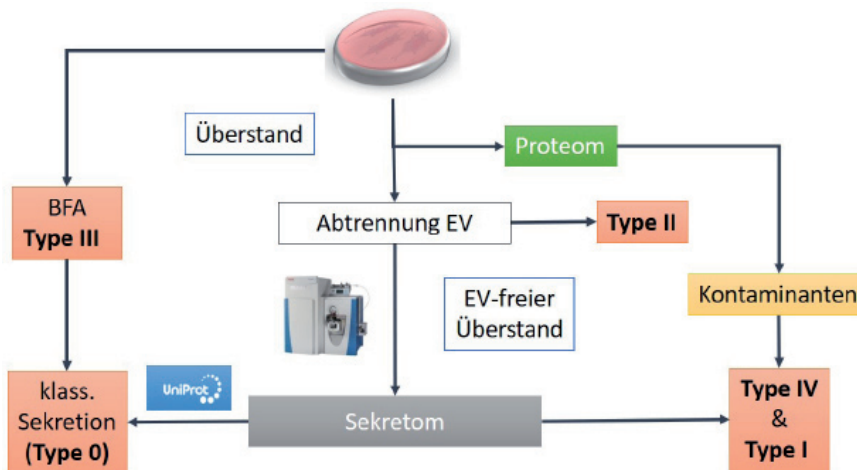


QUANTITATIVE MASSENSPEKTROMETRIE

ENTSCHLÜSSELUNG DES HUMANEN SEKRETOMS



Charakterisierung des humanen Sekretoms. Durch verschiedene aufeinander abgestimmte Arbeitsschritte lassen sich die unterschiedlichen Proteinsekretionswege zuordnen. BFA (Brefeldin A), EV (extrazelluläre Vesikel)

Zellen setzen Proteine frei, um mit ihrer Umgebung zu interagieren und zu kommunizieren. Sämtliche von der Zelle sekretierten Proteine werden unter dem Begriff Sekretom zusammengefasst. Die Daten der letzten Jahre aus dem Bereich der Sekretomanalyse zeigen, dass neben der klassischen Proteinsekretion, welche 1975 von Blobel und Dobberstein erstmalig beschrieben wurde, ein großer, bisher weitgehend vernachlässigter Teil der sekretierten Proteine auf alternativen Wegen, der „unkonventionellen Proteinsekretion“, die Zelle verlassen. Neben der klassischen Proteinsekretion (Type 0), die auf einem N-terminalen Signalpeptid beruht und entlang der ER-Golgi-Route stattfindet, wurden Sekretionswege beschrieben, die unter anderem auf der Bildung von Membranporen (Type I), dem vesikulären Transport (Type II), dem Golgi Bypass (III) oder dem Ectodomain shedding (Type IV) beruhen. Um diese unkonventionell sekretierten Proteine identifizieren und für die Forschung erschließen zu können, wurden, auf der quantitativen Massenspektrometrie (MS) basierend, experimentelle Ansätze entwickelt (Abb.) und erfolgreich angewendet.

Wichtig bei der Charakterisierung des Sekretoms ist, dass dieses unter kontrollierten Bedingungen gewonnen wird. Kontaminanten, zum Beispiel aus dem serumhaltigen Kultivierungsmedium oder freigesetzt von sterbenden Zellen, können die MS-basierte Analyse beziehungsweise die Interpretation der Daten beeinträchtigen. Da sekretierte Proteine in konditioniertem Medium von humanen Zellen häufig in niedrigen Konzentrationen (ng/mL) vorkommen, können diese durch entsprechende Anreicherungsverfahren aufkonzentriert werden. Da bis dato noch kein verlässlicher Vorhersagealgorithmus für die unkonventionellen Sekretionswege existiert, kann lediglich die Bestimmung von klassisch sekretierten Proteinen durch entsprechende Vorhersagewerkzeuge gängiger Proteindatenbanken, wie zum Beispiel UniProt, erfolgen. Für die Identifizierung unkonventionell sekretierter Proteine gibt es allerdings experimentelle Ansätze, die auf der Analyse des Sekretoms durch quantitative Massenspektrometrie beruhen. Durch den Vergleich des Sekretoms mit dem Proteom eines bestimmten Zelltyps besteht die Mög-



Deutsche Gesellschaft für
Proteomforschung e.V.

TERMIN

**15.–19. September,
Adelaide (AUS)**
18th HUPRO conference 2019
<http://hupo2019.org>

lichkeit, Proteine, die signifikant im Sekretom angereicht sind, als mögliche Kontaminanten auszuschließen und als Kandidaten der unkonventionellen Proteinsekretion zu berücksichtigen. Die vorherige Abreicherung von extrazellulären Vesikeln (EV), durch zum Beispiel Ultrazentrifugation, erlaubt es, gezielt Proteine aus extrazellulären Vesikeln zu identifizieren.

Weiterhin können durch die Überprüfung der Sequenzabdeckung von im Sekretom identifizierten Membranproteinen Rückschlüsse auf die Freisetzung per Ectodomain shedding gezogen werden. Die Inhibition der klassischen Sekretion mittels Brefeldin A, einem Pilzgift, liefert Hinweise, ob Proteine mit einem Signalpeptid über einen sogenannten Golgi Bypass sekretiert werden können.

Basierend auf diesen experimentellen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass das humane Sekretom mit insgesamt rund 1.000 bis 2.000 experimentell bestimmbar Proteinen je nach Herkunft bis zu 50% unkonventionell sekretierte Proteine enthalten können. Somit stehen neue sekretierte Proteine, die bisher als Kontaminanten ohne extrazelluläre Funktion betrachtet wurden, für die Entwicklung neuer Therapeutika, der Identifizierung von Biomarkern, sowie für die Erforschung der auto-, endo- und parakrinen Signalweiterleitung im Organismus zur Verfügung.

Prof. Dr. Kai Stühler
kai.stuehler@uni-duesseldorf.de
Institut für Molekulare Medizin