

DOI: 10.13376/j.cbls/2016107

文章编号: 1004-0374(2016)07-0824-07

点击化学在神经可塑性研究中的应用

祁羨杰, 阮杭泽, 高娟妹, 郭霞, 沈万华*

(杭州师范大学浙江省器官发育与再生技术研究重点实验室, 杭州 310036)

摘要: 神经环路结构和功能的可塑性过程需要大量的新生蛋白参与, 鉴定这些蛋白质的组分和在体动态变化无疑会对神经可塑性机制研究提供重要线索。近几年新发展起来的两种点击化学技术, BONCAT (生物正交非天然氨基酸标记) 和 FUNCAT (荧光非天然氨基酸标记) 为神经可塑性研究带来了新的技术手段, 它们不仅可以提高检测新生蛋白成分的灵敏度, 还可以实时跟踪定位亚细胞新生蛋白的表达情况, 已经逐步发展为除荧光和同位素标记蛋白外的另一种重要技术。现就最近几年利用点击化学标记新生蛋白的新技术, 包括和质谱联用、筛选新生蛋白以及在各模式动物研究中的应用做一综述。

关键词: 点击化学; 神经可塑性; 新生蛋白

中图分类号: Q426; R331 **文献标志码:** A

Click chemistry in neural plasticity

QI Xian-Jie, RUAN Hang-Ze, GAO Juan-Mei, GUO Xia, SHEN Wan-Hua*

(Zhejiang Key Laboratory of Organ Development and Regeneration, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

Abstract: Newly-synthesized proteins are required for neural plasticity and structural plasticity in central nervous system. It will be very helpful to demonstrate the mechanism for neural plasticity by identifying and elucidating the newly-synthesized proteins in specific subcellular compartments. In recent several years, the non-canonical amino acid labeling techniques of BONCAT (bioorthogonal non-canonical amino acid tagging) and FUNCAT (fluorescent non-canonical amino acid tagging) have been widely used to observe protein dynamics and subcellular localization, which provides novel techniques for studying neural plasticity. The next generation of these biological tools not only can increase the sensitivity for detection of newly-synthesized proteins, but also can track the protein dynamics in subcellular compartments *in vivo*. It has been considered as one of the important techniques for studying newly-synthesized proteins besides the classical methods of fluorescent and radioisotope labeling of proteins. The new techniques for labeling of newly-synthesized proteins by click chemistry, identification of proteomes combined with mass spectrometry (MS) and its applications in animal models are reviewed.

Key words: click chemistry; neural plasticity; newly-synthesized proteins;

大脑通过学习形成的长时程记忆依赖于大脑神经环路对信息的处理方式。神经可塑性是神经系统在分子细胞以及系统水平应对外界刺激发生改变的一种能力, 被认为是学习和记忆的基础。已经有大量数据表明, 神经环路、突触联系、单个神经元的形态结构、生化组分(包括核酸、蛋白质、酶类以及神经递质等)以及电生理特性等都具有一定程度的可塑性。所谓可塑性变化, 在宏观上表现为学习、记忆、行为及精神变化以及损伤后的功能恢复等;

在微观上体现为电生理活动、神经化学、神经传递、组织及细胞形态的变化。可塑性的变化需要通过不断合成新的蛋白 (newly-synthesized proteins) 和调控蛋白质动态变化来实现^[1]。因此, 深入研究蛋白质合成动力学、新生蛋白的亚细胞定位, 以及这些蛋

收稿日期: 2015-12-24; 修回日期: 2016-01-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31271176);

杭州市“131”人才计划支持项目

*通信作者: E-mail: bioshen@gmail.com

白的成份, 对于理解神经可塑性的机制至关重要。

生物研究者通常使用荧光蛋白标签, 如 GFP 来观察和定位新生蛋白质^[2]。这种标记技术是当前研究蛋白质合成的一种重要方法。但是, 使用标签标记蛋白可能会影响在体蛋白的功能和被标记蛋白的细胞定位, 而且这种方法在同一时间只能研究少数几个已知蛋白质, 并不能系统地研究整个蛋白质组的动态变化情况。此外, 同位素标记联合质谱分析技术, 可以鉴定和量化外界刺激对蛋白质合成的影响^[3]。但是, 神经元的蛋白成份相当复杂, 如果新生蛋白质的含量低, 很难用传统的方法对低丰度蛋白进行识别与鉴定。因此, 需要建立一种新的生物技术来鉴别低丰度新生蛋白, 并在体动态观察新生蛋白的变化。

过去几年, 研究者使用外源叠氮化物氨基酸 (azidohomoalanine, AHA) 和炔烃氨基酸 (homopropargylglycine, HPG) 作为蛋白质合成原料来代替内源性的甲硫氨酸 (Met), 从而标记新生蛋白^[4-6]。对蛋白质组进行亲和纯化分离新生蛋白后, 用一价铜离子催化叠氮和炔烃环形成共价连接 (如图 1 所示), 这种技术称之为“点击化学” (click chemistry)^[7-8]。它是在 2001 年由诺贝尔化学奖获得者美国化学家 Sharpless 首先提出的^[9]。在点击化学的基础上, 研究者建立了生物正交非天然氨基酸标记 (bioorthogonal noncanonical amino acid tagging, BONCAT) 和荧光非天然氨基酸标记 (fluorescent noncanonical amino acid tagging, FUNCAT) 技术^[10-13]。BONCAT 技术使用亲和识别标记物标记并纯化那些连接 AHA 或 HPG 的新生蛋白。而 FUNCAT 利用荧光标签, 可以在体观察动物细胞中的新生蛋白。使用免疫印迹法可以直接分析亲和标记的蛋白质, 或者用亲和纯化的方法将其从总蛋白中分离出来后, 再使用质谱

法分析鉴定新生蛋白的组份。细胞代谢吸收 AHA 后, 蛋白质组中含 AHA 的多肽高达 87%^[14], 因此, 非天然氨基酸标记技术用 AHA 替代体内的 Met 就变得非常灵敏。BONCAT 技术已经成功地应用于 HEK293 细胞蛋白质组研究, 检测出 195 种新生蛋白^[10]; 在爪蟾视顶盖细胞中, 识别了 992 种新生蛋白组分^[15]。FUNCAT 技术也成功鉴定了 Rat-1 成纤维细胞中的新生蛋白^[16-17], 观察了离体海马神经元和海马脑片中局部蛋白的合成^[12]。另一方面, 非天然氨基酸标记技术和免疫组化、原位杂交得到的实验结果高度一致^[13], 并且可以将点击化学技术用于提高药物结合效率的研究中^[18], 为一些疾病的临床治疗提供了新的思路。

通过细胞自身的蛋白质合成机制, AHA 和 HPG 替代甲硫氨酸-tRNA 中的甲硫氨酸这个过程不需要基因调控。因此, 点击化学技术可用于研究神经细胞的蛋白质组动力学。BONCAT 和 FUNCAT 技术已经逐步发展成为除荧光蛋白标记和同位素标记蛋白技术外的另一种重要技术。相比单独使用同位素标记, 结合 BONCAT 技术后检测到的蛋白质合成率更加准确和高效^[19]。Tom 等^[20]将荧光非天然氨基酸标记、嘌呤霉素标记分别与邻位连接 (PLA) 技术结合, 可以实时监测新生蛋白的来源、再分布以及周转。叠氮化物和炔烃都是小分子化学基团, 不会干扰体内蛋白质正常的空间折叠与定位^[10], 因此不会影响被标记蛋白的功能。尽管细胞内环境非常复杂, 而且新生蛋白的含量较低, 但由于生物体内不存在叠氮和炔烃, 点击化学的灵敏度会非常高。另外, AHA 不会干扰细胞的生物进程, 甚至对病毒的复制和感染也没有影响^[21]。本文主要讨论点击化学技术在神经系统中的应用和一些非天然氨基酸标记的新技术, 以及如何使用这些新技术去研究蛋

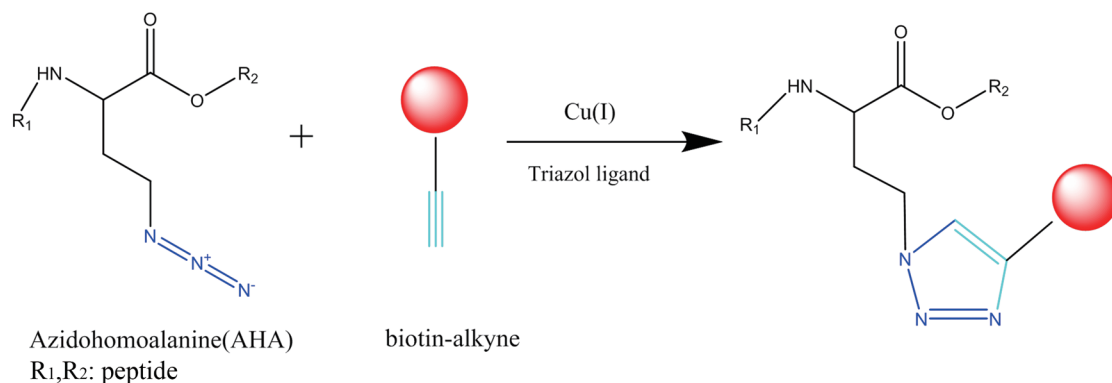


图1 点击化学反应示意图

白质组动力学。

1 BONCAT和FUNCAT技术在神经系统功能研究中的应用

1.1 研究细胞内蛋白质合成变化

哺乳动物中单个细胞约含1万种蛋白质^[22],每个化学性突触含有1 000~1 500种不同的蛋白质^[23],每小时突触蛋白的更新率为0.7%^[24]。因此,研究细胞内蛋白质合成的变化对于了解细胞的功能至关重要。近几年发展起来的两种点击化学技术——BONCAT和FUNCAT为神经系统中新生蛋白的研究带来了新的技术手段,这些新生蛋白与神经系统的功能密不可分。Roche等^[25]使用AHA标记,证实了神经元轴突的导向需要增加蛋白质合成量。他们还发现了在神经生长因子(NGF)或脑信号蛋白3A(Sema3A)存在时,刺激背根神经节神经元会增加胞体和轴突的蛋白质合成量。另一方面,Marin等^[26]发现,用谷氨酸受体激动剂NMDA刺激离体海马细胞,会降低树突蛋白质合成量。Hodas等^[27]鉴定了树突和轴突中300多种新生蛋白,用D1/D5受体拮抗剂SKF81927处理后,树突的蛋白质合成增加。与疼痛相关的细胞因子白介素6(IL-6)和NGF会引起背根神经节细胞外信号调节激酶和雷帕霉素靶蛋白合成增加^[28],外周神经损伤会引起坐骨神经蛋白合成增加^[29]。在腓骨肌萎缩症(CMT)研究中,甘氨酸-tRNA合成酶突变果蝇的运动和感觉神经元的蛋白质亚细胞定位正常,但总蛋白合成量明显减少^[30]。

1.2 鉴定刺激诱导的新生蛋白成份

使用同位素标记很难检测和鉴定低丰度的新生蛋白,而点击化学技术标记的新生蛋白,经过富集纯化后很容易被检测。Hodas等^[27]使用BONCAT技术鉴定了大鼠海马神经纤维网中的多巴胺能蛋白质组,用AHA孵育海马脑片2.5 h,联合点击化学和质谱分析技术,鉴定出891种新生蛋白,这些蛋白质参与了不同生物进程和分子功能。其中有100种蛋白质是由多巴胺受体激动剂刺激新产生的。有些新生蛋白与突触功能相关,如突触前蛋白Munc13-1、电压门控钾离子通道亚基 β -1(KCNAB1)、40S核糖体蛋白S25(RPS25)和60S核糖体蛋白L13a(RPL13A)。这些数据说明了BONCAT技术可以用于鉴定刺激引起的神经系统中新生蛋白的生成。Zhang等^[31]用BONCAT结合同位素标记技术(stable isotope labeling by amino acids, SILAC)研究脑

源性神经营养因子(BDNF)诱导的蛋白调控时,发现53种蛋白质在BDNF刺激后明显变化。培养的神经元细胞受到损伤性缺血刺激时,新生的蛋白质将会影响整个蛋白质组变化,鉴定对缺血产生效应的蛋白质就有希望找到急性脑卒中的药物作用靶点^[32]。爪蟾行为可塑性的调控需要新生蛋白的快速合成,联合运用点击化学和MudPIT技术鉴定了视顶盖细胞中多种新生蛋白组分,如CaMKII、MEK1、CPEB和GAD65等^[33]。此外,Yoon等^[34]用AHA标记技术,发现Engrailed-1(En-1)会引起爪蟾视网膜神经节细胞(RGC)轴突蛋白合成量增加,并结合双向电泳(2D-DIGE)技术找到一种与核膜相关的中间丝状体蛋白质——核纤层蛋白B2(LB2),它受到En-1刺激后所产生的变化最大,这种蛋白对轴突线粒体功能和轴突生长非常重要。AHA替换甲硫氨酸后,还可以用于蛋白质化学修饰研究,探究蛋白质功能的调控方式^[35]。

1.3 可视化研究细胞局部新生蛋白动态变化

尽管很多蛋白质合成的局部定位已经清楚^[36],但是FUNCAT技术可以进一步研究树突、轴突及生长锥等的一些亚细胞部位的蛋白质合成。Dieterich等^[12]用蛋白合成抑制剂茴香霉素处理离体海马神经细胞时发现,AHA只会整合到树突的新生蛋白中。此外,Tcherkenzian等^[37]用FUNCAT技术发现,在海马神经元和背侧连合神经元的丝状伪足中,一种接受神经生长因子刺激的神经元跨膜受体(DDC)和新生蛋白共定位,推测DDC可能参与了调控轴突生长锥的局部蛋白质翻译。

1.4 研究突触蛋白质代谢

神经元之间主要通过突触来传递信息,突触需要不断合成新的蛋白质来维持突触的结构和功能。突触蛋白是一组与突触功能相关的具有神经元特异性的磷酸蛋白家族,在调节神经递质的释放及参与神经元早期发育等方面起着重要的作用。但目前大部分的相关研究主要集中在一些丰度高的突触蛋白^[38]。Cohen等^[24]将FUNCAT技术与SILAC、蛋白质谱分析(mass spectrometry, MS)、定量免疫组化以及生物信息学分析相结合,系统地测量了数百个突触蛋白的代谢半衰期。含AHA的蛋白的荧光强度在24 h和48 h后分别降低到了70%和55%,并且发现所有突触蛋白都有相似的2~5 d的半衰期。这些与突触结构和功能相关的蛋白质有着相似的更新率,说明了蛋白质的合成和降解机制可能具有类似的调控机制。

2 最近的一些研究进展

近年来, 非天然氨基酸标记技术已经开始应用于神经可塑性的研究, 增强新生蛋白检测的灵敏度, 为科研工作者研究神经环路结构和功能可塑性提供了便利的工具。

2.1 在体BONCAT和FUNCAT技术

在体研究神经可塑性可以帮助人们更准确地理解学习和记忆的分子机制, BONCAT 和 FUNCAT 技术提供了这样一种在体研究方法。到目前为止, 多个实验室已经在爪蟾^[33]、果蝇^[30]、斑马鱼^[39]、小鼠和线虫^[40]上使用了此技术。在研究斑马鱼新生蛋白合成时, AHA 或 HPG 很容易从培养液直接扩散进入幼体斑马鱼内, 通过细胞代谢整合到新生蛋白中, 并且不产生明显的细胞毒性, 也不会对行为产生影响^[39]。运用 BONCAT 技术, Shen 等^[33]联合运用点击化学和质谱技术在爪蟾视顶盖内筛选了一批视觉经验依赖的新生蛋白, 确定了点击化学技术可以定量研究新生蛋白的变化, 并且利用蛋白质免疫印迹技术证实了总蛋白的表达变化不一定能被检测出来, 表明新生蛋白的富集过程极大地提高了反应的灵敏度。这些结果为研究学习记忆相关新生蛋白提供了新的技术, 为深入研究可塑性机制奠定了基础。通过标记整个组织的新生蛋白, 分析新生蛋白的动态变化和成份, 或许可以进一步揭示记忆形成过程中神经环路的结构和功能变化, 并扩展到其他研究领域。

2.2 量化亲和纯化蛋白

稳定的同位素标记 (SILAC) 技术可以用于定量分析蛋白质组成, 然而, 在分析一些成份复杂的蛋白质组时, 低丰度含标记的新生蛋白不容易被检测。通过富集新生蛋白可以有效解决低丰度蛋白检测灵敏度低的问题。将 SILAC、BONCAT 与亲和纯化技术相结合^[15], 可以定量分析蛋白的绝对量变化^[41]或细胞含量少的分泌蛋白变化^[42]。刺激 CD4 阳性 T 细胞 2 h 或 4 h 后, 蛋白质表达量在 1.6 倍到 589 倍的变化范围内波动^[41]。AHA 整合进入肿瘤坏死因子 (TNF- α) 和白介素 (IL-1 β) 调控的新生蛋白中, 纯化富集的蛋白用同位素相对标记与绝对定量技术 (isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ) 测定后, 可以鉴定多种受炎症性细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 调控的新生蛋白^[43]。

2.3 亲和标记和荧光标记新方法

非天然氨基酸标记技术需要通过加热来分离结

合在树脂上的新生蛋白, 但是, 一些非特异性蛋白, 如内源性生物素可能无法从测试样品中完全分离出来。Szychowski 等^[44]设计了一组可分离的生物素探针二烷氧二苯基硅烷 (Dialkoxydiphenylsilane, DADPS), 它可以快速高效地从亲和柱中纯化分离多肽, 从而降低了非特异性结合。

Dieterich 等^[12]使用量子点 (Qdot) 复合物来动态观察神经元中的蛋白质变化, 相比传统的荧光染料, 其显著性地提高了亮度和光稳定性。在进行 Qdots 实验时, 如果溶液中存在重金属离子, 则会对长期观察的细胞产生毒性。Wu 等^[45]研制出一种超亮的荧光标记技术 (Pdots), 极大地降低了细胞的毒副作用。这种 Pdots 比 Qdots 更明亮, 不会闪光, 并且释放速率快了一千倍, 更容易在神经系统中进行单分子追踪实验。但是, 由于 Pdots 不能穿过细胞膜, 所以需要光毒性的紫外光照射才能进入细胞, 限制了其应用范围。

在使用 FUNCAT 技术进行动态标记时, 点击化学反应所必需的铜催化剂会对新生蛋白产生阻断作用^[46], 而 AHA 的合成需要铜催化叠氮基的转移^[47]。为了降低铜催化剂的细胞毒性, 同时使用 CuSO₄ 和三唑基甲基胺的配体 BTES, 可以促进细胞表面含叠氮化物或炔烃基团和所对应的生物素标签在数分钟内发生点击反应^[48]。Bettozzi 团队研制出一种改进的环辛炔和叠氮化物的环加成反应, 这种反应在生理条件下不需要催化剂, 因此, 没有细胞毒性^[49-50]。但这些二氟化环辛炔的荧光标记物很难合成, 并且与 BTES 配体结合后不能透过细胞膜。Beatty 等^[51-52]针对胞浆蛋白的活性标记技术, 设计了一组环辛炔标签, 这种标签可以结合到更小并能透过细胞膜的荧光素上, 如香豆素和氟硼吡咯等。使用香豆素的环辛炔复合体标记 Rat1 纤维母细胞标记 4 h 后, 相比甲硫氨酸对照组, 荧光强度增强 30 倍^[51]; 但是, 香豆素荧光基团需要在紫外光 360 nm 下激活, 这样不仅会损害细胞, 而且紫外光的穿透力低, 应用范围有所限制。相反, 氟硼吡咯的激发光和发射光光谱与 GFP 相似。用 AHA 处理 4 h, 点击反应 10 min 后, Rat1 纤维母细胞的绝大多数标记蛋白都位于细胞膜上^[52], 但是, 氟硼吡咯-环辛炔的膜渗透性较香豆素-环辛炔低。因此, 进一步开发膜渗透性高的细胞标签, 将会极大地提高对神经元, 甚至在体新生蛋白动态成像的分辨率, 扩大此标记技术的应用范围。

2.4 选择性标记新生蛋白

BONCAT 和 FUNCAT 利用外源性 AHA 或 HPG 替代内源性甲硫氨酸, 然而, 大部分体内蛋白都含有甲硫氨酸, 这使得标记的特异性受到了影响。Tirrell 团队通过改变大肠杆菌中甲硫氨酸-tRNA 合成酶的特异性, 从而将叠氮正亮氨酸 (ANL) 通过代谢整合进入新生蛋白^[53-54], 这种技术为标记蛋白的细胞特异性问题提供了解决方案, 并可用于遗传确定的细胞和神经环路中的蛋白质成份的鉴定。通过点击反应修饰结合蛋白的特异位点, 可以增加蛋白质的一些功能, 应用于生物医学的不同领域^[55]。

3 点击化学技术的局限性

非天然氨基酸标记技术还不能适用于所有类型的细胞, 在应用上也有一些局限。假如细胞不能有效地代谢吸收 AHA 或 HPG, 那么新生蛋白就不能通过非天然氨基酸被标记。若非天然氨基酸容易在亚细胞之间扩散, 则可能需要使用蛋白质合成抑制剂来降低非特异性标记^[12]。另外, 点击化学中经常使用含 Alexa 的荧光基团进行标记, 但这种方法并不能追踪单个标记分子。此外, 反应过程中所需的铜催化剂产生的细胞毒性会在一定程度上影响细胞的正常生理状态。所以, 点击化学技术仍需进一步改善以适用于更多的神经可塑性研究。

4 结语

点击化学可以广泛适用于神经科学领域各种细胞和组织内基于蛋白质动态合成的神经可塑性研究, 能够对新生蛋白进行亚细胞定位, 并且能定量检测新生蛋白的含量和动态变化。新生蛋白的定量识别和标记等新技术的发展, 将会极大地推动神经科学在神经可塑性领域研究的进展。这项技术的应用无疑还有极大的潜力, 在未来一段时间, 这项技术将在很多领域得到推广, 其重点发展方向如下: 第一, 进一步优化点击化学技术, 如研发膜穿透性高的代谢标签、提高反应效率等, 使之更广泛地应用于其他模式动物和细胞中, 促进神经可塑性机制的深入研究; 第二, 将点击化学与其他现代生物学技术相结合, 如质谱分析、免疫荧光、激光共聚焦、膜片钳等技术, 来研究大脑学习记忆过程中的神经可塑性机制; 第三, 研究神经系统疾病发生发展过程中蛋白质表达的变化, 分析诸如癫痫、精神分裂症等一些神经疾病的发病机制, 寻找疾病治疗的靶标分子, 为临床诊断和治疗奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] Davis HP, Squire LR. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull*, 1984, 96: 518-59
- [2] Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 509-44
- [3] Ong SE, Blagojev B, Kratchmarova I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1: 376-86
- [4] Kiick KL, Saxon E, Tirrell DA, et al. Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 19-24
- [5] Link AJ, Vink MK, Tirrell DA. Presentation and detection of azide functionality in bacterial cell surface proteins. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 10598-602
- [6] Beatty KE, Xie F, Wang Q, et al. Selective dye-labeling of newly synthesized proteins in bacterial cells. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 14150-1
- [7] Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV, et al. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002, 41: 2596-9
- [8] Tornøe CW, Christensen C, Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem*, 2002, 67: 3057-64
- [9] Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int: Ed Engl*, 2001, 40: 2004-21
- [10] Dieterich DC, Link AJ, Graumann J, et al. Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 9482-7
- [11] Dieterich DC, Lee JJ, Link AJ, et al. Labeling, detection and identification of newly synthesized proteomes with bioorthogonal non-canonical amino-acid tagging. *Nat Protoc*, 2007, 2: 532-40
- [12] Dieterich DC, Hodas JJ, Gouzer G, et al. *In situ* visualization and dynamics of newly synthesized proteins in rat hippocampal neurons. *Nat Neurosci*, 2010, 13: 897-905
- [13] Tom Dieck S, Müller A, Nehring A, et al. Metabolic labeling with noncanonical amino acids and visualization by chemoselective fluorescent tagging. *Curr Protoc Cell Biol*, 2012, Chapter 7: Unit 7. 11
- [14] Nessen MA, Kramer G, Back J, et al. Selective enrichment of azide-containing peptides from complex mixtures. *J Proteome Res*, 2009, 8: 3702-11
- [15] Somasekharan SP, Stoyanov N, Rotblat B, et al. Identification and quantification of newly synthesized proteins translationally regulated by YB-1 using a novel Click-SILAC approach. *J Proteomics*, 2012, 77: e1-10
- [16] Beatty KE, Liu JC, Xie F, et al. Fluorescence visualization of newly synthesized proteins in mammalian cells. *Angew Chem Int: Ed Engl*, 2006, 45: 7364-7
- [17] Beatty KE, Tirrell DA. Two-color labeling of temporally

- defined protein populations in mammalian cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 5995-9
- [18] Naim NW, Shanebeck KD, Wang A, et al. Development of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for increased *in vivo* efficacy of interferon β -1b by site-specific PEGylation. *Bioconjug Chem*, 2012, 23: 2087-97
- [19] Bagert JD, Xie YJ, Sweredoski MJ, et al. Quantitative, time-resolved proteomic analysis by combining bioorthogonal noncanonical amino acid tagging and pulsed stable isotope labeling by amino acids in cell culture. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13: 1352-8
- [20] tom Dieck S, Kochen L, Hanus C, et al. Direct visualization of newly synthesized target proteins *in situ*. *Nat Methods*, 2015, 12: 411-4
- [21] Banerjee PS, Ostapchuk P, Hearing P, et al. Unnatural amino acid incorporation onto adenoviral (Ad) coat proteins facilitates chemoselective modification and retargeting of Ad type 5 vectors. *J Virol*, 2011, 85: 7546-54
- [22] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 2000, 405: 837-46
- [23] Pielot R, Smalla KH, Muller A, et al. SynProt: a database for proteins of detergent-resistant synaptic protein preparations. *Front Synaptic Neurosci*, 2012, 4: 1
- [24] Cohen LD, Zuchman R, Sorokina O, et al. Metabolic turnover of synaptic proteins: kinetics, interdependencies and implications for synaptic maintenance. *PLoS One*, 2013, 8: e63191
- [25] Roche FK, Marsick BM, Letourneau PC. Protein synthesis in distal axons is not required for growth cone responses to guidance cues. *J Neurosci*, 2009, 29: 638-52
- [26] Marin P, Nastiuk KL, Daniel N, et al. Glutamate-dependent phosphorylation of elongation factor-2 and inhibition of protein synthesis in neurons. *J Neurosci*, 1997, 17: 3445-54
- [27] Hodas JJ, Nehring A, Hoche N, et al. Dopaminergic modulation of the hippocampal neuropil proteome identified by bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proteomics*, 2012, 12: 2464-76
- [28] Melemedjian OK, Asiedu MN, Tillu DV, et al. IL-6- and NGF-induced rapid control of protein synthesis and nociceptive plasticity via convergent signaling to the eIF4F complex. *J Neurosci*, 2010, 30: 15113-23
- [29] Melemedjian OK, Asiedu MN, Tillu DV, et al. Targeting adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) in preclinical models reveals a potential mechanism for the treatment of neuropathic pain. *Mol Pain*, 2011, 7: 70
- [30] Niehues S, Bussmann J, Steffes G, et al. Impaired protein translation in *Drosophila* models for charcot-marie-tooth neuropathy caused by mutant tRNA synthetases. *Nat Commun*, 2015, 6: 7520
- [31] Zhang G, Bowling H, Hom N, et al. In-depth quantitative proteomic analysis of *de novo* protein synthesis induced by brain-derived neurotrophic factor. *J Proteome Res*, 2014, 13: 5707-14
- [32] Zhou A, Simon RP, David L. Nascent proteomes of ischemic-injured and ischemic-tolerant neuronal cells. *Int J Comput Biol Drug Des*, 2011, 4: 40-55
- [33] Shen W, Liu HH, Schiapparelli L, et al. Acute synthesis of CPEB is required for plasticity of visual avoidance behavior in *Xenopus*. *Cell Rep*, 2014, 6: 737-47
- [34] Yoon BC, Jung H, Dwivedy A, et al. Local translation of extranuclear lamin B promotes axon maintenance. *Cell*, 2012, 148: 752-64
- [35] Zhang MM, Tsou LK, Charron G, et al. Tandem fluorescence imaging of dynamic S-acylation and protein turnover. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 8627-32
- [36] Aakalu G, Smith WB, Nguyen N, et al. Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron*, 2001, 30: 489-502
- [37] Tcherkezian J, Brittis PA, Thomas F, et al. Transmembrane receptor DCC associates with protein synthesis machinery and regulates translation. *Cell*, 2010, 141: 632-44
- [38] Ehlers MD. Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci*, 2003, 6: 231-42
- [39] Hinz FI, Dieterich DC, Tirrell DA, et al. Non-canonical amino acid labeling *in vivo* to visualize and affinity purify newly synthesized proteins in larval zebrafish. *ACS Chem Neurosci*, 2012, 3: 40-9
- [40] Yuet KP, Doma MK, Ngo JT, et al. Cell-specific proteomic analysis in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 2705-10
- [41] Howden AJ, Geoghegan V, Katsch K, et al. QuanNCAT: quantitating proteome dynamics in primary cells. *Nat Methods*, 2013, 10: 343-6
- [42] Eichelbaum K, Winter M, Berriel Diaz M, et al. Selective enrichment of newly synthesized proteins for quantitative secretome analysis. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 984-90
- [43] Choi KY, Lippert DN, Ezzatti P, et al. Defining TNF- α and IL-1 β induced nascent proteins: combining bio-orthogonal non-canonical amino acid tagging and proteomics. *J Immunol Methods*, 2012, 382: 189-95
- [44] Szychowski J, Mahdavi A, Hodas JJ, et al. Cleavable biotin probes for labeling of biomolecules via azide-alkyne cycloaddition. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 18351-60
- [45] Wu C, Jin Y, Schneider T, et al. Ultrabright and bioorthogonal labeling of cellular targets using semiconducting polymer dots and click chemistry. *Angew Chem Int: Ed Engl*, 2010, 49: 9436-40
- [46] Sletten EM, Bertozzi CR. Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angew Chem Int: Ed Engl*, 2009, 48: 6974-98
- [47] Link AJ, Vink MK, Tirrell DA. Preparation of the functionalizable methionine surrogate azidohomoalanine via copper-catalyzed diazo transfer. *Nat Protoc*, 2007, 2: 1879-83
- [48] Soriano Del Amo D, Wang W, Jiang H, et al. Biocompatible copper(I) catalysts for *in vivo* imaging of glycans. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 16893-9
- [49] Agard NJ, Prescher JA, Bertozzi CR. A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of

- biomolecules in living systems. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 15046-7
- [50] Baskin JM, Prescher JA, Laughlin ST, et al. Copper-free click chemistry for dynamic *in vivo* imaging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 16793-7
- [51] Beatty KE, Fisk JD, Smart BP, et al. Live-cell imaging of cellular proteins by a strain-promoted azide-alkyne cycloaddition. *Chembiochem*, 2010, 11: 2092-5
- [52] Beatty KE, Szychowski J, Fisk JD, et al. A BODIPY-cyclooctyne for protein imaging in live cells. *Chembiochem*, 2011, 12: 2137-9
- [53] Link AJ, Vink MK, Agard NJ, et al. Discovery of aminoacyl-tRNA synthetase activity through cell-surface display of noncanonical amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 10180-5
- [54] Tanrikulu IC, Schmitt E, Mechulam Y, et al. Discovery of *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase mutants for efficient labeling of proteins with azidonorleucine *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 15285-90
- [55] Simon M, Zangemeister-Wittke U, Pluckthun A. Facile double-functionalization of designed ankyrin repeat proteins using click and thiol chemistries. *Bioconjug Chem*, 2012, 23: 279-86