

## PROXIMITY LABELLING

# UNTERSUCHUNG VON PROTEIN-INTERAKTIONEN

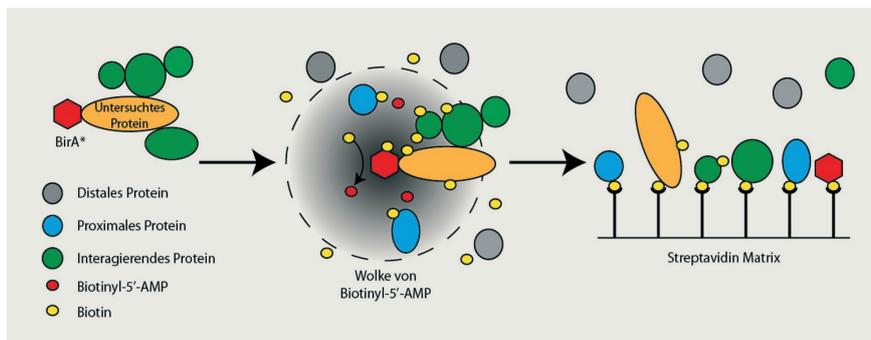
Die meisten Proteine liegen unter physiologischen Bedingungen nicht einzeln vor, sondern erfüllen ihre Aufgabe als Teil von Komplexen oder größeren Protein-Netzwerken. Daher ist die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) von zentraler Bedeutung für das Verständnis biologischer Vorgänge.

BioID nutzt enzymatische Biotinylierung, um direkte und indirekte Interaktoren eines Proteins über deren Markierung zu identifizieren. Dies wird durch die Verwendung einer promiskuitiven Biotin-Ligase-Variante aus *E. Coli* (BirA\*) ermöglicht, die Biotinyl-5'-AMP aus ATP und Biotin generiert. Die BirA\*-Sequenz wird dabei mit der DNA des Proteins von Interesse fusioniert und das daraus resultierende Fusionsprotein zellulär exprimiert. Durch eine Mutation im katalytischen Zentrum von BirA\* wird das reaktive Biotinyl-5'-AMP schnell freigesetzt und ist in der Lage, eine kovalente Bindung mit primären Aminen von Proteinen in unmittelbarer Nachbarschaft (Proximity) auszubilden. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Biotinyl-5'-AMP im Zytosol bleibt die Biotinylierung auf eine Entfernung von etwa 10 nm zur BirA\* beschränkt. Nach Affinitätsreinigung der biotinylierten Proteine mit Hilfe von Matrix-gekoppeltem Streptavidin können potentielle Interaktoren

des Fusionsproteins massenspektrometrisch oder über spezifischen Antikörper-Nachweis identifiziert werden [10.1083/jcb.201112098].

Um Limitationen durch BirA\* bezüglich der korrekten Lokalisation und Funktion des exprimierten Fusionsproteins zu überwinden, wurde die BioID2-Methode entwickelt. Diese nutzt eine humanisierte Form einer kleineren Biotin-Ligase aus dem thermophilen Bakterium *A. aeolicus* und erreicht ihre maximale katalytische Aktivität bereits bei einer wesentlich geringeren Konzentration an Biotin [10.1091/mbc.E15-12-0844]. Auch diese Methode wurde weiter verbessert: Zu nennen ist hier insbesondere TurboID, basierend auf einer Biotin-Ligase mit erhöhter katalytischer Aktivität, die es erlaubt, die Inkubationszeit in Experimenten auf bis zu zehn Minuten zu reduzieren [10.1038/nbt.4201].

Die Vorteile der BioID-Methode im Vergleich zu anderen Ansätzen der PPI-Analyse, wie dem Yeast-Two-Hybrid-System, liegen in der möglichen Identifizierung von nicht nur direkten, sondern auch indirekten und transienten Interaktionspartnern unter physiologischen Bedingungen und ist potenziell besser geeignet zur Detektion schwacher oder transienter PPIs als andere Protein-Tags wie zum Beispiel FLAG [10.1016/j.jprot.2014.09.011].



Prinzip des Proximity Labelling (BioID) Verfahrens



Deutsche Gesellschaft für  
Proteomforschung e.V.

## TERMINE

**24.–28. März, Potsdam**

Proteomic Forum 2019/

XIII. EuPA Congress/

[www.eupa2019.org](http://www.eupa2019.org)

Spezifische Herausforderungen liegen in der Generierung und Expression eines funktionellen Fusionsproteins. Die Wahl der genauen Position, an welche die Biotin-Ligase fusioniert wird, ist von zentraler Bedeutung. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, sollte eine einheitliche Expression auf möglichst nativen zellulären Levels angestrebt werden. Weiter sollte dessen korrekte zelluläre Lokalisation überprüft werden. Aufgrund seiner Funktionsweise liefert die Methode viele falsch-positive Interaktionspartner, weshalb geeignete Kontrollen gewählt und die Ergebnisse kritisch analysiert und validiert werden sollten [10.1002/0471140864.ps1923s74].

Zusammenfassend handelt es sich bei BioID um eine robuste Methode zum Screening von PPI unter physiologischen Bedingungen. Die Vorteile liegen in der möglichen Identifikation von direkten und indirekten und potenziell ebenfalls transienten Interaktionspartnern. Die Nachteile liegen, wie bei anderen Tag-basierten Ansätzen in einer möglichen Beeinträchtigung von Funktion und Lokalisation des Proteins durch Fusion mit der Biotin-Ligase sowie in der möglichen Detektion falsch-positiver Interaktionspartner.

**Tobias Leonhard, Karsten Boldt,**

**Felix Hoffmann, Tina Beyer**

**und Marius Ueffing**

**Forschungsinstitut für Augenheilkunde**

**und Medizinische Bioanalytik, Universität**

**Tübingen, [www.eye.uni-tuebingen.de](http://www.eye.uni-tuebingen.de)**