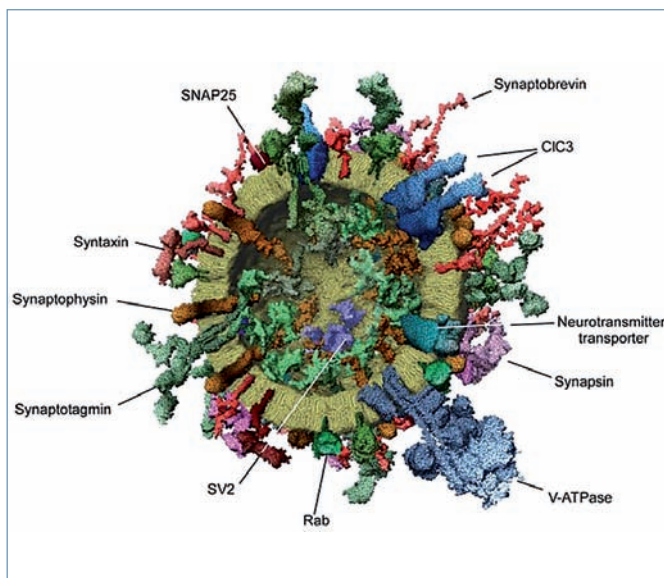
Das signal-to-noise-Dilemma bei der Analyse von Organellen-Proteomen

Die massenspektrometrische (MS) Proteomanalyse stellt derzeit die sensitivste Technik dar, um Proteine komplexer Proben wie Organellen zu erfassen. Für eine vollständige Proteomanalyse müssen die MS-basierten Verfahren eine hohe Trennschärfe und Empfindlichkeit besitzen, um sowohl häufige wie seltene Proteine nachzuweisen. So ist das häufigste SV-Protein, das SNARE Synaptobrevin (VAMP), in durchschnittlich 70 Kopien pro SV vorhanden (**Abb. 3**), während andere Proteine nur in sehr wenigen Kopien vorkommen bzw. nur an Subpopulationen von SVs auftreten. Letztere sind in der Probe unterrepräsentiert und werden nur „schwach“ im Massenspektrometer detektiert. Andererseits nimmt der Anteil von Proteinen, die Verunreinigungen darstellen und in der Organellenfraktion eigentlich nichts zu suchen haben, bei Erhöhung der Messempfindlichkeit überproportional zu. So enthält unser SV-Proteom mehr als 20 Ribosomen-assoziierte und mehr als ein Dutzend Proteasomen-Proteine. Wie kann man bei den erfassten Proteinen die Spreu vom Weizen trennen?

Ein klassisches, bereits von de Duve eingeführtes Kriterium ist die Parallel-Anreicherung von Proteinen mit spezifischen Markern während der Zellfraktionierung. In anderen Worten: Ein Protein, das mit einem Organell spezifisch assoziiert ist, sollte bei der Fraktionierung eine ähnliche Verteilung wie Organellen-spezifische Marker aufweisen. Aus diesem Grund haben wir die Verteilung von mehr als 80 Proteinen durch Immunoblot überprüft^[4] (**Abb. 2**). So konnten einige der in der MS-Analyse nachgewiesenen Membranproteine auf geringfügige Verunreinigungen durch Fremdmembranen zurückgeführt werden, darunter die Na/K-ATPase



▲ **Abb. 2:** A, Schematische Darstellung der Isolierungsverfahren für synaptische Vesikel (SV). B, Anreicherung von drei vesikel-assoziierten Proteinen: NSF, eine AAA+-ATPase, die die SNARE-Komplexe dissoziiert und sowohl im Zytoplasma wie an allen SNARE-haltigen Membranen residiert, Complexin, ein Regulatorprotein der Exozytose, das nicht auf SV vorkommt, und Synapsin I, ein SV-spezifisches Phosphoprotein. Analyse durch Immunoblot, jede Spur enthält gleich viel Protein, H ist Homogenat, P1 Pellet 1 (nicht in A), S2 Überstand 2 (nicht in A), P2 Synaptosomen (siehe A), LP1 Plasmamembranen (siehe A), LP2 crude SVs (siehe A), PI restliche Plasmamembranen, kleinere Mikrosomen (nicht in A) (Daten aus [4]). C, EM-Aufnahme konventionell gereinigter Vesikel. D, EM-Aufnahme immunisolierter Vesikel (SV) mit Eupergit C1Z-Beads (modifiziert nach [8]). E, Proteinprofil konventionell gereinigter (konv.) und immunisolierter Vesikel (IB) nach SDS-PAGE. Die Hauptproteine Synaptotagmin (Syt), Synaptophysin (Syp), und Synaptobrevin (Syb) sind als Banden sichtbar. * schwere und leichte Kette des zur Immunisolierung verwendeten monoklonalen Antikörpers^[8].

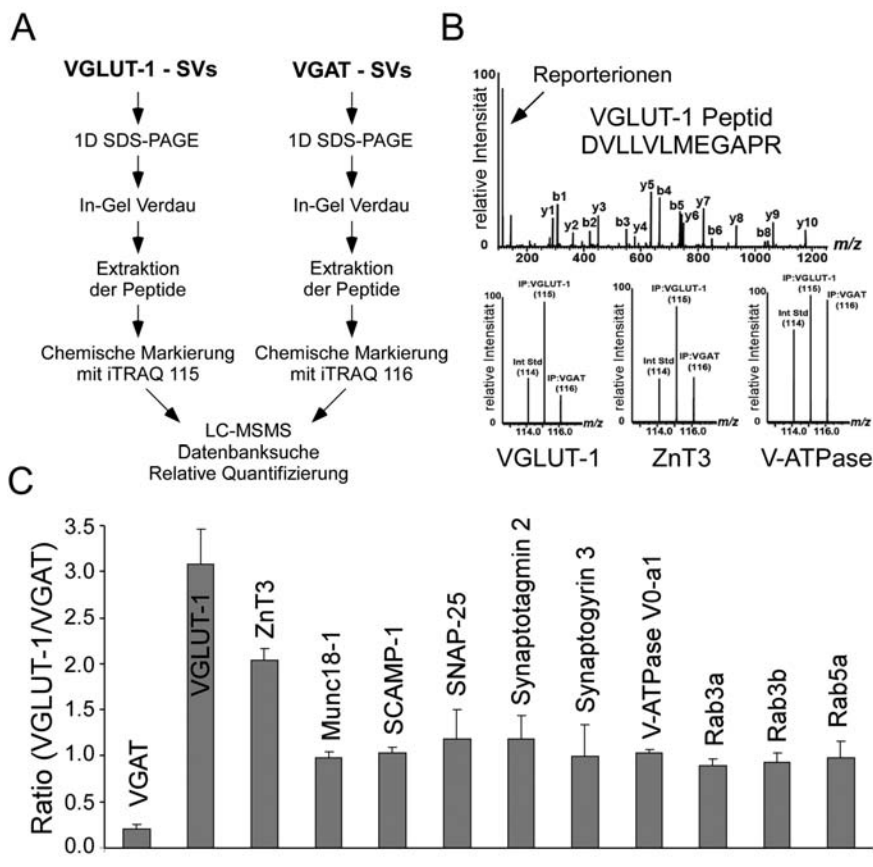


◀ **Abb. 3:** Quantitatives Molekularmodell eines durchschnittlichen synaptischen Vesikels^[4]. Das Modell zeigt SV-Hauptproteine, deren Menge gemessen oder abgeschätzt wurde und die insgesamt 2/3 der experimentell bestimmten Proteinmasse eines SV ausmachen. Die Proteine wurden, so weit möglich, auf der Basis existierender Strukturen oder Teilstrukturen modelliert.

sowie einige Membranproteine des endoplasmatischen Reticulums. Solche Ko-Fraktionierung (*gradient profiling*) ist kürzlich in einer systematischen Organell-Proteom-Studie als Kriterium benutzt worden, um Proteine spezifischen Organellen zuzuordnen^[5].

Schwieriger wird es bei der Interpretation des Verteilungsmusters von Proteinen, die eine weite Verbreitung auf intrazellulären

Membranen haben (z. B. Syntaxin) oder die einen löslichen Pool aufweisen (z. B. Glutamat-Decarboxylase und NSF). Idealerweise sollte daher die Lokalisation solcher Proteine sowohl durch licht- wie elektronenmikroskopische Immunlokalisation überprüft werden. Dies setzt jedoch für die Immunzytochemie geeignete Antikörper voraus, die für viele Proteine nicht verfügbar sind.



▲ **Abb. 4:** A Strategie zur MS-basierten quantitativen Analyse der spezifischen glutaminergen (VGLUT-1 – SVs) und GABAergen (VGAT) SV-Proteine mittels chemischer Markierung der entsprechenden Peptide mit stabilen Isotopen markierten Reagenzien (iTRAQ™ 115 und 116^[9]). Die zu vergleichenden SV-Proteine, die aus verschiedenen SV-Populationen hervorgegangen sind, werden elektrophoretisch in unterschiedlichen Bahnen eines 1D SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt. Proteine werden mit der Endoproteinase Trypsin im Gel hydrolysiert und die Peptide extrahiert. Extrahierte Peptide werden mit Reagenzien markiert, die eine unterschiedliche Anzahl von stabilen Isotopen (¹³C, ¹⁵N, ¹⁸O) besitzen, aber ansonsten chemisch exakt gleich sind (z. B. iTRAQ 115 und iTRAQ 116, Applied Biosystems^[9, 10]). Werden die so markierten Peptide, die aus den unterschiedlichen SV-Populationen hervorgegangen sind, nun wieder vereinigt, können sie aufgrund der unterschiedlichen Massen der stabilen Isotope im Massenspektrometer unterschieden werden. Das Größenverhältnis der Signale ein und desselben Peptides, welches mit iTRAQ 115 markiert ist und aus der IP mit anti-VGLUT-1 stammt, kann direkt mit dem entsprechenden Peptid, welches mit iTRAQ 116 markiert ist und aus der IP mit anti-VGAT stammt, verglichen werden und entspricht der jeweiligen Menge an Peptid und damit auch an Protein in den beiden Proben.

B, Beispiele für die massenspektrometrische Quantifizierung SV-spezifischer Proteine in verschiedenen Vesikelpopulationen. Oberes Panel: Fragmentationmassenspektrum eines Peptides des VGLUT-1-Transporters. Unteres Panel: Reporterionen zur Quantifizierung eines VGLUT-1-, ZnT3- und eines V-ATPase spezifischen Peptides in den unterschiedlichen Vesikelpopulationen (IP:VGLUT-1 und IP:VGAT). Die Signalintensität der Reporterionen ist ein direktes Maß für die Abundanz des Peptides/Proteins in den unterschiedlichen Vesikelpopulationen. **C,** Relative Quantitäten einzelner SV-spezifischer Proteine auf VGLUT-1 – und VGAT – SVs. Solche Proteine, die ein Verhältnis (VGLUT-1/VGAT) deutlich größer 1 zeigen, sind in erster Linie mit glutaminergen SVs assoziiert, während solche, die ein Verhältnis deutlich kleiner als 1 zeigen, mit GABAergen SVs assoziiert sind. Proteine im Verhältnis 1 sind gleichermaßen auf beiden Vesikelpopulationen vorhanden.

Mikroheterogenität und SV-Subpopulationen

Selbst die höchstgereinigte SV-Fraktion besteht aus einer Mischung von Organellen aus Milliarden von Neuronen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Es ist daher möglich, dass das SV-Proteom Proteine enthält, die ausschließlich oder überwiegend nur in spezialisierten Neuronen exprimiert werden. Weiterhin wissen wir nicht, wie homogen die

SV-Population eines einzelnen Neurons ist. So ist noch ungeklärt, ob Vesikelproteine stochastisch in Vesikel eingebaut werden, oder ob es einen *proof-reading*-Mechanismus gibt, der dafür sorgt, dass die Stöchiometrie einigermassen konstant bleibt. Letzteres ist zumindest für die V-ATPase wahrscheinlich, die essenziell als Energielieferant für die Neurotransmitter-Aufnahme ist, von der wir aber im Durchschnitt nur weniger als

zwei Kopien/Vesikel nachweisen konnten (**Abb. 4**)^[4].

Beispiele für spezifisch exprimierte SV-Proteine stellen die Transporter für Neurotransmitter dar, die den Transmitter-Phänotyp eines Neurons definieren. Inwieweit unterscheidet sich die Proteinzusammensetzung von beispielsweise glutamatergen und GABAergen Vesikeln? Mithilfe von Antikörpern, die spezifisch VGLUTs oder VGAT erkennen, ist es möglich, diese SV-Populationen relativ anzureichern (**Abb. 2a**). Eine erste Analyse durch Immunoblot ergab keine messbaren Unterschiede in der Verteilung von einem Dutzend SV-Proteinen^[6]. Um diese Frage grundsätzlich zu klären, wenden wir zurzeit die quantitative MS-Analyse der unterschiedlichen SV-Populationen nach chemischer Markierung mit stabilen Isotopenmarkierten Reagenzien an (**Abb. 4A, B**)^[7, 9]. Die Ergebnisse zeigen, dass nur wenige Proteine spezifisch mit z. B. VGLUT-Vesikeln assoziiert sind, darunter der Zn²⁺-Transporter: Die MS-Signalintensitäten der spezifischen Peptide des Zn²⁺-Transporters sind in den VGLUT-spezifischen SVs deutlich höher als in den entsprechenden VGAT-spezifischen Vesikeln (**Abb. 4B**). Auch wenn diese Untersuchungen noch nicht abgeschlossen sind, bestätigte sich, dass die meisten SV-Proteine auf glutamatergen und GABAergen Vesikeln ungefähr gleich häufig sind (**Abb. 4C**). Aus diesem Grund dürfte das in **Abbildung 3** gezeigte quantitative Modell eines SV zumindest für die wichtigsten exzitatorischen und inhibitorischen Transmitter repräsentativ sein.

Ausblick

Die hohe Empfindlichkeit und Trennschärfe der heute verfügbaren MS-Verfahren ist dabei, die biologische Forschung zu revolutionieren. Allerdings sind noch viele analytische Probleme zu lösen, und auch ein vollständiges Inventar der an einem Organell residierenden Proteine reicht nicht für ein funktionelles molekulares Verständnis aus. Auf der Seite der Massenspektrometrie müssen Verfahren entwickelt werden, einzelne Proteine quantitativ zu erfassen, z. B. unter Zuhilfenahme von gereinigten Standardproteinen oder Peptiden. Dagegen sind die Techniken zum relativen quantitativen Probenvergleich sehr weit entwickelt, wobei die Markierung mit stabilen Isotopen derzeit am weitesten verbreitet ist. Für den Zellbiologen entstehen dadurch eine Fülle von faszinierenden neuen Fragen und experimentellen Möglichkeiten.

So können Organellen-Proteome von transgenen Tieren miteinander quantitativ verglichen werden. Dagegen ist es schwieriger, Daten über die Mikroheterogenität einer Organellenpopulation zu erhalten. Verfahren sind erforderlich, die es erlauben, SV-Populationen aus verschiedenen Stadien des Vesikelkreislaufs zu isolieren oder Einzelvesikel-Analysen durchzuführen. Es gibt also noch viel zu tun. ■

Literatur

- [1] Ziv, N. E., Garner, C. C. (2004): Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly. *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 385–399.
- [2] Warnock, D. E., Fahy, E., Taylor, S. W. (2004): Identification of protein associations in organelles, using mass spectrometry-based proteomics. *Mass Spectrom. Rev.* 23: 259–280.
- [3] Morciano, M., Burre, J., Corvey, C., Karas, M., Zimmermann, H., Volkmandt, W. (2005): Immunolocalization of two synaptic vesicle pools from synaptosomes: a proteomics analysis. *J. Neurochem.* 95: 1732–1745.
- [4] Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S. A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J. S., de Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F., Jahn, R. (2006): Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127: 831–846.
- [5] Foster, L. J., de Hoog, C. L., Zhang, Y., Zhang, Y., Xie, X., Mootha, V. K., Mann, M. (2006): A mammalian organelle map by protein correlation profiling. *Cell* 125: 187–199.
- [6] Takamori, S., Riedel, D., Jahn, R. (2000): Immunolocalization of GABA-specific synaptic vesicles defines a functionally distinct subset of synaptic vesicles. *J. Neurosci.* 20: 4904–4911.

- [7] Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., Kuster, B. (2007): Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 389: 1017–1031.
- [8] Burger, P. M., Mehl, E., Cameron, P. L., Maycox, P. R., Baumert, M., Lottspeich, F., De Camilli, P., Jahn, R. (1989): Synaptic vesicles immunisolated from rat cerebral cortex contain high levels of glutamate. *Neuron* 3: 715–720.
- [9] Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlett-Jones, M., He, F., Jacobson, A., Pappin, D. J. (2004): Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell Proteomics* 3: 1154–1169.
- [10] Schmidt, C., Urlaub, H. (2009): iTRAQ-labelling of in-gel digested proteins for relative quantification. In: Reinders, J. (Hrsg.) *Proteomics for Methods in Molecular Biology*. Humana Press (im Druck).

Korrespondenzadressen:

Dr. Henning Urlaub
Dr. Mads Grønborg
Bioanalytische Massenspektrometrie
Max Planck Institut für biophysikalische Chemie
Am Fassberg 11
D-37077 Göttingen
Tel.: 0551-2011060
Fax: 0551-20111997
henning.urlaub@mpibpc.mpg.de

Prof. Dr. Reinhard Jahn
Abteilung Neurobiologie
Max Planck Institut für biophysikalische Chemie
Am Fassberg 11
D-37077 Göttingen
Tel.: 0551-201-1635
Fax: 0551-201-1639
rjahn@gwdg.de

AUTOREN



Henning Urlaub

1987–1993 Biochemie-Studium an der FU Berlin. 1993–1996 Doktorarbeit am MDC in Berlin bei Prof. Dr. Wittmann-Liebold; 1996 Promotion. 1997–2004 Postdoc in Marburg und Göttingen bei Prof. Dr. Lüthmann. Seit 2005 Gruppenleiter Bioanalytische Massenspektrometrie am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen. Seit 2004 Organisator (zusammen mit Prof. Dr. Marcus, MPC der Ruhr-Universität Bochum) der Summer School-Serie „Proteomic Basics“. Vorstandsmitglied der Deutschen Gesellschaft für Proteomforschung (DGPF).



Mads Grønborg

1995–2002 Master in molekularer Zellbiologie und Chemie an der Universität Southern Denmark in Odense. 2002–2006 Dissertation bei Prof. Dr. Pandey an der John-Hopkins University in Baltimore, USA. Seit 2006 Postdoc in der Abteilung Neurobiologie am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen.



Reinhard Jahn

1970–1976 Studium der Biologie und Chemie in Freiburg und Göttingen. 1981 Promotion in Göttingen bei Prof. Dr. Söling. 1981–1985 Postdoc in Göttingen, seit 1983 bei Prof. Dr. Greengard an der Rockefeller University, New York, USA. 1985–1986 Assistant Professor an der Rockefeller University. 1986–1991 Nachwuchsgruppenleiter am MPI für Psychiatrie in Martinsried. 1990 Habilitation für Biochemie an der LMU München. 1991–1997 Professor für Pharmakologie und Zellbiologie und Investigator am Howard Hughes Medical Institute, Yale University, New Haven, USA. Seit 1997 Direktor der Abteilung Neurobiologie am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen.