

# Bifunktionalisierte Fettsäuren zur Visualisierung und Identifizierung von Protein-Lipid-Interaktionen in lebenden Zellen\*\*

Per Haberkant,\* Reinout Raijmakers, Marjolein Wildwater, Timo Sachsenheimer, Britta Brügger, Kenji Maeda, Martin Houweling, Anne-Claude Gavin, Carsten Schultz, Gerrit van Meer, Albert J. R. Heck und Joost C. M. Holthuis

Zelluläre Prozesse beruhen auf einem aufeinander abgestimmten Zusammenspiel zahlreicher Biomoleküle, die wiederum auf einem komplexen Netzwerk molekularer Wechselwirkungen basieren. Zahlreiche Studien widmen sich der Aufklärung dieses zellulären Interaktionsnetzwerks, wobei sich die Mehrzahl auf die Identifizierung von Protein-Protein-, Protein-DNA- und Protein-Metabolit-Interaktionen beschränkt.<sup>[1,2]</sup> Zwei Drittel des zellulären Proteoms übt seine Funktion jedoch an oder in Zellmembranen aus, die aus Tausenden verschiedener Lipidspezies bestehen. Lipide fungieren nicht nur als Bausteine zellulärer Membranen und als wasserfreie Energiespeicher, sondern sind auch an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt. Veränderungen der Lipidhomöostase gehen häufig mit Krankheiten einher, die von neurodegenerativen Störungen bis hin zum Metabolischen Syndrom und zu Krebs reichen.<sup>[3,4]</sup> Obwohl diese Erkenntnisse für ein komplexes Zusammenspiel zwischen Proteinen und Lipiden sprechen, wurden bislang nur wenige Studien mit der Zielsetzung durchgeführt, systematisch Protein-Lipid-Interaktionen zu charakterisieren.

Mit dem Ziel einer systematischen Katalogisierung der Protein-Lipid-Interaktionen in *Saccharomyces cerevisiae* verwendeten Gallego et al. tandemaffinitäts-gereinigte Proteine und untersuchten deren Interaktion mit Lipiden mithilfe miniaturisierter Lipid-Chips, bei denen Lipide auf einem Nitrocellulose-Träger aufgebracht waren. Dies führte zu einem neuen Konzept, demzufolge die Pleckstrin-Homologie-domänen nicht eine, sondern zwei Bindungsspezifitäten aufweisen können und möglicherweise als Sensoren für be-

stimmte Lipidklassen oder -kombinationen fungieren.<sup>[5]</sup> In anderen Studien wurden radioaktiv markierte, photoaktivierbare Lipide verwendet, um individuelle Protein-Lipid-Interaktionen in lebenden Zellen zu untersuchen.<sup>[6,7]</sup> Auf diese Weise wurde vor kurzem z. B. die spezifische Interaktion des Membranproteins p24 mit einer einzelnen Sphingomyelinspezies gefunden, bei der das Lipid als Cofaktor bei der Biogenese von Coat-Protein-I (COPI)-Vesikeln wirkt.<sup>[8]</sup> Andere Studien beschreiben die Anwendung von Phospholipid-basierten, so genannten aktivitätsabhängigen Sonden zur Charakterisierung von Protein-Lipid-Interaktionen mithilfe synthetischer Analoga von Phosphatidylcholin- oder Phosphatidylinositolpolyphosphaten.<sup>[9–11]</sup> Zusätzlich zu einer photoaktivierbaren Gruppe für die kovalente Vernetzung mit ihren Interaktionspartnern weisen diese Sonden noch eine zweite funktionelle Gruppe auf. Durch nachfolgende Klick-Reaktionen gelang so die Anreicherung der vernetzten Proteine sowie deren massenspektrometrische Detektion. Die bisher beschriebenen bifunktionalisierten Phospholipidderivate haben den Nachteil, dass ihre Anwendung auf Zellsysteme beschränkt ist und sie somit keine systematische Analyse von Protein-Lipid-Interaktionen im Zellsystem ermöglichen.

Für eine globale Analyse von Protein-Lipid-Interaktionen in lebenden Zellen haben wir nun eine 15 Kohlenstoffatome lange, photoaktivierbare und für Klick-Reaktionen geeignete („klickbare“) Fettsäure, pacFA, synthetisiert (Abbildung 1 a). Im ersten Schritt wurde die zweifach geschützte Keto-Fettsäure **3** in einer Grignard-Reaktion aus dem Tri-


[\*] Dr. P. Haberkant, Dr. K. Maeda, Dr. A.-C. Gavin, Priv.-Doz. Dr. C. Schultz  
European Molecular Biology Laboratory  
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)  
E-Mail: per.haberkant@embl.de

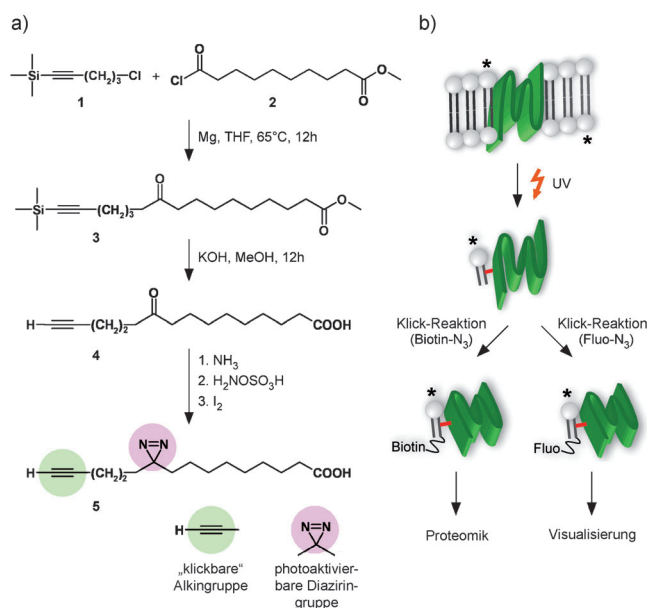
Dr. P. Haberkant, Dr. R. Raijmakers, Dr. M. Wildwater, Prof. G. van Meer, Prof. A. J. R. Heck, Prof. J. C. M. Holthuis  
Membrane Biochemistry & Biophysics, Biomolecular Mass Spectrometry & Proteomics Group, Developmental Biology, Bijvoet Center for Biomolecular Research, Utrecht University  
3584 CH Utrecht (Niederlande)

Prof. J. C. M. Holthuis  
Molekulare Zellbiologie, Universität Osnabrück (Deutschland)  
T. Sachsenheimer, Priv.-Doz. Dr. B. Brügger  
Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg (Deutschland)

Dr. M. Houweling  
Department of Biochemistry and Cell Biology  
Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht (Niederlande)

[\*\*] Wir danken für die Unterstützung: dem EMBL-Interdisciplinary Postdoc(EIPOD)-Stipendium cofinanziert durch Marie-Curie-COFUND (P.I.), dem Netherlands Proteomics Center (NPC) als Teil der Netherlands Genomics Initiative für die Unterstützung in Form eines NPC Valorization Vouchers (P.H.), dem 7. FP Marie-Curie ITN „SPHINGONET“ der Europäischen Union (C.S., A.J.R.H., J.C.M.H.) und dem TRR83 der DFG (B.B., C.S.). K.M. war Stipendiat des Danish Natural Science Research Council (09-064986/FNU). Wir danken Y. Horibata, H. Sugimoto und S. Cockcroft für Plasmide, Cees Versluis für hochaufgelöste Massenspektren sowie Hedwich Vlieg, Harmen Dijkstra und Thomas Klimeck für technische Unterstützung.

 Hintergrundinformationen (experimentelle Daten) zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201210178> zu finden.



**Abbildung 1.** a) Synthese der bifunktionalisierten Fettsäure pacFA (5). b) In-vivo-Screening zellulärer Protein-Lipid-Interaktionen. Die den Zellen verabreichte pacFA wird metabolisiert und in ein bifunktionalisiertes Lipid eingebaut (hier durch einen Stern markiert). Dieses kann mit seinem Proteinbindungspartner (grün) durch UV-Licht vernetzt werden. Durch eine Klick-Reaktion kann die terminale  $\text{C}\equiv\text{C}$ -Bindung im bifunktionalisierten Lipid mit Biotin- $\text{N}_3$  oder einem azidhaltigen Fluorophor (Fluo- $\text{N}_3$ ) markiert werden. Dies ermöglicht die Identifizierung bzw. Visualisierung des vernetzten Protein-Lipid-Komplexes.

methylsilyl(TMS)-geschützten Alkin **1** mit dem Säurechlorid **2** erhalten. In einem zweiten Schritt wurden gleichzeitig der Ester sowie die TMS-Gruppe unter alkalischen Bedingungen gespalten ( $\rightarrow$ 4). Die Umsetzung der Ketogruppe in die photoaktivierbare Diazirinegruppe erfolgte wie zuvor beschrieben<sup>[6]</sup> und lieferte pacFA (**5**).

Zum In-vivo-Screening von Protein-Lipid-Interaktionen wurden Zellen mit pacFA als Vorstufenmolekül für die Biosynthese bifunktionalisierter Phosphoglycerolipide gefüttert. Diejenigen Proteine, die sich in direktem Kontakt mit bifunktionalisierten Lipiden befanden, wurden anschließend durch Bestrahlung der Diazirinegruppe mit UV-Licht vernetzt (Abbildung 1b). Bei der UV-Bestrahlung entstand ein hochreaktives Intermediat, das im Nanosekundenbereich eine kovalente Bindung mit Molekülen in seiner unmittelbaren Umgebung einging.<sup>[12]</sup> Mithilfe von Klick-Reaktionen wurde danach das Alkin mit einem Reportermolekül versehen, was die Visualisierung bzw. Affinitätsreinigung von vernetzten Produkten ermöglichte. Diese zweistufige Prozedur hat den Vorteil, dass die Markierung des bifunktionalisierten Lipids erst erfolgt, nachdem die Interaktion durch UV-Vernetzung fixiert wurde und so das relativ große Reportermolekül die Protein-Lipid-Interaktion nicht beeinflusst.

Als Nachweis, dass Proteine auf diese Weise markiert werden können, wurde pacFA mit dem fettsäurebindenden Protein Rinderserumalbumin (BSA) inkubiert und mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurde die Lösung in einer Klick-Reaktion mit Biotinazid umgesetzt und mittels Western Blot analysiert. Die Markierung von BSA mit Biotin erfolgte

ausschließlich nach UV-Bestrahlung und in Gegenwart von pacFA (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen (SI)). Das Biotinylieren von BSA war dabei abhängig von  $\text{CuSO}_4$  und dem Reduktionsmittel Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP), zwei essenziellen Komponenten der Klick-Reaktion. Keine Photoaffinitätsmarkierung wurde beobachtet, wenn BSA durch das nicht lipidbindende Protein Lysozym ersetzt wurde. Folglich resultierte die UV-lichtabhängige Markierung von BSA durch eine spezifische Interaktion des Proteins mit pacFA.

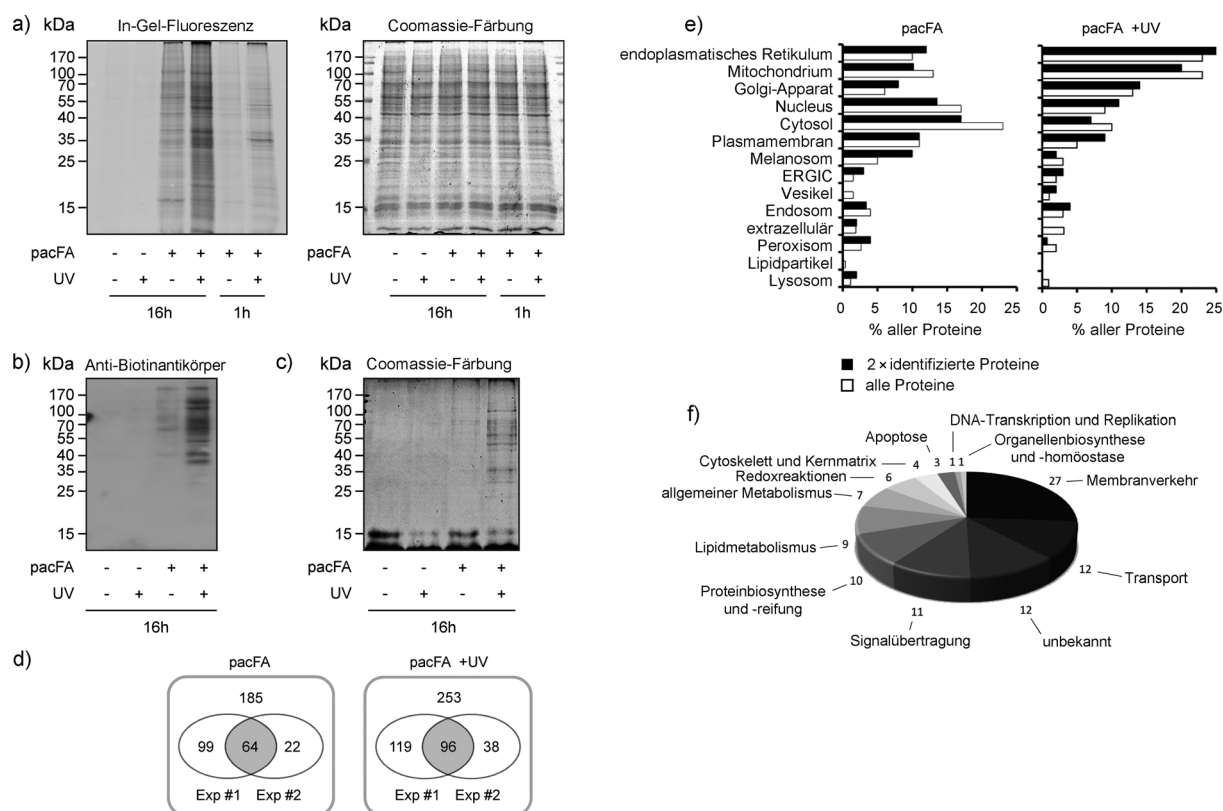
Um zu überprüfen, ob pacFA ein geeignetes Vorstufenmolekül der Biosynthese von Phospholipiden ist, wurden Chinese-Hamster-Ovary (CHO)- sowie humane HeLa-Zellen 16 h mit pacFA markiert und ihre Lipidzell-extrakte auf die Gegenwart von bifunktionalisierten Phosphatidylcholin (PC)-Spezies mithilfe von Nano-Elektrospray-Ionisierungs-Tandem-Massenspektrometrie (nano-ESI-MS/MS) untersucht. Bei der Markierung von CHO-Zellen mit pacFA konnten neue Signale nachgewiesen werden, die eine 8 Da höhere Masse als endogene PC-Spezies aufwiesen. Diese Massendifferenz entspricht der Differenz der Molekulargewichte von pacFA ( $264\text{ g mol}^{-1}$ ) und seinem natürlichen Analogon, der Palmitinsäure ( $256\text{ g mol}^{-1}$ ; Abbildung S2 (SI)). Mehrfache Vorstufenionenscans (MPIS) der Lipidextrakte von pacFA-markierten HeLa-Zellen für das charakteristische pacFA-Ion ( $[\text{M-H}]^-$ ,  $m/z$  263) zeigten das Auftreten verschiedener pacFA enthaltender PC-Spezies (Abbildung S3a (SI)). Ebenso wurde der Einbau von pacFA in Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylglycerin (PG) und Cardiolipin (CL) nachgewiesen (Abbildung S3b und S4 (SI)).

Zur Untersuchung des Metabolismus von pacFA wurden pacFA-markierte HeLa-Zellen in einer Klick-Reaktion mit 3-Azido-7-hydroxycumarin umgesetzt und anschließend dünn-schichtchromatographisch analysiert, wie für Alkin-markierte Lipide beschrieben.<sup>[13]</sup> Innerhalb einer Stunde wurde der Hauptanteil an pacFA ( $> 95\%$ ) in Diacylglycerin (DAG; 16%), Triacylglycerin/Cholesterinester (TAG/CE; 17%) und Phospholipide (49%; Abbildung S5 (SI)) eingebaut. Längere Inkubationszeiten von 16 h oder das Markieren mit einer klickbaren Palmitinsäure (cFA) ergaben eine sehr ähnliche Verteilung dieser alkinhaltigen Lipide. Folglich wird pacFA ohne weiteres in eine Vielzahl von bifunktionalisierten Lipiden umgesetzt, die alle Hauptklassen der Phosphoglycerolipide umfassen. Obwohl die Palmitinsäure ein Substrat der Serin-Palmitoyl-Transferase sowie der Ceramid-Synthase ist und zur Biosynthese von Sphinganin bzw. Ceramid verwendet wird, konnten wir keinen Einbau von pacFA in Sphingolipide beobachten. Da beide Enzyme hochspezifisch für Acyl-Kettenlängen sind,<sup>[14–16]</sup> kann die Einführung der Diazirinegruppe und des Alkins durchaus die Erkennung von pacFA als Substrat bei der Sphingolipidbiosynthese verhindern.

Als nächstes wurde die Anwendung von pacFA für den Nachweis von Protein-Lipid-Interaktionen in lebenden Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden CHO-Zellen 1 oder 16 h gefüttert, mit UV-Licht bestrahlt und anschließend lysiert. Die Zellmembranen wurden vom Cytosol getrennt und einer Klick-Reaktion mit Alexa-488-Azid unterzogen. Die mit Alexa markierten Proteine wurden durch

SDS-PAGE und In-Gel-Fluoreszenz analysiert. Wie in Abbildung S6 (SI) gezeigt, wurde ein Teil der Membranproteine in pacFA-gefütterten und UV-bestrahlten Zellen fluoreszenzmarkiert, wogegen cytosolische Proteine nahezu frei von Markierung waren. Ohne UV-Licht wurde ebenfalls ein Teil der Membranproteine fluoreszenzmarkiert; dies wurde jedoch nur in den 16 h lang gefütterten Zellen beobachtet (Abbildung 2a). In Abwesenheit von pacFA ließen sich keine Markierungen nachweisen. Folglich erhalten in den 16 h lang mit pacFA kultivierten Zellen einige Proteine eine Fluoreszenzmarkierung, die unabhängig von der photoinduzierten Vernetzung ist. Da ein kleiner Teil der zellulären Proteine durch Palmitoylierung modifiziert ist, könnte diese Fluoreszenzmarkierung in nicht UV-bestrahlten Zellen auf den metabolischen Einbau von pacFA zurückzuführen sein. Einhergehend mit dieser Beobachtung wurde ebenfalls eine UV-Licht-unabhängige Markierung in cFA-markierten Zellen festgestellt (Abbildung S7 (SI)).<sup>[17]</sup> Zur Analyse wurden Membranfraktionen von pacFA-markierten, nicht UV-bestrahlten CHO-Zellen in einer Klick-Reaktion mit Biotinazid umgesetzt. Als Kontrolle fungierten Klick-Reaktionen mit

Membranfraktionen von Zellen, die in Abwesenheit von pacFA kultiviert wurden. Biotinylierte Proteine wurden einerseits mithilfe eines Western Blots analysiert und andererseits nach ihrer Anreicherung mit Neutravidin-Trägerpartikeln durch SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 2b,c), einem In-Gel-Verdau unterzogen und massenspektrometrisch identifiziert (für Kriterien zur Identifizierung vernetzter Produkte siehe SI). Zwei unabhängige Experimente führten zur Identifizierung von insgesamt 185 Proteinen, die ausschließlich in pacFA-gefütterten und nicht UV-bestrahlten Zellen identifiziert wurden. 64 dieser Proteine wurden zweimal identifiziert (Abbildung 2d, Tabelle S2 (SI)). Ca. 6.5 % (12 von 185) sind bekannte palmitoylierte Proteine, wogegen 26 % (48 von 185) in einem vor kurzem veröffentlichten Screening zur Identifizierung palmitoylierter Proteine nachgewiesen wurden.<sup>[18]</sup> Darüber hinaus wurde für ca. die Hälfte der 185 Proteine eine für palmitoylierte Proteine charakteristische Lokalisation gefunden (Cytoplasma, Kern, Plasmamembran; Abbildung 2e).<sup>[19]</sup> Zusammengefasst lassen diese Befunde darauf schließen, dass die Affinitätsreinigung von nicht UV-bestrahlten und pacFA-markierten Zellen zu einer



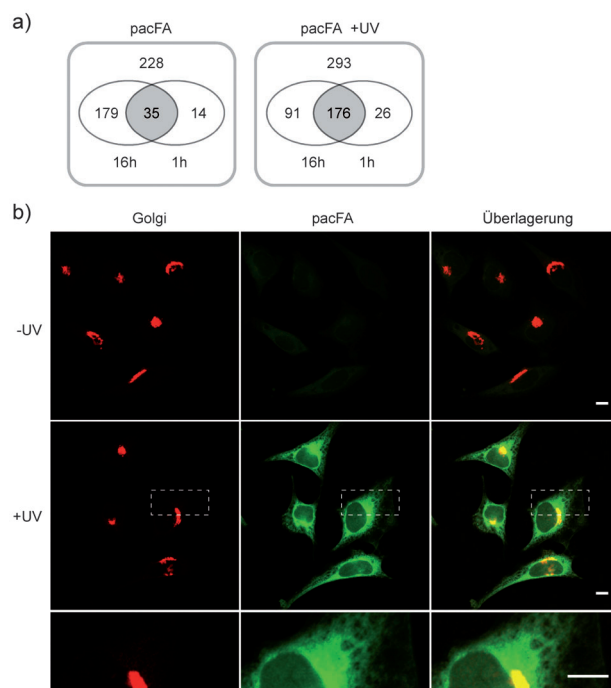
**Abbildung 2.** Identifizierung proteomweiter Protein-Lipid-Interaktionen in pacFA-markierten CHO-Zellen. a) CHO-Zellen wurden 1 bzw. 16 h mit oder ohne pacFA kultiviert und anschließend, wie angegeben, mit UV-Licht bestrahlt. Zellmembranen wurden isoliert, einer Klick-Reaktion mit Alexa-488-Azid unterzogen, durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch In-Gel-Fluoreszenz (links) oder durch Färbung mit Coomassie (rechts) analysiert. b) CHO-Zellmembranen wurden wie unter (a) beschrieben einer Klick-Reaktion mit Biotinazid unterzogen und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Western-Blot-Analyse erfolgte mit einem gegen Biotin gerichteten Antikörper. c) Biotinylierte Protein-Lipid-Komplexe wurden mithilfe von Neutravidin-Trägerpartikeln gereinigt und nach SDS-PAGE durch Coomassie-Färbung visualisiert. Die prominente Bande bei ca. 15 kDa entspricht den monomeren Untereinheiten von Neutravidin. d) MS-Identifizierung affinitätsgereinigter Proteine von mit pacFA kultivierten CHO-Zellen vor (links) sowie nach UV-Bestrahlung (rechts). Dargestellt ist die Zahl der Proteine, die in zwei unabhängigen Experimenten identifiziert wurden. e) Subzelluläre Verteilung der in (d) identifizierten Proteine. f) Verteilung der Funktionen von Proteinen, die nach Kultivierung mit pacFA und UV-Bestrahlung bei zwei unabhängigen Experimenten nachgewiesen wurden.

Anreicherung palmitoylierter Proteine führt und dass pacFA in palmitoylierte Proteine eingebaut wird.

Zur Identifizierung der mit bifunktionalisierten Lipiden vernetzten Proteine wurden Zellmembranen von pacFA-gefütterten und UV-bestrahlten CHO-Zellen mit Biotinazid umgesetzt, die Proteine mithilfe von Neutravidin-Trägerpartikeln angereichert und massenspektrometrisch analysiert. Nicht UV-bestrahlte pacFA-gefütterte Zellen fungierten als Kontrolle, um die mit Lipiden vernetzten Proteine von palmitoylierten Proteinen zu unterscheiden. Zwei unabhängige Experimente führten zur Identifizierung von 253 Proteinen. Diese wurden ausschließlich in den affinitätsgereinigten Fraktionen von pacFA-gefütterten und mit UV-Licht bestrahlten Zellen identifiziert oder lagen dort stark angereichert vor. Nahezu 40 % der vernetzten Proteine (96 von 253) wurden zweimal identifiziert (Abbildung 2d; Tabelle S3 (SI)). Im Unterschied zu den affinitätsgereinigten Proteinen von unbestrahlten Zellen wies die Mehrzahl der aus UV-bestrahlten Zellen identifizierten und somit lipidvernetzten Proteine eine Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum (ER) oder in den Mitochondrien auf (Abbildung 2e). Diese sind an einer Reihe von zellulären Prozessen beteiligt, die den Lipidmetabolismus, die Proteinbiosynthese, den Membranverkehr, den Transport sowie die Signalübertragung beinhalten (Abbildung 2 f).

Für die weitere Validierung dieser Befunde wurden lipidverknüpfte Proteine aus mit pacFA inkubierten und mit UV-bestrahlten HeLa-Zellen identifiziert (Abbildung S8 (SI)). Dabei wurden die Zellen vor der UV-Bestrahlung 16 oder 1 h in Gegenwart von pacFA kultiviert. Wie oben beschrieben, fungierten nicht bestrahlte Zellen als Kontrolle zur Unterscheidung zwischen lipidvernetzten und palmitoylierten Proteinen. Wie in Abbildung 3a gezeigt, nahm die Zahl potenzieller palmitoylierter Proteine, die in nicht UV-bestrahlten Zellen identifiziert wurden, um mehr als das Vierfache ab, wenn die Kultivierung mit pacFA von 16 auf eine 1 h verkürzt wurde (von 214 auf 49; Tabelle S4 (SI)). Im Unterschied dazu war die Zahl der identifizierten vernetzten Proteine weitgehend unabhängig davon, ob Zellen 1 oder 16 h mit pacFA kultiviert wurden (267 bzw. 202; Abbildung 3a und Tabelle S5 (SI)). Der Großteil dieser Proteine wurde zweimal identifiziert (176 von insgesamt 293). Dies ist in Einklang mit der Beobachtung, dass die Markierung von Zellen mit pacFA nach 1 oder 16 h eine ähnliche Verteilung bifunktionalisierter Lipide ergab (Abbildung S5 (SI)). Zudem wiesen identifizierte Protein-Lipid-Komplexe in HeLa-Zellen eine wesentliche Übereinstimmung mit denen in CHO-Zellen auf.

Insgesamt wurden 105 Orthologe der 253 in CHO-Zellen identifizierten Protein-Lipid-Komplexe gefunden (42 %; Abbildung S8c (SI)). Tabelle S1 (SI) zeigt 99 mit höchster Konfidenz identifizierte Proteine, die in beiden Zelltypen nachgewiesen und in mindestens drei der vier Screenings identifiziert wurden. Etwa die Hälfte dieser Proteine wies eine ER-Lokalisierung auf, während nahezu 20 % mitochondriale Proteine sind. Für 10 % der Proteine wurde eine direkte Interaktion mit Fettsäuren oder deren Stoffwechselprodukten als primäre Funktion beschrieben. Es handelt sich dabei um Proteine, denen bei der Aufnahme von Fettsäuren



**Abbildung 3.** Visualisierung von Protein-Lipid-Interaktionen in pacFA-kultivierten HeLa-Zellen. a) MS-Identifizierung von mit Neutravidin-Trägerpartikeln affinitätsgereinigten Proteinen vor (links) und nach (rechts) UV-Bestrahlung. Dargestellt ist die Zahl der Proteine, die in zwei unabhängigen Experimenten identifiziert wurden. Dabei wurden die Zellen 1 und 16 h mit pacFA kultiviert. b) HeLa-Zellen mit stabiler Expression von RFP-markierter Mannosidase-II (Golgi-Marker, rot) wurden 1 h mit pacFA inkubiert und anschließend UV-bestrahlt. Zellen wurden in Methanol fixiert, mit Chloroform/Methanol/Essigsäure (10:44:0.75) extrahiert, einer Klick-Reaktion mit Alexa-488-Azid unterzogen und mit Fluoreszenzspektroskopie abgebildet. Unterste Reihe: Vergrößerung der Regionen wie in der Mitte markiert. Maßstab 10 µm.

oder ihrem Abbau in den Mitochondrien (CPT2, ECHA), bei der Phospholipidbiosynthese (CDIPT), ihrem Transport (PITPB, STARD7) oder ihrem Umsatz (ABHD6) eine Rolle zugeschrieben wird. Darunter befinden sich ebenfalls Proteine, die an der Acylierung von Proteinen im ER (PIGS, GPI8) beteiligt sind oder die Sphingolipidhomöostase im ER kontrollieren (ORML2, SGPL1).

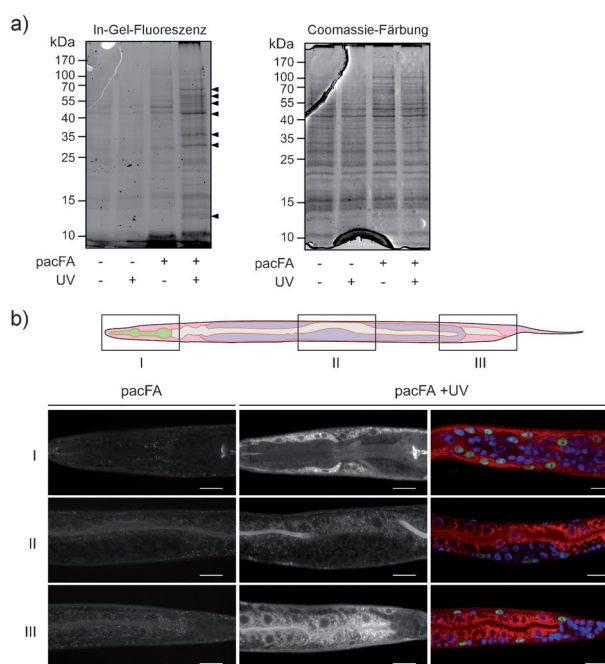
Von den mit hoher Zuverlässigkeit identifizierten lipidvernetzten Proteinen sind die beiden cytosolischen Phospholipidtransferproteine PITPB und STARD7 von besonderem Interesse. Um in Kontakt mit der photoaktivierbaren Gruppe zu gelangen, müssen diese Proteine in den hydrophoben Kern der Membran eintauchen oder ein bifunktionalisiertes Lipid aus dieser extrahieren. Während die genaue zelluläre Funktion von PITPB und STARD7 ungeklärt ist, weisen beide Proteine eine spezifische Phospholipidbindungsstelle auf und vermitteln bei In-vitro-Experimenten den monomeren Transfer bestimmter Phospholipide zwischen Membranen.<sup>[20–22]</sup> Für weitere Einblicke in die Interaktion dieser beiden Proteine mit bifunktionalisierten Lipiden wurden die in *E. coli* produzierten rekombinanten Proteine mit Liposomen aus Lipidextrakten von HeLa-Zellen, die 16 h mit pacFA gefütterten wurden, inkubiert. Nicht an Protein



gebundene Lipide wurden durch Größenausschlusschromatographie abgetrennt und die durch PITPB und STARD7 gebundenen Lipide dünnschichtchromatographisch und massenspektrometrisch identifiziert. In Einklang mit der bekannten Lipid-Bindungsspezifität konnte für PITPB eine Interaktion mit pacPC und pacPI gezeigt werden, wogegen STARD7 ausschließlich mit pacPC interagierte (Abbildungen S9 und S10 (SI)). Die proteingebundenen Lipidfraktionen waren frei von pacFA und anderen bifunktionalisierten Lipiden. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass pacFA sich als Hilfsmittel für die Identifizierung von Protein-Lipid-Interaktionen in lebenden Zellen eignet.

Um zu testen, ob pacFA zur Visualisierung zellulärer, in situ vorliegender Protein-Lipid-Interaktionen herangezogen werden kann, wurden HeLa-Zellen 1 h mit pacFA kultiviert und anschließend mit UV-Licht bestrahlt. Nicht mit pacFA kultivierte sowie unbestrahlte Zellen fungierten als Kontrolle (Abbildungen 3b und S11 (SI)). Anschließend wurden Zellen mit  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem Methanol fixiert, um zelluläre Proteine zu präzipitieren. Nicht mit Proteinen vernetzte Lipide wurden mithilfe von Chloroform extrahiert. Nach anschließender Klick-Reaktion mit Alexa-488-Azid wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Um den Einbau von pacFA in palmitoylierte Proteine zu minimieren, wurde die Kultivierung mit pacFA auf 1 h beschränkt. Wie in Abbildung 3b gezeigt, wiesen die mit pacFA gefütterten und UV-bestrahlten Zellen eine prominente netzförmige Fluoreszenzmarkierung des Zellplasmas auf, die eine ER-ähnliche Struktur aufwies. Diese Färbung schloss die Kernhülle mit ein und war bei nicht pacFA-kultivierten Zellen sowie ohne UV-Bestrahlung nicht zu sehen. Dies ist in Einklang mit unserer Beobachtung, dass nahezu die Hälfte der 99 mit hoher Konfidenz identifizierten Proteine eine ER-Lokalisation aufweist (Tabelle S1 (SI)).

Als Nächstes untersuchten wir, ob pacFA sich für die Analyse von Protein-Lipid-Interaktionen im multizellulären Organismus *C. elegans* eignet. Hierzu wurden L2-Larven bei  $20^{\circ}\text{C}$  mit pacFA inkubiert und anschließend UV-bestrahlt. Gesamtllysate wurden in einer Klick-Reaktion mit Alexa-488-Azid umgesetzt und fluoreszenzmarkierte Proteine nach SDS-PAGE durch In-Gel-Fluoreszenz dargestellt (Abbildung 4a). Für die Mehrzahl der Proteine konnte in Abwesenheit von pacFA oder ohne UV-Bestrahlung keine Fluoreszenzmarkierung beobachtet werden. Um Protein-Lipid-Interaktionen im gesamten Organismus zu visualisieren, wurden pacFA-gefütterte und UV-bestrahlte L2-Larven in Methanol und Aceton fixiert. Nicht vernetzte Lipide wurden wie oben beschrieben extrahiert und Protein-Lipid-Komplexe durch Klick-Reaktion mit Alexa-488-Azid markiert. Wie in Abbildung 4b gezeigt, wiesen mit pacFA gefütterte Larven eine helle und UV-Licht-abhängige Fluoreszenzmarkierung auf. Diese war nicht einheitlich und besonders ausgeprägt in den intestinalen Epithelzellen sowie in den Muskelzellen des Rachens (Pharynx). Beide Zelltypen wiesen eine netzartige Struktur im Cytoplasma auf, die ähnlich den mit pacFA inkubierten und mit UV-Licht bestrahlten HeLa-Zellen auf eine ER-Färbung schließen lässt. Dies ist in Einklang mit unserer Beobachtung, dass der Hauptteil der identifizierten vernetzten Proteine eine ER-Lokalisation aufweist (Abbil-



**Abbildung 4.** Visualisierung von Protein-Lipid-Interaktionen in pacFA-gefütterten *C. elegans*-Larven. a) Wildtyp-L2-Larven wurden, wie angegeben, mit pacFA gefüttert und UV-bestrahlt. Gesamtmembranen wurden isoliert und einer Klick-Reaktion mit Alexa-488-Azid unterzogen und nach SDS-PAGE mithilfe von In-Gel-Fluoreszenz (links) oder nach Coomassie-Färbung (rechts) analysiert. b) *C. elegans* mit GFP-markiertem muskelspezifischem Transkriptionsfaktor wurde mit pacFA gefüttert und UV-bestrahlt. Larven wurden in Methanol und Aceton fixiert, mit Chloroform/Methanol/Essigsäure (10:44:0.75) extrahiert, einer Klick-Reaktion mit Alexa-594-Azid unterzogen, mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gefärbt und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Bilder wurden von Kopf- (I), Mittel- (II) sowie Schwanzregionen (III) aufgenommen. Die linke Spalte sowie die Mitte zeigen Alexa-488-Fluoreszenz, wogegen die rechte Spalte die Überlagerung von Alexa-594-, DAPI- und GFP-Fluoreszenz zeigen. Maßstab 10  $\mu\text{m}$ .

dung 2e). Eine schwächere Färbung wurde in der Hypodermis beobachtet, wogegen die Gonaden weitestgehend unmarkiert blieben. In unbestrahlten Larven konnte keine derartige Markierung beobachtet werden. Der genaue Grund für die gewebeabhängige Markierung ist unklar. Es sei in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, dass intestinale Epithelzellen sowie Muskelzellen im Allgemeinen eine höhere Aktivität der Fettsäureaufnahme aufweisen.<sup>[23,24]</sup>

Zusammengefasst haben wir eine bifunktionalisierte Fettsäure, pacFA, als neues Hilfsmittel zur proteomweiten Analyse von Protein-Lipid-Interaktionen in lebenden Zellen hergestellt. Die Methode kombiniert die Vorzüge der literaturbekannten photoaktivierbaren und radioaktiven Lipidvorstufenmoleküle mit denen der Klick-Chemie und vermeidet dabei die mit der Radioaktivität verbundenen Nachteile. Gleichzeitig werden neue Möglichkeiten für bildgebende Screening-Verfahren geschaffen, die es ermöglichen, die Funktion von Lipiden in deren natürlicher Umgebung zu studieren. Neben den Phosphoglycerolipiden bilden Cholesterin sowie Sphingolipide zwei weitere Lipidhauptklassen biologischer Membranen. Um auch deren Interaktionen mit

Proteinen systematisch zu erfassen, entwickeln wir derzeit bifunktionalisierte Vorstufenmoleküle für die Sterol- und Sphingolipid-Biosynthese. Wir zeigen, dass die Anwendung von pacFA vom Zellkultursystem auf *C. elegans* übertragen werden kann und somit einen Ausgangspunkt zur systematischen Untersuchung von Protein-Lipid-Interaktionen in der Tierphysiologie und -entwicklung schafft.

Eingegangen am 20. Dezember 2012

Online veröffentlicht am 28. Februar 2013

**Stichwörter:** Klick-Chemie · Lipide · Photoaffinitätsmarkierung · Proteine · Zell-Imaging

- [1] A. C. Gavin, P. Aloy, P. Grandi, R. Krause, M. Boesche, M. Marzioch, C. Rau, L. J. Jensen, S. Bastuck, B. Dumpelfeld, A. Edelmann, M. A. Heurtier, V. Hoffman, C. Hoefert, K. Klein, M. Hudak, A. M. Michon, M. Schelder, M. Schirle, M. Remor, T. Rudi, S. Hooper, A. Bauer, T. Bouwmeester, G. Casari, G. Drewes, G. Neubauer, J. M. Rick, B. Kuster, P. Bork, R. B. Russell, G. Superti-Furga, *Nature* **2006**, *440*, 631.
- [2] X. Li, T. A. Gianoulis, K. Y. Yip, M. Gerstein, M. Snyder, *Cell* **2010**, *143*, 639.
- [3] M. P. Wymann, R. Schreiner, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 162.
- [4] Y. A. Hannun, L. M. Obeid, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 139.
- [5] O. Gallego, M. J. Betts, J. Gvozdenovic-Jeremic, K. Maeda, C. Matetzki, C. Aguilar-Gurreri, P. Beltran-Alvarez, S. Bonn, C. Fernandez-Tornero, L. J. Jensen, M. Kuhn, J. Trott, V. Rybin, C. W. Muller, P. Bork, M. Kaksonen, R. B. Russell, A. C. Gavin, *Mol. Syst. Biol.* **2010**, *6*, 430.
- [6] C. Thiele, M. J. Hannah, F. Fahrenholz, W. B. Huttner, *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 42.
- [7] P. Haberkant, O. Schmitt, F. X. Contreras, C. Thiele, K. Hanada, H. Sprong, C. Reinhard, F. T. Wieland, B. Brügger, *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 251.
- [8] F. X. Contreras, A. M. Ernst, P. Haberkant, P. Bjorkholm, E. Lindahl, B. Gonen, C. Tischer, A. Elofsson, G. von Heijne, C. Thiele, R. Pepperkok, F. Wieland, B. Brügger, *Nature* **2012**, *481*, 525.
- [9] J. Gubbens, E. Ruijter, L. E. de Fays, J. M. Damen, B. de Kruijff, M. Slijper, D. T. Rijkers, R. M. Liskamp, A. I. de Kroon, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 3.
- [10] M. M. Rowland, H. E. Bostic, D. Gong, A. E. Speers, N. Lucas, W. Cho, B. F. Cravatt, M. D. Best, *Biochemistry* **2011**, *50*, 11143.
- [11] M. D. Best, M. M. Rowland, H. E. Bostic, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 686.
- [12] J. Ford, T. Yuzawa, M. Platz, S. Matzinger, M. Fülscher, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4430.
- [13] C. Thiele, C. Papan, D. Hoelper, K. Kusserow, A. Gaebler, M. Schoene, K. Piotrowitz, D. Lohmann, J. Spandl, A. Stevanovic, A. Shevchenko, L. Kuerschner, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 2004.
- [14] Y. Pewzner-Jung, S. Ben-Dor, A. H. Futerman, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 25001.
- [15] T. Hornemann, A. Penno, M. F. Rutti, D. Ernst, F. Kivrak-Pfiffner, L. Rohrer, A. von Eckardstein, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 26322.
- [16] R. Tidhar, S. Ben-Dor, E. Wang, S. Kelly, A. H. Merrill, Jr., A. H. Futerman, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 3197.
- [17] R. N. Hannoush, J. Sun, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 498.
- [18] B. R. Martin, B. F. Cravatt, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 135.
- [19] J. P. Wilson, A. S. Raghavan, Y. Y. Yang, G. Charron, H. C. Hang, *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, M110.001198.
- [20] Y. Horibata, H. Sugimoto, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 7358.
- [21] P. B. Vordtriede, C. N. Doan, J. M. Tremblay, G. M. Helm-kamp, Jr., M. D. Yoder, *Biochemistry* **2005**, *44*, 14760.
- [22] K. W. A. Wirtz, *Biochem. J.* **1997**, *324*, 353.
- [23] M. Kazantzis, A. Stahl, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2012**, *1821*, 852.
- [24] B. C. Mullaney, K. Ashrafi, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2009**, *1791*, 474.