

**Neuroregenerative Wirkung
von USSC durch parakrine Sekretion**
—
**Proteom- und Sekretomstudie von
Stammzellen aus Nabelschnurblut**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Heiner Falkenberg
geb. Behling, aus Herdecke

Düsseldorf, Januar 2014

aus dem Molecular Proteomics Laboratory (MPL)
des Instituts für Molekulare Medizin
am Universitätsklinikum Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Kai Stühler
Korreferent: Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 23.03.2014

Summary

Due to its multiple functions during embryogenesis, human umbilical cord blood contains a collection of cell types, especially stem cells. These umbilical cord blood-derived stem cells are a valuable alternative to embryonic stem cells in regenerative medicine. This study primarily focusses on the proteomic characterisation of two cord blood derived cell types: unrestricted somatic stem cells (USSC) and CD34⁺ hematopoietic stem cells.

USSC are multipotent stem cells with increasing importance for regenerative medicine. Recently, it was shown (Schira *et al.*, 2012) that USSC induce regeneration of neuronal cells after acute spinal cord injury. The underlying mechanism of regeneration is not based on differentiation but involves the secretion of regulatory factors, notably proteins, or a direct interaction with cells within the lesion site. This study highlights the capability of USSC, especially with respect to their potential use in therapy of acute spinal cord injury. The goal of the first part of the study was the identification of potential neurite outgrowth factors within USSC-secreted proteins, termed the secretome. Using multiple techniques, 1 608 proteins were identified within the USSC secretome, among them known neurite outgrowth factors. Interestingly, several proteins were predicted and identified as new potential neurite outgrowth factors.

In addition, the influence of proteins derived from the spinal cord lesion site on cultured USSC were investigated. Adaptions in the protein profile of transplanted cells were subject of a labelfree quantification proteomics approach, in which comparison of protein levels in the USSC secretome as well as in the whole cell were monitored. This approach revealed that both proteins derived from uninjured tissue and proteins derived from the lesion site result in changes in protein composition. Several proteins linked with a modification of cytoskeletal structures and the extracellular matrix were modified in their abundance.

Within the third part of the present study CD34⁺ cord blood cells were characterised. These cells are an important source for usage in allogenic stem cell transplantations but due to limitations in cell number their clinical application remains challenging. Therefore, CD34⁺ cells isolated from cord blood were cultured *ex vivo* for up to seven days. Little is known about changes within the CD34⁺ proteome during expansion. This study aimed to determine differences in protein composition of expanding cells. The proteome of uncultured and expanded cells was compared at different time points. Protein abundances showed only minimal influence of cytokines used during culturing. However, the proteome of CD34⁺ cord blood cells undergoes multiple changes throughout the duration of expansion.

Zusammenfassung

Menschliches Nabelschnurblut hat in der Embryonalentwicklung viele Funktionen. Unter anderem enthält es Stammzellen, die als Vorläuferzellen für verschiedene Zelltypen dienen können. Diese Nabelschnurblutstammzellen stellen für die regenerative Medizin eine wertvolle Alternative zu embryonalen Stammzellen dar. Diese Arbeit befasst sich primär mit der Charakterisierung der Proteine zweier Stammzelltypen aus dem Nabelschnurblut, den unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) und CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen.

USSC sind multipotente Stammzellen mit einer steigenden Bedeutung in der regenerativen Medizin. Erst kürzlich konnte gezeigt werden (Schira *et al.*, 2012), dass sie in der Lage sind, die Regeneration von neuronalen Zellen nach einer Rückenmarksläsion zu unterstützen. Diese Wirkung basiert nicht auf der Differenzierung von USSC, sondern auf parakrinen Mechanismen. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher das Sekretom dieser Zellen eingehend untersucht, um insbesondere Neuritenwachstumsfaktoren zu identifizieren, die von USSC an ihre Umgebung abgegeben werden. Durch Einsatz verschiedener Techniken konnten 1 608 Proteine innerhalb des USSC Sekretoms identifiziert werden, darunter auch potente Neuritenwachstumsfaktoren. Zusätzlich konnten mittels bioinformatischer Filtermethoden eine Reihe potentiell neuer Neuritenwachstumsfaktoren nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde im zweiten Teil der Einfluss der zellulären Umgebung in der Läsionsstelle auf transplantierte USSC untersucht. Dazu wurde in einer *in vitro* Studie durch markierungsfreie Quantifizierung das Proteom sowie das Sekretom von USSC analysiert, die mit Gewebelysat aus dem Rückenmark behandelt wurden. Es konnte sowohl ein Einfluss von intaktem Rückenmarksgewebe festgestellt werden, als auch eine spezielle Reaktion der Zellen auf die Behandlung mit Gewebe aus der Läsionsstelle. Auch konnte eine permanente Veränderung des Proteoms sowie des Sekretoms dieser Zellen beobachtet werden. Mehrere Proteine, deren Funktion in der Modifizierung des Zytoskelletes und der Extrazellulärmatrix liegt, wurden durch eine Behandlung in ihrer Abundanz verändert.

Der dritte Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut. Diese Zellen werden bereits bei allogenen Stammzelltransplantationen eingesetzt. Um eine ausreichende Zahl an Zellen für eine Transplantation zur Verfügung zu haben, werden CD34⁺ Zellen *ex vivo* expandiert. Hier wurden die intrazellulären Prozesse untersucht, die während der Expansion ablaufen. Dazu wurde das Proteom von unkultivierten Zellen mit dem Proteom von expandierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten quantitativ miteinander verglichen. Das Ergebnis zeigt, dass der direkte Einfluss der Kulturbedingungen wie beispielsweise Cytokine nur gering ist, aber das Gesamtproteom sich über die Zeit verändert.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Rückenmarksverletzungen	1
1.1.1	Regenerationsfähigkeit des zentralen Nervensystems	2
1.1.2	Pathologie der Nervenverletzung im ZNS	2
1.1.3	Therapieansätze zur Unterstützung der Nervenregeneration	4
1.2	Stammzellen aus dem Nabelschnurblut	5
1.2.1	Stammzellen	5
1.2.2	Nabelschnurblut als Stammzellquelle	6
1.2.3	Stammzellen im Nabelschnurblut und ihr klinischer Einsatz	7
1.2.3.1	Nabelschnurblut-MSC und USSC	7
1.2.3.2	Transplantation von USSC zur Behandlung von Rückenmarksverletzungen	8
1.2.3.3	CD34 ⁺ hämatopoetische Stammzellen	9
1.3	Proteomik	10
1.3.1	Massenspektrometrie-basierte Proteinidentifizierung und -quantifizierung	10
1.3.1.1	Trennung von Peptiden mit RP-HPLC	11
1.3.1.2	Massenspektrometrie	12
1.3.1.3	Bioinformatische Datenanalyse	15
1.3.1.4	Quantifizierung von Proteinen	15
1.3.2	Proteomik von Nabelschnurblutzellen	17
1.3.3	Sekretomstudien	18
1.3.4	Sekretion von Proteinen	18
1.3.4.1	Klassische Sekretion	19
1.3.4.2	Nicht-klassische Sekretion	20
2	Zielsetzung	21

3	Material und Methoden	23
3.1	Chemikalien	23
3.2	Antikörper	23
3.3	Rekombinante Proteine	24
3.4	Geräte	24
3.5	Zellkultur	25
3.5.1	Nabelschnurblutentnahme	25
3.5.2	Isolation von CD34 ⁺ hämatopoetischen Stammzellen	25
3.5.3	Expansion von CD34 ⁺ hämatopoetischen Stammzellen	25
3.5.4	Zellaufschluss	26
3.5.5	Zellkultur von USSC	26
3.5.6	Generierung von konditioniertem Medium	26
3.5.7	Kultivierung von primären kortikalen Neuronen aus Ratten- gehirn	27
3.5.8	Immunohistochemie	27
3.5.9	Neuritenwachstumsassay	27
3.5.10	Validierung	28
3.5.11	Tiere	28
3.5.12	Behandlung von USSC mit Läsionslysate	29
3.6	Proteinbiochemische Methoden	29
3.6.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	29
3.6.2	Konzentrationsbestimmung von Peptiden mittels Aminosäu- reanalyse	29
3.6.3	Gelelektrophorese	30
3.6.3.1	Silberfärbung	30
3.6.3.2	Entfärben und Waschen	31
3.6.4	Enzymatische Spaltung von Proteinen	31
3.6.5	Immunodetektion durch Western Blotting	31
3.6.5.1	Semidry-Blotting	31
3.6.5.2	Immunodetektion	31
3.6.6	Antikörper Mikroarray	32
3.6.7	Größenausschlusschromatographie	33
3.6.8	Proteinfällung	34
3.7	Proteinidentifizierung und -quantifizierung	34
3.7.1	RP-HPLC	34
3.7.2	Massenspektrometrie	34
3.7.3	Identifizierung von Proteinen	35
3.7.3.1	USSC-Sekretom	35
3.7.3.2	USSC-Zellysate	35
3.7.3.3	Zellysate von CD34 ⁺ hämatopoetischen Stammzellen	36
3.7.4	Bioinformatik	36

4	USSC-Sekretom	37
4.1	Ergebnisse	37
4.1.1	Sekretomanalyse	38
4.1.1.1	Massenspektrometrie-basierte Proteinidentifizierung	39
4.1.1.2	Analyse von USSC-Sekretom mit einem Antikörper-Microarray	40
4.1.2	Charakterisierung der USSC-Sekretomproteine	40
4.1.2.1	Subzelluläre Lokalisation der identifizierten Proteine	41
4.1.2.2	Signalwege und biologische Prozesse der identifizierten Proteine	43
4.1.3	Charakterisierung des USSC-Sekretoms anhand von Neuritenwachstumsassays	44
4.1.3.1	Etablierung der automatisierten Analyse des Neuritenwachstums im Hochdurchsatzverfahren	44
4.1.3.2	Temperaturdegradation des USSC-KM	45
4.1.3.3	Konzentrationsreihe USSC-Sekretom	48
4.1.3.4	Fraktionierung von USSC-Sekretom	48
4.1.4	USSC-Sekretom im Vergleich mit anderen Zelllinien	49
4.1.4.1	Vergleich der Sekretome basierend auf LC-MS Daten	50
4.1.4.2	Analyse von MSC-Sekretom mit einem Antikörper-Microarray	51
4.1.5	Bekannte Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom	52
4.1.6	Datenbank mit bekannten Neuritenwachstumsfaktoren	53
4.1.6.1	In Literatur beschriebene Neuritenwachstumsfaktoren	53
4.1.6.2	Suche nach neuen Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom	55
4.1.7	Validierung einzelner identifizierter Neuritenwachstumsfaktoren	55
4.1.7.1	Neutralisation von Kandidatenproteinen	58
4.1.7.2	Wirkung rekombinanter Kandidatenproteine	59
4.2	Diskussion	60
4.2.1	Identifizierung von USSC-sekretierten Proteinen	63
4.2.2	USSC als Modulatoren der Extrazellulärmatix	63
4.2.3	Sekretion von Cytokinen durch USSC	65
4.2.4	Bekannte Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom	65
4.2.5	Vergleich vom USSC-Sekretom mit anderen Zelllinien	67
4.2.6	Neue potentielle Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom	68
4.3	Fazit	69

5	Veränderungen von USSC durch Transplantation in Rückenmarksgewebe	71
5.1	Ergebnisse	71
5.1.1	Proteom von USSC nach Behandlung mit Gewebelysat aus murinem Rückenmark	72
5.1.2	Quantifizierung der Veränderungen im USSC-Proteom	73
5.1.2.1	Statistische Auswertung	73
5.1.2.2	Signifikante Veränderung durch Inkubation mit Läsionslysat	74
5.1.2.3	Einfluss einer längeren Inkubationsdauer	78
5.1.2.4	Vergleich von behandelten und unbehandelten USSC	82
5.1.2.5	Quantifizierung und Identifizierung von CD-Antigenen zur Charakterisierung von USSC	82
5.1.3	Sekretomanalyse von behandelten USSC	82
5.1.4	Quantifizierung von Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom	84
5.2	Diskussion	86
5.2.1	Einfluss einer Behandlung mit Rückenmarksllysat aus einer Läsionsstelle	87
5.2.2	Einfluss einer Behandlung mit Rückenmarksllysat	88
5.2.3	Veränderung des Phänotypes	89
5.2.4	Sekretomanalyse von behandelten USSC	89
5.2.5	SPARC im USSC-Zelllysat und USSC-Sekretom	90
5.3	Fazit	90
6	Expansion von CD34⁺ hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen	92
6.1	Ergebnisse	92
6.1.1	<i>ex vivo</i> -Expansion von CD34 ⁺ hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen	93
6.1.2	Erstellung von Proteomprofilen während der <i>ex vivo</i> -Expansion	93
6.1.3	Regulierte biologische Prozesse während der <i>ex vivo</i> -Expansion	98
6.1.4	Zytometrische Validierung von ausgewählten Oberflächenmarkerproteinen	101
6.1.5	Cytokinbedingte Proteomveränderungen	101
6.2	Diskussion	101
6.3	Fazit	104
7	Ausblick	106
8	Literaturverzeichnis	107
A	Tabellen	XII

B Erklärung

XIV

Abbildungsverzeichnis

1.1	Anatomie des Rückenmarks	3
1.2	Ablauf eines typischen Proteomik-Experiments	11
1.3	Prinzip der Elektrosprayionisation	12
1.4	Querschnitt des Orbitrap-Massenanalysators	13
1.5	Fragmentierungsmuster von Peptiden	14
1.6	Quantifizierung von Proteinen	16
1.7	Sekretion von Proteinen	19
4.1	Ablauf der USSC-Sekretomanalyse	38
4.2	Cytokin-Array	41
4.3	Venn-Diagramm der sekretierten Proteine	43
4.4	Primäre kortikale Neurone nach Inkubation mit USSC-KM	46
4.5	Einfluss der Inkubationszeit von primären Neuronen in USSC-KM	47
4.6	Temperaturdegradation von USSC-KM	48
4.7	Effekt der Verdünnung von USSC-KM	49
4.8	Fraktionierung von USSC-KM mittels SEC	50
4.9	Sekretierte Proteine von MSC, Fibroblasten und USSC	51
4.10	Inhibierung von SPARC und PEDF in USSC-KM	59
4.11	Inhibierung von SPARC und PEDF in USSC-KM	60
4.12	Zugabe von SPARC in unkonditioniertes Medium	61
4.13	Zugabe von PEDF in unkonditioniertes Medium	62
4.14	Zugabe von Cystatin C in unkonditioniertes Medium	62
5.1	Experimenteller Ablauf bei der Proteomanalyse von USSC nach si- mulierter Transplantation in Rückenmarksgewebe	72
5.2	Subzelluläre Lokalisation der Proteine aus USSC-Zelllysat	74
5.3	Vergleich der relativen Proteinintensitäten im USSC-Zelllysat	75

5.4	Hauptkomponentenanalyse Läsionsexperiment	76
5.5	Vergleich von unterschiedlich behandelten USSC	78
5.6	Expression von vier Proteinen, die nach Inkubation mit Läsionslysat in USSC differentiell vorhanden sind	79
5.7	Anzahl zeitabhängig regulierter Proteine in unterschiedlich behan- delten USSC	80
5.8	Quantifizierung von SPARC im USSC-Zelllysat und Sekretom	85
5.9	Immunodetektion von SPARC im USSC-Zelllysat und Sekretom . . .	86
6.1	Experimentelles Vorgehen bei der Analyse von Proteomveränderun- gen während der Expansion von CD34 ⁺ Zellen	93
6.2	FACS von Nabelschnurblutzellen	94
6.3	Expansionsraten von Nabelschnurblutstammzellen und CD34 ⁺ Zellen	94
6.4	Hauptkomponentenanalyse der Proteinintensitäten in CD34 ⁺ Zellen	96
6.5	Paarweiser Vergleich der Proteinexpression an verschiedenen Tagen	97
6.6	Expression von PTPRC	100
6.7	Validierung der Proteinquantifizierung mittels Durchflusszytometrie	102
A.1	2D-PAGE von USSC-Sekretom	XIII

Tabellenverzeichnis

4.1	Strategien zur Analyse von USSC-Sekretom mittels LC-MS gekoppelter Proteomik	39
4.2	Proteine, die in einem Cytokin-Array positiv nachgewiesen wurden .	42
4.3	Signalwege, an denen Proteine des USSC-Sekretoms beteiligt sind . .	43
4.4	Bekannte sekretierte Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom	52
4.5	Eigenschaften von Neuritenwachstumsfaktoren	56
4.6	Kandidaten für Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom . .	57
4.7	USSC-sekretierte Proteine, die in weiteren Experimenten analysiert wurden	58
4.8	Ermittelte Proteinkonzentration nach der T3PQ-Methode	58
5.1	Proteine, die nach 24 h Inkubation mit Läsionslysat signifikant reguliert sind	76
5.2	Proteine, die nach 72 h nur durch Behandlung mit Läsionslysat signifikant reguliert sind	77
5.3	Proteine, die signifikant nach Behandlung reguliert sind	81
5.4	CD-Antigene im USSC-Zelllysat	83
5.5	Unterschiede zwischen dem Sekretom von USSC, die mit Rückenmarksgewebe behandelt wurden	84
6.1	Anzahl an Proteinen mit entsprechenden Expressionsprofilen von Tag 0 nach Tag 7	96
6.2	Beispiele angereicherter biologischer Prozesse innerhalb der signifikant regulierten Proteine	99

Einleitung

1.1 Rückenmarksverletzungen

Als Rückenmark wird der Teil des zentralen Nervensystems (ZNS) bezeichnet, der sich in der Wirbelsäule befindet. Es enthält auf- und absteigende Nervenbahnen sowohl sensorischer als auch motorischer Neurone. Darüber hinaus befinden sich im Rückenmark propriospinale Interneurone, deren Zellkörper die graue Substanz bilden. Das Rückenmark leitet Informationen von Haut, Gelenken und Muskeln des Körpers zum Gehirn und zurück.

Eine Schädigung des Rückenmarks, sei es eine teilweise oder eine komplette Durchtrennung oder Quetschung des Rückenmarks, geschieht in der Regel durch ein mechanisches Trauma, gefolgt von lokaler Ischämie und einer inflammatorischen Kaskade. Auf zellulärer Ebene sterben betroffene Zellen ab, Nervenbahnen gehen verloren und es entsteht ein durch Astrozyten gebildetes Narbengewebe (Glianarben) bzw. eine fibröse Narbe, die eine selbstständige Regeneration verhindert.

In vielen Fällen führen traumatische Hirn- und Rückenmarksverletzungen zu dauerhaften Funktionsverlusten (z. B. Querschnittlähmung) mit ernsthaften Konsequenzen für den Patienten. Akut kommt es zu einem teilweisen Ausfall des Sympathicus (u. a. Blutdruckabfall, Ausfall der Blasenfunktion). Langfristig bleiben Bewegungsstörungen, Sensibilitätsverlust, vegetative Störungen und neuropathischer Schmerz. Der Grad der Einschränkung hängt dabei vom Grad der Durchtrennung des Rückenmarks ab. Eine heilende Therapie ist zurzeit nicht verfügbar.

Im Durchschnitt treten in den USA im Jahr etwa 40 Fälle von Rückenmarksläsionen pro einer Million Einwohner auf. Dort leben zurzeit 273 000 Menschen mit dieser Verletzung. Die häufigsten Gründe für die Erkrankung sind Autounfälle (36,5 %), Stürze (28,5 %), Gewalteinwirkung insbesondere durch Waffeneinwirkung (14,3 %), sowie Sportunfälle (9,2 %), wobei überproportional häufig (80,7 %) Männer betroffen sind. (National Spinal Cord Injury Statistical Center, 2013)

1.1.1 Regenerationsfähigkeit des zentralen Nervensystems

Lange Zeit wurde angenommen, dass neurale Zellen des humanen ZNS unfähig sind, zu regenerieren. Im Jahr 1928 wurde von Cajal (1928) das Dogma aufgestellt, dass das menschliche Gehirn nicht zur Regeneration von abgestorbenen Nervenzellen in der Lage ist. Wird ein Axon durchtrennt, ließen sich grundsätzlich die beiden Nervenfasernenden nicht mehr miteinander zu einer intakten Nervenfaserverbindung verbinden. Die Signalweiterleitung vom Gehirn zu den Organen bliebe folglich irreparabel unterbrochen (Abb. 1.1). Distal der Läsion kommt es zur Wallerschen Degeneration und damit zum Verlust der Myelinscheide. Im Gegensatz zum peripheren Nervensystem, bei dem die verbliebenen Axonstümpfe auswachsen, kann der proximale Stumpf im ZNS nicht erneut auswachsen.

David und Aguayo (1981) konnten jedoch durch eine Transplantation von peripheren Nerven in verletztes Rückenmarksgewebe zeigen, dass eine Regeneration von Nervenzellen des ZNS grundsätzlich möglich ist und damit das Dogma von Cajal (1928) widerlegen. Gleichzeitig konnte ein inhibitorischer Einfluss des Gewebes im ZNS auf die Regenerationsfähigkeit verletzter Axone festgestellt werden. Die Nutzung dieser Regenerationsfähigkeit ist insbesondere für die Entwicklung klinischer Therapien wichtig (s. Kapitel 1.1.3).

1.1.2 Pathologie der Nervenverletzung im ZNS

Im Falle einer Nervenverletzung im ZNS ist der sofortige Effekt zunächst die Unterbrechung von Nervenbahnen und eine verhinderte Signalweiterleitung (Abb. 1.1). Gleichzeitig löst die Verletzung weitere Reaktionen in Glia- und Stützzellen aus. Die Verletzung der Zellmembran führt zur Freisetzung von Glutamat, Radikalen und radikalen Sauerstoffspezies (ROS). Durch Blutgefäßverletzung dringt Blut in die Wunde ein und Eisen wird freigesetzt. Parallel wird die Blutversorgung unterbrochen. Exitotoxische Substanzen dringen in die Läsionsstelle ein und führen zur weiteren Schädigung von Nervengewebe. Parallel kommt es zu einer Entzündungsreaktion, durch die aktivierte Immunzellen zur Läsionsstelle wandern.

Als weitere Reaktion des Körpers dringen Fibroblasten, Astrozyten, Endothel- sowie Mikrogliazellen in das Läsionszentrum ein (Fleming *et al.*, 2006). Sie bewirken

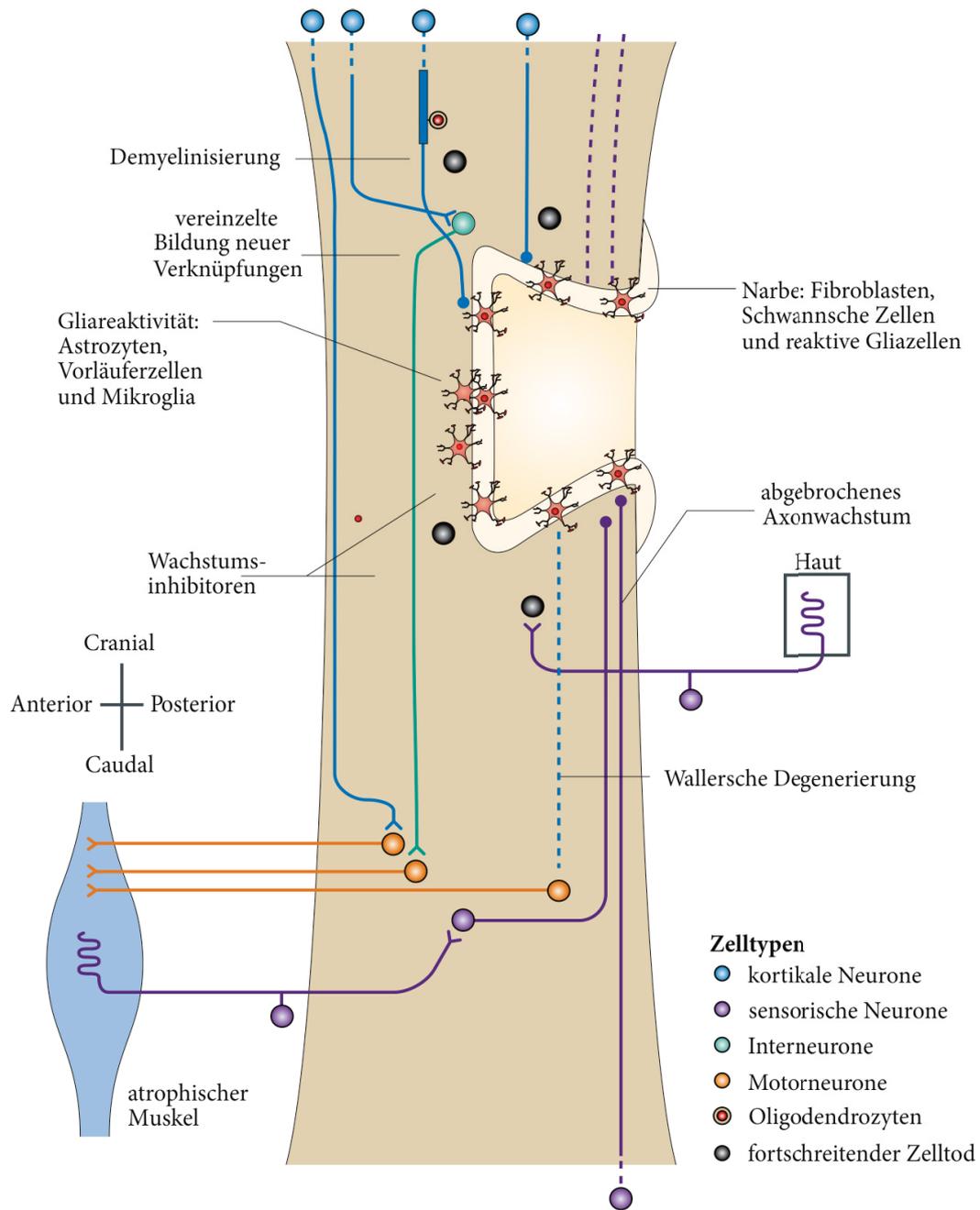


Abbildung 1.1 – Anatomie des Rückenmarks nach Läsion: Bereits eine partielle Durchtrennung des Rückenmarks führt zur Unterbrechung der Signalweiterleitung zwischen Gehirn und Organen. Die Regeneration der durchtrennten Nervenstränge wird unter anderem durch die Bildung einer Narbe aus Gliazellen und Fibroblasten unterdrückt. Verbliebene Axonstümpfe sterben durch Wallerische Degeneration ab. Durch fortschreitenden Zelltod und die Sekretion von Wachstumsinhibitoren wird die Bildung neuer Verknüpfungen zunächst verhindert. Um die Folgen einer Rückenmarksläsion zu lindern, werden verschiedene Therapieansätze verfolgt, wie z. B. die Transplantation von Stammzellen in das lädierte Gewebe. (modifiziert nach Thuret *et al.* (2006))

eine Remodellierung der extrazellulären Matrix (ECM) und fördern die Bildung einer fibrösen Wund-/Glianarbe. Diese Narbe verschließt, ähnlich wie bei anderen Verletzungen im Körper, die Wunde und verhindert das Eindringen von schädlichen Substanzen in gesundes Gewebe. Gleichzeitig unterdrückt sie aber auch das Wachstum von Axonen über die Läsionsstelle hinaus. Einzelne Neurone können sich zwar spontan regenerieren (Abb. 1.1), allerdings stoppt das Axonwachstum bei Erreichen der Glianarbe (Grimpe und Silver, 2002; Klapka und Müller, 2006; Stichel und Müller, 1998). Nach ein bis zwei Tagen ziehen sich die verletzten Axone zurück (Beattie *et al.*, 1997). Distale Axonstümpfe werden durch Wallersche Degeneration abgebaut (Becerra *et al.*, 1995). Durch die Sekretion von inhibitorischen Faktoren, unter anderem durch das Narbengewebe, wird die Axonregeneration weiter verhindert (Skaper, 2012).

1.1.3 Therapieansätze zur Unterstützung der Nervenregeneration

Die Therapie von Rückenmarksläsion ist ein Feld intensiver Forschung. Um geeignete Therapiekonzepte zu testen wird Ratten durch einen operativen Eingriff ein Teil des Rückenmarks entfernt oder durch Quetschung lädiert (Rivlin und Tator, 1978). Ziel bei der Entwicklung klinischer Therapien von Rückenmarksläsionen ist es, die Funktionsfähigkeit der Neurone wiederherzustellen und damit eine Steigerung der Mobilität des Patienten zu gewährleisten. Hierfür gibt es unterschiedliche Konzepte. Bei molekularen Therapien wird durch die Injektion oder Überexpression von Wachstumsfaktoren (z. B. BDNF¹, NT-3, NGF, SDF-1) oder anti-inhibitorischer Substanzen (z. B. NEP1–40, einem NOGO-antagonistisches Peptid) versucht das Neuritenwachstum positiv zu beeinflussen. Bei zellbasierten Therapien werden Zellen in die Läsionsstelle transplantiert. Diese sollen helfen, die Läsionsstelle zu überbrücken, neue Neurone zu bilden, die Myelinisierung vorhandener Neurone zu verbessern und durch parakrine Mechanismen die Neuroregeneration zu fördern. (Bradbury und McMahon, 2006; Thuret *et al.*, 2006)

Für eine Transplantation von ausdifferenzierten Zellen haben sich vor allem drei Zelltypen bewährt: olfaktorische Hüllzellen, periphere Nervenzellen aus dem Nervus saphenus und aktivierte Makrophagen. Bei diesen Zellen wird die Fähigkeit genutzt, dass sie neurotrophe Faktoren an ihre Umgebung abgeben können. Olfaktorische Hüllzellen beispielsweise sekretieren GDNF, einen neurotrophen Faktor, der das Neuritenwachstum und Neuronüberleben fördert. (Thuret *et al.*, 2006)

Für eine Transplantation in die Läsionsstelle wurden verschiedene Stammzellen und Stammzelltypen untersucht (Mortazavi *et al.*, 2011), darunter CD34⁺ häma-

¹Die Bezeichnung von Proteinen erfolgt in dieser Arbeit nach der Uniprot-Nomenklatur (Uniprot, 2013).

topoetische Stammzellen, embryonale Stammzellen (ESC) sowie mesenchymale Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark und aus dem Nabelschnurblut (Tetzlaff *et al.*, 2011). Eine neue vielversprechende Stammzellart für die Therapie von Rückenmarksläsion sind USSC aus Nabelschnurblut (Schira *et al.*, 2012), deren Verwendung in Kapitel 1.2.3 näher beschrieben wird.

Weitere Therapiekonzepte umfassen die Verzögerung der fibrösen Narbenbildung z. B. durch Eisenchelatoren (Klapka und Müller, 2006), die Implantation synthetischer Gerüste (Stokols und Tuszyński, 2004), Elektrostimulation (Ragnarsson, 2008), mechanische Brückenstrukturen sowie Stimulation durch physisches Training (Wernig und Müller, 1992). Vielversprechend sind zurzeit Kombinationen aus mehreren Ansätzen, da durch singuläre Therapien lediglich eine geringe funktionelle Verbesserung erzielt werden kann (Fouad *et al.*, 2005).

1.2 Stammzellen aus dem Nabelschnurblut

1.2.1 Stammzellen

Die Untersuchung von Stammzellen hat sich in den vergangenen Jahren unter anderem durch den positiven Einfluss bei Rückenmarkstherapien zu einem wichtigen Forschungsgebiet entwickelt. Ihre Bedeutung in der Embryonalentwicklung, der Organregeneration oder auch der Blutbildung machen sie für viele klinische Anwendungen relevant. Eine Stammzelle wird definiert als „klonale, selbst erneuerbare, multipotente Zelle, die in der Lage ist, unterschiedlich differenzierte Zelltypen auszubilden“ (Lanza, 2009). Stammzellen besitzen somit die Fähigkeit, mittels asymmetrischer Zellteilung weitere Stammzellen - also auch differenzierte Tochterzellen - zu generieren. Eine Unterscheidung der Stammzellen erfolgt anhand ihres Potentials, Tochterzellen der verschiedenen Keimblätter (mesoderm, endoderm, ektoderm) und damit verschiedene Gewebearten zu generieren. Totipotente Zellen können in Zellen aller drei Keimblätter sowie zusätzlich in Keimbahnzellen differenzieren und somit in einer geeigneten Umgebung komplette lebensfähige Organismen generieren. Pluripotente Stammzellen können lediglich in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren, während multipotente Stammzellen nur in der Lage sind, in Zellen eines Keimblattes zu differenzieren.

Neben der Einteilung nach ihrer Potenz werden Stammzellen außerdem anhand ihrer Spezifität für bestimmte Organe klassifiziert. Eine besondere Rolle nehmen dabei ESC ein. Aus ihnen können alle Zellen des menschlichen Körpers gebildet werden. Sie kommen ausschließlich in der Blastozyste vor (Thomson *et al.*, 1998), weshalb ihre Gewinnung und Verwendung mit ethischen Bedenken einhergehen. Neben den ESC existieren postnatale Stammzellen. Diese werden nach ihrer Herkunft unterteilt in fötale, neonatale sowie adulte Stammzellen. Zu adulten Stammzellen zählen unter

anderem hämatopoetische Stammzellen (HSC), neurale Stammzellen (NSC) und MSC, deren Charakteristika im Folgenden kurz erläutert werden.

HSC sind als adulte Stammzellen des Blutes (Lewis und Trobaugh, 1964) für die Bildung aller Blutzellen (Hämatopoese) zuständig und kommen primär im Knochenmark vor. Sie werden durch die Zellantigene CD45 und CD34 charakterisiert und im Folgenden basierend auf dem wichtigsten Antigen als "CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen" bezeichnet. Für klinische Therapien können CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen aus Knochenmark (Gluckman *et al.*, 1989), aus peripherem Blut oder aus Nabelschnurblut gewonnen werden. Sie konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in verschiedene Zelltypen differenziert werden, darunter Herzmuskelzellen, Skelettmuskelzellen oder Epithelzellen (Masson *et al.*, 2004).

NSC haben die Fähigkeit, sowohl in funktionsfähige Neurone, als auch in Gliazellen zu differenzieren. Sie kommen in der subventrikulären Zone des Lateralventrikels und Gyrus Dentatus des Hippocampus vor. *In vitro* bilden sie freischwebende, sphärische Cluster: sogenannte Neurosphären (Lanza, 2009).

MSC stellen Vorläuferzellen des Bindegewebes dar (Friedenstein *et al.*, 1968). Sie können ebenfalls aus dem Knochenmark isoliert werden, unterscheiden sich von HSC aber durch die fehlende Expression der hämatopoetischen Zellantigene CD45 und CD34. Multipotente MSC können in Zellen der Bauchspeicheldrüse, der Nieren, der Leber, der Lunge, des Skelettmuskels und sogar des Nervengewebes differenziert werden (Le Blanc und Pittenger, 2005). Als fibroblastenähnliche Zellen können MSC adhärent kultiviert werden. Knochenmark-MSK werden derzeit zur Reduktion von Abstoßungsreaktionen nach allogener Transplantation (Fang *et al.*, 2009), sowie bei der Behandlung von Herzinfarkten (Charwat *et al.*, 2008) eingesetzt.

Die Gewinnung adulter Stammzellen für Transplantationen (z. B. aus Knochenmark) setzt eine hohe Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger voraus und schränkt die Anzahl potentieller Spender ein. Eine alternative Quelle zur Gewinnung von Stammzellen ist das Blut der Nabelschnur. Die Vorteile bei der Verwendung von Nabelschnurblutzellen sind eine nicht-invasive Gewinnung, geringere ethische Bedenken und die Tatsache, dass die Zellen, basierend auf ihrer Telomerlänge, biologisch jünger sind (Kögler *et al.*, 2004).

1.2.2 Nabelschnurblut als Stammzellquelle

Die Nabelschnur stellt während der Schwangerschaft die Versorgung des Kindes mit Sauerstoff und allen lebensnotwendigen Nährstoffen sicher. Sie besteht überwiegend aus einem speziellen schleimigen Bindegewebe, der sogenannten Wharton-Sulze (*Wharton's Jelly*). Die Wharton-Sulze umschließt die Blutgefäße, welche im Inneren aus zwei Arterien und einer Vene bestehen (Can und Karahuseyinoglu, 2007). Eine

humane Nabelschnur wiegt etwa 40 g, hat eine Länge von 60–65 cm und einen Durchmesser von etwa 1,5 cm (Di Naro *et al.*, 2001; Raio *et al.*, 1999). Durch die größere Nabelvene wird mit Sauerstoff angereichertes Blut von der Plazenta über die fötale Leber in den Blutkreislauf geführt, während die beiden schmalere Nabelarterien sauerstoffarmes Blut aus der Aorta des Fötus zur Plazenta führen (Benirschke *et al.*, 2006).

Im Nabelschnurblut sind neben Erythrozyten und Leukozyten auch CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen, MSC und MSC-ähnliche Zellen enthalten (Erices *et al.*, 2000). Das Nabelschnurblut entstammt ausschließlich dem fötalen Kreislauf und ist vom maternalen Kreislauf getrennt. In der Plazenta erfolgt ein kontrollierter Austausch zwischen den beiden Blutkreisläufen. Dabei wird durch eine epitheliale und bindegewebige Schicht eine semipermeable Plazentaschranke gebildet, die für Blutzellen undurchlässig ist, den Austausch von Nährstoffen und Gasen aber ermöglicht.

Direkt nach der Geburt werden die Gefäße durch eine Konsistenzveränderung der Wharton-Sulze verschlossen und ein Blutverlust des Kindes verhindert. Das noch in der Nabelschnur verbliebene fötale Blut galt lange als medizinischer Abfall. Mittlerweile wird dieses Blut gezielt gesammelt um die darin enthaltenen Stammzellen für klinische Behandlungen oder für Forschungszwecke verwenden zu können. Dazu werden Nabelschnurblute direkt im Kreißsaal mit einer Spritze entnommen, an Nabelschnurblutbanken geliefert und dort unter GMP-Bedingungen (*Good Manufacturing Practice*, Gute Herstellungspraxis) aufgearbeitet, typisiert und bis zur Verwendung gelagert.

1.2.3 Stammzellen im Nabelschnurblut und ihr klinischer Einsatz

1.2.3.1 Nabelschnurblut-MSK und USSC

Nabelschnurblut-MSK können prinzipiell analog zu Knochenmark-MSK eingesetzt werden, solange sie unter GMP-Bedingungen generiert und expandiert wurden (Aktas *et al.*, 2010). Eine MSC-ähnliche Stammzellpopulation aus der mononukleären Fraktion des Nabelschnurblutes wurde von Kögler *et al.* (2004) als *unrestricted somatic stem/stromal cell* (USSC) bezeichnet. Sie unterscheiden sich von Nabelschnurblut-MSK durch ein fehlendes adipogenes Differentierungspotential (Kluth *et al.*, 2010) einhergehend mit der Expression von DLK-1 (Kluth *et al.*, 2013). Weiter unterscheiden sie sich in ihrer Expression der HOX-Gene (Liedtke *et al.*, 2010), die bei USSC unterdrückt ist, und ihrem immunologischen Verhalten (van den Berk *et al.*, 2009; Winter *et al.*, 2009). Gemein haben beide Zelltypen, *in vitro* wie auch *in vivo*, die Fähigkeit zur osteogenen und chondrogenen Differenzierung (Kögler *et al.*, 2005, 2006).

Unter speziellen Mediumbedingungen können USSC *in vitro* auch in neuronähnliche Zellen mit dopaminergem Charakter differenzieren (Greschat *et al.*, 2008; Iwaniuk *et al.*, 2011; Trompeter *et al.*, 2011). Eine Differenzierung in funktionsfähige Neurone ist bisher nicht möglich.

MSC aus dem Nabelschnurblut werden als Transplantat in mehreren klinischen Versuchsreihen eingesetzt, darunter die Behandlung von Leukämie, multipler Sklerose oder Rückenmarksläsion (U.S. Department of Health and Human Services, 2013). USSC hingegen werden bisher noch nicht in entsprechenden klinischen Studien eingesetzt, auch wenn in mehreren Experimenten ein vielversprechendes Potential dieses Zelltyps beschrieben wurde. USSC eignen sich für allogene Transplantation, weil sie kein tumorbildendes Potential besitzen. Des Weiteren kann ihre Gewinnung unter GMP-Bedingungen und ohne invasiven Eingriff erfolgen (Aktas *et al.*, 2010).

Auf die Verwendung von USSC zur Unterstützung der Neuronregeneration nach Rückenmarksläsion wird in Kapitel 1.2.3.2 näher eingegangen. Eine weitere mögliche Anwendung von USSC ist die Therapie von Myokardinfarkten. USSC können *in vitro* in myokardiale Zellen differenzieren, wenn sie in Co-Kultur mit Cardiomyocyten wachsen. Diese Beobachtung konnte in einem Tiermodell, wenn auch nur mit einer geringeren Anzahl an differenzierenden USSC-Zellen, bestätigt werden (Ding *et al.*, 2012). In einem Akuten-Herzinfarkt-Modell wurde gezeigt, dass USSC zu einer reduzierten Narbenbildung und einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion führen (Ghodsizad *et al.*, 2009, 2011).

Im adulten Schaf sind USSC in der Lage, die hepatische Regeneration nach Embolisation der Leberportalvene zu unterstützen. Dieser Effekt wird durch parakrine Sekretion hervorgerufen (Ghodsizad *et al.*, 2012).

Eine Co-Kultur von USSC und CD34⁺ Stammzellen führt zu einer Erhöhung der Expansionsrate der HSC, während im Vergleich dazu die Co-Kultur von MSC und CD34⁺ Stammzellen nicht zu einer Verstärkung führt (Kögler *et al.*, 2005). USSC unterstützen das Anwachsen von CD34⁺ Stammzellen, wenn sie parallel in immundefiziente Mäuse injiziert werden. Weil gerade dies der kritische Punkt für den Erfolg einer allogenen Transplantation ist, können USSC in Zukunft dazu beitragen, die Sterblichkeit in Folge von früher Abstoßung des Transplantats zu verringern.

1.2.3.2 Transplantation von USSC zur Behandlung von Rückenmarksverletzungen

Eine weitere vielversprechende Anwendung von USSC ist der Einsatz zur Behandlung von Rückenmarksverletzungen. Dazu wurden in *in vivo* Experimenten USSC in das lädierte Rückenmark von Ratten transplantiert (Schira *et al.*, 2012). In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass USSC in die Läsionsstelle migrieren und auf bisher noch unbekanntem Wege zu signifikantem Axonwachstum sowie

einer funktionellen lokomotorischen Erholung führen. Eine Differenzierung der USSC in neurale Zellen konnte *in vivo* bisher nicht beobachtet werden. (Schira *et al.*, 2012)

In Folge einer Transplantation von USSC 2 mm rostral und caudal der Läsion in das verletzte Rückenmarksgewebe von Ratten, so konnte bereits nach sechs Wochen eine funktionelle Verbesserung der Lokomotion festgestellt werden. Es wurde gezeigt, dass die USSC dabei in die Läsionsstelle migrieren. *In vitro* chemotaktische Versuche haben gezeigt, dass diese Migration überwiegend durch HGF hervorgerufen wird (Schira *et al.*, 2012), welches als Chemoattraktant für USSC (Trapp *et al.*, 2008) wirkt und vom umliegenden Gewebe in der Läsionsstelle sekretiert wird.

Bisher gibt es keinen Nachweis dafür, dass die neuroregenerative Wirkung von USSC durch eine Differenzierung dieser Zellen verursacht wird. Möglich ist, dass USSC durch parakrine Mechanismen auf ihre zelluläre Umgebung wirken. Denkbar ist aber auch, dass die regenerative Wirkung von USSC über Zell-Zell-Interaktion vermittelt wird. Untersuchungen zur Ermittlung der für das verstärkte Neuritenwachstum und verbesserte Neuronüberleben verantwortlichen Faktoren fehlen bisher. Die vielversprechenden Funktionen von USSC bei der Regeneration und der Wundheilung (Ghodsizad *et al.*, 2009, 2011; Kögler *et al.*, 2005) weisen darauf hin, dass USSC potente Faktoren sekretieren, mittels derer sie die Zellen in ihrer Umgebung beeinflussen können (Ghodsizad *et al.*, 2012; Kögler *et al.*, 2005; Schira *et al.*, 2012). In einer Studie von Kögler *et al.* (2005) wurden gezielt erste, durch USSC sekretierte, Proteine identifiziert. Mittels des gerichteten Nachweises durch Cytokin-Mikroarrays konnte gezeigt werden, dass USSC in serumhaltigem Medium LIF, VEGF, SCF, TGF- β , CSF, IL-6, IL-8, IL-11 sowie SDF-1 sezernieren. Die weitergehende Untersuchung des USSC-Sekretoms ist Ziel dieser Arbeit. Eine genaue Kenntnis über USSC-sezernierte Proteine kann zu einem gezielteren Einsatz der USSC in der Therapie von Rückenmarksläsionen beitragen.

1.2.3.3 CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen

CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen aus dem Nabelschnurblut sind für Stammzelltransplantationen nach Radio- oder Chemotherapie bei vielen hämatologischen Erkrankungen (z. B. Leukämie) von großer Bedeutung. Bei der allogenen Transplantation dieser Zellen ist es eine Herausforderung, eine hohe Übereinstimmung der humanen Leukozytenantigen (HLA)-Klassifizierung zu erzielen, um immunologische Abwehrreaktionen des Transplantats (*graft-versus-host-disease*) zu verhindern. Nabelschnurblut-Transplantationen sind dabei, verglichen mit Knochenmarktransplantationen, weniger anfällig bei HLA-Unterschieden zwischen Spender und Empfänger (Laughlin *et al.*, 2004). Dazu kommt eine geringere Inzidenz viraler Belastungen, aber gleichzeitig leider auch ein langsames Anwachsen der Zellen sowie die Begrenzung der Zellzahl im Transplantat (Rocha und Gluckman, 2006).

Letzteres kann durch die Verwendung mehrerer Transplantate für einen Empfänger umgangen werden (Barker *et al.*, 2005; Wagner und Gluckman, 2010) oder alternativ durch eine Expansion der hämatopoetischen Zellen *in vitro* eine höhere Zellzahl erzielt werden (Bruno *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2008).

Bei der *ex vivo*-Expansion von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen aus dem Nabelschnurblut werden Cytokine zur Unterstützung des Zellwachstums eingesetzt (Qiu *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2005). Aufgrund mehrerer Herausforderungen wird diese Methode jedoch kontrovers diskutiert (Kelly *et al.*, 2009). Zum einen wird bei klinischen Versuchsreihen lediglich ein kleiner Teil des Nabelschnurblutes *ex vivo* expandiert, während der Rest unbehandelt bleibt. Daher kann das expandierte Produkt erst etwa 10–14 Tage nach Transplantation verabreicht werden. Eine Alternative hierzu wäre die Transplantation von einer *ex vivo* expandierten Einheit zusammen mit einer zweiten, nicht-manipulierten Einheit. Zum anderen sind nicht alle Cytokine und Wachstumsfaktoren in klinischer Reinheit verfügbar. Jene, die verfügbar sind, sind teuer in der Anschaffung und schränken aufgrunddessen eine routinemäßige Anwendung ein.

Eine Alternative zur Verbesserung der Ansiedlung transplantierte Zellen kann auch die Co-Transplantation einer einzelnen Nabelschnurbluteinheit zusammen mit hoch aufgereinigten, mobilisierten CD34⁺ Stammzellen aus dem peripheren Blut eines haploidenten Spenders sein (Fernández, 2009). Dieser steht jedoch nicht immer zur Verfügung. Eine weitere Möglichkeit ist die schnelle Expansion von CD34⁺ Stammzellen durch die Regulation der Sekretion von parakrinen Faktoren (Csaszar *et al.*, 2012). Von Delaney *et al.* (2010) wurde darüber hinaus eine Notch-unterstützte *ex vivo*-Expansion von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen beschrieben. Die Verwendung expandierter Zellen wird zurzeit in umfangreichen klinischen Studien evaluiert (U.S. Department of Health and Human Services, 2013). Ob und wie sich das Proteom der Zellen während der *ex vivo*-Expansion mit Cytokinen verändert, konnte allerdings noch nicht gezeigt werden. Zwar sind die expandierten CD34⁺ Zellen gut charakterisiert (Amirizadeh *et al.*, 2013; Zanette *et al.*, 2013), aber eine zeitaufgelöste Analyse der gesamten Proteine über die Expansionsdauer fehlt bisher und ist ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit.

1.3 Proteomik

1.3.1 Massenspektrometrie-basierte Proteinidentifizierung und -quantifizierung

Flüssigchromatographie- (LC) und Massenspektrometrie- (MS) basierte Proteomik erlaubt die gleichzeitige Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen in kom-

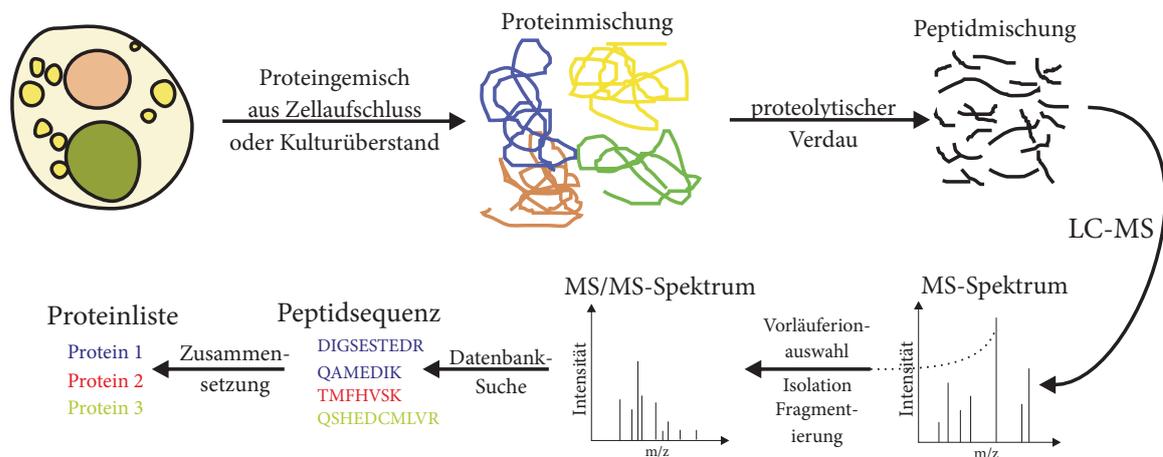


Abbildung 1.2 – Ablauf eines typischen Proteomik-Experiments: Nach Zellaufschluss und Aufreinigung wird die Proteinmischung mit Proteasen (typischerweise Trypsin) in Peptide gespalten. Diese werden anschließend über HPLC aufgetrennt, über ESI in die Gasphase überführt und mit MS und MS/MS analysiert. Ein Messzyklus besteht darin, die Ionen mit den intensivsten Signalen im MS-Spektrum zu isolieren und zu fragmentieren. Anhand der Massen der Fragmentionen und der Vorläuferionmasse wird eine Datenbanksuche durchgeführt und die Sequenz der Peptide nachgewiesen. Im letzten Schritt werden die identifizierten Peptide zu Proteinen zusammengesetzt.

plexen Gemischen (Bantscheff *et al.*, 2012). Zur Proteinidentifizierung werden die zu analysierenden Proteine aus Zelllysaten oder Zellkulturüberständen proteolytisch verdaut. Die so entstandenen Peptide werden in der Regel über RP-HPLC (Umkehrphasen-Hochdruckflüssigchromatographie) aufgetrennt und sequentiell ins Massenspektrometer überführt. Der Ablauf eines typischen Proteomik-Experimentes ist in Abb. 1.2 dargestellt.

Die massenspektrometrische Analyse erfolgt in der Regel auf Basis der Peptide, die durch proteolytischen Verdauung der Proteine generiert werden. Hier kommt in der Proteomforschung typischerweise die Serinprotease Trypsin zum Einsatz. Sie spaltet Proteine hauptsächlich C-terminal hinter Arginin und Lysin und generiert so Peptide mit einer durchschnittlichen Länge von zehn Aminosäuren mit einer Ladung von +2 oder +3.

1.3.1.1 Trennung von Peptiden mit RP-HPLC

Die Umkehrphasen (*reversed phase*, RP)-HPLC stellt eine etablierte Methode zur Peptidauftrennung in der Proteinanalytik dar. Das Grundprinzip der Trennung basiert auf hydrophoben Wechselwirkungen der Analyten mit der unpolaren stationären Phase. Die Elutionsreihenfolge ist abhängig von der Hydrophobizität der Analyten. Je hydrophiler ein Analyt, desto stärker ist seine Verteilung in der hydrophilen, mobilen Phase und desto eher eluiert er von der Säule. Als stationäre Phase kommen unpolare Kohlenwasserstoffketten (C₈ – C₁₈) zum Einsatz. Als mobile Phase werden

polare, wässrige Lösungsmittel verwendet, wohingegen die Elution mit unpolaren, organischen Lösungsmitteln (Acetonitril) erfolgt. Zur Verbesserung der Auftrennung werden Ionenpaarreagenzien, wie z. B. Trifluoressigsäure oder Ameisensäure, hinzugegeben. Sie verstärken die Hydrophobizität, indem sie mit ihrem geladenen Molekülteil an die ionischen Seitenketten binden, während der ungeladene Molekülteil dem Lösungsmittel zugewandt ist.

1.3.1.2 Massenspektrometrie

Der Aufbau aller Massenspektrometer geht auf ein grundlegendes Prinzip zurück. Zunächst werden die Analyten gegebenenfalls in die Gasphase überführt und ionisiert, dann mittels eines Massenanalysators nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) aufgetrennt und letztlich mittels eines Detektors nachgewiesen (Lottspeich und Engels, 2006). Die Analyse von Peptiden mit Elektrosprayionisation (ESI)-MS, die überwiegend in Kopplung mit der HPLC zum Einsatz kommt, basiert auf der feinen Verteilung der gelösten Analytionen mittels einer dünnen Kapillarnadel im elektrischen Feld. In Abb. 1.3 ist der Ablauf der ESI schematisch dargestellt. Durch das starke elektrische Feld ($2\text{-}5\text{ kV/cm}$), welches zwischen der Nadel und der Einlassöffnung des Massenspektrometers angelegt ist, werden kleine Tröpfchen mit einem Durchmesser von etwa $10\text{ }\mu\text{m}$ gebildet. Das Lösungsmittel in den Tropfen desolvatisiert und die Ladungsdichte nimmt zu (Chait und Kent, 1992). Zurück bleiben geladene Analytionen, die durch Addition oder Verlust eines oder mehrerer

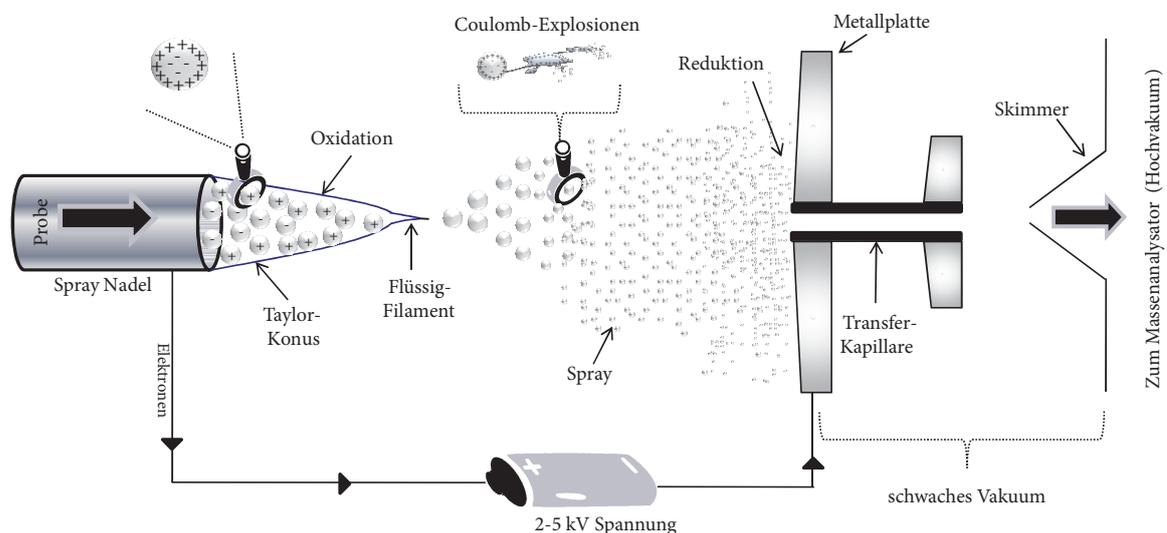


Abbildung 1.3 – Prinzip der Elektrosprayionisation: Die Analytlösung wird in einem elektrischen Feld unter Atmosphärendruck in Richtung der Einlassöffnung des Massenanalysators versprüht. Das Spray formt den charakteristischen Taylor-Konus und zerfällt dabei in einzelne feine Tröpfchen. Durch Desolvatisierung des Lösungsmittels nimmt die Tröpfchengröße stetig ab, gleichzeitig steigt die Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche. (aus Barbour *et al.* (2008))

Protonen entstehen: $[M+H]^+$ bei positiver Spannung bzw. $[M-H]^-$ bei negativer Spannung.

ESI wird, wie Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) auch, als weicher Ionisationsprozess angesehen, da während der Ionisation in der Regel keine Fragmentierung der Analyten stattfindet. Im Jahr 2002 wurde John Fenn für die Weiterentwicklung der ESI zur Analyse von Biomolekülen der Nobelpreis für Chemie verliehen (Fenn, 2003). Heute wird ESI bevorzugt für die LC-MS-basierte Analyse komplexer Proteinproben nach proteolytischem Verdau eingesetzt (Barbour *et al.*, 2008).

Die Analyse der ionisierten Moleküle geschieht durch Isolation, Fragmentierung und genauer Bestimmung ihres m/z -Verhältnisses. Zu diesem Zweck gibt es verschiedene Massenanalysatoren wie Flugzeitmassenanalysatoren (Wollnik, 1993), Ionenfallen (Allison und Stepnowski, 1987; Douglas, 2009) oder die Orbitrap (Michalski *et al.*, 2012; Scigelova und Makarov, 2006).

Die Orbitrap stellt einen neuartigen Massenanalysator dar, der sowohl in Hybrid-Fouriertransform-Massenspektrometern eingesetzt wird als auch als alleinstehender Massenanalysator vorkommt. Sie besteht aus einer spindelförmigen Innenelektrode und einer fassförmigen Außenelektrode, zwischen denen die Ionen eine Kreisbahn beschreiben (Makarov, 2000). Sie werden durch das Gleichgewicht zwischen elektrostatischer Anziehung und zentrifugaler Kraft auf einer stabilen Bahn gehalten. Dabei zeigen Ionen mit denselben m/z -Werten gleiche axiale Bewegungen, deren Frequenz mit weiteren Elektroden zeitabhängig aufgezeichnet wird. Durch eine schnelle Fouriertransformation (FT) kann das Signal dieser harmonischen Oszillation zunächst in ein Frequenzspektrum und weiter durch Zweipunktkalibrierung in ein m/z -abhängiges Massenspektrum umgewandelt werden.

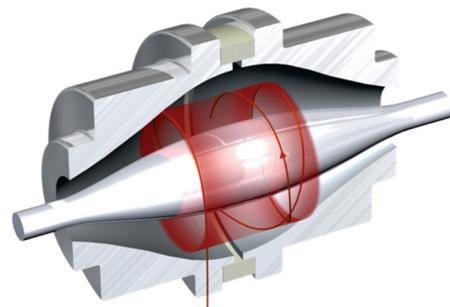


Abbildung 1.4 – Querschnitt des Orbitrap-Massenanalysators: Die Ionen werden auf Kreisbahnen um die Zentralelektrode eingefangen. Gleichzeitig oszillieren sie m/z -abhängig axial. Durch Fouriertransformation wird aus dem komplexen Signal die Frequenz bestimmt und ein Massenspektrum erstellt. (aus Scigelova und Makarov (2006))

Die Orbitrap zeichnet sich durch ein hohes Auflösungsvermögen nach der Halbwertsbreite-Methode (FWHM, *full width at half maximum*) von über 240 000 bei einer Massengenauigkeit (mit interner Rekalibrierung) von ≤ 1 ppm (Michalski *et al.*, 2012) aus. Im ersten Schritt eines Messzyklus werden die Peptidionen direkt in die Orbitrap überführt. Während dort mit hoher Genauigkeit ein MS-Spektrum aufgenommen wird, werden in einer vorgeschalteten linearen Ionenfalle mit radialem Ionenauslass

MS/MS-Spektren mit geringerer Genauigkeit, dafür aber mit sehr hoher Sensitivität aufgenommen (Scigelova und Makarov, 2006). Die geringere Genauigkeit der MS/MS-Spektren ist für die Peptidentifizierung in Kombination mit einer hohen Spezifität in der Messung der Peptidionenmasse ausreichend und ermöglicht eine Peptid- und damit Proteinidentifizierung mit hoher Zuverlässigkeit.

Bei der automatischen, datenabhängigen Messung besteht ein typischer Messzyklus zunächst aus der Erstellung eines Übersichtsspektrums. Eine definierte Anzahl der intensivsten, geladenen (+2, +3, +4) Peptidionen aus diesem Spektrum wird daraufhin nacheinander isoliert und fragmentiert. Aus dem im Übersichtsspektrum bestimmten m/z -Verhältnis und dem zugehörigen Fragmentspektrum kann mit Hilfe spezieller Suchalgorithmen über einen Datenbankvergleich das Peptid identifiziert werden (Perkins *et al.*, 1999). Alle identifizierten Peptide werden abschließend zu Proteinen zusammengesetzt.

Die MS-basierte Sequenzierung von Peptidionen erfolgt in der Gasphase überwiegend mittels kollisionsinduzierten Dissoziation (CID). Ein elektrisches Potential beschleunigt dabei die protonierten Peptide, die mit Inertgas (in der Regel He oder N_2) kollidieren. Dabei wird die kinetische Energie in Vibrationsenergie umgewandelt und über das gesamte Peptidmolekül verteilt. Sobald die interne Energie des Moleküls die Aktivierungsbarriere der labilsten Bindung übersteigt, bricht diese und charakteristische Fragmentationen entstehen. Das Fragmentation, an dem die Ladung verbleibt, wird nach Roepstorff und Fohlman (1984) je nach Position des Bindungsbruches mit Kleinbuchstaben und, je nach Anzahl der Aminosäuren, mit Indizes bezeichnet (Abb. 1.5). Besteht das Fragmentation aus dem C-terminalen Teil, so lautet die Bezeichnung x-, y- oder z-Ion. N-terminale Fragmentationen hingegen heißen a-, b- oder c-Ionen. Bei CID zerfallen Peptide bevorzugt zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Amidstickstoff des Peptidrückgrates. Aufgrund der Tatsache, dass verschieden protonierte Ionen vorkommen, geschieht die Fragmentierung an diversen Positionen des Peptidrückgrates. So entstehen charakteristische b- und y-Ionen mit unterschiedlicher Länge, die die zur Identifizierung notwendige Sequenzinformation enthalten (Wysocki *et al.*, 2000).

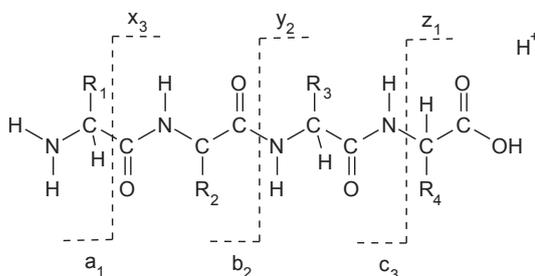


Abbildung 1.5 – Fragmentierungsmuster von Peptiden: Die Nomenklatur wurde von Roepstorff und Fohlman (1984) entwickelt. Bei der verbreiteten kollisionsinduzierten Dissoziation (CID) entstehen überwiegend b- und y-Ionen.

1.3.1.3 Bioinformatische Datenanalyse

Bei der Proteomanalyse mit massenspektrometrischen Methoden fallen große Datenmengen an, deren Auswertung durch bioinformatische Applikationen deutlich erleichtert wird (Martin *et al.*, 2013). Aus den m/z -Werten der intakten Peptide (MS-Spektren) und den m/z -Werten der Fragmentationen (MS/MS-Spektren) werden automatisch Signallisten erstellt. Die Datenbank gestützte Auswertung beginnt mit der Verknüpfung von Signallisten und Peptidsequenzen. Hierzu werden Sequenzen durch den Vergleich von aufgenommenen und theoretischen Spektren identifiziert. Theoretische Spektren werden mittels *in-silico* Verdau von allen in der Datenbank enthaltenen Proteine berechnet. Die Datenbanksuche erfolgt mit Hilfe von Suchalgorithmen (z. B. mit Mascot™ (Perkins *et al.*, 1999) oder Sequest (Eng *et al.*, 1994)). Die Anzahl an Kandidatenpeptiden für ein Fragmentspektrum kann durch diverse Kriterien begrenzt werden. Dazu zählen unter anderem die Massentoleranz des verwendeten Gerätes, das verwendete proteolytische Enzym, mögliche posttranslationale Modifikationen oder die Anzahl möglicher ^{13}C -Isotope. Die Suchalgorithmen erstellen eine Liste der Fragmentspektren mit zugeordneten Peptidsequenzen, sortiert nach einem Bewertungsfaktor. Aus dieser Peptidliste werden die Proteine zusammengesetzt (Perkins *et al.*, 1999). Die Validität der Proteinlisten wird durch sogenannte *Decoy*-Datenbanken erhöht (Reidegeld *et al.*, 2008). Diese Datenbanken enthalten neben echten Proteineinträgen auch die gleiche Anzahl an künstlich erzeugten Proteinsequenzen, die in der Natur so nicht vorkommen (*Decoy*-Einträge). Durch die Anzahl von *Decoy*-Einträgen in der Proteinliste kann eine Falschpositivrate (*false discovery rate*, FDR) abgeschätzt werden, da die Wahrscheinlichkeit einer Identifizierung von *Decoy*-Einträgen ähnlich hoch ist wie eine zufällige falsche Zuordnung von Spektren und Originaleinträgen. Bei diesem sog. *target-Decoy*-Ansatz wird für jeden Eintrag der Proteinliste eine FDR berechnet, also der Anteil an *Decoy*-Einträgen (Reidegeld *et al.*, 2008).

1.3.1.4 Quantifizierung von Proteinen

Neben der reinen Identifizierung von Proteinen können durch massenspektrometrische Methoden auch relative Unterschiede zwischen Proben festgestellt werden. Dies ist wichtig, um Gewebearten, verschiedene Zellzustände oder auch Körperflüssigkeiten miteinander vergleichen zu können. Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE) in Kombination mit Fluoreszenzfarbstoffen (2D-DIGE) wird dafür bereits seit Langem eingesetzt (Diehl *et al.*, 2007; Sitek *et al.*, 2005). Für die relative Quantifizierung von Proteinen mittels LC-MS haben sich innerhalb der letzten Jahre zwei Methoden etabliert, die entweder auf der Markierung mit stabilen Isotopen basieren oder markierungsfrei (*label-free*) ablaufen können.

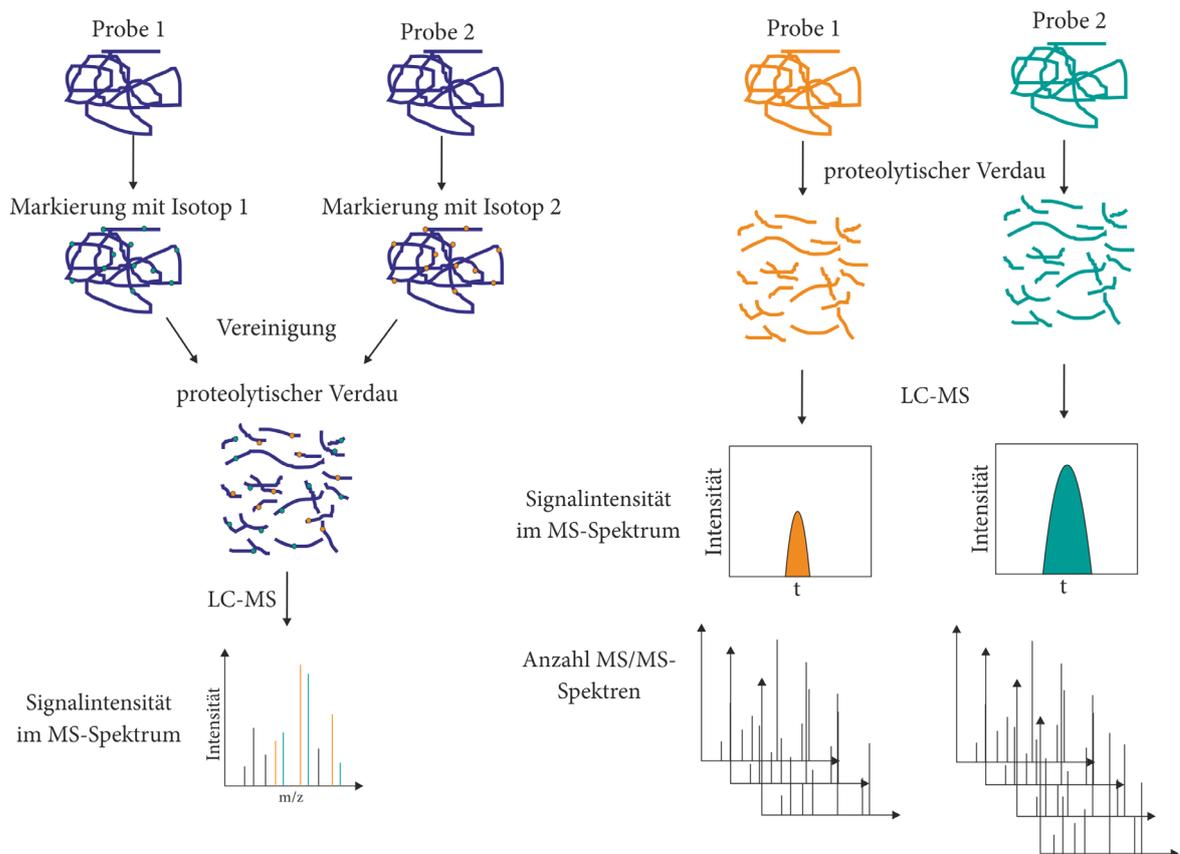


Abbildung 1.6 – Quantifizierung von Proteinen: Bei der Markierung mit schweren Isotopen (links) werden die Proben nach dem Mischen proteolytisch verdaut und die Peakfläche in einem MS-Spektrum miteinander verglichen. Bei markierungsfreier Quantifizierung (rechts) werden die Proben nicht miteinander vermischt, sondern getrennt aufgearbeitet und gemessen. Die Quantifizierung kann sowohl auf dem Vergleich der Signalintensität im MS-Spektrum zwischen zwei Läufen als auch auf dem Vergleich der Anzahl an MS/MS-Spektren je Peptid/Protein erfolgen.

Bei Ersterem werden Moleküle mit schweren Isotopen (^{15}N , ^{13}C , ^2H , ^{18}O) markiert. Die zu vergleichenden Proben werden nach der Markierung kombiniert und zusammen aufgearbeitet. Da beide Peptidisoformen in der Regel zur selben Zeit von einer C_{18} -Säule eluieren, kann aus der Intensität des Signalpaares im MS-Spektrum relativ quantifiziert werden (Abb. 1.6). Moleküle, die für diese chemische Form der isotopenbasierten Quantifizierung geeignet sind, sind z. B. *Tandem Mass Tags* (TMT) (Thompson *et al.*, 2003) oder *iTRAQ* (Ross *et al.*, 2004). Daneben gibt es auch die Möglichkeit der metabolischen Markierung (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*, SILAC), bei der dem Zellkulturmedium mit schweren Isotopen markierte, essentielle Aminosäuren zugesetzt werden (Ong *et al.*, 2002). Der Vorteil dabei ist, dass die Proben direkt im Anschluss an den Zellaufschluss gemischt werden können und so nur wenige Varianzen durch Unterschiede in der Probenvorbereitung eingebracht werden. Diese Form der Markierung ist für klinische Proben ungeeignet, weil

insbesondere für Gewebe eine Inkubation mit markierten Aminosäuren generell nicht möglich ist.

Der zweite Weg zur LC-MS-basierten Quantifizierung von Proteinen kommt ohne jede Form der Markierung aus und ist dadurch wesentlich günstiger in der Durchführung. Der Vergleich zweier oder mehr Proben erfolgt dabei lediglich auf der Signalfläche oder der Anzahl aufgenommener MS/MS-Spektren der identifizierten Peptide (Abb. 1.6) (Bondarenko *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004). Dies setzt eine hohe Reproduzierbarkeit sowohl in der Probenvorbereitung als auch in der Peptidtrennung per HPLC voraus. Die Proben werden anders als bei anderen Methoden nicht miteinander kombiniert, sondern getrennt voneinander mittels LC-MS analysiert. Durch hochauflösende Massenspektrometrie und Weiterentwicklungen in der Datenverarbeitung können kleinere Abweichungen in der Retentionszeit bei der Quantifizierung berücksichtigt werden (Cox und Mann, 2011; Nahnsen *et al.*, 2013). Die markierungsfreie Quantifizierung ist, im Vergleich zu SILAC, auch für klinische Proben gut geeignet (Neilson *et al.*, 2011; Sitek *et al.*, 2012; Wiener *et al.*, 2004). Unter den hier aufgeführten Methoden hat sie den größten dynamischen Bereich, ist dafür aber weniger akkurat und reproduzierbar (Li *et al.*, 2012). Darüber hinaus kann mit der markierungsfreien Quantifizierung die größte Proteomabdeckung erzielt werden (Merl *et al.*, 2012).

Die Möglichkeit der absoluten Quantifizierung von Proteinen kann durch den Vergleich einer Probe mit einem Analyten bekannter Konzentration erfolgen (Malmström *et al.*, 2009). Hierzu werden definierte Mengen von synthetisch hergestelltem, isotopen markiertem Peptid einer Probe hinzugefügt (AQUA, (Kettenbach *et al.*, 2011)) und die Signalintensität mit dem infrage kommenden Peptiden verglichen (Schmidt *et al.*, 2010).

Von Silva *et al.* (2006) wurde eine vereinfachte Methode zur absoluten Quantifizierung von Proteinen vorgestellt, die speziell mit Q-TOF-Massenanalysatoren in Kombination mit LCMS^E, also der gleichzeitigen Fragmentierung aller Ionen ohne vorheriger Isolation, funktioniert. Sie basiert darauf, dass die mittlere Intensität der drei am besten ionisierbaren/identifizierbaren Peptide mit der Abundanz eines Proteins linear korreliert. Für eine zuverlässige absolute Quantifizierung ist es ausreichend, ein Protein bekannter Konzentration der Probe zuzugeben und die mittleren Peptidintensitäten miteinander zu vergleichen. Diese Methode eignet sich auch für Ionenfallen-basierte Massanalytoren. Dort wird sie als T3PQ-Methode (Top 3 Protein Quantifizierung) bezeichnet (Grossmann *et al.*, 2010).

1.3.2 Proteomik von Nabelschnurblutzellen

Das Proteom von Zellen aus dem Nabelschnurblut wurde bisher nur in geringem Umfang mittels Massenspektrometrie-basierten Methoden analysiert. So wurden

zum Beispiel CD34⁺ hämatopoetische Stamm-/Vorläuferzellen von mehreren Arbeitsgruppen untersucht (D'Alessandro *et al.*, 2010a,b; Liu *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2004; Zenzmaier *et al.*, 2005, 2003). Anhand verschiedener Techniken konnten bis zu 370 Proteine (Liu *et al.*, 2006) in nativen CD34⁺ Nabelschnurblutzellen identifiziert werden. Die Prozesse, die während der *ex vivo*-Expansion ablaufen, wurden bisher nicht weitergehend untersucht. Die bisher durchgeführten Studien beschränken sich überwiegend auf eine qualitative Beschreibung der nativen und expandierten CD34⁺ Stammzellen.

1.3.3 Sekretomstudien

Die Identifizierung sekretierter Proteine ist ein Gegenstand umfangreicher Forschungen und hat auch klinische Relevanz. Eine der ersten Sekretomstudien mit 13 sekretierten Proteinen wurde von Scheele (1975) an Pankreaszellen mittels 2D-PAGE durchgeführt. Durch neue methodische Entwicklungen konnten bis zu 1 000 sekretierte Proteine identifiziert werden (Diehl *et al.*, 2007; Volmer *et al.*, 2005). Mittlerweile wurde das Sekretom verschiedener Zellen untersucht, darunter auch viele Stammzelltypen (Skalnikova *et al.*, 2011).

Die Herausforderung bei einer LC-MS-basierten Sekretomanalyse ist eine geringe Konzentration von Proteinen im Zellkulturüberstand, die mittels Proteinfällung, Ultrafiltration, Dialyse oder Lyophilisierung des konditionierten Mediums erhöht werden kann (Cao *et al.*, 2011). Bei der Verwendung von serumhaltigem Medium reicht der dynamische Bereich LC-MS-basierter Techniken häufig nicht aus und ermöglicht nur die Identifizierung besonders abundant sekretierter Proteine. Aus diesem Grund und um Kontaminationen durch bovine Proteine zu verhindern wird in der Zellkultur serumfreies Medium verwendet (Hathout, 2007).

Eine alternative Methoden für die Identifizierung von Proteinen im Zellkulturüberstand sind Antikörper-Mikroarrays. Niedrig abundante Proteine können durch Massenspektrometrie-basierte Sekretomanalysen teilweise schwierig abgedeckt werden. Antikörper-Mikroarrays ermöglichen die gezielte Analyse von bekannten Proteinen (Mustafa *et al.*, 2011).

1.3.4 Sekretion von Proteinen

Extrazellulär lokalisierte Proteine haben ihren Ursprung ausnahmslos innerhalb der Zelle. Der Mechanismus der Sekretion von Proteinen ist bisher nur teilweise verstanden. Ein Großteil der sekretierten Proteine in Eukaryonten wird aufgrund einer Signalsequenz schon während der Synthese sortiert und auf gut untersuchten Signalwegen durch Vesikelverschnürung mit der Zellmembran in den Extrazellulärraum sekretiert (Abb. 1.7). Diese Proteine werden als klassisch sekretiert bezeichnet.

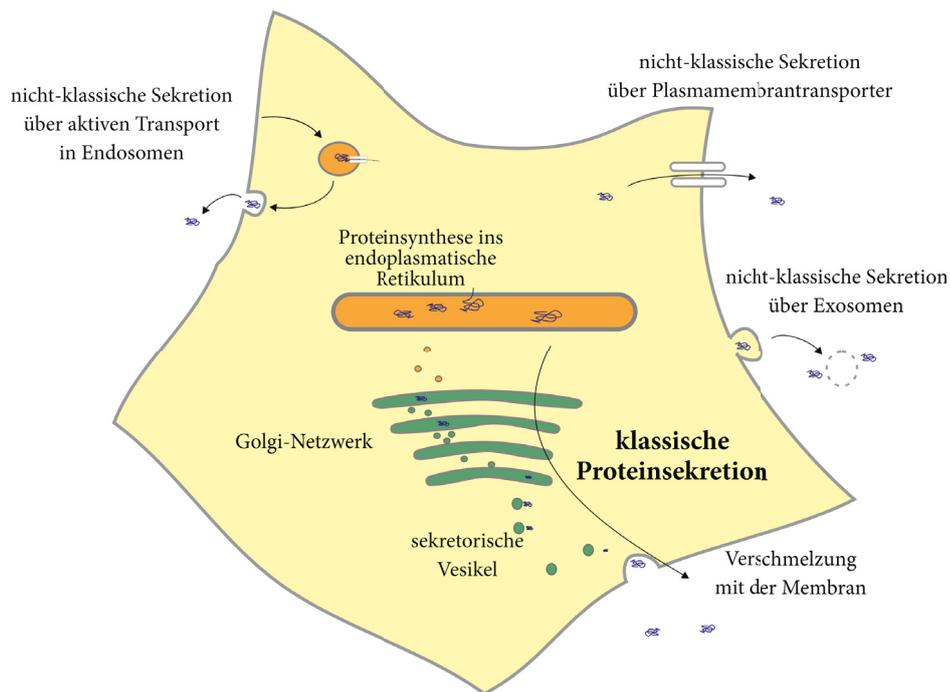


Abbildung 1.7 – Sekretion von Proteinen: Bei der klassischen Sekretion werden Proteine aufgrund einer spezifischen Signalsequenz in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums synthetisiert. Über Vesikel werden die Proteine in das Golgi-Netzwerk transportiert und dort posttranslational modifiziert. Über sekretorische Vesikel werden sie in den extrazellulären Raum abgegeben. Nicht-klassische Sekretion erfolgt ER-unabhängig.

Eine zweite Klasse extrazellulärer Proteine stellen nicht-klassisch sezernierte Proteine dar. Sie werden aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften, unabhängig von einer Signalsequenz, sezerniert. Über die Mechanismen, die hinter dieser Art der Sekretion stehen, ist deutlich weniger bekannt (Nickel, 2003).

1.3.4.1 Klassische Sekretion

Die Signalsequenz, die Proteine als extrazellulär oder membranständig lokalisiert, ist keine klar definierte Signalsequenz, sondern basiert überwiegend auf einer Strukturähnlichkeit. Sie wird aus 3–7 polaren, meist ungeladenen Aminosäuren (c-Region), etwa 15 hydrophoben Aminosäuren (der h-Region), gefolgt von 1–5 Aminosäuren mit positiver Ladung (N-Region) gebildet. Das Signalpeptid wird im Laufe der Proteinexpression durch Signalpeptidasen (SPasen) vom Rest des Proteins abgespalten. In der Nähe der Spaltstelle folgt die Sequenz dabei meist der 3-1-Regel. Die Aminosäuren an Position -3 und -1 (relativ zur Spaltstelle) müssen klein und neutral geladen sein. (Heijne, 1983, 1985)

Die Erkennung des Signalpeptides stellt den ersten Schritt des Exports dar. Im

Nächsten wird das Polypeptid durch die Membran in das ER-Lumen translokalisiert bzw. in die Membran integriert. Im ER-Lumen werden viele der sekretierten Proteine durch Ologosaccharyltransferasen glycosyliert. Die eigentliche Sekretion wird über das Golgi-Netzwerk und sekretorische Vesikel gesteuert.

Das Vorhandensein eines Signalpeptides bedeutet aber nicht gleichzeitig, dass das Protein sekretiert wird. So kann es vorkommen, dass sie im ER verbleiben oder weiter in den Golgi-Apparat transportiert werden und ihren Weg in andere membranumhüllte Organellen wie Liposomen finden.

1.3.4.2 Nicht-klassische Sekretion

Die signalpeptidunabhängige Sekretion auf nicht-klassischem Wege wurde bisher hauptsächlich in Bakterien beschrieben, aber ebenso auch in eukaryotischen Zellen beobachtet (Wilkinson *et al.*, 1997). Dort werden auch Proteine wie Galectin-1 oder IL1- β , die zunächst im Cytoplasma synthetisiert werden, ohne eine Beteiligung des ER und Golgi-Apparates sezerniert (Cooper und Barondes, 1990; Rubartelli *et al.*, 1990). Diese post-translationale Translokalisierung kann über Plasmamembrantransporter, über einen aktiven Transport in Endosomen sowie über die Bildung von Exosomen erfolgen (Abb. 1.7). Proteinbeispiele für die nicht-klassische Sekretion sind Serpine, Ovalbumin, SERPINB2, Leukine oder FGF (Nickel, 2003).

Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die umfassende Charakterisierung von zwei therapielevanten Stammzelltypen aus Nabelschnurblut, und zwar von unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) sowie von CD34⁺ hämatopoetische Stamm-/Vorläuferzellen. USSC eignen sich für die Therapie von Rückenmarksläsionen und tragen im Tiermodell signifikant zur Regeneration von lädiertem Nervengewebe bei (Schira *et al.*, 2012). Es soll analysiert werden, welche Proteine von USSC sekretiert werden. Einerseits soll gezielt nach bekannten Neuritenwachstumsfaktoren gesucht werden, andererseits soll die Anwendung von bioinformatischen Filtermethoden dazu beitragen, neue potentielle Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom zu identifizieren. Der Vergleich mit dem Sekretom anderer Zelllinien soll dabei die Charakterisierung dieser Stammzellen aus dem Nabelschnurblut ergänzen.

Die Transplantation von USSC in das Rückenmarksgewebe von Ratten führt zu einer lokomotorischen Verbesserung (Schira *et al.*, 2012). Ob sich USSC durch die Transplantation verändern, konnte jedoch bisher nicht geklärt werden. In einer differentiellen Proteinstudie soll die *in vivo*-Situation durch die Behandlung von USSC mit Rückenmarksgewebe simuliert und dabei die Veränderungen im Proteom analysiert werden. Dabei ist zu klären, ob und wie sich die Zellen sowohl durch Gewebe aus der Läsionsstelle als auch durch Gewebe von gesundem Rückenmark beeinflussen lassen. Durch die Quantifizierung von Unterschieden im Sekretom der behandelten USSC können Rückschlüsse auf die biochemischen Abläufe nach Transplantation in lädiertes Gewebe gezogen werden.

Eine weitere Stammzellart aus dem Nabelschnurblut stellen CD34⁺ hämatopoetische Stamm-/Vorläuferzellen dar. Sie kommen bereits in der klinischen Therapie zum Einsatz, überwiegend bei der Therapie von Leukämie. Dabei ist eine ausreichende

Zellzahl ein limitierender Faktor für den Erfolg der Therapie. Um diese positiv zu beeinflussen, werden die Zellen teilweise durch eine *ex vivo*-Expansion vermehrt. Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit ist die Untersuchung, in welcher Weise sich das Proteom von CD34⁺ hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen während dieser Expansion verändert. Dazu sollen Expressionsprofile einzelner Proteine über die gesamte Expansionsdauer von sieben Tagen erstellt werden. Weiter soll ein potentieller cytokinbedingter Einfluss auf das Proteom quantifiziert werden, um, falls notwendig, die Expansionsbedingungen anpassen zu können.

Die Sekretomanalyse, das Wissen um die Veränderungen des Proteoms nach Transplantation und die Quantifizierung von expansionsbedingten Veränderungen können wichtige Schritte für einen verbesserten klinischen Einsatz von Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut sein.

Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien und Verbrauchsartikel wurden von folgenden Firmen bezogen: *J.T. Baker* (Deventer, NL), *Biochrom AG* (Berlin), *Bio-Rad* (München), *Eppendorf AG* (Hamburg), *Merck* (Darmstadt), *Riedel-de Haen* (Seelze), *Carl Roth* (Karlsruhe), *Serva* (Heidelberg), *Sigma-Aldrich* (Steinheim).

3.2 Antikörper

CD34, PE-konjugiert - für FACS (BD Bioscience, San Jose, USA)

CD45, FITC-konjugiert - für FACS (BD Bioscience, San Jose, USA)

β -III-Tubulin - Erstantikörper für Neuritenwachstumsassay (Sigma-Aldrich)

Anti-Hase, Alexa 594-konjugiert - Zweitantikörper für Neuritenwachstumsassay (Invitrogen)

SPARC, human, monoklonal hergestellt in Maus (sc-33645, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA)

PEDE, human, polyklonal hergestellt in Hase (sc-25594, Santa Cruz Biotechnology)

SERPIN E1, human, monoklonal hergestellt in Maus (MAB1786, R&D Systems, Minneapolis, USA)

IGFBP3, human, polyklonal hergestellt in Ziege (AF675, R&D Systems)

NRP1, human, polyklonal hergestellt in Schaf (AF3870, R&D Systems)

SLIT3, human, polyklonal hergestellt in Ziege (AF3629, R&D Systems)

CST3, human, polyklonal hergestellt in Ziege (P01034, R&D Systems)

3.3 Rekombinante Proteine

SPARC, exprimiert in HEK293-Zellen (C388, novoprotein, Summit, USA)

PEDF (SERPINF1), exprimiert in *E. coli* (P3662, Abnova, Taipeh, Taiwan)

NRP1, human, exprimiert in Maus-Myelom-Zellen (3870-N1-025, R&D Systems)

CST3, human, exprimiert in Maus-Myelom-Zellen (1196-PI-010, R&D Systems)

SERPINE E1, human, exprimiert in *Spodoptera frugiperda* (1786-PI-010, R&D Systems)

AGRN, human, exprimiert in CHO-Zellen (6624-AG-050, R&D Systems)

3.4 Geräte

LTQ Orbitrap Velos, Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen)

LTQ Orbitrap Elite, Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific)

U3000 RSLCnano, HPLC (Dionex/Thermo Fisher Scientific)

GenePix4000B, Array Scanner (Molecular Devices, Sunnyvale, USA)

Typhoon 9400, Laser Scanner (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)

Cellomics Array Scan VTI, HCS Reader (Thermo Fisher Scientific)

3.5 Zellkultur

3.5.1 Nabelschnurblutentnahme

Das verwendete Nabelschnurblut wurde nach Einwilligung der Eltern im Kreißsaal durch geschulte Hebammen nach etablierten Methoden entnommen (Kögler *et al.*, 1996). Direkt nach der Geburt wurde die Nabelschnur doppelt abgeklemmt, getrennt und das Blut mit Hilfe einer Spritze in speziellen Behältern mit Acid-Citrate-Dextrose aufgefangen. In den hier durchgeführten Experimenten wurden ausschließlich Nabelschnurblute verwendet, die nicht als allogenes Transplantat nach den Richtlinien der Bundesärztekammer infrage kommen. Ein solches Hindernis liegt z. B. bei geringer Zellzahl, einer Krankheitsgeschichte der Mutter oder der Einnahme von Medikamenten vor der Geburt vor (Kögler *et al.*, 1996).

3.5.2 Isolation von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen

CD34⁺ Zellen wurden durch magnetische Zellseparation (MACS) und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung aus dem Nabelschnurblut isoliert. Dazu wurden zunächst mononukleäre Zellen mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (Biochrom, Berlin) angereichert (Kögler *et al.*, 2005). Verbliebene Erythrozyten wurden durch Ammoniumchloridlyse (10 Minuten, 4 °C) entfernt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden CD34⁺ Zellen durch Markierung mit Antikörpern und paramagnetischen Partikeln gegen das CD34-Epitop (*Indirect CD34 Micro Bead Kit*) und durch Anwendung von LS-Säulen und MIDI-MACS-Magneten (alles Milteny, Bergisch Gladbach) entsprechend der Anleitung des Herstellers isoliert.

Darüber hinaus wurden die MACS-angereicherten Zellen mit Antikörpern gegen das CD34-Epitop (PE-konjugiert) und gegen CD45 (FITC-konjugiert) inkubiert und im *Core Flow Cytometry Center* des Universitätsklinikums Düsseldorf FACS-sortiert. Dazu wurde ein *MoFlo XDP cell sorter* (Beckman Coulter, Fullerton, USA) eingesetzt. Zellen, die eine hohe CD34- und eine niedrige CD45-Expression aufwiesen wurden entsprechend sortiert.

3.5.3 Expansion von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen

Die isolierten CD34⁺ Zellen wurden in einer Dichte von 2×10^5 / 3 ml / Schale in 6-Schalen-Platten ausgesät und unter Standardzellkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) in einem Wachstumsmedium bestehend aus DMEM (Lonza, Basel, Schweiz), 30 % fötalem Kälberserum (Gibco, Karlsruhe), Penicillin/Streptomycin/Glutamine (Lonza) und Cytokinen (50 ng/ml SCF, 20 ng/ml FLT3lg, 50 ng/ml IL-6, 10 ng/ml TPO;

alle von R&D Systems) inkubiert. An Tag 3 und Tag 7 wurden die Zellen geerntet, ihre Anzahl in einer Neubauer-Kammer bestimmt und nach zweimaligem Waschen mit PBS lysiert. Parallel dazu wurde ein Aliquot von etwa 5×10^4 Zellen in einer Durchflusszytometrie gegen CD34/CD45 (FACSCanto, BD Biosciences) analysiert.

3.5.4 Zellaufschluss

Die Zellkulturschale wurde auf Eis gestellt, das Medium abgezogen und die Zellen zweimal mit 3 ml eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde Lysispuffer (30 mM Tris, 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, pH=8,5 mit HCl) auf die Zellen gegeben und die Zellen mit einem Gummizellschaber gründlich abgelöst. Die Lösung wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und zweimal für je eine Minute im eisgekühlten Ultraschallbad aufgeschlossen. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 16 000 g (15 Minuten, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Proteinkonzentration bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.5.5 Zellkultur von USSC

Zwei USSC-Populationen (SA 5/03 und SA5/73) wurden aus dem Nabelschnurblut entsprechend Kögler *et al.* (2004) unter GMP-Bedingungen isoliert. Die mononukleäre Zellfraktion nach Ficoll-Gradienten (s. o.) wurde in Kulturflaschen in Gegenwart von Dexamethasone (Endkonzentration von 10^{-7} mol/ml, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ausgesät. USSC wachsen dabei als adhärenente Zellkolonien. Einzelne Zellkolonien wurden entnommen und in einem Wachstumsmedium ohne Zugabe von Cytokinen (s. o.) bei 37 °C inkubiert. Bei Erreichen einer zu hohen Konfluenz (>80 %) wurden die Zellen in neue Kulturflaschen überführt. Ab Passage 5 wurden USSC in serumfreiem N2-Medium inkubiert. Das N2-Medium ist eine 4:1-Mischung von DMEM mit Hams-F12 (Gibco, Invitrogen) versetzt mit 5 mg/ml bovinem Insulin, 5 mg/ml humanem Transferrin, 20 nM Progesterone, 30 nM Natriumselenit, 100 mM Putrescin und 3,9 mM Glutamine (alles Sigma Aldrich).

3.5.6 Generierung von konditioniertem Medium

Konditioniertes Medium wurde von konfluenten Zellkulturschalen entnommen, die für 48 h mit serumfreiem N2-Medium inkubiert wurden. Das konditionierte Medium wurde abgenommen und für 5 Minuten bei 1 500 g zentrifugiert, um lose Zelltrümmer zu entfernen.

3.5.7 Kultivierung von primären kortikalen Neuronen aus Rattegehirn

Zur Herstellung von primären kortikalen Neuronenkulturen wurden E15-Wistar-Rattenembryos verwendet (Kappler *et al.*, 1997). Nach Sektion des cerebralen Kortex wurde das Gewebe in 0,05 % Trypsin für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Waschen mit 10 % fetalem Kälberserum (PAA Laboratories) in DMEM wurden die Zellen in serumfreiem N2-Medium aufgenommen, trituiert, durch eine 30 µm Nylongaze gepresst und auf beschichteten Zellkulturschalen (0,5 mg/ml Poly-D-Lysin, Sigma-Aldrich; 13 µg/ml Laminin, Sigma-Aldrich) ausgesät. Die kortikalen Neurone wurden entweder mit serumfreiem N2-Medium oder USSC-konditioniertem Medium für 48 h inkubiert und anschließend immunohistochemisch analysiert.

3.5.8 Immunohistochemie

Nach 48 h Inkubation mit serumfreiem N2-Medium oder USSC-konditioniertem Medium wurden die primären kortikalen Neurone mit 4 % Formaldehyd (Merck, Darmstadt) fixiert, mit 10 % Ziegen Serum blockiert und mit 0,03 % Triton X-100 für 1 h permeabilisiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (β -III-Tubulin, 1:500, Sigma) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nachdem die Zellkulturschalen mit PBS gewaschen wurden, wurden sie mit dem Zweitantikörper (Anti-Hase, aus Ziege isoliert, konjugiert mit Alexa 594, Invitrogen) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Anfärbung der Zellkörper erfolgte durch Färbung mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI).

3.5.9 Neuritenwachstumsassay

In einem Neuritenwachstumsassay (NOA, *Neurite-Outgrowth-Assay*) wurde der Effekt von konditioniertem Medium auf primäre kortikale Neurone gemessen. Dazu wurden die gefärbten Zellkulturplatten von primären kortikalen Neuronen im Hochdurchsatzverfahren am *Cellomics ArrayScan HCS Reader* (Thermo Fisher) gescannt. Je Schale wurden 2×25 Bilder mit einer 10×-Vergrößerung aufgenommen. In einem Kanal wurde die Färbung der Zellkerne (DAPI) mit 461 nm und in einem weiteren Kanal die Färbung der Neurone mit 617 nm detektiert. Die initiale Belichtungsdauer betrug 0,1 s.

Die Quantifizierung von Neuronenanzahl und Neuritenlänge erfolgte mittels der Software *Neuronal Profiling bioapplication*, durch die ein Großteil der Neurone einer Schale erkannt und die Neuritenlänge automatisch ermittelt werden konnte. Für die automatische Detektion wurden folgende Parameter verwendet: Nukleusidentifizierung (Isodata >-0,119; Segmentintensität >80), Nukleusvalidierung (Größe 7–110),

Zellkörperidentifizierung (Isodata >0; mind. 1 Zellkörper; Seedsegmentierung; Zellkörperabgrenzung =2), Zellkörpervalidierung (1 Zellkern; Zellkörpergröße 30–1 050; totale Zellintensität 20 450–521 307), Neuritenidentifizierung (Identifikationsmodifizierer = -0,938; Länge 255; Punktauflösung 2; Lückentoleranz = 5), Neuritenvalidierung (Neuritenlänge 10–600; Neuritenintensität 0–4 095).

Die ermittelten Parameter sind die Anzahl an Neuronen pro analysierter Zellkulturschale, die absolute Anzahl an Neuriten pro Neuron, die durchschnittliche Länge aller Neuriten pro Neuron, die durchschnittliche Länge eines Neuriten, die Anzahl an Neuritenverknüpfungen und die Fläche aller Neuriten.

In den hier durchgeführten Experimenten wurden je Zustand sechs Zellkulturschalen unabhängig voneinander ausgewertet. Der Mittelwert und die Standardabweichung der absoluten Anzahl an Neuronen und die durchschnittliche Länge aller Neuriten pro Neuron wurden als aussagekräftigste Parameter für den Vergleich herangezogen.

3.5.10 Validierung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von einzelnen Proteinen im USSC-konditionierten Medium wurde die T3PQ-Methode (Grossmann *et al.*, 2010) angewendet. Hierbei wurde die mittlere Intensität der drei abundantesten Peptide von Kandidatenproteinen und Transferrin miteinander verglichen. Dafür wurden fünf unabhängig gemessene Datensätze gemittelt. Transferrin liegt im N2-Medium in einer Konzentration von 5 mg/ml vor, dies entspricht 92,46 fmol/Injektion. Basierend auf einer linearen Regression wurde so eine Abschätzung der Proteinkonzentration vorgenommen. Diese diente als Grundlage für die Zugabe von Antikörper mit blockierender Funktion. Das mit Antikörper versetzte Medium wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend eine Zellsuspension primärer Neurone hinzugegeben. Die weitere Behandlung erfolgte entsprechend Abschnitt 3.5.7.

Unkonditioniertes N2-Medium wurde mit rekombinantem Protein versetzt und ebenfalls entsprechend Abschnitt 3.5.7 mit primären kortikalen Neuronen inkubiert.

3.5.11 Tiere

Die für diese Arbeit verwendeten Ratten wurden entsprechend des deutschen Tierschutzgesetzes behandelt. Für eine dorsale Hemisektion zur Generierung von Lysat der Läsionsstelle wurden ausgewachsene weibliche Wistar-Ratten (180–210 g) verwendet. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen mit Wasser und Nahrung

ad libitum gehalten. Die Operation wurde entsprechend Schira *et al.* (2012) durchgeführt.

3.5.12 Behandlung von USSC mit Lösionslysat

8 mm um die Läsionsstelle wurde Rückenmarksgewebe entsprechend Schira *et al.* (2012) entnommen. Das Gewebe wurde lysiert, Zelltrümmer sedimentiert und der Überstand mit N2-Medium verdünnt. Anschließend wurden USSC für 24 h mit dem Medium bei 37 °C inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde nach 24 h lysiert, bei einem weiteren Teil wurde das Medium gegen frisches N2-Medium ausgetauscht und die Zellen weitere 48 h inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden der Überstand abgenommen und entsprechend Abschnitt 3.5.6 das Sekretom der Zellen aufgearbeitet. Die verbliebenen Zellen wurden entsprechend Abschnitt 3.5.4 lysiert.

Gewebeextrakt aus intaktem Rückenmark wurde analog aus dem Rückenmark gesunder Ratten aufgearbeitet.

3.6 Proteinbiochemische Methoden

3.6.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen wurde der *660 nm-Pierce Assay*, eine kolorimetrische Methode, im Mikroplattenformat angewandt (in Anlehnung an Bradford (1976)). Dazu wurden 2 µl Probe mit 150 µl Pierce-Reagenz vermischt. Anschließend wurde die UV-Absorption bei 660 nm gemessen. Jede Messung erfolgte als Doppelbestimmung. Anhand einer Standardgerade, die durch Messung von Proteinlösungen (Rinderserumalbumin, BSA) mit definierten Konzentrationen (0,03125 – 2,00000 µg/ml) erstellt wurde, konnte die genaue Proteinkonzentration ermittelt werden.

3.6.2 Konzentrationsbestimmung von Peptiden mittels Aminosäureanalyse

Die Konzentration von Peptiden wurde durch Aminosäureanalyse ermittelt. Dabei wurden die Aminosäuren durch saure Hydrolyse freigesetzt, fluoreszenzmarkiert (*AccQFluor*, Waters) und chromatographisch (RP-HPLC, *AccQTag-C₁₈*-Säule, Waters) aufgetrennt. Aus der Intensität der detektierten Fluoreszenz sowie aus dem

Vergleich mit der synthetischen Aminosäure Norleucin ($10 \text{ pmol}/\mu\text{l}$) als internen Standard und einer Standardreihe von Aminosäuren (50–200 pmol) wurde die genaue Aminosäuremenge im Ansatz berechnet.

3.6.3 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molgewicht erfolgte mit der eindimensionalen Gelelektrophorese (1D-PAGE). Hierfür wurden Bis-Tris-Gradientengele (4-12 %) der Firma Life Technologies (Carlsbad, USA) mit 10 oder 12 Taschen (Minigel), bzw. 20 oder 22 Taschen (Midigel) und einer Dicke von 1 mm verwendet. Je Tasche wurde in der Regel $10 \mu\text{g}$ Protein in SDS-Probenpuffer (150 mM DTT, 7,5 % Glycerin, 3 % SDS, 37,5 % Tris/HCl, pH=7,0, Bromphenolblau) aufgetragen. Vor dem Auftragen wurden die Proben für eine Minute bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Als Laufpuffer wurde 50 mM MOPS, 50 mM Tris Base, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA (pH=7,7) verwendet. Als Marker wurde *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Pierce/Thermo Fisher Scientific) eingesetzt.

Für eine optimale Auftrennung wurde zunächst eine Spannung von 50 V für die Dauer von 15 Minuten angelegt, anschließend die Spannung auf 200 V für bis zu 1,5 h erhöht. Bei einem Kurzgel, wo eine Auftrennung nicht von Bedeutung war, wurde die Spannung bereits nach 15 Minuten abgestellt.

3.6.3.1 Silberfärbung

Die Detektion von Proteinen in einer 1D-PAGE wurde mit einer MS-kompatiblen Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1988) und Klose und Kobalz (1995) durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden die Proteine im Gel durch 30 minütige Inkubation mit 10 % Essigsäure und 50 % Ethanol fixiert. Anschließend wurde mit 500 mM Natriumacetat (wasserfrei), 8 mM Natriumthiosulfat für 30 Minuten inkubiert und dreimal für 10 Minuten mit Reinstwasser inkubiert.

Die Färbung erfolgte durch 30-minütige Inkubation mit 6 mg Silber in 50 ml Reinstwasser. Überschüssiges Silber wurde durch kurze Inkubation mit Reinstwasser abgespült und das Gel mit Natriumcarbonat für eine Minute gespült. Die Entwicklung erfolgte mit 236 mM Natriumcarbonat und 0,01 % Formalaldehyd für 4–10 Minuten, je nach gewünschter Intensität der Färbung. Die Reaktion wurde mit 50 mM EDTA gestoppt.

3.6.3.2 Entfärben und Waschen von silbergefärbten Proteinbanden

Silbergefärbte Proteinbanden aus einer 1D-PAGE wurden durch kurze Inkubation mit 15 µl 15 mM Na₂S₂O₃/50 mM K₃[Fe(CN)₆] entfärbt. Zum Waschen wurden die Banden abwechselnd für je 10 Minuten mit 10 mM NH₄HCO₃ und 5 mM NH₄HCO₃/50 % Acetonitril bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses Vorgehen wurde insgesamt viermal wiederholt bis die Banden gänzlich entfärbt waren. Anschließend wurden die Banden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

3.6.4 Enzymatische Spaltung von Proteinen

Für die Präparation zur späteren Analyse mittels nano-HPLC-ESI-MS/MS wurden die Proteine in den getrockneten Gelstücken durch Zugabe von je 2 µl Trypsinlösung (10 mM NH₄HCO₃, 0,03 µg/µl modifiziertes Trypsin) und Inkubation über Nacht bei 37 °C proteolytisch gespalten. Für die Extraktion wurden die Gelstücke mit 15 µl einer Lösung aus Acetonitril und 0,1 % TFA (50:50, v/v) versetzt und 15 Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Gelstück erneut mit 15 µl Lösung versetzt und weitere 15 Minuten inkubiert. Die Überstände wurden vereinigt und das Acetonitril in einer Vakuumzentrifuge entfernt. Die Proben wurden mit 0,1 % FA auf ein Volumen von 16 µl eingestellt.

3.6.5 Immunodetektion durch Western Blotting

3.6.5.1 Semidry-Blotting

Der Transfer von Proteinen aus einer 1D-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte durch Semidry-Blotting. Dabei wird eine in Ethanol (p.a.) benetzte und in Anodenpuffer (300 mM Tris, 100 mM Tricin) getränkte Immobilonmembran (Immobilon-FL PVDF, *Merck Millipore*) auf zwei Lagen in Anodenpuffer getränkten Blottingkarton gelegt. Auf die Membran wurde das Gel und darauf zwei mit Kathodenpuffer (300 mM Aminocaprinsäure, 30 mM Tris, pH 8,6-8,8) getränkte Lagen Blottingkarton gelegt und mit einer Glaspipette eingeschlossene Luftblasen entfernt. Durch die angelegte Spannung (2 mA pro cm² für 1 h) wandern die Proteine aus dem Gel und binden an die Immobilonmembran.

3.6.5.2 Immunodetektion

Die Immobilonmembran wurde im Anschluss an das Semidry-Blotting kurz in TBST (10 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween20) gewaschen und dann für mindestens 0,5 h bei Raumtemperatur in Blocking-Lösung (TBST + 5 % BSA)

geschüttelt. Das BSA bindet dabei an die Immobilisationsmembran und verhindert so ein unspezifisches Binden des zur Detektion verwendeten Antikörpers. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1:100–1:200 mit Blockinglösung) inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde einmal kurz und dreimal für 10 Minuten mit TBST abgewaschen. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte für 1,5 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nichtgebundener Antikörper wurde anschließend einmal kurz und zweimal für 10 Minuten mit TBST entfernt. Letztlich wurde die Membran 5 Minuten mit PBS gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Die Detektion erfolgte am *Typhoon Laser Scanner* bei einer Photomultipliersensitivität von 500–800 im Akquisitionsmodus Fluoreszenz und einer Auflösung von 100 Microns. Das Bild wurde mittels der Software *ImageJ* in ein .tiff-Format konvertiert und der Kontrast optimiert.

3.6.6 Antikörper Mikroarray

Die Bestimmung von relativen Unterschieden in der Abundanz von Cytokinen wurde mit dem *RayBio Biotin Label-based Human Antibody Array 1* der Firma *RayBioTech* (Norcross, USA) durchgeführt. Er basiert auf der Kopplung der Proteine mit einem Biotin-Label, der Bindung an auf eine Glasplatte gekoppelte Antikörper und der Detektion mit fluoreszenzmarkiertem (Cy3) Streptavidin. Es ermöglicht die simultane Detektion von relativen Expressionsunterschieden von 507 humanen Proteinen.

Die Durchführung erfolgte laut dem Protokoll des Herstellers. 200 µl Zellkulturüberstand wurden gegen DPBS- (KCl 0,2 g/l, Kaliumdihydrogenphosphat 0,2 g/l, NaCl 8,0 g/l, Dinatriumhydrogenphosphat 1,15 g/l) für 24 h bei 4 °C dialysiert. Die dialysierte Probe wurde für 5 Minuten bei 10 000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Zur Biotinylierung wurde in Abhängigkeit der Proteinkonzentration (36 µg je mg Protein) ein Labeling Reagenz zur Probe (V = 180 µl) gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 µl Stopp-Lösung gequencht und erneut über Nacht bei 4 °C gegen DPBS-dialysiert. Der Array wurde in Blocking-Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Proben wurden mit 300 µl Blocking-Lösung verdünnt und jeweils 400 µl auf dem Glasarray über Nacht bei leichtem Schwenken inkubiert. Die Lösung wurde abgenommen und dreimal mit je 800 µl Waschpuffer 1 für 5 Minuten und zweimal mit 2 000 µl Waschpuffer 1 für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zweimal für 5 Minuten mit 2 000 µl Waschpuffer 2 gewaschen. Für 2 h bei Raumtemperatur wurden die Mikroarrays mit jeweils 400 µl Streptavidin-Farbstoff bei leichtem Schütteln inkubiert. Der Glaschip wurde aus der Halterung genommen und in einem 30 ml Zentrifugationsgefäß dreimal mit Waschpuffer 1 und dreimal mit Waschpuffer 2 für je 10 Minuten gewaschen.

Abschließend wurde der Glaschip für 3 Minuten bei 1 000 rpm zentrifugiert, um Tropfen von der Oberfläche zu entfernen.

Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit einem *GenePix4000B*-Arraysscanner. Folgende Parameter wurden zum Scannen verwendet: Pixelgröße 10, Detektionswellenlänge 532 nm, PMT-Gain 450–660, Laserpower 1,66. Zur Auswertung wurde das Bild (.tif-Format) zusammen mit der .gal-Datei, die die Information über die Position der gespotteten Antikörper enthält, in die *GenePix Pro7 Acquisition and Analysis Microarray Software (Molecular Devices)* geladen. Die detaillierte Position der Spots wurde zunächst manuell angepasst und für jeden Spot das lokale Hintergrundsignal vom Median des Spotsignals abgezogen. Zunächst erfolgte eine Normalisierung mit dem excelbasierten BLG Analysis Tool (*RayBioTech*). Durch den Vergleich der Intensität der Positivkontrollen (bestehend aus drei Mengen biotinyliertes IgG) ist ein Vergleich über mehrere Arrays ohne Probleme möglich. Der normalisierte Wert ergibt sich dabei aus folgender Formel:

$$X(N_y) = X(y) \times \frac{P_1}{P(y)}$$

mit P_1 als Medianspotsignal der Positivkontrolle des Referenzarrays, $P(y)$ als Medianspotsignal der Positivkontrolle auf Vergleichsarray, $X(y)$ als Medianspotsignal des Spot X des Referenzarray und $X(N_y)$ als normalisierte Signalintensität für Spot X auf dem Vergleichsarray. Als Negativkontrolle diente der Puffer, mit dem die Antikörper auf den Array gedruckt wurden. Das Signal der Negativkontrolle war in allen Fällen im Bereich des Hintergrundsignals. Jeder der 507 Proteinantikörper ist jeweils als Duplex auf dem Array gedruckt. Als positives Signal wurde eine Signalintensität über 200 in beiden Positionen bewertet.

3.6.7 Größenausschlusschromatographie

Die analytische Gelfiltration basiert auf dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie. Hierfür wurde eine *Superdex 200 10/300*-Säule (*GE Healthcare*) mit einem Volumen von 24 ml und einem Ausschlussvolumen von $1,3 \times 10^6$ Da verwendet. Die Chromatographie erfolgte mit einer *ÄktaFPLC* (*GE Healthcare*) bei einer Temperatur von 4 °C und einem Fluss von 500 µl pro Minute. Die Säule wurde zunächst mit 40 ml PBS (entspricht 1,5 Säulenvolumina) equilibriert. Die Probe wurde über eine 1 ml Probenschleife injiziert und mit 80 ml PBS gewaschen. Die Fraktionierung erfolgte in Reagenzgläsern (500 µl je Fraktion). Die Fraktionen wurden eingetrocknet, in 500 µl N2-Medium aufgenommen und in einem Neuritenwachstumsassay auf ihre biologische Wirkung getestet.

3.6.8 Proteinfällung

Die Fällung von Proteinen erfolgte in einer modifizierten Version von Chevallet *et al.* (2007). Dazu wurden 20 ml konditioniertes Zellkulturmedium in einem Ultrazentrifugationsröhrchen mit 400 µl 10 % Sarkosyl NL vermischt. Nach Zugabe von TCA (Endkonzentration 7,5 %) wurde die Probe für 2 h auf Eis inkubiert und anschließend bei 10 000 g für 10 Minuten (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, zum Pellet 2 ml vorgekühltes THF gegeben und solange gemischt, bis sich das Pellet nahezu komplett aufgelöst hatte. Anschließend wurde erneut für 10 Minuten bei 10 000 g (4 °C) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbleibende Pellet wurde erneut vorsichtig mit 2 ml THF gewaschen und letztendlich in 100 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und mit der Hilfe eines Ultraschallbades (30 Minuten) vollständig aufgelöst.

3.7 Proteinidentifizierung und -quantifizierung

3.7.1 RP-HPLC

Für die Aufnahme der Massenspektren mittels LC-ESI-MS/MS wurden die extrahierten Peptide zunächst mittels Umkehrphasenchromatographie (RP-HPLC) an einer *U3000 RSCLnano* (Dionex LC Packings, Idstein, Deutschland) HPLC-Anlage aufgetrennt.

Hierfür wurde eine Vorkonzentrierung über eine Vorsäule (C₁₈-Pepmap-Säule (Thermo Fisher Scientific), 2 cm Länge, 75 µm Innendurchmesser, 3 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße) vorgenommen. Die eigentliche Trennung erfolgte über eine C₁₈-Pepmap-Säule (25 cm-50 cm Länge, 75 µm Innendurchmesser, 2 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße) mittels eines Gradienten von B (84 % Acetonitril, 0,1 % FA) über 120–150 Minuten bei einer Flussrate von 300 nL/min. Für die Herstellung von Lösungsmittel wurden ausschließlich Acetonitril der Reinheit HPLC-S Gradient Grade oder LC/MS Grade (*BioSolve*, Valkenswaard, NL) verwendet. Die eluierenden Peptide wurden durch Elektrospray (1,2-3,0 keV) direkt in das Massenspektrometer ionisiert.

3.7.2 Massenspektrometrie

Im Anschluss an die chromatographische Trennung wurden die Peptide im Massenspektrometer analysiert. Es wurden zwei Massenspektrometer eingesetzt: LTQ Orbitrap Velos und das Nachfolgemodell LTQ Orbitrap Elite (beide Thermo Fisher

Scientific). Sie unterscheiden sich überwiegend in dem Aufbau des Orbitrapmassenanalysators, basieren beide aber auf demselben Aufbau mit der Kopplung einer linearen Ionenfalle und einer Orbitrap.

Beide Massenspektrometer wurden in einem TOP20-datenabhängigen Modus betrieben. MS-Spektren wurden in der Orbitrap im Massenbereich 300–2 000 m/z (Orbitrap Velos), bzw. 350–1 700 m/z (Orbitrap Elite) aufgenommen mit Polysiloxan (445,120030 Da) als interne Kalibriermasse. Von bis zu 20 der intensivsten Ionen wurden MS/MS-Spektren nach kollisionsinduzierter Dissoziation (CID) in der linearen Ionenfalle aufgenommen. Die Isolationsweite betrug 2 Da, die normalisierte Kollisionsenergie 35 % bei einer Aktivierungszeit von 10 ms. Die dynamische Exklusion von einmal gestoßenen Ionen war aktiviert.

3.7.3 Identifizierung von Proteinen

Die Rohdaten der Massenspektrometer wurden mittels der Software Max Quant (Version 1.2.7.4) ausgewertet und Peptide sowie Proteine mit der Suchmaschine Andromeda identifiziert (Cox und Mann, 2008; Luber *et al.*, 2010). Dazu wurden die MS/MS-Spektren gegen eine Uniprot/Swissprot-Datenbank (nur humane Einträge, Version vom 13.06.2012) mit einer Massentoleranz von 10 ppm (MS-Modus) bzw. 0,5 Da (MS/MS-Modus) gesucht. Die Oxidation von Methionin sowie eine N-terminale Acetylierung wurden als variable Modifikation berücksichtigt. Die Falschpositivrate sowohl auf Peptid als auch auf Proteinlevel lag unter 1 %. Bekannte Kontaminanten wurden von der Liste der identifizierten Proteine entfernt.

3.7.3.1 USSC-Sekretom

Für die Identifizierung von Proteinen im USSC-Sekretom wurden Proteine mit mindestens einem unigenen Peptid mit mindestens 7 Aminosäuren herangezogen.

3.7.3.2 USSC-Zelllysate

Für die Identifizierung von Proteinen im USSC-Zelllysate wurden Proteine mit mindestens zwei unigenen Peptiden verwendet. Alle Proteine wurden ausschließlich basierend auf unigenen Peptiden quantifiziert.

Die statistische Analyse wurde mit *Perseus*, einem Teil von *MaxQuant*, durchgeführt. Darüber hinaus wurden durch eine R-basierte zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) signifikant regulierte Proteine ermittelt. Dabei wurden sechs Gruppen (unbehandelt, behandelt mit Läsionslysate, behandelt mit Kontrolllysate; je nach 24 h

und nach 72 h) miteinander verglichen. In einer Analyse wurden zunächst nur Unterschiede betrachtet, die nach unterschiedlicher Behandlung (2 vs. 2 vs. 2) oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten (3 vs. 3) aufgetreten sind. Eine weitere Analyse berücksichtigte Wechselwirkungen zwischen den Gruppen.

3.7.3.3 Zelllysate von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen

Für die Identifizierung von Proteinen im Zelllysate von CD34⁺ Zellen wurden Proteine mit mindestens zwei unigenen Peptide verwendet. Alle Proteine wurden ausschließlich basierend auf unigenen Peptiden quantifiziert.

Die statistische Analyse wurden mit *Perseus*, einem Teil von *MaxQuant*, durchgeführt. Darüber hinaus wurde ein R-basierter beidseitiger t-Test (FDR < 0,05, S0=0,8) über alle Konditionen durchgeführt, um eine Proteinregulation als signifikant deklarieren zu können.

3.7.4 Bioinformatik

Um angereicherte GO-Kriterien, KEGG-Signalwege oder Uniprot-Schlagwörter zu finden wurde ein exakter Fisher-Test durchgeführt (p-Wert < 0,001, Anreicherungsfaktor > 2,3).

Zusätzlich wurde DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*, Huang *et al.* (2009)) verwendet, um angereicherte GO-Kriterien, KEGG-Signalwege oder Uniprot-Schlagwörter herauszufiltern.

Die Identifizierung von Proteinen mit Signalpeptid erfolgte durch SignalP (Petersen *et al.*, 2011). Für die Vorhersage von nicht-klassisch sekretierten Proteinen wurde der SecretomeP-Algorithmus (Bendtsen *et al.*, 2005) angewendet. Dieser kann für Proteine basierend auf Parametern wie ihrer Aminosäurezusammensetzung oder ihrer Sekundärstruktur die Wahrscheinlichkeit für eine nicht-klassische Sekretion vorhergesagen. Ein NN-Wert über 0,5 wurde als nicht-klassische Sekretion gewertet.

USSC-Sekretom

4.1 Ergebnisse

USSC sind in der Lage das Neuritenwachstum primärer kortikaler Neurone zu fördern (Schira *et al.*, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass USSC nach Transplantation in lädiertes Rückenmarksgewebe von Ratten zu verstärktem Axonwachstum und signifikanter funktioneller Verbesserung der Motorik beitragen. Diese Verbesserung ist unabhängig von einer potentiellen neuronalen Differenzierung der Zellen und wird durch die Interaktion von USSC mit den Zellen der Läsionsstelle hervorgerufen (Schira *et al.*, 2012). Dies kann durch die Sekretion eines oder mehrerer Proteinfaktoren geschehen oder auch durch Zell-Zellinteraktionen. In diesem Teil der Arbeit soll die Rolle von USSC-sekretierten Proteinen bei der Unterstützung der Regeneration untersucht werden.

Durch eine umfangreiche Sekretomanalyse wurden in dieser Arbeit zunächst die von USSC sekretierten Proteine identifiziert (Abb. 4.1). Dabei wurden verschiedene MS-basierte Methoden eingesetzt (Kapitel 4.1.1.1) sowie eine gezielte Suche mit Cytokin-Arrays durchgeführt (Kapitel 4.1.1.2). Die Charakterisierung aller identifizierten sekretierten Proteine erfolgte durch bioinformatische Auswertung (Kapitel 4.1.2) und durch klassische biochemische Methoden (Kapitel 4.1.3) in einem Neuritenwachstumsassay (*neurite outgrowth assay*, NOA). Das Sekretom von USSC wurde darüber hinaus mit dem Sekretom anderer Zelllinien verglichen (Kapitel 4.1.4). Aufbauend auf den so identifizierten USSC-sekretierten Proteinen konnte gezielt

nach bekannten sowie nach potentiell neuen Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom gesucht werden (Kapitel 4.1.5 und 4.1.6), um entsprechende Kandidaten in einem NOA zu validieren (Kapitel 4.1.7).

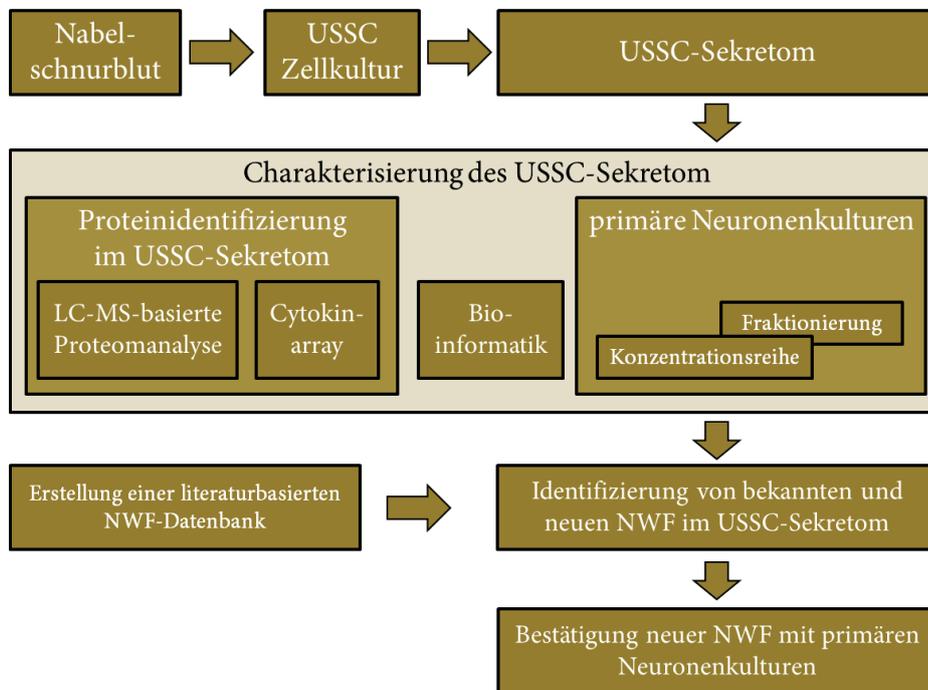


Abbildung 4.1 – Ablauf der USSC-Sekretomanalyse: USSC wurden aus Nabelschnurblut isoliert und nach *in vitro* Expansion das Sekretom der Zellen analysiert. Nach einer umfangreichen Proteinidentifizierung wurden die Proteine im Sekretom durch bioinformatische und proteinbiochemische Methoden charakterisiert. Letztlich wurde basierend auf diesen Daten ein Verzeichnis mit bekannten und auch mit neuen Neuritenwachstumsfaktoren (NWF) erstellt, die in primären Neuronkulturen bestätigt werden konnten.

4.1.1 Sekretomanalyse

Um das Sekretom der USSC untersuchen zu können, wurden USSC zunächst in Zellkultur in serumfreiem Medium kultiviert. Rekombinantes Transferrin wurde dem Medium in einer Konzentration von 5 µg/ml zugesetzt. In Vorexperimenten konnte gezeigt werden, dass dies der optimale Wert für Sekretomanalysen ist. Einerseits werden in der Analyse des Sekretoms keine niedrig abundanten Proteine durch eine zu hohe Transferrinkonzentration überdeckt (Abb. A.1 im Anhang). Andererseits werden ausreichend gute Wachstumsbedingungen für die Zellen geschaffen. Für die Charakterisierung des USSC-Sekretoms wurde der Zellkulturüberstand nach einer Kultivierungsdauer von 48 h analysiert. Der Proteingehalt im USSC-konditionierten Medium betrug über alle Analysen 102,5-144,0 µg/ml (bestimmt durch Aminosäure-

analyse von dialysiertem Medium).

4.1.1.1 Massenspektrometrie-basierte Proteinidentifizierung

Für eine detaillierte Analyse des USSC-Sekretoms mittels LC-MS wurden in dieser Arbeit mehrere Ansätze mit verschiedenen Aufreinigungsmethoden und verschiedenen Typen von Massenspektrometern verwendet. Die teilweise zueinander komplementären Methoden ermöglichen eine umfassende Identifizierung eines Großteils der Proteine im USSC-Sekretom.

Ein Überblick über die Methoden und die jeweils identifizierten Proteine ist in Tab. 4.1 dargestellt. Eine Aufkonzentrierung des konditionierten Mediums erfolgte entweder durch TCA-Präzipitation oder durch Lyophilisierung. Anschließend wurde die Probe in SDS-Puffer aufgenommen und eine 1D-PAGE sowohl zur Auftrennung als auch zur Entfernung von Detergenzien durchgeführt. Für die Flüssigchromatographie sind die Säulenlängen 25 cm und 50 cm zum Einsatz gekommen. Komplementiert wurde der Ablauf durch die Verwendung zweier Massenspektrometer (LTQ Orbitrap Velos und LTQ Orbitrap Elite). Die Parameter zur Identifizierung der Proteine waren in allen Datensätzen identisch.

In einer einzelnen Analyse des USSC-Sekretom konnten bis zu 1 002 Proteine nachgewiesen werden. Auf einen Vergleich der Parameter wird hier bewusst verzichtet, da diese Arbeit auf die Erstellung eines möglichst umfangreichen Katalogs des USSC-Sekretoms fokussiert ist. Insgesamt konnten 1 593 Proteine im USSC-Sekretom identifiziert werden. Die durch LC-MS identifizierten Proteine sind in Tab. 1 im Anhang dargestellt.

Tabelle 4.1 – Strategien zur Analyse von USSC-Sekretom mittels LC-MS-gekoppelter Proteomik:

Aufkonzentrierung	TCA-Fällung	TCA-Fällung	TCA-Fällung	Lyophilisierung	Lyophilisierung	Lyophilisierung	Lyophilisierung
Separation	Kurzgel	Kurzgel	Kurzgel	Kurzgel	Kurzgel	Kurzgel	1D-PAGE, 12 Bahnen
LC (Länge Säule, Gradientendauer)	50 cm, 2 h	50 cm, 2 h	25 cm, 2 h	50 cm, 2 h	50 cm, 2 h	50 cm, 2 h	50 cm, 12x 2 h
Massenspektrometer	LTQ OT Velos	LTQ OT Velos	LTQ OT Velos	LTQ OT Velos	LTQ OT Elite	LTQ OT Elite	LTQ OT Elite
Anzahl identifizierter Proteine	676	945	475	711	700	620	1 002

4.1.1.2 Analyse von USSC-Sekretom mit einem Antikörper-Microarray

Um ein möglichst umfassendes Bild des USSC-Sekretoms erfassen zu können, wurde dieses mit Antikörper-Microarrays analysiert. Die Sensitivität eines solchen Arrays liegt häufig höher als bei Massenspektrometrie-basierten Proteomanalysen, beschränkt sich in der Analyse aber auf einige wenige Proteine. Der hier verwendete Antikörper Microarray ist speziell für die Identifizierung und relative Quantifizierung von Cytokinen ausgelegt. Im Massenspektrometrie-basierten Ansatz konnten nur wenige Cytokine im USSC-Sekretom nachgewiesen werden, sei es durch ihre geringe Abundanz oder durch das häufig geringe Molgewicht der Cytokine.

In diesem gezielten Ansatz zur Identifizierung und Quantifizierung wurde ein Cytokin-Array mit 507 gespotteten Cytokinantikörpern verwendet. Dafür wurden die Proteine zunächst mit Biotin gekoppelt, mit dem Antikörper-gekoppelten Array inkubiert und anschließend das Biotin über dessen Wechselwirkung mit Streptavidin-gekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen. Unter den 507 als Duplex gespotteten Proteinantikörpern befinden sich überwiegend bekannte Cytokine und Wachstumsfaktoren, wie z. B. BDNF, EGF, FGF, HGF, Interleukine oder TGF. Darunter sind lediglich 49 Proteine, die bereits mittels LC-MS im USSC-Sekretom nachgewiesen wurden.

Vier unabhängig voneinander konditionierte USSC-Sekretome wurden mit Hilfe des o. g. Cytokin-Arrays analysiert. Als positives Signal wurde ein Fluoreszenzsignal über einer hintergrundbereinigten relativen Intensität von 200 in mindestens drei der vier Replikate interpretiert. Insgesamt konnten auf diese Weise 20 Cytokine und Wachstumsfaktoren im USSC-Sekretom identifiziert werden (Tab. 4.2). Darunter befinden sich auch fünf Proteine, die bereits durch LC-MS nachgewiesen werden konnten (Activin A, IGFBP 7, SPARC, TGF- β -1 und TSP). Somit konnten im USSC-Sekretom insgesamt 1 608 Proteine identifiziert werden.

4.1.2 Charakterisierung der USSC-Sekretomproteine

Die Identifizierung von 1 608 Proteinen im Sekretom der USSC durch LC-MS stellt die Voraussetzung für die Identifizierung von Neuritenwachstumsfaktoren dar. Hierzu wurden unter anderem bioinformatische Methoden eingesetzt, um relevante Signalwege, die im Bezug zu Neuritenwachstum stehen, nachzuweisen und um mögliche neue Neuritenwachstumsfaktoren zu finden. Dazu wurden die subzelluläre Lokalisation, die biologische und molekulare Funktion, involvierte Signalwege und die Relevanz für Neuritenwachstum analysiert. Alle diese Eigenschaften der identifizierten Proteine wurden für die Suche nach Neuritenwachstumsfaktoren berücksichtigt und die Kandidatenliste entsprechend eingegrenzt. Weiterhin konnte so ein Einblick gewonnen werden, welche weiteren wichtigen Signalwege durch die Sekretion von Signalmolekülen durch USSC reguliert werden.

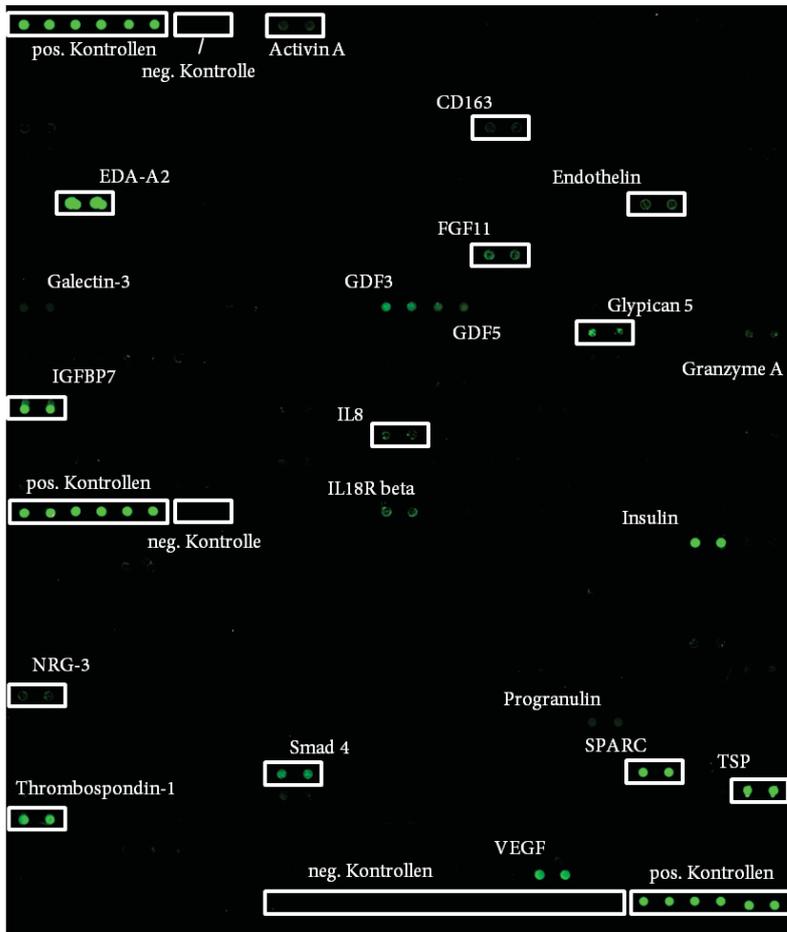


Abbildung 4.2 – Cytokin-Array Biotin-gekoppeltes USSC-Sekretom wurde mit einem Cytokin-Array mit 507 als Duplex gespotteten Antikörpern analysiert. Durch Detektion mit einem Streptavidin-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff konnte für insgesamt 20 Proteine in mindestens drei von vier analysierten USSC-Sekretomen ein positives Signal (relative Intensität >200, hervorgehoben durch weißen Rahmen) gemessen werden. Auf dem Array sind insgesamt 9 Positivkontrollen in aufsteigenden Konzentrationen und 9 Negativkontrollen (Antikörperpuffer) enthalten.

4.1.2.1 Subzelluläre Lokalisation der identifizierten Proteine

Zur Beschreibung der subzellulären Lokalisation der identifizierten Proteine wurden Informationen aus einer Datenbank und zwei verschiedenen Algorithmen verwendet:

1. *Uniprot* - in der Proteindatenbank hinterlegte Proteinlokalisierung
2. *SignalP* - Sequenzalgorithmus, der die Proteinsequenz nach Signalpeptiden zur klassischen Sekretion durchsucht
3. *SecretomeP* - Algorithmus, der die Wahrscheinlichkeit für nicht-klassische Sekretion berechnet

Von 1 608 identifizierten Proteinen sind 250 Proteine (15,6 %) in der Proteindatenbank *Uniprot* als sekretiert kategorisiert. Davon wiederum sind 81 Proteine als extrazellulär lokalisiert beschrieben. Eine cytoplasmatische Lokalisation ist für 25,5 % der Proteine beschrieben (*GeneOntology-Slim, Cellular Compartment, Dimmer et al. (2012)*). Die Einträge der *Uniprot*-Datenbank bezüglich der Annotierung für Proteineigenschaften

Tabelle 4.2 – Proteine, die in einem Cytokin-Array positiv nachgewiesen wurden: 20 Proteine (**fett** hervorgehoben) wurden in mindestens drei von vier Replikaten im USSC-Sekretom nachgewiesen. Drei weitere wurden im Sekretom von MSC nachgewiesen. Eine hintergrundbereinigte Signalstärke des farbstoffgekoppelten Streptavidins (angegeben als relative Intensität) über 200 gilt als positives Signal. Sechs der hier aufgelisteten Proteine (*kursiv*) bestätigen die Massenspektrometrie-basierte Identifizierung.

Proteinname	USSC 1	USSC 2	USSC 3	USSC 4	MSC
Activin A	305	-	281	403	1 215
CD 163	787	439	288	221	236
EDA-A2	3 620	3 344	2 893	4 220	3 200
Endothelin	1 314	668	395	268	221
FGF 11	435	308	484	232	-
Glypican 5	334	-	482	432	510
IGFBP 7	878	1 390	4 049	1 763	5 715
IL-15	395	277	204	-	-
IL-2 R α	443	236	261	-	-
IL-8	528	361	227	-	-
CXCL11	-	-	-	-	400
MCP-1	382	246	201	-	-
MMP-20	909	771	236	-	-
NRG2	266	549	220	-	-
NRG3	520	540	285	-	-
Smad 4	260	263	789	616	272
SPARC	752	734	1 646	2 294	1 188
TGF-β-1	722	445	268	-	-
TSP	4 130	9 781	10 844	6 753	7 440
Thrombospondin-1	226	325	1 196	266	2 493
TIMP-2	-	-	-	-	315
TNF-α	466	337	241	-	-
VEGF	-	-	1 054	431	1 740

stützen sich auf die *Uniprot Keywords* und die *GeneOntology*-Annotierung (Dimmer *et al.*, 2012).

Mittels SignalP (Petersen *et al.*, 2011) können in der Proteinsequenz vorhandene Signalpeptide identifiziert werden. Die Präsenz der Signalpeptidsequenz lässt auf die klassische Sekretion eines Proteins schließen. Bei 470 Proteinen konnte nachgewiesen werden, dass sie mit Signalpeptid translatiert werden. Dies entspricht 29,2 % der identifizierten Proteine.

Anhand des SecretomeP-Algorithmus (Bendtsen *et al.*, 2005) kann für Proteine basierend auf Parametern wie ihrer Aminosäurezusammensetzung oder ihrer Sekundärstruktur die Wahrscheinlichkeit für eine nicht-klassische Sekretion vorhergesagt werden. Im USSC-Sekretom konnte für 435 Proteine eine hohe Wahrscheinlichkeit berechnet werden. Dies bedeutet, dass 27,0 % aller identifizierten Proteine auf einem nicht-klassischem Wege sekretiert werden können (Abb. 4.3).

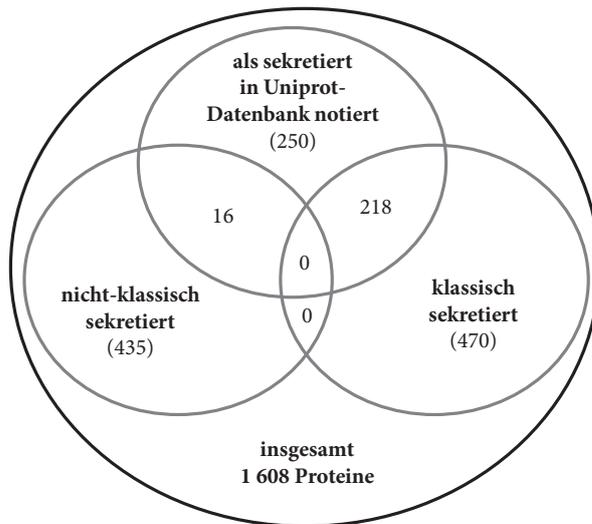


Abbildung 4.3 – Proteineigenschaften im USSC-Sekretom: 1 608 im USSC-Sekretom identifizierte Proteine wurden auf ihre subzelluläre Lokalisation untersucht. 470 Proteine tragen ein Signalpeptid und werden auf klassischem Wege sekretiert. Für 435 Proteine wurde eine nicht-klassische Sekretion vorhergesagt. Des Weiteren sind in der Uniprot-Datenbank 250 Proteine als sekretiert eingetragen. 453 identifizierte Proteine werden von keiner der drei Kategorien erfasst.

Insgesamt konnte für 921 aller identifizierter Proteine eine potentielle extrazelluläre Lokalisation nachgewiesen werden, weil sie in der *Uniprot*-Datenbank als extrazellulär lokalisiert beschrieben sind, durch SignalP ein Signalpeptid nachgewiesen werden konnte oder mittels SecretomeP eine nicht-klassische Sekretion vorhergesagt wurde (Abb. 4.3). Dies entspricht einem Anteil von 57,2 % aller identifizierten Proteine.

4.1.2.2 Signalwege und biologische Prozesse der identifizierten Proteine

Durch Anreicherung bestimmter Signalwege und biologischer Prozesse können Hinweise auf Proteine mit Bezug zu den beobachteten *in vivo*- und *in vitro*-Effekten des USSC-Sekretom gewonnen werden. Dabei bezieht sich eine Anreicherung auf die Anzahl an identifizierten Proteinen eines Signalweges, nicht aber auf die Abundanz einzelner Proteine.

Tabelle 4.3 – Signalwege, an denen Proteine des USSC-Sekretoms beteiligt sind: Einzelne Signalwege sind im Anhang abgebildet (Anhang 9).

biologischer Prozess	identifizierte Proteine im USSC-Sekretom	KEGG-Signalwegnummer
<i>fokale Adhäsion</i>	66	map04510
<i>ECM-Rezeptor Interaktion</i>	37	map04512
<i>Endozytose</i>	36	map04144
<i>Tight junction</i>	32	map04530
<i>gerichtetes Axonwachstum</i>	25	map04360
<i>Neurotrophin-Signalweg</i>	21	map04722
<i>Chemokine-Signalweg</i>	17	map04062

Die von USSC sekretierten Proteine sind in 4 252 verschiedene biologische Prozesse involviert (basierend auf GO-Schlagwörtern der Kategorie „Biologischer Prozess“, Mehrfachnennungen je Protein möglich). Nur bezogen auf eine verkleinerte Auswahl an bekannten biologischen Prozessen (sog. *GOslim*-Schlagwörter) werden 65 übergeordnete Prozesse mit den identifizierten Proteinen in Verbindung gebracht (Tab. 1 im Anhang). Einige Beispiele für die Prozesse und Signalwege, die mit Neuronüberleben und Neuritenwachstum in Verbindung gebracht werden können, sind in Tab. 4.3 aufgeführt sowie in Anhang 9 vollständig abgebildet.

4.1.3 Charakterisierung des USSC-Sekretoms anhand von Neuritenwachstumsassays

4.1.3.1 Etablierung der automatisierten Analyse des Neuritenwachstums im Hochdurchsatzverfahren

Um einen Faktor des USSC-Sekretoms als Neuritenwachstumsfaktor zu validieren, wurde ein automatisiertes Verfahren zur Quantifizierung der Anzahl und des Neuritenwachstums primärer kortikaler Neurone der Ratte etabliert. Die Anforderungen an ein solches Verfahren sind:

- Zuverlässige Quantifizierung von Neuritenlänge bezogen auf die Anzahl an Neurone,
- parallele Analyse verschiedener Bedingungen im Hochdurchsatz,
- Bereitstellung aussagekräftiger Ausleseparameter,
- reproduzierbare Ergebnisse.

Bisher wurden zur Quantifizierung von Neuronenanzahl und Neuritenlänge primäre kortikale Neurone auf Deckgläsern ausgesät, für 48 h inkubiert und die Zellen nach immunocytochemischer Färbung gegen neuronenspezifische Antigene durch Fluor“-eszenzmikroskopie und semiautomatischer Auswertung mittels des Programms *ImageJ* analysiert. Der zeitliche Aufwand und die dadurch limitierte Anzahl ausgewerteter Bilder und Bedingungen waren hier für die große Anzahl zu validierender Faktoren nicht adäquat.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein Neuritenwachstumassay, der zur automatisierten Analyse geeignet ist, etabliert.¹ Dazu wurden primäre kortikale Neurone in Zellkulturplatten mit 96 Schalen ausgesät, mit USSC-konditioniertem Medi-

¹Sämtliche hier durchgeführten Neuritenwachstumsassays wurden in Kollaboration mit Dr. Jessica Schira und Prof. Dr. Hans Werner Müller im Labor für Molekulare Neurobiologie der Neurologischen Klinik durchgeführt. Sie koordinierte die Kultivierung der USSC, die Gewinnung primärer kortikaler Neurone wie auch die immunocytochemische Färbung.

um (USSC-KM) inkubiert und fixiert. Die immunocytochemische Färbung erfolgte mit DAPI sowie einem β -III-Tubulin-Antikörper (neuronenspezifischer Marker). Anschließend wurden die Zellkulturplatten im Hochdurchsatzverfahren gescannt (Abb. 4.4). Die Quantifizierung von Neuronenanzahl und Neuritenlänge erfolgte mittels der Software *Neuronal Profiling bioapplication*, durch die ein Großteil der Neurone einer Schale erkannt und die Neuritenlänge automatisch ermittelt werden konnte.²

Als Ergebnis liefert die Auswertung im Hochdurchsatzverfahren die Anzahl an Neuronen pro analysierter Zellkulturschale (Abb. 4.5a), die absolute Anzahl an Neuriten pro Neuron, die durchschnittliche Länge aller Neuriten pro Neuron (Abb. 4.5b), die durchschnittliche Länge eines Neuriten, die Anzahl an Neuritenverknüpfungen und die Fläche aller Neuriten. Besonders deutlich wird die durch USSC-KM hervorgerufene Verbesserung des Neuronüberlebens durch die absolute Neuronenanzahl und die durchschnittliche Länge aller Neuriten pro Neuron. Anhand dieser beiden Parameter und insbesondere aus dem Vergleich mit der Kontrolle lässt sich der Einfluss auf das Neuronüberleben und das Neuritenwachstum optimal quantifizieren.

Die Etablierung der automatisierten Quantifizierung erforderte die Optimierung verschiedener Parameter, von denen hier beispielhaft nur der optimale Fixierzeitpunkt erwähnt sei. Durch den Vergleich von Neuronenanzahl und Neuritenlänge nach 24 h und 48 h Inkubationszeit (Abb. 4.5a) konnte festgestellt werden, dass die Anzahl Neurone nach 48 h Inkubation mit USSC-KM nur leicht verändert (-3 % bis +8 %) im Vergleich zu 24 h Inkubationszeit ist. Relevant ist der Vergleich mit unkontrolliertem Medium, in dem nach 48 h nur noch 38 % der Neurone auswertbar sind. Der Effekt des USSC-KM ist nach 48 h deutlich stärker ausgeprägt. Gleiches gilt für die Länge der Neuriten pro Neuron (Abb. 4.5b). Nach 48 h ist die Länge der Neuriten um 58 % bis 61 % vergrößert. Auch hier wird der Effekt des USSC-KM verglichen mit unkontrolliertem Medium nach 48 h Inkubation deutlicher als nach 24 h Inkubation.

4.1.3.2 Temperaturdegradation des USSC-KM

Die potentiellen Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-KM können sowohl Proteine, Peptide als auch organische Moleküle sein. Um die Art des Faktors eingrenzen zu können, wurde das USSC-KM für 5 Minuten auf 80 °C bzw. 90 °C erhitzt. Bei diesen Temperaturen degradieren in der Regel die meisten Proteine und Peptide. Das erhitzte Medium wurde anschließend auf seine Aktivität im NOA überprüft (Abb. 4.6). Durch Erhitzen des USSC-KM überlebten nach 48 h verglichen mit unbehandeltem

²Die Quantifizierung erfolgte im Leibniz-Institut für Umwelt-medizinische Forschung (IUF) im Labor von Prof. Dr. med. Ellen Fritsche. Die Durchführung der Quantifizierung wurde in gleichen Teilen von Heiner Falkenberg und von Dr. Jessica Schira durchgeführt.

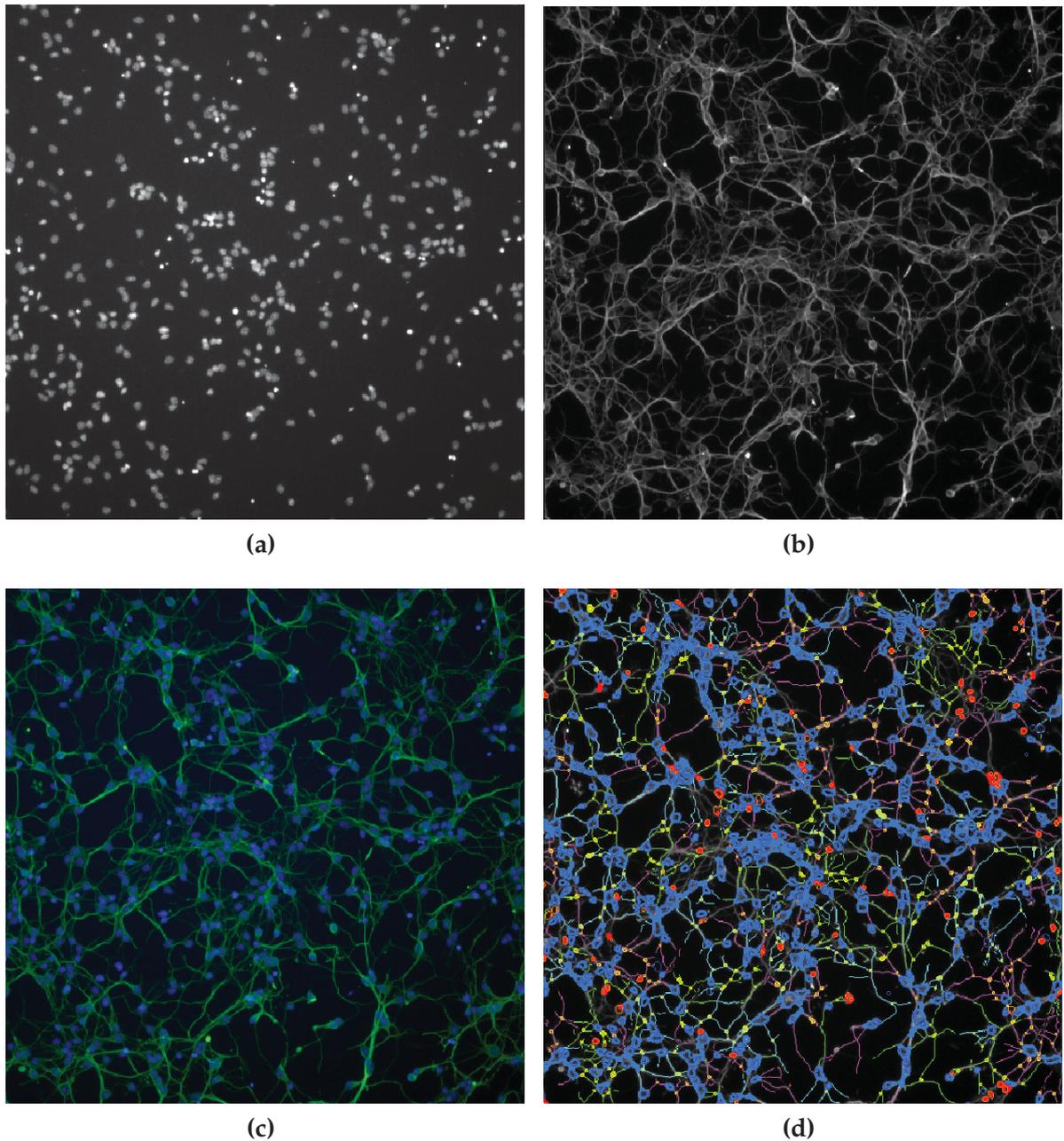
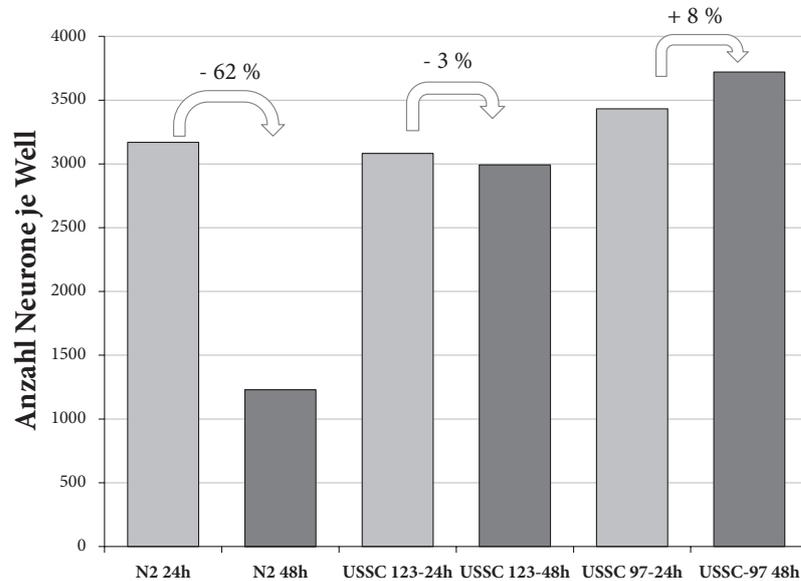
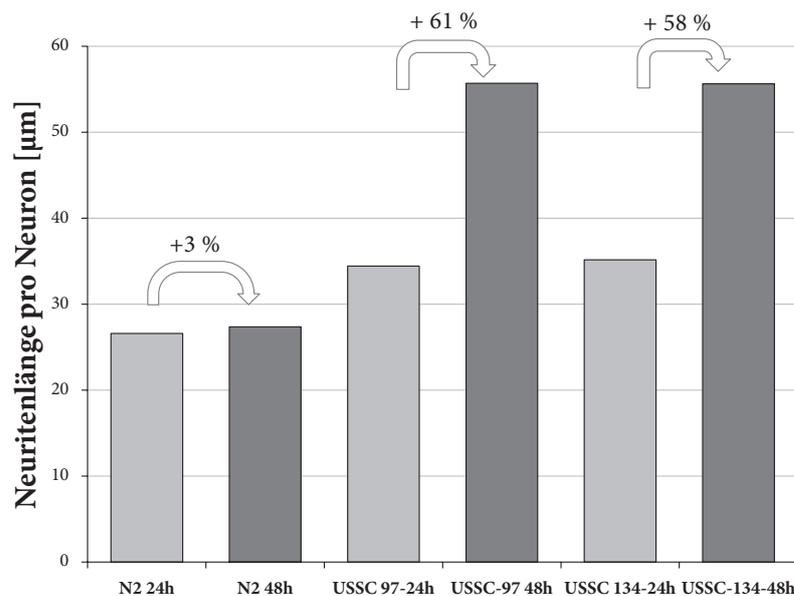


Abbildung 4.4 – Primäre kortikale Neurone nach Inkubation mit USSC-KM: Nach 24 h Inkubation mit USSC-KM wurden die Neurone sowohl mit DAPI (a) als auch mit einem β -III-Tubulin-Antikörper (b) gefärbt (Überlagerung in (c)). In (d) sind vermessene Neuriten (türkis, grün, lila), Zellkörper (blau), Verknüpfungspunkte (gelb) und nicht ausgewertete Zellen (rot) farblich markiert. Pro Zellkulturschale wurden 25 dieser Bilder aufgenommen und ausgewertet. In dem hier dargestellten Bild wurden 424 Neurone mit einer durchschnittlichen Neuritenlänge von 39,22 μ m pro Neuron und im Schnitt 1,77 Neuriten pro Neuron gezählt. Die Gesamtlänge aller hier abgebildeten Neuriten beträgt 16,6 mm.



(a)



(b)

Abbildung 4.5 – Einfluss der Inkubationsdauer von primären Neuronen in USSC-KM: Primäre kortikale Neurone wurden mit USSC-KM inkubiert und nach 24 h bzw. 48 h fixiert. Die Anzahl an überlebenden Neuronen im USSC-KM unterscheidet sich zwischen den Fixierpunkten nur gering (a), dafür nimmt die Länge der Neuriten pro Neuron (b) deutlich zu. Bei unconditioniertem Medium verhält es sich konträr: Nach 48 h überleben insgesamt weniger Zellen, aber die Länge der Neuriten pro Neuron bleibt annähernd konstant. Die hier gezeigten Daten basieren auf einer Einzelmessung, wurden aber durch entsprechende Wiederholungen mehrfach bestätigt.

USSC-KM nur noch 35 % der Neurone. Zusätzlich haben die überlebenden Neurone um 82 % kürzere Neuriten.

4.1.3.3 Konzentrationsreihe USSC-Sekretom

Um den Einfluss der Konzentration des USSC-KM zu untersuchen, wurde der Effekt von verschiedenen USSC-KM-Konzentrationen auf primäre kortikale Neuronen gemessen. Dazu wurden 500 µl USSC-KM mit unterschiedlichen Volumina PBS oder unkonditioniertem N2-Medium verdünnt (Abb. 4.7). Während sich geringe Verdünnungen (1,00:1,03; entspricht 15 µl PBS in 500 µl USSC-KM) positiv auf die Anzahl an Neuronen und die Neuritenlänge auswirken, bewirkt bereits eine 1,1-fache Verdünnung des Mediums mit 50 µl PBS oder unkonditioniertem Medium eine deutlich geringere Zahl an überlebenden Zellen. Wird USSC-KM noch stärker verdünnt, verschwindet der Unterschied zu unkonditioniertem N2-Medium gänzlich (Daten der Übersichtlichkeit halber nicht gezeigt).

4.1.3.4 Fraktionierung von USSC-Sekretom

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das USSC-Sekretom >900 Proteine enthält (s. Kapitel 4.1.1.1). Wenn das Sekretom in Subsekretome unterteilt werden kann, die anschließend im NOA bezüglich ihrer Wirkung auf primäre Neurone getestet werden können, dann kann die Anzahl potentieller

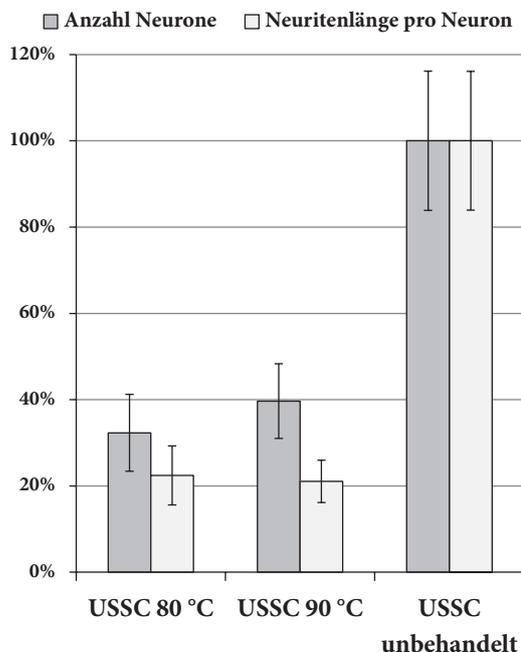


Abbildung 4.6 – Temperaturdegradation von USSC-KM: USSC-KM wurde für 5 Minuten auf 80 °C bzw. 90 °C erhitzt und anschließend für 48 h mit primären kortikalen Neuronen inkubiert. Verglichen mit unbehandeltem USSC-KM nimmt sowohl die Anzahl überlebender Neurone ($p < 0,005$) als auch die durchschnittliche Länge der Neuriten ab ($p < 0,001$). Die Daten stellen Mittelwerte aus 6 Experimenten mit jeweils 500 µl USSC-KM dar.

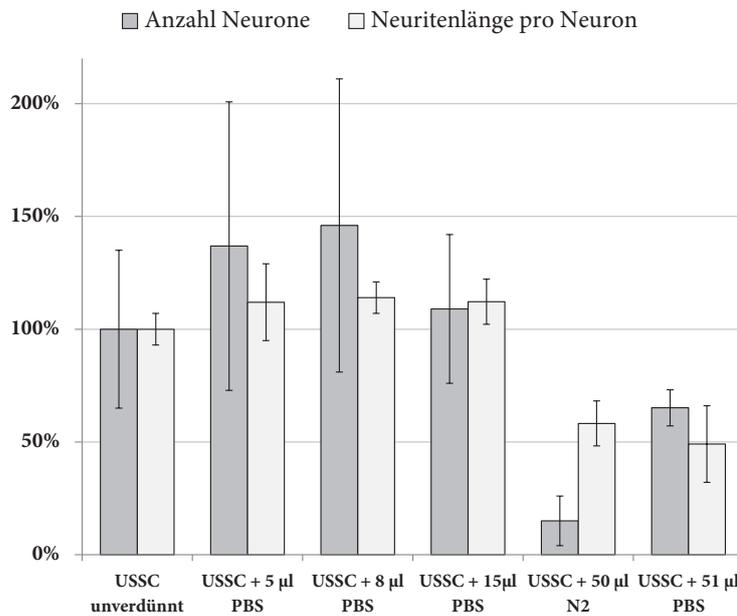


Abbildung 4.7 – Effekt der Verdünnung von USSC-KM: 500 µl USSC-KM wurde mit unterschiedlichen Volumina PBS oder unkonditioniertem Medium verdünnt. Während sich kleine Volumina bis 15 µl positiv auf die Anzahl an Neuronen und die Neuritenlänge auswirken, bewirkt bereits eine 1,0:1,1-fache Verdünnung des Mediums mit 50 µl eine geringere Zahl an überlebenden Zellen (Mittelwerte aus 6 Experimenten mit jeweils 500 µl USSC-KM).

Faktoren eingegrenzt werden. Um einen eventuellen Funktionsverlust zu vermeiden, wurde hier eine Trennung unter nativen Bedingungen gewählt. Eine Möglichkeit zur nicht denaturierenden Fraktionierung ist die Größenausschlusschromatographie (SEC), bei der Proteine anhand ihrer molekularen Größe aufgetrennt werden.

Die Separation von 500 µl USSC-Sekretom erfolgte über Größenausschlusschromatographie (Abb. 4.8a). Es konnten mehrere Fraktionen erstellt werden. Wie bereits oben gezeigt, ist es notwendig, die Konzentration einzelner Proteine gegenüber dem Ausgangsmedium unverändert zu halten. Daher wurden die Fraktionen lyophilisiert und im selben Volumen unkonditioniertem Medium wie das ursprüngliche USSC-Sekretom (500 µl) aufgenommen. Die so behandelten Fraktionen wurden für 48 h mit primären Neuronen kultiviert und im NOA auf ihre Aktivität getestet. In keiner Fraktion – sowohl Durchlauf als auch spätere Fraktionen – konnten primäre Neurone überleben (Abb. 4.8b). Die Zellzahl liegt niedriger als nach Inkubation mit unfraktioniertem, unkonditioniertem Medium.

4.1.4 USSC-Sekretom im Vergleich mit anderen Zelllinien

Der von Schira *et al.* (2012) beschriebene Zellüberleben-fördernde Einfluss des USSC-konditionierten Mediums auf primäre Neurone *in vitro* kann auch durch das konditionierte Medium anderer Zelllinien hervorgerufen werden. Dies trifft insbesondere auf MSC zu (Gu *et al.*, 2012), deren Sekretom in der Vergangenheit intensiv untersucht wurde und das bereits bei klinischen Therapien zum Einsatz kommt (Carvalho *et al.*, 2011).

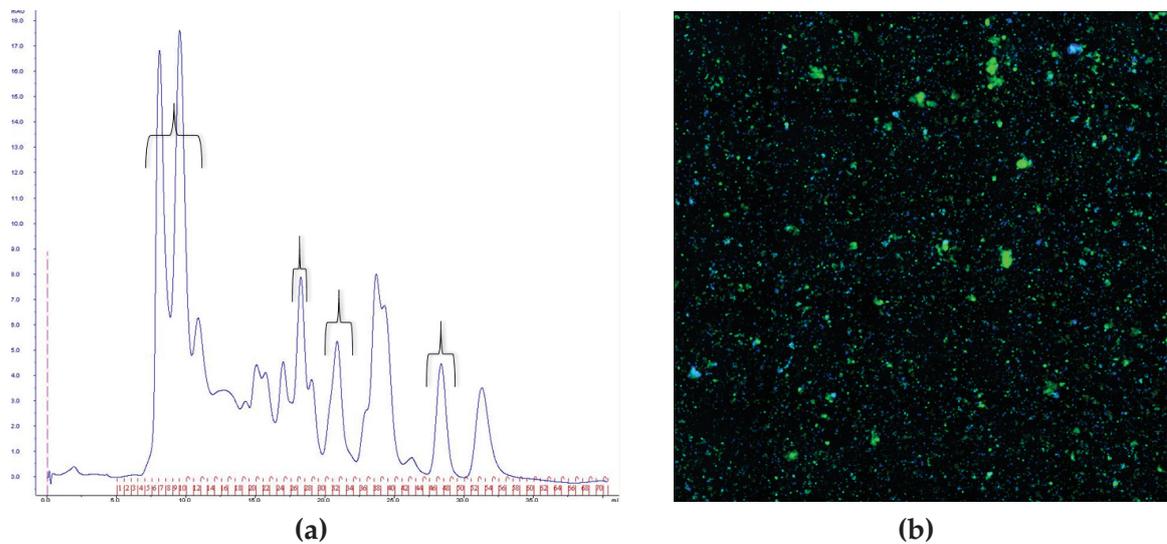


Abbildung 4.8 – Fraktionierung von USSC-KM mittels SEC: 15 ml USSC-Zellkulturüberstand wurden auf 500 μ l konzentriert und mittels Größenausschlusschromatographie aufgetrennt. 72 Fraktionen zu je 500 μ l wurden gesammelt und lyophilisiert (a). Einzelne Fraktionen wurden entsprechend der markierten Klammern teilweise vereinigt (Fraktionen 7-10, 27-28, 31-33, 46-48), in 500 μ l unkonditioniertem Medium aufgenommen und im NOA auf ihre Aktivität getestet. Als Kontrolle wurde 500 μ l PBS lyophilisiert und in unkonditioniertem Medium aufgenommen. Es konnten keine überlebenden Neurone beobachtet werden (b).

Im Gegensatz zu MSC- und USSC-konditioniertem Medium ist das konditionierte Medium von humanen Fibroblasten nicht in der Lage, diesen Effekt hervorzurufen. Insbesondere bei der *in vivo* Situation nach SCI sind Fibroblasten für ihre narbenbildende Funktion bekannt, die die Regeneration deutlich inhibiert. Zwar können Fibroblasten im PNS durch ihre Wirkung auf Schwannzellen zu Neuritenwachstum führen (van Neerven *et al.*, 2013), im ZNS hingegen hemmen sie durch die Sekretion von neuritenwachstumbehindernden Faktoren wie Semaphorine (Tannemaat *et al.*, 2007) die Regeneration.

In diesem Abschnitt soll das USSC-Sekretom mit dem Sekretom von Fibroblasten und MSC verglichen werden. Dieser Vergleich erfolgt anhand der durch Massenspektrometrie und Cytokin-Arrays identifizierten Proteine.

4.1.4.1 Vergleich der Sekretome basierend auf LC-MS Daten

Die sekretierten Proteine von humanen Fibroblasten und MSC wurden in einem Proteomansatz analysiert. Insgesamt konnten im Fibroblasten-Sekretom 938 Proteine identifiziert werden, im MSC-Sekretom 1 006. Ein Vergleich mit den 1 608 im USSC-Sekretom identifizierten Proteinen (Tab. 1 im Anhang) zeigt, dass die Überschneidung zwischen diesen drei Datensätzen sehr hoch ist (Abb. 4.9). 546

Proteine werden von allen drei Zelllinien sekretiert, das sind über die Hälfte der im Fibroblasten-Sekretom und MSC-Sekretom identifizierten Proteine. Nur 91 unique Proteine werden ausschließlich im Fibroblasten-Sekretom identifiziert, während 149 Proteine exklusiv im MSC-Sekretom vorkommen. Die Überschneidung zwischen USSC-Sekretom und Fibroblasten-Sekretom sowie zwischen USSC-Sekretom und MSC-Sekretom liegt bei 832 bzw. 797 Proteinen. Dabei ist der Anteil an sekretierten Proteinen in allen Datensätzen gleich hoch: Im MSC- und auch im Fibroblasten-Sekretom sind 56 % aller Proteine als sekretiert vorhergesagt. Zum Vergleich: Im USSC-Sekretom liegt der Anteil sekretierter Proteine bei 58 % (s. Kapitel 4.1.1.1).

Im Sekretom von MSC wurden viele Proteine mit Bezug zur fokalen Adhäsion identifiziert (52 Proteine). Ebensoviele Proteine sind verknüpft mit einer Funktion bei der Axonzielführung (Tab. 5 im Anhang). Darüber hinaus wurden 15 Proteine des KEGG-Signalweges *Neurotrophine Signaling* identifiziert. Im USSC-Sekretom konnten 21 Proteine dieses Signalweges identifiziert werden (Tab. 4.3).

Auch im Sekretom von humanen Fibroblasten konnten 47 Proteine identifiziert werden, deren Funktion mit dem Prozess der Axonzielführung verknüpft sind. Aus dem KEGG-Signalweg *fokale Adhäsion* konnten 47 Proteine im Sekretom von Fibroblasten nachgewiesen werden (Tab. 4 im Anhang). 17 Proteine konnten dem oben erwähnten KEGG-Signalweg *Neurotrophine Signaling* zugeordnet werden.

4.1.4.2 Analyse von MSC-Sekretom mit einem Antikörper-Microarray

Durch Analyse von MSC-Sekretom mit einem Antikörper-Microarray (vgl. Kapitel 4.1.1.2 auf Seite 40) konnte für 13 Proteine ein positives Signal detektiert werden (Tab. 4.2). Elf der 13 Proteine wurden bereits im USSC-Sekretom detektiert. Ausnahmen sind CXCL11, TIMP-2 und VEGF, die ausschließlich im MSC-Sekretom nachgewiesen wurden. Der Cytokin-Array bestätigt für die Proteine Activin A, IGFBP-7, SPARC, TSP und TIMP-2 die Identifizierung durch LC-MS.

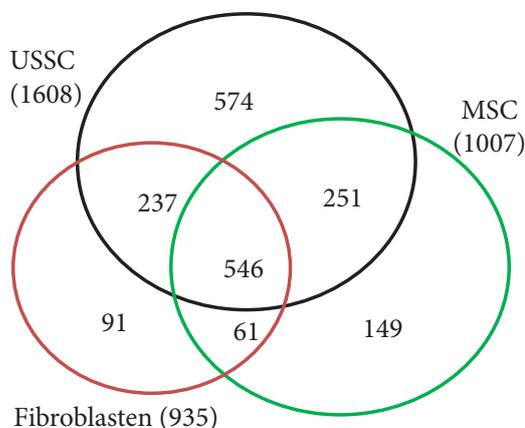


Abbildung 4.9 – Venn-Diagramm der sekretierten Proteine von MSC, Fibroblasten und USSC: 546 Proteine werden sowohl im USSC-Sekretom, im MSC-Sekretom als auch im Fibroblasten-Sekretom nachgewiesen.

Im Falle von Activin A konnte ein signifikanter Unterschied in der Proteinkonzentration im USSC-Sekretom und MSC-Sekretom festgestellt werden (vgl. Tab. 4.2). Im MSC-Sekretom kommt Activin A mit einer mindestens dreimal so hohen Konzentration vor. Ebenfalls ein signifikanter Unterschied wurde für Thrombospondin-1 detektiert.

4.1.5 Bekannte Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom

Durch Massenspektrometrie-basierter Proteomik und einem Cytokin-Array konnten 1 608 Proteine im USSC-Sekretom identifiziert werden. Das Ziel der Arbeit war es, jene proteinogenen Faktoren zu identifizieren, die von USSC sezerniert werden und in der Lage sind, eine verbesserte Regeneration des Rückenmarks zu vermitteln. In Vorexperimenten konnte aufgrund der Inkompatibilität mit dem NOA eine Eingrenzung der Faktoren durch Vorfraktionierung nicht erfolgreich durchgeführt werden. Dagegen ermöglichte die bioinformatische Herangehensweise eine erste Eingrenzung der Kandidaten. Durch die Beteiligung der identifizierten Proteine an bestimmten Signalwege (Tab. 4.3) konnten mehrere Proteine gefunden werden, die

Tabelle 4.4 – Bekannte sekretierte Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom: Die angegebene Literaturstelle ist ggf. nur eine von mehreren, die diesen Faktor als Neuritenwachstumsfaktor beschreiben.

Genname	Uniprot ID	Fibroblasten-Sekretom	MSC-Sekretom	Eigenschaft	Literaturstelle
AGRIN	O00468	✓	✓	sezerniert	Zhang <i>et al.</i> (2011)
CLU	P10909	✓	✓	sezerniert	Kang <i>et al.</i> (2005)
Gelsolin	P06396	✓	✓	sezerniert	Furnish <i>et al.</i> (2001)
Laminin	P11047	✓	✓	sezerniert	Rankin <i>et al.</i> (2008)
MIF	P14174	✓	✓	sezerniert	Bank <i>et al.</i> (2012)
Moesin	P26038	✓	✓	sezerniert	Marsick <i>et al.</i> (2012)
NDNF	Q8TB73	✓	✓	sezerniert	Kuang <i>et al.</i> (2010)
Nidogen	P14543	✓	✓	sezerniert	Lee <i>et al.</i> (2009)
NRP	O14786	✓	✓	sezerniert	Gorba <i>et al.</i> (2006)
Par-4	Q96IZ0	-	-	sezerniert	Guo <i>et al.</i> (2001)
PEDF	P36955	✓	✓	sezerniert	Houenou <i>et al.</i> (1999)
Periostin	Q15063	-	-	sezerniert	Kudo <i>et al.</i> (2007)
Progranulin	P28799	✓	-	sezerniert	van Damme <i>et al.</i> (2008)
SDF1	P48061	✓	-	sezerniert	Shyu <i>et al.</i> (2008)
SERPINE1	P05121	✓	✓	sezerniert	Soeda <i>et al.</i> (2008)
SERPINE2	P07093	✓	✓	sezerniert	Houenou <i>et al.</i> (1995)
SPARC	P09486	✓	✓	sezerniert	Au <i>et al.</i> (2007)
Tenascin-C	P24821	✓	✓	sezerniert	Neidhardt <i>et al.</i> (2003)
TGFB2	P61812	-	-	sezerniert	Zhang <i>et al.</i> (2006)
Versican V1	P13611	✓	✓	sezerniert	Wu <i>et al.</i> (2004)

eine bekannte Funktion in Verbindung mit Nervenwachstum, Regeneration nach Rückenmarksläsion, Neuronüberleben und/oder Neuritenwachstum haben.

20 der 921 im USSC-Sekretom identifizierten und als sekretiert kategorisierten Proteine wurden in der Literatur bisher explizit als Neuritenwachstumsfaktoren beschrieben (Tab. 4.4). Die Funktionen dieser Proteine stehen teilweise in direktem Zusammenhang mit den beobachteten Effekten von USSC-Sekretom auf primäre kortikale Neurone und von USSC auf lädiertes Rückenmarksgewebe.

Auch im Sekretom humaner Fibroblasten und MSC (Kapitel 4.1.4) konnten Neuritenwachstumsfaktoren identifiziert werden. Die meisten der 20 Neuritenwachstumsfaktoren wurden sowohl von USSC als auch von Fibroblasten und MSC sekretiert (Tab. 4.4).

4.1.6 Datenbank mit bekannten Neuritenwachstumsfaktoren

Im USSC-Sekretom konnten in dieser Arbeit bisher 20 Faktoren identifiziert werden, die als Neuritenwachstumsfaktor bekannt sind (Tab. 4.4). Neben diesen bekannten Kandidaten besteht die Möglichkeit, dass USSC Proteine sekretieren, die bisher nicht als Neuritenwachstumsfaktor beschrieben wurden, aber eine ebensolche Funktion besitzen. Zu diesem Zweck soll im folgenden Kapitel mit bioinformatischen Methoden nach diesen Faktoren gesucht und das Sekretom der USSC unter Zuhilfenahme einer Datenbank mit bekannten Neuritenwachstumsfaktoren charakterisiert werden. Die gemeinsamen Charakteristiken der bekannten Neuritenwachstumsfaktoren sollen anschließend dabei helfen, neue Kandidatenproteine im USSC-Sekretom vorherzusagen und zu validieren.

Bekannte Neuritenwachstumsfaktoren sollten bestimmte gemeinsame Eigenschaften aufweisen. Wenn nun umgekehrt im USSC-Sekretom Proteine mit genau diesen Eigenschaften gefunden werden, ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass dieses Protein ebenfalls ein Neuritenwachstumsfaktor ist. Diese Herangehensweise bestätigt diese Proteine nicht direkt als Neuritenwachstumsfaktor. Dies kann nur mittels umfangreicherer Experimente erfolgen. Nichtsdestotrotz stellt dieser bioinformatische Weg eine unvoreingenommene Möglichkeit dar, in der Gesamtheit der 921 USSC-sekretierten Proteine nach neuen Neuritenwachstumsfaktoren zu suchen.

4.1.6.1 In Literatur beschriebene Neuritenwachstumsfaktoren

Die Erstellung einer Liste mit bekannten Neuritenwachstumsfaktoren basiert auf publizierten Arbeiten der Jahre 1972-2013 und ihrer Abstracts in der PubMed-Datenbank. Das Suchkriterium für die initiale Suche ist dabei gewesen: Das Stichwort *Neurite outgrowth factor* muss im Titel oder in der Zusammenfassung vorkommen.

Basierend auf dieser Suche wurden 3 239 Literaturstellen gefunden. 31 Publikationen stammen aus den Jahren 1972-1979, 331 Publikationen aus den Jahren 1980-1989, 974 Publikationen aus den Jahren 1990-1999, 1 402 aus den Jahren 2000-2009 und 501 Publikationen aus den Jahren 2010-2013.

Der Inhalt jeder einzelnen Literaturstelle wurde manuell auf mögliche Neuritenwachstumsfaktoren hin analysiert. Nicht relevant waren dabei nicht-proteinogene Faktoren (z. B. organische Moleküle) oder solche Proteine, die nur indirekt am Prozess des Neuritenwachstums beteiligt sind (zum Beispiel nach Aktivierung durch Bindung eines extrazellulär lokalisierten Protein oder eines Transkriptionsfaktors). Nicht berücksichtigt wurden Proteine, deren Neuritenwachstumsfaktor-Funktion (insbesondere *in vivo*) auf der Modulation der ECM basiert, weil diese Funktion nicht mit dem hier etablierten Neuritenwachstumsassay (Kapitel 4.1.3.1 auf Seite 44) *in vitro* nachgewiesen werden kann. Auf diese Weise konnten 155 nicht redundante Faktoren herausgearbeitet werden, die als proteinogener Neuritenwachstumsfaktor beschrieben wurden. 41 Proteine haben dabei einen negativen Einfluss auf das Wachstum von Neuriten und wurden daher bei der Erstellung der Datenbank nicht weiter berücksichtigt. Für 114 Proteine wurde ein positiver Effekt auf Neuritenwachstum beschrieben. Die positiven Neuritenwachstumsfaktoren sind in Tab. 3 im Anhang aufgelistet und werden im Folgenden charakterisiert.

Für die in Tab. 3 im Anhang aufgelisteten Faktoren wurde ihre subzelluläre Lokalisation annotiert (Uniprot, GO SecretomeP, SignalP; vgl. Kapitel 4.1.2) und ihre biologischen und molekularen Funktionen (Uniprot, GO) verglichen. 52 der 114 positiven Faktoren sind von Uniprot als sekretiert oder extrazellulär lokalisiert klassifiziert. 61 der 114 Proteine tragen laut SignalP ein Signalpeptid und werden auf klassischem Wege sezerniert (54 %). Bei 20 der 114 Proteine (18 %) existieren laut SecretomeP deutliche Hinweise auf eine nicht-klassische Sezernierung. Insgesamt werden 74 % der Faktoren (84) sekretiert. Des Weiteren liegen elf membranständige Proteine, ein Golgi-membran-assoziiertes Protein sowie fünf überwiegend im Cytoplasma lokalisierte Proteine vor. In dem konkreten Fall des von Schira *et al.* (2012) *in vivo* und *in vitro* beobachteten Neuritenwachstums kommen nur extrazellulär sekretierte Proteine in Frage, deshalb werden zur weiteren Charakterisierung auch nur die 84 sekretierten Faktoren herangezogen.

Die Anreicherung bestimmter molekularer Funktionen und Uniprot-Keywords wurde mit Hilfe von DAVID (Huang *et al.*, 2009) und MaxQuant (Cox und Mann, 2008) analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass 50 % (57) der Proteine posttranslational durch eine Glykosylierung modifiziert werden können. Des Weiteren ist der biologische Prozess „*cell surface receptor linked signaling pathway*“ für 41 Proteine hinterlegt. Als molekulare Funktion der Faktoren tritt besonders häufig „*receptor binding*“ auf (49 Proteine).

Basierend auf bestimmten Proteineigenschaften, subzellulärer Lokalisationen und Proteinfunktionen konnte ein Vergleich mit den Eigenschaften aller sekretierter

humaner Proteine in der Uniprot-Datenbank (insgesamt 1 992 Einträge) durchgeführt werden. Es konnten 39 Proteineigenschaften mit Bezug zum beobachteten *in vitro*-Effekt der USSC ermittelt werden, die unter den bekannten Neuritenwachstumsfaktoren signifikant angereichert sind ($>$ Faktor 2) und von mindestens zehn Faktoren geteilt werden (Tab. 4.5). Mit ihnen können bekannte Neuritenwachstumsfaktoren klassifiziert werden.

Diese Kriterien zur Beschreibung von bekannten Neuritenwachstumsfaktoren überschneiden sich. So werden 64 der 84 Neuritenwachstumsfaktoren durch fünf oder mehr der ausgewählten Kriterien beschrieben. 36 Faktoren werden durch ≥ 12 Kriterien beschrieben. Durch Eingrenzung von Proteinen anhand dieser Kriterien können neue potentielle Neuritenwachstumsfaktoren gefunden werden. Im folgenden Kapitel sollen diese Kriterien angewendet werden, um das USSC-Sekretom nach neuen potentiellen Neuritenwachstumsfaktoren zu durchsuchen.

4.1.6.2 Suche nach neuen Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom

Im USSC-Sekretom konnten innerhalb der 921 nachweislich sekretierten Proteine 11 bekannte Neuritenwachstumsfaktoren identifiziert werden (Tab. 4.4). Weitere bisher noch nicht als Neuritenwachstumsfaktoren beschriebene Kandidaten wurden durch die Anwendung der oben beschriebenen Kriterien auf die Liste mit USSC-sekretierten Proteinen identifiziert. Dazu wurden die Proteine des USSC-Sekretom entsprechend Tab. 4.5 charakterisiert.

Von den 921 USSC-sekretierten Proteinen werden 66 Proteine durch 12 oder mehr der 39 in Tab. 4.5 beschriebenen Kategorien charakterisiert. 30 Proteine decken mehr als 16 Kategorien ab. Diese 110 potentiellen Neuritenwachstumsfaktoren sind in Tab. 4.6 aufgelistet.

4.1.7 Validierung einzelner identifizierter Neuritenwachstumsfaktoren

Im USSC-konditionierten Medium konnten sowohl bereits bekannte Neuritenwachstumsfaktoren als auch mögliche neue bzw. noch nicht im *in vitro*-Assay getestete Faktoren nachgewiesen werden (s. Kapitel 4.1.5 und 4.1.6.2). Für die Validierung einzelner Faktoren wurde nur eine Auswahl von Proteinen herangezogen (Tab. 4.7). Diese vier Proteine wurden im NOA bezüglich ihrer Wirkung auf primäre kortikale Neurone untersucht. Dazu wurden zwei Strategien angewendet:

- Neutralisation von Kandidatenproteinen im USSC-KM durch Neutralisationsantikörper und
- Zugabe rekombinanter Kandidatenproteine zu unkonditioniertem Medium.

Tabelle 4.5 – Eigenschaften von Neuritenwachstumsfaktoren: 84 literaturbekannte Neuritenwachstumsfaktoren wurden charakterisiert. Die Liste stellt eine Auswahl von 39 Eigenschaften dar, die im Vergleich zu allen 1941 sekretierten Proteinen der Uniprot-Datenbank mindestens um den Faktor 2,0 angereichert sind. (BP = biologischer Prozess, MF = molekulare Funktion, KEGG = Signalweg, US = Uniprot-Schlagwort)

Eigen-schaft	Name	Anzahl Proteine	Anzahl NWF	Anreicherungs-faktor	p-Wert
BP	<i>axon guidance</i>	57	11	4,7	1,1E-05
BP	<i>biological regulation</i>	757	70	2,2	1,1E-18
BP	<i>cell projection organization</i>	18	6	8,0	4,9E-05
BP	<i>cell proliferation</i>	88	13	3,6	3,2E-05
BP	<i>cell surface receptor linked signaling pathway</i>	259	35	3,3	9,4E-12
BP	<i>cellular component morphogenesis</i>	27	8	7,1	6,7E-06
BP	<i>cellular component organization</i>	170	21	3,0	1,8E-06
BP	<i>cellular component organization or biogenesis</i>	170	21	3,0	1,8E-06
BP	<i>cellular component organization or biogenesis at cellular level</i>	101	14	3,3	3,3E-05
BP	<i>cellular response to stimulus</i>	433	56	3,1	6,0E-20
BP	<i>chemotaxis</i>	132	16	2,9	4,6E-05
US	<i>Cytokine</i>	165	16	2,3	5,8E-04
MF	<i>cytokine activity</i>	184	20	2,6	2,3E-05
KEGG	<i>Cytokine-cytokine receptor interaction</i>	183	21	2,8	5,9E-03
BP	<i>cytokine-mediated signaling pathway</i>	40	8	4,8	1,4E-04
MF	<i>growth factor activity</i>	138	32	5,6	1,1E-17
MF	<i>growth factor receptor binding</i>	44	9	4,9	4,4E-05
US	<i>Growthfactor</i>	118	28	5,7	1,1E-11
BP	<i>localization</i>	20	5	6,0	9,3E-04
BP	<i>locomotion</i>	175	21	2,9	2,9E-06
BP	<i>negative regulation of cell death</i>	67	19	6,8	3,2E-12
BP	<i>negative regulation of cellular component organization</i>	31	10	7,8	1,8E-07
BP	<i>negative regulation of developmental process</i>	82	11	3,2	3,2E-04
BP	<i>positive regulation of cell differentiation</i>	60	12	4,8	2,8E-06
BP	<i>positive regulation of cell migration</i>	67	11	4,0	5,1E-05
BP	<i>regulation of biological process</i>	726	70	2,3	7,1E-20
BP	<i>regulation of cell adhesion</i>	54	8	3,6	1,1E-03
BP	<i>regulation of cell development</i>	41	10	5,9	3,1E-06
BP	<i>regulation of cell projection organization</i>	21	6	6,9	1,3E-04
BP	<i>regulation of cellular process</i>	640	69	2,6	1,8E-22
BP	<i>regulation of multicellular organismal development</i>	160	22	3,3	1,4E-07
BP	<i>regulation of multicellular organismal process</i>	240	27	2,7	2,8E-07
BP	<i>regulation of nervous system development</i>	29	8	6,7	1,2E-05
BP	<i>regulation of neurogenesis</i>	26	8	7,4	4,9E-06
BP	<i>regulation of neuron differentiation</i>	21	7	8,0	1,1E-05
BP	<i>regulation of neuron projection development</i>	17	6	8,5	3,4E-05
BP	<i>response to stimulus</i>	753	64	2,0	9,8E-14
BP	<i>signal transduction</i>	390	51	3,2	9,4E-18
BP	<i>taxis</i>	132	16	2,9	4,6E-05

Tabelle 4.6 – Kandidaten für Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom: Proteine, die mind. 12 der für Neuritenwachstumsfaktoren typischen Eigenschaften besitzen (Tab. 4.5). **Fett gedruckte Proteine** sind bereits als Neuritenwachstumsfaktor beschrieben (Tab. 4.4).

Genname	Uniprot-ID	Kategorien	Genname	Uniprot-ID	Kategorien
ADAM10	O14672	15	LAMC1	P11047	13
ADAM9	Q13443	13	MIF	P14174	16
AGRN	O00468	14	NDNF	Q8TB73	19
AP2B1	P63010	12	NPM1	P06748	13
APOA1	P02647	12	NPTN	Q9Y639	18
APOC3	B0YIW2	12	NRAS	P01111	12
APOD	C9JF17	17	NRP1	O14786	14
APOE	P02649	24	PDGFRA	P16234	19
APP	P05067	13	PDGFRB	P09619	21
CALR	P27797	18	PDLIM5	Q96HC4	14
CAMK2A	E9PF82	20	PTK7	Q13308	21
CLTA	F8WF69	12	PTPRK	E9PGC5	13
COL1A1	P02452	19	PTPRM	F8WA38	13
COL1A2	P08123	14	RHOA	P61586	28
COL3A1	P02461	14	RHOG	P84095	15
COL4A2	P08572	13	ROBO1	Q9Y6N7	24
CORO1A	P31146	14	S100A6	P06703	12
CSF1	P09603	18	SBDS	Q9Y3A5	12
CST3	P01034	12	SEMA7A	O75326	23
CTNNB1	P35222	17	SERPINE1	P05121	17
SDF1	P48061	21	SERPINE2	P07093	14
CYR61	O00622	16	SH3GL1	Q99961	14
ENG	P17813	15	SLIT3	J3KNP3	13
EZR	P15311	12	SOD1	P00441	15
GREM1	O60565	12	SPOCK1	Q08629	20
IGFBP3	P17936	15	STMN1	P16949	20
INHBA	P08476	18	TGFB1	P01137	25
INS	F8WCM5	18	TGFB1I1	O43294	14
ITGA5	P08648	12	TGFB2	P61812	27
ITGAV	P06756	16	THY1	E9PNQ8	23
ITGB3	P05106	17	TPM1	D9YZV2	13
LAMA5	O15230	18	VASP	P50552	14
LAMB1	G3XAI2	14	VCAM1	P19320	17

Tabelle 4.7 – USSC-sekretierte Proteine, die in weiteren Experimenten analysiert wurden: Einer der vier mittels LC-MS nachgewiesenen Kandidaten wurde bisher nicht als Neuritenwachstumsfaktor beschrieben, ist aber durch bioinformatische Filterstrategie als möglicher Neuritenwachstumsfaktor hervorgegangen.

Gen-name	Proteinname	LC-MS	Cytokin-Array	literatur-bekannter Faktor	potentiell neuer Faktor
SPARC	Osteonectin	✓	✓	✓	
PEDF	<i>Pigment epithelium-derived factor</i>	✓		✓	
NRP1	Neuropilin-1	✓		✓	
CST3	Cystatin-C	✓			✓

4.1.7.1 Neutralisation von Kandidatenproteinen

Wenn mittels einer gezielten Abreicherung oder Neutralisation von Kandidatenproteinen das Potential des USSC-konditionierten Mediums abgeschwächt werden kann, bestätigt dies für bekannte Faktoren ihre Funktion als Neuritenwachstumsfaktor auch im USSC-Sekretom. Bei bisher nicht beschriebenen Faktoren gibt es auf diese Weise Hinweise auf eine neue vielversprechende biologische Funktion dieser Proteine.

Für eine Inhibierung der Proteinfunktion der in Tab. 4.7 aufgelisteten Proteine wurde USSC-KM mit speziellen Neutralisationsantikörpern inkubiert. Sie sind gegen die aktive Domäne der Proteine gerichtet. Das so behandelte USSC-KM wurde im NOA auf seine biologische Aktivität untersucht.

Die verwendete Menge an Antikörpern ist abhängig von der jeweiligen Proteinkonzentration im USSC-KM und der ND90-Konzentration des Antikörpers, bei der nach Herstellerangaben 90 % der Aktivität des Proteins blockiert wird. Zur Abschätzung der Proteinkonzentration wurde die T3PQ-Methode (Grossmann *et al.*, 2010)

Tabelle 4.8 – Ermittelte Proteinkonzentration nach der T3PQ-Methode (Grossmann *et al.*, 2010): Die mittlere Intensität der drei abundantesten Peptide (gemittelt über 5 Datensätze) wurde in Relation zu Transferrin gesetzt. Dieses liegt im USSC-KM in einer Konzentration von 5 µg/ml vor. Von 1 ml USSC-Sekretom wurden nach Aufarbeitung umgerechnet 1,4 µl je Probe durch LC-MS analysiert (entspricht einem 1/701,8-Teil).

Protein	mittlere Intensität	fmol/ Injektion	Mol-gewicht [kDa]	fg/ Injektion	ng/ml
Transferrin	253 250 000	92,46	77,1	7 125 000	5 000,00
SPARC	2 909 0033	16,12	34,6	558 165	391,69
PEDF	812 111	0,46	46,3	21 213	14,89
NRP1	178 988	0,21	103,1	22 124	15,53
CST3	1 093 814	1,13	15,8	17 816	12,50

angewendet. Sie basiert auf dem Intensitätsvergleich der drei abundantesten Peptide eines Proteins mit den drei abundantesten Peptiden eines Proteins bekannter Konzentration. Als Referenz dient hier Transferrin, das dem Medium mit 5 µg/ml zugegeben wurde. Aus dieser Methode ergeben sich die in Tab. 4.8 aufgelisteten Proteinkonzentrationen sowie die entsprechende ND90-Konzentration der Neutralisationsantikörper. Um Verdünnungseffekte auszuschließen (vgl. Kapitel 4.1.3.3), wurde als Kontrolle USSC-KM mit dem entsprechenden Volumen PBS verdünnt.

Für SPARC und PEDF sind die Effekte der neutralisierten USSC-KM auf primäre Neurone in Abb. 4.10 dargestellt. In drei unabhängigen Replikaten ist die Neuritenlänge pro Neuron nach Behandlung mit SPARC-Antikörpern signifikant kürzer (im Durchschnitt 35 %, $p < 0,05$) als mit unbehandelten USSC-KM. Bei Neutralisation mit PEDF-Antikörper ist die Neuritenlänge durchschnittlich 26 % kürzer ($p < 0,05$) als in der Kontrolle. In fünf unabhängig voneinander durchgeführten NOA konnte hingegen kein signifikanter Effekt von Neuropilin (NRP1) nachgewiesen werden (Abb. 4.11).

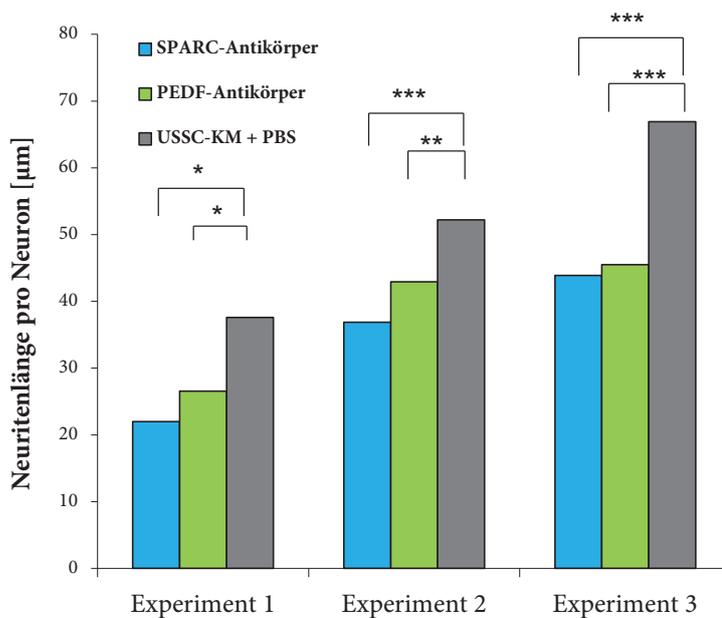


Abbildung 4.10 – Inhibierung von SPARC und PEDF in USSC-KM: 500 µl USSC-KM wurde mit SPARC-Antikörper (4 µg/ml) bzw. mit PEDF-Antikörper (4 µg/ml) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden primäre kortikale Neurone für 48 h mit den behandelten Medien inkubiert und die durchschnittliche Neuritenlänge im NOA bestimmt. Als Kontrolle wurde USSC-KM mit 20 µl PBS versetzt. (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,005$; ***= $p < 0,001$, je Experiment N=6)

4.1.7.2 Wirkung rekombinanter Kandidatenproteine

Für eine Validierung insbesondere von potentiell neuen Neuritenwachstumsfaktoren wurden die rekombinanten Kandidatenproteine SPARC, PEDF und Cystatin C zu unconditioniertem Medium hinzugegeben und ihre Wirkung auf primäre kortikale Neurone im NOA quantifiziert (Abbildungen 4.12-4.14).

Die Zugabe von rekombinantem SPARC in einer Konzentration von 0,5–1,0 µg/ml

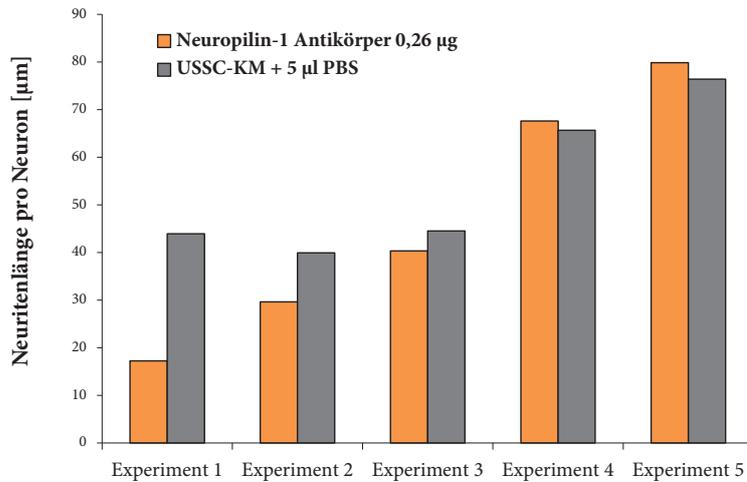


Abbildung 4.11 – Inhibition von Neuropilin in USSC-KM: 500 µl USSC-KM wurde mit Neuropilin-Antikörper (0,26 µg/ml) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden primäre kortikale Neurone für 48 h mit den behandelten Medien inkubiert und die durchschnittliche Neuritenlänge im NOA bestimmt. Als Kontrolle wurde USSC-KM mit 5 µl PBS versetzt.

hatte keine Verbesserung der Neuritenlänge zur Folge (Abb. 4.12). Gleiches wurde für rekombinantes PEDF in einer Konzentration von 30–60 ng/ml beobachtet (Abb. 4.13).

Rekombinantes Cystatin C wurde in zwei unabhängigen Experimenten in zwei Konzentrationen (25 ng/ml und 62 ng/ml) zu Zellkulturmedium zugegeben. Diese Konzentrationen entsprechen der zweifachen bzw. der zehnfachen Konzentration des Proteins im USSC-Sekretom (Tab. 4.8). In beiden Experimenten konnte ein positiver Effekt von Cystatin C auf die durchschnittliche Neuritenlänge beobachtet werden, allerdings nur in einer Konzentration von 25 ng/ml. In einem Experiment beträgt die durchschnittliche Neuritenlänge 55,3 µm, durch Zugabe von rekombinantem Cystatin C sind die Neuriten 23,1 µm länger (78,4 µm).

4.2 Diskussion

Die selbstständige Regeneration von verletzten Nervenbahnen des zentralen Nervensystems, insbesondere des Rückenmarks (z. B. nach einem Unfall), wird durch verschiedene Mechanismen verhindert. Um die Mobilität der Patienten zurückzugewinnen, gibt es unterschiedliche Therapieansätze, darunter die Implantation von synthetischen Gerüsten, Infusion von nervenwachstumstimulierenden Substanzen, Elektrotherapie oder die Implantation von humanen Zellen in die Läsionsstelle. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Implantation von unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) aus Nabelschnurblut in das verletzte Rückenmark zu einer deutlichen funktionellen Verbesserung führt (Schira *et al.*, 2012). Es wurde vermutet, dass die Sekretion von Proteinen ein Grund dafür ist, dass USSC auch in Zellkultur zu einem verstärkten Neuritenwachstum führen. Durch welche Proteine dieser Effekt hervorgerufen wird, konnte aber bisher nicht geklärt werden.

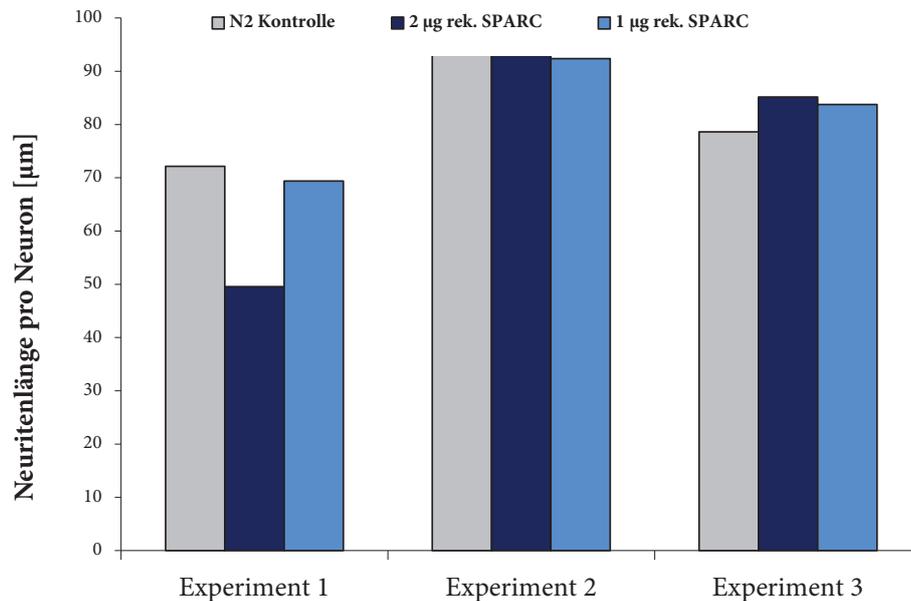


Abbildung 4.12 – Zugabe von SPARC in unkonditioniertes Medium: 500 µl unkonditioniertes Medium wurden mit rekombinantem SPARC (1 µg bzw. 2 µg) versetzt. Anschließend wurden primäre kortikale Neurone für 48 h mit den behandelten Medien inkubiert und die durchschnittliche Neuritenlänge im NOA bestimmt. Als Kontrolle wurde unbehandeltes N2-Medium verwendet.

Durch Inkubation von primären kortikalen Neuronen in USSC-konditioniertem Medium konnte in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass signifikant mehr Zellen mit längeren Neuriten überleben (Abb. 4.4). Dies entspricht den Ergebnissen von Schira *et al.* (2012). Zusätzlich erfolgte in dieser Arbeit die Quantifizierung des Neuritenwachstums im Hochdurchsatzverfahren. So konnten in einzelnen Experimenten die Neuritenlänge von etwa 3 000 Neuronen vermessen und auf diese Weise verschiedene Einflussfaktoren evaluiert werden. Es wurde gezeigt, dass der beobachtete Effekt temperatursensitiv ist und stark von der Konzentration des konditionierten Mediums abhängt (Abb. 4.6 und 4.7). Bereits eine 1,1-fache Verdünnung des Mediums führt zu einer Abschwächung.

In dieser Arbeit wurde das Sekretom von USSC durch eine detaillierte Sekretomstudie analysiert und charakterisiert. Dies stellt die erste umfangreiche Untersuchung des Sekretoms dieser Nabelschnurblutstammzellen dar. Das Wissen um USSC-sekretierte Faktoren ermöglicht einen ersten Eindruck darüber, wie diese Zellen nach Transplantation im Rückenmark zu verstärktem Neuritenwachstum führen können. Es konnten mehrere bekannte Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom identifiziert werden. Darüber hinaus wurden durch den Vergleich mit bekannten Neuritenwachstumsfaktoren neue, bisher nicht beschriebene potentielle Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom identifiziert.

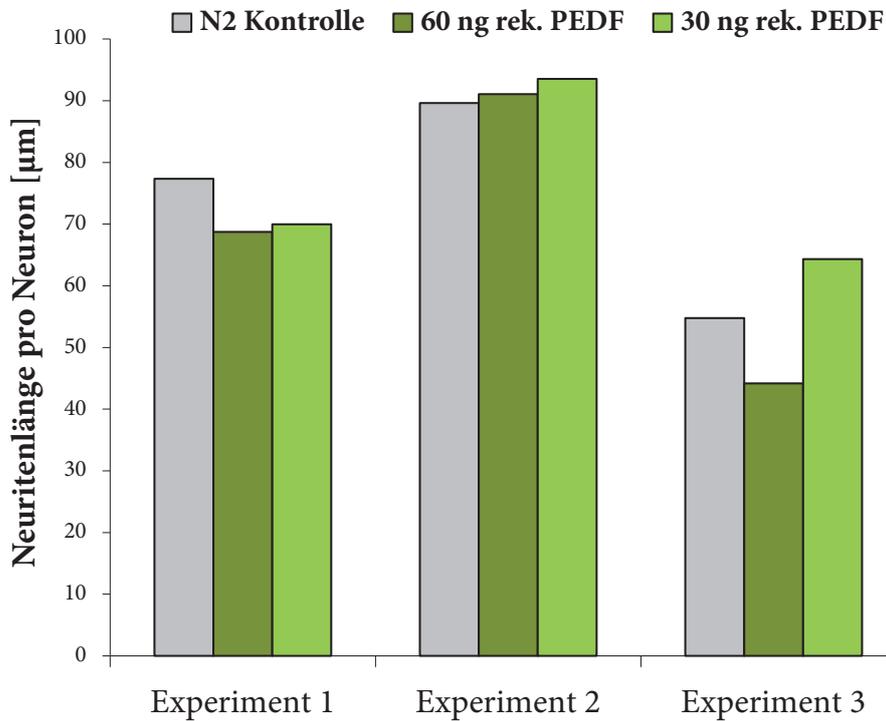


Abbildung 4.13 – Zugabe von PEDF in unkonditioniertes Medium: 500 μl N2-Medium wurden mit rekombinantem PEDF (60 ng/ml bzw. 30 ng/ml) versetzt. Anschließend wurden primäre kortikale Neurone für 48 h mit den behandelten Medien inkubiert und die durchschnittliche Neuritenlänge im NOA bestimmt. Als Kontrolle wurde unbehandeltes N2-Medium verwendet.

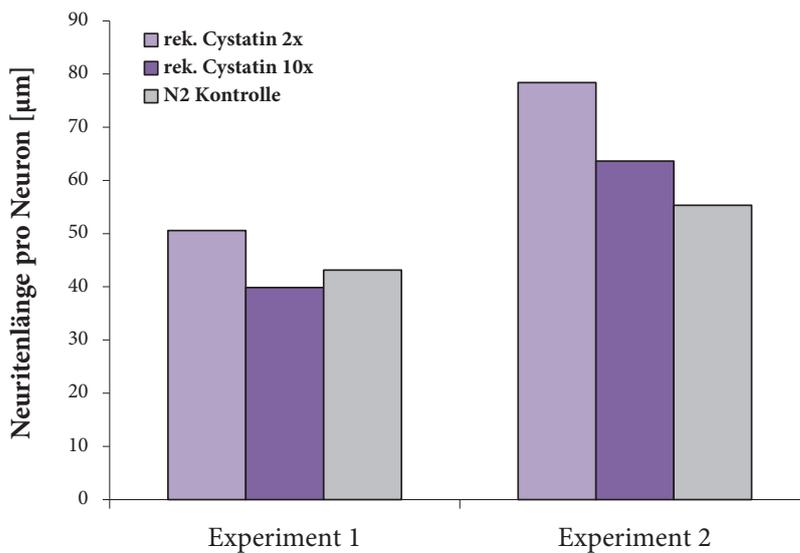


Abbildung 4.14 – Zugabe von Cystatin C in unkonditioniertes Medium: 500 μl N2-Medium wurden mit rekombinantem Cystatin C (12,5 ng bzw. 26,0 ng) versetzt. Anschließend wurden primäre kortikale Neurone für 48 h mit den behandelten Medien inkubiert und die durchschnittliche Neuritenlänge im NOA bestimmt. Als Kontrolle wurde unbehandeltes N2-Medium verwendet.

4.2.1 Identifizierung von USSC-sekretierten Proteinen

Zunächst konnte ein detaillierter Katalog der von USSC sekretierten Proteine erstellt werden. In umfangreichen LC-MS-Analysen wurden 1 593 Proteine im USSC-Sekretom identifiziert. Darüber hinaus konnten 15 weitere Cytokine durch einen gezielten Nachweis mittels Antikörper-Microarrays im USSC-Sekretom gefunden werden.

Durch Aufarbeitung und Analyse des Sekretoms mit verschiedenen Methoden konnte eine größere Anzahl an Proteinen im Zellkulturüberstand identifiziert werden, als in Sekretomstudien anderer Zelllinien, bei denen nur einzelne Methoden verwendet wurden (1 254 Proteine (Emmink *et al.*, 2013), 1 337 Proteine (Barderas *et al.*, 2013)). Der Anteil an bioinformatisch nachgewiesenen sekretierten Proteinen liegt bei 57,9%.

Die USSC-sekretierten Proteine wurden auf ihren Bezug zu Neuritenwachstum und Regeneration untersucht. In den beschriebenen biologischen Prozessen finden sich viele Hinweise auf potentielle Neuritenwachstumsfaktoren. So wurden Proteine identifiziert, die über die Prozesse der Axonzielführung, Axonwachstum oder Axonogenese den beschriebenen Effekt *in vitro* erklären könnten (Tab. 4.4). Gleichmaßen wurden Proteine mit biologischen Prozessen nachgewiesen, die den Effekt der Regeneration des Rückenmarks *in vivo* bewirken können (Myelinisierung, Wundheilung, Zellmigration). Andererseits konnten auch einzelne Proteine identifiziert werden, für die bisher eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum und die Regeneration von Neuronen beschrieben wurde (ROCK, Notch1, NOGO-A, Ephexin1, SLIT3, TNF- α).

Diese Beobachtung spricht dafür, dass der beschriebene Einfluss von USSC auf das Neuritenwachstum nicht bloß durch ein einzelnes Protein hervorgerufen wird, sondern von mehreren Proteinen - inhibitorisch wie auch exitatorisch - beeinflusst wird. In Summe überwiegt dann im USSC-Sekretom die Wirkung neuritenwachstumsfördernder Proteine. Dabei ist auch die Konzentration der einzelnen Neuritenwachstumsfaktoren wie auch -inhibitoren von wichtiger Bedeutung.

4.2.2 USSC als Modulatoren der Extrazellulärmatrix

Neben der Betrachtung der involvierten biologischen Prozesse wurde eine Signalweganalyse mit der KEGG-Datenbank für Signalwege (Kanehisa *et al.*, 2012) durchgeführt. Dabei sind sekretierte Proteine, anders als Proteine aus dem Cytosol, meist als Initiator eines intrazellulär ablaufenden Signalweges involviert. Trotzdem konnten mehrere biologisch relevante Signalwege auf diese Weise abgebildet werden (Tab. 4.3 und Anhang 9). Aus ihnen geht hervor, dass viele USSC-sekretierte Proteine einen

Bezug zu den Signalwegen ECM-Rezeptor-Interaktion, extrazelluläre Matrix, fokale Adhäsion, Endocytose/Vesikelbildung oder dem Prozess des Axonwachstums haben.

50 Proteine aus dem USSC-Sekretom konnten der extrazellulären Matrix zugeordnet werden. Dazu zählen essentielle Bestandteile der ECM wie Fibrillin, Lumican und verschiedene Collagen-Isoformen, aber auch Laminin-Untereinheiten sowie wichtige ECM-Signalproteine (Agrin, Emilin-1/2, Netrin-4, Nidogen-2, SPARC).

Ein weiterer wichtiger involvierter Signalweg ist die Zell-Zellinteraktion durch fokale Adhäsion. Aus diesem Signalweg konnten 60 Proteine im USSC-Sekretom nachgewiesen werden. Neben einigen bereits erwähnten Proteinen der ECM wurden ein Wachstumsfaktor (*Platelet-derived growth factor D*, PDGFD), Rezeptoren (ITGA, ITGB, RTK) und intrazelluläre Effektorproteine (Grb2, Actinin, Filamin, Talin, Vinculin, RhoA, ROCK) nachgewiesen.

Im USSC-Sekretom konnten darüber hinaus Proteine identifiziert werden, die für die Clathrin-abhängige Endocytose von Bedeutung sind. Dies sind zum einen Dynamin, Clathrin und AP-2. Diese drei Proteine sind essentielle Proteine für die Abschnürung von Vesikeln von der Membran. Des Weiteren wurden Proteine nachgewiesen, die normalerweise intrazellulär am Vesikelrecycling beteiligt sind (Alix, Rab5/7, CHMP4, VPS28). Von allen identifizierten Proteinen wurde für 112 Proteine eine Lokalisation in oder an Membranvesikeln in der Literatur beschrieben (Dimmer *et al.*, 2012). Möglicherweise können USSC ihre nähere Umgebung durch eine verstärkte Vesikelbildung und Exocytose beeinflussen.

Der starke Bezug der USSC-sekretierten Proteine zu den drei erwähnten Signalwegen gibt erste Hinweise darauf, wie USSC mit ihrer Umgebung kommunizieren. USSC leisten einen starken Beitrag zur Ausbildung von ECM-Strukturen. Es ist belegt, dass die ECM je nach Zusammensetzung unterschiedlich auf axonale Regeneration nach Rückenmarksläsion wirken kann und es auf die genaue Balance zwischen den inhibitorischen und exitatorischen Substanzen ankommt (Jones *et al.*, 2003). Sollten USSC also diese Balance positiv beeinflussen, ist dies eine erste Erklärung für das verbesserte Neuritenwachstum nach USSC-Transplantation. Neben der Sekretion von ECM-Proteinen interagieren USSC auf direktem Wege mit Zellen ihrer unmittelbaren Nachbarschaft über fokale Adhäsion. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch dieser Prozess zu einem verstärkten Neuritenwachstum führen kann. Weder der *in vitro* beobachtete Effekt kann darauf zurückgeführt werden, weil in USSC-konditioniertem Medium schlichtweg keine USSC vorkommen, noch ist der *in vivo* beobachtete Effekt auf Nervenzellen in direktem Zellkontakt mit den transplantierten Zellen beschränkt, sondern wurde auch in weiter entfernten Zellen gemessen (Schira *et al.*, 2012). Diese Art von Zell-Zellkommunikation erfolgt häufiger durch eine parakrine Sekretion von Proteinen oder die Bildung von Membranvesikeln. Über welchen Weg genau die Sekretion erfolgt, muss in weitergehenden Studien eruiert werden.

4.2.3 Sekretion von Cytokinen durch USSC

Die Sekretion von Cytokinen und Wachstumsfaktoren durch USSC wurde bereits durch Kögler *et al.* (2005) gezeigt. Anhand von Antikörper-Mikroarrays wurde nachgewiesen, dass USSC in serumhaltigem Medium LIF, VEGF, SCF, TGF- β , CSF, IL-6, IL-8, IL-11 sowie SDF-1 sezernieren. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass USSC einige Wachstumsfaktoren in höheren Konzentrationen sezernieren als MSC. In der hier vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass SCF (CXCL12), CSF, TGF- β und IL-8 auch unter serumfreien Kulturbedingungen von USSC sezerniert werden. Die Sekretion von LIF, IL-6, IL-11 und SDF-1 α hingegen konnte unter serumfreien Bedingungen nicht bestätigt werden. Für den Wachstumsfaktor VEGF konnten durch einen Antikörper Mikroarray Hinweise für eine Sekretion auch unter diesen Bedingungen gefunden werden (positiv in 2 von 4 USSC-Sekretomen).

4.2.4 Bekannte Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom

Der Prozess des Axonwachstums ist ein komplexer Prozess, an denen neben extrazellulären Effektormolekülen auch Rezeptoren und intrazelluläre Signalwege beteiligt sind. Im USSC-Sekretom konnten 24 Proteine identifiziert werden, die an Axonwachstum-relevanten Signalwegen beteiligt sind. Sie können in multipler Weise u. a. das Wachstum des Aktin-Cytoskelets und des Axonwachstums regulieren (Ng und Luo, 2004; Nishimura *et al.*, 2003). Allerdings sind die Funktionen dieser Proteine und Netzwerke - insbesondere in nicht-neuronalen Zellen - vielseitig und nicht ausschließlich auf Axonwachstum ausgerichtet. Daher wurde gezielt nach solchen Proteinen gesucht, die diese Prozesse in neuronalen Zellen aktivieren können.

So konnten in dieser Arbeit mehrere bekannte Neuritenwachstumsfaktoren identifiziert werden (Tab. 4.4). Es konnte TGF- β -1 identifiziert werden, welches u.a. bei Proliferation und Differenzierung von Zellen involviert ist. TGF- β -1 kann sowohl positiv als auch negativ auf die Produktion von Wachstumsfaktoren einwirken (Sporn *et al.*, 1986). Auch NRG2 (Neuregulin-2) und NRG3 (Neuregulin-3), beides ErbB3/4-Liganden die u. a. Zellwachstum von Neuronen stimulieren können (Carraway *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997), wurden im USSC-Sekretom nachgewiesen. Ebenso wurde NDNF (*Neuron-derived neurotrophic factor*) identifiziert. NDNF ist ein potenter Neuritenwachstumsfaktor, der eine Migration von Neuronen, vermehrtes Neuronwachstum und verstärktes Neuritenwachstum hervorrufen kann (Kuang *et al.*, 2010).

Für einzelne Neuritenwachstumsfaktoren konnte eine ungefähre Konzentration mit der T3PQ-Methode (Grossmann *et al.*, 2010) abgeschätzt werden (Tab. 4.8). So wurde SPARC in einer relativ hohen Konzentration (ca. 390 ng/ml) im USSC-Sekretom nachgewiesen. SPARC ist ein Matrix-Protein, das die Aktivität von Cytokinen, Wachstumsfaktoren und die Zusammensetzung der ECM modifizieren kann. Es spielt

durch die Regulation von Zell-/Matrix-Interaktionen eine wichtige Rolle bei der Regeneration von verletztem Gewebe (Brekken und Sage, 2001; Murphy-Ullrich, 2001). Unter anderem wird es von olfaktorischen Hüllzellen sezerniert und regt Schwannsche Zellen zum Neuritenwachstum an (Au *et al.*, 2007). Sezerniertes SPARC wirkt im Nervengewebe als Wachstumsfaktor und bewirkt die Wiederherstellung von verletzten Nervenbahnen (Au *et al.*, 2007; Bampton *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2009). Die wichtigsten Interaktionspartner von SPARC sind PDGF, VEGF und TGF- β -1 (Brekken und Sage, 2001), weiter bindet es Calcium, Kupfer, Collagene, Albumin und Thrombospondin (Raines *et al.*, 1992). SPARC kann die Expression von TGF- β -1 regulieren (Francki *et al.*, 1999, 2004), allerdings ist über eine direkte Interaktion bisher nichts bekannt. SPARC kann in einem autokrinen Feedback-Mechanismen die Produktion von Matrixmetalloproteasen (MMP) positiv regulieren (Gilles *et al.*, 1998) und gleichzeitig von diesen gespalten werden (Sasaki *et al.*, 1997). In der hier durchgeführten Sekretomstudie konnte MMP2 als USSC-sekretiertes Protein identifiziert werden. Folglich werden auch die USSC von der extrazellulär hohen Konzentration von SPARC beeinflusst.

Die neuritenwachstumsfördernde Funktion von SPARC konnte in dieser Arbeit teilweise bestätigt werden. Wurde die Funktion von SPARC durch die Zugabe von entsprechendem Antikörper blockiert, so konnten signifikant kürzere Neuriten beobachtet werden (Abb. 4.10). Die Zugabe von rekombinantem SPARC zu unkonditioniertem Zellkulturmedium hatte hingegen keine Verbesserung des Neuritenwachstums zur Folge (Abb. 4.12). Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass der neuritenwachstumsfördernde Effekt von SPARC von posttranslationalen Modifikationen wie z. B. Glykosylierungen abhängig ist, die bei dem verwendeten rekombinanten Protein nicht in derselben Form vorliegen, wie in der USSC-sekretierten Form von SPARC.

Die gleiche Beobachtung wurde für PEDF gemacht. PEDF, auch bezeichnet als SERPINF1, ist ein neurotrophines Protein, welches das Überleben und das Neuritenwachstum von Motoneuronen aus Hühnerembryos verbessern kann (Becerra *et al.*, 1993; Houenou *et al.*, 1999). Ein PEDF-funktionsblockierender Antikörper in USSC-konditioniertem Medium führte zu einem schlechteren Wachstum von Neuriten (Abb. 4.10). Die Zugabe von rekombinantem PEDF in Konzentrationen von 30–60 ng/ml zu unkonditioniertem Zellkulturmedium hatte jedoch keinen positiven Effekt. Dies kann, wie bei SPARC, an Unterschieden in der posttranslationalen Modifikation liegen. Rekombinantes PEDF kann in glykosylierter Form zu verstärktem Neuritenwachstum führen (Stratikos *et al.*, 1996).

Anders verhält es sich mit Neuropilin 1 (NRP), ebenfalls ein nachgewiesener Neuritenwachstumsfaktor (Gorba *et al.*, 2006). Die Zugabe eines funktionsblockierenden Antikörpers zum USSC-Sekretom hat keinen signifikanten Einfluss auf das Neuritenwachstum (Abb. 4.11). Dies zeigt nicht nur, dass NRP nicht ursächlich am

USSC-bedingtem Neuritenwachstum beteiligt ist, sondern auch, dass nicht bereits die Zugabe eines Antikörpers zu verschlechtertem Neuritenwachstum führt.

Im Sekretom von USSC konnten somit zwei der identifizierten Neuritenwachstumsfaktoren als solche bestätigt werden. Sowohl SPARC als auch PEDF tragen als exzitatorische Faktoren zu einem verbesserten Überleben von Neuronen als auch zu einem verstärkten Neuritenwachstum bei. Die hohe Konzentration von SPARC (Tab. 4.8) ist bemerkenswert und lässt darauf schließen, dass SPARC einen wichtigen Beitrag zu dem oben beschriebenen Gleichgewicht zusteuert. Aber auch PEDF, welches wesentlich niedriger konzentriert ist (14,89 ng/ml), beeinflusst das Neuritenwachstum positiv. Eine geringere Konzentration dieses sehr potenten Faktors ist folglich ähnlich bedeutend für die Gesamtwirkung des USSC-Sekretom, wie höher konzentriertes SPARC. Weiter gibt es Hinweise darauf, dass die hohe extrazelluläre SPARC-Konzentration die Sekretion von TGF- β -1 fördert, welches ebenso als Neuritenwachstumsfaktor wirken kann.

4.2.5 Vergleich vom USSC-Sekretom mit anderen Zelllinien

Das USSC-Sekretom unterscheidet sich von Fibroblasten- und MSC-Sekretom sowohl in seiner Wirkung auf primäre kortikale Neurone, als auch durch ihre Proteinzusammensetzung. Interessanterweise konnten durch Massenspektrometrie-basierte Proteomanalysen in dieser Arbeit im Sekretom aller drei Zelllinien Faktoren nachgewiesen werden, die sich positiv auf das Neuritenwachstum auswirken (Tab. 4.4). Die Sekretion von positiven Neuritenwachstumsfaktoren durch Fibroblasten führt allerdings nicht zu verstärktem Neuritenwachstum. Eine mögliche Erklärung könnte die gleichzeitige Sekretion von inhibierenden Faktoren wie Semaphorin 3B sein. Dieses in der vorliegenden Studie ausschließlich durch Fibroblasten sekretierte Protein wirkt durch Chemorepulsion überwiegend als Axonwachstum-Inhibitor (Falk *et al.*, 2005; Tannemaat *et al.*, 2007). Im komplexen Zusammenspiel von Inhibitoren und Aktivatoren überwiegt hier folglich die inhibitorische Wirkung.

MSC werden durch die Antigene CD44, CD73 (NT5E), CD90 (THY1), CD105 (Endoglin) charakterisiert. Diese vier Proteine konnten sowohl im Sekretom von MSC als auch im Sekretom von USSC nachgewiesen werden. CD90 und CD105 konnten ebenso im Fibroblasten-Sekretom identifiziert werden, nicht aber CD44 und CD73.

Im Gegensatz zum USSC-Sekretom wurde das MSC-Sekretom bisher mittels diverser Methoden analysiert (Skalnikova *et al.*, 2011). In dieser Arbeit konnte die Sekretion mehrerer Chemokine, Cytokine und Wachstumsfaktoren im MSC-Sekretom bestätigt werden: SDF-1 α (Potian *et al.*, 2003; Sze *et al.*, 2007), PDGF (Sze *et al.*, 2007), SDF-4 (Choi *et al.*, 2010), TNF- α (Potian *et al.*, 2003; Sze *et al.*, 2007), IFGBP-2, -3, -4, -5, -6 und -7 (Choi *et al.*, 2010; Liu und Hwang, 2005; Sze *et al.*, 2007) sowie die beiden Metalloproteasen TIMP-1 und TIMP-2 (Choi *et al.*, 2010; Liu und Hwang, 2005; Sze

et al., 2007). Auch die Sekretion von SPARC durch MSC wurde von Arufe *et al.* (2011) bereits berichtet. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit weitere MSC-sekretierte Wachstumsfaktoren identifiziert (NDNF, PEDF), für die eine positive Wirkung auf Neurone bereits gezeigt wurde.

4.2.6 Neue potentielle Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom

Ein Ziel dieser Arbeit war es, einzelne Faktoren im USSC-Sekretom zu identifizieren, die in der Lage sind, das *in vitro* beobachtete Neuritenwachstums hervorzurufen. Basierend auf der umfangreichen Katalogisierung des USSC-Sekretoms durch Massenspektrometrie-basierte Proteomik (Kapitel 4.1.1.1) konnten mehrere bekannte Neuritenwachstumsfaktoren (Tab. 4.4) identifiziert werden, die bereits zuvor diskutiert wurden. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass bisher noch nicht beschriebene Faktoren aus dem USSC-Sekretom an der Förderung des Neuritenwachstum beteiligt sind. Daher wurde ein Ansatz gewählt, in dem das Sekretom fraktioniert wurde und die Fraktionen im NOA auf ihre biologische Funktion getestet wurden.

Bei der Fraktionierung durch SEC konnte eine Fraktionierung erfolgreich durchgeführt werden. In den Mikroskopaufnahmen des NOA wird jedoch deutlich, dass die Bedingungen zur Fraktionierung nicht kompatibel mit einer primären Neuronkultur sind (Abb. 4.8b). Durch eine mögliche Kontamination sterben sämtliche Zellen in der Kultur. Daher wurde eine andere Lösung für die Suche nach neuen Neuritenwachstumsfaktoren gefunden: In einer bioinformatischen Herangehensweise wurde ausgenutzt, dass bekannte Neuritenwachstumsfaktoren bestimmte Eigenschaften teilen. Diese Gemeinsamkeiten wurden herausgearbeitet (Tab. 4.5) und mit den Proteinen des USSC-Sekretoms verglichen.

Durch intensive Forschung an Neuritenwachstum und SCI-Regeneration konnten in den vergangenen Jahren viele Faktoren nachgewiesen werden, die sowohl einen Einfluss auf Neuritenwachstum und/oder Neuronüberleben *in vitro* haben als auch solche, die *in vivo* zur verbesserten Regeneration nach SCI beitragen können. Eine Katalogisierung all dieser Faktoren erfolgte in der Literatur überwiegend für Neurotrophine, einer Proteinklasse, deren Mitglieder sekretiert werden und die unter anderem für embryonales Neuritenwachstum essentiell sind (Allen und Dawbarn, 2006). In dieser Arbeit wurde daher durch umfangreiche Literaturrecherchen eine Datenbank mit 84 proteinogenen Neuritenwachstumsfaktoren erstellt. Diese Datenbank ist unabhängig von der Proteinklassifizierung generiert worden und basiert ausschließlich auf *peer-reviewed* Literatur. Sie umfasst nur Faktoren, die in der Literatur explizit als Neuritenwachstumsfaktor bezeichnet werden.

Diese Datenbank kann nicht alle bekannte Faktoren umfassen, weil nicht alle bekannten Neuritenwachstumsfaktoren explizit auf diese Weise in der Literatur beschrieben werden (z. B. Netrin). Zum einen ist sie aufgrund dieses unvoreingenommenen Kriteriums unabhängig von bestimmten Proteinklassen, welche bei einer kategorischen Herangehensweise stärker vorkommen würden. Zum anderen lässt sich die Frage, ob ein Protein ein positiver Neuritenwachstumsfaktor ist, nicht immer eindeutig beantworten und bleibt Gegenstand vieler, teils widersprüchlicher Forschungen. Diese Datenbank stellt eine unvoreingenommene, erste Übersicht der bisher beschriebenen, sekretierten positiven Neuritenwachstumsfaktoren dar.

Durch die Charakterisierung der bekannten Neuritenwachstumsfaktoren konnten 39 biologische Prozesse, Signalwege und molekulare Funktionen der Proteine gefunden werden, die der Großteil der bekannten Faktoren teilt. Ein Vergleich der Eigenschaften bekannter Neuritenwachstumsfaktoren mit den Eigenschaften der USSC-Sekretomproteine führte zu 66 neuen potentiellen Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom. Einige dieser Faktoren wurden bereits im Zusammenhang mit Neuritenwachstum genannt (z. B. NDNF, Kuang *et al.* (2010)), aber nicht explizit als Neuritenwachstumsfaktor bezeichnet. NDNF stellt keinen neuen Neuritenwachstumsfaktor dar, es unterstreicht aber die Fähigkeit der Methodik, Proteine mit entsprechenden Eigenschaften aus dem USSC-Sekretom herauszufiltern.

Cystatin C (CST3) ist ein Protein, welches zwölf der für Neuritenwachstumsfaktoren typischen Eigenschaften teilt und daher aus dem USSC-Sekretom als potentiell neuer Faktor in Frage kommt. Es kommt als Cysteinproteinase-Inhibitor in hoher Konzentration in der Zerebrospinalflüssigkeit vor (Palm *et al.*, 1995) und ist an der Zellmigration beteiligt (Sloane *et al.*, 1990). Zusammen mit FGF-2 ist es ein essentieller Faktor für die *in vitro* Proliferation von neuronalen Stammzellen (Taupin *et al.*, 2000). Die Serumkonzentration von Cystatin C kann Patienten mit einer Rückenmarksläsion als Markerprotein für die Nierenfunktion dienen (Koçak *et al.*, 2005). Als potentieller Neuritenwachstumsfaktor wurde es bisher nicht explizit in der Literatur beschrieben. In dieser Arbeit konnte erstmals eine solche Funktion von Cystatin C gezeigt werden. So konnte durch die Zugabe von Cystatin C ein positiver Effekt auf die durchschnittliche Neuritenlänge beobachtet werden (Abb. 4.14). Primäre kortikale Neurone, die mit Cystatin C inkubiert wurden, haben um bis zu 41 % längere Neuriten. Dies bestätigt einerseits, dass Cystatin C als Neuritenwachstumsfaktor wirken kann, und andererseits, dass der hier gewählte bioinformatische Ansatz in der Lage ist, entsprechende Faktoren aufzuspüren.

4.3 Fazit

Das USSC-Sekretom stellt eine komplexe Proteinmischung aus über 1 500 Proteinen dar. In dieser Arbeit konnten im USSC-Sekretom mehrere bekannte Neuritenwachs-

tumsfaktoren (z. B. SPARC oder PEDF), am Neuritenwachstum-beteiligte Proteine sowie neue potentielle Neuritenwachstumsfaktoren (z. B. Cystatin C) identifiziert und bestätigt werden. Die hohe Anzahl dieser Proteine lässt vermuten, dass nicht nur ein singulärer Faktor für das beobachtete Neuritenwachstum verantwortlich ist. Das USSC-Sekretom stellt ein komplexes Gleichgewicht aus potenten exitatorischen Neuritenwachstumsfaktoren und inhibitorischen Proteinen darstellt, das in der Summe auf unterschiedliche Weise zu einem verstärkten Neuronenüberleben und Neuritenwachstum führt.

Veränderungen von USSC durch Transplantation in Rückenmarksgewebe

5.1 Ergebnisse

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass USSC mehrere Proteinfaktoren sekretieren, die einen positiven Effekt bei der Regeneration von lädiertem Rückenmark haben können. Die neuritenwachstumsfördernde Funktion von USSC kann für die Transplantation von USSC aus dem Nabelschnurblut in die Läsionsstelle des Rückenmarks genutzt werden, wo die sekretierten Proteine über eine kurze Distanz wirken können (Schira *et al.*, 2012). Ungeklärt ist dabei aber bisher, wie USSC durch eine Transplantation vom Gewebe im lädierten Rückenmark beeinflusst werden und dabei insbesondere, ob sich die Zusammensetzung der sekretierten Proteine durch Interaktion der Läsionsstelle mit den transplantierten USSC verändert.

In Experimenten von Schira *et al.* (2012) wurde gezeigt, dass Gewebelysat aus der Rückenmarksläsionsstelle von Ratten (sog. Läsionsextrakt) attraktiv auf USSC wirkt und sich die Zellen in einem Chemotaxis-Assay in Richtung des Gewebelysats bewegen. Diese Migration ist HGF-abhängig und geht ausschließlich von lädiertem Rückenmarkslysat aus, nicht aber von Lysat aus intaktem Rückenmark. In dieser Arbeit wurden USSC in Zellkultur mit Läsionsextrakt inkubiert¹ und so eine Si-

¹Die Erstellung des Gewebelysats, die Zellkultur und die Behandlung der USSC wurde von Dr. Jessica Schira durchgeführt und koordiniert.

tuation simuliert, wie sie nach einer Transplantation ins Rückenmark vorliegt. Von den so behandelten USSC wurden das Proteom und das Sekretom verglichen mit USSC, die mit einem Gewebelysat von gesunden Ratten inkubiert wurden (Abb. 5.1). Anhand eines quantitativen Vergleichs der Proteinabundanz im USSC-Sekretom und im USSC-Zellysate konnte ein Einfluss der Läsionsstelle auf USSC abgeschätzt werden. Als zusätzliche Kontrolle diente der Vergleich mit unbehandelten USSC. Je Zustand wurden fünf biologische Replikate durch markierungsfreie Proteinquantifizierung untersucht. Die regulierten Proteine können über regulierte Signalwege Aufschluss geben und lassen so Rückschlüsse auf die Veränderung der USSC nach Transplantation *in vivo* zu.

5.1.1 Proteom von USSC nach Behandlung mit Gewebelysat aus murinem Rückenmark

Voraussetzung für die markierungsfreie Quantifizierung ist eine geringe technische Varianz und eine hohe Reproduzierbarkeit sowohl in der Probenvorbereitung als auch während der LC-MS-Messung. Aus diesem Grund wurde für die Lyse der

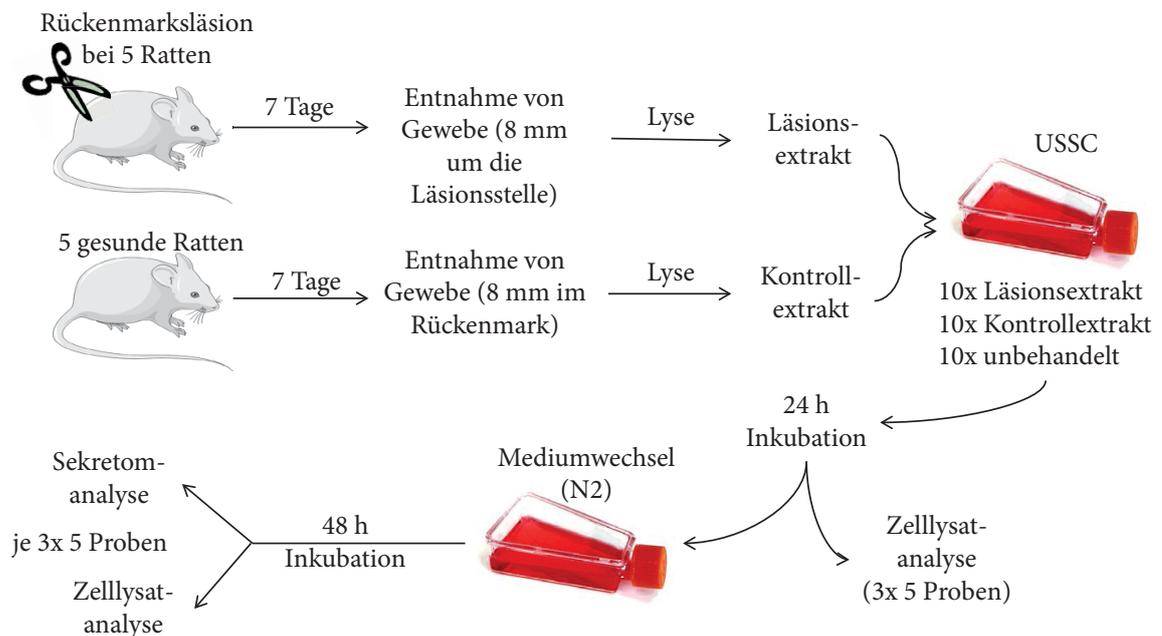


Abbildung 5.1 – Experimenteller Ablauf bei der Proteomanalyse zur Quantifizierung von Veränderungen in USSC nach simulierter Transplantation in Rückenmarksgewebe: Lysiertes Rückenmarksgewebe von fünf Ratten mit Rückenmarksläsion sowie von fünf gesunden Ratten wurde mit USSC inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde nach 24 h lysiert und das Proteom analysiert. Der andere Teil der Zellen wurde nach Mediumwechsel für weitere 48 h (insgesamt also 72 h) inkubiert. Anschließend wurde sowohl das Proteom als auch das Sekretom der Zellen miteinander verglichen.

Zellen ein Ablauf mit wenigen Arbeitsschritten gewählt, bei dem die Zellen direkt auf der Zellkulturschale durch Zugabe von Harnstoff lysiert wurden.

Insgesamt wurden 30 USSC-Zelllysate analysiert. Das Proteom von fünf biologischen Replikaten wurde an zwei Zeitpunkten (24 h und 72 h) und in drei Zuständen (behandelt mit Läsionsextrakt, behandelt mit Kontrollextrakt sowie unbehandelt) analysiert. Aufgrund der LC-MS-bedingten technischen Variation in der Gesamtintensität wurden zwei Datensätze (USSC unbehandelt nach 24 h und nach 72 h) nicht für die weitere Auswertung herangezogen.

Durch Massenspektrometrie-basierte Proteomanalyse von 28 USSC-Lysaten konnten insgesamt 2 502 unique Proteine im Zelllysate von USSC identifiziert werden (Tab. 6 im Anhang). 1 008 von diesen Proteinen wurden in allen 28 Datensätzen gefunden. 1 656 Proteine wurden in mindestens der Hälfte der Datensätze nachgewiesen.

Die Verteilung der identifizierten Proteine auf subzelluläre Kompartimente ist in Abb. 5.2 dargestellt. Der überwiegende Teil der Proteine ist hauptsächlich im Cytosol lokalisiert. Es konnten aber gleichzeitig auch viele nukleäre Proteine (525), mitochondriale Proteine (123) sowie extrazelluläre Proteine (66) nachgewiesen werden.

5.1.2 Quantifizierung der Veränderungen im USSC-Proteom

Von den 2 502 im Zelllysate von USSC identifizierten Proteinen konnte mehr als die Hälfte quantifiziert werden. 1 343 Proteine (53,7 %) wurden in mindestens drei von fünf biologischen Replikaten in jeder Gruppe identifiziert. Die relative Intensität der Proteine weist zwischen allen Datensätzen eine hohe Korrelation sowohl zwischen verschiedenen Zeitpunkten als auch unterschiedlich behandelten Zellen auf (Abb. 5.3). Dies unterstreicht, dass die Probenvorbereitung reproduzierbar abgelaufen ist und die Proben für eine markierungsfreie Quantifizierung mittels LC-MS geeignet sind.

Anhand einer Hauptkomponentenanalyse (Abb. 5.4) wird deutlich, dass klar zwischen den beiden Zeitpunkten, aber auch zwischen den Behandlungsarten unterschieden werden kann. Gleichzeitig bestätigt sie die hohe Übereinstimmung zwischen den biologischen Replikaten.

5.1.2.1 Statistische Auswertung

Veränderungen im USSC-Proteom nach Behandlung mit Gewebeextrakt zeigen, wie sich USSC in Kultur von Rückenmarkszellen beeinflussen lassen. Der experimentelle Aufbau stellt dabei eine vereinfachte Simulation der Transplantation von USSC in Rückenmarksgewebe dar.

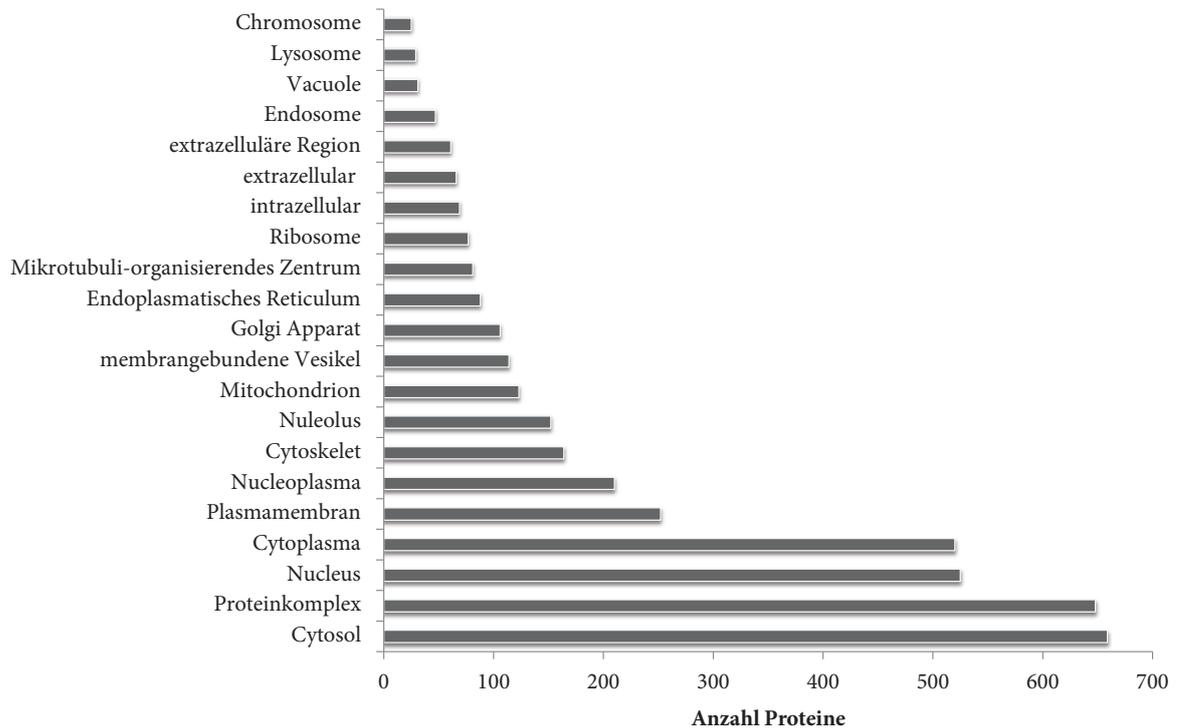


Abbildung 5.2 – Subzelluläre Lokalisation der identifizierten Proteine: Im Zellysate von USSC konnten insgesamt 2502 unique Proteine identifiziert werden. Ihre subzelluläre Lokalisation basierend auf den Einträgen in der Uniprot-Datenbank (Dimmer *et al.*, 2012) deckt viele intrazelluläre Kompartimente ab (Mehrfachnennung möglich). Darüber hinaus konnten auch Proteine, die überwiegend extrazellulär oder in membrangebundenen Vesikeln lokalisiert sind, im Zellysate nachgewiesen werden.

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass zwischen den hier untersuchten Zuständen eine große Übereinstimmung in der Abundanz der Proteine herrscht. Signifikante Unterschiede, sowohl zwischen behandelten und unbehandelten Zellen als auch zwischen den verschiedenen Zeitpunkten, wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) herausgearbeitet. Dabei wurden drei Modelle unabhängig voneinander betrachtet (Abb. 5.5).

5.1.2.2 Signifikante Veränderung durch Inkubation mit Läsionslysate

Durch den Vergleich der drei unterschiedlich behandelten USSC kann ein spezifischer Einfluss des Läsionslysates untersucht werden. Proteine, die ausschließlich durch die Behandlung mit Läsionslysate reguliert werden, nicht aber durch die Behandlung mit intaktem Rückenmarksgewebe, lassen auf läsionspezifische Veränderungen schließen (Abb. 5.5, Modell 1). Dieser Vergleich wurde für beide Zeitpunkte getrennt durchgeführt. Signifikant unterschiedlich konzentrierte Proteine sind in den Tabellen 5.1 (24 h) und 5.2 (72 h) aufgelistet. Nach 24 h kommen sieben Proteine stärker in

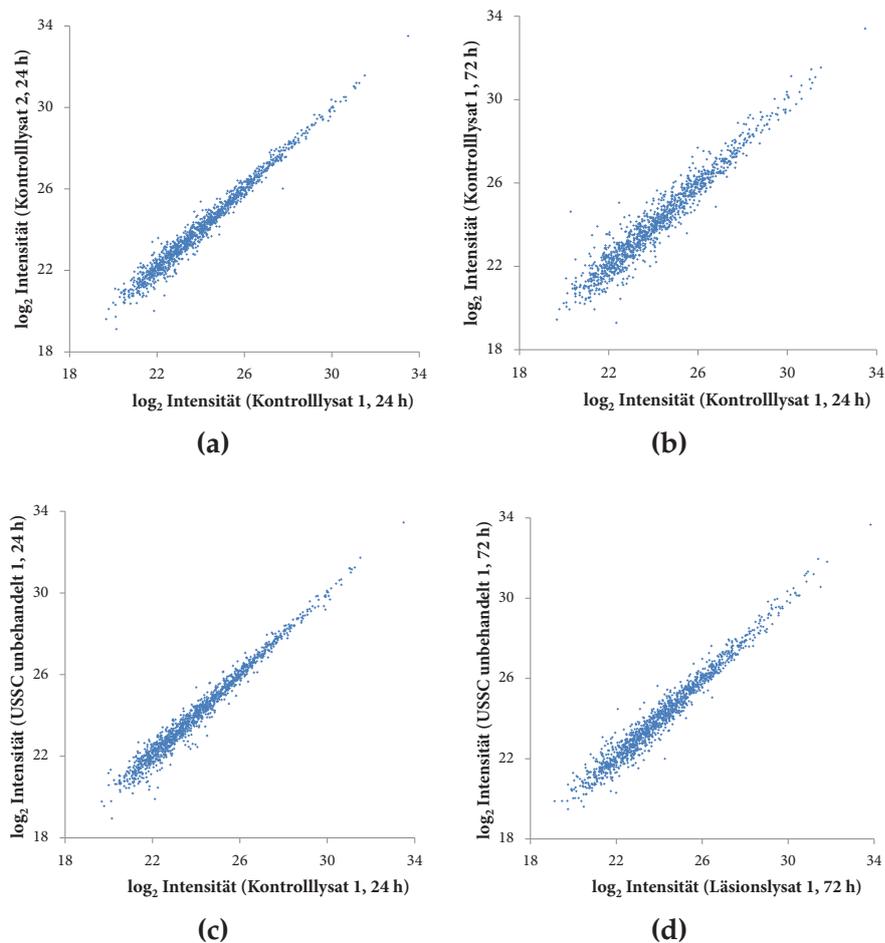


Abbildung 5.3 – Vergleich der relativen Proteinintensitäten im USSC-Lysat verschiedener Zustände: Die Korrelation der relativen Intensität aller quantifizierter Proteine (angegeben als log₂-Werte) zwischen zwei biologischen Replikaten (a) liegt bei 98,8%. Zwei Zeitpunkte desselben Zustandes (b) korrelieren zu 96,6%. Die Intensitäten zwischen behandelten USSC und unbehandelten USSC nach 24 h korrelieren zu 98,2% (c), nach 72 h (d) zu 98,1%.

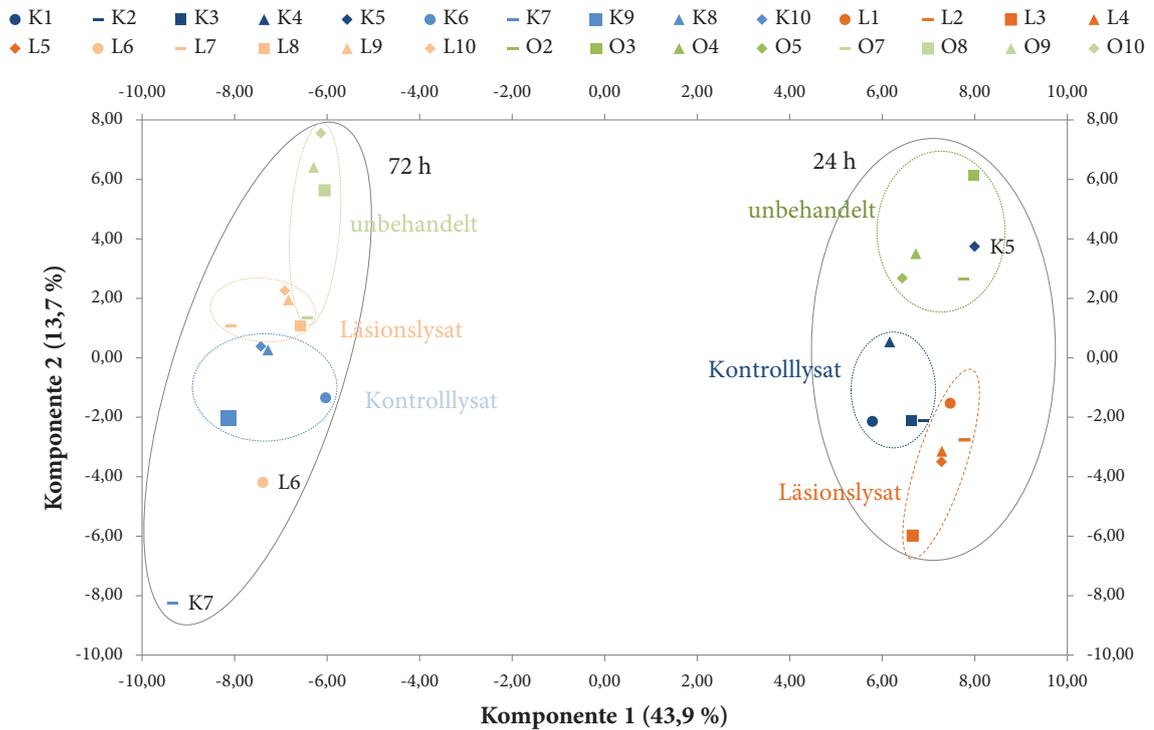


Abbildung 5.4 – Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Proteinintensitäten im USSC-Zelllysat: Der Unterschied zwischen den hier untersuchten Zeitpunkten wird deutlich. Basierend auf den gemessenen Proteinintensitäten lässt sich mit Ausnahme von drei Proben (K5, K7 und L9) auch zwischen den unterschiedlich behandelten USSC differenzieren (L = USSC behandelt mit Läsionsextrakt, K = USSC behandelt mit Kontrolleextrakt, O = USSC unbehandelt). Für die Darstellung wurden nur die 1 008 Proteine berücksichtigt, die in allen 28 Datensätzen quantifiziert wurden.

Tabelle 5.1 – Proteine, die nach 24 h Inkubation mit Läsionslysat signifikant reguliert sind:

Genname	Proteinname	p-Wert L ₂₄ /K ₂₄	Veränderung L ₂₄ /K ₂₄
VCAN	Versican core protein	3,74E-03	+1,73
PLA2G4A	Phospholipase A2	4,92E-02	+1,51
DDX5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	3,18E-02	+1,45
ALDH1A3	Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3	2,02E-02	+1,36
GFPT2	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase 2	6,00E-04	+1,35
SDCBP	Syntenin-1	4,80E-02	+1,27
HM13	Minor histocompatibility antigen H13	4,43E-02	+1,21
PRKAR2A	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	8,01E-03	-1,27
PSAT1	Phosphoserine aminotransferase	7,62E-03	-1,28
TPI1	Triosephosphate isomerase	3,58E-02	-1,34
DDAH2	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	3,97E-02	-1,35
HIST2H2AA3	Histone H2A type 2-A	2,76E-04	-1,45

Tabelle 5.2 – 46 Proteine, die nach 72 h nur durch Behandlung mit Läsionslysate signifikant reguliert sind:

Genname	Proteinname	p-Wert L ₇₂ /K ₇₂	Veränderung L ₇₂ /K ₇₂
IRP1	Cytoplasmic aconitate hydratase	5,72E-03	+1,96
SURF4	Surfeit locus protein 4	4,39E-02	+1,88
PLA2G4A	Phospholipase A2	5,26E-03	+1,79
HTRA1	Serine protease HTRA1	1,73E-02	+1,57
KHDRBS1	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	3,94E-02	+1,54
NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	2,98E-03	+1,54
EGFR	Epidermal growth factor receptor	4,04E-03	+1,42
ITGB1	Integrin beta-1	3,18E-03	+1,35
MATR3	Matrin-3	1,39E-02	+1,30
SEC24D	Protein transport protein Sec24D	4,53E-02	+1,30
HNRNPD	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	4,67E-02	+1,30
PARP4	Poly [ADP-ribose] polymerase 4	8,47E-03	+1,29
VAR5	Valine-tRNA ligase	2,37E-02	+1,26
PSMD2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	3,56E-02	+1,23
HDLBP	Vigilin	3,62E-02	+1,21
RARS	Arginine-tRNA ligase, cytoplasmic	3,82E-02	-1,14
HSPA1A	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	1,39E-02	-1,19
HSPB1	Heat shock protein beta-1	3,00E-03	-1,20
NAGK	N-acetyl-D-glucosamine kinase	1,50E-02	-1,21
ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase	4,89E-02	-1,21
ASNS	Asparagine synthetase	1,08E-02	-1,22
SEP7	Septin-7	7,75E-03	-1,26
P4HA1	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	1,50E-03	-1,26
FSCN1	Fascin	1,17E-02	-1,27
DES	Desmin	3,31E-03	-1,27
GOT1	Aspartate aminotransferase	4,58E-02	-1,28
PSAT1	Phosphoserine aminotransferase	5,99E-03	-1,29
RPS8	40S ribosomal protein S8	7,89E-03	-1,29
PEBP1	Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide	1,60E-03	-1,30
FKBP10	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10	4,00E-02	-1,31
RNH1	Ribonuclease inhibitor	3,66E-03	-1,32
TPM3	Tropomyosin alpha-3 chain	3,63E-02	-1,32
SEP11	Septin-11	2,26E-02	-1,34
TPM4	Tropomyosin alpha-4 chain	5,97E-03	-1,33
CALD1	Caldesmon	3,86E-03	-1,34
PABPC4	Polyadenylate-binding protein 4	4,55E-03	-1,36
ALDH1A3	Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3	1,61E-02	-1,38
PAWR	PRKC apoptosis WT1 regulator protein	2,21E-02	-1,40
PPAP2B	Lipid phosphate phosphohydrolase 3	4,30E-03	-1,41
TES	Testin	4,10E-02	-1,41
NAE1	NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit	3,46E-02	-1,53
EIF4H	Eukaryotic translation initiation factor 4H	1,42E-02	-1,54
TCEA1	Transcription elongation factor A protein 1	2,61E-03	-1,54
NUDC	Nuclear migration protein nudC	7,14E-03	-1,54
PFDN2	Prefoldin subunit 2	1,55E-02	-1,58
GLS	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	1,33E-02	-1,59

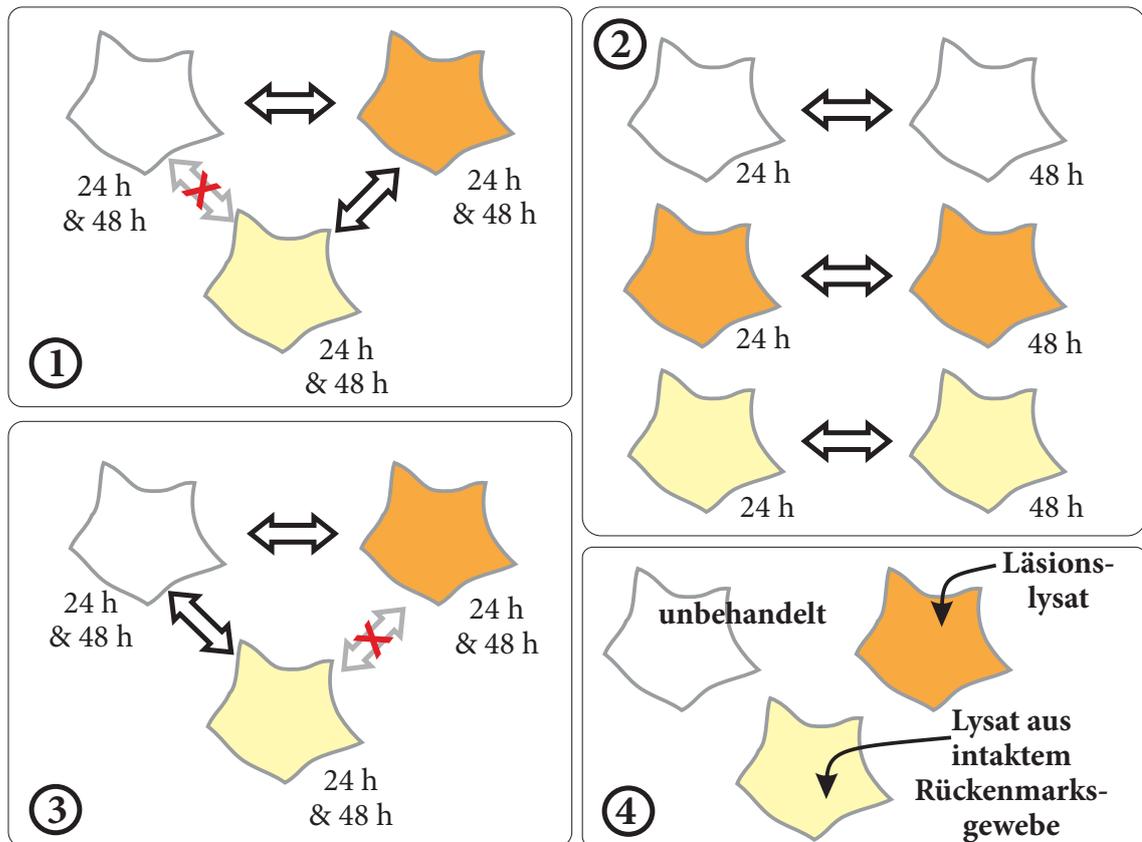


Abbildung 5.5 – Vergleich von unterschiedlich behandelten USSC: Bei dem statischen Vergleich der Proteinabundanzen von unterschiedlich behandelten USSC wurden drei Modelle durch zwei-faktorielle Varianzanalyse unabhängig voneinander betrachtet. (1) Die Behandlung mit Läsionslysat verändert die Proteinabundanz. (2) Die längere Inkubationsdauer verändert die Proteinabundanz. (3) Die Behandlung mit Rückenmarksgewebe verändert die Proteinabundanz, unabhängig davon, ob Lysat von intaktem oder lädiertem Rückenmark verwendet wurde. (4) Legende

läsionsbehandelten Zellen vor, während fünf Proteine schwächer vorkommen. Nach 72 h sind 15 Proteine durch die Behandlung mit Läsionslysat stärker und 31 Proteine schwächer konzentriert.

Für die vier Proteine VCAN, EGFR, SEP11 und TCEA1 ist die Regulation in einem Scatterblot dargestellt (Abb. 5.6). Drei Proteine sind sowohl nach 24 h als auch nach 72 h signifikant unterschiedlich. Dies sind PLA2G4A, ALDH1A3 und PSAT1.

5.1.2.3 Einfluss einer längeren Inkubationsdauer

Ob das Proteom von USSC durch eine längere Wachstumsphase in Zellkultur verändert werden, konnte der Vergleich der Proteinintensitäten der beiden untersuchten

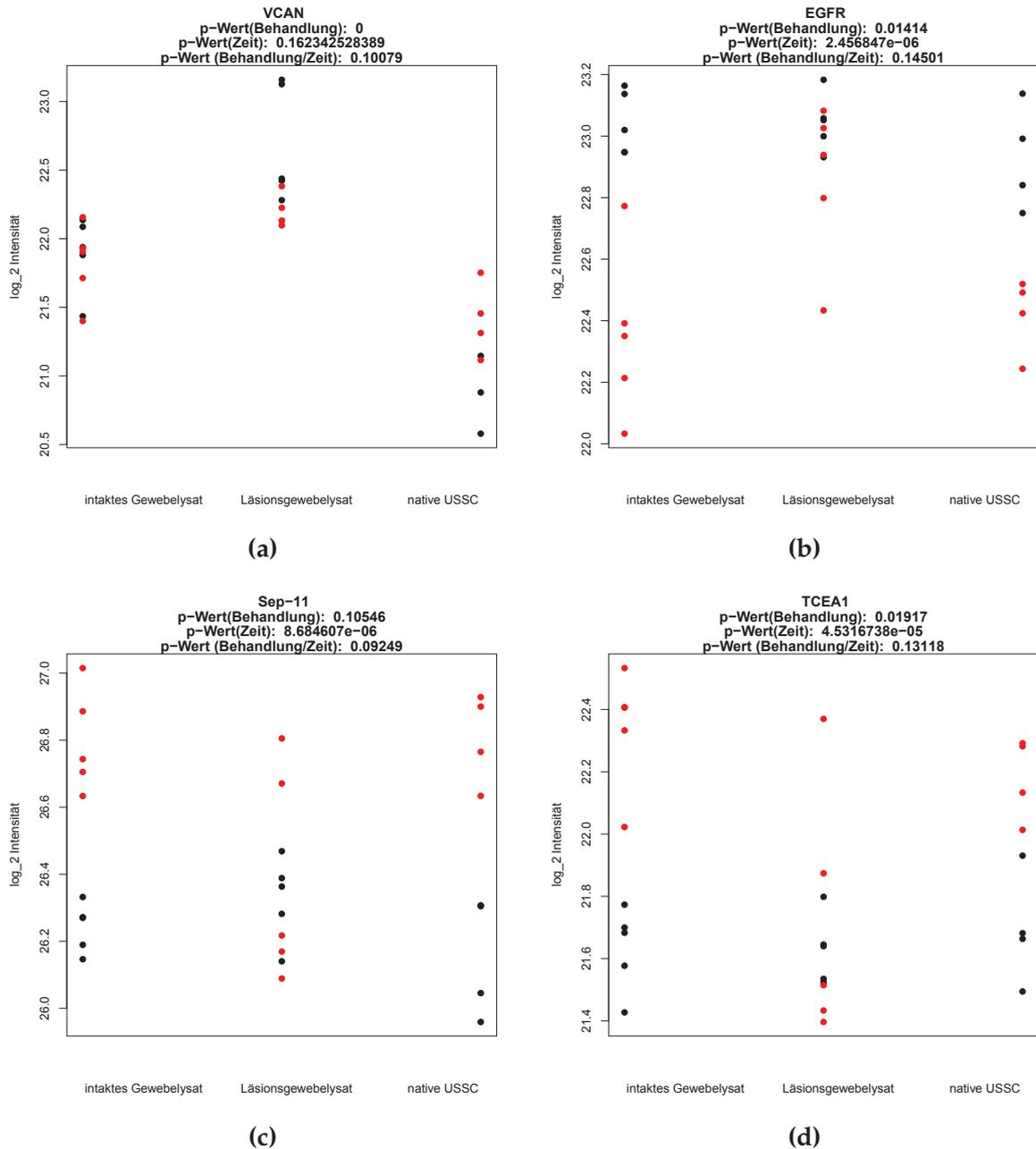


Abbildung 5.6 – Expression von vier Proteinen, die nach Inkubation mit Läsionslysat in USSC differenziell vorhanden sind: (a) VCAN ist signifikant stärker vorhanden nach Behandlung mit Läsionsgewebelysat, sowohl nach 24 h (schwarz) als auch nach 72 h (rot). (b) EGFR ist in unbehandelten USSC und in mit intaktem Gewebelysat behandelten USSC nach 72 h signifikant schwächer vorhanden, in mit Läsionsgewebelysat behandelten USSC nach 72 h aber konstant. (c) SEP11 ist in unbehandelten USSC und in mit intaktem Gewebelysat behandelten USSC nach 72 h signifikant stärker abundant, in mit Läsionsgewebelysat behandelten USSC nach 72 h konstant. (d) TCEA1 ist in mit Läsionsgewebelysat behandelten USSC nach 72 h konstant, während es in mit unbehandelten USSC und in mit intaktem Gewebelysat behandelten USSC signifikant stärker vorhanden ist.

Zeitpunkte zeigen (Abb. 5.5, Modell 2). Insgesamt wurden 374 Proteine als differenziell zwischen den beiden Zeitpunkten einer Behandlung detektiert (Tab. 7 im Anhang).

Dabei konnten kleinere behandlungsbedingte, zeitabhängige Unterschiede festgestellt werden. Der Großteil der zeitabhängig regulierten Proteine ist unabhängig von einer Behandlung mit Lysat reguliert (Abb. 5.7). Von 192 zum späteren Zeitpunkt hochregulierten Proteinen sind 117 Proteine unabhängig von der Behandlung reguliert und nur 33 Proteine ausschließlich nach einer Behandlung mit einem der Lysate (Abb. 5.7a). So sind die 11 Proteine ECH1, ECHS1, ARL6IP5, SLC25A12, BLCRB, SLC25A3, HRNRNPD, ALDH18A1, APMAP, AP2A2 und RPN2 nur nach Behandlung mit Läsionslysat nach 72 h hochreguliert, nicht aber in unbehandelten Zellen.

Von 182 Proteinen, die nach 72 h schwächer abundant vorkommen als nach 24 h, sind 76 Proteine unabhängig von der Behandlung reguliert (Abb. 5.7b). 17 Proteine sind ausschließlich nach Behandlung mit Läsionslysat reguliert. Dies sind die Proteine CSE1L, ABCE1, COPA, FLNA, ZYX, AP1G1, UFD1L, ALDOA, API5, PARVA, EIF3F, ACOT7, UBE2K, MYBBP1A, LSM12, EIF4H und PRPS1.

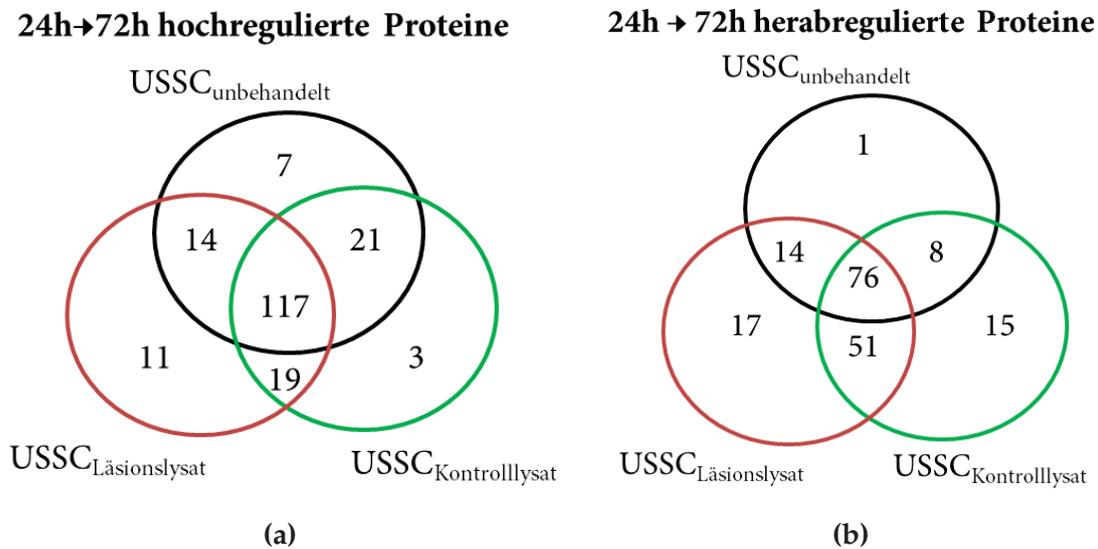


Abbildung 5.7 – Anzahl zeitabhängig regulierter Proteine in unterschiedlich behandelten USSC-Kulturen: 192 Proteine sind nach 72 h signifikant hochreguliert (a), während nach 72 h Inkubationszeit 182 Proteine signifikant schwächer in USSC detektiert wurden (b).

Tabelle 5.3 – Proteine, die signifikant nach Behandlung reguliert sind: Sechs der 36 Proteine sind nur zu einem Zeitpunkt signifikant reguliert (**fett** hervorgehoben). 30 Proteine weisen sowohl nach 24 h als auch nach 72 h eine signifikante Regulation zwischen unbehandelten (O) und behandelten USSC (K = mit Kontrolllysate, L = mit Läsionslysate) auf. P-Werte < 0,05 sind angegeben.

Genname	Proteinname	p-Wert		Veränderung	
		O/L	O/K	O/L	O/K
Proteine, die nach Behandlung schwächer vorhanden sind					
ELN	Elastin	1,69E-04	1,18E-03	+3,54	+4,40
TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain	1,78E-02	4,50E-02	+3,29	+2,25
SLC1A4	Neutral amino acid transporter A	4,99E-04	1,32E-02	+2,39	+2,17
PSAT1	Phosphoserine aminotransferase	9,86E-07	6,44E-04	+1,91	+1,49
ACTA1	Actin, aortic smooth muscle	2,29E-05	5,81E-03	+1,89	+1,66
PPAP2B	Lipid phosphate phosphohydrolase 3	4,81E-04	1,44E-03	+1,80	+1,43
RRAS	Ras-related protein R-Ras	3,86E-03	1,75E-02	+1,74	+1,66
HSPG2	Endorepellin	5,64E-03	2,12E-03	+1,69	+1,52
PALLD	Palladin	5,56E-04	3,23E-03	+1,63	+1,43
HSPB1	Heat shock protein beta-1	1,46E-06	4,68E-07	+1,63	+1,40
SLC3A2	4F2 cell-surface antigen heavy chain	1,08E-05	7,61E-03	+1,61	+1,54
CALD1	Caldesmon	3,03E-03	2,81E-02	+1,56	+1,35
TPM4	Tropomyosin alpha-4 chain			+1,51	+1,23
LMO7	LIM domain only protein 7	2,90E-03	1,01E-02	+1,48	+1,38
DES	Desmin	1,19E-03	2,71E-02	+1,47	+1,23
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	3,09E-02	5,35E-05	+1,45	+1,31
P4HA1	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	1,35E-03	3,94E-02	+1,40	+1,25
EHD2	EH domain-containing protein 2	1,85E-02	9,89E-05	+1,36	+1,41
DAB2	Disabled homolog 2			+1,19	+1,22
Proteine, die nach Behandlung stärker vorhanden sind					
PDCD4	Programmed cell death protein 4			-1,14	-1,27
COL12A1	Collagen alpha-1(XII) chain			-1,15	-1,03
HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	4,10E-02	1,71E-02	-1,20	-1,24
GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	2,19E-02	3,37E-02	-1,23	-1,31
LAMB1	Laminin subunit beta-1			-1,34	-1,18
LRP1	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 85 kDa subunit	4,96E-02	2,07E-02	-1,41	-1,38
FAM129B	Niban-like protein 1	1,08E-02	4,06E-04	-1,51	-1,42
ASPH	Aspartyl/asparaginyl β -hydroxylase	9,35E-05	4,89E-02	-1,51	-1,46
COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	3,35E-06	5,78E-04	-1,57	-1,44
NT5E	5-nucleotidase	5,86E-06	9,02E-03	-1,62	-1,54
PC	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	1,98E-02	7,74E-03	-1,64	-1,65
H6PD	Glucose 1-dehydrogenase	6,44E-03	1,88E-03	-1,72	-1,59
COL6A2	Collagen alpha-2(VI) chain	4,15E-05	4,35E-05	-1,81	-1,69
NRP1	Neuropilin-1	2,49E-03	1,29E-02	-1,90	-1,71
GFPT2	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase 2	1,20E-06	2,87E-06	-2,03	-1,69
ANPEP	Aminopeptidase N	1,05E-06	5,02E-07	-1,90	-1,90
COL6A3	Collagen alpha-3(VI) chain	1,99E-06	2,17E-05	-2,07	-1,92

5.1.2.4 Vergleich von behandelten und unbehandelten USSC

Ob USSC nicht nur durch Läsionslysat, sondern generell durch die Behandlung mit Rückenmarksgewebe beeinflusst werden, wurde durch den Vergleich von unbehandelten und behandelten USSC untersucht (Abb. 5.5, Modell 3). In Tab. 5.3 sind 36 Proteine aufgelistet, die sowohl nach Behandlung mit gesundem als auch nach Behandlung mit lädiertem Rückenmarksllysat eine signifikante Regulation, verglichen mit unbehandelten USSC, zeigen. 30 Proteine sind sowohl nach 24 h als auch nach 72 h Inkubation unterschiedlich stark konzentriert, während sechs Proteine (STAT1, PDCD4, COL12A1, LAMB1, TPM4, DAB2) nur an einem der beiden Zeitpunkte als differenziell detektiert wurden. 19 Proteine sind nach Behandlung stärker abundant, 17 Proteine schwächer.

5.1.2.5 Quantifizierung und Identifizierung von CD-Antigenen zur Charakterisierung von USSC

CD-Antigene sind Proteine, die als Oberflächenmarker zur immunphänotypischen Charakterisierung von Zellen verwendet werden. Im USSC-Lysat wurden 34 CD-Antigene identifiziert (aufgelistet in Tab. 5.4), die hilfreich für die weitere Typisierung von USSC und zur Unterscheidung der USSC von anderen Zelltypen im Nabelschnurblut sein können.

Von den 34 identifizierten CD-Antigenen wurden zehn Proteine als reguliert zwischen den Zeitpunkten bzw. zwischen den Behandlungen detektiert. So sind CD13, CD29, CD49b, CD71 und CD109 nach 72 h signifikant reguliert. CD73, CD91, CD98 und CD304 hingegen sind signifikant nach einer Behandlung mit Lysat reguliert. CD108 wurde ausschließlich in behandelten USSC identifiziert und deshalb nicht quantifiziert.

5.1.3 Sekretomanalyse von behandelten USSC

Parallel zum Zelllysat wurde das Sekretom von behandelten und unbehandelten USSC nach 72 h untersucht. Dazu wurde der Zellkulturüberstand durch Lyophilisierung aufkonzentriert, über eine kurze 1D-PAGE von störenden Salzen befreit und schließlich über LC-MS aufgetrennt und analysiert. Insgesamt konnten auf diese Weise 611 humane Proteine in 15 Datensätzen (drei Zustände mit je fünf biologischen Replikaten) nachgewiesen werden. 175 Proteine (29 %) wurden in allen Zuständen und Replikaten identifiziert, 370 Proteine (61 %) in mehr als der Hälfte der Datensätze.

Tabelle 5.4 – CD-Antigene, die im USSC-Zellysat identifiziert wurden: Proteine, die nach Behandlung oder zwischen den beiden Zeitpunkten differentiell vorkommen, sind **fett** hervorgehoben.

CD-Antigen	Gen-name	Proteinname	Regulation
CD13	ANPEP	Aminopeptidase N	nach 72 h hochreguliert
CD29	ITGB1	Integrin beta-1	nach Behandlung und 72 h hochreguliert
CD44	CD44	CD44 antigen	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD47	CD47	Leukocyte surface antigen CD47	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD49b	ITGA2	Integrin alpha-2	nur in behandelten USSC identifiziert, nach 72 h herunterreguliert
CD49c	ITGA3	Integrin alpha-3	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD49e	ITGA5	Integrin alpha-5	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD51	ITGAV	Integrin alpha-V	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD54	ICAM1	Intercellular adhesion molecule-1	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD71	TFRC	Transferrin receptor protein 1	nach 72 h herunterreguliert
CD73	NT5E	5'-nucleotidase	nach Behandlung herunterreguliert
CD90	THY1	Thy-1 membrane glycoprotein	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD91	LRP1	Low density lipoprotein-related protein 1	nach Behandlung herunterreguliert
CD98	SLC3A2	4F2 cell-surface antigen heavy chain	nach Behandlung hochreguliert
CD167b	DDR2	Discoidin domain-containing receptor 2	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD105	ENG	Endoglin	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD106	VCAM1	Vascular cell adhesion protein 1	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD107a	LAMP1	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD107b	LAMP2	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD108	SEMA7A	Semaphorin-7A	nur in behandelten USSC identifiziert
CD109	CD109	150 KDa TGF-beta-1 binding protein	nach 72 h hochreguliert
CD112	PVRL2	Poliovirus receptor related protein 2	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD140a	PDGFRA	Alpha-type PDGF receptor	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD140b	PDGFRB	Beta-type PDGF receptor	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD147	BSG	Basigin	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD166	ALCAM	Activated leukocyte-cell adhesion molecule	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD203a	ENPP1	Ectonucleotide pyrophosphatase	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD222	IGF2R	Insulin-like growth factor II receptor	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD248	CD248	Endosialin	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD262	TNFRSF10B	Death receptor 5	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD298	ATP1B3	Sodium/potassium-transporting ATPase beta-3 chain	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD304	NRP1	Neuropilin-1	nach Behandlung herunterreguliert
CD315	PTGFRN	Prostaglandin F2 receptor negative regulator	<i>keine signifikante Regulation</i>
CD325	CDH2	Cadherin-2	<i>keine signifikante Regulation</i>

Von 611 in diesem Experiment im USSC-Sekretom identifizierten Proteinen konnten 266 Proteine (44 %) quantifiziert werden. 167 Proteine sind signifikant unterschiedlich konzentriert zwischen einer der Behandlungsgruppen. Die größten Unterschiede wurden zwischen den Sekretomen der behandelten und der unbehandelten USSC festgestellt. Hier sind 98 Proteine nach Behandlung stärker, 30 schwächer konzentriert (Tab. 8 im Anhang).

Zwischen den mit lädiertem und den mit gesundem Gewebe behandelten USSC wurden drei Proteine stärker nach Behandlung mit gesundem Kontrollgewebe und neun Proteine stärker nach Behandlung mit Läsionsgewebe detektiert (Tab. 5.5).

Tabelle 5.5 – Unterschiede zwischen dem Sekretom von USSC, die mit Rückenmarksgewebe behandelt wurden (K = Kontrollgewebe, L = Läsionsgewebe):

Genname	Proteinname	p-Wert L _S /K _S	Veränderung L _S /K _S
RAP1A	Ras-related protein Rap-1A	9,89E-03	+2,04
EXT2	Exostosin-2	2,61E-02	+1,92
SSC5D	Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D	7,49E-03	+1,68
TNC	Tenascin	2,83E-03	+1,64
EMILIN1	EMILIN-1	2,20E-02	+1,54
SERPINE2	Glia-derived nexin	5,75E-03	+1,53
COL3A1	Collagen alpha-1(III) chain	2,96E-03	+1,39
EFEMP2	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	2,42E-02	+1,35
GDI2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	3,20E-02	+1,21
MYH9	Myosin-9	4,50E-02	-1,27
HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta	4,12E-02	-1,42
CALU	Calumenin	3,68E-03	-1,78

5.1.4 Quantifizierung von Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom

Im Zelllysate von USSC konnte eine Reihe von bekannten Neuritenwachstumsfaktoren identifiziert und quantifiziert werden, die bereits im Sekretom der Zellen nachgewiesen wurden. Von den 20 bekannten Neuritenwachstumsfaktoren im USSC-Sekretom (Tab. 4.4 auf Seite 52) konnten 14 ebenfalls im Zelllysate von USSC identifiziert werden. Die Proteine CLU, Gelsolin, MIF, Moesin, Nidogen, Periostin, SERPINE1, SERPINE2 sowie Tenascin wurden identifiziert, nicht aber quantifiziert. Für Laminin B1 wurde eine signifikante Regulation zwischen unbehandelten und behandelten USSC festgestellt (Tab. 5.3). In gleicher Weise wurde auch Neuropilin 1

reguliert. Versican V1 ist spezifisch nur nach Behandlung mit Läsionslysat stärker vorhanden.

SPARC, welches als abundantes Protein mit vielversprechender Funktion in Kapitel 4.1.7 bereits untersucht wurde, konnte sowohl im Zelllysat als auch im Sekretom behandelter und unbehandelter USSC detektiert und quantifiziert werden. Ein signifikanter Unterschied konnte für die Konzentration von SPARC im Sekretom festgestellt werden. Im Sekretom behandelter USSC (Abb. 5.8b) ist SPARC nach 48 h signifikant schwächer vorhanden, wenn die Zellen vorher mit dem Lysat aus murinem Rückenmark inkubiert wurden. Zwischen unbehandelten USSC und mit Läsionslysat behandelten USSC ist eine 2,6-fach schwächere Abundanz und zwischen unbehandelten USSC und mit Kontrolllysat behandelten USSC eine 2,0-fach schwächere Abundanz detektiert worden. Dies konnte durch Immunodetektion bestätigt werden (Abbildungen 5.8 und 5.9).

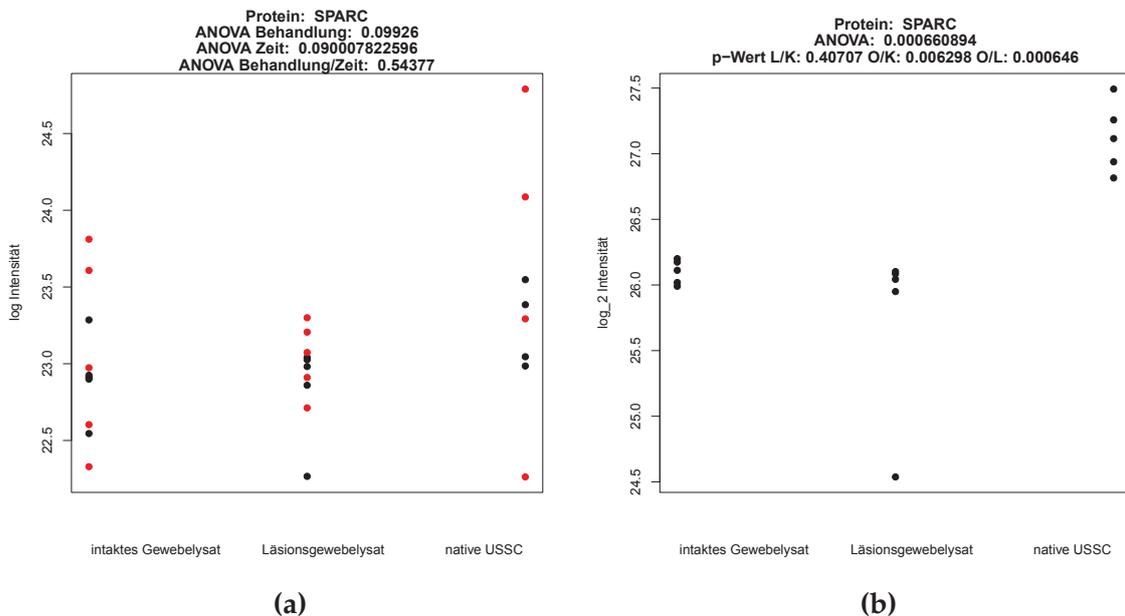


Abbildung 5.8 – Quantifizierung von SPARC im USSC-Zelllysat und Sekretom: Durch markierungsfreie Massenspektrometrie-basierte Quantifizierung konnte kein Unterschied der SPARC-Abundanz im USSC-Zelllysat festgestellt werden (a). Im Sekretom behandelter USSC (b) ist SPARC nach 48 h signifikant schwächer vorhanden, wenn die Zellen vorher mit dem Lysat aus murinem Rückenmark inkubiert wurden. Zwischen unbehandelten USSC und mit Läsionslysat behandelten USSC ist eine 2,6-fach schwächere Expression und zwischen unbehandelten USSC und mit Kontrolllysat behandelten USSC eine 2,0-fach schwächere Expression detektiert worden.

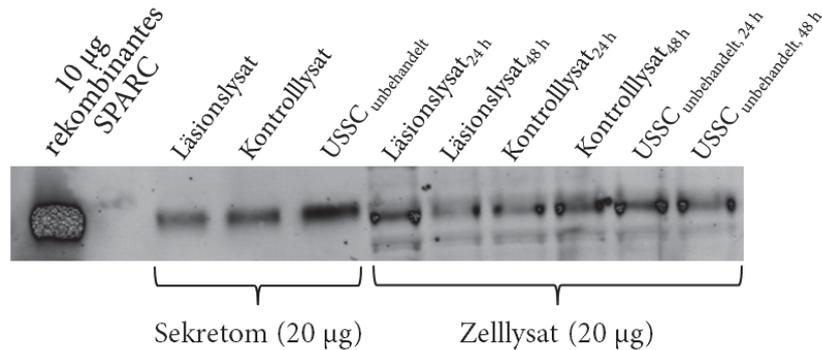


Abbildung 5.9 – Immunodetektion von SPARC im USSC-Zelllysate und Sekretom: Durch Immunodetektion (Färbung mit SPARC-Antikörper) konnte SPARC sowohl im Sekretom als auch im Zelllysate von unbehandelten und behandelten USSC nachgewiesen werden. Im Sekretom wurde eine Abnahme der SPARC-Konzentration in behandelten USSC festgestellt.

5.2 Diskussion

Im vorangegangenen Kapitel wurde bereits das neuritenwachstumsfördernde Potential des USSC-Sekretoms eingehend diskutiert und gezeigt, dass diese Stammzellen mehrere neuritenwachstumsfördernde Faktoren sekretieren. Ob der in Kapitel 4 *in vitro* beobachtete parakrine Effekt auch für die *in vivo* beobachtete Neuronregeneration verantwortlich ist oder ob USSC sich möglicherweise durch die veränderte Umgebung komplett anders verhalten, wurde in einer umfangreichen, quantitativen Proteomstudie untersucht. Dazu wurde durch die Behandlung der Zellen mit Gewebelysate eine Situation simuliert, wie sie nach Transplantation der USSC ins Rückenmark vorliegt. Die Auswirkungen auf das Gesamtproteom von USSC wie auch auf das Sekretom wurden mittels markierungsfreier Quantifizierung detektiert.

Die hier beschriebene differentielle Analyse von USSC-Zelllysate stellt die erste beschriebene Proteomanalyse dieses Zelltypes dar. Die 2 502 identifizierten Proteine verteilen sich über nahezu alle Zellkompartimente (Abb. 5.2).

Durch Quantifizierung von 1 343 Proteinen im Zelllysate von USSC konnte ein Einfluss der Behandlung mit Gewebelysate aus murinem Rückenmark festgestellt werden. Dabei wirkt sich Gewebelysate aus gesundem Rückenmark anders aus als Gewebelysate aus einer Läsionsstelle im Rückenmark. Diese Behandlung verändert die USSC derart, dass auch nach weiteren 48 h Inkubation unter normalen Kulturbedingungen noch Veränderungen sowohl im Proteom als auch im Sekretom festgestellt werden konnten.

5.2.1 Einfluss einer Behandlung mit Rückenmarkslysate aus einer Läsionsstelle

Eine wichtige Fragestellung dieses Experimentes war, ob sich das Proteom von USSC durch Behandlung mit Lysat aus der Läsionsstelle verändert und ob es Unterschiede zu der Behandlung mit Lysat aus gesundem Rückenmarksgewebe gibt. Es konnte gezeigt werden, dass die behandelten Zellen sich bereits nach 24 h unterscheiden (Tab. 5.1). Die signifikanten Konzentrationsunterschiede in der Abundanz einzelner Proteine sind dabei aber kleiner als Faktor 1,80. Ein Protein, das beispielsweise nach spezifischer Behandlung stärker konzentriert ist, ist das *Versican Core Protein* (VCAN), das in der ECM wichtige Aufgaben in der Zellbewegung übernimmt (Abb. 5.6a). Als Proteoglykan wirkt VCAN in der Läsionsnarbe stark inhibierend auf die Regeneration (Davies *et al.*, 1999; Schmalfeldt *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2003) und wird nach einer Rückenmarksverletzung in Schwannschen Zellen hochreguliert (Plant *et al.*, 2001). In der hier parallel durchgeführten quantitativen Sekretomanalyse wurde festgestellt, dass VCAN von behandelten Zellen (allerdings unabhängig von der Art des Gewebes) um den Faktor 2 stärker sekretiert wird als in unbehandelten Zellen (Tab. 8 im Anhang).

Syntenin-1 (SDCBP) ist als weiteres identifiziertes Protein aus USSC an der Axonogenese beteiligt und kommt wie VCAN stärker in läsionsbehandelten Zellen vor (Faktor 1,27). Syntenin-1 ist ein PDZ-Domänen-Protein, das überwiegend an der Zytoskelett/Membran-Organisation beteiligt ist, aber ebenso über die L1-Familie der Celladhäsionsmoleküle (L1CAM) in Neuronen direkt zum Axonwachstum beitragen kann (Herron *et al.*, 2009). Möglich ist also, dass die verletzten Nervenbahnen zur Aktivierung der USSC beitragen können. Ebenso denkbar ist, dass Syntenin-1 ähnlich wie VCAN die Zytoskelettorganisation unterstützt und so auf eine veränderte Motilität der USSC hinweist.

Nach Entfernen des Lysates und weiteren 48 h Inkubation ist ein anhaltender Effekt zu beobachten (Tab. 5.2). Integrin beta-1 (ITGB1, auch bezeichnet als Fibronectin-Rezeptor β oder CD29), und der EGF-Rezeptor (EGFR) sind beide nach 72 h hochreguliert, nicht aber nach 24 h. Das Zelladhäsionsprotein ITGB1 ist an zahlreichen Interaktionen zwischen ECM und Zellmembran beteiligt (z. B. mit Laminin und Collagenen). Es ist nach Behandlung mit Läsionslysate signifikant stärker abundant. Für EGFR wurde ein ähnliches Abundanzprofil beobachtet. Sowohl ITGB1 als auch EGFR sind an der Zelltaxi beteiligt (Ayuso-Sacido *et al.*, 2010; Balzac *et al.*, 1994).

Phospholipase A2 (PLA2G4A) ist sowohl nach 24 h als auch nach 72 h signifikant hochreguliert in läsionslysatebehandelten Zellen. Dieses Enzym hydrolysiert membrangebundene Glycerophospholipide und setzt ungebundene Fettsäuren und Lyso-phospholipide frei, die eine Immunantwort hervorrufen können (Ryborg *et al.*, 1994). Die hier quantifizierte cytosolische Phospholipase A2 wirkt in der Läsionsstelle protektiv auf das Nervengewebe und neuronwachstumsfördernd (López-Vales *et al.*,

2011). Die Beobachtung, dass PLA2G4A nach Rückenmarksläsion in der Läsionsstelle stärker exprimiert wird, wurde bereits im Tiermodell bestätigt (López-Vales *et al.*, 2011). Nicht nur in USSC wird also die Expression von PLA2G4A durch Läsionsgewebe angeregt, sondern auch in anderen Zellen der Läsionsstelle.

Daraus wird geschlossen, dass nach 24 h zunächst eine Veränderung des Zytoskeletts abläuft und anschließend während fortlaufender Inkubation intrazelluläre Proteine und Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimiert werden, die eine gerichtete Bewegung zu einem externen Stimulus (in diesem Fall zur Läsionsstelle) ermöglichen. Gleichzeitig wird die Sekretion bestimmter Faktoren wie Phospholipiden angeregt.

5.2.2 Einfluss einer Behandlung mit Rückenmarkslysat

Nach Behandlung mit Gewebelysat (unabhängig ob aus intaktem Gewebe oder aus der Läsionsstelle) sind mehrere Proteine schwächer konzentriert, die an der Reorganisation des Cytoskeletts beteiligt sind (EHD2, LMO7, ACTA1, CALD1, DES, ELN, PALLD, TPM1). Drei Proteine, die zur Reorganisation der ECM beitragen (ELN, P4HA1, HSPG2), wurden als schwächer konzentriert detektiert. Insbesondere das Strukturprotein Elastin kommt nach Behandlung um den Faktor 4,40 schwächer konzentriert vor (Tab. 5.3). Vier Proteine (ALD1, HSPB1, TPM1 und TPM4) sind am biologischen Prozess der Zellbewegung beteiligt (Crabos *et al.*, 1991; Doshi *et al.*, 2010; Eppinga *et al.*, 2006) und sind ebenfalls nach Behandlung mit Gewebelysat herunterreguliert.

Der Transkriptionsfaktor STAT1 ist nach Behandlung mit Rückenmarksgewebe signifikant geringer konzentriert. STAT1 wird nach neuronalem Zelltod durch Rückenmarksläsion aktiviert und induziert das verbesserte Überleben von Neuronen (Osuka *et al.*, 2011). In USSC wird es durch die Behandlung intrazellulär inhibiert. AHNAK (*Neuroblast differentiation-associated protein* oder Desmoyokin) ist als ein Protein beschrieben, dass nach Rückenmarksläsion in hohem Maße durch myelinisierende Zellen in der Läsionsstelle exprimiert wird (Salim *et al.*, 2009). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nach Behandlung mit Rückenmarkslysat in USSC in geringerer Konzentration vorkommt.

Weiterhin konnte die Regulation des Neuritenwachstumsfaktors Neuropilin (CD304 oder NRP1) beobachtet werden. Dieser ist nach Behandlung mit Läsionslysate oder Kontrolllysate stärker abundant. Auch im Sekretom konnte dieser Unterschied in der NRP1-Konzentration festgestellt werden. In unbehandelten Datensätzen ist NRP1 schwächer vorhanden als in behandelten Datensätzen. Die stärkste Sekretion von NRP1 wurde in USSC beobachtet, die mit Läsionslysate behandelt wurden. Eine weitere Regulation von Neuritenwachstumsfaktoren im Zelllysate behandelte USSC konnte nicht beobachtet werden.

In USSC läuft durch die Behandlung mit Gewebelysate (unabhängig ob aus intaktem Gewebe oder aus der Läsionsstelle) eine Anpassung an die neue Umgebung ab. ECM-modifizierende Proteine, cytoskelettäre Proteine und an der Zellbewegung beteiligte Proteine werden schwächer exprimiert. Es kann also sein, dass USSC sobald sie in Kontakt mit Rückenmarksgewebe kommen, in ihrer Motilität eingeschränkt werden. Auch die stärkere Abundanz von vier Collagenuntereinheiten sowie Laminin durch die Gewebebehandlung weisen auf eine Veränderung der Motilität von USSC hin. Dies deckt sich teilweise mit der von Schira *et al.* (2012) beobachteten Migration der Zellen nach Transplantation ins Rückenmark. Dort konnte gezeigt werden, dass USSC, sobald sie in die Nähe der Läsionsstelle gewandert sind, ihre Motilität verlieren. Interessanterweise kann dieser Effekt aber bereits durch intaktes Rückenmarksgewebe hervorgerufen werden.

5.2.3 Veränderung des Phänotypes

USSC sind phänotypisch durch eine Reihe von CD-Antigenen charakterisiert (Kögler *et al.*, 2005). In dieser Arbeit konnten die meisten dieser CD-Antigene bestätigt werden (CD13, CD29, CD44, CD49e, CD54, CD71, CD73, CD90, CD105, CD166, Vimentin). Vimentin stellt das mit Abstand intensivste Protein im USSC-Zelllysate dar. Darüber hinaus konnten weitere CD-Antigene festgestellt werden (u. a. CD47, CD140a/b). Diese können in Zukunft zu einer verbesserten Isolierung von USSC aus dem Nabelschnurblut beitragen.

Der Phänotyp der USSC verändert sich sowohl durch Behandlung als auch durch eine längere Inkubation (Tab. 5.4). So sind nur jene Zellen, die mit Rückenmarksllysate behandelt wurden, CD49b und CD108 positiv. In unbehandelten USSC konnten diese beiden CD-Antigene nicht durch MS-basierte Proteinanalytik nachgewiesen werden. CD29 (ITGB1) wurde nach Behandlung mit Läsionslysate stärker exprimiert als ohne Behandlung. Eine nach Behandlung signifikant veränderte Abundanz wurde für CD73, CD91, CD98 und CD304 festgestellt. CD73 wird als Marker für lymphatische Differenzierung, aber auch als Oberflächenmarker für MSC verwendet (Dominici *et al.*, 2006; Resta und Thompson, 1997). Darüber hinaus werden mehrere CD-Antigene nach einer längeren Inkubationszeit differentiell exprimiert (CD13, CD71, CD109).

5.2.4 Sekretomanalyse von behandelten USSC

In dieser Studie konnten im Sekretom von USSC 611 Proteine identifiziert werden. 533 Proteine davon konnten bereits mittels der umfangreichen Sekretomanalyse in Kapitel 4 nachgewiesen werden.

Das Sekretom der behandelten USSC unterscheidet sich vom Sekretom unbehandelter USSC. Neun Proteine wurden nach Behandlung mit Läsionslysate stärker sekretiert als nach Behandlung mit Kontrolllysate. Zu diesen zählen vier Proteine, die an der Wundheilung beteiligt sind: RAP1A, COL3A1, EFEMP2 und SERPINE2. Das Läsionsgewebe enthält folglich Proteine, die die Sekretion dieser Proteine durch USSC fördern. Gleichzeitig ist die Variation dieser Proteine ein Hinweis darauf, dass USSC nicht nur an der Regeneration des neuronalen Gewebes beteiligt sind, sondern auch zur Wundheilung der Läsionsstelle (insbesondere durch Blutgerinnung) beitragen können. Darüber hinaus werden nach Behandlung mit Läsionslysate drei Proteine stärker sekretiert, die an der fokalen Adhäsion beteiligt sind (Emilin1, Tenascin C und COL3A1). Die Inhibierung von Tenascin C in spinalen Motoneuronen führt zu einer verschlechterten Regenerierung nach Rückenmarksläsion (Yu *et al.*, 2011). Folglich kann die verstärkte Sekretion von Tenascin C durch USSC die Neuronregenerierung fördern.

5.2.5 SPARC im USSC-Zelllysate und USSC-Sekretom

In vorhergehenden Analysen konnte SPARC als potenter und abundanter Neuritenwachstumsfaktor im USSC-Sekretom nachgewiesen werden (Kapitel 4.1.7). In diesem Kapitel wurde der Einfluss von Läsionsgewebe auf die intrazelluläre Konzentration und die Sekretion von SPARC analysiert.

SPARC wurde durch markierungsfreie Quantifizierung im USSC-Zelllysate als nicht signifikant reguliert detektiert (Abb. 5.8a). Sowohl zwischen den unterschiedlich behandelten Zellen als auch zwischen den beiden untersuchten Zeitpunkten konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Diese Beobachtung wird durch die Immunodetektion mit SPARC-Antikörper (Abb. 5.9) gestützt.

Im Sekretom von USSC ist SPARC hingegen nach Behandlung mit Zelllysate aus dem murinen Rückenmark signifikant schwächer vorhanden (Abb. 5.8b). Diese Regulation ist unabhängig davon, ob die Zellen mit Lysate aus intaktem Rückenmark oder aus Lysate der Läsionsstelle inkubiert wurden. Durch Immunodetektion (Abb. 5.9) wurde bestätigt, dass SPARC abundanter im Sekretom unbehandelter Zellen vorkommt.

5.3 Fazit

In der hier durchgeführten quantitativen Proteomstudie konnten erste Einblicke in die Veränderung von USSC nach Transplantation in lädiertes Rückenmark erhalten werden. Demnach läuft durch die Behandlung mit Gewebelysate (unabhängig ob aus intaktem Gewebe oder aus der Läsionsstelle) eine Anpassung an die neue

Umgebung ab. Mehrere ECM-modifizierende Proteine, cytoskelettäre Proteine und an der Zellbewegung beteiligte Proteine werden schwächer exprimiert.

USSC werden durch die spezielle Behandlung mit Läsionslysate anders in ihrer Motilität beeinflusst als durch die Behandlung mit Gewebelysate aus intaktem Rückenmarksgewebe. In USSC, die mit Lysate aus der Läsionsstelle behandelt wurden, ist bereits nach 24 h eine verstärkte Abundanz einzelner Bestandteile des Zytoskeletts detektiert worden. Während fortlaufender Inkubation werden intrazelluläre Proteine und Rezeptoren auf der Zelloberfläche (u. a. Integrine) exprimiert, die eine gerichtete Bewegung zur Läsionsstelle ermöglichen. Gleichzeitig wird sowohl die Sekretion von Proteinen, die die Wundheilung unterstützen, als auch von bestimmten Faktoren wie Phospholipiden angeregt.

Für eine beginnende Differenzierung der USSC in neuronale Zellen oder Gliazellen konnten wie auch bereits von Schira *et al.* (2012) keine Hinweise gefunden werden. Zwar verändert sich der Phänotyp basierend auf der Expression von CD-Antigenen sowohl durch Behandlung als auch durch eine längere Inkubationsdauer, aber eine explizite Veränderung in einen bestimmten Zelltyp konnte nicht beobachtet werden.

Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass sich die Zusammensetzung des Sekretoms verändert. Auch das Gleichgewicht aus positiven und negativen Neuritenwachstumsfaktoren (Kapitel 4) verändert sich, wenn USSC in die Läsionsstelle transplantiert werden. So wurde für SPARC eine schwächere Sekretion festgestellt. Andere Neuritenwachstumsfaktoren wie z. B. NRP1 oder Tenascin C wurden hingegen stärker von behandelten USSC sekretiert und exprimiert als von unbehandelten Zellen. Es ist möglich, dass der *in vitro* beobachtete neuritenwachstumsfördernde Effekt des USSC-Sekretoms auf anderen Proteinen und Mechanismen beruht als der *in vivo* beobachtete Effekt nach Transplantation ins Rückenmark.

Expansion von CD34⁺ hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen

6.1 Ergebnisse

Der dritte Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung von CD34⁺/CD45⁺ Zellen aus Nabelschnurblut.¹ Die Verwendung von Nabelschnurblutzellen für klinische Studien und Transplantationen ist durch die geringe Zahl an CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen limitiert (Kelly *et al.*, 2009). Deshalb wird häufig eine *ex vivo*-Expansion dieser Zellen angestrebt, um die Zellzahl signifikant zu erhöhen. Ob und wie sich CD34⁺-Zellen während der *ex vivo*-Expansion verändern, wurde in dieser Arbeit anhand von Proteomanalysen untersucht. Dazu wurde die relative Veränderung auf Proteinlevel bestimmt, um so ein Verständnis für Veränderungen von biologischen Prozessen zu erhalten. Es wurden CD34⁺ Zellen analysiert, die unter GMP-Bedingungen (*Good Manufacturing Practice*, Gute Herstellungspraxis) isoliert und für bis zu sieben Tage in Zellkultur expandiert wurden (Abb. 6.1). Das Gesamtzelllysat von FACS-isolierten CD34⁺ Zellen (Tag 0) und von weiter expandierten Zellen (Tag 3 und Tag 7) wurde mittels markierungsfreier LC-MS analysiert.

¹Dieses Kapitel wurde in *Stem Cell International* veröffentlicht. Autoren dieser Arbeit sind Heiner Falkenberg und Teja Falk Radke (zu gleichen Teilen) sowie Gesine Kögler und Kai Stühler. Die Aufarbeitung und die Expansion der Zellen wurden von Teja Falk Radke durchgeführt. Zellaufschluss, Proteomanalyse sowie statistische und bioinformatische Auswertung wurden von Heiner Falkenberg durchgeführt.

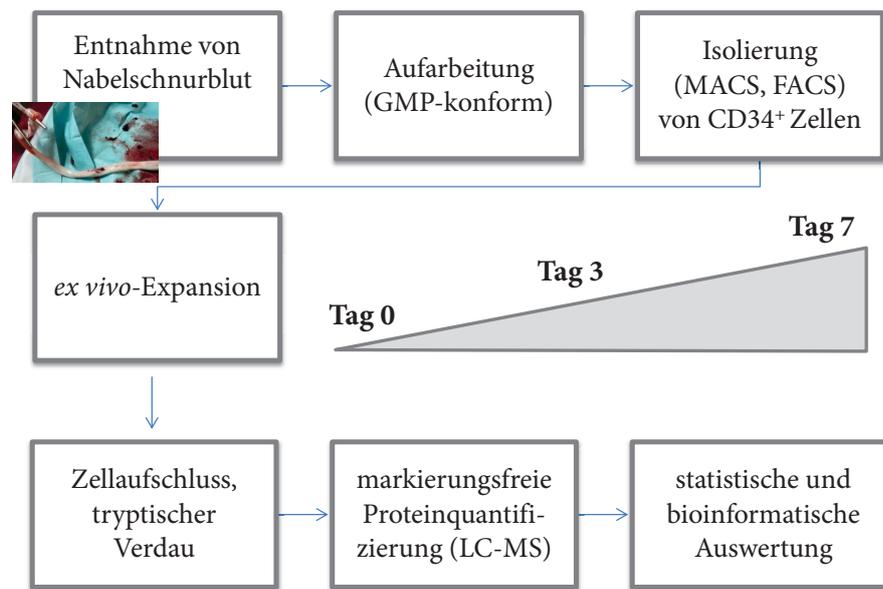


Abbildung 6.1 – Experimentelles Vorgehen bei der Analyse von Proteomveränderungen während der Expansion von CD34⁺ Zellen

6.1.1 *ex vivo*-Expansion von CD34⁺ hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen

Im Anschluss an die Expansion im Zellkulturmedium, das mit den Cytokinen SCF, TPO, FLT3-Ig und IL6 versetzt wurde, ist die Zellzahl von CD34⁺ hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen bestimmt worden (Abb. 6.3). Die Gesamtzellzahl nimmt innerhalb der ersten drei Tage um den Faktor 2,07 zu. In den folgenden vier Tagen steigt die Zellzahl sogar insgesamt um den Faktor 25,30. Dabei nimmt die Zahl an CD34⁺ Zellen von Tag 0 bis Tag 3 um den Faktor 2,1 zu. Der Anteil an CD34⁺ Zellen bleibt also zunächst annähernd konstant (97,5% an Tag 3). Sie machen somit in den ersten Tagen der Expansion den Hauptanteil der Zellpopulation aus. In den darauffolgenden Tagen verschiebt sich dieses Verhältnis jedoch, sodass zwar nach sieben Tagen die Gesamtzellzahl drastisch gestiegen ist, aber die CD34⁺ Zellen sich im gleichen Zeitraum nur um den Faktor 4,2 vermehrt haben und folglich nur noch eine Subpopulation aller Zellen darstellen (Anteil CD34⁺ Zellen: 16,6%).

6.1.2 Erstellung von Proteomprofilen während der *ex vivo*-Expansion

Zur Erstellung von Proteomprofilen wurde die markierungsfreie Quantifizierung verwendet. Sie ermöglicht es, Proteine in komplexen Mischungen ohne vorheri-

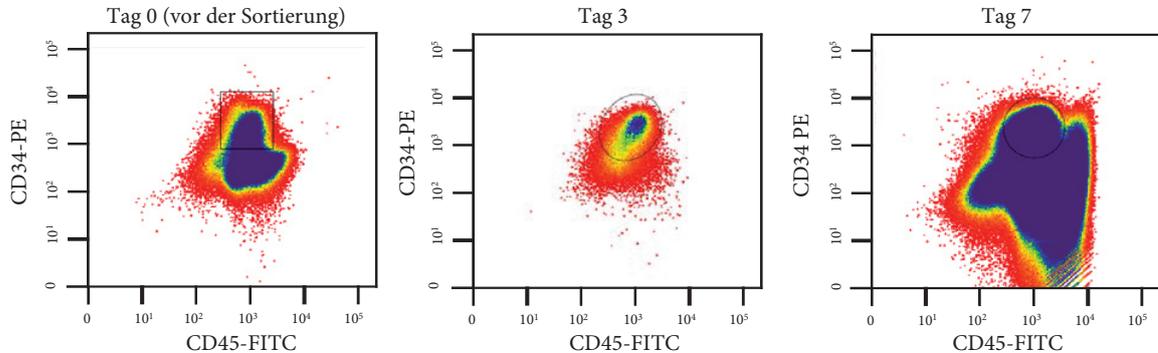


Abbildung 6.2 – Zellen aus humanem Nabelschnurblut wurden durch MACS angereichert und anhand ihrer CD34⁺/CD45⁻ Expression sortiert: Repräsentative Entwicklung der CD34-Expression während der Expansion über sieben Tage. An Tag 0 wurden die Zellen mit MACS angereichert und anhand ihrer CD34⁺/CD45⁻ Expression sortiert (gate 4). Isolierte Zellen wurden in 6-well-Schalen mit cytokinangereichertem Medium (SCF, TPO, FLT3-g, IL-6) kultiviert. Nach drei Tagen exprimieren die meisten Zellen CD34 auf ihrer Oberfläche, während nach sieben Tagen weniger als 20 % der Zellen als CD34⁺/CD45⁻ klassifiziert wurden. (FITC=Fluorescein-isothiozyanat gekoppelter Antikörper, PE=R-phycoerythrin gekoppelter Antikörper)

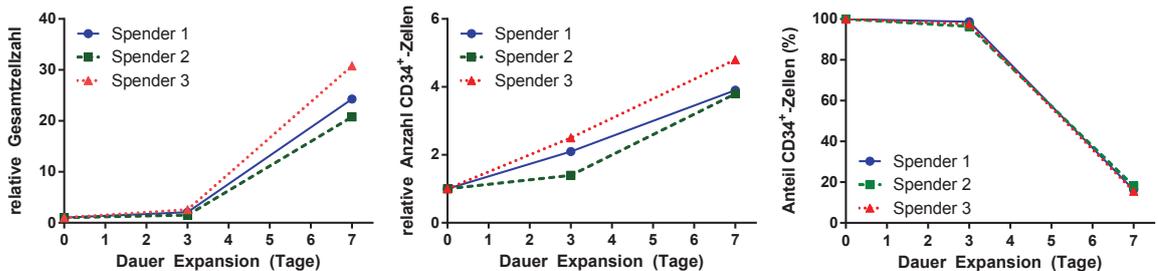


Abbildung 6.3 – Expansionsraten von Nabelschnurblutstammzellen und CD34⁺ Zellen: Innerhalb der ersten drei Tage nimmt die Gesamtzellzahl um das 2,07-fache ($\pm 0,32$) zu, während nur eine kleine Veränderung der CD34-Expression festgestellt wurde. Dies korreliert mit der Expansionsrate der CD34⁺ Zellen von 2,00 ($\pm 0,32$). Innerhalb von vier weiteren Tagen der cytokinunterstützten Expansion nimmt die Gesamtzellzahl auf das 25,30-fache ($\pm 2,93$) des Ausgangswertes zu, während der Anteil der CD34-exprimierenden Zellen drastisch abnimmt. Trotzdem steigt die Zellzahl der CD34⁺ Zellen in dieser Zeit auf das 4,17-fache ($\pm 0,32$) des Ausgangswertes.

ge Markierung zu identifizieren und zu quantifizieren. Dazu wurde das Gesamtzelllysat von drei Nabelschnurblutspendern an Tag 0 (nach Entnahme und FACS-Anreicherung) sowie an Tag 3 und Tag 7 nach *ex vivo*-Expansion analysiert.

Insgesamt konnten über die gesamte Expansionsdauer 2 970 unique Proteine identifiziert werden. Eine detaillierte Analyse der Proteineigenschaften (basierend auf GO-Terms (Uniprot, 2013)) zeigte, dass Proteine aus nahezu allen subzellulären Kompartimenten (Nukleus, Golgiapparat, Cytoskelle, Membran, extrazelluläre Region und weitere) nachgewiesen wurden, die an 65 übergeordneten biologischen Prozessen (basierend auf *GOslim*-Kategorisierung) beteiligt sind. Über die qualitative Analyse des Proteinlysates lassen sich zunächst wenige Rückschlüsse auf Veränderungen im Proteom während einer Expansion ziehen. Dagegen kann die quantitative Analyse mittels markierungsfreier Quantifizierung wichtige Aussagen über die Veränderung der Proteinexpression während der Expansion liefern. Zur weiteren Analyse von Proteomveränderungen während der *ex vivo*-Expansion wurden 1 343 Proteine verglichen, die sowohl in allen drei Spendern als auch zu allen drei Zeitpunkten quantifiziert werden konnten.

Eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) zeigt deutlich, dass die größte Varianz zwischen Datensätzen zwischen den analysierten Zeitpunkten liegt und nicht zwischen den individuellen Spendern (Abb. 6.4). Ein systembedingter Einfluss kann ausgeschlossen werden, weil die Proben in einer zufälligen Reihenfolge gemessen wurden und letztlich eine gute LC-MS-Reproduzierbarkeit erreicht wurde, was Voraussetzung für die markierungsfreie Analyse ist. Die Pearson-Korrelation zwischen der log₂-Expression zweier technischer Replikate (beide Tag 0, selber Spender) liegt bei 0,967.

Die statistische Analyse der Proteinabundanz mittels ANOVA von 1 343 Proteinen konnte zeigen, dass 903 der identifizierten Proteine (67,2 %) keine signifikante Regulation an einem der Zeitpunkte aufwiesen, wohingegen 440 Proteine signifikante Veränderungen während der analysierten Expansionsdauer aufwiesen (Abb. 6.5).

In Übereinstimmung mit der PCA wurde die größte Anzahl an veränderten Proteinexpressionen bereits nach Tag 3 und damit in einem frühen Stadium der Expansion festgestellt (Tab. 6.1). Insgesamt 360 Proteine sind an Tag 3 signifikant stärker oder signifikant schwächer vorhanden als an Tag 0. Von diesen Proteinen wurden 318 Proteine ebenfalls nach Tag 7 noch als signifikant verändert detektiert. Sie repräsentieren einen frühen und permanenten Effekt der Expansion. Im Vergleich zu dieser Gruppe von Proteinen konnten 42 Proteine mit einer frühen, aber transienten Veränderung beobachtet werden. Von Tag 3 bis Tag 7 wurde eine kleine Gruppe von 80 Proteinen beobachtet, deren Abundanz sich ausschließlich in der späten Phase der Expansion verändert.

Um die Veränderungen auf Proteinebene besser beschreiben zu können, wurden fünf verschiedene Expressionsprofile definiert (Tab. 6.1). Die Gruppe der früh-permanent

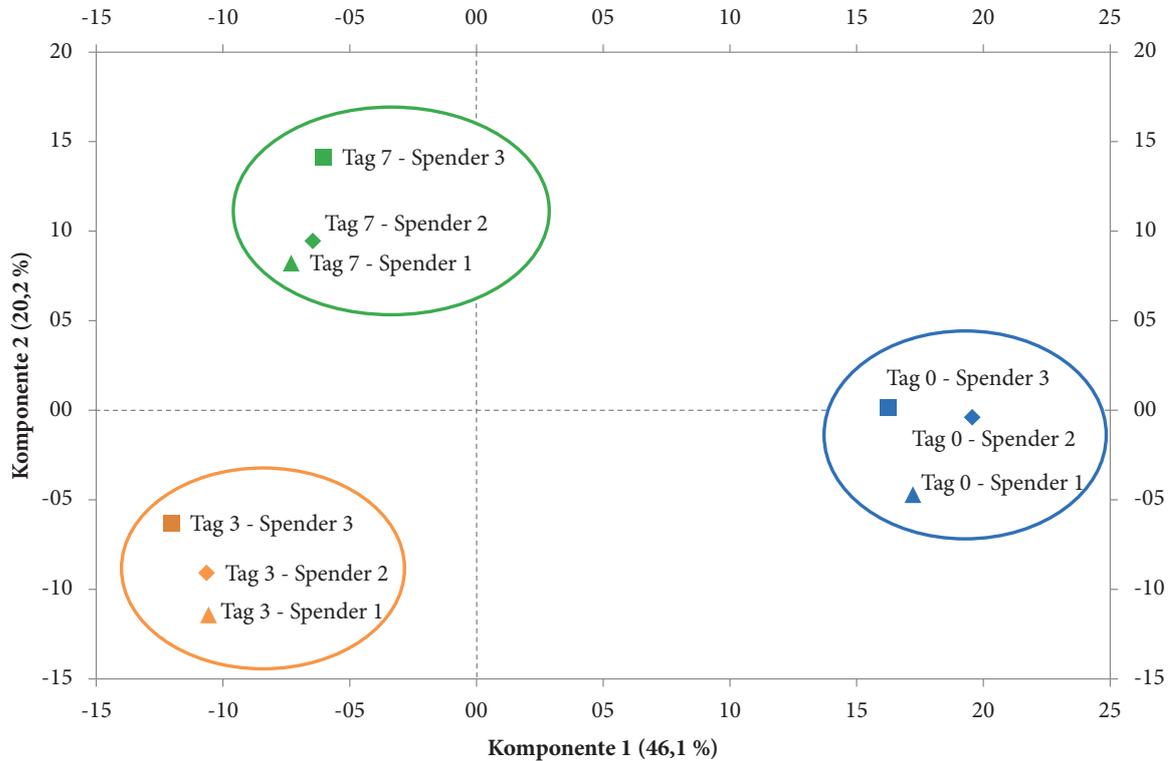


Abbildung 6.4 – Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Proteinintensitäten in CD34⁺ Zellen: Anhand der PCA wird ein Unterschied zwischen den hier untersuchten drei Zeitpunkten der Expansion deutlich. Basierend auf den gemessenen Proteinexpressionsdaten liegt der größte Unterschied zwischen Tag 0 und Tag 3, wohingegen die Variation zwischen Tag 3 und Tag 7 deutlich kleiner ist. Nur kleine Varianzen wurden zwischen den drei verschiedenen Nabelschnurblutspendern beobachtet.

Expressionsprofil		Anzahl Proteine
früh transient	hoch	17
	herab	25
früh permanent	hoch	167
	herab	151
spät	hoch	38
	herab	19
Langzeit	hoch	21
	herab	2
keine Regulation		903
insgesamt		1343

Tabelle 6.1 – Anzahl an Proteinen mit entsprechenden Expressionsprofilen von Tag 0 nach Tag 7: Eine Unterscheidung zwischen frühen, späten und Langzeit-Veränderungen und zwischen transienten und permanenten Veränderungen verdeutlicht, dass die meisten signifikanten Veränderungen im frühen Stadium der Expansion ablaufen und permanent reguliert bleiben.

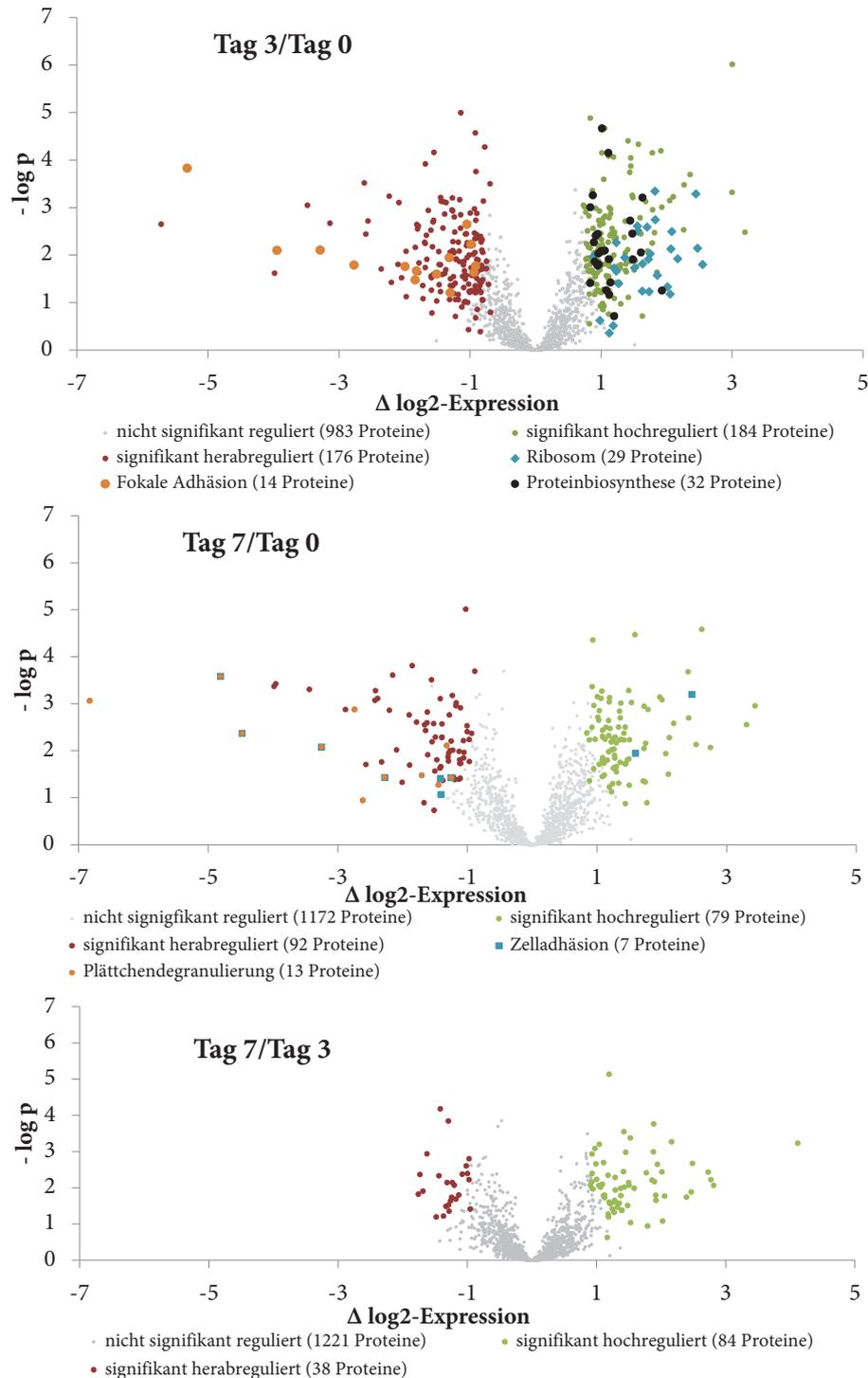


Abbildung 6.5 – Paarweiser Vergleich der Proteinexpression an verschiedenen Tagen: Signifikant regulierte Proteine zeigen im Volcano-Plot sowohl einen deutlichen Unterschied in der log₂-Auftragung der Proteinabundanz (x-Achse) als auch im -log(p)-Wert (y-Achse). Mit den biologischen Prozessen der fokalen Adhäsion und der Proteinbiosynthese verbundene Proteine zeigten eine starke Regulation zwischen Tag 0 und Tag 3.

und früh-transient regulierten Proteine stehen für frühe Veränderungen im Proteom von CD34⁺ hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen. Dagegen spiegeln die Gruppen der späten und der langzeit-regulierten Proteine Veränderungen wider, die während länger andauernder Expansion auftreten. In der Gruppe der früh-transient hochregulierten Proteine (insgesamt 17 Proteine) wurde das Transferrin-Rezeptor-Protein 1 (CD71) an Tag 3 als 7,6-fach intensiver als an Tag 0 detektiert, nach Tag 7 allerdings wieder 2,3-fach schwächer als an Tag 3. Eine vergleichbar große Gruppe an Proteinen wurde als langzeit-verändert festgestellt (21 Proteine intensiver, 15 Proteine schwächer vorhanden). Als Beispiele für Proteine dieser Gruppe dienen hier das actinbindende Protein Tropomodulin-3, die cyclinabhängige Kinase 6 (beide langzeit-hochreguliert) sowie zwei tRNA-Ligasen, die an der Aminosäureaktivierung beteiligt sind (VARS und WARS, beide langzeit-herabreguliert).

6.1.3 Regulierte biologische Prozesse während der *ex vivo*-Expansion

Die Gruppen der während der *ex vivo*-Expansion regulierten Proteine wurden auf gemeinsame biologische Prozesse analysiert. Dafür wurde nach angereicherten GO-Kategorien (sowohl molekulare Funktionen als auch biologische Prozesse), KEGG-Signalwegen und Uniprot-Schlagwörtern (Kanehisa *et al.*, 2012; Uniprot, 2013) in den einzelnen Proteingruppen gesucht (Tab. 6.2, Abb. 6.5).

Innerhalb der Gruppe der früh-permanent hochregulierten Proteine sind die meisten biologischen Prozesse signifikant angereichert. Die meisten dieser regulierten Prozesse stehen in Zusammenhang mit der Translation (Initiation/Elongation), ribosomaler Aktivität und Proteinbiosynthese (Tab. 6.2). Von allen 1 343 quantifizierten Proteinen können 33 Proteine mit dem Signalweg „Ribosom“ in Verbindung gebracht werden, wovon 27 bereits nach kurzer Expansionsdauer von drei Tagen um das 1,85 bis 5,51-fache stärker vorhanden waren. Eine signifikante Anreicherung konnte ebenfalls für das Uniprot-Schlagwort „Proteinbiosynthese“ beobachtet werden. 31 Proteine von insgesamt 64 Proteinen mit diesem Schlagwort aus dem gesamten Datensatz zeigten einen frühen Abundanzanstieg. Darüber hinaus konnten mehrere Transkriptionsfaktoren (z. B. EIF2A, EIF3A, EIF4A, EIF5B) sowie zehn tRNA-Ligasen des Aminoacyl-tRNA-Biosynthese-Signalweges (z. B. GARS, MARS, NARS) als permanent hochreguliert beobachtet werden.

Die Gruppe der Proteine, die nach drei Tagen permanent schwächer abundant sind als an Tag 0, konnte mit dem KEGG-Signalweg der fokalen Adhäsion (z. B. Ingetrin- α -2b/ β -3, Filamin A/B), dem biologischen Prozess der Exocytose und der Degranulation von Blutplättchen (z. B. *Platelet basic protein*) in Verbindung gebracht werden. Von 22 Proteinen, die aus dem KEGG-Signalweg der fokalen Adhäsion im

Tabelle 6.2 – Beispiele angereicherter biologischer Prozesse innerhalb der signifikant regulierten Proteine: Die Annotierung der biologischen Prozesse (GOBP⁽¹⁾), KEGG-Signalwege ⁽²⁾ und Uniprot-Schlagwörtern ⁽³⁾ der regulierten Proteine wurde verglichen mit den entsprechenden Prozessen aller identifizierter Proteine im gesamten Datensatz. Angereicherte Kategorien sind mindestens um den Faktor 2,3 stärker vorhanden und haben einen p-Wert <0,001. Infolge multipler Funktionalität werden einzelne Proteine mehreren Kategorien zugeordnet.

Kategorie	Anzahl regulierter Proteine (insgesamt)	Anreicherungs-faktor	p-Wert	regulierte Proteine (Uniprot-ID)
früh permanent: hochreguliert				
<i>serine family amino acid metabolic process</i> ¹	4 (4)	8,04	2,3E-04	PHGDH; PSPH; SHMT1; SHMT2
<i>translational initiation</i> ¹	28 (34)	6,62	3,7E-21	EIF2B2; EIF2B4; EIF3B; EIF3E; EIF3H; EIF3K; EIF4G1; EIF4G2; EIF5B; PABPC1; RPL12; RPL13; RPL14; RPL17; RPL18; RPL22; RPL27; RPL3; RPL38; RPL4; RPL7; RPL7A; RPL9; RPLP0; RPLP0P6; RPS10; RPS10P5; RPS13; RPS16; RPS18; RPS19; RPS2; RPS25; RPS3; RPS3A; RPS4X; RPS7; RPS8; RPSA; RPSAP58 PWP2; RPL12; RPL13; RPL14; RPL17; RPL18; RPL22; RPL27; RPL3; RPL38; RPL4; RPL7; RPL7A; RPL9; RPLP0; RPLP0P6; RPS10; RPS10P5; RPS13; RPS16; RPS18; RPS19; RPS2; RPS25; RPS3; RPS3A; RPS4X; RPS7; RPS8; RPSA; RPSAP58
<i>Ribosome</i> ²	27 (33)	6,58	2,9E-20	RPL9; RPLP0; RPLP0P6; RPS10; RPS10P5; RPS13; RPS16; RPS18; RPS19; RPS2; RPS25; RPS3; RPS3A; RPS4X; RPS7; RPS8; RPSA; RPSAP58 GFM1; RPL12; RPL13; RPL14; RPL17; RPL18; RPL22; RPL27; RPL3; RPL38; RPL4; RPL7; RPL7A; RPL9; RPLP0; RPLP0P6; RPS10; RPS10P5; RPS13; RPS16; RPS18; RPS19; RPS2; RPS25; RPS3; RPS3A; RPS4X; RPS7; RPS8; RPSA; RPSAP58
<i>translational elongation</i> ¹	28 (35)	6,43	1,7E-20	CDK1; RPL12; RPL13; RPL14; RPL17; RPL18; RPL22; RPL27; RPL3; RPL38; RPL4; RPL7; RPL7A; RPL9; RPLP0; RPLP0P6; RPS10; RPS10P5; RPS13; RPS16; RPS18; RPS19; RPS2; RPS25; RPS3; RPS3A; RPS4X; RPS7; RPS8; RPSA; RPSAP58
<i>cellular process involved in reproduction</i> ¹	29 (42)	5,55	3,4E-18	RPL12; RPL13; RPL14; RPL17; RPL18; RPL22; RPL27; RPL3; RPL38; RPL4; RPL7; RPL7A; RPL9; RPLP0; RPLP0P6; RPS10; RPS10P5; RPS13; RPS16; RPS18; RPS19; RPS2; RPS25; RPS3; RPS3A; RPS4X; RPS7; RPS8; RPSA; RPSAP58; UBAP2L
<i>protein targeting to ER</i> ¹	27 (40)	5,43	1,4E-16	RPLP0; RPLP0P6; RPS10; RPS10P5; RPS13; RPS16; RPS18; RPS19; RPS2; RPS25; RPS3; RPS3A; RPS4X; RPS7; RPS8; RPSA; RPSAP58
<i>Initiationfactor</i> ³	17 (29)	4,71	2,4E-09	EIF2A; EIF2B; EIF2B4; EIF2S1; EIF2S2; EIF3A; EIF3B; EIF3C; EIF3CL; EIF3D; EIF3E; EIF3EIP; EIF3L; EIF3H; EIF3K; EIF4A1; EIF4G1; EIF4G2; EIF5B AARS; CARS; EEF1A1; EEF1A1P5; EEF1A2; EEF1D; EEF1G; EEF2; EIF2A; EIF2B2; EIF2B4; EIF2S1; EIF2S2; EIF3A; EIF3B; EIF3C; EIF3CL; EIF3D; EIF3E; EIF3EIP; EIF3L; EIF3H; EIF3K; EIF4A1; EIF4G1; EIF4G2; EIF5B; EPRS; ETF1; GARS; GFM1; IARS; MARS; NARS; TARS MRPS27; RPL12; RPL13; RPL14; RPL17; RPL18; RPL22; RPL27; RPL3; RPL38; RPL4; RPL7; RPL7A; RPL9; RPLP0; RPLP0P6; RPS10; RPS10P5; RPS13; RPS16; RPS18; RPS19; RPS2; RPS25; RPS3; RPS3A; RPS4X; RPS7; RPS8; RPSA; RPSAP58
<i>Proteinbiosynthesis</i> ³	31 (64)	3,90	2,9E-13	EIF2A; EIF2B; EIF2B4; EIF2S1; EIF2S2; EIF3A; EIF3B; EIF3C; EIF3CL; EIF3D; EIF3E; EIF3EIP; EIF3L; EIF3H; EIF3K; EIF4A1; EIF4G1; EIF4G2; EIF5B; EPRS; ETF1; GARS; GFM1; IARS; MARS; NARS; TARS MRPS27; RPL12; RPL13; RPL14; RPL17; RPL18; RPL22; RPL27; RPL3; RPL38; RPL4; RPL7; RPL7A; RPL9; RPLP0; RPLP0P6; RPS10; RPS10P5; RPS13; RPS16; RPS18; RPS19; RPS2; RPS25; RPS3; RPS3A; RPS4X; RPS7; RPS8; RPSA; RPSAP58
<i>Ribonucleoprotein</i> ³	28 (78)	2,89	2,2E-08	RPL7A; RPL9; RPLP0; RPLP0P6; RPS10; RPS10P5; RPS13; RPS16; RPS18; RPS19; RPS2; RPS25; RPS3; RPS3A; RPS4X; RPS7; RPS8; RPSA; RPSAP58 EEF1A1; EEF1A1P5; EEF1A2; EIF2B2; EIF2B4; EIF2S1; EIF2S2; EIF3A; EIF3B; EIF3C; EIF3CL; EIF3D; EIF3E; EIF3EIP; EIF3L; EIF3H; EIF3K; EIF4A1; EIF4G1; EIF4G2; EIF5B; ELAC2; GEMIN5; NUP93; PABPC1; PABPC4; RANGAP1; XPOT
<i>RNA transport</i> ²	22 (66)	2,68	3,4E-06	AARS; CARS; ELAC2; EPRS; FTSJ3; GARS; GEMIN5; IARS; MARS; NARS; NOP2; PDCD11; RPL14
<i>cellular macromolecule catabolic process</i> ¹	43 (145)	2,38	2,0E-09	CDK1; EIF3E; EIF4A1; EIF4G1; ETF1; FEN1; PABPC1; PABPC4; PSMC1; PSMC2; PSMD1; PSMD2; PSMD3
<i>ncRNA metabolic process</i> ¹	21 (71)	2,38	4,3E-05	AARS; CARS; ELAC2; EPRS; FTSJ3; GARS; GEMIN5; IARS; MARS; NARS; NOP2; PDCD11; RPL14
früh permanent: herabreguliert				
<i>platelet degranulation</i> ¹	13 (21)	5,43	2,8E-08	ACTN1; CALM2; F13A1; FLNA; ITGA2B; ITGB3; PECAM1; PPBP; THBS1; TLN1; TUBA4A; VCL; WDR1
<i>Focal adhesion</i> ²	13 (22)	5,19	6,2E-08	ACTN1; CRKL; FLNA; FLNB; ITGA2B; ITGB3; MYL12A; PPP1R12A; RAP1B; THBS1; TLN1; VASP; VCL
<i>exocytosis</i> ¹	14 (24)	5,12	2,3E-08	ACTN1; CALM2; CALM1; F13A1; FLNA; ITGA2B; ITGB3; PECAM1; PLEK; PPBP; SCRNI; SNCA; THBS1; TLN1; TUBA4A; VCL; WDR1
<i>Calmodulin-binding</i> ³	6 (11)	4,79	5,2E-04	ADD3; IQGAP2; PPP3CA; SPTAN1; SPTBN1; STRN
<i>organic acid catabolic process</i> ¹	14 (38)	3,23	2,4E-05	ACADM; ALDH6A1; BCKDHA; CPT2; DDAH2; DECR1; DLST; ECI1; DCI; ETHE1; GLUD1; GLUD2; HADHB; HIBCH; IVD; MCCC1
<i>cell activation</i> ¹	16 (48)	2,93	2,6E-05	ACTN1; ADA; CALM2; CALM1; F13A1; FLNA; ITGA2B; PECAM1; PLEK; PPBP; PPP3CA; RAP1B; RAP1A; THBS1; TLN1; TUBA4A; VCL; WDR1; YWHAZ
spät reguliert: hochreguliert				
<i>Cell adhesion molecules</i> ²	3 (5)	21,21	2,0E-04	HLA-DRA; ITGAL; ITGB2;
<i>Glycoprotein</i> ³	11 (76)	5,12	2,9E-06	ASAH1; CD74; GLB1; HLA-DRA; ITGAL; ITGB2; MPO; PLD3; PRTN3; RNASET2; VIM;
<i>Signal</i> ³	9 (67)	4,75	5,0E-05	ASAH1; IL-25; CD74; GLB1; HLA-DRA; ITGAL; ITGB2; MPO; PLD3; PRTN3; RNASET2
spät reguliert: herabreguliert				
keine signifikant angereicherten Kategorien, weil Proteinanzahl < 30				
langzeitverändert: hoch- und herabreguliert				
keine signifikant angereicherten Kategorien, weil Proteinanzahl < 30				
früh/transient: hoch- und herabreguliert				
keine signifikant angereicherten Kategorien, weil Proteinanzahl < 30				

gesamten Datensatz identifiziert wurden, sind 13 Proteine bereits nach drei Tagen Expansion signifikant herabreguliert.

Weil die Anzahl an Proteinen, die an Tag 3 noch unverändert, aber zwischen Tag 3 und Tag 7 differentiell vorhanden sind, etwas geringer ist als die der früh regulierten Proteine (Tab. 6.1), konnten in dieser Gruppe auch weniger signifikant angereicherte biologische Prozesse festgestellt werden. So konnten verschiedene Zelladhäsionsmoleküle (HLA-DRA, ITGAL [auch bekannt als CD11a], ITGB2 [bekannt als CD18]) und Proteine mit dem Uniprot-Schlagwort „Glykoprotein“ (z. B. CD74, VIM) als angereichert in der Gruppe der spät-hochregulierten Proteine gefunden werden.

Letzlich ist in der Gruppe der transient- oder langzeitveränderten Proteine die Anzahl an Proteinen noch geringer. Deshalb konnten keine regulierten biologischen Prozesse beobachtet werden. Nichtsdestotrotz können Proteine mit diesen Expressionsprofilen relevant für ein besseres Verständnis der *ex vivo*-Expansion sein. So wurde z. B. die *Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C* (PTPRC), auch bekannt als CD45, identifiziert. PTPRC wurde basierend auf 13 Peptiden mit vergleichbaren Expressionsprofilen (Abb. 6.6) als früh/transient herabreguliert quantifiziert. Dieses Protein zeigte an Tag 3 eine signifikant schwächere Expression (Faktor -2,3). Die Abundanz von CD45 wurde an Tag 7 um den Faktor 3,6 höher als an Tag 3 gemessen und damit auf einem höheren Level als an Tag 0. Diese Beobachtungen sind konsistent mit der bei der FACS gemessenen Anzahl an CD45⁺-Zellen (Abb. 6.2). Die Anzahl an CD45⁺-Zellen ist an Tag 3 am niedrigsten, verglichen mit Tag 0 und Tag 7 (Abb. 6.6).

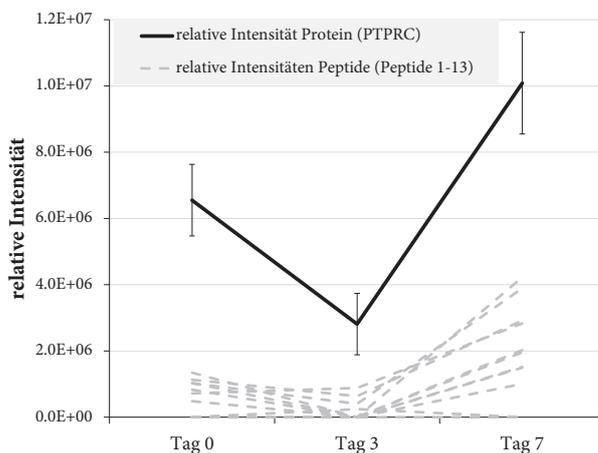


Abbildung 6.6 – Expression von PTPRC: Die markierungsfreie Quantifizierung von PTPRC (auch bekannt als CD45) basiert auf 13 unigen Peptiden mit ähnlichen Expressionsprofilen. Eine signifikante Herabregulierung um das 2,33-fache wurde zwischen Tag 0 und Tag 3 beobachtet. Von Tag 3 bis Tag 7 wurde dagegen eine um den Faktor 3,6 stärkere Expression detektiert.

6.1.4 Zytometrische Validierung von ausgewählten Oberflächenmarkerproteinen

Zur Validierung von identifizierten Kandidatenproteinen wurde eine Durchflusszytometrie von ausgewählten Oberflächenmarkerproteinen durchgeführt. Die Daten für CD13 und CD71 sind dargestellt in Abb. 6.7. CD34⁺ Zellen zeigen an Tag 0 eine mittlere Expression von CD13, die an Tag 3 signifikant ansteigt, um dann bis zu Tag 7 leicht schwächer zu werden. Die Abundanz von CD71 hingegen, welche an Tag 0 nur sehr gering ist, nimmt an Tag 3 zu und bleibt bis Tag 7 der Expansion stabil. Diese Beobachtungen sind kongruent mit den Werten der markierungsfreien Quantifizierung auf Proteomlevel, bei der CD13 ein früh-hochreguliertes Profil und CD71 ein langzeit-hochreguliertes Profil zeigt.

6.1.5 Cytokinbedingte Proteomveränderungen

In den vorhandenen Datensätzen wurde gezielt nach Proteinen gesucht, die eine Verbindung zu den zur Kultivierung verwendeten Cytokinen haben, also SCF, TPO, FLT3-Ig und IL-6. Es konnte keine Veränderung von direkten Interaktionspartnern dieser Cytokine beobachtet werden. Unter Verwendung von STRING (Jensen *et al.*, 2009) und *Ingenuity Pathway-Analysis* wurde auch nach indirekten Effektormolekülen sowie einer generellen Regulation von Signalwegen, die in Verbindung mit den Cytokinen stehen, gesucht. Auch hier konnte keine signifikante Veränderung auf Proteinlevel beobachtet werden, weder nach drei noch nach sieben Tagen Expansionsdauer. Gleiches gilt für den NOTCH-Signalweg, für welchen eine Verbindung mit der *ex vivo*-Expansion von CD45⁺ Zellen beschrieben wurde.

6.2 Diskussion

Die Verwendung eines Zellkulturmediums, welches mit Cytokinen versetzt wurde, führt zu einer schnellen und effizienten Expansion von hämatopoetischen Zellen (Kelly *et al.*, 2009). In den hier gezeigten Experimenten über die cytokinunterstützte *ex vivo*-Expansion von CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut nimmt die Gesamtzellzahl innerhalb von drei Tagen etwa um den Faktor 2 zu. Nahezu alle Zellen exprimieren zu diesem Zeitpunkt noch das CD34-Epitop auf ihrer Zelloberfläche. Morphologische Veränderungen oder beobachtete Unterschiede in der Durchflusszytometrie gegenüber nativen CD34⁺ Zellen wurden nicht festgestellt.

Durch Proteomanalyse konnten 2 970 unique Proteine im Zellysate von *ex vivo* expandierten CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut identifiziert werden. Dies stellt die bisher detaillierteste Beschreibung dieser Zellen auf Proteinebene während der *ex*

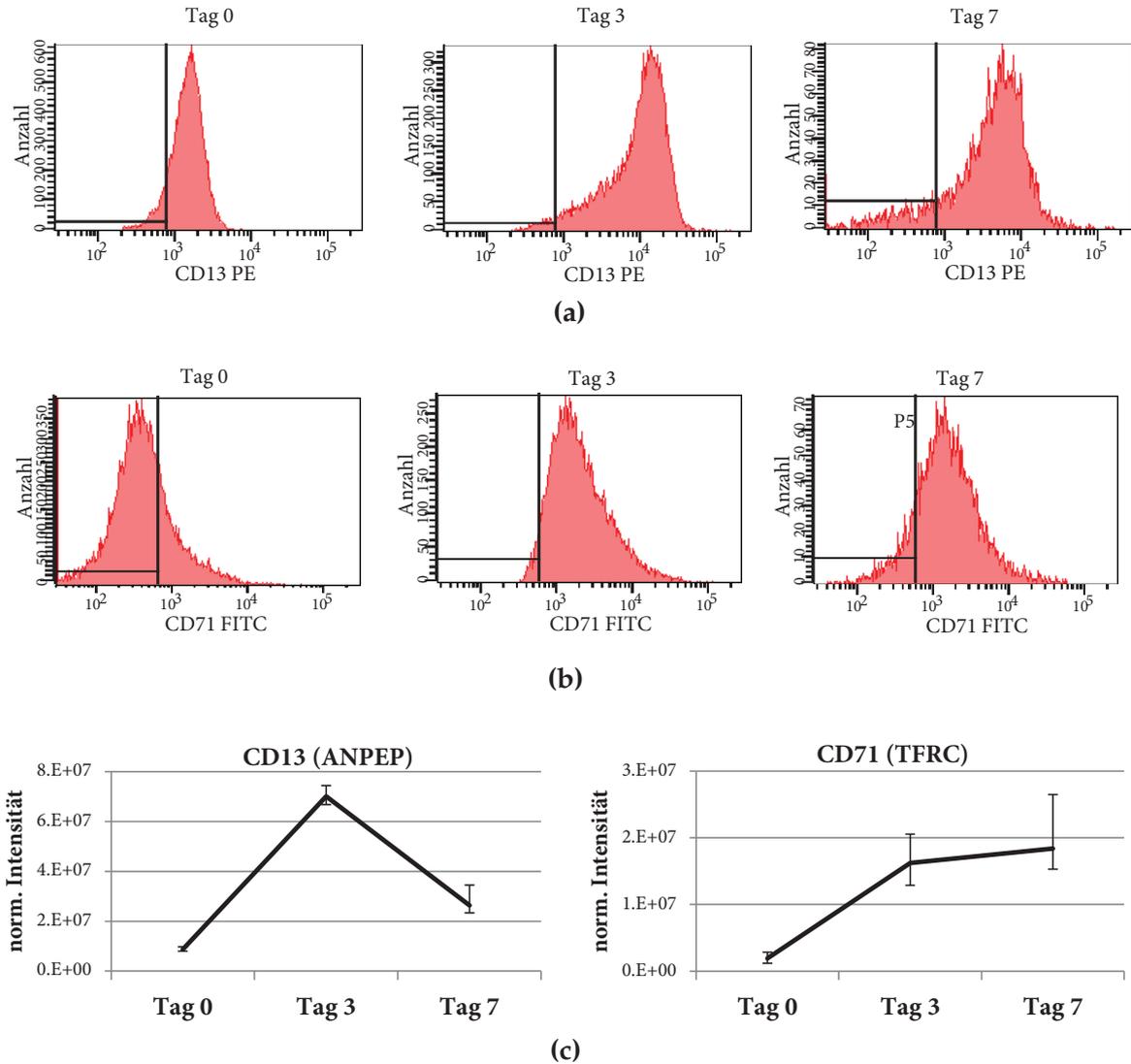


Abbildung 6.7 – Validierung der Proteinquantifizierung mittels Durchflusszytometrie: CD34⁺ Zellen wurden entsprechend des beschriebenen Protokolls expandiert. An den Tagen 0, 3 und 7 wurde die Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker in Kombination mit CD34 anhand von Durchflusszytometrie vermessen. Hier ist die Expression von CD13 (a) und CD71 (b) basierend auf den Daten der Durchflusszytometrie exemplarisch dargestellt. Diese Daten bestätigen die Expressionsprofile der markierungsfreien Proteinquantifizierung (c), dargestellt als normalisierte Intensität. CD13 wird an Tag 3 deutlich stärker exprimiert und wiederum schwächer an Tag 7. Die CD71-Expression nimmt ebenfalls bis Tag 3 zu, bleibt dann aber bis Tag 7 konstant.

in vivo-Expansion über eine Zeitspanne von sieben Tagen dar. Von 290 Proteinen, die von D'Alessandro *et al.* (2010b) durch Proteomanalyse von nativen CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut beschrieben wurden, konnten hier 221 Proteine bestätigt werden. Darüber hinaus konnten in dieser Arbeit durch markierungsfreie Quantifizierung von 1 343 Proteinen grundlegende Veränderungen des Proteoms während der gesamten Expansionsdauer nachgewiesen werden.

Eine signifikante Veränderung des Proteinprofils konnte bereits an Tag 3 der Expansion festgestellt werden. Insbesondere Proteine, die in Bezug zu Translation, ribosomaler Aktivität und Zellzyklus stehen, sind zu diesem Zeitpunkt hochreguliert. Dies ist konsistent mit dem beobachteten Anstieg der Zellzahl. Im Gegensatz dazu haben Proteine, die zu diesem Zeitpunkt (Tag 3) herabreguliert sind, spezifische Funktionen bei der fokalen Adhäsion oder der Cytoskelet-Remodellierung (z. B. ACTN1, ITGB3, TLN1, VASP). Auch wenn native CD34⁺ Zellen in der Regel nicht adhärent wachsen, haben sie unter *in vivo*-Bedingungen ein starkes intrinsisches Potential, das ihnen das Anwachsen im Gewebe (z. B. Knochenmark) ermöglicht. Die hier beobachtete Abnahme an Proteinen mit Verbindungen zur ECM weist möglicherweise auf einen Verlust dieser Eigenschaft während der frühen Expansionsphase durch eine (Teil-)Differenzierung der Zellen hin.

Während länger andauernder Expansion nimmt die Zellzahl weiter zu. Die bereits durch Proteomdaten an Tag 3 beobachtete beginnende Veränderung kann anhand von Durchflusszytometrie an Tag 7 belegt werden. Nur noch weniger als 20 % der Zellen exprimieren CD34 auf ihrer Oberfläche. Zusätzlich wurde eine CD45⁺ Zellpopulation, einem für die meisten Leukocyten spezifischem Markerprotein, festgestellt. Bestätigt wird diese Differenzierung durch das CD45-Proteinexpressionsprofil (Abb. 6.6).

Diese Veränderung resultiert in der PCA in einem größeren Unterschied zwischen Tag 3 und Tag 7 als zwischen Tag 0 und Tag 3 (Abb. 6.4). Weil die Expansionsrate innerhalb der ersten drei Expansionstage auf demselben Niveau liegt wie von Tag 3 bis Tag 7 (Abb. 6.3), kann davon ausgegangen werden, dass bereits an Tag 3 größere Veränderungen abgelaufen sind. Gleichzeitig konnte durch die Erstellung von Proteinprofilen gezeigt werden, dass die meisten in ihrer Abundanz veränderten Proteine und ihre assoziierten Signalwege permanent über die gesamte Expansionsdauer verändert sind und nur kleinere Veränderungen zwischen den späteren Zeitpunkten ablaufen.

Weil keinerlei Regulation von direkten Interaktionspartnern oder Effektoren der in der Zellkultur eingesetzten Cytokine beobachtet wurde, ist zu vermuten, dass die meisten der hier beschriebenen Änderungen weniger abhängig vom Expansionsprotokoll sind als bisher angenommen. Weitere Einblicke können in Zukunft beispielsweise durch den Einsatz von gerichteten Methoden zur Proteinquantifizierung mit einer höheren Sensitivität für spezielle Signalwege (z. B. NOTCH) erzielt werden.

Ein später Effekt auf Proteinebene ist die höhere Abundanz von spezialisierten Zelladhäsionsmolekülen. Während die in der Durchflusszytometrie beobachtete Veränderung im CD-Muster an Tag 7 durch die Quantifizierung von Proteinen bestätigt wurde (nicht nur für CD45 und CD34, sondern auch für CD11, CD18 und CD74), konnte durch die relative Proteinquantifizierung mit LC-MS darüber hinaus gezeigt werden, dass bereits zu einem früheren Zeitpunkt gravierende Veränderungen in der Proteinzusammensetzung auftreten.

Einige Proteine, die ausschließlich spät reguliert werden, stehen im Zusammenhang mit der Aktivierung von Leukozyten oder Lymphozyten (DUSP3, HLA-DRA, PAK1, CD45, SYK). Sollten die hier beobachteten Zellen in diese Richtung differenzieren, so könnte dies durchaus die Fähigkeit zum Anwachsen im Patientengewebe negativ beeinträchtigen. Damit verbunden ist eine größere Wahrscheinlichkeit zur Abstoßung durch den Patienten. Weitergehende Untersuchungen dieser Effekte werden insbesondere vor dem Hintergrund einer potentiellen klinischen Anwendung dringend empfohlen. Ein weiterer Aspekt sollte dabei die Analyse von CD34⁺ Subpopulationen, wie die CD34⁺/CD38⁻ Zellen, die als frühe hämatopoetische Vorläufer gelten, durch Resortierung (FACS) nach der Expansion sein. Die Resortierung bietet, eine ausreichende Zellzahl vorausgesetzt, die Möglichkeit der gezielten Analyse einzelner Subpopulationen. Des Weiteren bleibt noch offen, ob eine Abwandlung im Expansionsprotokoll durch die Verwendung anderer Cytokine die Predifferenzierung in eine bestimmte Richtung leiten kann (z. B. myeloid oder lymphoid).

6.3 Fazit

Die *ex vivo*-Expansion von CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut resultiert durch den Zusatz von Cytokinen in schnellem und effektivem Wachstum hämatopoetischer Zellen. Sie stellt daher einen vielversprechenden, klinisch relevanten Ansatz dar, um eine ausreichende Zellzahl für Transplantationen bereitzustellen (Kelly *et al.*, 2009). Die Proteinquantifizierung expandierender Zellen zeigt eine frühe Hochregulation von Proteinen, die an der Proteinbiosynthese beteiligt sind und gleichzeitig eine Herabregulierung von adhäsiven und exozytotischen Proteinen innerhalb von drei Tagen.

Aus den in dieser Arbeit gezeigten Experimenten kann geschlossen werden, dass dieses Verfahren die Eigenschaften von hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen möglicherweise stärker verändert als bisher angenommen. Während sich, basierend auf den gezeigten Daten, an Tag 3 noch keine Differenzierungsrichtung der Zellen abzeichnet, sind nach weiterer Kultivierung in der Proteinexpression Anzeichen für eine generelle Differenzierung zu Leukozyten und/oder Lymphozyten, die durch Durchflusszytometrie noch nicht zugänglich ist, nachgewiesen worden. Wird dies berücksichtigt, stellt sich letztlich die Frage, wie effektiv diese Art der Expansion in

Bezug auf Erhaltung des undifferenzierten Zustandes der hämatopoetischen Zellen ist.

Ausblick

In dieser Arbeit konnte ein umfassender Einblick in das Proteom und das Sekretom von Nabelschnurblutstammzellen gewonnen werden. Die hier erlangte Erkenntnis, dass USSC gleich mehrere Neuritenwachstumsfaktoren sekretieren, verstärkt die klinische Relevanz dieses Zelltyps. Gleichzeitig bietet sie die Möglichkeit, die neuritenwachstumsfördernde Wirkung von USSC im lädierten Rückenmark genauer untersuchen zu können, um so die Zellen gezielter einzusetzen. Die Veränderungen des Proteoms, die nach Behandlung von USSC mit Rückenmarksgewebe ablaufen, lassen auf eine veränderte Motilität der Zellen schließen. Aber nicht nur nach Rückenmarksläsion, auch bei der Behandlung von Myokardinfarkten kann das Wissen um USSC-sekretierte Proteine zu einem verbessertem Einsatz führen. Die starke ECM-modifizierende Wirkung der USSC-sekretierten Proteine kann möglicherweise sogar einen Ansatz für andere klinische Einsatzfelder bieten.

In dieser Arbeit konnten einige neue potentielle Neuritenwachstumsfaktoren identifiziert werden. Für eine Bestätigung ihrer positiven Wirkung auf Neurone sind umfassendere Experimente notwendig. Dies können *in vitro* durchgeführte Neuritenwachstumsassays mit rekombinanten Proteinen sein oder sogar *in vivo* Versuche mit rückenmarkslädierten Tieren.

Weiter konnte hier gezeigt werden, dass CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut sich während einer *ex vivo* Expansion stärker verändern als bisher angenommen. Die ersten Anzeichen für eine Differenzierung nach sieben Tagen bieten Grund zur Annahme, dass nach Expansion andere Zellen transplantiert werden, als bei der Verwendung nicht-exandierter Transplantate. Insbesondere eine veränderte Fähigkeit der Zellen, im Patientengewebe anzuwachsen, sollte eingehend untersucht werden.

Literaturverzeichnis

- Aktas, M.; Buchheiser, A.; Houben, A.; Reimann, V.; Radke, T.; Jeltsch, K.; Maier, P.; Zeller, W. J. und Kogler, G.; Good manufacturing practice-grade production of unrestricted somatic stem cell from fresh cord blood; *Cytotherapy*; 12 (3), 338–348, 2010; ISSN 1465-3249; doi:10.3109/14653241003695034. (Zitiert auf den Seiten 7 und 8)
- Allen, S. J. und Dawbarn, D.; Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors; *Clinical science (London, England : 1979)*; 110 (2), 175–191, 2006; ISSN 0143-5221; doi:10.1042/CS20050161. (Zitiert auf Seite 68)
- Allison, J. und Stepnowski, R. M.; The hows and whys of ion trapping; *Analytical chemistry*; 59 (18), 1072A–1088A, 1987; ISSN 0003-2700. (Zitiert auf Seite 13)
- Amirizadeh, N.; Oodi, A.; Nikougoftar, M. und Soltanpour, M. S.; Expression and promoter methylation changes of the p15ink4b during ex vivo cord blood cd34+ cell expansion following co-culture with mesenchymal stromal cells; *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*; 18 (5), 260–268, 2013; ISSN 1607-8454; doi:10.1179/1607845412Y.0000000062. (Zitiert auf Seite 10)
- Arufe, M. C.; La Fuente, A. d.; Mateos, J.; Fuentes, I.; Toro, F. J. d. und Blanco, F. J.; Analysis of the chondrogenic potential and secretome of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord stroma; *Stem cells and development*; 20 (7), 1199–1212, 2011; ISSN 1547-3287; doi:10.1089/scd.2010.0315. (Zitiert auf Seite 68)
- Au, E.; Richter, M. W.; Vincent, A. J.; Tetzlaff, W.; Aebersold, R.; Sage, E. H. und Roskams, A. J.; Sparc from olfactory ensheathing cells stimulates schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair; *The Journal of neuroscience*

- : *the official journal of the Society for Neuroscience*; 27 (27), 7208–7221, 2007; ISSN 1529-2401; doi:10.1523/JNEUROSCI.0509-07.2007. (Zitiert auf den Seiten 52 und 66)
- Ayuso-Sacido, A.; Moliterno, J. A.; Kratovac, S.; Kapoor, G. S.; O'Rourke, D. M.; Holland, E. C.; García-Verdugo, J. M.; Roy, N. S. und Boockvar, J. A.; Activated egfr signaling increases proliferation, survival, and migration and blocks neuronal differentiation in post-natal neural stem cells; *Journal of neuro-oncology*; 97 (3), 323–337, 2010; ISSN 1573-7373; doi:10.1007/s11060-009-0035-x. (Zitiert auf Seite 87)
- Balzac, F.; Retta, S. F.; Albin, A.; Melchiorri, A.; Koteliansky, V. E.; Geuna, M.; Silengo, L. und Tarone, G.; Expression of beta 1b integrin isoform in cho cells results in a dominant negative effect on cell adhesion and motility; *The Journal of cell biology*; 127 (2), 557–565, 1994; ISSN 0021-9525. (Zitiert auf Seite 87)
- Bampton, E. T. W.; Ma, C. H.; Tolkovsky, A. M. und Taylor, J. S. H.; Osteonectin is a schwann cell-secreted factor that promotes retinal ganglion cell survival and process outgrowth; *The European journal of neuroscience*; 21 (10), 2611–2623, 2005; ISSN 1460-9568; doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04128.x. (Zitiert auf Seite 66)
- Bank, L. M.; Bianchi, L. M.; Ebisu, F.; Lerman-Sinkoff, D.; Smiley, E. C.; Shen, Y.-C.; Ramamurthy, P.; Thompson, D. L.; Roth, T. M.; Beck, C. R.; Flynn, M.; Teller, R. S.; Feng, L.; Llewellyn, G. N.; Holmes, B.; Sharples, C.; Coutinho-Budd, J.; Linn, S. A.; Chervenak, A. P.; Dolan, D. F.; Benson, J.; Kanicki, A.; Martin, C. A.; Altschuler, R.; Koch, A. E.; Jewett, E. M.; Germiller, J. A. und Barald, K. F.; Macrophage migration inhibitory factor acts as a neurotrophin in the developing inner ear; *Development (Cambridge, England)*; 139 (24), 4666–4674, 2012; ISSN 0950-1991; doi: 10.1242/dev.066647. (Zitiert auf Seite 52)
- Bantscheff, M.; Lemeer, S.; Savitski, M. M. und Kuster, B.; Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present; *Analytical and bioanalytical chemistry*; 404 (4), 939–965, 2012; ISSN 1618-2650; doi: 10.1007/s00216-012-6203-4. (Zitiert auf Seite 11)
- Barbour, J.; Neuhaus, E. M.; Piechura, H.; Stoepel, N.; Mashukova, A.; Brunert, D.; Sitek, B.; Stühler, K.; Meyer, H. E.; Hatt, H. und Warscheid, B.; New insight into stimulus-induced plasticity of the olfactory epithelium in mus musculus by quantitative proteomics.; *Journal of proteome research*; 7 (4), 1594–1605, 2008; ISSN 1535-3893; doi:10.1021/pr7005796. (Zitiert auf den Seiten 12 und 13)
- Barderas, R.; Mendes, M.; Torres, S.; Bartolomé, R. A.; López-Lucendo, M.; Villar-Vázquez, R.; Peláez-García, A.; Fuente, E.; Bonilla, F. und Casal, J. I.; In-depth characterization of the secretome of colorectal cancer metastatic cells identifies key proteins in cell adhesion, migration, and invasion; *Molecular & cellular proteomics : MCP*; 12 (6), 1602–1620, 2013; ISSN 1535-9476; doi:10.1074/mcp.M112.022848. (Zitiert auf Seite 63)

- Barker, J. N.; Weisdorf, D. J.; DeFor, T. E.; Blazar, B. R.; McClave, P. B.; Miller, J. S.; Verfaillie, C. M. und Wagner, J. E.; Transplantation of 2 partially hla-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy; *Blood*; 105 (3), 1343–1347, 2005; ISSN 0006-4971; doi:10.1182/blood-2004-07-2717. (Zitiert auf Seite 10)
- Beattie, M. S.; Bresnahan, J. C.; Komon, J.; Tovar, C. A.; van Meter, M.; Anderson, D. K.; Faden, A. I.; Hsu, C. Y.; Noble, L. J.; Salzman, S. und Young, W.; Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat; *Experimental neurology*; 148 (2), 453–463, 1997; ISSN 0014-4886; doi:10.1006/exnr.1997.6695. (Zitiert auf Seite 4)
- Becerra, J. L.; Puckett, W. R.; Hiester, E. D.; Quencer, R. M.; Marcillo, A. E.; Post, M. J. und Bunge, R. P.; Mr-pathologic comparisons of wallerian degeneration in spinal cord injury; *AJNR. American journal of neuroradiology*; 16 (1), 125–133, 1995; ISSN 0195-6108. (Zitiert auf Seite 4)
- Becerra, S. P.; Palmer, I.; Kumar, A.; Steele, F.; Shiloach, J.; Notario, V. und Chader, G. J.; Overexpression of fetal human pigment epithelium-derived factor in escherichia coli. a functionally active neurotrophic factor; *The Journal of biological chemistry*; 268 (31), 23148–23156, 1993; ISSN 0021-9258. (Zitiert auf Seite 66)
- Bendtsen, J. D.; Kiemer, L.; Fausbøll, A. und Brunak, S.; Non-classical protein secretion in bacteria; *BMC microbiology*; 5, 58, 2005; ISSN 1471-2180; doi:10.1186/1471-2180-5-58. (Zitiert auf den Seiten 36 und 42)
- Benirschke, K.; Baergen, R. und Kaufmann, P.; *Pathology of the Human Placenta*; Springer Science+Business Media, Inc, New York and NY, 2006; ISBN 978-0-387-26738-8. (Zitiert auf Seite 7)
- Bondarenko, P. V.; Chelius, D. und Shaler, T. A.; Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Analytical chemistry*; 74 (18), 4741–4749, 2002; ISSN 0003-2700. (Zitiert auf Seite 17)
- Bradbury, E. J. und McMahon, S. B.; Spinal cord repair strategies: why do they work?; *Nature reviews. Neuroscience*; 7 (8), 644–653, 2006; ISSN 1471-003X; doi:10.1038/nrn1964. (Zitiert auf Seite 4)
- Bradford, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Analytical biochemistry*; 72, 248–254, 1976; ISSN 0003-2697. (Zitiert auf Seite 29)
- Brekken, R. A. und Sage, E. H.; Sparc, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication; *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*; 19 (8), 816–827, 2001; ISSN 0945-053X. (Zitiert auf Seite 66)

- Bruno, S.; Gunetti, M.; Gammaitoni, L.; Perissinotto, E.; Caione, L.; Sanavio, F.; Fagioli, F.; Aglietta, M. und Piacibello, W.; Fast but durable megakaryocyte repopulation and platelet production in nod/scid mice transplanted with ex-vivo expanded human cord blood cd34+ cells; *Stem cells (Dayton, Ohio)*; 22 (2), 135–143, 2004; ISSN 1549-4918; doi:10.1634/stemcells.22-2-135. (Zitiert auf Seite 10)
- Cajal, S. R.; Degeneration and regeneration of the nervous system; *New York: Oxford University Press*; - (1), 369–769, 1928. (Zitiert auf Seite 2)
- Can, A. und Karahuseyinoglu, S.; Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells; *Stem cells (Dayton, Ohio)*; 25 (11), 2886–2895, 2007; ISSN 1549-4918; doi:10.1634/stemcells.2007-0417. (Zitiert auf Seite 6)
- Cao, J.; Shen, C.; Zhang, J.; Yao, J.; Shen, H.; Liu, Y.; Lu, H. und Yang, P.; Comparison of alternative extraction methods for secretome profiling in human hepatocellular carcinoma cells; *Science China. Life sciences*; 54 (1), 34–38, 2011; ISSN 1869-1889; doi:10.1007/s11427-010-4122-1. (Zitiert auf Seite 18)
- Carraway, K. L.; Weber, J. L.; Unger, M. J.; Ledesma, J.; Yu, N.; Gassmann, M. und Lai, C.; Neuregulin-2, a new ligand of erbb3/erbb4-receptor tyrosine kinases; *Nature*; 387 (6632), 512–516, 1997; ISSN 0028-0836; doi:10.1038/387512a0. (Zitiert auf Seite 65)
- Carvalho, M. M.; Teixeira, F. G.; Reis, R. L.; Sousa, N. und Salgado, A. J.; Mesenchymal stem cells in the umbilical cord: phenotypic characterization, secretome and applications in central nervous system regenerative medicine; *Current stem cell research & therapy*; 6 (3), 221–228, 2011; ISSN 1574-888X. (Zitiert auf Seite 49)
- Chait, B. T. und Kent, S. B.; Weighing naked proteins: practical, high-accuracy mass measurement of peptides and proteins; *Science (New York, N.Y.)*; 257 (5078), 1885–1894, 1992; ISSN 0036-8075. (Zitiert auf Seite 12)
- Charwat, S.; Gyöngyösi, M.; Lang, I.; Graf, S.; Beran, G.; Hemetsberger, R.; Nyolczas, N.; Sochor, H. und Glogar, D.; Role of adult bone marrow stem cells in the repair of ischemic myocardium: current state of the art; *Experimental hematology*; 36 (6), 672–680, 2008; ISSN 0301-472X; doi:10.1016/j.exphem.2008.01.005. (Zitiert auf Seite 6)
- Chevallet, M.; Diemer, H.; van Dorssealer, A.; Villiers, C. und Rabilloud, T.; Toward a better analysis of secreted proteins: the example of the myeloid cells secretome; *Proteomics*; 7 (11), 1757–1770, 2007; ISSN 1615-9861; doi:10.1002/pmic.200601024. (Zitiert auf Seite 34)
- Choi, Y.-A.; Lim, J.; Kim, K. M.; Acharya, B.; Cho, J.-Y.; Bae, Y.-C.; Shin, H.-I.; Kim, S.-Y. und Park, E. K.; Secretome analysis of human bmscs and identification of smoc1 as an important ecm protein in osteoblast differentiation; *Journal of*

- proteome research*; 9 (6), 2946–2956, 2010; ISSN 1535-3907; doi:10.1021/pr901110q. (Zitiert auf Seite 67)
- Cooper, D. N. und Barondes, S. H.; Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism; *The Journal of cell biology*; 110 (5), 1681–1691, 1990; ISSN 0021-9525. (Zitiert auf Seite 20)
- Cox, J. und Mann, M.; Maxquant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification; *Nature biotechnology*; 26 (12), 1367–1372, 2008; ISSN 1546-1696; doi:10.1038/nbt.1511. (Zitiert auf den Seiten 35 und 54)
- Cox, J. und Mann, M.; Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology; *Annual review of biochemistry*; 80, 273–299, 2011; ISSN 1545-4509; doi:10.1146/annurev-biochem-061308-093216. (Zitiert auf Seite 17)
- Crabos, M.; Yamakado, T.; Heizmann, C. W.; Cerletti, N.; Bühler, F. R. und Erne, P.; The calcium binding protein tropomyosin in human platelets and cardiac tissue: elevation in hypertensive cardiac hypertrophy; *European journal of clinical investigation*; 21 (5), 472–478, 1991; ISSN 0014-2972. (Zitiert auf Seite 88)
- Csaszar, E.; Kirouac, D. C.; Yu, M.; Wang, W.; Qiao, W.; Cooke, M. P.; Boitano, A. E.; Ito, C. und Zandstra, P. W.; Rapid expansion of human hematopoietic stem cells by automated control of inhibitory feedback signaling; *Cell stem cell*; 10 (2), 218–229, 2012; ISSN 1875-9777; doi:10.1016/j.stem.2012.01.003. (Zitiert auf Seite 10)
- D’Alessandro, A.; Grazzini, G.; Giardina, B. und Zolla, L.; In silico analyses of proteomic data suggest a role for heat shock proteins in umbilical cord blood hematopoietic stem cells; *Stem cell reviews*, 2010a; ISSN 1558-6804; doi:10.1007/s12015-010-9180-z. (Zitiert auf Seite 18)
- D’Alessandro, A.; Liunbruno, G.; Grazzini, G.; Pupella, S.; Lombardini, L. und Zolla, L.; Umbilical cord blood stem cells: towards a proteomic approach; *Journal of proteomics*; 73 (3), 468–482, 2010b; ISSN 1876-7737; doi:10.1016/j.jprot.2009.06.009. (Zitiert auf den Seiten 18 und 103)
- David, S. und Aguayo, A. J.; Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats; *Science (New York, N.Y.)*; 214 (4523), 931–933, 1981; ISSN 0036-8075. (Zitiert auf Seite 2)
- Davies, S. J.; Goucher, D. R.; Doller, C. und Silver, J.; Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord; *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*; 19 (14), 5810–5822, 1999; ISSN 1529-2401. (Zitiert auf Seite 87)

- Delaney, C.; Heimfeld, S.; Brashem-Stein, C.; Voorhies, H.; Manger, R. L. und Bernstein, I. D.; Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution; *Nature medicine*; 16 (2), 232–236, 2010; ISSN 1546-170X; doi:10.1038/nm.2080. (Zitiert auf Seite 10)
- Di Naro, E.; Ghezzi, F.; Raio, L.; Franchi, M. und D’Addario, V.; Umbilical cord morphology and pregnancy outcome; *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*; 96 (2), 150–157, 2001; ISSN 0301-2115. (Zitiert auf Seite 7)
- Diehl, H. C.; Stühler, K.; Klein-Scory, S.; Volmer, M. W.; Schöneck, A.; Bieling, C.; Schmiegel, W.; Meyer, H. E. und Schwarte-Waldhoff, I.; A catalogue of proteins released by colorectal cancer cells in vitro as an alternative source for biomarker discovery; *Proteomics. Clinical applications*; 1 (1), 47–61, 2007; ISSN 1862-8346; doi: 10.1002/prca.200600491. (Zitiert auf den Seiten 15 und 18)
- Dimmer, E. C.; Huntley, R. P.; Alam-Faruque, Y.; Sawford, T.; O’Donovan, C.; Martin, M. J.; Bely, B.; Browne, P.; Mun Chan, W.; Eberhardt, R.; Gardner, M.; Laiho, K.; Legge, D.; Magrane, M.; Pichler, K.; Poggioli, D.; Sehra, H.; Auchincloss, A.; Axelsen, K.; Blatter, M.-C.; Boutet, E.; Braconi-Quintaje, S.; Breuza, L.; Bridge, A.; Coudert, E.; Estreicher, A.; Famiglietti, L.; Ferro-Rojas, S.; Feuermann, M.; Gos, A.; Gruaz-Gumowski, N.; Hinz, U.; Hulo, C.; James, J.; Jimenez, S.; Jungo, F.; Keller, G.; Lemercier, P.; Lieberherr, D.; Masson, P.; Moinat, M.; Pedruzzi, I.; Poux, S.; Rivoire, C.; Roechert, B.; Schneider, M.; Stutz, A.; Sundaram, S.; Tognolli, M.; Bougueleret, L.; Argoud-Puy, G.; Cusin, I.; Duek-Roggli, P.; Xenarios, I. und Apweiler, R.; The uniprot-go annotation database in 2011; *Nucleic acids research*; 40 (Database issue), D565–70, 2012; ISSN 1362-4962; doi:10.1093/nar/gkr1048. (Zitiert auf den Seiten 41, 42, 64 und 74)
- Ding, Z.; Burghoff, S.; Buchheiser, A.; Kögler, G. und Schrader, J.; Survival, integration and differentiation of unrestricted somatic stem cells (usscs) in the heart; *Cell transplantation*, 2012; ISSN 1555-3892; doi:10.3727/096368912X64046. (Zitiert auf Seite 8)
- Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D. und Horwitz, E.; Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement; *Cytotherapy*; 8 (4), 315–317, 2006; ISSN 1465-3249; doi:10.1080/14653240600855905. (Zitiert auf Seite 89)
- Doshi, B. M.; Hightower, L. E. und Lee, J.; Hspb1, actin filament dynamics, and aging cells; *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1197, 76–84, 2010; ISSN 1749-6632; doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05191.x. (Zitiert auf Seite 88)
- Douglas, D. J.; Linear quadrupoles in mass spectrometry; *Mass spectrometry reviews*; 28 (6), 937–960, 2009; ISSN 1098-2787; doi:10.1002/mas.20249. (Zitiert auf Seite 13)

- Emmink, B. L.; Verheem, A.; van Houdt, W. J.; Steller, E. J. A.; Govaert, K. M.; Pham, T. V.; Piersma, S. R.; Borel Rinkes, I. H. M.; Jimenez, C. R. und Kranenburg, O.; The secretome of colon cancer stem cells contains drug-metabolizing enzymes; *Journal of proteomics*; 91, 84–96, 2013; ISSN 1876-7737; doi:10.1016/j.jprot.2013.06.027. (Zitiert auf Seite 63)
- Eng, J. K.; McCormack, A. L. und Yates III, J. R.; An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database; *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*; 5 (11), 976–989, 1994; ISSN 1044-0305. (Zitiert auf Seite 15)
- Eppinga, R. D.; Li, Y.; Lin, J. L.-C. und Lin, J. J.-C.; Tropomyosin and caldesmon regulate cytokinesis speed and membrane stability during cell division; *Archives of biochemistry and biophysics*; 456 (2), 161–174, 2006; ISSN 0003-9861; doi:10.1016/j.abb.2006.06.015. (Zitiert auf Seite 88)
- Erices, A.; Conget, P. und Minguell, J. J.; Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood; *British journal of haematology*; 109 (1), 235–242, 2000; ISSN 1365-2141. (Zitiert auf Seite 7)
- Falk, J.; Julien, F.; Bechara, A.; Fiore, R.; Nawabi, H.; Zhou, H.; Hoyo-Becerra, C.; Bozon, M.; Rougon, G.; Grumet, M.; Püschel, A. W.; Sanes, J. R. und Castellani, V.; Dual functional activity of semaphorin 3b is required for positioning the anterior commissure; *Neuron*; 48 (1), 63–75, 2005; ISSN 0896-6273; doi:10.1016/j.neuron.2005.08.033. (Zitiert auf Seite 67)
- Fang, B.; Li, N.; Song, Y.; Li, J.; Zhao, R. C. und Ma, Y.; Cotransplantation of haploidentical mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells and to reduce the risk of graft failure in two children with severe aplastic anemia; *Pediatric transplantation*; 13 (4), 499–502, 2009; ISSN 1399-3046; doi:10.1111/j.1399-3046.2008.01002.x. (Zitiert auf Seite 6)
- Fenn, J. B.; Electrospray wings for molecular elephants (nobel lecture); *Angewandte Chemie (International ed. in English)*; 42 (33), 3871–3894, 2003; ISSN 1433-7851; doi:10.1002/anie.200300605. (Zitiert auf Seite 13)
- Fernández, M. N.; Improving the outcome of cord blood transplantation: use of mobilized hsc and other cells from third party donors; *British journal of haematology*; 147 (2), 161–176, 2009; ISSN 1365-2141; doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07766.x. (Zitiert auf Seite 10)
- Fleming, J. C.; Norenberg, M. D.; Ramsay, D. A.; Dekaban, G. A.; Marcillo, A. E.; Saenz, A. D.; Pasquale-Styles, M.; Dietrich, W. D. und Weaver, L. C.; The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury; *Brain : a journal of neurology*; 129 (Pt 12), 3249–3269, 2006; ISSN 1460-2156; doi:10.1093/brain/awl296. (Zitiert auf Seite 2)

- Fouad, K.; Schnell, L.; Bunge, M. B.; Schwab, M. E.; Liebscher, T. und Pearse, D. D.; Combining schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord; *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*; 25 (5), 1169–1178, 2005; ISSN 1529-2401; doi:10.1523/JNEUROSCI.3562-04.2005. (Zitiert auf Seite 5)
- Francki, A.; Bradshaw, A. D.; Bassuk, J. A.; Howe, C. C.; Couser, W. G. und Sage, E. H.; Sparc regulates the expression of collagen type i and transforming growth factor-beta1 in mesangial cells; *The Journal of biological chemistry*; 274 (45), 32145–32152, 1999; ISSN 0021-9258. (Zitiert auf Seite 66)
- Francki, A.; McClure, T. D.; Brekken, R. A.; Motamed, K.; Murri, C.; Wang, T. und Sage, E. H.; Sparc regulates tgf-beta1-dependent signaling in primary glomerular mesangial cells; *Journal of cellular biochemistry*; 91 (5), 915–925, 2004; ISSN 0730-2312; doi:10.1002/jcb.20008. (Zitiert auf Seite 66)
- Friedenstein, A. J.; Petrakova, K. V.; Kurolesova, A. I. und Frolova, G. P.; Heterotopic of bone marrow. analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues; *Transplantation*; 6 (2), 230–247, 1968; ISSN 0041-1337. (Zitiert auf Seite 6)
- Furnish, E. J.; Zhou, W.; Cunningham, C. C.; Kas, J. A. und Schmidt, C. E.; Gelsolin overexpression enhances neurite outgrowth in pc12 cells; *FEBS letters*; 508 (2), 282–286, 2001; ISSN 0014-5793. (Zitiert auf Seite 52)
- Ghodsizad, A.; Fahy, B. N.; Waclawczyk, S.; Liedtke, S.; Gonzalez Berjon, J. M.; Barrios, R.; Mehrabi, A.; Karck, M.; Ruhparwar, A. und Kögler, G.; Portal application of human unrestricted somatic stem cells to support hepatic regeneration after portal embolization and tumor surgery; *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)*; 58 (3), 255–261, 2012; ISSN 1538-943X; doi: 10.1097/MAT.0b013e31824cc922. (Zitiert auf den Seiten 8 und 9)
- Ghodsizad, A.; Niehaus, M.; Kögler, G.; Martin, U.; Wernet, P.; Bara, C.; Khaladj, N.; Loos, A.; Makoui, M.; Thiele, J.; Mengel, M.; Karck, M.; Klein, H. M.; Have-rich, A. und Ruhparwar, A.; Transplanted human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells improve left-ventricular function and prevent left-ventricular dilation and scar formation after acute myocardial infarction; *Heart (British Cardiac Society)*; 95 (1), 27–35, 2009; ISSN 1468-201X; doi:10.1136/hrt.2007.139329. (Zitiert auf den Seiten 8 und 9)
- Ghodsizad, A.; Ungerer, M. N.; Bordel, V.; Kallenbach, K.; Kögler, G.; Bruckner, B.; Niehaus, M.; Gregoric, I.; Karck, M. und Ruhparwar, A.; Transplanted human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells preserve high-energy reserves at the site of acute myocardial infarction; *Cytotherapy*; 13 (8), 956–961, 2011; ISSN 1465-3249; doi:10.3109/14653249.2011.563290. (Zitiert auf den Seiten 8 und 9)

- Gilles, C.; Bassuk, J. A.; Pulyaeva, H.; Sage, E. H.; Foidart, J. M. und Thompson, E. W.; Sparc/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines; *Cancer research*; 58 (23), 5529–5536, 1998; ISSN 0008-5472. (Zitiert auf Seite 66)
- Gluckman, E.; Broxmeyer, H. A.; Auerbach, A. D.; Friedman, H. S.; Douglas, G. W.; Devergie, A.; Esperou, H.; Thierry, D.; Socie, G. und Lehn, P.; Hematopoietic reconstitution in a patient with fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an hla-identical sibling; *The New England journal of medicine*; 321 (17), 1174–1178, 1989; ISSN 1533-4406; doi:10.1056/NEJM198910263211707. (Zitiert auf Seite 6)
- Gorba, T.; Bradoo, P.; Antonic, A.; Marvin, K.; Liu, D.-X.; Lobie, P. E.; Reymann, K. G.; Gluckman, P. D. und Sieg, F.; Neural regeneration protein is a novel chemoattractive and neuronal survival-promoting factor; *Experimental cell research*; 312 (16), 3060–3074, 2006; ISSN 0014-4827; doi:10.1016/j.yexcr.2006.06.020. (Zitiert auf den Seiten 52 und 66)
- Greschat, S.; Schira, J.; Küry, P.; Rosenbaum, C.; Souza Silva, M. A. d.; Kögler, G.; Wernet, P. und Müller, H. W.; Unrestricted somatic stem cells from human umbilical cord blood can be differentiated into neurons with a dopaminergic phenotype; *Stem cells and development*; 17 (2), 221–232, 2008; ISSN 1547-3287; doi:10.1089/scd.2007.0118. (Zitiert auf Seite 8)
- Grimpe, B. und Silver, J.; The extracellular matrix in axon regeneration; *Progress in brain research*; 137, 333–349, 2002; ISSN 0079-6123. (Zitiert auf Seite 4)
- Grossmann, J.; Roschitzki, B.; Panse, C.; Fortes, C.; Barkow-Oesterreicher, S.; Rütishauser, D. und Schlapbach, R.; Implementation and evaluation of relative and absolute quantification in shotgun proteomics with label-free methods; *Journal of proteomics*; 73 (9), 1740–1746, 2010; ISSN 1876-7737; doi:10.1016/j.jprot.2010.05.011. (Zitiert auf den Seiten 17, 28, 58 und 65)
- Gu, W.; Zhang, F.; Xue, Q.; Ma, Z.; Lu, P. und Yu, B.; Bone mesenchymal stromal cells stimulate neurite outgrowth of spinal neurons by secreting neurotrophic factors; *Neurological research*; 34 (2), 172–180, 2012; ISSN 0161-6412; doi:10.1179/1743132811Y.00000000068. (Zitiert auf Seite 49)
- Guo, Q.; Xie, J.; Chang, X.; Zhang, X. und Du, H.; Par-4 is a synaptic protein that regulates neurite outgrowth by altering calcium homeostasis and transcription factor ap-1 activation; *Brain research*; 903 (1-2), 13–25, 2001; ISSN 0006-8993. (Zitiert auf Seite 52)
- Hathout, Y.; Approaches to the study of the cell secretome; *Expert review of proteomics*; 4 (2), 239–248, 2007; ISSN 1744-8387; doi:10.1586/14789450.4.2.239. (Zitiert auf Seite 18)

- Heijne, G. v.; Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites; *European journal of biochemistry / FEBS*; 133 (1), 17–21, 1983; ISSN 0014-2956. (Zitiert auf Seite 19)
- Heijne, G. v.; Signal sequences. the limits of variation; *Journal of molecular biology*; 184 (1), 99–105, 1985; ISSN 1089-8638. (Zitiert auf Seite 19)
- Herron, L. R.; Hill, M.; Davey, F. und Gunn-Moore, F. J.; The intracellular interactions of the I1 family of cell adhesion molecules; *The Biochemical journal*; 419 (3), 519–531, 2009; ISSN 0264-6021; doi:10.1042/BJ20082284. (Zitiert auf Seite 87)
- Heukeshoven, J. und Dernick, R.; Improved silver staining procedure for fast staining in phastsystem development unit. i. staining of sodium dodecyl sulfate gels; *Electrophoresis*; 9 (1), 28–32, 1988; ISSN 0173-0835; doi:10.1002/elps.1150090106. (Zitiert auf Seite 30)
- Houenou, L. J.; D'Costa, A. P.; Li, L.; Turgeon, V. L.; Enyadike, C.; Alberdi, E. und Becerra, S. P.; Pigment epithelium-derived factor promotes the survival and differentiation of developing spinal motor neurons; *The Journal of comparative neurology*; 412 (3), 506–514, 1999; ISSN 0021-9967. (Zitiert auf den Seiten 52 und 66)
- Houenou, L. J.; Turner, P. L.; Li, L.; Oppenheim, R. W. und Festoff, B. W.; A serine protease inhibitor, protease nexin i, rescues motoneurons from naturally occurring and axotomy-induced cell death; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 92 (3), 895–899, 1995; ISSN 0027-8424. (Zitiert auf Seite 52)
- Huang, D. W.; Sherman, B. T. und Lempicki, R. A.; Systematic and integrative analysis of large gene lists using david bioinformatics resources; *Nature protocols*; 4 (1), 44–57, 2009; ISSN 1750-2799; doi:10.1038/nprot.2008.211. (Zitiert auf den Seiten 36 und 54)
- Huang, G.-P.; Pan, Z.-J.; Jia, B.-B.; Zheng, Q.; Xie, C.-G.; Gu, J.-H.; McNiece, I. K. und Wang, J.-F.; Ex vivo expansion and transplantation of hematopoietic stem/progenitor cells supported by mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood; *Cell transplantation*; 16 (6), 579–585, 2007; ISSN 1555-3892. (Zitiert auf Seite 10)
- Iwaniuk, K. M.; Schira, J.; Weinhold, S.; Jung, M.; Adjaye, J.; Müller, H. W.; Wernet, P. und Trompeter, H.-I.; Network-like impact of micrnas on neuronal lineage differentiation of unrestricted somatic stem cells from human cord blood; *Stem cells and development*; 20 (8), 1383–1394, 2011; ISSN 1547-3287; doi:10.1089/scd.2010.0341. (Zitiert auf Seite 8)
- Jensen, L. J.; Kuhn, M.; Stark, M.; Chaffron, S.; Creevey, C.; Muller, J.; Doerks, T.; Julien, P.; Roth, A.; Simonovic, M.; Bork, P. und Mering, C. v.; String 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms; *Nucleic acids*

- research*; 37 (Database issue), D412–6, 2009; ISSN 1362-4962; doi:10.1093/nar/gkn760. (Zitiert auf Seite 101)
- Jones, L. L.; Sajed, D. und Tuszynski, M. H.; Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of permissiveness and inhibition; *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*; 23 (28), 9276–9288, 2003; ISSN 1529-2401. (Zitiert auf Seite 64)
- Kanehisa, M.; Goto, S.; Sato, Y.; Furumichi, M. und Tanabe, M.; Kegg for integration and interpretation of large-scale molecular data sets; *Nucleic acids research*; 40 (Database issue), D109–14, 2012; ISSN 1362-4962; doi:10.1093/nar/gkr988. (Zitiert auf den Seiten 63 und 98)
- Kang, S.-W.; Shin, Y.-J.; Shim, Y.-J.; Jeong, S.-Y.; Park, I.-S. und Min, B.-H.; Clusterin interacts with sclip (scg10-like protein) and promotes neurite outgrowth of pc12 cells; *Experimental cell research*; 309 (2), 305–315, 2005; ISSN 0014-4827; doi:10.1016/j.yexcr.2005.06.012. (Zitiert auf Seite 52)
- Kappler, J.; Junghans, U.; Koops, A.; Stichel, C. C.; Hausser, H. J.; Kresse, H. und Müller, H. W.; Chondroitin/dermatan sulphate promotes the survival of neurons from rat embryonic neocortex; *The European journal of neuroscience*; 9 (2), 306–318, 1997; ISSN 1460-9568. (Zitiert auf Seite 27)
- Kelly, S. S.; Sola, C. B. S.; Lima, M. d. und Shpall, E.; Ex vivo expansion of cord blood; *Bone marrow transplantation*; 44 (10), 673–681, 2009; ISSN 1476-5365; doi:10.1038/bmt.2009.284. (Zitiert auf den Seiten 10, 92, 101 und 104)
- Kettenbach, A. N.; Rush, J. und Gerber, S. A.; Absolute quantification of protein and post-translational modification abundance with stable isotope-labeled synthetic peptides; *Nature protocols*; 6 (2), 175–186, 2011; ISSN 1750-2799; doi:10.1038/nprot.2010.196. (Zitiert auf Seite 17)
- Klapka, N. und Müller, H. W.; Collagen matrix in spinal cord injury; *Journal of neurotrauma*; 23 (3-4), 422–435, 2006; ISSN 1557-9042; doi:10.1089/neu.2006.23.422. (Zitiert auf den Seiten 4 und 5)
- Klose, J. und Kobalz, U.; Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome; *Electrophoresis*; 16 (6), 1034–1059, 1995; ISSN 0173-0835. (Zitiert auf Seite 30)
- Kluth, S. M.; Buchheiser, A.; Houben, A. P.; Geyh, S.; Krenz, T.; Radke, T. F.; Wiek, C.; Hanenberg, H.; Reinecke, P.; Wernet, P. und Kögler, G.; Dlk-1 as a marker to distinguish unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stromal cells in cord blood; *Stem cells and development*; 19 (10), 1471–1483, 2010; ISSN 1547-3287; doi:10.1089/scd.2010.0070. (Zitiert auf Seite 7)

- Kluth, S. M.; Radke, T. F. und Kögler, G.; Increased haematopoietic supportive function of ussc from umbilical cord blood compared to cb msc and possible role of dlk-1; *Stem cells international*; 2013, 985285, 2013; ISSN 1687-966X; doi: 10.1155/2013/985285. (Zitiert auf Seite 7)
- Koçak, H.; Oner-Iyidoğan, Y.; Gürdöl, F.; Koçak, T. und Esin, D.; The relation between serum mda and cystatin c levels in chronic spinal cord injury patients; *Clinical biochemistry*; 38 (11), 1034–1037, 2005; ISSN 0009-9120; doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.08.005. (Zitiert auf Seite 69)
- Kögler, G.; Callejas, J.; Hakenberg, P.; Enczmann, J.; Adams, O.; Däubener, W.; Krempe, C.; Göbel, U.; Somville, T. und Wernet, P.; Hematopoietic transplant potential of unrelated cord blood: critical issues; *Journal of hematotherapy*; 5 (2), 105–116, 1996; ISSN 1061-6128. (Zitiert auf Seite 25)
- Kögler, G.; Radke, T. F.; Lefort, A.; Sensken, S.; Fischer, J.; Sorg, R. V. und Wernet, P.; Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells; *Experimental hematology*; 33 (5), 573–583, 2005; ISSN 0301-472X; doi:10.1016/j.exphem.2005.01.012. (Zitiert auf den Seiten 7, 8, 9, 25, 65 und 89)
- Kögler, G.; Sensken, S.; Airey, J. A.; Trapp, T.; Müschen, M.; Feldhahn, N.; Liedtke, S.; Sorg, R. V.; Fischer, J.; Rosenbaum, C.; Greschat, S.; Knipper, A.; Bender, J.; Degistirici, O.; Gao, J.; Caplan, A. I.; Colletti, E. J.; Almeida-Porada, G.; Müller, H. W.; Zanjani, E. und Wernet, P.; A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential; *The Journal of experimental medicine*; 200 (2), 123–135, 2004; ISSN 0022-1007; doi:10.1084/jem.20040440. (Zitiert auf den Seiten 6, 7 und 26)
- Kögler, G.; Sensken, S. und Wernet, P.; Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood; *Experimental hematology*; 34 (11), 1589–1595, 2006; ISSN 0301-472X; doi:10.1016/j.exphem.2006.07.011. (Zitiert auf Seite 7)
- Kuang, X.-L.; Zhao, X.-M.; Xu, H.-F.; Shi, Y.-Y.; Deng, J.-B. und Sun, G.-T.; Spatio-temporal expression of a novel neuron-derived neurotrophic factor (ndnf) in mouse brains during development; *BMC neuroscience*; 11, 137, 2010; ISSN 1471-2202; doi:10.1186/1471-2202-11-137. (Zitiert auf den Seiten 52, 65 und 69)
- Kudo, Y.; Siriwardena, B. S. M. S.; Hatano, H.; Ogawa, I. und Takata, T.; Periostin: novel diagnostic and therapeutic target for cancer; *Histology and histopathology*; 22 (10), 1167–1174, 2007; ISSN 1699-5848. (Zitiert auf Seite 52)
- Lanza, R. P. (Herausgeber); *Essentials of stem cell biology*; Elsevier Acad. Press, Amsterdam u.a, 2009; ISBN 0-12-374729-5. (Zitiert auf den Seiten 5 und 6)

- Laughlin, M. J.; Eapen, M.; Rubinstein, P.; Wagner, J. E.; Zhang, M.-J.; Champlin, R. E.; Stevens, C.; Barker, J. N.; Gale, R. P.; Lazarus, H. M.; Marks, D. I.; van Rood, J. J.; Scaradavou, A. und Horowitz, M. M.; Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia; *The New England journal of medicine*; 351 (22), 2265–2275, 2004; ISSN 1533-4406; doi:10.1056/NEJMoa041276. (Zitiert auf Seite 9)
- Le Blanc, K. und Pittenger, M.; Mesenchymal stem cells: progress toward promise; *Cytotherapy*; 7 (1), 36–45, 2005; ISSN 1465-3249; doi:10.1080/14653240510018118. (Zitiert auf Seite 6)
- Lee, H. K.; Seo, I. A.; Suh, D. J. und Park, H. T.; Nidogen plays a role in the regenerative axon growth of adult sensory neurons through schwann cells; *Journal of Korean medical science*; 24 (4), 654–659, 2009; ISSN 1598-6357; doi: 10.3346/jkms.2009.24.4.654. (Zitiert auf Seite 52)
- Lewis, J. und Trobaugh, F.; Haematopoietic stem cells; *Nature*; 204, 589–590, 1964; ISSN 0028-0836. (Zitiert auf Seite 6)
- Li, Z.; Adams, R. M.; Chourey, K.; Hurst, G. B.; Hettich, R. L. und Pan, C.; Systematic comparison of label-free, metabolic labeling, and isobaric chemical labeling for quantitative proteomics on Itq orbitrap velos; *Journal of proteome research*; 11 (3), 1582–1590, 2012; ISSN 1535-3907; doi:10.1021/pr200748h. (Zitiert auf Seite 17)
- Liedtke, S.; Buchheiser, A.; Bosch, J.; Bosse, F.; Kruse, F.; Zhao, X.; Santourlidis, S. und Kögler, G.; The hox code as a "biological fingerprint" to distinguish functionally distinct stem cell populations derived from cord blood; *Stem cell research*; 5 (1), 40–50, 2010; ISSN 1876-7753; doi:10.1016/j.scr.2010.03.004. (Zitiert auf Seite 7)
- Lima, M. d.; McMannis, J.; Gee, A.; Komanduri, K.; Couriel, D.; Andersson, B. S.; Hosing, C.; Khouri, I.; Jones, R.; Champlin, R.; Karandish, S.; Sadeghi, T.; Peled, T.; Grynspan, F.; Daniely, Y.; Nagler, A. und Shpall, E. J.; Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase i/ii clinical trial; *Bone marrow transplantation*; 41 (9), 771–778, 2008; ISSN 1476-5365; doi:10.1038/sj.bmt.1705979. (Zitiert auf Seite 10)
- Liu, C.-H. und Hwang, S.-M.; Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood; *Cytokine*; 32 (6), 270–279, 2005; ISSN 1043-4666; doi:10.1016/j.cyto.2005.11.003. (Zitiert auf Seite 67)
- Liu, F.; Lu, J.; Fan, H.-H.; Wang, Z.-Q.; Cui, S.-J.; Zhang, G.-A.; Chi, M.; Zhang, X.; Yang, P.-Y.; Chen, Z. und Han, Z.-G.; Insights into human cd34+ hematopoietic stem/progenitor cells through a systematically proteomic survey coupled with transcriptome; *Proteomics*; 6 (9), 2673–2692, 2006; ISSN 1615-9861; doi:10.1002/pmic.200500032. (Zitiert auf Seite 18)

- Liu, H.; Sadygov, R. G. und Yates, J. R.; A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics; *Analytical chemistry*; 76 (14), 4193–4201, 2004; ISSN 0003-2700; doi:10.1021/ac0498563. (Zitiert auf Seite 17)
- López-Vales, R.; Ghasemlou, N.; Redensek, A.; Kerr, B. J.; Barbayianni, E.; Antonopoulou, G.; Baskakis, C.; Rathore, K. I.; Constantinou-Kokotou, V.; Stephens, D.; Shimizu, T.; Dennis, E. A.; Kokotos, G. und David, S.; Phospholipase a2 superfamily members play divergent roles after spinal cord injury; *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*; 25 (12), 4240–4252, 2011; ISSN 0892-6638; doi:10.1096/fj.11-183186. (Zitiert auf den Seiten 87 und 88)
- Lottspeich, F. und Engels, J. W.; *Bioanalytik*; Elsevier Spektrum Akad. Verl., München; 2. Aufl. Auflage, 2006; ISBN 9783827415202. (Zitiert auf Seite 12)
- Luber, C. A.; Cox, J.; Lauterbach, H.; Fancke, B.; Selbach, M.; Tschopp, J.; Akira, S.; Wiegand, M.; Hochrein, H.; O’Keeffe, M. und Mann, M.; Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells; *Immunity*; 32 (2), 279–289, 2010; ISSN 1097-4180; doi:10.1016/j.immuni.2010.01.013. (Zitiert auf Seite 35)
- Ma, C. H. E.; Palmer, A. und Taylor, J. S. H.; Synergistic effects of osteonectin and ngf in promoting survival and neurite outgrowth of superior cervical ganglion neurons; *Brain research*; 1289, 1–13, 2009; ISSN 0006-8993; doi:10.1016/j.brainres.2009.06.093. (Zitiert auf Seite 66)
- Makarov, A.; Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis; *Analytical chemistry*; 72 (6), 1156–1162, 2000; ISSN 0003-2700. (Zitiert auf Seite 13)
- Malmström, J.; Beck, M.; Schmidt, A.; Lange, V.; Deutsch, E. W. und Aebersold, R.; Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen leptospira interrogans; *Nature*; 460 (7256), 762–765, 2009; ISSN 0028-0836; doi:10.1038/nature08184. (Zitiert auf Seite 17)
- Marsick, B. M.; San Miguel-Ruiz, J. E. und Letourneau, P. C.; Activation of ezrin/radixin/moesin mediates attractive growth cone guidance through regulation of growth cone actin and adhesion receptors; *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*; 32 (1), 282–296, 2012; ISSN 1529-2401; doi:10.1523/JNEUROSCI.4794-11.2012. (Zitiert auf Seite 52)
- Martin, S. F.; Falkenberg, H.; Dyrland, T. F.; Khoudoli, G. A.; Mageean, C. J. und Linding, R.; Proteinchallenge: crowd sourcing in proteomics analysis and software development; *Journal of proteomics*; 88, 41–46, 2013; ISSN 1876-7737; doi:10.1016/j.jprot.2012.11.014. (Zitiert auf Seite 15)

- Masson, S.; Harrison, D. J.; Plevris, J. N. und Newsome, P. N.; Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: a critical review; *Stem cells (Dayton, Ohio)*; 22 (6), 897–907, 2004; ISSN 1549-4918; doi:10.1634/stemcells.22-6-897. (Zitiert auf Seite 6)
- Merl, J.; Ueffing, M.; Hauck, S. M. und Toerne, C. v.; Direct comparison of ms-based label-free and silac quantitative proteome profiling strategies in primary retinal müller cells; *Proteomics*; 12 (12), 1902–1911, 2012; ISSN 1615-9861; doi:10.1002/pmic.201100549. (Zitiert auf Seite 17)
- Michalski, A.; Damoc, E.; Lange, O.; Denisov, E.; Nolting, D.; Müller, M.; Viner, R.; Schwartz, J.; Remes, P.; Belford, M.; Dunyach, J.-J.; Cox, J.; Horning, S.; Mann, M. und Makarov, A.; Ultra high resolution linear ion trap orbitrap mass spectrometer (orbitrap elite) facilitates top down lc ms/ms and versatile peptide fragmentation modes; *Molecular & cellular proteomics : MCP*; 11 (3), O111.013698, 2012; ISSN 1535-9476; doi:10.1074/mcp.O111.013698. (Zitiert auf Seite 13)
- Mortazavi, M. M.; Verma, K.; Tubbs, R. S. und Theodore, N.; Cellular and paracellular transplants for spinal cord injury: a review of the literature; *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*; 27 (2), 237–243, 2011; ISSN 1433-0350; doi:10.1007/s00381-010-1312-x. (Zitiert auf Seite 4)
- Murphy-Ullrich, J. E.; The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state?; *The Journal of clinical investigation*; 107 (7), 785–790, 2001; ISSN 0021-9738; doi:10.1172/JCI12609. (Zitiert auf Seite 66)
- Mustafa, S. A.; Hoheisel, J. D. und Alhamdani, M. S. S.; Secretome profiling with antibody microarrays; *Molecular bioSystems*; 7 (6), 1795–1801, 2011; ISSN 1742-2051; doi:10.1039/c1mb05071k. (Zitiert auf Seite 18)
- Nahnsen, S.; Bielow, C.; Reinert, K. und Kohlbacher, O.; Tools for label-free peptide quantification; *Molecular & cellular proteomics : MCP*; 12 (3), 549–556, 2013; ISSN 1535-9476; doi:10.1074/mcp.R112.025163. (Zitiert auf Seite 17)
- National Spinal Cord Injury Statistical Center; <https://www.nscisc.uab.edu/>. (Zitiert auf Seite 2)
- Neidhardt, J.; Fehr, S.; Kutsche, M.; Löhler, J. und Schachner, M.; Tenascin-n: characterization of a novel member of the tenascin family that mediates neurite repulsion from hippocampal explants; *Molecular and cellular neurosciences*; 23 (2), 193–209, 2003; ISSN 1095-9327. (Zitiert auf Seite 52)
- Neilson, K. A.; Ali, N. A.; Muralidharan, S.; Mirzaei, M.; Mariani, M.; Assadourian, G.; Lee, A.; van Sluyter, S. C. und Haynes, P. A.; Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry; *Proteomics*; 11 (4), 535–553, 2011; ISSN 1615-9861; doi:10.1002/pmic.201000553. (Zitiert auf Seite 17)

- Ng, J. und Luo, L.; Rho gtpases regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathways; *Neuron*; 44 (5), 779–793, 2004; ISSN 0896-6273; doi: 10.1016/j.neuron.2004.11.014. (Zitiert auf Seite 65)
- Nickel, W.; The mystery of nonclassical protein secretion. a current view on cargo proteins and potential export routes; *European journal of biochemistry / FEBS*; 270 (10), 2109–2119, 2003; ISSN 0014-2956. (Zitiert auf den Seiten 19 und 20)
- Nishimura, T.; Fukata, Y.; Kato, K.; Yamaguchi, T.; Matsuura, Y.; Kamiguchi, H. und Kaibuchi, K.; Crmp-2 regulates polarized numb-mediated endocytosis for axon growth; *Nature cell biology*; 5 (9), 819–826, 2003; ISSN 1465-7392; doi:10.1038/ncb1039. (Zitiert auf Seite 65)
- Ong, S.-E.; Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Kristensen, D. B.; Steen, H.; Pandey, A. und Mann, M.; Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, silac, as a simple and accurate approach to expression proteomics.; *Molecular & cellular proteomics : MCP*; 1 (5), 376–386, 2002; ISSN 1535-9476. (Zitiert auf Seite 16)
- Osuka, K.; Watanabe, Y.; Usuda, N.; Atsuzawa, K.; Yasuda, M.; Aoshima, C.; Wakabayashi, T. und Takayasu, M.; Activation of stat1 in neurons following spinal cord injury in mice; *Neurochemical research*; 36 (12), 2236–2243, 2011; ISSN 1573-6903; doi:10.1007/s11064-011-0547-6. (Zitiert auf Seite 88)
- Palm, D. E.; Knuckey, N. W.; Primiano, M. J.; Spangenberg, A. G. und Johanson, C. E.; Cystatin c, a protease inhibitor, in degenerating rat hippocampal neurons following transient forebrain ischemia; *Brain research*; 691 (1-2), 1–8, 1995; ISSN 0006-8993. (Zitiert auf Seite 69)
- Perkins, D. N.; Pappin, D. J.; Creasy, D. M. und Cottrell, J. S.; Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data; *Electrophoresis*; 20 (18), 3551–3567, 1999; ISSN 0173-0835; doi:10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2. (Zitiert auf den Seiten 14 und 15)
- Petersen, T. N.; Brunak, S.; Heijne, G. v. und Nielsen, H.; Signalp 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions; *Nature methods*; 8 (10), 785–786, 2011; ISSN 1548-7105; doi:10.1038/nmeth.1701. (Zitiert auf den Seiten 36 und 42)
- Plant, G. W.; Bates, M. L. und Bunge, M. B.; Inhibitory proteoglycan immunoreactivity is higher at the caudal than the rostral schwann cell graft-transected spinal cord interface; *Molecular and cellular neurosciences*; 17 (3), 471–487, 2001; ISSN 1095-9327; doi:10.1006/mcne.2000.0948. (Zitiert auf Seite 87)
- Potian, J. A.; Aviv, H.; Ponzio, N. M.; Harrison, J. S. und Rameshwar, P.; Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens; *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*; 171 (7), 3426–3434, 2003; ISSN 0022-1767. (Zitiert auf Seite 67)

- Qiu, L.; Meagher, R.; Welhausen, S.; Heye, M.; Brown, R. und Herzig, R. H.; Ex vivo expansion of cd34+ umbilical cord blood cells in a defined serum-free medium (qbsf-60) with early effect cytokines; *Journal of hematotherapy & stem cell research*; 8 (6), 609–618, 1999; ISSN 1525-8165. (Zitiert auf Seite 10)
- Ragnarsson, K. T.; Functional electrical stimulation after spinal cord injury: current use, therapeutic effects and future directions; *Spinal cord*; 46 (4), 255–274, 2008; ISSN 1362-4393; doi:10.1038/sj.sc.3102091. (Zitiert auf Seite 5)
- Raines, E. W.; Lane, T. F.; Iruela-Arispe, M. L.; Ross, R. und Sage, E. H.; The extracellular glycoprotein sparc interacts with platelet-derived growth factor (pdgf)-ab and -bb and inhibits the binding of pdgf to its receptors; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 89 (4), 1281–1285, 1992; ISSN 0027-8424. (Zitiert auf Seite 66)
- Raio, L.; Ghezzi, F.; Di Naro, E.; Gomez, R.; Franchi, M.; Mazor, M. und Brühwiler, H.; Sonographic measurement of the umbilical cord and fetal anthropometric parameters; *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*; 83 (2), 131–135, 1999; ISSN 0301-2115. (Zitiert auf Seite 7)
- Rankin, S. L.; Guy, C. S. und Mearow, K. M.; Neurite outgrowth is enhanced by laminin-mediated down-regulation of the low affinity neurotrophin receptor, p75ntr; *Journal of neurochemistry*; 107 (3), 799–813, 2008; ISSN 0022-3042; doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05663.x. (Zitiert auf Seite 52)
- Reidegeld, K. A.; Eisenacher, M.; Kohl, M.; Chamrad, D.; Körting, G.; Blüggel, M.; Meyer, H. E. und Stephan, C.; An easy-to-use decoy database builder software tool, implementing different decoy strategies for false discovery rate calculation in automated ms/ms protein identifications; *Proteomics*; 8 (6), 1129–1137, 2008; ISSN 1615-9861; doi:10.1002/pmic.200701073. (Zitiert auf Seite 15)
- Resta, R. und Thompson, L. F.; T cell signalling through cd73; *Cellular signalling*; 9 (2), 131–139, 1997; ISSN 0898-6568. (Zitiert auf Seite 89)
- Rivlin, A. S. und Tator, C. H.; Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat; *Surgical neurology*; 10 (1), 38–43, 1978; ISSN 0090-3019. (Zitiert auf Seite 4)
- Rocha, V. und Gluckman, E.; Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells; *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*; 12 (1 Suppl 1), 34–41, 2006; ISSN 1083-8791; doi:10.1016/j.bbmt.2005.09.006. (Zitiert auf Seite 9)
- Roepstorff, P. und Fohlman, J.; Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides; *Biomedical mass spectrometry*; 11 (11), 601, 1984; ISSN 0306-042X; doi:10.1002/bms.1200111109. (Zitiert auf Seite 14)

- Ross, P. L.; Huang, Y. N.; Marchese, J. N.; Williamson, B.; Parker, K.; Hattan, S.; Khainovski, N.; Pillai, S.; Dey, S.; Daniels, S.; Purkayastha, S.; Juhasz, P.; Martin, S.; Bartlett-Jones, M.; He, F.; Jacobson, A. und Pappin, D. J.; Multiplexed protein quantitation in *saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents; *Molecular & cellular proteomics : MCP*; 3 (12), 1154–1169, 2004; ISSN 1535-9476; doi:10.1074/mcp.M400129-MCP200. (Zitiert auf Seite 16)
- Rubartelli, A.; Cozzolino, F.; Talio, M. und Sitia, R.; A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence; *The EMBO journal*; 9 (5), 1503–1510, 1990; ISSN 0261-4189. (Zitiert auf Seite 20)
- Ryborg, A. K.; Deleuran, B.; Thestrup-Pedersen, K. und Kragballe, K.; Lysophosphatidylcholine: a chemoattractant to human T lymphocytes; *Archives of dermatological research*; 286 (8), 462–465, 1994; ISSN 0340-3696. (Zitiert auf Seite 87)
- Salim, C.; Boxberg, Y. V.; Alterio, J.; Féréol, S. und Nothias, F.; The giant protein ahnak involved in morphogenesis and laminin substrate adhesion of myelinating schwann cells; *Glia*; 57 (5), 535–549, 2009; ISSN 0894-1491; doi:10.1002/glia.20782. (Zitiert auf Seite 88)
- Sasaki, T.; Göhring, W.; Mann, K.; Maurer, P.; Hohenester, E.; Knäuper, V.; Murphy, G. und Timpl, R.; Limited cleavage of extracellular matrix protein bm-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens; *The Journal of biological chemistry*; 272 (14), 9237–9243, 1997; ISSN 0021-9258. (Zitiert auf Seite 66)
- Scheele, G. A.; Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins; *The Journal of biological chemistry*; 250 (14), 5375–5385, 1975; ISSN 0021-9258. (Zitiert auf Seite 18)
- Schira, J.; Gasis, M.; Estrada, V.; Hendricks, M.; Schmitz, C.; Trapp, T.; Kruse, F.; Kögler, G.; Wernet, P.; Hartung, H.-P. und Müller, H. W.; Significant clinical, neuropathological and behavioural recovery from acute spinal cord trauma by transplantation of a well-defined somatic stem cell from human umbilical cord blood; *Brain : a journal of neurology*; 135 (Pt 2), 431–446, 2012; ISSN 1460-2156; doi:10.1093/brain/awr222. (Zitiert auf den Seiten II, III, 5, 8, 9, 21, 29, 37, 49, 54, 60, 61, 64, 71, 89, 91 und XIII)
- Schmalfeldt, M.; Bandtlow, C. E.; Dours-Zimmermann, M. T.; Winterhalter, K. H. und Zimmermann, D. R.; Brain derived versican v2 is a potent inhibitor of axonal growth; *Journal of cell science*; 113 (Pt 5), 807–816, 2000; ISSN 0021-9533. (Zitiert auf Seite 87)
- Schmidt, C.; Lenz, C.; Grote, M.; Lührmann, R. und Urlaub, H.; Determination of protein stoichiometry within protein complexes using absolute quantification and multiple reaction monitoring; *Analytical chemistry*; 82 (7), 2784–2796, 2010; ISSN 1520-6882; doi:10.1021/ac902710k. (Zitiert auf Seite 17)

- Scigelova, M. und Makarov, A.; Orbitrap mass analyzer—overview and applications in proteomics; *Proteomics*; 6 Suppl 2, 16–21, 2006; ISSN 1615-9861; doi:10.1002/pmic.200600528. (Zitiert auf den Seiten 13 und 14)
- Shyu, W.-C.; Liu, D. D.; Lin, S.-Z.; Li, W.-W.; Su, C.-Y.; Chang, Y.-C.; Wang, H.-J.; Wang, H.-W.; Tsai, C.-H. und Li, H.; Implantation of olfactory ensheathing cells promotes neuroplasticity in murine models of stroke; *The Journal of clinical investigation*; 118 (7), 2482–2495, 2008; ISSN 0021-9738; doi:10.1172/JCI34363. (Zitiert auf Seite 52)
- Silva, J. C.; Gorenstein, M. V.; Li, G.-Z.; Vissers, J. P. C. und Geromanos, S. J.; Absolute quantification of proteins by lcms: a virtue of parallel ms acquisition; *Molecular & cellular proteomics : MCP*; 5 (1), 144–156, 2006; ISSN 1535-9476; doi:10.1074/mcp.M500230-MCP200. (Zitiert auf Seite 17)
- Sitek, B.; Lüttges, J.; Marcus, K.; Klöppel, G.; Schmiegel, W.; Meyer, H. E.; Hahn, S. A. und Stühler, K.; Application of fluorescence difference gel electrophoresis saturation labelling for the analysis of microdissected precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma; *Proteomics*; 5 (10), 2665–2679, 2005; ISSN 1615-9861; doi:10.1002/pmic.200401298. (Zitiert auf Seite 15)
- Sitek, B.; Waldera-Lupa, D. M.; Poschmann, G.; Meyer, H. E. und Stühler, K.; Application of label-free proteomics for differential analysis of lung carcinoma cell line a549; *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*; 893, 241–248, 2012; ISSN 1940-6029; doi:10.1007/978-1-61779-885-6_16. (Zitiert auf Seite 17)
- Skalnikova, H.; Motlik, J.; Gadher, S. J. und Kovarova, H.; Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines; *Proteomics*; 11 (4), 691–708, 2011; ISSN 1615-9861; doi:10.1002/pmic.201000402. (Zitiert auf den Seiten 18 und 67)
- Skaper, S. D.; Neuronal growth-promoting and inhibitory cues in neuroprotection and neuroregeneration; *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*; 846, 13–22, 2012; ISSN 1940-6029; doi:10.1007/978-1-61779-536-7_2. (Zitiert auf Seite 4)
- Sloane, B. F.; Moin, K.; Krepela, E. und Rozhin, J.; Cathepsin b and its endogenous inhibitors: the role in tumor malignancy; *Cancer metastasis reviews*; 9 (4), 333–352, 1990; ISSN 0167-7659. (Zitiert auf Seite 69)
- Soeda, S.; Koyanagi, S.; Kuramoto, Y.; Kimura, M.; Oda, M.; Kozako, T.; Hayashida, S. und Shimeno, H.; Anti-apoptotic roles of plasminogen activator inhibitor-1 as a neurotrophic factor in the central nervous system; *Thrombosis and haemostasis*; 100 (6), 1014–1020, 2008; ISSN 0340-6245. (Zitiert auf Seite 52)
- Sporn, M. B.; Roberts, A. B.; Wakefield, L. M. und Assoian, R. K.; Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure; *Science (New York, N.Y.)*; 233 (4763), 532–534, 1986; ISSN 0036-8075. (Zitiert auf Seite 65)

- Stichel, C. C. und Müller, H. W.; Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic central nervous system injury; *Progress in neurobiology*; 56 (2), 119–148, 1998; ISSN 0301-0082. (Zitiert auf Seite 4)
- Stokols, S. und Tuszynski, M. H.; The fabrication and characterization of linearly oriented nerve guidance scaffolds for spinal cord injury; *Biomaterials*; 25 (27), 5839–5846, 2004; ISSN 0142-9612; doi:10.1016/j.biomaterials.2004.01.041. (Zitiert auf Seite 5)
- Stratikos, E.; Alberdi, E.; Gettins, P. G. und Becerra, S. P.; Recombinant human pigment epithelium-derived factor (pedf): characterization of pedf overexpressed and secreted by eukaryotic cells; *Protein science : a publication of the Protein Society*; 5 (12), 2575–2582, 1996; ISSN 0961-8368; doi:10.1002/pro.5560051220. (Zitiert auf Seite 66)
- Sze, S. K.; Kleijn, D. P. V. d.; Lai, R. C.; Khia Way Tan, E.; Zhao, H.; Yeo, K. S.; Low, T. Y.; Lian, Q.; Lee, C. N.; Mitchell, W.; El Oakley, R. M. und Lim, S.-K.; Elucidating the secretion proteome of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells; *Molecular & cellular proteomics : MCP*; 6 (10), 1680–1689, 2007; ISSN 1535-9476; doi:10.1074/mcp.M600393-MCP200. (Zitiert auf Seite 67)
- Tang, X.; Davies, J. E. und Davies, S. J. A.; Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of ng2, neurocan, phosphacan, brevican, versican v2, and tenascin-c during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue; *Journal of neuroscience research*; 71 (3), 427–444, 2003; ISSN 0360-4012; doi:10.1002/jnr.10523. (Zitiert auf Seite 87)
- Tannemaat, M. R.; Korecka, J.; Ehlert, E. M. E.; Mason, M. R. J.; van Duinen, S. G.; Boer, G. J.; Malessy, M. J. A. und Verhaagen, J.; Human neuroma contains increased levels of semaphorin 3a, which surrounds nerve fibers and reduces neurite extension in vitro; *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*; 27 (52), 14260–14264, 2007; ISSN 1529-2401; doi:10.1523/JNEUROSCI.4571-07.2007. (Zitiert auf den Seiten 50 und 67)
- Tao, W.; Wang, M.; Voss, E. D.; Cocklin, R. R.; Smith, J. A.; Cooper, S. H. und Broxmeyer, H. E.; Comparative proteomic analysis of human cd34+ stem/progenitor cells and mature cd15+ myeloid cells; *Stem cells (Dayton, Ohio)*; 22 (6), 1003–1014, 2004; ISSN 1549-4918; doi:10.1634/stemcells.22-6-1003. (Zitiert auf Seite 18)
- Taupin, P.; Ray, J.; Fischer, W. H.; Suhr, S. T.; Hakansson, K.; Grubb, A. und Gage, F. H.; Fgf-2-responsive neural stem cell proliferation requires ccg, a novel autocrine/paracrine cofactor; *Neuron*; 28 (2), 385–397, 2000; ISSN 0896-6273. (Zitiert auf Seite 69)
- Tetzlaff, W.; Okon, E. B.; Karimi-Abdolrezaee, S.; Hill, C. E.; Sparling, J. S.; Plemel, J. R.; Plunet, W. T.; Tsai, E. C.; Baptiste, D.; Smithson, L. J.; Kawaja, M. D.; Fehlings, M. G. und Kwon, B. K.; A systematic review of cellular transplantation therapies

- for spinal cord injury; *Journal of neurotrauma*; 28 (8), 1611–1682, 2011; ISSN 1557-9042; doi:10.1089/neu.2009.1177. (Zitiert auf Seite 5)
- Thompson, A.; Schäfer, J.; Kuhn, K.; Kienle, S.; Schwarz, J.; Schmidt, G.; Neumann, T.; Johnstone, R.; Mohammed, A. K. A. und Hamon, C.; Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by ms/ms; *Analytical chemistry*; 75 (8), 1895–1904, 2003; ISSN 0003-2700. (Zitiert auf Seite 16)
- Thomson, J. A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.; Marshall, V. S. und Jones, J. M.; Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts; *Science (New York, N.Y.)*; 282 (5391), 1145–1147, 1998; ISSN 0036-8075. (Zitiert auf Seite 5)
- Thuret, S.; Moon, L. D. F. und Gage, F. H.; Therapeutic interventions after spinal cord injury; *Nature reviews. Neuroscience*; 7 (8), 628–643, 2006; ISSN 1471-003X; doi:10.1038/nrn1955. (Zitiert auf den Seiten 3 und 4)
- Trapp, T.; Kögler, G.; El-Khattouti, A.; Sorg, R. V.; Besselmann, M.; Föcking, M.; Bürhle, C. P.; Trompeter, I.; Fischer, J. C. und Wernet, P.; Hepatocyte growth factor/c-met axis-mediated tropism of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells for neuronal injury; *The Journal of biological chemistry*; 283 (47), 32244–32253, 2008; ISSN 0021-9258; doi:10.1074/jbc.M800862200. (Zitiert auf Seite 9)
- Trompeter, H.-I.; Abbad, H.; Iwaniuk, K. M.; Hafner, M.; Renwick, N.; Tuschl, T.; Schira, J.; Müller, H. W. und Wernet, P.; Micrnas mir-17, mir-20a, and mir-106b act in concert to modulate e2f activity on cell cycle arrest during neuronal lineage differentiation of ussc; *PloS one*; 6 (1), e16138, 2011; ISSN 1932-6203; doi: 10.1371/journal.pone.0016138. (Zitiert auf Seite 8)
- Uniprot; Update on activities at the universal protein resource (uniprot) in 2013: The uniprot consortium; *Nucleic acids research*; 41 (Database issue), D43–7, 2013; ISSN 1362-4962; doi:10.1093/nar/gks1068. (Zitiert auf den Seiten 4, 95 und 98)
- U.S. Department of Health and Human Services; <http://www.clinicaltrials.gov>: Clinicaltrials.gov is a web-based resource that provides patients, their family members, health care professionals, researchers, and the public with easy access to information on publicly and privately supported clinical studies on a wide range of diseases and conditions. (Zitiert auf den Seiten 8 und 10)
- van Damme, P.; van Hoecke, A.; Lambrechts, D.; Vanacker, P.; Bogaert, E.; van Swieten, J.; Carmeliet, P.; van Den Bosch, L. und Robberecht, W.; Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival; *The Journal of cell biology*; 181 (1), 37–41, 2008; ISSN 0021-9525; doi:10.1083/jcb.200712039. (Zitiert auf Seite 52)

- van den Berk, L. C. J.; Roelofs, H.; Huijs, T.; Siebers-Vermeulen, K. G. C.; Raymakers, R. A.; Kögler, G.; Figdor, C. G. und Torensma, R.; Cord blood mesenchymal stem cells propel human dendritic cells to an intermediate maturation state and boost interleukin-12 production by mature dendritic cells; *Immunology*; 128 (4), 564–572, 2009; ISSN 1365-2567; doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03142.x. (Zitiert auf Seite 7)
- van Neerven, S. G. A.; Pannaye, P.; Bozkurt, A.; van Nieuwenhoven, F.; Joosten, E.; Hermans, E.; Taccola, G. und Deumens, R.; Schwann cell migration and neurite outgrowth are influenced by media conditioned by epineurial fibroblasts; *Neuroscience*; 252, 144–153, 2013; ISSN 0306-4522; doi:10.1016/j.neuroscience.2013.08.009. (Zitiert auf Seite 50)
- Volmer, M. W.; Stühler, K.; Zapatka, M.; Schöneck, A.; Klein-Scory, S.; Schmiegel, W.; Meyer, H. E. und Schwarte-Waldhoff, I.; Differential proteome analysis of conditioned media to detect smad4 regulated secreted biomarkers in colon cancer; *Proteomics*; 5 (10), 2587–2601, 2005; ISSN 1615-9861; doi:10.1002/pmhc.200401188. (Zitiert auf Seite 18)
- Wagner, J. E. und Gluckman, E.; Umbilical cord blood transplantation: the first 20 years; *Seminars in hematology*; 47 (1), 3–12, 2010; ISSN 1532-8686; doi:10.1053/j.seminhematol.2009.10.011. (Zitiert auf Seite 10)
- Wei, Y.-M.; Cao, Q.; Zhou, H.-Y.; Xia, R.; Lan, J.-C.; Meng, F.-Y. und Bai, H.; Ex vivo expansion of t, nk and cd34+ cells from umbilical cord blood; *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology*; 13 (6), 1076–1081, 2005; ISSN 1009-2137. (Zitiert auf Seite 10)
- Wernig, A. und Müller, S.; Laufband locomotion with body weight support improved walking in persons with severe spinal cord injuries; *Paraplegia*; 30 (4), 229–238, 1992; ISSN 0031-1758; doi:10.1038/sc.1992.61. (Zitiert auf Seite 5)
- Wiener, M. C.; Sachs, J. R.; Deyanova, E. G. und Yates, N. A.; Differential mass spectrometry: a label-free lc-ms method for finding significant differences in complex peptide and protein mixtures; *Analytical chemistry*; 76 (20), 6085–6096, 2004; ISSN 0003-2700; doi:10.1021/ac0493875. (Zitiert auf Seite 17)
- Wilkinson, B. M.; Regnacq, M. und Stirling, C. J.; Protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum; *The Journal of membrane biology*; 155 (3), 189–197, 1997; ISSN 0022-2631. (Zitiert auf Seite 20)
- Winter, M.; Wang, X.-N.; Däubener, W.; Eyking, A.; Rae, M.; Dickinson, A. M.; Wernet, P.; Kögler, G. und Sorg, R. V.; Suppression of cellular immunity by cord blood-derived unrestricted somatic stem cells is cytokine-dependent; *Journal of cellular and molecular medicine*; 13 (8B), 2465–2475, 2009; ISSN 1582-4934; doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00566.x. (Zitiert auf Seite 7)

- Wollnik, H.; Time-of-flight mass analyzers; *Mass spectrometry reviews*; 12 (2), 89–114, 1993; ISSN 1098-2787; doi:10.1002/mas.1280120202. (Zitiert auf Seite 13)
- Wu, Y.; Sheng, W.; Chen, L.; Dong, H.; Lee, V.; Lu, F.; Wong, C. S.; Lu, W.-Y. und Yang, B. B.; Versican v1 isoform induces neuronal differentiation and promotes neurite outgrowth; *Molecular biology of the cell*; 15 (5), 2093–2104, 2004; ISSN 1059-1524; doi:10.1091/mbc.E03-09-0667. (Zitiert auf Seite 52)
- Wysocki, V. H.; Tsaprailis, G.; Smith, L. L. und Brechi, L. A.; Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation.; *Journal of mass spectrometry : JMS*; 35 (12), 1399–1406, 2000; ISSN 1076-5174; doi:10.1002/1096-9888(200012)35:12<1399::AID-JMS86>3.0.CO;2-R. (Zitiert auf Seite 14)
- Yu, Y.-M.; Cristofanilli, M.; Valiveti, A.; Ma, L.; Yoo, M.; Morellini, F. und Schachner, M.; The extracellular matrix glycoprotein tenascin-c promotes locomotor recovery after spinal cord injury in adult zebrafish; *Neuroscience*; 183, 238–250, 2011; ISSN 0306-4522; doi:10.1016/j.neuroscience.2011.03.043. (Zitiert auf Seite 90)
- Zanette, D. L.; Lorenzi, J. C. C.; Panepucci, R. A.; Santos, A. R. D.; Molfetta, G. A.; Araujo, A. G.; Silva Junior, W. A. und Zago, M. A.; Microarray profiles of ex vivo expanded hematopoietic stem cells show induction of genes involved in noncanonical wnt signaling; *Genetics and molecular research : GMR*; 12 (2), 1691–1697, 2013; ISSN 1676-5680; doi:10.4238/2013.May.15.1. (Zitiert auf Seite 10)
- Zenzmaier, C.; Gesslbauer, B.; Grobuschek, N.; Jandrositz, A.; Preisegger, K.-H. und Kungl, A. J.; Proteomic profiling of human stem cells derived from umbilical cord blood; *Biochemical and biophysical research communications*; 328 (4), 968–972, 2005; ISSN 0006-291X; doi:10.1016/j.bbrc.2005.01.044. (Zitiert auf Seite 18)
- Zenzmaier, C.; Kollroser, M.; Gesslbauer, B.; Jandrositz, A.; Preisegger, K.-H. und Kungl, A. J.; Preliminary 2-d chromatographic investigation of the human stem cell proteome; *Biochemical and biophysical research communications*; 310 (2), 483–490, 2003; ISSN 0006-291X. (Zitiert auf Seite 18)
- Zhang, D.; Sliwkowski, M. X.; Mark, M.; Frantz, G.; Akita, R.; Sun, Y.; Hillan, K.; Crowley, C.; Brush, J. und Godowski, P. J.; Neuregulin-3 (nrg3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates erbB4; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 94 (18), 9562–9567, 1997; ISSN 0027-8424. (Zitiert auf Seite 65)
- Zhang, W.; Coldefy, A.-S.; Hubbard, S. R. und Burden, S. J.; Agrin binds to the n-terminal region of lrp4 protein and stimulates association between lrp4 and the first immunoglobulin-like domain in muscle-specific kinase (musk); *The Journal of biological chemistry*; 286 (47), 40624–40630, 2011; ISSN 0021-9258; doi:10.1074/jbc.M111.279307. (Zitiert auf Seite 52)

Zhang, Y. W.; Denham, J. und Thies, R. S.; Oligodendrocyte progenitor cells derived from human embryonic stem cells express neurotrophic factors; *Stem cells and development*; 15 (6), 943–952, 2006; ISSN 1547-3287; doi:10.1089/scd.2006.15.943. (Zitiert auf Seite 52)

Tabellen

Die folgenden Tabellen und Dateien sind auf dem beigelegten Datenträger gespeichert. In der elektronischen Version dieser Arbeit öffnen sich die Dateien durch Klick auf den Titel:

- 1.
- 2.
3. die zur Erstellung einer Datenbank herangezogen wurden
- 4.
- 5.
- 6.
7. in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer reguliert sind
8. in Abhängigkeit von der Behandlungsart reguliert sind
9. , identifizierte Proteine sind rot hervorgehoben

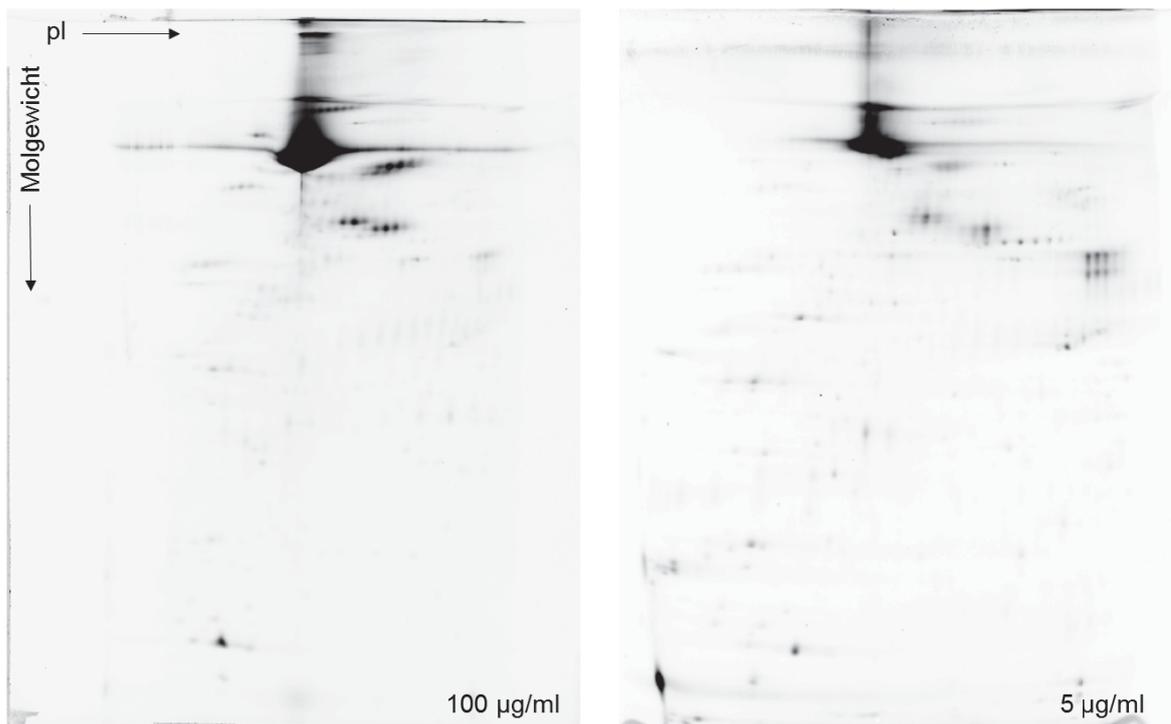


Abbildung A.1 – 2D-PAGE von USSC-Sekretom mit unterschiedlicher Transferrinkonzentration: Jeweils 50 µg Gesamtprotein (keine Kontrastverstärkung) wurden auf einer 2D-PAGE aufgetrennt. Links die ursprüngliche Transferrinkonzentration von 100 µg/ml (Schira *et al.*, 2012), rechts die reduzierte Transferrin Konzentration von 5 µg/ml. Transferrin ist in beiden Fällen als deutliches Signal in oberen Bildmitte zu erkennen. Im Falle der reduzierten Konzentration wird deutlich, dass andere Proteine besser hervorgehoben werden.

Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

„Neuroregenerative Wirkung von USSC durch parakrine Sekretion –
Proteom- und Sekretomstudie von Stammzellen aus Nabelschnurblut“

ohne unerlaubte Hilfe ausgeführt und an keiner anderen Universität zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe. Die Stellen der Arbeit, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, wurden in jedem Fall unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht. Dies gilt auch für die beigegebenen Zeichnungen, bildlichen Darstellungen, Skizzen und dergleichen.

Dortmund, den 05.01.2014

HEINER FALKENBERG