

Name: Diplom-Biologin Anke Müller
Titel: Zell-spezifische, metabolische Markierung von neu synthetisierten Proteinen in einem Neuron-Glia-Netzwerk

Zusammenfassung

Die chemische Synapse erlaubt nicht nur eine Weiterleitung elektrischer Signale sondern stellt durch die Fähigkeit diese Reizweiterleitung zu modulieren, die zelluläre Grundlage für Lernprozesse dar. Dabei kann die Adaptation der synaptischen Stärke auch durch die Interaktion mit Astrozyten an der sogenannten Trisynapse beeinflusst werden. Inwiefern Astrozyten sich durch plastische Mechanismen langfristig an veränderte neuronale Aktivität anpassen ist jedoch nur unzureichend verstanden.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Etablierung von GINCAT (*Genetically intro-duced non-canonical amino acid tagging*) und erste Anwendungen dieser Methode im Kontext der Neuron-Astrozyten-Interaktion. GINCAT erlaubt dabei eine Markierung von Proteinneusynthese mit Hilfe der nicht-kanonischen Aminosäure Azidonorleucin (ANL).

In dieser Arbeit konnte eine modifizierte Version der *Mus musculus* Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS), die LtoGMetRS, generiert werden, die in der Lage ist, auf Grund der Erweiterung der Methionin-Bindetasche ANL zu metabolisieren. Dabei ist die Integration von ANL in neu synthetisierte Proteine spezifisch für Zellen, die dieses Enzym exprimieren und kann sowohl direkt über Massenspektrometrie als auch indirekt über FUNCAT und BONCAT nachgewiesen werden. Eine Optimierung von GINCAT und die weitere Etablierung der Methode für verschiedene Applikationen zeigen vielseitige experimentelle Anwendungsmöglichkeiten auf. Eine Übertragung dieser Technik auf Astrozyten gelang über ein lentivirales Gentransfersystem, und die zellspezifische Expression der LtoGMetRS über einen GFAP-Promoter erlaubt die ANL-Markierung von Proteinneusynthese in Astrozyten eines Neuron-Glia-Kokultur-Modells. Dabei ermöglicht die Verwendung verschiedenster Alkin-Sonden in der Klick-Reaktion eine Visualisierung ANL-markierter Proteine über biochemische oder Fluoreszenz-basierte Methoden und erlaubt so die qualitative und quantitative Analyse von Proteinneusynthese, sowie die Identifizierung von ANL-markierten Proteinen über Massenspektrometrie. GINCAT stellt somit eine neue Methode dar, die eine Analyse von Proteinsynthese spezifisch in Astrozyten als Antwort auf veränderte neuronale Aktivität ermöglicht.

Weitere experimentelle Methoden wurden in ersten Ansätzen etabliert, die als Ergänzung zu GINCAT fungieren. So enthält die Astroprot-Datenbank bereits publizierte Daten über das astrogläre Proteom oder Transkriptom und bietet eine Basis für eine Verifizierung des zellulären Ursprungs von Proteinen. Eine Lokalisation der LtoGMetRS zu astroglären Filopodia über die Ferm-Domäne von Ezrin unterstützt zukünftig die Untersuchung lokaler Proteinsynthese des astroglären Teils der Trisynapse. Weiterhin erlaubt die Markierung von Ribosomen über RPL27EGFP die Analyse von Dynamiken und die Lokalisation der markierten Ribosomen spezifisch in Astrozyten.

Name: Diplom-Biologin Anke Müller
Titel: Zell-spezifische, metabolische Markierung von neu synthetisierten Proteinen in einem Neuron-Glia-Netzwerk

Abstract

Chemical synapses enable not only the transfer of action potentials from one neuron to another, but by modulating the synaptic strength they also provide a basis for plastic processes like learning and memory. At the tripartite synapse astrocytes are able to influence synaptic strength by direct or indirect interaction with the pre-and postsynaptic site. In how far astrocytes on the other hand adapt stably to changes of neuronal activity is mostly unknown.

To allow for an investigation of changes in the astroglial proteome as a response to neuronal activity, we established a new method called GINCAT (Genetically introduced non-canonical amino acid tagging). GINCAT enables a cell-selective labeling of newly synthesized proteins using the non-canonical amino acid acidonorleucin (ANL). Integration of ANL into newly synthesized proteins requires the expression of a modified *Mus musculus* Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS). A single amino acid exchange L274G (LtoGMetRS) enlarges the Methionine-binding pocket and allows the activation of ANL and the subsequent utilisation in protein synthesis. Specific ANL integration into proteins of cells expressing LtoGMetRS can be confirmed either by visualisation coupling a fluorescence- or biotin-tag to the azide group of ANL in click-reaktion or by mass spectrometry. Further optimisation of this method supports an application of GINCAT in different experimental setups.

To investigate changes of protein expression in astrocytes in a heterologous cell-culture system that allows direct and indirect contact to neuronal cells, we generated a lentiviral gene transfer system that enables the expression of the LtoGMetRS specifically in GFAP positive astrocytes. ANL integration can be found specifically in GFAP-positive cells, that express LtoGMetRS and new synthesized proteins can be isolated and analysed by mass spectrometry using a biotin-tag in click reaction.

Additional experimental approaches support GINCAT in the investigation of the astroglial proteome. A database containing already published information about the astrocytic proteom can be used to confirm the astrocytic origin of proteins. A localisation of the LtoGMetRS to astrocytic filopodia might enable a future analysis of local protein synthesis close to the trisynaptic site and the successful labeling of astroglial ribosomes with a fluorescence tag might unravel ribosome dynamics in astrocytes in response to neuronal activity.