

**Charakterisierung von mesenchymalen Stromazellen aus dem
Knochenmark-Mikromilieu in Patienten mit myelodysplastischen
Syndromen und akuter myeloischer Leukämie durch funktionelle
Sekretomanalysen**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Falk Justus Baberg
aus Lüdenscheid

Düsseldorf, April 2019

aus dem Molecular Proteomics Laboratory
des Instituts für Molekulare Medizin
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie
des Uniklinikums Düsseldorf

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Kai Stühler
2. Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2019

Für meine Tochter Emma

und

meine Familie

„Zu wissen, was man weiß, und zu wissen, was man tut, das ist Wissen.“

Konfuzius

Zusammenfassung

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind eine heterogene Gruppe von Blutstammzellerkrankungen des Knochenmarks, bei denen zu wenig ausgereifte oder funktionsfähige Blutzellen gebildet werden und deshalb ein Risiko besteht in eine akute myeloische Leukämie (AML) überzugehen. Nach aktuellem Stand der Forschung entstehen die MDS und AML infolge multifaktorieller Veränderungen hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ). In den vergangenen Jahren konnte in diversen Arbeiten gezeigt werden, dass mesenchymale Stromazellen (MSZ) im bidirektionalen Austausch mit den HSPZ stehen. Aus dem Grund ist auch das Interesse von MSZ in Bezug auf MDS und AML gewachsen. Unter der Annahme, dass die MSZ eine Rolle für die ineffektive Hämatopoese in MDS und AML spielen könnten, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Knochenmark-Mikromilieu in Patienten mit MDS und AML durch funktionelle Sekretomanalysen von mesenchymalen Stromazellen untersucht. Dafür wurde zunächst das Sekretom von gesunden MSZ aus dem Knochenmark tiefgehend charakterisiert. Hier stellte sich heraus, dass das Sekretom von MSZ hauptsächlich am Zellwachstum und/oder der Aufrechterhaltung und der Zellkommunikation beteiligt, ist und weiterhin, dass Kontaminationen nicht außer Acht gelassen werden dürfen. Anschließend wurden 31 MSZ aus gesunden Probanden, MDS und AML-Patienten durch eine markierungsfreie differenzielle Analyse massenspektrometrisch untersucht. Insgesamt wurden 1432 Proteine identifiziert und 568 Proteine quantifiziert. Die Ergebnisse zeigten 12 signifikant differenziell sekretierte Proteine zwischen den MSZ-Sekretomen aus gesunden Probanden und MSZ-Sekretomen aus MDS-Patienten und 34 signifikant differenziell sekretierte Proteine zwischen MSZ-Sekretomen aus gesunden Probanden und MSZ-Sekretomen aus AML-Patienten. Auf diesen Ergebnissen beruhend wurde das differenziell sekretierte Protein *Follistatin related protein 3* (FSTL3) hinsichtlich seiner biologischen Funktion auf HSPZ untersucht. Hier zeigten erste Ergebnisse, dass HSPZ von MDS/AML-Patienten eine verminderte Proliferation und Differenzierung sowie eine höhere SMAD2-Phosphorylierung aufwiesen. Jedoch zeigte FSTL3 auf die Funktionalität der HSPZ in Bezug auf Proliferation, Differenzierung und der Inhibierung des Aktivin Signalweges keinen signifikanten Einfluss. Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit mittels massenspektrometrischer Analyse das Sekretom MSZ tiefgehend charakterisiert werden und differenziell sekretierte Proteine zwischen Knochenmarks-MSZ aus gesunden Probanden und MDS/AML-Patienten aufgezeigt werden. Das mitunter signifikante Protein FSTL3 scheint keinen Einfluss auf die Funktionalität von gesunden und MDS/AML-HSPZ und demnach auch keinen Einfluss auf die Pathogenese von MDS/AML zu haben.

Summary

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of bone marrow blood stem cell diseases in which underdeveloped or functional blood cells are formed, possibly leading to a high risk of developing acute myeloid leukemia (AML). According to current research, MDS and AML are the result of multifactorial changes in hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC). In recent years, several studies have shown that mesenchymal stromal cells (MSC) are in bidirectional exchange with HSPC, leading to a growing interest in MSC in MDS and AML. Assuming that MSC could play a role in ineffective hematopoiesis, this work examined the bone marrow microenvironment in patients with MDS and AML by functional secretome analysis of mesenchymal stromal cells. Initially, the secretome of healthy MSC from the bone marrow was profoundly characterized. It turned out that the MSC secretome is involved mainly in cell growth and / or maintenance and cell communication and furthermore, that contamination cannot be disregarded. Subsequently, 31 secretomes from MSC of healthy donors and MSC from MDS and AML-patients were analyzed by mass spectrometry by a label-free differential analysis. A total of 1432 proteins were identified and 568 proteins were quantified. The results showed 12 significantly differentially secreted proteins between the MSC secretomes from healthy donors and MSC secretomes from MDS-patients. 34 significantly differentially secreted proteins were quantified between MSC secretomes from healthy donors and MSC secretomes from AML-patients. Based on these results, the differentially secreted protein Follistatin related protein 3 (FSTL3) was investigated for its biological function on HSPC. Here first results showed that HSPC of MDS/AML-patients had defects in proliferation and differentiation and further a higher SMAD2 phosphorylation. However, FSTL3 has no significant influence on the functionality of HSPC in terms of proliferation, differentiation and inhibition of the activin signaling pathway. Thus, in this work, the secretome of MSC could be characterized in detail by mass spectrometric analysis and differentially secreted proteins between bone marrow MSC from healthy donors and MDS/AML-patients could be identified. The significant differential protein FSTL3 does not appear to affect the functionality of both healthy and MDS/AML-HSPC, and therefore does not appear to affect the pathogenesis of MDS/AML.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Hämatopoese.....	1
1.2	Das Knochenmark-Mikromilieu.....	1
1.3	Die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ).....	3
1.4	Mesenchymale Stromazellen (MSZ).....	4
1.5	Myelodysplastische Syndrome (MDS).....	6
1.6	Akute myeloische Leukämie (AML).....	10
1.7	Die Rolle von Mesenchymalen Stromazellen (MSZ) in der MDS/AML-Pathogenese	13
1.8	Charakterisierung von mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen mittels Proteom- und Sekretomanalyse.....	14
1.9	Die Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie	17
1.10	Die Rolle der Bioinformatik in der Proteomanalyse.....	19
2	Zielsetzung der Arbeit.....	21
3	Material und Methoden.....	22
3.1	Material.....	22
3.1.1	Verwendete Materialien.....	22
3.1.2	Primer.....	27
3.1.3	Antikörper.....	27
3.1.4	Software.....	28
3.1.5	Zelllinien.....	28
3.1.6	Patientencharakteristika.....	28
3.2	Methoden.....	30
3.2.1	Zellkultur.....	30
3.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	33
3.2.3	Proteinanalytik.....	34

Inhaltsverzeichnis

3.2.4	LC-MS/MS-Analysen	37
3.2.5	Statistische Auswertungen	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Sekretomanalyse von MSZ aus dem Knochenmark gesunder Probanden	43
4.1.1	Quantitative MS Analyse von gesunden Knochenmark-MSZ.....	43
4.1.2	Biologische Einordnung der von Knochenmark-MSZ sezernierten Proteine	45
4.1.3	Charakterisierung der proteolytischen Abtrennung von Ektodomänen bei Membranproteinen (<i>Ectodomain shedding</i>).....	47
4.1.4	Validierung sekretierter und intrazellulärer Proteine	49
4.2	Differenzielle Sekretomanalyse von Knochenmark-MSZ	51
4.2.1	Differenziell quantifizierte Proteine im Knochenmark-MSZ-Sekretom von MDS- und AML-Patienten.....	52
4.2.2	Follistatin-related protein 3 (FSTL3)	57
4.3	Charakterisierung von HSPZ aus gesunden Probanden und MDS/AML-Patienten .	60
4.4	Funktionelle Validierung von FSTL3 als signifikant differenziell sekretierter Kandidat.....	64
4.4.1	Funktionell aktives FSTL3 in HL-60 und THP-1 AML Zelllinien.....	64
4.4.2	AktivinA in HSPZ.....	66
4.4.3	FSTL3 scheint keinen Einfluss auf die Proliferation von HSPZ zu haben	67
4.4.4	FSTL3 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Differenzierung von HSPZ...	68
4.4.5	FSTL3 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Phosphorylierung von SMAD2 in HSPZ	69
5	Diskussion.....	71
5.1	Methodische Aspekte	71
5.1.1	Das Modellsystem	71
5.1.2	Aufarbeitung der MSZ-Sekretome	72
5.1.3	Sekretomanalyse mithilfe der Massenspektrometrie.....	72
5.2	Biologische Diskussion	73
5.2.1	MSZ Analyse von gesunden Probanden	73

Inhaltsverzeichnis

5.2.2	Differenzielle MSZ-Sekretomanalyse von gesunden Probanden, MDS- und AML-Patienten.....	77
5.3	Funktionelle Validierung von FSTL3.....	83
5.3.1	Methodische Aspekte der funktionellen Validierung von FSTL3 an HSPZ.....	83
5.3.2	Knochenmark-HSPZ aus hämatopoetisch erkrankten Patienten zeigen funktionelle Defizite.....	85
5.3.3	FSTL3 hat keinen funktionellen Effekt auf HSPZ.....	87
6	Fazit.....	88
7	Literaturverzeichnis	89
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	105
9	Abkürzungsverzeichnis.....	108
10	Anhang.....	111
10.1	Abbildungen	111
10.2	Tabellen	113
10.3	Veröffentlichung.....	120
10.4	Danksagung	121
10.5	Erklärung	122

1 Einleitung

1.1 Die Hämatopoese

Die Hämatopoese (aus dem Griechischen, hämato: Blut; poiese: Bildung) ist ein lebenslang ablaufender Prozess, der zur Aufrechterhaltung der Funktionen des Blut- und Immunsystems dient. Dabei übernimmt das Blut vielfältige Aufgaben, wie den Transport von Sauerstoff und Nährstoffen, die Blutstillung und auch die Infektabwehr. Dafür werden im blutbildenden Knochenmark pro Sekunde $1,5 \times 10^6$ Blutzellen gebildet (Bryder *et al.*, 2006; Stastna und Van Eyk, 2012). Das in der Hämatopoese gebildete Blut wird in zwei Klassen von Zellen unterteilt: Die lymphatischen und die myeloischen Blutzellen.

1.2 Das Knochenmark-Mikromilieu

Der blutbildende Prozess findet beim Menschen vorwiegend im Knochenmark des Skelettsystems statt. Ausgangspunkt der Hämatopoese sind die hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ), aus denen durch Selbsterneuerung und Differenzierung reife Blutzellen entstehen. Das Knochenmark-Mikromilieu, welches die HSPZ umgibt, unterstützt die Zellen der Hämatopoese bei der Proliferation, Selbsterneuerung und Differenzierung (Gluck *et al.*, 1989). Es ist in zwei strukturelle und funktionelle Einheiten, den sogenannten Knochenmark-Nischen, organisiert. Diese wurden erstmals ansatzweise von Ray Schofield 1978 beschrieben (Schofield, 1978). Durch die technischen Fortschritte und Forschung geht man heutzutage von mindestens zwei hämatopoetischen Nischen aus, welche als funktionell zusammenhängende Einheiten agieren und nicht getrennt betrachtet werden sollten. Die erste Nische ist die endosteale (osteoblastäre) Nische. Diese ist charakterisiert durch die räumliche und funktionelle Nähe der blutbildenden hämatopoetischen Stammzelle mit den namensgebenden Osteoblasten. In dieser Nische sind die HSPZ, beeinflusst durch Signale der Osteoblasten, im Ruhezustand und proliferieren kaum. Dieser Zustand kann durch endogene oder exogene Stimuli beeinflusst werden (Abbildung 1). Die zweite hämatopoetische Nische ist die sauerstoffreichere perivaskuläre Nische, welche sich in unmittelbarer Nähe zur den venösen Sinusoiden befindet und hauptsächlich aus Endothelzellen besteht (Abbildung 1) (Boulais und Frenette, 2015). Im Knochenmark-Mikromilieu unterscheidet man generell zwischen zellulären und nicht zellulären Bestandteilen. Zu den zellulären Bestandteilen gehören verschiedene Zelltypen, wie Adipozyten, Osteoblasten, Osteoklasten, Endothelzellen, Retikulumzellen, Makrophagen, perivaskuläre Retikularzellen und die sogenannten

mesenchymalen Stromazellen (MSZ), welche im Kapitel 1.4 näher betrachtet werden (Isern und Mendez-Ferrer, 2011; Prockop, 1997). Der nicht zelluläre Teil besteht hauptsächlich aus dem autonomen Nervensystem, welches für die Mobilisierung der HSPZ aus dem Knochenmark ins periphere Blut zuständig ist, und extrazellulärer Matrix (Mendez-Ferrer *et al.*, 2010). Diese stellt neben der physikalisch stabilisierenden Funktion einen Speicher für Zytokine, Metalloproteinasen und Wachstumsfaktoren dar und besteht hauptsächlich aus Glykoproteinen und Proteoglykanen (Lerat *et al.*, 1993; Owen, 1988).

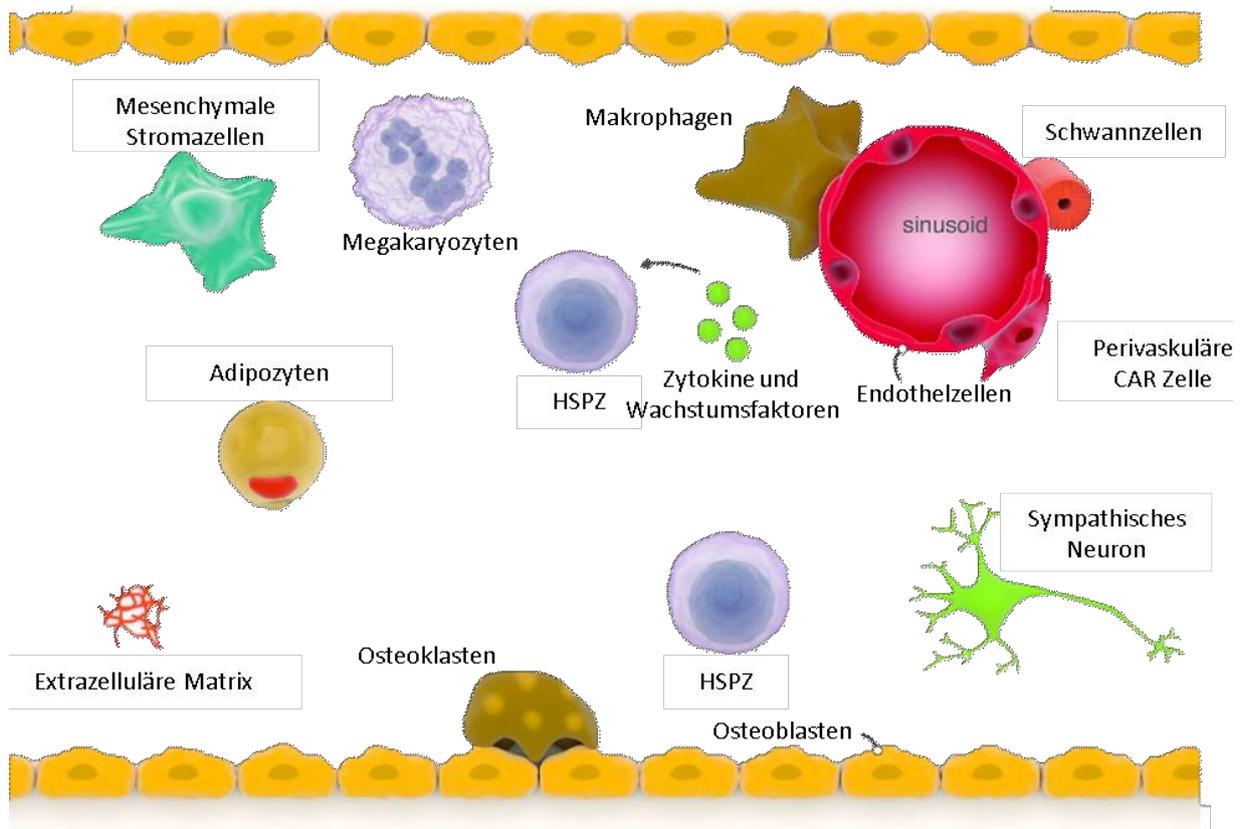


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Knochenmark-Mikromilieus. Das Knochenmark-Mikromilieu besteht aus verschiedenen Zellpopulationen, die gemeinsam zur Regulierung der Hämatopoese beitragen. Hauptverantwortlich für die Blutbildung sind die hämatopoetische Stamm- und Progenitorzelle (HSPZ). Neben diesen befinden sich noch andere Zelltypen wie Mesenchymale Stromazellen, Adipozyten, Megakaryozyten, Makrophagen, extrazelluläre Matrix, Osteoblasten/-klasten, Endothelzellen und Nerven im Knochenmark-Mikromilieu (modifiziert nach Krause und Scadden, 2015).

1.3 Die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ)

Sämtliche Blutzellen des hämatopoetischen Systems entstammen dem Knochenmark. Ausgangspunkt aller Blutzellen sind die pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSZ), die in der Lage sind sich unbegrenzt zu teilen und in jegliche hämatopoetischen Zelltypen zu differenzieren (Abbildung 2) (Osawa *et al.*, 1996). Nach dem bisherigen Stand der Forschung können mind. 10 enddifferenzierte Zelltypen aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen. Dazu zählen Erythrozyten, Thrombozyten, basophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, neutrophile Granulozyten, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, NK-Zellen, dendritische Zellen und Monozyten (Seita und Weissman, 2010). Die Differenzierung der HSZ erfolgt dabei stufenweise und hierarchisch über verschiedene hämatopoetische Vorläuferzellen (Progenitoren) (Abbildung 2). Die in dieser Arbeit gewonnenen Zellen stellen eine Population aus verschiedensten Stamm- und Progenitorpopulationen dar und werden im Folgenden als hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) bezeichnet. Im ersten Differenzierungsschritt entstehen Progenitoren multiplen Potentials (MPP), welche zum einen in lymphatische, zum anderen aber auch in myeloische Vorläuferzellen differenzieren können. Die lymphatischen Vorläuferzellen, auch *common lymphoid progenitor* (CLP) genannt, differenzieren über weitere Entwicklungsschritte in reife Zellen des lymphatischen Systems (T-Zellen, B-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen)). Dagegen entstehen aus den myeloischen Vorläuferzellen (*common myeloid progenitor* (CMP)) die sogenannten *megakaryocyte erythroid progenitors* (MEP) oder die *granulocyte macrophage progenitors* (GMP). Dabei differenzieren die MEP in Erythrozyten und Thrombozyten und die GMP in Granulozyten und Makrophagen (Abbildung 2) (Terskikh *et al.*, 2003). Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen befinden sich in der Knochenmark-Nische, in denen enger Kontakt zum umliegenden Mikromilieu vorherrscht (Dazzi *et al.*, 2006). Die Selbsterneuerung und Differenzierung der HSPZ wird neben intrinsischen Signalen (genetische und epigenetische Mechanismen) auch durch extrinsische Signale, welche durch das Mikromilieu generiert werden, reguliert (Jing *et al.*, 2010). Die extrinsischen Signale können dabei durch direkten Zell-Zell-Kontakt oder auch durch Interaktion mit extrazellulären Matrixproteinen entstehen. Auch parakrin wirkende lösliche Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine tragen zur Regulation von Selbsterneuerung und Differenzierung bei (Moore und Lemischka, 2006; Schroeder *et al.*, 2016). In diesem Zusammenhang sind auch die mesenchymalen Stromazellen (MSZ) zu nennen, welche sich in unmittelbarer räumlicher Nähe zu den HSPZ befinden. Da diese im Fokus dieser Arbeit stehen werden sie im folgenden Abschnitt näher betrachtet.

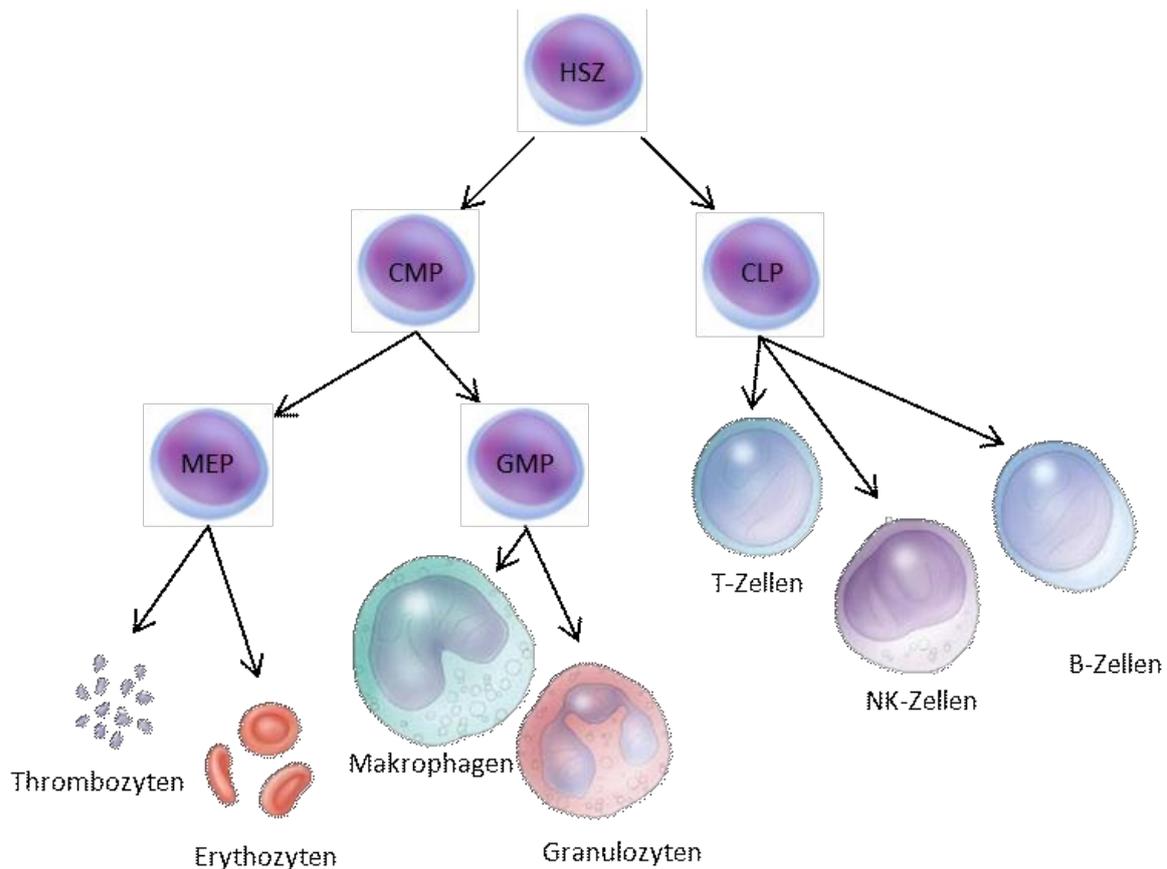


Abbildung 2: Die Hämatopoese im Menschen. Die Entwicklung von Blutzellen schreitet von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) aus fort, die sich entweder selbst erneuern, in einen gemeinsamen lymphatischen Vorläufer (CLP) oder einen gemeinsamen myeloiden Vorläufer (CMP) differenzieren können. Die myeloiden Vorläuferzellen führen dann zu den differenzierteren Vorläuferzellen *megakaryocyte erythroid progenitors* (MEP) oder den *granulocyte macrophage progenitors* (GMP), welche zu Thrombozyten, Erythrozyten, Makrophagen und Granulozyten differenzieren. Die CLP differenzieren in T-Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und B-Zellen (modifiziert nach Kaushansky, 2006).

1.4 Mesenchymale Stromazellen (MSZ)

Mesenchymale Stammzellen wurden erstmals durch Friedenstein *et al.* 1968 als fibroblastenartige, adhärent proliferierende Zellen beschrieben. Sie sind in diversen Geweben, wie Blut, Knochenmark, Fettgewebe, Leber und Nabelschnur zu finden (Halfon *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit MSZ des Knochenmarks gearbeitet, weswegen diese im Vordergrund stehen. MSZ haben das Potential in Zellen mesodermalen Ursprungs, wie Adipoblasten, Osteoblasten und Chondroblasten zu differenzieren (Abbildung 3) (Frenette *et al.*, 2013; Muntion *et al.*, 2016). Aufgrund der charakteristischen Stammzeleigenschaften der MSZ wurden diese zunächst als mesenchymale Stammzellen bezeichnet. Da die mesenchymalen Zellen durch Ausplattieren gewonnen werden, stellen diese keine homogene Zellpopulation dar, sondern eher ein Gemisch aus verschiedensten

bereits differenzierten mesenchymalen Progenitorzellen. Des Weiteren existiert bis heute kein repräsentativer Beweis für die Selbsterneuerungsfähigkeit auf Einzelzellniveau, welche Voraussetzung für eine Stammzelle ist. Aus dem Grund wird im Folgenden der Begriff mesenchymale Stromazelle (MSZ) verwendet (Dominici *et al.*, 2006; Frenette *et al.*, 2013). Im Jahre 2007 hat die *International Society for Cell & Gene Therapy* (ISCT) einheitliche Definitionskriterien für MSZ festgelegt. Grundlage ist der Nachweis der trilineären Differenzierungskapazität (Expressionsprofil verschiedener Oberflächenantigene) sowie die Plastikadhärenz. *In vitro* kultivierte MSZ müssen demnach zu 95 % die Oberflächenantigene *CD73*, *CD90* und *CD105* exprimieren und keine der hämatopoetischen Antigene *CD34* und *CD45* (< 2 % der Zellen) (Dominici *et al.*, 2006).

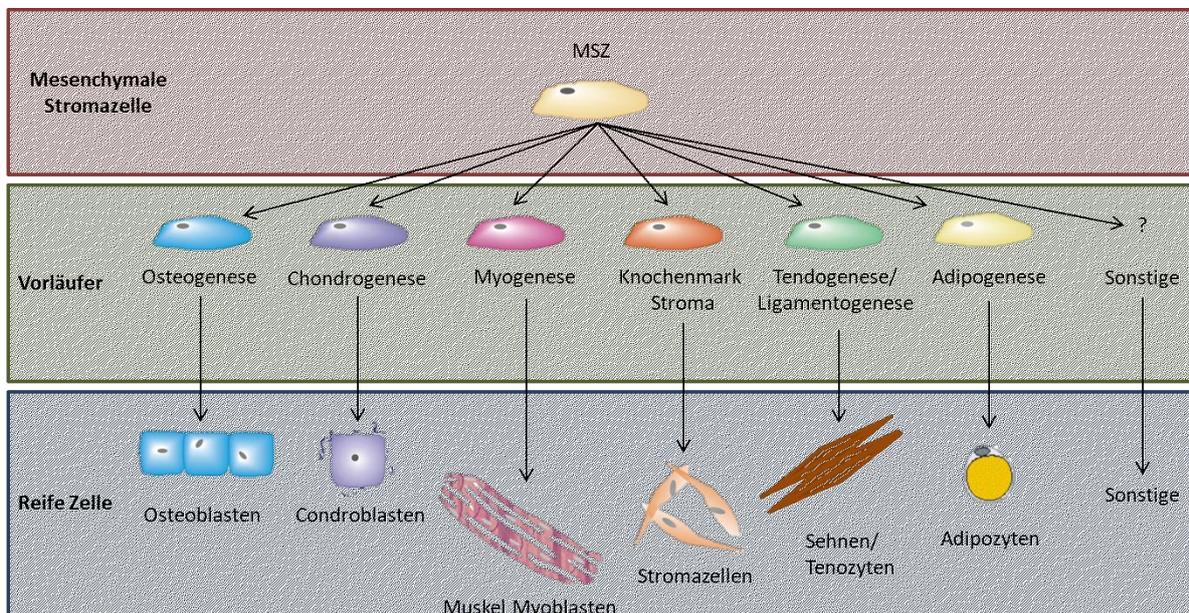


Abbildung 3: Mesenchymale Stromazellen (MSZ) und ihr Potential. Schematische Darstellung der im Knochenmark lokalisierten MSZ mit dem Hervorbringen von differenzierbaren Vorläuferzellen und den daraus resultierenden reifen Zellen (modifiziert nach Bonfield und Caplan, 2010).

Im Knochenmark-Mikromilieu haben MSZ eine regulatorische Wirkung auf die Differenzierung und Proliferation von HSPZ (Rankin *et al.*, 2015). Diese regulatorische Wirkung kann durch direkten Zell-Zell-Kontakt, aber auch durch sekretierte lösliche Faktoren, Proteine sowie die extrazelluläre Matrix, vermittelt werden (Saleh *et al.*, 2015; Schroeder *et al.*, 2016). Maligne Veränderungen innerhalb der Interaktion zwischen dem Knochenmark-Mikromilieu (darunter auch MSZ) und den HSPZ haben einen Einfluss auf die Blutbildung (Korn und Mendez-Ferrer, 2017). Dadurch kann es zur Entstehung von

Stammzellerkrankungen wie Leukämien oder myelodysplastischen Syndromen (MDS) kommen, auf welche im nächsten Abschnitt weiter eingegangen wird.

1.5 Myelodysplastische Syndrome (MDS)

Myelodysplastische Syndrome (MDS) umfassen eine heterogene Gruppe klonaler hämatologischer Stammzellerkrankungen, die mit einem um 30-45 % erhöhten Risiko zu einem Progress in eine akute myeloische Leukämie (AML) einhergehen (Pleyer *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2012). In der Gesamtbevölkerung liegt die Inzidenz von myelodysplastischen Syndromen sowie der akuten myeloischen Leukämie bei ca. 4 pro 100000/ Jahr. Die Erkrankungen können in jedem Alter auftreten, korrelieren jedoch mit dem Lebensalter der Patienten und nehmen mit fortschreitendem Alter erheblich zu. Das mittlere Erkrankungsalter liegt dementsprechend zwischen 68 und 75 Jahren (Medyouf *et al.*, 2014). Neben dem multiplen Myelom und den Non-Hodgkin-Lymphomen (inkl. der chronisch lymphatischen Leukämie) gehören MDS und AML zu den häufigsten hämatologischen Neoplasien. Aufgrund der steigenden Lebenserwartung und der alternden Bevölkerung wird die Häufigkeit mit hoher Wahrscheinlichkeit weiter zunehmen (Aul *et al.*, 1992a; Aul *et al.*, 1992b).

Ursächlich für MDS sind genomische Aberrationen und Abnormitäten der HSPZ, welche zu einer ineffektiven Hämatopoese führen. Diese führt in einer Vielzahl der Fälle zu einer Vermehrung von hämatopoetischen Progenitorzellen, welche unterschiedliche Zeichen von Dysplasien aufweisen. Im peripheren Blut hingegen können die Zytopenien variabel in qualitativer und quantitativer Art auftreten (Schmalzing *et al.*, 2017). Maligne Veränderungen in der Interaktion innerhalb des Knochenmark-Mikromilieus begünstigen die defekte Hämatopoese (Rankin *et al.*, 2015).

Die Symptomatik bei MDS ist meist die Folge einer Anämie und führt zu Symptomen wie Luftnot, Erschöpfung oder Schwindel (Nachtkamp *et al.*, 2009). Liegt eine Thrombozytopenie vor sind meist Blutungskomplikationen charakteristisch. Eine gesteigerte Infektanfälligkeit kommt bei den MDS-Patienten vor, die einen Mangel an Leukozyten, insbesondere an neutrophilen Granulozyten, aufweisen (Neukirchen *et al.*, 2009).

Als Ursache von MDS gilt häufig eine langfristige Exposition gegenüber Toxinen oder radioaktiver Strahlung, aber auch Radio- und Chemotherapien oder vorausgehende Komorbiditäten. Klassifiziert werden myelodysplastische Syndrome typischerweise durch die aktuell gültige Weltgesundheitsorganisation WHO-Klassifikation (Tabelle 1), welche im

Wesentlichen auf der zuvor gültigen *French-American-British-Association* (FAB) Einteilung basiert (Bennett *et al.*, 1982). Dabei bilden die Anzahl der betroffenen Zellreihen, Blastenzahl und zytogenetische Befunde die Bewertungsgrundlage (Arber *et al.*, 2016). Die Prognose von MDS-Patienten, hinsichtlich des Gesamtüberlebens und dem Risiko eines Übergangs in akute myeloische Leukämie, gestaltet sich ebenso heterogen wie der Phänotyp. Dabei schwankt das Gesamtüberleben von > 5 Jahren (RARS) bis zu < 1 Jahr (RAEB-II) (Germing *et al.*, 2008). Bewertungsgrundlage stellt das Prognosesystem *Revised-IPSS* (IPSSR) dar und erlaubt eine differenzierte Prognosestellung (Abbildung 4). In diesem Prognosesystem werden MDS-Patienten in die fünf Risikogruppen sehr niedrig, niedrig, intermediär, hoch und sehr hoch eingeteilt. Die für die Bewertung zugrunde liegenden Parameter sind die Zytogenetik des Knochenmarks, der prozentuale Blastenteil im Knochenmark und die Zytopenieanzahl (Abbildung 4) (Greenberg *et al.*, 2012).

Tabelle 1: WHO-Klassifizierung myelodysplastischer Syndrome sowie deren Merkmale im Blut und Knochenmark nach Stand 2016 (modifiziert nach Arber *et al.* 2010; Swerdlow *et al.* 2016).

MDS Typ	Zytopenien und Blasten im Blut	Knochenmarkbefunde und Zytogenetik
MDS mit <i>single lineage dysplasia</i> (MDS-SLD) (<i>Früher RA, RN, RT</i>)	1-2 Zytopenien, Blasten < 1 %	Blasten < 5 %, keine Auerstäbchen, < 15 % Ringsideroblasten
MDS mit <i>multilineage dysplasia</i> (MDS-MLD) (<i>Früher RCMD</i>)	1-3 Zytopenien, Blasten < 1 %	Blasten < 5 %, keine Auerstäbchen, < 15 % Ringsideroblasten
MDS mit <i>single lineage dysplasia</i> und Ringsideroblasten (MDS-RS-SLD) (<i>Früher RARS</i>)	1-2 Zytopenien, Blasten < 1 %	Blasten < 5 %, keine Auerstäbchen, > 15 % Ringsideroblasten oder > 5 % und SF3B1 Mutation
MDS mit <i>multilineage dysplasia</i> und Ringsideroblasten (MDS-RS-MLD) (<i>Früher RCMD-RS</i>)	1-3 Zytopenien, Blasten < 1 %	Blasten < 5 %, keine Auerstäbchen, > 15 % Ringsideroblasten oder > 5 % und SF3B1 Mutation
MDS mit del(5q)	1-2 Zytopenien, Blasten < 1 %	Blasten < 5 %, keine Auerstäbchen, del(5q) allein oder mit 1 Zusatzanomalie (nicht von Chromosom 7)
MDS mit Blastenvermehrung (MDS EB1) (<i>früher RAEB 1</i>)	1-3 Zytopenien, Blasten < 5 %	Blasten < 10 %, keine Auerstäbchen
MDS mit Blastenvermehrung (MDS EB2) (<i>früher RAEB 2</i>)	1-3 Zytopenien, Blasten < 20 %	Blasten < 20 %, Auerstäbchen möglich
MDS unklassifiziert	a) MDSSLD mit Panzytopenie b) MDSSLD/MDSMLD/MDSdel(5q) mit 1 % Blasten im Blut c) MDS ohne eindeutige Dysplasien, aber mit MDS definierender chromosomaler Aberration	Blasten < 5 %, keine Auerstäbchen

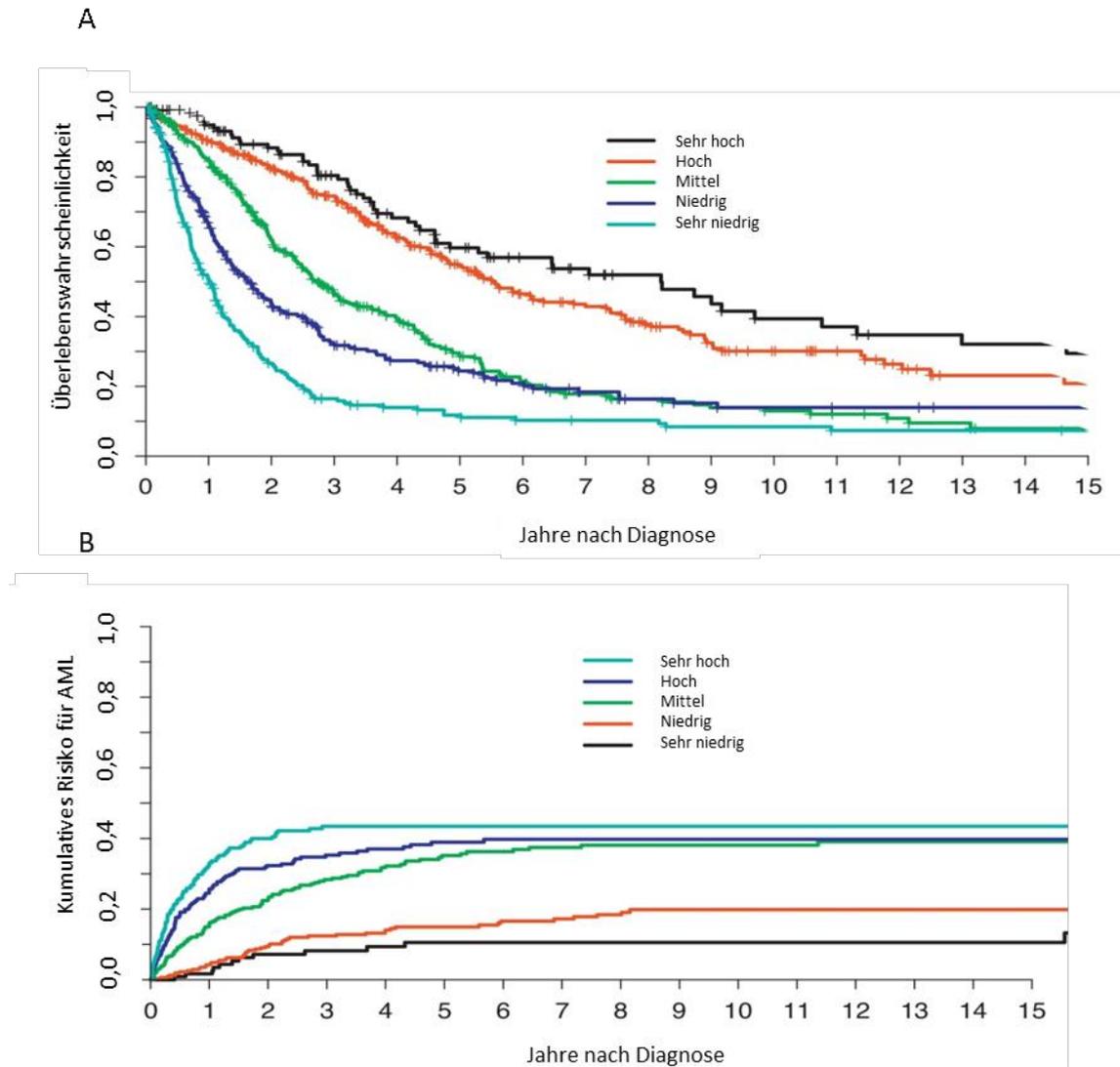


Abbildung 4: Überleben und Risiko des Übergangs in AML von Patienten mit MDS nach IPSS-R. Graphische Darstellung des A) kumulativen Überlebens von 894 Patienten mit MDS gemäß *WHO adapted Prognostic Scoring System* (WPSS) und B) des kumulativen Risikos eines Übergangs in AML von 894 Patienten mit MDS nach WPSS. Dargestellt sind fünf Risikogruppen: sehr niedrig, niedrig, mittel, hoch und sehr hoch (modifiziert nach Neukirchen *et al.*, 2014).

Für eine MDS Diagnose muss eine anhaltende Zytopenie vorliegen und entweder eine Vermehrung von Blasten (5-19 %) im Knochenmark, eine Dysplasie von mind. 10 % der Knochenmarkzellen oder eine MDS typische Chromosomenaberration vorliegen. Die Diagnostik beinhaltet neben einer Blutuntersuchung auch eine zytologische und/oder histologische Knochenmarkuntersuchung. Für die Suche nach spezifischen Aberrationen bedarf es einer zytogenetischen Untersuchung des Knochenmarks (Valent *et al.*, 2007).

Für MDS gibt es bis dato keinen kausalen Therapieansatz. Meist steht die Behandlung der durch die Zytopenien hervorgerufenen Symptome im Vordergrund. Dies kann durch

Transfusion (Thrombozyten- und Erythrozytenkonzentraten), aber auch durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren (Erythropoietin, Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF)) oder Thrombopoietinanaloga erfolgen. Seit 2008 ist die Substanz 5-Azacitidine, ein DNA-Methyltransferaseinhibitor, als Therapie generell für MDS in Europa zugelassen. Sie soll die in MDS gefundenen pathologischen Hypermethylierungen von verschiedenen Genen aufheben (Fenaux *et al.*, 2009). Bei etwa zwei Drittel der Niedrigrisiko MDS-Patienten mit isolierter Deletion 5q führt die Substanz Lenalidomid zu einer anhaltenden Verbesserung (List *et al.*, 2006). Lenalidomid ist eine immunmodulierende Substanz, dessen Wirkung auf verschiedenen Mechanismen beruht. Hauptsächlich hemmt die Substanz die Proliferation bestimmter hämatopoetischer Tumorzellen und die Produktion entzündungsfördernder Zytokine (Dimopoulos *et al.*, 2007).

1.6 Akute myeloische Leukämie (AML)

MDS-Patienten haben ein 30-45 % erhöhtes Risiko einen Progress in eine akute myeloische Leukämie (AML) zu entwickeln (Abbildung 4) (Pleyer *et al.*, 2016). Die akute myeloische Leukämie ist, wie bei MDS, eine maligne Erkrankung des blutbildenden und lymphatischen Systems und entsteht durch eine klonale Proliferation maligner, entarteter hämatopoetischer Zellen (Blasten). Die Inzidenz liegt bei etwa 4 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner, steigt jedoch mit zunehmendem Lebensalter immer weiter an. Das mediane Alter bei Erstdiagnose liegt bei 69 Jahren (Smith *et al.*, 2011). Unbehandelt führt AML aufgrund der Verdrängung der normalen Hämatopoese und den damit zusammenhängenden Komplikationen zum Tod. AML umfasst eine Gruppe biologischer und klinischer Subtypen, die sich in Verlauf und Prognose unterscheiden. Charakteristisch bei allen AML Subtypen ist jedoch die Transformation myeloider Vorläuferzellen zu leukämischen unreifen Blasten, welche im Knochenmark klonal expandieren (Recher *et al.*, 2005). Sie besitzen neben einem eingeschränkten Differenzierungspotential die Fähigkeit zur unkontrollierten Proliferation und verdrängen damit die normale Hämatopoese (Estey und Dohner, 2006). Seit 1976 erfolgt die Klassifikation durch die FAB. Diese basiert auf zytomorphologischen Kriterien, die oftmals mit bestimmten Karyotypen assoziiert sind (Bennett *et al.*, 1976). Seit 2008 erfolgt die gängige Einteilung der AML nach der WHO-Klassifikation, welche auf die FAB-Klassifikation aufbaut (Sabattini *et al.*, 2010). Bei dieser werden neben zytomorphologischer und zytochemischer Einteilung auch zyto- und molekulargenetische Merkmale und klinische Faktoren zur Einteilung von AML berücksichtigt (Tabelle 2). Laut WHO muss der Anteil der Blasten, die der myeloischen Reihe zugeordnet werden können, bei mindestens 20 % liegen

(Sabattini *et al.*, 2010). Bei einem Blastenanteil von < 20 % müssen typische chromosomale Aberrationen (t(8;21), inv(16), t(15;17)) nachzuweisen sein, damit eine akute myeloische Leukämie vorliegen kann (Sabattini *et al.*, 2010).

Tabelle 2: WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie (AML). Abkürzungen: CEBPA = CCAAT/enhancer binding protein alpha; NPM1 = Nucleophosmin 1; MKL1 = Megakaryoblastic leukemia (translocation) 1; MYH11 = Myosin heavy chain 11; RUNX1-RUNX1T1 = Runt-related transcription factor 1 translocated to 1; CBFβ = Core-binding factor, beta subunit; PML = Promyelozytenleukämie; RARα = Retinoic acid receptor-alpha; MLL-MLLT3 = Mixed-lineage leukemia translocated to chromosome 3; NUP214 = Nucleoporin 214kDa; RPN1 = Ribophorin I; EVI1 = Ecotropic virus integration site 1 protein homolog; RBM15 = Ribonukleinsäure binding motif protein 15 (modifiziert nach Sabattini *et al.*, 2010).

Kategorie	Definition
AML mit rekurrenten genetischen Anomalitäten	AML mit t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 AML mit inv(16)(p13.1q22) / t(16;16)(p13.1;q22); CBFβMYH11 Akute Promyelozytenleukämie mit t(15;17)(q22;q12); PMLRARα AML mit t(9;11)(p22;q23); MLL-MLLT3 AML mit t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); RPN1- EVI1 AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); RBM15- MKL1 AML mit mutiertem NPM1 AML mit mutiertem CEBPA
AML mit Myelodysplasie assoziierten Veränderungen	Akute Leukämie mit morphologischen Merkmalen der Myelodysplasie oder ein myelodysplastisches Syndrom (MDS) in der Vorgeschichte oder myelodysplastische/ myeloproliferative Neoplasie (MDS/MPN) Akute Leukämie mit MDS-bedingter zytogenetischer Anomalität
Therapieassoziierte myeloische Neoplasie	Therapieassoziierte akute myeloische Leukämie (t-AML) Therapieassoziiertes myelodysplastisches Syndrom (t-MDS) Therapieassoziierte myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasie (t-MDS/MPN)
Myeloische Proliferation assoziiert mit dem DownSyndrom	Transiente anomale Myelopoese Myeloische Leukämie assoziiert mit Down Syndrom
Myeloisches Sarkom	
Blastische plasmazytoide dendritische Zellneoplasie	
Akute myeloische Leukämie, nicht anders spezifiziert	AML mit minimaler Differenzierung AML ohne Maturation AML mit Maturation Akute myelomonozytische Leukämie Akute monoblastische/monozytische Leukämie Akute erythroide Leukämie Akute megakaryoblastische Leukämie Akute basophile Leukämie Akute Panmyelose mit Myelofibrose

Aufgrund der vergleichbaren Pathogenese zu den MDS-Patienten ähnelt die Symptomatik in AML-Patienten. Im Vordergrund stehen hierbei Beschwerden, die durch die Anämie, Leukozytopenie/-pathie und Thrombozytopenie hervorgerufen werden. Dazu gehören rasche Ermüdbarkeit, Blässe, Dyspnoe, Tachykardie, Fieber, Infektanfälligkeit und Blutungen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Symptomatik der AML bei Erstdiagnose (Fritsch *et al.*, 2006).

Allgemeine Leistungsminderung, Schwäche, Blässe, Dyspnoe	Häufigkeit
Fieber	30-40 %
Knochenschmerzen	25 %
Lymphadenopathie, Splenomegalie	10-20 %
Petechien, Ecchymosen	15-20 %
Zahnfleischbluten	10-15 %
Gewichtsverlust, Nachtschweiß	10-15 %
Hautinfiltrate	10 %
Rheologisch bedingte Symptome bei Hyperleukozytose	5 %
Epistaxis	2 %

Da AML, wie MDS, eine Knochenmark Erkrankung mit ähnlicher Pathogenese ist, sind die diagnostischen Verfahren für AML dieselben wie für MDS (siehe 1.5 Myelodysplastische Syndrome (MDS)). Die Therapie von AML unterscheidet sich aber in grundlegenden Punkten zu den MDS. Klassischerweise erfolgt bei AML eine zwei Phasen Therapie, mit der eine komplette Remission (< 5 % Blasten) im Knochenmark erreicht werden soll (Cheson *et al.*, 2003). Initial erfolgt die Induktionstherapie nach dem sogenannten 3+7 Schema. Dabei wird üblicherweise drei Tage der Stoff Anthrazyklin (Idarubicin, Daunorubicin) und sieben Tage Cytosin-Arabinosid (Ara-C) verabreicht (Tallman *et al.*, 2005). Anthrazykline sind Zytostatika, deren Wirkweise hauptsächlich auf die Bindung des Enzyms Topoisomerase II α basiert. Die Bindung an das Schlüsselenzym der Zellteilung führt zu dessen Inaktivierung. Zudem haben Anthrazykline Auswirkungen auf die DNA und die Nukleinsäuresynthese (McGowan *et al.*, 2017). Cytosin-Arabinoside sind wachstumshemmende Zytostatika. Ihre aktive, phosphorylierte Form wird anstelle des Nukleotids Cytidintriphosphat während der Replikation in die DNA eingebaut und wirkt somit zytotoxisch (Ellison *et al.*, 2016). Die kombinierte Therapie mit Anthrazyklin und Ara-C führt im günstigsten Fall zu einer kompletten Remission. Anschließend folgt die Postremissionstherapie (Konsolidierungstherapie), welche zum Erhalt der Remission dient. Diese besteht aus einer Hochdosistherapie mit Ara-C oder einer Stammzelltransplantation (Mayer *et al.*, 1994;

Tallman *et al.*, 2005). Die schlussendliche Wahl der Therapie ist jedoch abhängig von der Risikoeinteilung und dem Allgemeinzustand des Patienten (Dohner *et al.*, 2010).

1.7 Die Rolle von Mesenchymalen Stromazellen (MSZ) in der MDS/AML-Pathogenese

Bis dato beruhte die Forschung der Pathogenese von MDS und AML hauptsächlich auf der Untersuchung der HSPZ, da die beiden Erkrankungen prinzipiell von den HSPZ ausgehen. Durch wissenschaftliche und experimentelle Fortschritte in Bezug auf das Knochenmark-Mikromilieu rückten in den letzten Jahren, neben den HSPZ, andere Komponenten des Knochenmark-Mikromilieus immer mehr in den Fokus (Schepers *et al.*, 2015).

Knochenmark-MSZ stehen im bidirektionalen Austausch mit den hämatopoetischen HSPZ. Aus dem Grund ist auch das Interesse von Knochenmark-MSZ in Bezug auf MDS und AML in den letzten Jahren gewachsen (Schroeder *et al.*, 2016). Es konnte gezeigt werden, dass bei über einem Viertel der MDS-Patienten genetische Veränderungen in Knochenmark-MSZ vorliegen (Blau *et al.*, 2007). Des Weiteren wurden in MDS und auch in AML Veränderungen auf transkriptionaler und translationaler Ebene beschrieben (Bruns *et al.*, 2012; Frisch *et al.*, 2012). In Bezug auf die hämatopoetische Unterstützung sowie die Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit lieferten diverse Studien aus den letzten Jahren widersprüchliche Ergebnisse (Aanei *et al.*, 2012; Lopez-Villar *et al.*, 2009; Varga *et al.*, 2007). Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass die Knochenmark-MSZ der MDS-Subtypen strukturell, epigenetisch und funktionell verändert sind, was ursächlich für eine gestörte Stromaunterstützung ist und zu Defiziten der Hämatopoese in MDS führt (Geyh *et al.*, 2013). Neuste Ergebnisse zeigen, dass der Wachstumsfaktor *transforming growth factor beta-1* (TGF β 1) eine relevante Rolle bei der Pathogenese von Knochenmark-MSZ in MDS und AML spielt (Geyh *et al.*, 2018a). Weiterhin wurde auch gezeigt, dass von Knochenmark-MSZ sekretierte Faktoren wie G-CSF einen Einfluss auf HSPZ haben (Kose *et al.*, 2018). Auf mRNA-Expressions- sowie auf Proteinebene konnte auch eine veränderte Chemokin und Zytokin Expression in MDS-MSZ gezeigt werden. Einige Faktoren, darunter Angiopeotin-1, C-X-C Motif Ligand 1 (*CXCL1*), CC-Chemokinligand2 *CCL2* und Kit-Ligand, zeigten eine signifikant niedrigere Expression in MDS-MSZ. Dagegen exprimierten MDS-MSZ Osteopontin, *CXCL12* und *Jagged-1* mehr als MSZ aus gesunden Probanden (Geyh *et al.*, 2013). Diese veränderten Expressionen könnten mit einer verminderten Stammzellunterstützungskapazität zusammenhängen. Trotz der Veränderung von Knochenmark-MSZ in hämatopoetischen Erkrankungen konnte bis heute nicht eindeutig

geklärt werden, ob MSZ eine aktive Rolle in der Entstehung von MDS und AML spielen oder die Veränderungen die Folge der hämatopoetischen Erkrankungen sind. Aktuelle Forschungsansätze zielen darauf ab die bidirektionale Kommunikation zwischen malignen HSPZ, Zellen des Knochenmark-Mikromilieus und gesunden HSPZ zu entschlüsseln.

1.8 Charakterisierung von mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen mittels Proteom- und Sekretomanalyse

Für die Charakterisierung eines biologischen Systems haben sich globale Ansätze, wie z. B. Transkriptom- und Genomanalyse oder auch Proteomanalyse als aussagekräftige Methoden herausgestellt. Hierbei bietet die Proteomanalyse den Vorteil die Veränderungen von translatierten Genprodukten, den Proteinen, direkt zu analysieren. Als Proteom werden dabei alle Proteine bezeichnet, die zu einem definierten Zeitpunkt und Zustand in einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus vorhanden sind (Wilkins *et al.*, 1996). Das Proteom variiert neben dem Abundanzbereich mit ca. sieben Größenordnungen auch in der Anzahl der Proteinvarianten (10000 bis 20000) (Aebersold *et al.*, 2018; Feller und Aebersold, 2018; Kim *et al.*, 2014). Es ist im Gegensatz zum eher statischen Genom dynamisch und kann sich daher in seiner qualitativen und quantitativen Proteinzusammensetzung aufgrund veränderter Bedingungen (Umweltfaktoren, Temperatur, Genexpression, Wirkstoffgabe, Stresssignale etc.) verändern (Anderson und Anderson, 1996; Liu *et al.*, 2016; Rehm und Letzel, 2010). In der Proteomik werden Proteine in komplexen biologischen Systemen, unter Berücksichtigung möglicher Varianten (Isoformen) und Veränderungen wie posttranslationale Modifikationen, identifiziert und quantifiziert (Jungblut *et al.*, 1999; Lottspeich, 2009). Bis dato beruhte die Quantifizierung von Proteinen in eukaryotischen Zellen einzig auf Basis der Proteine (Gry *et al.*, 2009). Jüngste Fortschritte der auf Massenspektrometrie basierenden Proteinquantifizierungstechniken sowie quantitativer Sequenzierungsmethoden für mRNA halfen in den letzten Jahren ein genaueres Bild der organismenweiten Korrelation zwischen mRNA und Protein zu erhalten und den Einfluss der jeweiligen modifizierenden Parameter.

Dabei zeigte sich, dass mRNA-Konzentration und Proteinmengen bis zu 40 % korrelieren und dies zum jetzigen Zeitpunkt eine Vorhersage der Proteinmenge aus Transkriptom Daten schwierig macht (Maier *et al.*, 2009; Schwanhausser *et al.*, 2013; Wilhelm *et al.*, 2014). Mitunter kleine Veränderungen in den Proteinmengen können jedoch große regulatorische Effekte auf diverse Prozesse in der Zelle haben und folglich enormen Einfluss auf das gesamte System nehmen (Liu *et al.*, 2016). Dies macht eine direkte Analyse der Proteine unerlässlich. Ein weiterer Vorteil der Proteomik ist die Möglichkeit verschiedene

Kompartimente biologischer Systeme zu untersuchen. Hierbei lassen sich Proteine direkt in den jeweiligen Kompartimenten, wie z. B. Zellkern, Zytosol oder extrazellulärer Raum, isolieren und somit analysieren (Lavalley-Adam *et al.*, 2013). So stellt sich ein Teilbereich der Proteomik, die Sekretomanalyse dar. Als Sekretom werden alle Proteine bezeichnet, die von einem biologischen System sekretiert werden (Mukherjee und Mani, 2013). Beispiele von sekretorischen Proteinen umfassen Hormone, Verdauungsenzyme, Zytokine, Chemokine, Interferone (IFNs), koloniestimulierende Faktoren (CSFs), Wachstumsfaktoren und Tumornekrosefaktoren (TNFs) (Mukherjee und Mani, 2013). Sekretierte Proteine, wie z. B. *transforming growth factor β* (TGF β) oder *vascular endothelial growth factor* (VEGF), spielen mitunter eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kommunikation, Matrixremodellierung und Proliferation (Li *et al.*, 2006). Grundsätzlich lässt sich die Sekretion von Proteinen in zwei unterschiedliche Sekretionstypen teilen. Der erste Sekretionstyp ist die klassische Sekretion (Abbildung 5). Diese trifft für die meisten Proteine mit einem Signalpeptid zu. Dieses Signalpeptid steuert ihre Insertion in das endoplasmatische Retikulum (ER), von wo sie über Vesikel abgegeben werden, um den Golgi-Apparat und die Plasmamembran zu erreichen (Palade, 1975; Rabouille, 2017). Der zweite Sekretionstyp ist die unkonventionelle Sekretion (UPS), welche auf Proteinen basiert die sekretiert werden ohne den herkömmlichen ER-Golgi-Sekretionsweg zu passieren. Dieser kann in 4 Mechanismen unterschieden werden. Die ersten 3 Mechanismen umfassen zytoplasmatische „führerlose“ Proteine, die die Plasmamembran durchqueren und im extrazellulären Medium aktiv sind, obwohl sie kein Signalpeptid besitzen. Diese „führerlosen“ Proteine werden auf bis dato drei bekannten Wegen sezerniert: Typ 1: Porenvermittelte Translokation durch die Plasmamembran; Typ 2: ABC-Transporter-basierte Sekretion und Typ 3: Autophagosom/Endosom basiert (Abbildung 5). Die vierte Kategorie umfasst Proteine mit einem Signalpeptid und/oder einer Transmembrandomäne die in das ER eindringen, jedoch auf ihrem Weg zur Plasmamembran den Golgi-Apparat umgehen. Dies wird auch Typ 4- oder Golgi-Umgehungs-Pfad genannt (Abbildung 5) (Rabouille, 2017). Die Analyse unkonventionell sezernierter Proteine gestaltet sich zum jetzigen Zeitpunkt als schwierig, da die Mechanismen der unkonventionellen Sekretion nicht vollständig geklärt sind und nur eine Handvoll verifizierte, unkonventionell sekretierte Proteine bekannt sind (Rabouille, 2017). Entscheidend bei der Analyse von klassischen und unkonventionell sekretierten Proteinen sind bis dato hauptsächlich die Identifizierung von vorhergesagten Signalpeptiden bei Proteinen. Für die Vorhersage von Signalpeptiden und/oder Transmembrandomänen kann auf Datenbanken (z. B. UniProtKB-Datenbank) und Vorhersageprogramme (z. B. SignalP), bei

denen diese Informationen für eine Vielzahl an Proteinen berechnet wird, zurückgegriffen werden (Bendtsen *et al.*, 2004).

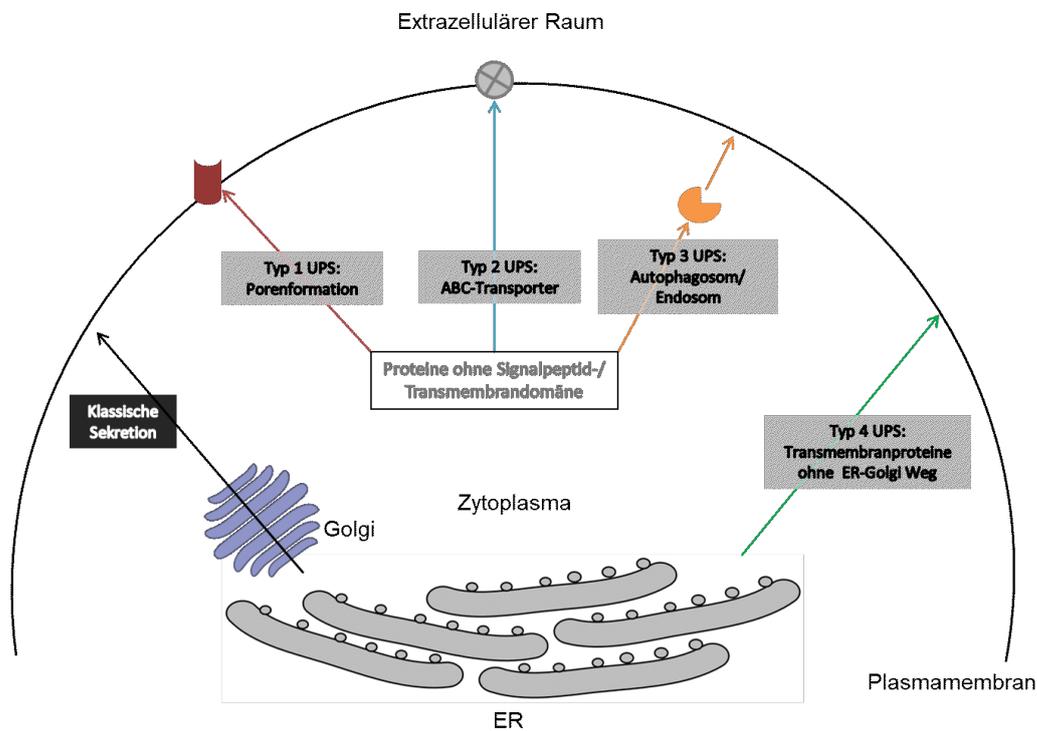


Abbildung 5: Wege der Sekretion. Proteine mit Signalpeptid/Transmembrandomäne können klassisch (schwarz) sekretiert werden oder über den Golgi-Bypass (grün) zur Plasmamembran transportiert werden. Proteine ohne Signalpeptid/Transmembrandomäne können nicht klassisch über Porenbildung (rot), ABC-Transporter (blau) oder membrangebundene Organellen (orange) sekretiert werden (modifiziert nach Rabouille, 2017).

In der Sekretomanalyse werden Proteine, die über unkonventionelle Sekretionswege ausgeschieden werden, häufig vernachlässigt, was zu einem unvollständigen Sekretom führt. Je nach Zellsystem können unkonventionell sekretierte Proteine im Bereich von 50 % des Zellsekretoms liegen (Schira *et al.*, 2015; Waldera Lupa *et al.*, 2015). Eine verlässliche Vorhersage von Proteinkandidaten für unkonventionelle Sekretion ist heute nicht verfügbar. Es gibt jedoch immer mehr experimentelle Daten, die zeigen, dass neben der klassischen Proteinsekretion ein großer Teil der sekretierten Proteine auf alternativen Wegen freigesetzt wird (Pompa *et al.*, 2017; Rabouille, 2017).

Der Goldstandard der Sekretomanalysen basiert auf Zellkultur basierenden Experimenten, bei denen das Medium (Überstand) von kultivierten Zellen, in denen sich die sekretierten Proteine befinden, abgenommen wird (Skalnikova *et al.*, 2011). Proteinreiche Mediumergänzungen, die bei der Kultivierung von Zellen eingesetzt werden, führen zu einem starken

kontaminierenden Hintergrund mit einer großen Menge hochabundanter Proteine. Diese können bei der anschließenden massenspektrometrischen Analyse zu einer Verschiebung des dynamischen Bereichs führen und einer Limitierung der Identifizierung von niedrig abundanten Proteinen (Brown *et al.*, 2012). Zudem kann es durch zelluläre Proteine (Proteom) aus apoptotischen Zellen zu Kontamination kommen (Severino *et al.*, 2013). Eine weitere Herausforderung ist die geringe Konzentration an sekretierten Proteinen (ng/ml -Skala) in volumenreichen Zellkulturüberständen. Diese ist im Vergleich zu z. B. Zelllysaten relativ gering, weswegen man grundsätzlich die Proteinmenge für die Analyse aufkonzentrieren muss (Severino *et al.*, 2013). Die anschließende Analyse von klassisch und unkonventionell sekretierten Proteinen kann mit verschiedenen Techniken (z. B. 2D-PAGE, Massenspektrometrie oder ELISA) durchgeführt werden (Villarreal *et al.*, 2013). Diese Analysen stellen einen wichtigen Bestandteil der Untersuchung der Zell-Zell-Kommunikation dar und können beispielsweise zur Identifizierung von differentiell sekretierten Proteinen in verschiedensten Erkrankungen führen. Da der Fokus dieser Arbeit auf der massenspektrometrischen Analyse von Proteinen liegt, wird darauf im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

1.9 Die Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie

Durch den technischen Fortschritt in der Massenspektrometrie und dem Vorteil der gleichzeitigen Quantifizierung und Identifizierung von tausenden Proteinen wird diese Methodik heutzutage hauptsächlich verwendet (Gillet *et al.*, 2016). Gegenüber anderen Methoden (z. B. 2D-Gelelektrophorese, Immunmarkierung oder De-Novo-Sequenzierung) hat die massenspektrometrische Analyse den Vorteil der hohen analytischen Genauigkeit der Massenbestimmung (0,01-0,001 Da) sowie der Sensitivität (Attomol Bereich) (Mann und Kelleher, 2008). Man unterscheidet zwei massenspektrometrische Ansätze für die Identifizierung von Proteinen: Zum einen die *top-down*- und zum anderen die *bottom-up*-Methode. Die *top-down*-Methode dient der Identifizierung von intakten Proteinen. Die so zu analysierenden intakten Proteine besitzen hohe Ladungszustände, wodurch, nach momentanem Stand der Technik, eine Intaktmessung von komplexen Proteingemischen nur eingeschränkt möglich ist (Catherman *et al.*, 2014). In der *bottom-up*-Methode werden die Proteine zunächst proteolytisch verdaut und nach der massenspektrometrischen Analyse mittels Datenbankabgleichen wieder zusammengesetzt (Catherman *et al.*, 2014). Für beide massenspektrometrischen Methoden werden die komplexen Protein- oder Peptidgemische

meist über eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgetrennt und mittels Elektrosprayionisation, ESI (Fenn *et al.*, 1989) oder die matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisation (*matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI) (Karas und Hillenkamp, 1988) von der Flüssig- in die Gasphase gebracht. Dabei werden niedrig geladene Peptidionen gebildet (+1, +2, +3 und +4). Anschließend folgt die Analyse des Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) im Massenspektrometer (Fenn *et al.*, 1989). Um zusätzliche Informationen über die Sequenz zu erhalten besteht die Möglichkeit der Fragmentierung bestimmter Mutterionen (Tandem MS).

In den letzten Jahren wurden verschiedenste Analysatoren für die Analyse von ESI-Peptiden entwickelt. Zu den Analysatoren gehören der Quadrupol- und Triplequadrupol (Q und QQQ), die lineare Ionenfalle (*linear ion trap*, LIT), das Flugzeit-MS (*quadrupole time-of-flight*, QToF), die dreidimensionale Ionenfalle (*three-dimensional ion trap*, QIT) und die Orbitrap (Haag, 2016). Dabei hat die Orbitrap, als jüngste Entwicklung der Ionenfallen-Massenspektrometer, eine vergleichsweise gute Massenauflösung (bis 200000), hohe Massengenauigkeit (2 ppm) und einen hohen Massenbereich (bislang bis 6000 m/z). Des Weiteren können Analysen im Gegensatz zu anderen Massenspektrometern mit wenig elektrischem Aufwand, ohne Magnetfelder durchgeführt werden (Makarov, 2000). Nichts desto trotz hat jeder dieser Massenanalysatoren bestimmte Vor- und Nachteile und die Wahl ist außerdem abhängig davon, ob eine ungerichtete Analyse oder eine gerichtete Analyse (z. B. *selected reaction monitoring* (SRM)) durchgeführt werden soll. Die ungerichtete Analyse wird vorrangig bei komplexen Proben unbekannter Zusammensetzung verwendet, die gerichtete Analyse hingegen zielt auf sensitive Detektion einzelner Proteine, wie z. B. niedrig Abundante Zytokine, ab. Mittels der massenspektrometrischen Analyse ist es darüber hinaus möglich Abundanzunterschiede von Proteinen zwischen verschiedenen experimentellen Bedingungen relativ, aber auch absolut zu quantifizieren. Die relative Quantifizierung beruht auf dem Verhältnis der Abundanzen in den verschiedenen Probengruppen. Hierbei wird die Information der Abundanz einzelner Proteine zur Kontrollgruppe erhalten. Mit der absoluten Quantifizierung können genaue Konzentrationen bestimmt werden, in dem ein Analyt mit bekannter Konzentration zur quantifizierenden Probe eingebracht und die absolute Menge aus dem Verhältnis der Signalintensitäten bzw. Signalflächen (bekannt/unbekannt) ermittelt wird (Bantscheff *et al.*, 2007; Desiderio und Kai, 1983). Grundsätzlich stehen zwei Quantifizierungsvarianten zur Verfügung. Die markierungsfreie, auch *label-free*, Quantifizierung und die durch metabolische

Markierungsstrategien (z. B. *stable isotope labeling by amino acids* (SILAC)). Die in dieser Arbeit verwendete Quantifizierungsstrategie ist die markierungsfreie Quantifizierung. Diese kann zum einen auf der Intensität des Mutterions (*area under the curve*) oder zum anderen auf dem *spectral counting* basieren (Liu *et al.*, 2004). Beim *spectral counting* werden als Maß für die Abundanz alle aufgenommenen Fragmentspektren genommen. Der Vorteil bei der markierungsfreien Quantifizierung liegt darin, dass die Proteine nicht manipuliert werden, wie z. B. durch eine metabolische Markierung, sondern direkt gemessen werden können. Sie setzt aber dadurch eine hohe Reproduzierbarkeit der Flüssigchromatographie und des analysierenden Massenspektrometers voraus (Cox und Mann, 2011).

1.10 Die Rolle der Bioinformatik in der Proteomanalyse

Die Verarbeitung und Analyse der Datenmengen, die durch massenspektrometrische Analysen von Tausenden von Peptiden und Proteinen entstehen, geschieht auf bioinformatischer Ebene (Bessarabova *et al.*, 2012; Kumar und Mann, 2009). Spezielle Programme bzw. Algorithmen wie SEQUEST (Eng *et al.*, 1994), Mascot (Perkins *et al.*, 1999) oder auch MS Amanda (Dorfer *et al.*, 2014) können Proteine und Peptide aus Peptidmassenspektren identifizieren und darüber hinaus interpretieren. Herausforderungen hierbei sind posttranslationale Modifikationen und auch überlesene Schnittstellen der Protease, welche zu einem enormen Rechenaufwand führen. Um den Unterschied zwischen verschiedenen experimentellen Bedingungen zu interpretieren ist zudem eine Quantifizierung (relativ oder absolut) der Proteine von Nöten. Die Quantifizierung von Proteinen kann mittels verschiedener Programme, die alle ihren eigenen Algorithmus haben und auf den oben genannten Parametern beruhen, durchgeführt werden. Zu den gängigsten Quantifizierungsprogrammen zählen MaxQuant (Cox und Mann, 2008) oder Progenesis (Nonlinear Dynamics).

Für weitergehende funktionelle Analysen der Proteine werden meist Anreicherungsanalysen durchgeführt. Dabei werden häufig Gennamen oder Protein-IDs Ontologie-Begriffen (z. B. Biologischen Prozessen, molekularen Funktionen oder zellulären Kompartimenten) einer Datenbank (z. B. *Gene Ontology*-Datenbank) zugeordnet und zu einem Bezugsproteom in Relation gesetzt (Bessarabova *et al.*, 2012). Für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen stehen sogenannte Netzwerk-Analysen, zum Aufzeigen möglicher veränderter Signalwege oder Prozesse, zur Verfügung, wie z. B. STRING oder Cytoscape. Dabei generiert die integrative Auswertung der verschiedenen Techniken (Proteomik, Transkriptomik und Metabolomik) enorme Datensätze, die die Verwendung bioinformatischer Verfahren unerlässlich macht.

Sekretierte Proteine lassen sich nur bedingt durch bioinformatische Lösungen vorhersagen. Da die Signalpeptid-Hypothese für den klassischen Sekretionsweg gut etabliert ist, können klassisch sekretierte Proteine zuverlässig bestimmt werden indem das Signalpeptid mittels Algorithmen bestimmt wird (Petersen *et al.*, 2011). Die Datenbank UniProtKB beispielsweise wendet 4 Algorithmen an (Phobius (Kall *et al.*, 2007), Predotar (Small *et al.*, 2004), SignalP (Petersen *et al.*, 2011) und TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2007)). Mindestens zwei Verfahren müssen ein positives Signalpeptid als Kandidat für die klassische Sekretion vorhersagen. In der jüngsten Version von UniprotKB (November 2018, 20410 überprüfte menschliche Proteine) wurden 3655 Proteine mit einem Signalpeptid annotiert, obwohl von denen vorhergesagt wurde, dass 2031 Proteine sekretiert werden. Zusammenfassend repräsentieren ungefähr 10 % des menschlichen Proteoms Kandidatenproteine des klassischen Sekretionswegs. Eine verlässliche Vorhersage von Proteinkandidaten für unkonventionelle Sekretion durch bioinformatische Programme ist bis heute nicht verfügbar.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die sekretierten Proteine von Zellen, das Sekretom, spielen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kommunikation und Proliferation. Mesenchymale Stromazellen (MSZ) im Knochenmark stehen durch sekretierte Proteine im bidirektionalen Austausch mit hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSPZ), die für die Blutbildung verantwortlich sind. Im Rahmen dieser Arbeit soll zur Aufklärung der Wechselwirkung von Knochenmark-MSZ und HSPZ, durch Massenspektrometrie-basierte Sekretomanalyse von Knochenmark-MSZ, die Rolle von sekretierten Proteinen im Kontext von myelodysplastischen Syndromen und akuter myeloischer Leukämie geklärt werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden folgende Arbeiten durchgeführt:

- Charakterisierung des Sekretoms von humanen gesunden mesenchymalen Stromazellen (MSZ) aus dem Knochenmark durch massenspektrometrische Analyse.
- Planung und Durchführung einer differentiellen Sekretomanalyse mittels Massenspektrometrie von MSZ aus gesunden sowie MDS- und AML-Patienten unter Verwendung der markierungsfreien MS-Analyse.
- Einfluss von differentiell unterschiedlich sekretierten Proteinen zwischen gesunden und hämatopoetisch kranken Knochenmark-MSZ auf die biologische Funktion von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ)

Mit Hilfe der durchgeführten Arbeiten soll die bisher noch nicht verstandene Rolle der von Knochenmark-MSZ sekretierten Proteine in MDS und AML eingehend untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Materialien

Tabelle 4: Laborgeräte

Produkt	Hersteller
Anti-Statikum, Zerostat 3	Sigma, München
CASY® Zellzähler TTC	Roche
Feinwaage, Entris	Sartorius, Göttingen
Folienschweißgerät	Severin, Sundern
Heizschüttler, MKR 13	Hettich Benelux, Geldermalsen, Niederlande
Heizschüttler, MKR 13	Hettich Benelux, Geldermalsen, Niederlande
Inkubator	Binder, Tuttingen
Laser Scanner, Typhoon 9400	GE Healthcare, München
Magnetrührer, KS250 basic	Ika, Staufen
Massenspektrometer, QExactive	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Milli-Q® Integral Wasseraufbereitungssystem	Merck Millipore, Darmstadt
Molecular Image ChemiDoc XRS+	Bio-Rad, Hercules, USA
PAGE-Kammer, 1D-PAGE	Thermo Fisher Scientific
pH-Meter	Mettler Toledo, Gießen
Pipetten Research Plus	Eppendorf, Hamburg
Plattenlesegerät, DTX 880	Beckman Coulter, Krefeld
Plattformschüttler, KS250 <i>basic</i>	Ika, Staufen
Plattformschüttler, Unimax 1010	Heidolph, Schwabach
Präzisionswaage, 822	Kern, Balingen-Frommern
Präzisionswaage, PCB	Kern, Balingen-Frommern
Probenschüttler, <i>HulaMixer</i>	Thermo Fisher Scientific
Scanner, ViewPix 700	Biostep, Burkhardtsdorf
Semi-Dry Blotter, <i>Multiphor II</i>	Amersham Pharmacia Biotech
Spannungsgerät, Consort E815	Sigma, München
Spannungsgerät, EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech
Tischzentrifuge, Mikro 20	Hettich, Mülheim an der Ruhr
Tischzentrifuge, Mikro 220R	Hettich, Mülheim an der Ruhr
Tissue Lyser <i>LT</i>	QIAGEN, Hilden
Ultraschallbad, Sonorex	Bandelin, Berlin
Vakuumkonzentrator, 5301	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Amicon Ultra 0,5 ml 3K	Merck, Darmstadt
Analytische Säule	Thermo Fisher Scientific, Bremen
CD34 <i>MicroBead Kit</i> (human)	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Dispenser-Spitzen	Eppendorf, Hamburg
ESI-Nadeln	New Objective, Woburn, USA
Falcons 15, 50 ml	Eppendorf, Hamburg
Kapillarsäule	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Kryoröhrchen (2ml)	Greiner bio-one (Frickenhausen)
LS-Magnetsäule	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
MidiMACS Magenetischer Zellseparator	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen
PCR-Reaktionsplatte (96-well)	Applied Biosystems (Warrington, UK)
PCR- <i>Softstripes</i> (0,2ml)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym (Hessisch Oldendorf)
PVDF-Membran Immobilon®-FL	Merck Millipore, Darmstadt
QIAShredder	Qiagen (Hilden)
Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2 µl	Eppendorf, Hamburg
RNase-Free DNase Set	Qiagen (Hilden)
RNeasy <i>Micro Kit</i>	Qiagen (Hilden)
RNeasy <i>Mini Kit</i>	Qiagen (Hilden)
Stripetten	Corning Incorporated Costar (NY, USA)
Vivaspin 15R (3kDa)	Sartorius, Göttingen, Germany
<i>Zeba Desalting Spin Columns</i>	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Zellkulturflaschen (T25 cm ² , T75cm ²)	Corning Incorporated Costar (NY, USA)
Zellkulturplatten (6-, 24-well)	Corning Incorporated Costar (NY, USA)
Zellkulturplatten (96-well)	Greiner bio-one Cellstar (Frickenhausen)

Tabelle 6: Chemikalien

Produkt	Hersteller
<i>5x First Strand Buffer</i>	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt)
Acetonitril	Sigma
Ammoniumbicarbonat	Fluka
Aqua dest. Spüllösung	Delta Select (Dreieich)
Ascorbinsäure	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
Dexamethason	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
Dithiothreitol (DTT)	Serva/ Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt)
DMEM (<i>low glucose 1 g/l, high glucose 4,5 g/l</i>)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
DNase I, <i>Amplification Grade</i>	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt)
dNTP Mix (10mM)	Invitrogen/Life Technologies

	(Darmstadt)
Erythropoietin	Roche (Mannheim)
Ethanol 99,5 %, vergällt	VWR
Ethanol absolut	Merck (Darmstadt)
Ethanol, absolut	Sigma
FBS (<i>Fetal Bovine Serum</i>)	Biochrom AG (Berlin)
FBS (Langzeitzellkultur)	STEMCELL Technologies (Vancouver, Kanada)
Formaldehyd (4 %)	Otto Fischer GmbH & Co KG (Saarbrücken)
HPGM (<i>Hematopoietic Progenitor Growth Medium</i>)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
Iodoacetamid	Sigma
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumhexacyanoferrat III K ₃ [Fe(CN) ₆]	Merck
L-Glutamin-Penicillin-Streptomycin (PSG)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
Lysepuffer	Zentralapotheke Uniklinik Düsseldorf
Magermilchpulver	Fluka
Methylzellulose (MethoCult H4534)	STEMCELL Technologies (Kanada)
MOPS	Sigma
Natriumacetat	Sigma
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Sigma
Natriumdeoxycholat	Sigma
Natriumdodecylsulfat	Sigma
Natriumthiosulfat Pentahydrat	Fluka
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck (Darmstadt)
Nu PAGE 4-12 % Bis-Tris Gel	Thermo Fisher Scientific
Oligo dT18-20 (50µM)	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt)
<i>Page Ruler PreStained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific
PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>) pH7,3	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
Pierce® 660 nm Protein Assay	Thermo Fisher Scientific
RTMC Peptid <i>Retention Mix</i>	Thermo Fisher Scientific
Power SYBR Green PCR Master Mix (2x)	Applied Biosystems (Warrington, UK)
RNase OUT (40U/µl)	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt)
Silbernitrat	Sigma
β-Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
Superscript II™ <i>First Strand Synthesis System for RT PCR</i> (200 U/µl)	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt)
SuperSignal West Femto <i>Maximum Sensitivity Kit</i>	Thermo Fisher Scientific
Taq DNA Polymerase (F-530 Phusion®)	Finnzymes/Thermo Scientific (Schwerte)
Tricin	Sigma
Triethanolamin	Merck, Darmstadt

Trizma base	Sigma
Trypanblau (0,4 %)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
Trypsin/EDTA (10x)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
Tween 20	Sigma

Tabelle 7: Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Anodenpuffer	126 g Harnstoff 35 ml Phosphorsäure (85 %) dH ₂ O (Gesamtvolumen 700 ml)
BDP FL NHS-Ester Stammlösung	0,5 mg BDP FL NHS-Ester 1284 µl Dimethylformamid (DMF)
Bindungspuffer	1 M Glykolsäure 80 % Acetonitril 5 % TFA
Blockierlösung	2 % ECL Prime in 50 ml TBST
DTT	1,4 M in 100 mM NH ₄ HCO ₃
DTT für In-Gel-Verdau	7,14 µl 1,4 M DTT 995 µl 50mM NH ₄ HCO ₃
Entfärbelösung 1	30 mM Natriumthiosulfat
Entfärbelösung 2	100 mM Kaliumhexacyanoferrat
Extraktionslösung (Gelbande)	50 % TFA (aus 0,1 %iger Lösung) 50 % Acetonitril
Größenstandard	Page Ruler PreStained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific
Hinterkolbenspülung	10 % Isopropanol
HPGM Proliferationsmedium für CD34+	HPGM 20 % FBS 1 % PSG, 100 U/ml IL3, IL6 und SCF (10 ng/ml) FLT3 (20 ng/ml)
IAA für In-Gel-Verdau	55 mM Iodacetamid in 50mM NH ₄ HCO ₃
Kathodenpuffer	300 mM Aminocapronsäure 30 mM Tris
LC-MS Lösemittel A	0,1 % TFA
LC-MS-Lösemittel B	0,1 % FA 84 % ACN
Lysepuffer	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 4 % Chaps 30 mM Tris-HCL
MACS Puffer	500 ml PBS 1,5 ml HAS (5 %) 1,5 ml EDTA (0,5 M)
MOPS Puffer, 20-fach konzentriert	1M MOPS 1M Tris Base

	2 % SDS 20 mM EDTA pH 7,7
MSZ Kulturmedium	DMEM (<i>low glucose</i>) 30 % FBS 1 % PSG
MSZ Kulturmedium (Serumfrei)	DMEM (<i>low glucose</i>) 1 % PSG
RLT-Puffer + β -Mercaptoethanol	5 ml RLT-Puffer (Qiagen) 50 μ l β -Mercaptoethanol
SDS-Probenpuffer, 4-fach konzentriert	600 mM DTT (wurde bei Bedarf verwendet) 30 % Glycerin 12 % SDS 150 mM Tris/HCl pH 7,0 wenig Bromphenolblau
Silberfärbung Lösung A	50 % EtOH 10 % Essigsäure
Silberfärbung Lösung B	30 % EtOH 500 mM Natriumacetat 8 mM Natriumthiosulfat
Silberfärbung Lösung C	6 mM Silbernitrat
Silberfärbung Lösung D	236 mM Natriumcarbonat
Silberfärbung Lösung E	236 mM Natriumcarbonat 0,01 % Formaldehyd
Silberfärbung Lösung F	50 mM EDTA
TBS, 10-fach konzentriert	100 mM Tris Base 1,5 M NaCl pH 8
TBST	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20
Trypsin Lösung für Proteinverdau	0,033 μ g/ μ l Trypsin in 50 mM NH_4HCO_3
Ureapuffer	7 M Harnstoff 2M Thioharnstoff 30 mM Tris-HCL
Waschlösung A	10 mM Ammoniumhydrogencarbonat
Waschlösung B	50 % 5 mM Ammoniumhydrogencarbonat 50 % Acetonitril (v/v)

3.1.2 Primer

Für die PCR Analysen wurden viele der in Tabelle 8 aufgeführten Primer eigenständig mit den Online-Plattformen NCBI, Primer Blast (NCBI- Blast- Tool), Ensembl Genome Browser und Oligo Analyzer-Integrated DNA Technologies gestaltet. Bestellt wurden alle Primer bei der Firma Biologio (Nijmegen, Niederlande).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

<http://www.ensembl.org/index.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer>

Tabelle 8: Auflistung verwendeter Primer

Primer Paar	NM Sequenz	Sequenzen 5' _ 3'	Annealing-temperatur	Produktgröße [bp]
Gapdh	NM_002046.4	fwd: TGCACCACCAACTGCTTAGC rev: ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT G	60 °C	110
FSTL3	NM_005860.2	fwd: GGTGCTCCAGACTGATGTC rev: CGCACGAATCTTTGCAGG	58 °C	149

3.1.3 Antikörper

Tabelle 9: Primäre Antikörper

Antikörper	Quelle (Bestellnr.)	Spezies	Verdünnung WB
Anti-SMAD2	Cell Signaling (5339)	Hase monoklonal	1:1000
Anti-Phospho-SMAD2	Cell Signaling (3108)	Hase monoklonal	1:1000
AGT	Thermo Fisher Scientific (PA5-11572)	Hase polyklonal	1:1000
Serpine1	R&D Systems (MAB1786)	Maus monoklonal	1 µg/ml
Beta-Tubulin	Abcam (ab6046)	Hase polyklonal	1:500

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Quelle (Bestellnr.)	Spezies	Verdünnung WB
Anti-Hase IgG HRP	Cell Signaling Technology (7074)	Ziege	1:5000
Anti-Hase IgG Alexa Fluor 555	Invitrogen (A21429)	Ziege	1:5000
Anti-Maus IgG HRP	Cell Signaling Technology (7076)	Pferd	1:5000

3.1.4 Software

Tabelle 11: Verwendete Software

Software	Hersteller
Chromeleon	Thermo Fisher Scientific
Mascot	Matrix Science, London, UK
Max Quant	Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried
Perseus	Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried
Progenesis	Nonlinear Dynamics
Proteome Discoverer	Thermo Fisher Scientific
Tune/X-Calibur	Thermo Fisher Scientific

3.1.5 Zelllinien

In den Behandlungsexperimenten wurden die beiden Suspensionszelllinien HL-60 (Akute promyelozytische Leukämie) und THP-1 (AML Zelllinie) eingesetzt. Beide Zelllinien stammen vom DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

3.1.6 Patientencharakteristika

Die in dieser Arbeit verwendeten MSZ und HSPZ wurden aus dem Knochenmark von Patienten mit MDS oder AML Diagnose, nach Erteilung deren Einverständnisses, isoliert. Als gesunde Kontrollen dienten MSZ und HSPZ aus Knochengewebe von hämatologisch gesunden Patienten, die in der hiesigen Orthopädischen Klinik einen Hüftersatz erhielten.

Tabelle 12: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten MDS/AML-Patienten und gesunden Probanden für die Aufarbeitung von MSZ und/oder HSPZ

Probanden	Anzahl	Medianes Alter
Gesunde Probanden	26	68 (13 – 83)
Männlich	16	
Weiblich	10	
MDS-Patienten	16	63 (42 - 89)
Männlich	12	
Weiblich	4	
RCMD	6	
MDS-MLD	1	
MDS-RS MLD	3	
MDS EB1	1	
MDS EB2	5	
AML-Patienten	24	57 (26 - 79)
Männlich	14	
Weiblich	10	
AML-NOS	12	
Sekundäre AML (sAML)	12	

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Zellkulturarbeit wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 21 % O₂ und 5 % CO₂ kultiviert.

3.2.1.1 Isolation der mononukleären Zellfraktion aus dem Knochenmark

Das Volumen der Knochenmarkprobe wurde auf 15 ml Ficoll (LSM 1077) aufgeschichtet und, um die mononukleäre Zellfraktion (MNZ) zu isolieren, zentrifugiert (ohne Bremse, 835 g/ 20 min/ 20 °C). Aus den entstandenen Phasen wurde die Interphase (weißer Ring) unterhalb des Plasmas abgenommen und in ein neues 50 ml Falcon überführt. Und dann nach zweimaligem Waschen mit PBS erneut zentrifugiert (bei 300 g, 10 min bei 4 °C). Anschließend folgte die Hämolyse der Erythrozyten (Pellet) mit einer 4 °C kalten Ammoniumchlorid-Lösung. Nach 5-10 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) und anschließendem zweimaligem Waschen mit MACS Puffer (500 ml PBS + 1,5 ml HSA (5 %) + 1,5 ml EDTA (0,5 M)) wurde die Lösung zentrifugiert (300 g, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde erneut in 50 ml MACS Puffer resuspendiert und die Zellzahl am CASY® Zellzähler TTC (Roche) bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation (300 g, 10 min, 4 °C) wurde die MNZ Fraktion für die Generierung von MSZ und/oder zur Isolation von CD34+ HSPZ verwendet (siehe Punkt 3.2.1.2 und 3.2.1.3).

3.2.1.2 Isolation und Kultivierung der CD34+ HSPZ

Für die Isolation der CD34+ HSPZ wurde der Überstand der in 3.2.1.1 zentrifugierten MNZ verworfen und die CD34+ HSPZ mittels magnetischer Zellseparation (Midi MACS Technik (Miltenyi) nach dem Protokoll (Tabelle 13) des Herstellers durchgeführt.

Tabelle 13: Protokoll zur Isolation der CD34+ HSPZ

Nummer	Schritt	Ausführung
1	Färbung der MNZ	1x10 ⁸ MNZ in 300 µl MACS Puffer resuspendieren und 100 µl Blockungsreagenz + 100 µl Antikörper (<i>magneto bead</i> konjugiert)
2	Inkubation	30 min Inkubation bei 4 °C
3	Waschen	Auffüllen auf 50 ml mit MACS Puffer
4	MACS Isolation	<ul style="list-style-type: none"> • 3 ml MACS Puffer zur Äquilibration der LS-Säule im Magnethalter • Aufnahme der MNZ in 1-2 ml MACS Puffer und auf LS-Säule überführen • Nach Durchlauf, LS Säule zweimal mit 7 ml MACS Puffer spülen • Elution der Probe mit 7 ml MACS Puffer und Druckkolben außerhalb des Magnethalters
5	Zentrifugation	Zentrifugation der HSPZ (300 g, 10 min, 4 °C)
6	Zellzahlbestimmung	Zellzahlbestimmung mittels CASY

Für CD34+ HSPZ Pellets wurden diese bei 6000 g, 5 min, 4 °C zentrifugiert und anschließend in RLT-Puffer + β-Mercaptoethanol aufgenommen und bei -80 °C eingefroren, bevor die RNA Isolation durchgeführt worden ist (3.2.2.1). Für die Behandlungsversuche der CD34+ HSPZ wurden die Zellen in CD34+ HPGM Proliferationsmedium aufgenommen und 0,2x10⁶ Zellen in 3 ml Medium auf eine 6-Well Platte gegeben und je nach Experiment mit Faktoren in Ko-Kultur behandelt. Die Zellen wurden 3 Tage kultiviert und anschließend geerntet. Dafür wurden die 3 ml Medium mit den Zellen in 15 ml Falcons überführt. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels CASY wurden 400 Zellen für den CFU abgenommen (s. 3.2.1.7). Die Falcons wurden anschließend mit PBS auf 15 ml aufgefüllt und zentrifugiert (300 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und es folgte ein Waschschrift mit PBS. Nach erneuter Zentrifugation (300 g, 10 min, 4 °C) wurden die Pellets in RLT-Puffer + β-Mercaptoethanol aufgenommen und bei -80 °C eingefroren.

3.2.1.3 Generierung und Kultivierung der MSZ aus dem Knochenmark

Die MNC Fraktion aus dem Knochenmark (s. 3.2.1.1) wurde pelletiert und in einer Zelldichte von 2x10⁷ – 3x10⁷ auf eine T75 cm² Zellkulturflasche in MSZ Medium (DMEM *low glucose*, 30 % FBS, 1 % PSG) als Primärkultur ausplattiert. Der Mediumwechsel erfolgte dabei wöchentlich. Das Auftreten von Kolonien in den Primärkulturen der MSZ konnte nach 14-21 Tagen beobachtet werden (probenabhängig). Zellkolonien mit > 50 Zellen wurden mikroskopisch ausgezählt und auf 1x10⁷ MNC normiert. Bei einer MSZ Konfluenz von 70-

80 % wurden die Zellen geerntet. Für die Ernte wurde das Medium aufgefangen, die Zellen mit PBS gespült und anschließend mit PBS bedeckt und 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Ablösung der Zellen erfolgte mit 1x Trypsin in PBS für 5 min bei 37 °C und wurde mikroskopisch kontrolliert, bevor, durch leichte Schläge gegen die Zellkulturflasche, die adhären Zellen abgelöst wurden. Das Stoppen der Enzymreaktion des Trypsins erfolgte durch die Zugabe des zuvor aufgefangenen Mediums. Nach Zentrifugation (397 g, 7 min, 4 °C) wurde das Pellet in neuem MSZ Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden, je nach Experiment die Zellen neu ausplattiert oder pelletiert (durch einen zusätzlichen Waschschrift mit PBS).

3.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Die Zellen der MSZ wurden mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dafür wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau (0,4 %) vermischt. Tote Zellen erschienen dunkelblau durch die Einlagerung des Trypanblaus in die Zellmembran. Die lebenden Zellen wurden in 4 Großquadraten gezählt und die Zellzahl mittels folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl} / 4 \times 2 \times 10000 \times \text{Volumen (ml)}$$

3.2.1.5 Serumfreie Kultivierung der MSZ

Für die massenspektrometrischen Sekretom- und Proteomanalysen wurde die MSZ für 48 Stunden serumfrei kultiviert, um mögliche Serumkontaminationen zu vermeiden. Dafür wurden die kultivierten MSZ (s. 3.2.1.3) in Passage 3-4 bei einer Konfluenz von ca. 80 % zweimal mit PBS gewaschen und für 48 Stunden mit MSZ Kulturmedium (serumfrei) inkubiert. Nach 48 Stunden wurde der Überstand abgenommen (Sekretom) und mit einem 0,45 µm Filter steril filtriert. Die Zellpellets wurden wie in 3.2.1.3 beschrieben geerntet.

3.2.1.6 Wachstumskinetik

Um das Wachstumsverhalten von HSPZ zu analysieren, wurden die kumulativen Populationsverdopplungen (*Cumulative Population Doublings*, CPD) berechnet:

$$PD = \frac{\log\left(\frac{n_1}{n_0}\right)}{\log 2}$$

$$CPD = \sum PD$$

PD= Population doublings (dt. Populationsverdopplungen)

n₀= Anzahl ausplattierter Zellen

n₁= Anzahl geernteter Zellen

3.2.1.7 Der *Colony Forming Unit* (CFU)-basierte Adhäsionsassay

Während der Differenzierung zu reifen Blutzellen durchlaufen die Nachkommen von HSPZ Zwischenstufen, einschließlich multipotentieller Vorläuferzellen (HSPZ), bevor sie reif werden (Seita und Weissman, 2010). Wenn HSPZ in einer geeigneten halbfesten Matrix kultiviert werden, proliferieren und differenzieren individuelle Vorläuferzellen, die koloniebildende Einheiten (CFUs) genannt werden. Und sie bilden diskrete Zellcluster oder Kolonien aus. Somit liefern die Anzahl und Typen von Kolonien, die in einem *Colony Forming Unit* (CFU)-basierte Adhäsionsassay gezählt wurden, Informationen über die Häufigkeit und Arten von Vorläuferzellen, die in der ursprünglichen Zellpopulation vorhanden sind. Zusätzlich kann man ihre Fähigkeit der Proliferation und Differenzierung analysieren. Für den Assay wurden 400 HSPZ mit Methylzellulose Medium (MethoCult H4434, Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada) in eine 24 Multiwell Platte als Duplikat für 14 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Erythrozyten Vorläuferzellen (BFU-E, CFU-E) und Granulozyt- Makrophagen Vorläuferzellen (CFU-GM, CFU-G und CFU-M) wurden nach Morphologie, Größe und Farbe der Kolonien mikroskopisch gezählt und der Mittelwert der Kolonien zwischen den Duplikaten gebildet.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 RNA Isolation

Die RNA Isolation von MSZ Pellets und HSPZ erfolgte je nach Zellzahl mit dem RNeasy Mini oder Micro Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers. Zusätzlich wurde der optionale DNase Verdau durchgeführt.

3.2.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration mittels Nanodrop® ND-1000

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte durch ein Spektralphotometer (Nanodrop® ND-1000). Eingesetzt wurden 1,5 µl Probe.

3.2.2.3 cDNA Synthese durch reverse Transkriptase

Die cDNA Synthese der MSZ und HSPZ erfolgte durch die Superscript II Reverse Transcriptase und Oligo dT Primer nach Herstellerangaben (Invitrogen) an einem Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf. Dafür wurde die RNA zunächst mit DEPC behandeltem Wasser, dNTP Mix und Oligo dT Primer (Endvolumen 20 µl) bei 65 °C, 5 min denaturiert. Nach 1 min Abkühlung auf Eis wurde der Master Mix II (5x First Strand Puffer, DTT (0,1 mM), RNase OUT (40 U/ml)) zu den einzelnen Proben hinzugegeben und bei 42 °C, 50 min inkubiert. Die Inaktivierung der Reaktion erfolgte bei 70 °C für 15 min bevor die Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) gestartet werden konnte.

3.2.2.4 Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) ermöglicht die Quantifizierung der Produkte durch Fluoreszenz Messungen, die pro Zyklus, während der Messungen erstellt werden. Die Fluoreszenz nimmt dabei mit vorhandenem PCR Produkt proportional zu. Dafür wurden der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems) und oligospezifische Primer verwendet. Dabei erfolgte die Reaktion in Duplikaten und das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente als Referenzkontrolle. Die Änderung der Genexpression wurde durch die $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet.

3.2.3 Proteinanalytik

3.2.3.1 Zellaufschluss

Für den Aufschluss der MSZ Zellpellets (Proteom) wurde das Gewicht der Pellets bestimmt und die dreifache Menge an Lyse-Puffer hinzugeben. Anschließend wurde mittels einer 5 mm Stahlkugel eine Minute bei 40 Hz im *Tissue Lyser* (Qiagen) geschüttelt und dadurch lysiert. Danach folgte die Beschallung im Ultraschallbad für 6 mal 10 Sekunden. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 4 °C und 16000 g für 15 min abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal mit doppelter Menge Lyse-Puffer wiederholt. 1-3 µl des Lysates wurden zur Proteinbestimmung genutzt (s. 3.2.3.3).

Die HSPZ Zellpellets wurden gleichzeitig mit der RNA Extraktion (s. 3.2.2.1) aufgeschlossen. Dies erfolgte mit dem RNeasy *Mini* oder *Micro Kit* (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers. Die Proteine wurden hierbei durch eine Aceton-Fällung mit dem 4-fachen Volumen an Aceton präzipitiert, anschließend abzentrifugiert und gewaschen, bevor eine Proteinbestimmung durchgeführt wurde.

3.2.3.2 Aufarbeitung der MSZ Überstände (Sekretome)

Da die Proteinkonzentration in den geernteten Überständen (Sekretome) der MSZ sehr gering war, wurden diese in einem ersten Schritt aufkonzentriert. Dafür wurden Vivaspin 15R Ultrafiltrationssäulen mit einer 3 kDa Molekularsperre benutzt (Sartorius, Göttingen, Germany). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die aufkonzentrierten Sekretomproben wurden anschließend mit Zeba™ *Spin Desalting Columns* (7K MWCO, Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben entsalzt, eingetrocknet und in Ureapuffer aufgenommen. Davon wurden 4 µl für die Proteinkonzentrationsbestimmung eingesetzt.

3.2.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der MSZ und HSPZ Proteinkonzentrationen erfolgte über eine Absorptionsmessung bei 660 nm mittels Pierce 660 Protein Assay. Dieser basiert auf der Bindung eines Metallkomplexfarbstoffes an Proteine, bei der es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums kommt. Dabei ist die Absorption und damit die Farbintensität proportional zur Proteinkonzentration. Die Methode eignet sich für Konzentrationsbereiche zwischen 25 µg/ml und 2 mg/ml. Als Referenz diente eine BSA-Standardreihe (0 ng/µl – 2 µg/µl). Die Messung erfolgt in je zwei technischen Replikaten für anschließende Mittelwertberechnung. Anhand der im Gerät gemessenen Absorption wurden über die Standardreihe (Referenz) die Proteinkonzentrationen berechnet. Die Sekretomproben wurden im Verhältnis 1:5 und die Proteomproben im Verhältnis 1:2 mit Elix®-H₂O verdünnt. Anschließend wurden 10 µl Probe und 10 µl BSA-Standardreihe in eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert und gemessen.

3.2.3.4 Fluoreszenzmarkierung mit BDP FL NHS-Ester

Um die Gesamtproteinmenge von HSPZ nach *Semidry* Western Blot Analysen darzustellen wurde diese vorausgehend mit BDP FL NHS-Ester markiert. BDP FL NHS-Ester ist ein aminreaktiver Fluoreszenzfarbstoff für den 488-nm-Kanal (Cy2). Die für den Western Blot eingesetzte Proteinmenge wurde mit Ureapuffer auf 15 µl aufgefüllt und mit 1 µl (5 pM/µl) Farbstoff in einem dunklen Reaktionsgefäß markiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei 4 °C im

Dunkeln wurden die Proben mit 4x Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 40 °C inkubiert. Daran schloss die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese an. Die Gesamtproteinmenge wurde nach den *Semidry* Western Blot Analysen im Molecular Image ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) im Cy2 Kanal bestimmt.

3.2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Schon 1984 wurden Proteine über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Smith, 1984). Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) führt zu einer Denaturierung von Proteinen und diese nehmen dabei eine negative Ladungsverteilung an. Im Polyacrylamidgel können kleinere Proteine leicht durch das Gel Richtung Anode laufen, während große Proteine zurückgehalten werden. Für die SDS-Page wurden kommerziell erhältliche 4-12 % Bis-Tris Gele (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Ein Proteinstandard (*Page Ruler Prestained Protein Ladder*) mit bekannter Größe wurde benutzt, um die Größe der Proteine in der Probe abzugleichen. Die Laufzeit einer vollständigen Proteinseparation betrug 15 min bei 50 V und 1 h bei 200 V. Für massenspektrometrische Analysen diente ein Kurzgel bei dem die Proben vollständig ins Gel einliefen, bevor diese gestoppt wurde und die einzelnen Banden für den In-Gel-Verdau vorbereitet wurden. Die Laufzeit lag bei 15 min bei 50 V.

3.2.3.6 Silberfärbung

Unmittelbar nach der SDS-PAGE wurden die Proteine mittels Silberfärbung visualisiert (Tabelle 14). Die Färbung basiert auf dem Ausfällen der Proteine (Fixierung) im sauren Milieu und der Färbung von proteinhaltigen Bereichen mit Silbernitrat (Nesterenko *et al.*, 1994).

Tabelle 14: Reihenfolge und Inkubationszeiten der Silberfärbung

Färbeschritt	Lösung	Dauer
Fixierung	A	15 min – 24 h
Inkubation	B	15 min – 24 h
Wässern	H ₂ O	3 x 5 – 15 min
Färbung	C	15 – 30 min
Wässern	H ₂ O	Einige Sekunden
Spülen	D	1 min
Entwicklung	E	1 – 7 min
Stoppen	F	20 min
Waschen	H ₂ O	10 min

3.2.3.7 Semidry Western Blot

Nach der vollständigen Proteinseparation mittels SDS-Page erfolgte der Transfer der Proteine durch ein angelegtes elektrisches Feld auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Trägermembran. Dafür wurden je zwei Filterpapiere in Anodenpuffer und Kathodenpuffer eingelegt. Die PVDF Membran wurde mit 100 % Isopropanol aktiviert und anschließend mit Anodenpuffer gewaschen. Danach wurde wie folgt auf die Anoden-Platte des *Blotting*-Gerätes geschichtet: Anoden-Filterpapiere, PVDF-Membran, SDS-Page-Gel, Kathoden-Filterpapiere. Bevor die Kathodenplatte aufgelegt wurde, wurden mögliche Luftblasen entfernt. Der Transfer erfolgte eine Stunde bei 2 mA pro cm². Um frei unspezifische Bindestellen zu sättigen wurde die PVDF Membran 30 min mit Blockierlösung inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation des Primärantikörpers (in 1 ml Blockierlösung) bei 4 °C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T folgte die Inkubation des HRP-konjugiertem Sekundärantikörpers (in 15 ml Blockierlösung) für 1,5 Stunden im Dunkeln. Anschließend folgten zwei Waschschriffe mit TBS-T bevor der Immunoblot zum Scannen bereit war.

3.2.3.8 Detektion von Immunoblots mittels ECL

Die Detektion der Antiköpersignale des Immunoblots erfolgte mittels *Enhanced-Chemilumineszenz* (ECL). Dafür wurde das SuperSignal West Femto Maximum *Sensitivity Kit* von Thermo Fisher Scientific benutzt, welches auf eine hochsensitive Detektion von Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxide*, HRP) markierten Antikörpern im niedrigen Femtogramm-Bereich basiert. Der Immunoblot wurde dafür mit 1 ml des frisch angesetzten Reagenzes aus Peroxid-Puffer und Luminol *Enhancer*-Lösung des Kits (Verhältnis 1:1) für 1 min inkubiert und im Anschluss im Molecular Image ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) im Modus Chemi High Resolution gescannt.

3.2.4 LC-MS/MS-Analysen

3.2.4.1 Probenvorbereitung für einen In-Gel-Verdau

Für die massenspektrometrischen Analysen wurden die silbergefärbten Gelstücke aus dem Kurzgel mit einem Skalpell ausgeschnitten und entfärbt (Entfärbelösung 1 und 2, Verhältnis 1:1). Nach Entfärbung folgte ein Waschschriff, bei dem die Gelstücke dreimal alternierend mit Waschlösung A und Waschlösung B für 3-5 min gewaschen und im Vakuumkonzentrator getrocknet wurden. Die trockenen Gelstücke wurden im Anschluss reduziert und alkyliert. Dafür wurden die Gelstücke mit 50 µl 10 mM Dithiothreitol (DTT) in 50 mM NH₄HCO₃ versetzt und für 45 min bei 56 °C inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes folgte zügig die

Alkylierung für 30 min im Dunkeln mit 50 µl 55 mM Iodacetamid (IAA) in 50 mM NH_4HCO_3 . Anschließend folgten erneut je zwei alternierende Waschschrte mit Waschlösung A und B. Die Gelstücke wurden im Vakuumkonzentrator getrocknet und für den In-Gel-Verdau mit Trypsin weiterverwendet oder zunächst bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Für den Trypsinverdau wurden, unter Berücksichtigung des Enzym-zu-Protein-Soll-Verhältnisses von 1:50, 0,033 µg/µl konzentrierte Trypsinlösung auf die Banden gegeben und über Nacht bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Am nächsten Tag folgte die Extraktion der Peptide mittels Extraktionslösung. Diese wurde auf die Gelstücke gegeben, 15 min in das Ultraschallbad gestellt und der Überstand mit den Peptiden abgenommen. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal durchgeführt bevor die zusammengeführten Überstände eingetrocknet wurden. Das eingetrocknete Peptidgemisch wurde für die darauffolgende LC-MS/MS-Messung in 0,1 % TFA rekonstituiert. Um eine absolute Quantifizierung nach der LC-MS/MS-Messung durchzuführen wurde ein Kalibrantenprotein in jede Probe eingebracht. Dafür wurde ein RTMC Retentionsmix (Pierce™ Peptide Retention Time Calibration Mixture, Thermo Fisher Scientific), bestehend aus 15 schwermarkierten Peptiden, verwendet. Auf diesen schwermarkierten Peptiden konnte im Folgenden in der bioinformatischen Auswertung quantifiziert werden und somit eine Aussage über absolute Proteinkonzentrationen getroffen werden.

3.2.4.2 Massenspektrometrie

Die Analyse der vorbereiteten Proben erfolgte mittels Massenspektrometrie. Hierbei wurde der *bottom-up* Ansatz gewählt, bei der die Identifizierung anhand der Informationen zu Peptidmasse (Mutter-Ion/Vorläufer-Ion) und Fragment-Ion aus der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) über Sequenzdatenabgleich stattfindet. Durch die Komplexität der Proben war eine vorgeschaltete Auftrennung der Probe durch eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) erforderlich. Quantitative Vergleiche zwischen Proben und Patientengruppen erfolgten über markierungsfreie relative Quantifizierung.

3.2.4.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) für Peptidgemische

Für die Auftrennung der Peptidgemische wurde ein Flüssigkeitschromatographie System (Ultimate 3000, Dionex/Thermo Fisher Scientific) verwendet. Dieses entnahm der Probe 15 µl und spülte diese auf die Vorsäule (Acclaim PepMap C18, 100 µm Innendurchmesser, 3 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße, 2 cm Länge). Dieser Schritt dient zur Vorauftrennung und Entfernung von Kontaminationen. Im Anschluss folgte die analytische Säule (Acclaim

PepMap C18, 75 µm Innendurchmesser, 2 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße, 25 cm Länge). Der Gradient (120 min) und der Spül- und Equilibrierungsschritt (60 min) sind in Tabelle 15 aufgelistet. Nach Auftrennung über die analytische Säule wurden die Peptide über eine Nanoelektrospray-Ionisationsquelle in das Massenspektrometer überführt.

Tabelle 15: Teilschritte des 120 min. HPLC-Gradienten

Zeit [min]	Anteil Lösemittel B [%]	Flussrate [µl/min]
0 – 10	4,0	0,3
10 – 12	4 – 10	0,3
12 – 29	10	0,3
12 – 47	20	0,3
47 – 64	30	0,3
64 – 65	40	0,3
65 – 69	95	0,3
69,5 – 71	4	0,3
71 – 75	95	0,4
75,5 – 81	4	0,4
81 – 85,5	50	0,4
85,5 – 95,5	96	0,4
95,5 – 120	4	0,4

3.2.4.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gezielte Analysen mittels *Selected Reaction Monitoring* (SRM)

Für die Auftrennung der Peptidgemische zur gezielten Analyse einzelner Proteine mittels SRM wurde ein Flüssigkeitschromatographie System (Ultimate 3000, Dionex/Thermo Fisher Scientific) verwendet. Dieses entnahm 15 µl der Probe und spülte diese auf die Vorsäule (Acclaim PepMap C18, 100 µm Innendurchmesser, 5 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße, 0,5 cm Länge). Dieser Schritt dient zur Vorauftrennung und Entfernung von Kontaminationen. Im Anschluss folgt die analytische Säule (Acclaim PepMap C18, 75 µm Innendurchmesser, 2 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße, 15 cm Länge). Der Gradient (40 min) und der Spül- und Equilibrierungsschritt (20 min) sind in Tabelle 16 aufgelistet. Nach Auftrennung über die analytische Säule wurden die Peptide über eine Nanoelektrospray-Ionisationsquelle in das Massenspektrometer überführt.

Tabelle 16: Teilschritte des 60 min. HPLC-Gradienten

Zeit [min]	Anteil Lösemittel B [%]	Flussrate [$\mu\text{l}/\text{min}$]
0 – 20	4,0	0,3
20 – 21	35	0,3
21 – 23	96	0,3
23 – 27	4	0,3
27 – 29	40	0,3
29 – 33	96	0,3
33 – 34	96	0,3
34 – 39	4	0,3
39 – 45	96	0,3
45 – 60	4	150

3.2.4.5 Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrische Analyse der Peptidgemische wurde mit einer Q Exactive Plus, einem Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer, durchgeführt. Die Q Exactive Plus charakterisiert, durch die Analyse von Vorläufer- und Fragment-Ionen mittels Orbitrap, ein hohes Auflösungsvermögen und eine hohe Massengenauigkeit. Das Massenspektrometer war online an ein HPLC-System gekoppelt und die Analyten wurden mittels Nanoelektrosprayquelle (nano-ESI) ins Massenspektrometer geleitet. Die Einstellungen des Massenspektrometers sind in Tabelle 17 aufgelistet.

Tabelle 17: Einstellung des Massenspektrometers (Q Exactive Plus)

Spray Spannung (+)	1400 V
Kapillartemperatur	250 °C
Polarität	Positiv
MS1-Auflösung	70000
MS2-Auflösung	17500
MS1-Scan Bereich	200 bis 2000 m/z
MS2-Scan Bereich	abhängig vom Vorläufer-Ion
TopN	20
Isolationsfenster Quadrupol	4,0 m/z
<i>Automatic Gain Control</i> (MS1)	3e6
<i>Automatic Gain Control</i> (MS2)	1e5
Maximale Ionenzeit MS1	50 ms
Maximale Ionenzeit MS2	50 ms
Dynamischer Ausschluss	10 s
Fragmentierungsmethode	HCD
Kollisionsgas	Stickstoff
Kollisionsenergie	30 %

Die gezielte Detektion eines einzelnen (bekannten) Analyten aus einer komplexen Mischung wurde mittels “Selected Reaction Monitoring” (SRM) an einer TSQ Vantage, einem Triple-Quadrupol Massenspektrometer, durchgeführt. Auch dieses war online an ein HPLC-System gekoppelt und die Analyten wurden mittels Nanoelektrosprayquelle (nano-ESI) ins Massenspektrometer geleitet. Dafür wurden pro Peptid eines Proteins drei Übergänge, also Fragmentierungen eines spezifischen Vorläufer-Ions in Fragment-Ionen, ausgewählt und in einem 60 min Gradienten gemessen (Tabelle 16). Sowohl Vorläufer- als auch Fragment-Ionen wurden dahingehend ausgewählt, dass sie mit der gewählten Methode gut und in ausreichendem Maße ionisierbar und die Fragment-Ionen spezifisch für die spezifische Masse des Vorläufer-Ion waren. Die *cycle-time* beschreibt die Zeitspanne, die das Instrument für Separation und Detektion jedes einzelnen Übergangs braucht. Diese ist direkt proportional zur sogenannten Verweilzeit (*dwel-time*), welche für die Analyse jedes einzelnen Übergangs notwendig ist. Beide Parameter beeinflussen sowohl die Anzahl möglicher Übergänge als auch die Sensitivität und wurden für jedes Experiment optimiert.

3.2.4.6 Datenanalyse der massenspektrometrischen Analysen

Die Rohdaten nach den massenspektrometrischen Messungen wurden über eine mehrschrittige Analyse ausgewertet. Die Proteinidentifizierung erfolgte über Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific) mit dem MS Amanda Algorithmus und dem Datenbankabgleich der Uniprot/SwissProt (homo sapiens, Sequenzen: 20181, Stand 25.10.2017). Die Parametereinstellungen für die Datenbankanalyse sind in Tabelle 18 aufgelistet. Nach der Proteinidentifizierung folgte die markierungsfreie Quantifizierung der Proteine mit Progenesis QI for Proteomics (Version 2.0.5387.521021, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA). Nach automatischer und manueller Überprüfung der einzelnen Peptidmuster der Proben schloss sich die Normalisierung und Quantifizierung an. Dabei wurden einfach geladene Ionen und Peptide, deren Identifizierung mit einem Massenfehler größer als 10 ppm erfolgte, ausgeschlossen. Nach Gruppierung der einzelnen Proben wurde die Proteinidentifizierung importiert. Differentielle Kandidatenproteine waren mit mindestens zwei spezifischen Peptiden quantifiziert und wiesen einen p-Wert $< 0,05$ und einen Abundanzunterschied von $> 1,5$ auf.

Tabelle 18: Parametereinstellungen für die Datenbankanalyse mit Proteom Discoverer

Verdaumethode	Tryptische Proteolyse
Überlesene Schnittstellen	2
Toleranz MS1-Suche	10 ppm
Toleranz MS2-Suche	0,04 Da
FDR (Proteinebene)	5 %
FDR (Peptidebene)	1 %
Taxonomie	<i>Homo sapiens</i>
Statische Modifikation (fest)	Carbamidomethyl (C)/ +57,021 Da
Dynamische Modifikation (variabel)	Oxidation (M)/ + 15,995 Da
Min. Vorläufermasse	350 Da
Max. Vorläufermasse	5000 Da
Max. Kollisionsenergie	100

3.2.5 Statistische Auswertungen

Die Berechnungen (Mittelwerte und Standardabweichungen) und die graphischen Darstellungen erfolgten mit Excel 2010 (Microsoft) und Prism 5.01 (GraphPad Software Inc.). Signifikanzen wurden durch einen ungepaarten oder zweiseitig gepaarten studentischen t-Test ermittelt. Der Signifikanzwert (p-Wert) ist in den Abbildungen mit Sternen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) dargestellt.

4 Ergebnisse

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Wechselwirkung der zellulären Bestandteile des Knochenmarks eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von MDS und AML spielen (Korn und Mendez-Ferrer, 2017; Krause *et al.*, 2013). Vor diesem Hintergrund sollte in dieser Arbeit das Sekretom von Knochenmark-MSZ, isoliert aus MDS- und AML-Patienten, charakterisiert werden. Hierzu wurden die MSZ aus dem Knochenmark von 30 Probanden und Patienten isoliert, in Kultur genommen und so die Überstände gewonnen. Diese wurden mittels LC-MS/MS analysiert, um dadurch differenziell sekretierte Proteine zwischen Knochenmark-MSZ aus gesunden Probanden und MSZ aus MDS- sowie AML-Patienten zu identifizieren.

4.1 Sekretomanalyse von MSZ aus dem Knochenmark gesunder Probanden

4.1.1 Quantitative MS Analyse von gesunden Knochenmark-MSZ

Für die Charakterisierung des MSZ-Sekretoms wurden 8 Sekretome und 4 korrespondierende Proteome von Knochenmark-MSZ aus gesunden Probanden verwendet. Nach Aufarbeitung des Sekretoms und des Proteoms der aus dem Knochenmark folgte die massenspektrometrische LC-MS/MS Analyse. Insgesamt wurden 650 Proteine im Sekretom und 2220 Proteine im Proteom von Knochenmark-MSZ gesunder Probanden identifiziert (Abbildung 6).

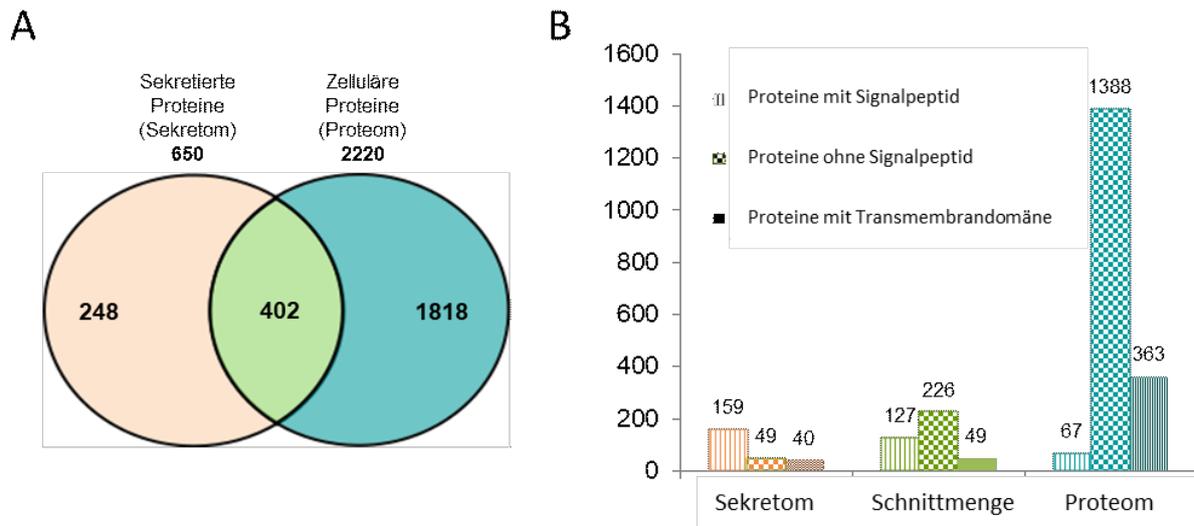


Abbildung 6: MS Analyse des Sekretoms und Proteoms von MSZ aus dem Knochenmark. A) Venn Diagramm mit allen identifizierten Proteinen im Sekretom (650) und Proteom (2220) von gesunden Knochenmark-MSZ. 248 Proteine und 1818 Proteine wurden ausschließlich im Sekretom bzw. im Proteom identifiziert. 402 Proteine bildeten die Schnittmenge und wurden in beiden Kompartimenten identifiziert. **B)** Im Sekretom von MSZ tragen 159 Proteine ein vorhergesagtes Signalpeptid, 49 Proteine haben kein Signalpeptid und 40 Proteine besitzen eine Transmembrandomäne. Im Proteom tragen 1388 Proteine kein vorhergesagtes Signalpeptid. 363 Proteine haben eine Transmembrandomäne.

Um von MSZ sekretierte Proteine hinsichtlich ihres Sekretionsweges zu charakterisieren wurde ein Vergleich des Sekretoms und des Proteoms durchgeführt. Der Vergleich von im Sekretom identifizierten und intrazellulären Proteinen zeigte 248 ausschließlich im Sekretom von MSZ identifizierte Proteine. Diese Proteine gehören mit hoher Wahrscheinlichkeit zu den sekretierten Proteinen von MSZ. Ein Datenbankabgleich der 248 Proteine zeigte, dass 159 Proteine (64 %), aufgrund eines vorhergesagten N-terminales Signalpeptids, Kandidaten der klassischen Sekretion sind. 49 ausschließlich von MSZ sekretierte Proteine (20 %) haben kein vorhergesagtes N-terminales Signalpeptid und wurden daher der unkonventionellen Sekretion zugeordnet. Weitere 40 sekretierte Proteine (16 %) wurden mit einem Signalpeptid und zusätzlich mit mindestens einer Transmembrandomäne (TMD) identifiziert und als Kandidatenproteine des *ectodomain shedding* betrachtet (Abbildung 6). Darüber hinaus wurden 402 Proteine übereinstimmend im Sekretom sowie im Proteom identifiziert. Da diese somit nicht eindeutig dem Sekretom oder dem Proteom zugeordnet werden konnten, wurde ein auf Intensitätsebene quantitativer Vergleich dieser Proteine durchgeführt. Anschließend wurden nur die Proteine als sekretiert angesehen, welche eine signifikant höhere Abundanz (Intensitätsunterschied, $p \leq 0,05$) im Sekretom aufwiesen und somit weniger wahrscheinlich aus nekrotischen Zellen stammten. Von den 402 Proteinen, die in beiden Kompartimenten

identifiziert wurden, waren 67 im Sekretom signifikant angereichert. Von diesen waren 62 (93 %) Kandidatenproteine der klassischen Sekretion. Diese Gruppe enthielt sechs Proteine mit mindestens einer TMD und wurde als Kandidatenproteine für *ectodomain shedding* angesehen. Zusammenfassend wurden 315 Proteine als hoch signifikant angereicherte Proteine im Sekretom von Knochenmark-MSZ identifiziert.

4.1.2 Biologische Einordnung der von Knochenmark-MSZ sezernierten Proteine

Obwohl es sich beim Sekretom um ein spezielles Kompartiment der Zelle handelt und die Funktion eines Proteins sehr stark von der Lokalisation abhängt, wurde eine *gene-ontology* (GO)-Analyse des Sekretoms der Knochenmark-MSZ durchgeführt. Der Vergleich zwischen dem ungefilterten und dem gefilterten Sekretom zeigte einen signifikanten Anstieg von 44 % (285 von 650 Proteinen) auf 65 % (203 von 315 Proteinen) des Anteils von Proteinen mit bekannter extrazellulärer Lokalisation. Der Anteil zytoplasmatischer Proteine dagegen reduzierte sich von 49 % (315 von 650 Proteinen) auf 26 % (81 von 315 Proteinen). Diese Ergebnisse zeigen, dass sich das Filtern des Sekretoms nachweislich als sinnvoll erwiesen hat. Durch den quantitativen MS-Ansatz konnten die sekretierten Proteine nach ihren Abundanzbereichen gruppiert werden (Abbildung 7). Dafür wurde die Abundanz der 315 Proteine in drei Bereiche (hoch-, mittel- und niedrigabundant) unterteilt. Der hohe Abundanzbereich umfasste 49 Proteine, von denen 48 Proteine (98 %) ein Signalpeptid aufwiesen. Das einzige Protein ohne vorhergesagtes Signalpeptid im Segment hoher Abundanz war Hyaluron und Proteoglykan-Link-Protein 1 (HPLN1). Der mittlere und niedrige Abundanzbereich umfasste 127 Proteine mit 103 (81 %) bzw. 93 Proteine mit 65 (81 %) klassisch sezernierten Proteinen. Interessant zu bemerken ist, dass 59 Proteine, die in der Zellkommunikation eine Rolle spielen, über den gesamten Abundanzbereich im MSZ-Sekretom verteilt waren, während 60 Proteine mit dem GO – Begriff Zellwachstum und/oder Aufrechterhaltung nur in den mittleren und hohen Abundanzsegmenten signifikant angereichert waren (Abbildung 7).

Im MSZ-Sekretom konnten viele Proteine, die im Zusammenhang mit der biologischen Funktion von MSZ beschrieben wurden, identifiziert werden und gemäß ihrer Abundanz eingeordnet werden. Beispielsweise wurden Wachstumsfaktoren, die für das Fortschreiten der Differenzierung mitverantwortlich sind, aber auch Faktoren, die in der Lokalisierung von HSPZ in ihren regulatorischen Nischen eine Rolle spielen, identifiziert (Ge *et al.*, 2018; Grafe *et al.*, 2018). Dazu gehören zwei in der Literatur beschriebene Wachstumsfaktoren, TGF β 1 und VEGFC, die im niedrigabundanten Bereich nachgewiesen wurden (Abbildung 7).

Mitglieder des regulatorischen Aktivin-Signalweges, wie *Follistatin-related protein 3* (FSTL3), *Inhibin Beta A* (INHBA) und *Stromal cell-derived factor 1* (SDF1), das auch als *C-X-C motif chemokine 12* (CXCL12) bekannt ist, wurden dem mittelabundanten Bereich zugeordnet. Unter den hochabundanten Proteinen wurden 10 Kollagene und das *latent-transforming growth factor beta-binding protein 2* (LTBP2) nachgewiesen (Abbildung 7).

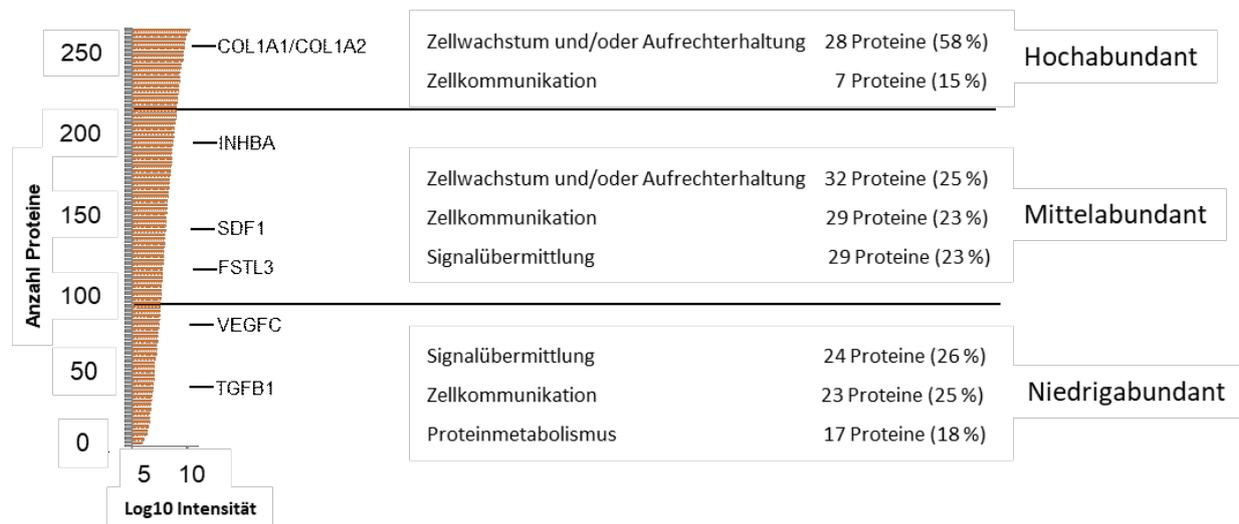


Abbildung 7: Gruppierung der sekretierten Proteine nach ihrem Abundanzbereich. Hochabundante und mittelabundante Proteine sind überwiegend im biologischen Prozess Zellwachstum und/oder Aufrechterhaltung und Zellkommunikation involviert während niedrigabundante Proteine hauptsächlich eine Rolle in Signalübermittlung spielen. Vertreter der hochabundanten Proteine sind überwiegend Kollagene. Im mittelabundanten Bereich wurden Proteine wie INHBA, SDF1 und FSTL3 identifiziert. Die Wachstumsfaktoren VEGFC und TGFβ1 waren niedrigabundante Proteine. Abgebildet sind die Proteine in Abhängigkeit zur ihrer log10 Intensität.

Um eine funktionelle Beziehung der sekretierten Proteine von MSZ aus dem Knochenmark hervorzuheben, wurde eine Netzwerkanalyse durchgeführt (Abbildung 8). Wie erwartet war der wichtigste biologische Prozess der sekretierten Proteine mit 29 Proteinen Zellkommunikation und Signaltransduktion. Darunter sind Proteine wie z. B. der *Transforming growth factor beta 1/2* (TGFβ1, TGFβ2), *Vascular endothelial growth factor C* (VEGFC), oder die *Insulin-like growth factor-binding proteins* (IGFBP 3 4/5/6). Für den biologischen Prozess Zellwachstum und/oder Aufrechterhaltung ergab die Analyse zwei Cluster. Das größte Cluster (19 Proteine) bestand hauptsächlich aus verschiedenen Kollagenisoformen (COL6A2; COL4A2; COL6A1; COL10A1; COL5A2; COL15A1; COL8A1; COL11A1; COL1A1; COL3A1; COL5A1; COL1A2; COL5A3; COL4A1), während das 12 Proteine umfassende Cluster durch extrazelluläre Laminine (LAM), wie z. B. LAMA2, LAMA4, LAMM repräsentiert wurde. Durch die biologisch-funktionelle

Charakterisierung des MSZ-Sekretoms wurde gezeigt, dass extrazelluläre Matrixproteine nicht nur die größte Gruppe von Proteinen, sondern auch die hochabundanteste Gruppe repräsentieren, die von MSZ sekretiert wurden.

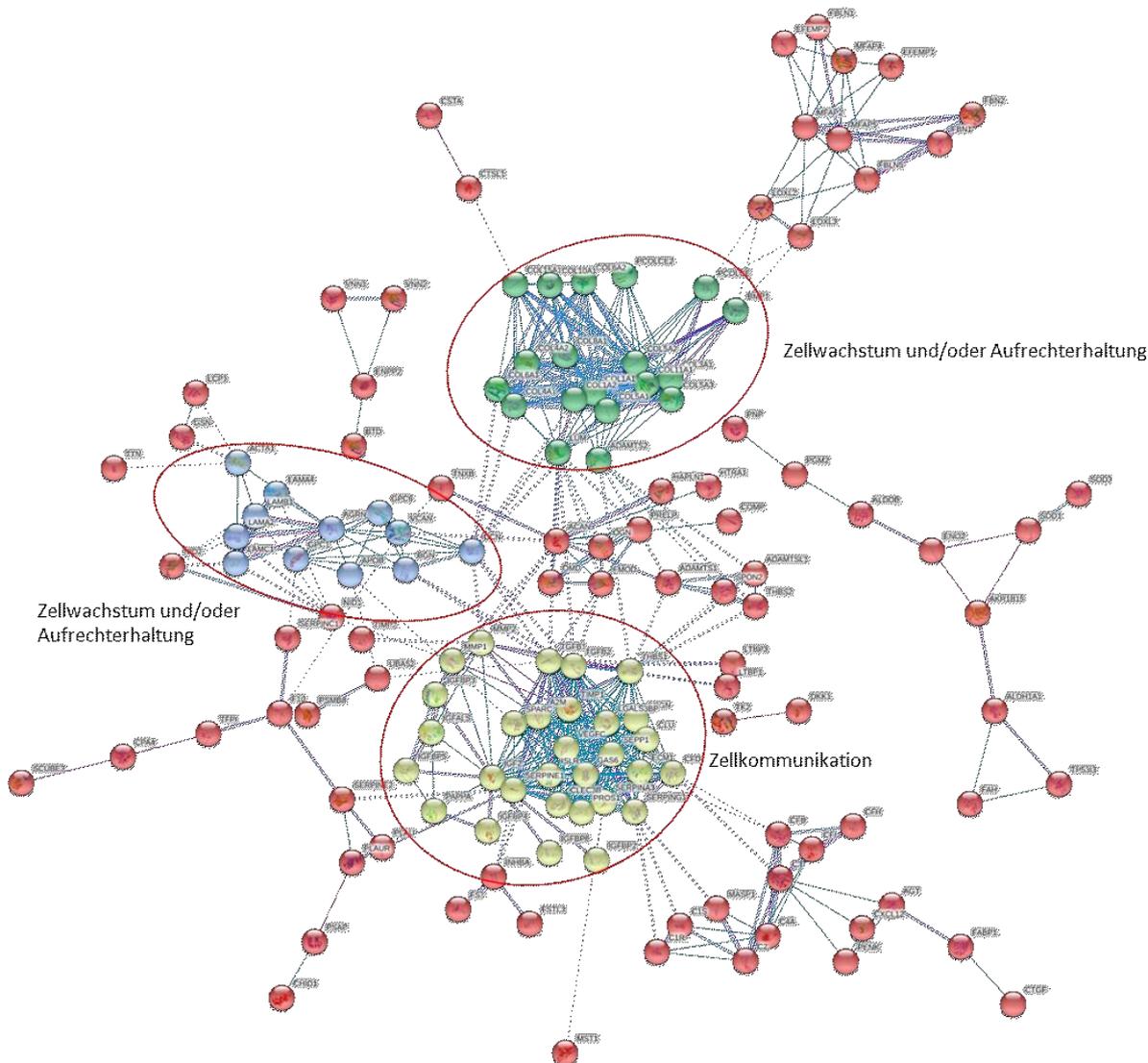


Abbildung 8: Charakterisierung des MSZ-Sekretoms. Funktionelle Beziehung der sekretierten Proteine durch eine Netzwerkanalyse. Die GO-Annotierung zeigt drei Cluster. Das grüne und blaue Cluster gehören zu dem hauptsächlich biologischen Prozess ‚Zellwachstum und/oder Aufrechterhaltung‘. Die Proteine des gelben Clusters sind hauptsächlich an dem Prozess Zellkommunikation beteiligt. Das Netzwerk wurde mit STRING 10.5 erstellt (Szklarczyk *et al.*, 2017).

4.1.3 Charakterisierung der proteolytischen Abtrennung von Ektodomänen bei Membranproteinen (*Ectodomain shedding*)

Die proteolytische Abtrennung der Ektodomänen von Membranproteinen führt zu biologisch aktiven löslichen Ektodomänen, welche Einfluss auf viele biologische Prozesse haben können

(Zhou *et al.*, 1999). Da sich auch im MSZ-Sekretom proteolytisch prozessierte Membranproteine befinden können, wurden die Sequenzinformationen der MS Analyse verwendet, um eine mögliche proteolytische Freisetzung von Membranproteinen mit mindestens einer TMD im MSZ-Sekretom vorherzusagen. Unter zur Hilfenahme des Programms "*Lysat und Secretome Peptide Feature Plotter*" (LSPFP) (Grube *et al.*, 2018) konnten 17 Proteine identifiziert werden, die aufgrund eines Unterschieds der Sequenzabdeckung proteolytisch prozessiert werden können (Abbildung 9). Für diese 17 Membranproteine einschließlich Kandidaten wie CD44-Antigen, *Tyrosine-protein kinase-like 7* (PTK7), *Plexin-B2* (PLXB2), *Integrin-beta-1* (ITB1), *Cytoskeleton-associated protein 4* (CKAP4) wurden nur in den Proteomproben Peptide identifiziert, die sowohl die extrazellulären als auch die intrazellulären Proteinregionen abdecken, während in Sekretomproben der zytoplasmatische Proteinteil fehlte und daher nahelegt, dass die Ektodomäne von diesen Proteinen proteolytisch gespalten wurde (Abbildung 9). Zusammenfassend konnten anhand des kombinierten MS-Ansatzes 17 potentielle *ectodomain shedding* Kandidatenproteine identifiziert werden (s. Anhang Abbildung 27).

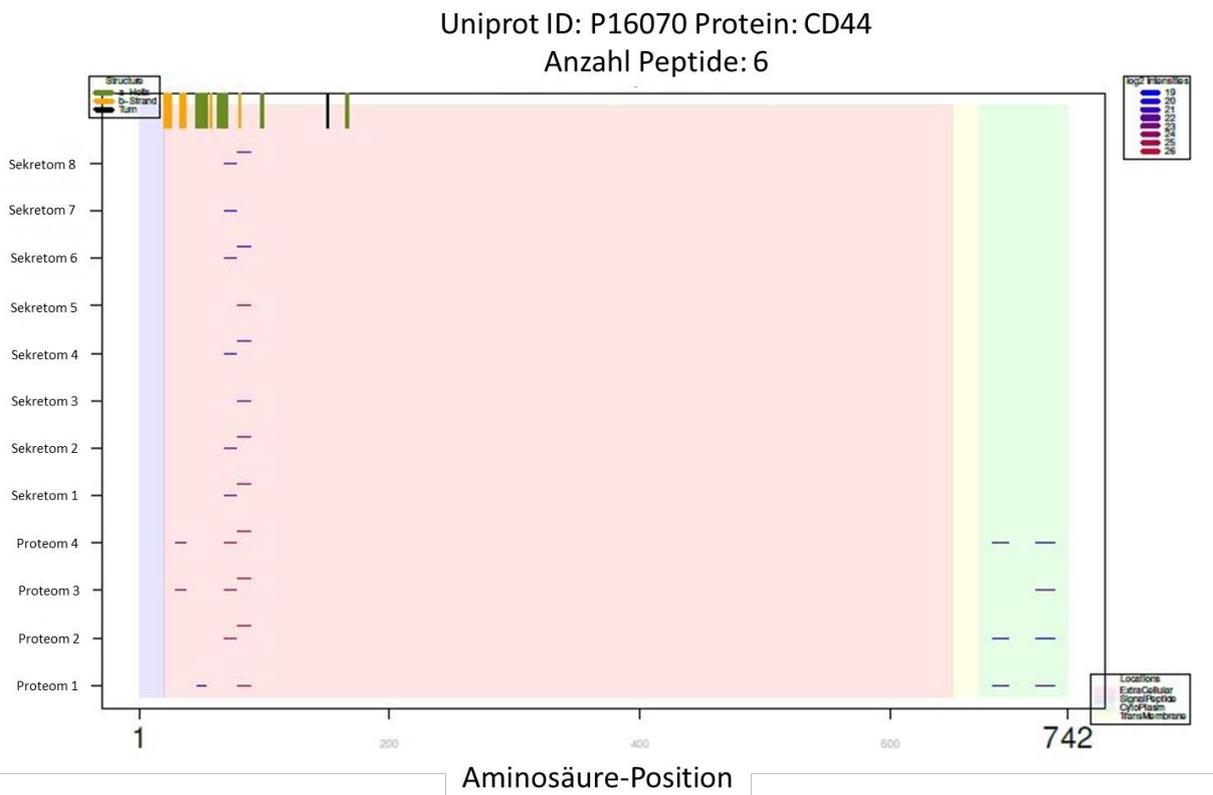


Abbildung 9: Beispiel der Ergebnisse der LSPFP Analyse. Dargestellt ist das repräsentative Protein CD44, für welches für eine proteolytische Abtrennung der Ektodomänen vorhergesagt wurde. Rot: Extrazellulär, Lila: Signalpeptid, Grün: Zytoplasma, Gelb: Transmembran.

4.1.4 Validierung sekretierter und intrazellulärer Proteine

Um den Sekretomansatz zu bestätigen wurden die Ergebnisse in einer unabhängigen Gruppe (n= 3 pro Gruppe) mittels Western Blot validiert. Für die 67 im Sekretom signifikant angereicherten Proteine wurde das sekretierte Protein SerpinE1 für die Western Blot-Validierung ausgewählt. Dieses Protein war im Sekretom signifikant angereichert (Abundanzunterschied= 1,84; p-Wert= 0,036). Für die 248 ausschließlich im Sekretom identifizierten Proteine wurde ein Antikörper gegen Angiotensin (AGT) verwendet. Obwohl die Anreicherung der Proteine im Sekretom bestätigt wurde, konnten die Abundanzunterschiede aufgrund der unterschiedlichen Parameter (z. B. Nachweisgrenze, linearer dynamischer Bereich) der angewandten Quantifizierungstechniken nicht exakt reproduziert werden (Abbildung 10).

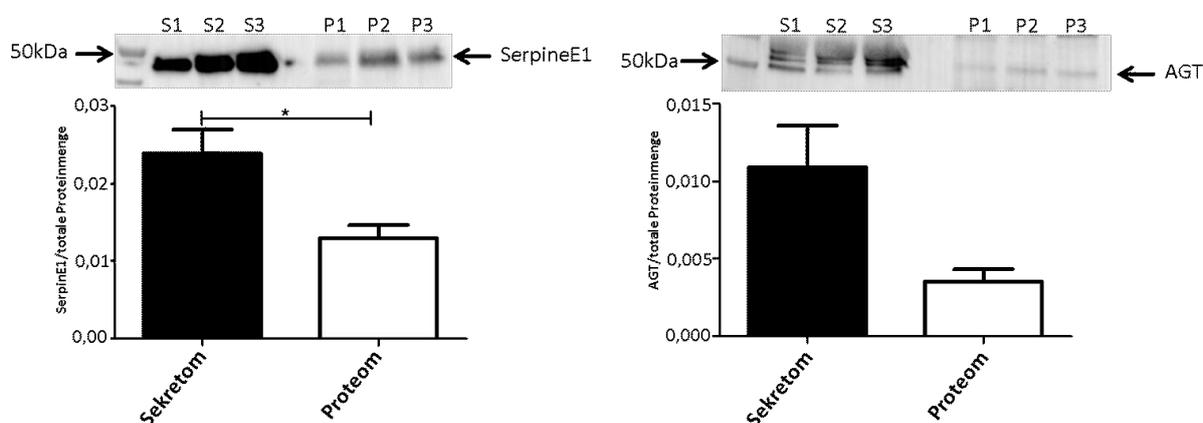


Abbildung 10: Abundanz der sekretierten Proteine SerpinE1 und Angiotensin (AGT) im MSZ-Sekretom. Sekretome und korrespondierende Proteome einer unabhängigen Proben­gruppe (n= 3) wurden mittels Western Blot validiert. SerpinE1 war signifikant abundanter (Abundanzunterschied: 1,84; p-Wert = 0,036) im MSZ-Sekretom. Angiotensin wurde mit einer 3,09-mal höheren Abundanz im Sekretom validiert (p-Wert= 0,057).

Zusätzlich wurde ein typisches intrazelluläres Protein analysiert, Beta-Tubulin, um den Beitrag nekrotischer Zellen zum MSZ-Sekretom zu bewerten. Hier wurde eine signifikant höhere Menge von Beta-Tubulin (Abundanzunterschied: 214,18; p-Wert < 0,0001) im Proteom nachgewiesen (Abbildung 11).

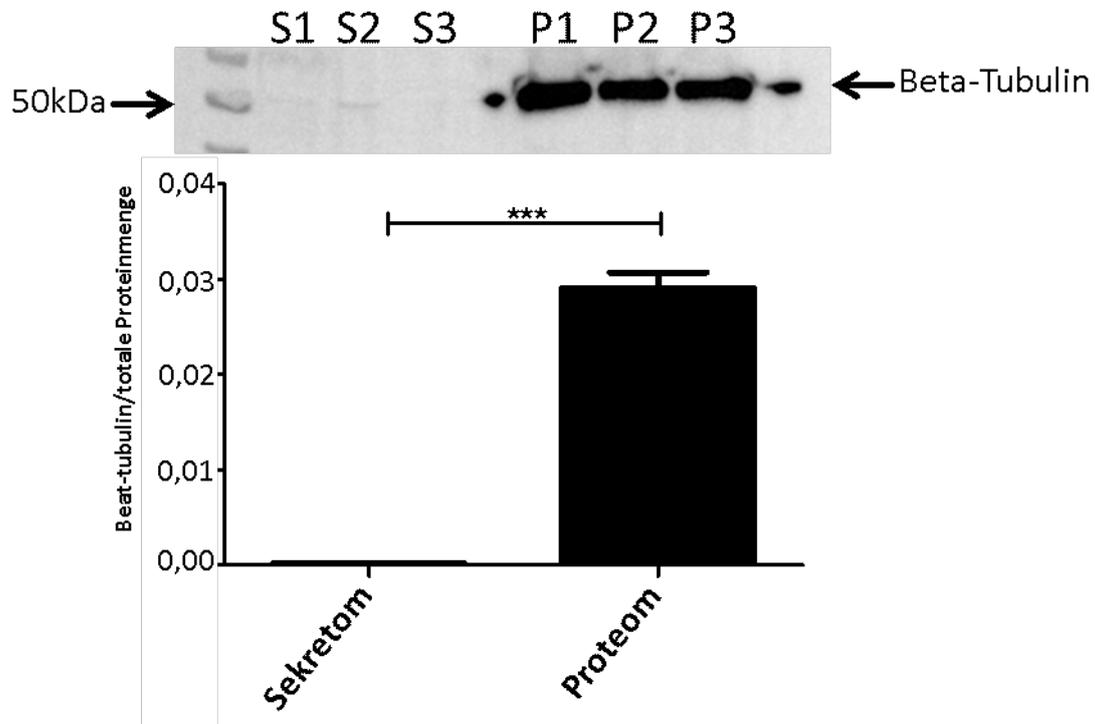


Abbildung 11: Abundanz des intrazellulären Proteins Beta-Tubulin. Sekretome und korrespondierende Proteome einer unabhängigen Proben­gruppe (n= 3) wurden mittels Western Blot validiert. Beta-Tubulin war signifikant abundanter (Abundanzunterschied: 214,18; p-Wert < 0,0001) im MSZ-Proteom.

4.2 Differenzielle Sekretomanalyse von Knochenmark-MSZ

Die in dieser Arbeit durchgeführte Sekretomanalyse von Knochenmark-MSZ aus gesunden Probanden unterstützt die Hypothese, dass das Mikromilieu des Knochenmarks in der Lage ist die Hämatopoese zu beeinflussen. So konnte im Knochenmark-MSZ-Sekretom eine Vielzahl von Faktoren identifiziert werden, deren Einfluss auf die Hämatopoese bereits beschrieben ist. Darauf aufbauend sollte das MSZ-Sekretom von MDS- und AML-Patienten untersucht werden, um mögliche Veränderungen von sekretierten Proteinen in hämatologisch erkrankten Patienten festzustellen.

Für die massenspektrometrische Analyse wurden 8 Sekretome von Knochenmark-MSZ aus gesunden Probanden generiert, 12 aus MDS- und 10 aus AML-Patienten. Insgesamt konnten durch die massenspektrometrische Sekretomanalyse über alle Proben 1432 Proteine identifiziert werden und davon, durch eine markierungsfreie Quantifizierung mit mindestens zwei für das Protein spezifischen Peptiden, 568 Proteine quantifiziert werden. In einem ersten Schritt wurden die identifizierten Proteine der Sekretome der einzelnen Gruppen verglichen. Ein Datenbankabgleich der Sekretome der einzelnen Gruppen zeigte, dass der Anteil an Proteinen mit vorhergesagtem N-terminalem Signalpeptid in allen drei Gruppen annähernd bei 47,6 % lag (Gesund: 46,9 %; MDS: 46,3 %; AML: 49,4 %) und demnach Kandidaten der klassischen Sekretion zuzuordnen sind. Der Anteil an Kandidaten Proteine für die unkonventionelle Sekretion, ohne vorhergesagtem Signalpeptid sowie ohne Transmembrandomäne, lag im Mittel bei 47,6 % (Gesund: 47,6 %; MDS: 48,7 %; AML: 46,4 %). Von den 1432 Proteinen wurden 199 Proteine ausschließlich im Sekretom der gesunden Probanden, 136 ausschließlich in Sekretom von MDS-Patienten und 56 ausschließlich im Sekretom von AML-Patienten identifiziert.

4.2.1 Differenziell quantifizierte Proteine im Knochenmark-MSZ-Sekretom von MDS- und AML-Patienten

Nach der Quantifizierung über alle Proteine im Sekretom wurde für den differenziellen Vergleich zwischen den Proben Gruppen ein T-Test ($p \leq 0,05$) zwischen den normalisierten Proteinabundanzen durchgeführt. In Abbildung 12 A sind die 568 quantifizierten sekretierten Proteine dargestellt. Im Vergleich zwischen den gesunden Probanden und den MDS-Patienten erwiesen sich 12 Proteine als signifikant differenziell (rot markiert), wobei 4 Proteine im Sekretom von MDS-Patienten mit einem Unterschied $\geq 1,5$ signifikant runterreguliert und 8 Proteine im Sekretom der MDS-Patienten signifikant waren (Abbildung 12 B).

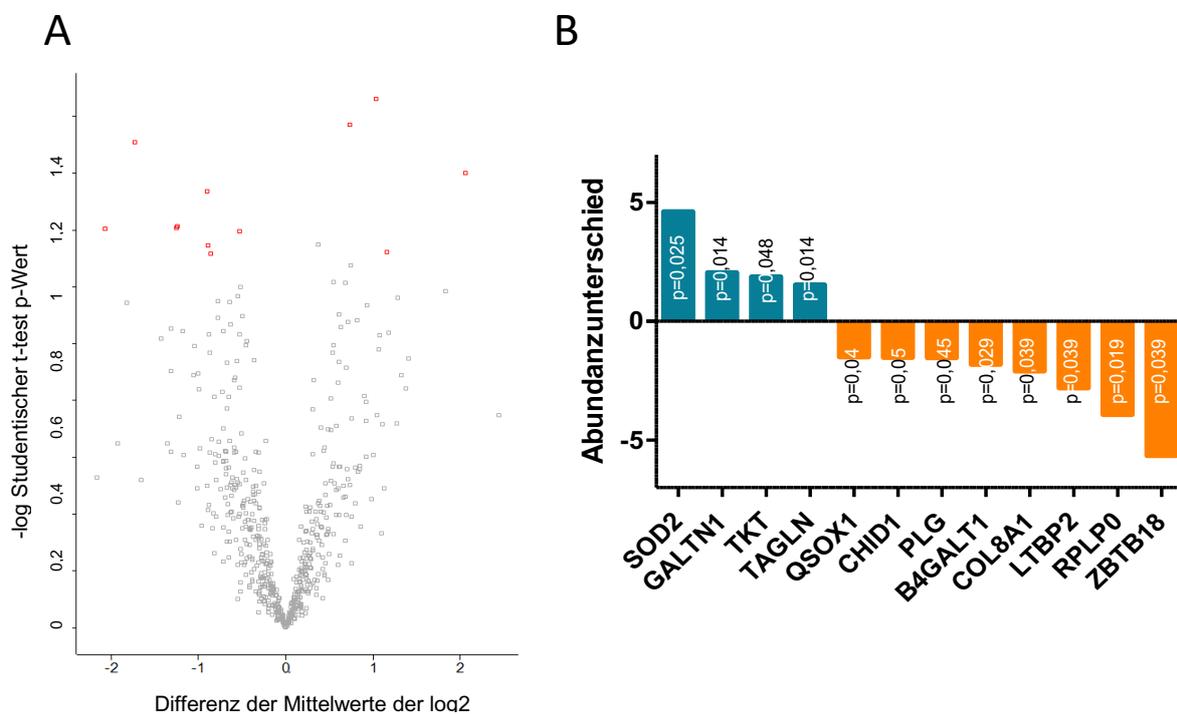


Abbildung 12: Signifikant differenziell sekretierte Proteine von MSZ aus gesunden Probanden und MDS-Patienten. **A)** Der Vulkan-Plot zeigt die 568 quantifizierten Proteine im MSZ-Sekretom, von denen 12 Proteine einen signifikanten Unterschied zwischen gesunden Probanden und MDS-Patienten aufwiesen. **B)** Signifikant differenzielle Proteine im MSZ-Sekretom zwischen gesunden Probanden und MDS-Patienten. 4 Proteine sind höher abundant in den gesunden Probanden (türkis), 8 Proteine zeigen eine höhere Abundanz in den MDS-Patienten (orange). Signifikante Proteine haben mindestens 2 spezifische Peptide, einen $p\text{-Wert} \leq 0,05$ und einen Abundanzunterschied $\geq 1,5$.

Von den 12 differenziell sekretierten Proteinen wurde für fünf ein Signalpeptid vorhergesagt, weshalb sie zu den klassisch sekretierten Proteinen gezählt wurden. Durch einen Datenbankabgleich (Uniprot/SwissProt homo sapiens, Sequenzen: 20181, Stand 25.10.2017) zeigte sich, dass 7 der 12 Proteine bereits als sekretiert beschrieben waren und für 5 ein

Signalpeptid vorhergesagt wurde (Tabelle 19). Unter den differenziellen Kandidaten zeigte beispielsweise die *Superoxide dismutase 2* (SOD2) mit einem p-Wert von 0,025 eine 4,6-mal höhere Abundanz im MSZ-Sekretom in gesunden Probanden im Vergleich zu den MDS-Patienten. Dagegen war das *latent-transforming growth factor beta-binding protein 2* (LTBP2), ein TGF β bindendes Protein, 2,8-mal so abundant im Sekretom von MDS-Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden (p-Wert= 0,039).

In der Analyse des MSZ-Sekretoms zwischen den gesunden Probanden und den AML-Patienten zeigten von den 568 quantifizierten Proteinen 34 Proteine einen signifikant differenziellen Unterschied (Abbildung 13 A). Von diesen waren 21 signifikant höher abundant in den gesunden Probanden und 13 signifikant höher im Sekretom der AML-Patienten (Abbildung 13 B). 17 der 34 differenziellen Proteine waren mit einem Signalpeptid vorhergesagt und wiederum 17 waren als sekretiert beschrieben (Tabelle 20). Zu den Proteinen mit einer höheren Abundanz im Sekretom der gesunden Probanden gehörten beispielsweise das Calcium-binding protein A8 (S100A8, p-Wert= 0,047) oder auch Kollagene, wie z. B. COL2A1 oder COL3A1. Eine 3,6-mal höhere Abundanz in den AML-Patienten wies z. B. *Platelet-derived growth factor D* (PDGFD, p-Wert= 0,01) auf. Um zu überprüfen, ob es sich bei den Kandidaten der differenziellen Sekretomanalyse um sekretierte Proteine handelt und diese nicht aus nekrotischen Zellen stammen, wurde ein Abgleich mit Datenbanken sowie mit den MSZ-Proteomen aus 4.1 durchgeführt. Dazu wurden in einem ersten Schritt die differenziellen Proteine mit der Uniprot Datenbank dahingehend annotiert, ob für diese ein Signalpeptid vorhergesagt wird (klassisch sekretierte Proteine) oder diese bereits in der Literatur als sekretiert beschrieben sind (Tabelle 19). Im nächsten Schritt wurden die gemittelten Intensitäten der sekretierten Proteine mit den Proteomdaten aus 4.1 verglichen und ein Anreicherungsfaktor berechnet.

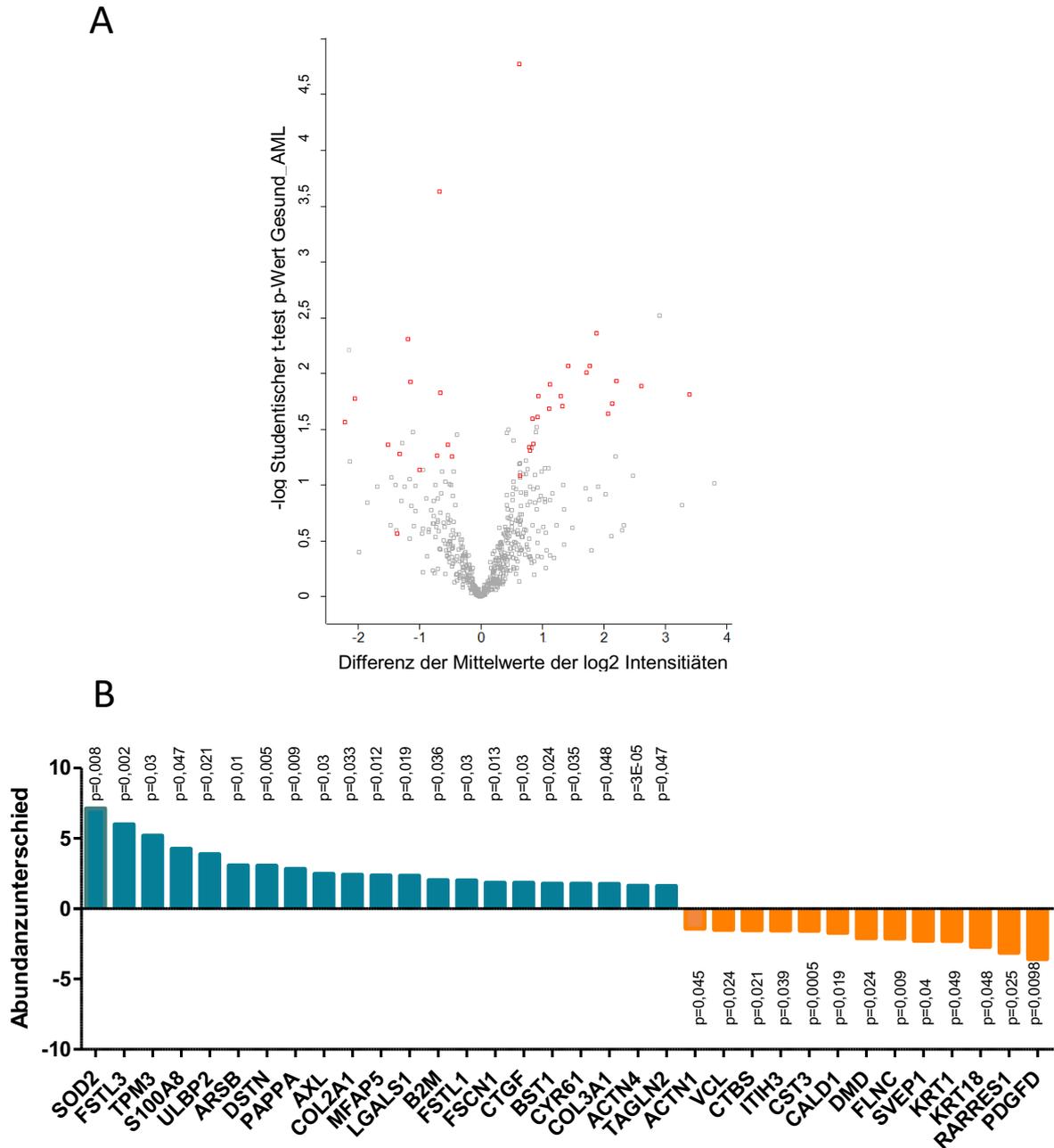


Abbildung 13: Signifikant differentiell sekretierte Proteine von MSZ aus gesunden Probanden und AML-Patienten. **A)** Der Vulkan-Plot zeigt die 568 quantifizierten Proteine im MSZ-Sekretom, von denen 34 Proteine einen signifikanten Unterschied zwischen gesunden Probanden und AML-Patienten zeigten (rot markiert). **B)** Säulendiagramm der 34 signifikant differentiellen Proteine im MSZ-Sekretom zwischen gesunden Probanden und AML-Patienten. 21 Proteine sind höher abundant in den gesunden Probanden (türkis) und 13 Proteine höher in den AML-Patienten (orange). Signifikante Proteine haben einen $p\text{-Wert} \leq 0,05$ und einen Abundanzunterschied $\geq 1,5$).

Als sekretiert wurden demnach nur die Proteine angesehen, die einen Anreicherungsfaktor > 1 aufweisen, sprich deutlich abundanter im Sekretom sind (Tabelle 19, Tabelle 20). Hier zeigte sich, dass 10 differenzielle Proteine bspw. QSOX1, CHID1, PLG, LTBP2 und FSTL3 ausschließlich im Sekretom identifiziert worden sind, ein Signalpeptid trugen und als sekretiert beschrieben waren. Drei Proteine (B4GALT1, S100A8, LGALS1) hatten kein vorhergesagtes Signalpeptid, waren aber als sekretiert beschrieben und konnten nicht im Proteom identifiziert werden. Diese genannten Proteine hatten eine hohe Evidenz sekretierte Proteine zu sein und kamen demnach für eine funktionelle Validierung in Betracht. Das Glykoprotein *Follistatin-related protein 3* (FSTL3 oder auch FLRG) war das mit am höchst differenziell sekretierte Protein in MSZ. Deshalb wird im Folgenden näher auf dieses Protein eingegangen.

Tabelle 19: Differenzielle Proteine im MSZ-Sekretom zwischen gesunden Probanden und MDS-Patienten. Anreicherungsfaktor basierend auf dem Vergleich der gemittelten Intensität im Sekretom und Proteom (Faktor > 1 : Anreicherung im Sekretom)

Protein	Hochreguliert in	Signal-peptid	Sekretiert	Identifiziert im Proteom	Anreicherungsfaktor im Sekretom
TAGLN	Gesund			x	0,0013
TKT	Gesund			x	0,0092
GALTN1	Gesund		x	x	0,0015
SOD2	Gesund			x	0,0003
QSOX1	MDS	x	x		
CHID1	MDS	x	x		
PLG	MDS	x	x		
B4GALT1	MDS		x		
COL8A1	MDS	x	x	x	0,0292
LTBP2	MDS	x	x		
RPLP0	MDS			x	0,0003
ZBTB18	MDS				

Tabelle 20: Differenzielle Proteine im MSZ-Sekretom zwischen gesunden Probanden und AML-Patienten.
Anreicherungsfaktor basierend auf dem Vergleich der gemittelten Intensität im Sekretom und Proteom
(Faktor > 1: Anreicherung im Sekretom)

Protein	Hochreguliert in	Signal-peptid	Sekretiert	Identifiziert im Proteom	Anreicherungsfaktor im Sekretom
SOD2	Gesund			x	0,0003
FSTL3	Gesund	x	x		
TPM3	Gesund			x	0,0001
S100A8	Gesund		x		
ULBP2	Gesund	x	x		
ARSB	Gesund	x	x		
DSTN	Gesund				
PAPPA	Gesund	x	x	x	0,0002
AXL	Gesund	x		x	0,0000
COL2A1	Gesund	x	x		
MFAP5	Gesund	x	x	x	0,0029
LGALS1	Gesund		x		
B2M	Gesund	x	x		
FSTL1	Gesund	x	x		
FSCN1	Gesund				
CTGF	Gesund	x	x	x	0,0005
BST1	Gesund	x			
CYR61	Gesund	x	x		
COL3A1	Gesund	x	x	x	0,0001
ACTN4	Gesund				
TAGLN2	Gesund			x	0,0820
ACTN1	AML			x	0,4944
VCL	AML			x	0,0003
CTBS	AML	x	x	x	0,0355
ITIH3	AML	x	x	x	0,0235
CST3	AML			x	0,0109
CALD1	AML			x	0,0158
DMD	AML			x	0,0002
FLNC	AML			x	0,0013
SVEP1	AML	x	x	x	0,0001
KRT1	AML			x	0,0001
KRT18	AML				
RARRES1	AML			x	0,0005
PDGFD	AML	x	x	x	0,0001

4.2.2 Follistatin-related protein 3 (FSTL3)

Durch die massenspektrometrische Analyse und die markierungsfreie Quantifizierung wurde das Protein *follistatin-related protein 3* (FSTL3 oder auch FLRG) als signifikant ($p=0,002$) differenziell reguliertes Protein von MSZ zwischen den gesunden Probanden und AML-Patienten identifiziert (Abbildung 14). FSTL3 ist ein sekretiertes Glykoprotein, hat ein vorhergesagtes Signalpeptid und gehört demnach zu den klassisch sekretierten Proteinen. Es ist involviert im Aktivin Signalweg, bindet bevorzugt AktivinA mit hoher Affinität, neutralisiert seine biologische Funktion und kann somit als extrazellulärer Regulator der TGF β -Familie angesehen werden (Bartholin *et al.*, 2002; Maguer-Satta *et al.*, 2001). FSTL3 war 6-mal höher abundant in den gesunden Probanden im Vergleich zu den AML-Patienten (2 spezifische Peptide, p -Wert= 0,002). Im Vergleich zu den MDS-Patienten zeigte FSTL3 auch eine höhere Regulierung in den gesunden Probanden, diese war jedoch nicht signifikant (Abbildung 14).

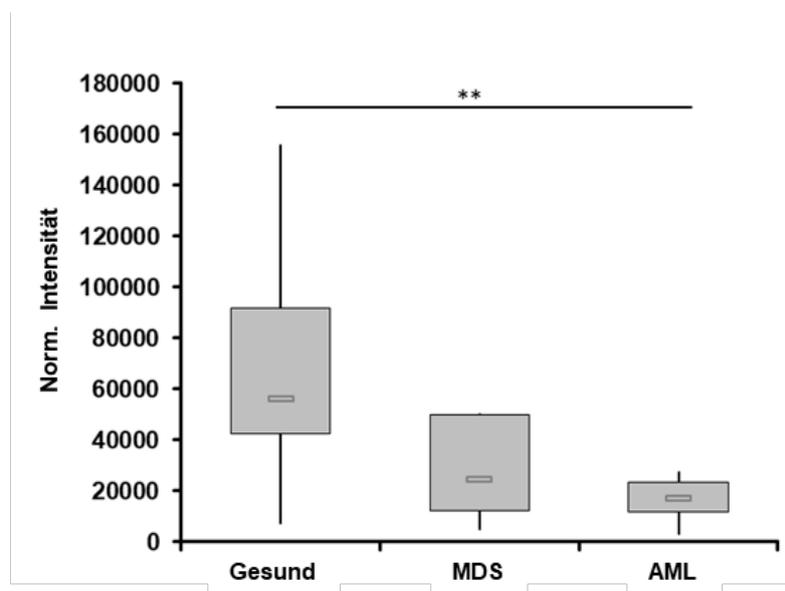


Abbildung 14: Box-Plot der Intensität von FSTL3 im MSZ-Sekretom von gesunden Probanden, MDS-Patienten und AML-Patienten. FSTL3 ist signifikant höher reguliert im Sekretom der gesunden Probanden im Vergleich zu den AML-Patienten.

Aufgrund der quantitativen massenspektrometrischen Analyse und dem hinzugegebenen RTMC Peptidmix (20 fmol) ist es möglich absolute Konzentrationen einzelner Proteine zu ermitteln. Dafür wurden die einzelnen Proteine in Relation zu dem hinzugegebenen Peptidmix gesetzt und somit konnte eine Aussage über die absolute Konzentration des Proteins getroffen werden. Mit dieser Methode wurde auch die absolute Konzentration von FSTL3 berechnet

(Abbildung 15). Diese absolute Konzentration von FSTL3 lag im MSZ-Sekretom der gesunden Probanden bei ca. 0,5 fmol und im Sekretom der AML-Patienten bei ca. 0,1 fmol.

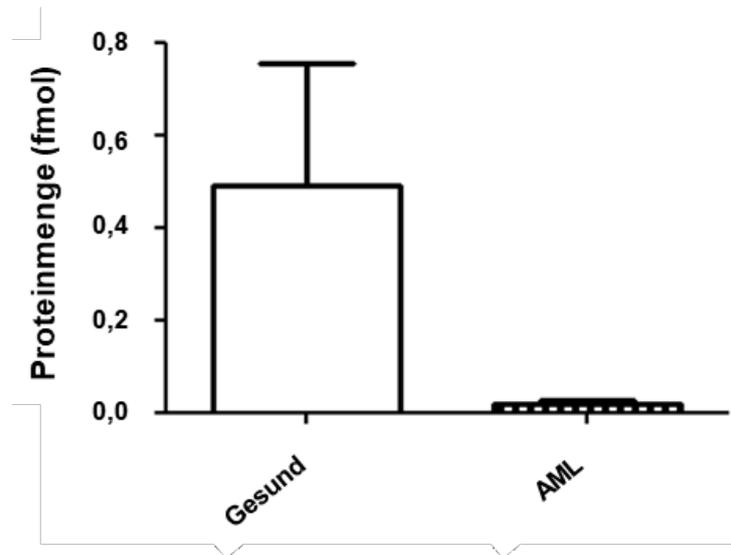


Abbildung 15: Absolute Konzentration von FSTL3 im MSZ-Sekretom von gesunden Probanden und AML-Patienten. Die absolute Konzentration wurde mittels eingebrachter synthetischer Peptide (20 fmol RTMC Peptidmix) ermittelt.

Um auszuschließen, dass FSTL3 als ein kontaminierendes Protein aus der Zellkultur oder der Sekretomaufarbeitung stammt, wurde überprüft, ob das Protein FSTL3 überhaupt von MSZ gebildet und damit sekretiert werden kann. Dafür wurde die Geneexpression von *FSTL3* in 13 MSZ aus gesunden Probanden, 12 MDS- und 10 AML-Patienten mittels qRT-PCR gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass *FSTL3* von MSZ exprimiert werden kann und somit auch in der Lage ist das Protein zu translatieren und aufgrund des vorhergesagten Signalpeptids, zu sekretieren. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass *FSTL3* in den MSZ der gesunden Probanden geringfügig höher exprimiert wird als in den MSZ von MDS- und AML-Patienten (Abbildung 16).

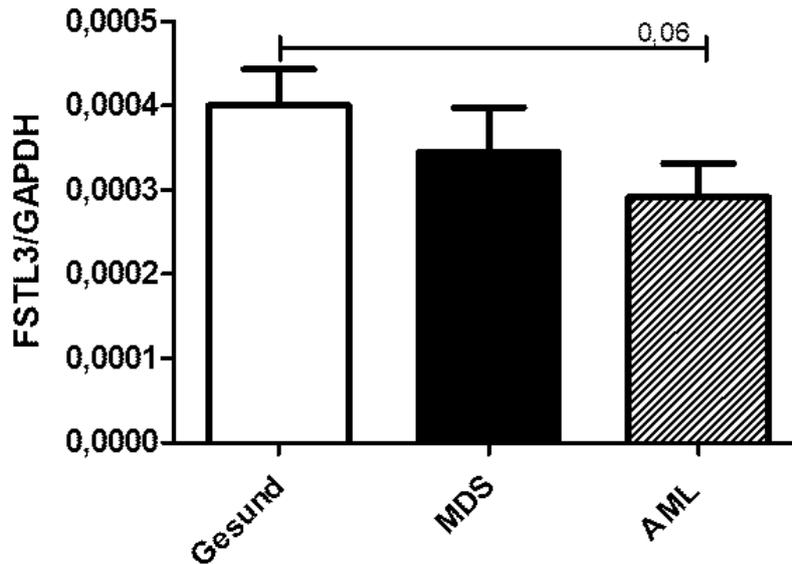


Abbildung 16: qRT-PCR der Genexpression von *FSTL3* in MSZ von gesunden Probanden, MDS- und AML-Patienten. MDS- und AML-MSZ zeigten eine verminderte *FSTL3* Expression im Vergleich zu MSZ aus gesunden Probanden. Für die Analyse wurden MSZ aus 13 gesunden, 12 MDS- und 10 AML-Patienten verwendet. *FSTL3* wurde in Relation zu dem Haushaltsgen *GAPDH* gesetzt und durch qRT-PCR quantifiziert.

Dieses Ergebnis deckte sich mit der massenspektrometrischen Analyse des MSZ-Sekretoms. In der massenspektrometrischen Analyse des Proteoms von MSZ konnte kein FSTL3 identifiziert werden. Dies, bestärkt durch die differenzielle Expression von FSTL3, spricht für eine starke aktive FSTL3 Sekretion von MSZ. Dieses sekretierte differenzielle Protein sollte im Folgenden an HSPZ funktionell untersucht werden, um Rückschlüsse über die Beteiligung von FSTL3 bei der Pathogenese von MDS und AML zu gewinnen. Dafür wurden in einem ersten Schritt HSPZ aus gesunden Probanden und MDS/AML-Patienten hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften charakterisiert.

4.3 Charakterisierung von HSPZ aus gesunden Probanden und MDS/AML-Patienten

Da die differenziellen Proteine im Knochenmark auf die HSPZ wirken könnten, wurde diese in einem ersten Schritt funktionell charakterisiert, um Unterschiede zwischen HSPZ aus gesunden Probanden und MDS/AML-Patienten zu untersuchen. Um die Proliferationsfähigkeit von HSPZ aus gesunden Probanden und MDS/AML-Patienten zu analysieren, wurde die Zellzahl nach 72 Stunden Kultivierung ermittelt und die kumulativen Populationsverdopplungen (CPD; *Cumulative population doublings*) berechnet (Abbildung 17). Dabei wurde ein Faktor zu Proliferation im Verhältnis zur eingesetzten Zellzahl berechnet. HSPZ aus MDS- und AML-Patienten (n= 10) zeigten eine signifikant verminderte Proliferation im Vergleich zu HSPZ aus dem Knochenmark von gesunden Probanden (n= 5) auf.

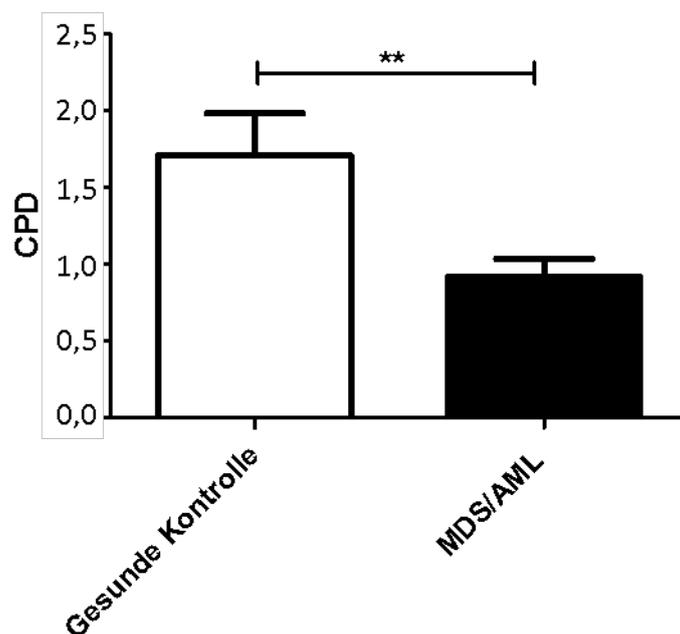


Abbildung 17: Kumulative Populationsverdopplung von HSPZ aus dem Knochenmark. MDS/AML-HSPZ (n= 10) zeigen eine signifikant verminderte Proliferation als HSPZ aus gesunden Probanden ($p < 0,01$).

Im nächsten Schritt wurde die Differenzierungsfähigkeit von HSPZ untersucht. Während der Differenzierung zu reifen Blutzellen durchlaufen die Nachkommen von HSPZ Zwischenstufen, einschließlich multipotentieller Vorläuferzellen (HSPZ) (Seita und Weissman, 2010). Wenn HSPZ in einer geeigneten halbfesten Matrix kultiviert werden

proliferieren und differenzieren individuelle Vorläuferzellen, die koloniebildende Einheiten (*Colony Forming Unit*, CFUs) genannt werden, und bilden diskrete Zellcluster oder Kolonien aus. Dazu gehören Zellen der „weißen Zellreihe“, die Granulozyt- Makrophagen Vorläuferzellen und die Zellen der „roten Zellreihe“, die Erythrozyten Vorläuferzellen. Die Analyse der Differenzierungsfähigkeit der HSPZ in die einzelnen Zelltypen wurde mittels CFU Bestimmung (3.2.1.7) durchgeführt. Hierfür wurden HSPZ aus gesunden Probanden (n= 5) und HSPZ aus MDS/AML-Patienten (n= 9) wiederum über einen Zeitraum von 72 Stunden kultiviert, bevor ein Teil der Zellen im CFU Assay eingesetzt wurde. Nach 14-tägiger Kultivierung/Differenzierung wurden die differenzierten weißen und roten Kolonien mikroskopisch ermittelt (Abbildung 18). HSPZ von MDS/AML-Patienten haben eine signifikant verminderte Differenzierungsfähigkeit im Vergleich zu HSPZ aus gesunden Probanden. Diese verminderte Fähigkeit betrifft sowohl die rote als auch die weiße Zellreihe (Abbildung 18). Die gesamte Kolonienanzahl war 7,5-mal geringer bei MDS/AML-HSPZ im Vergleich zu den gesunden HSPZ. Insbesondere die Differenzierung in die Erythrozyten Vorläuferzellen war bei MDS/AML-HSPZ mit 0 Kolonien signifikant vermindert zu den gesunden HSPZ, die im Mittel 16 Kolonien aufwiesen. Insgesamt differenzieren HSPZ aus Patienten mit hämatologischer Erkrankung wesentlich schlechter als HSPZ aus gesunden Probanden.

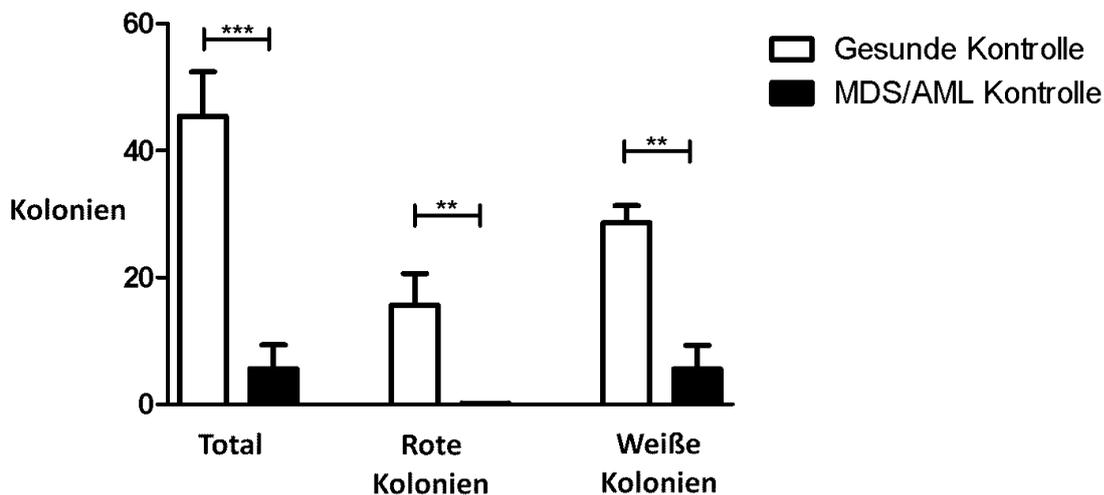


Abbildung 18: Differenzierungsfähigkeit von HSPZ aus gesunden Probanden und MDS/AML-Patienten. Die Kolonienanzahl der Erythrozyten Vorläuferzellen (Rote Kolonien) und der Granulozyt-Makrophagen Vorläuferzellen (Weiße Kolonien) sind signifikant vermindert in MDS/AML-HSPZ (n= 9) im Vergleich zu den gesunden HSPZ (n= 5).

Die SMAD-Signalisierungskaskade ist verantwortlich für die Differenzierung und Proliferation von verschiedenen Zelltypen, darunter auch HSPZ (Challen *et al.*, 2010; DePaolo, 1997; Yu und Dolter, 1997). Da dieser Signalweg in MDS und AML verändert sein könnte, sollte die Aktivierung des SMAD Signalweges mittels Immunfärbung von SMAD2 und phosphoryliertem SMAD2 (pSMAD2) untersucht werden. Dafür wurden die Proteine von HSPZ aus MDS- und AML-Patienten nach 3-tägiger Kultivierung isoliert und anschließend durch Western Blot und Immunfärbung die Abundanz von SMAD2 und pSMAD2 nachgewiesen. Für die pSMAD2 Level wurden die Signale für pSMAD2 auf die geladene Gesamtproteinmenge normalisiert. Um eine Veränderung der Phosphorylierung zu analysieren wurde im Anschluss wiederum auf die SMAD2 Intensität normalisiert. Wie in Abbildung 19 A dargestellt waren die Level in MDS/AML-HSPZ höher als die pSMAD2 Level in HSPZ von gesunden Probanden. Dies ist auch in den Beispielen der Immunfärbungen in Abbildung 19 B zu erkennen. Die pSMAD2 Signale zeigten in den HSPZ aus gesunden Probanden deutlich schwächere Signale als bei den Kontroll-HSPZ aus MDS/AML-Patienten.

Somit konnte gezeigt werden, dass HSPZ aus hämatologisch erkrankten Patienten signifikant schlechtere Eigenschaften zeigen, als HSPZ aus gesunden Probanden. Die Proliferation und die Differenzierung dieser waren signifikant vermindert und weiterhin lassen die erhöhten pSMAD2 Level vermuten, dass dieser Signalweg in HSPZ aus hämatologisch erkrankten Patienten dereguliert ist. Das differenziell im Sekretom quantifizierte Protein FSTL3 ist ein sekretiertes, bindendes und antagonistisches Protein für Mitglieder der TGF β -Familie, speziell AktivinA. Demnach hat es regulierende Eigenschaften auf die SMAD Signalisierung. Um einen Einfluss von dem differenziell sekretierten Protein FSTL3 in der MDS und AML Pathogenese zu ergründen, wurde für dieses im Folgenden eine funktionelle Validierung an HSPZ durchgeführt.

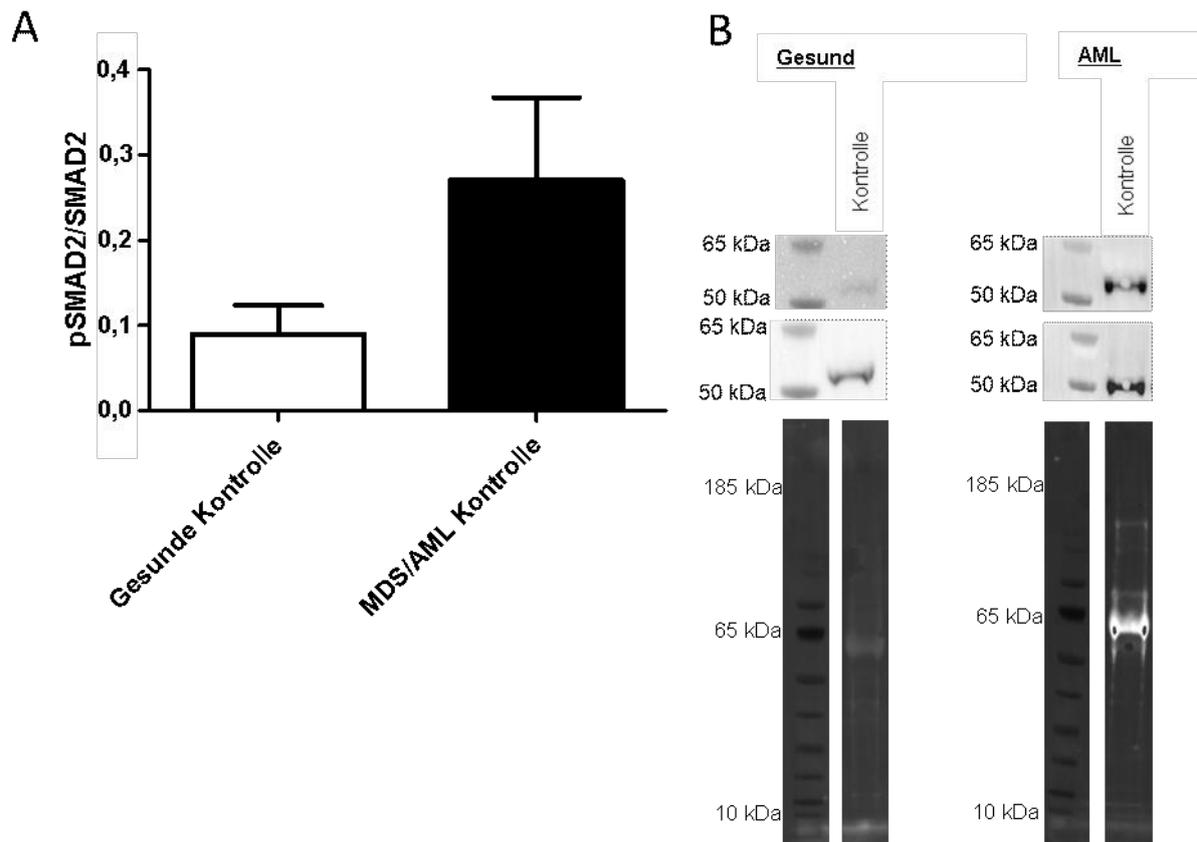


Abbildung 19: Western Blot, Immunfärbung gegen SMAD2 und pSMAD2 von HSPZ aus gesunden Probanden und MDS/AML-Patienten. A) Level von pSMAD2 sind höher in HSPZ aus MDS/AML-Patienten im Vergleich zu HSPZ aus gesunden Probanden. Signale wurden auf Gesamtproteinmenge und unphosphoryliertem SMAD2 normalisiert. **B)** Zwei Beispiele (Gesund und AML) der Immunfärbung gegen pSMAD2 und SMAD2 sowie die geladenen Gesamtproteinmenge in HSPZ aus einem gesunden Probanden und HSPZ aus einem AML-Patienten.

4.4 Funktionelle Validierung von FSTL3 als signifikant differenziell sekretierter Kandidat

In der differenziellen Sekretomanalyse von gesunden Probanden und an MDS und AML erkrankten Patienten zeigte das Protein *follistatin-related protein 3* (FSTL3) eine geringere Abundanz im MSZ-Sekretom von MDS-Patienten und darüber hinaus eine signifikante geringere Abundanz im MSZ-Sekretom von AML-Patienten. FSTL3 ist ein sekretiertes, bindendes und antagonisierendes Protein für Mitglieder der TGF β -Familie, speziell AktivinA. AktivinA ist der dominierende Ligand für den Aktivin Signalweg, steuert grundlegende Prozesse wie Zellproliferation und -differenzierung, Entwicklung und Reproduktion von Zellen (DePaolo, 1997; Maguer-Satta und Rimokh, 2004; Phillips und de Kretser, 1998). Demzufolge wurden funktionelle Effekte von FSTL3 auf den Aktivin Signalweg in HSPZ, welche primär für die hämatologischen Erkrankungen MDS und AML verantwortlich sind, validiert. Dafür wurden HSPZ aus dem Knochenmark von gesunden Probanden und MDS/AML-Patienten isoliert (3.2.1.2) und anschließend kultiviert. Um die differenzielle Sekretion von FSTL3 durch MSZ im Knochenmark widerzuspiegeln, wurden die HSPZ 72 Stunden mit rekombinantem FSTL3 behandelt. Für die Analyse der Funktionalität von FSTL3, wurde im Folgenden rekombinantes FSTL3 an den beiden AML Zelllinien HL-60 und THP-1 getestet.

4.4.1 Funktionell aktives FSTL3 in HL-60 und THP-1 AML Zelllinien

In ersten Experimenten wurde die inhibierende Funktion von FSTL3 auf AktivinA analysiert. Hierfür wurden die kommerziellen Suspension AML Zelllinien HL-60 (Akute promyelozytische Leukämie Zelllinie) und THP-1 (AML Zelllinie) mit humanem AktivinA und FSTL3 behandelt (Abbildung 20) und anschließend die Aktivierung des Aktivin Signalweges durch Immunfärbung von SMAD2 und phosphoryliertem SMAD2 (pSMAD2) analysiert. Laut Herstellerangaben liegt die ED50 für die Neutralisierung der Aktivin-vermittelten erythroiden Differenzierung von K562 humanen chronischen myelogenen Leukämiezellen durch FSTL3, bei 3-15 ng/ml in Gegenwart von 7,5 ng/ml rekombinantem humanem AktivinA (R&D Systems). Die beiden Zelllinien wurden laut Herstellerangaben mit 7,5 ng/ml rekombinantem humanem AktivinA behandelt. Um eine vollständige Neutralisierung von AktivinA zu erreichen wurden 50 ng/ml FSTL3 eingesetzt.

Als Ladekontrolle diente dabei das Haushaltsprotein GAPDH. In eigenen Vorexperimenten wurde die optimale Konzentration von AktivinA und FSTL3 in den beiden Zelllinien ermittelt und es zeigte sich ein intensiveres pSMAD2 Signal nach 7,5 ng/ml

AktivinA Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diese erhöhte Phosphorylierung von SMAD2 konnte mit einer gleichzeitigen Behandlung mit 50 ng/ml FSTL3 reduziert werden (Abbildung 20). Durch die Immunfärbung von pSMAD2 in den AML Zelllinien konnte gezeigt werden, dass FSTL3 aktiv ist, AktivinA binden und somit inhibieren kann. Im Folgenden wurde der Einfluss von FSTL3 auf die HSPZ und speziell auf die Proliferation der HSPZ untersucht.

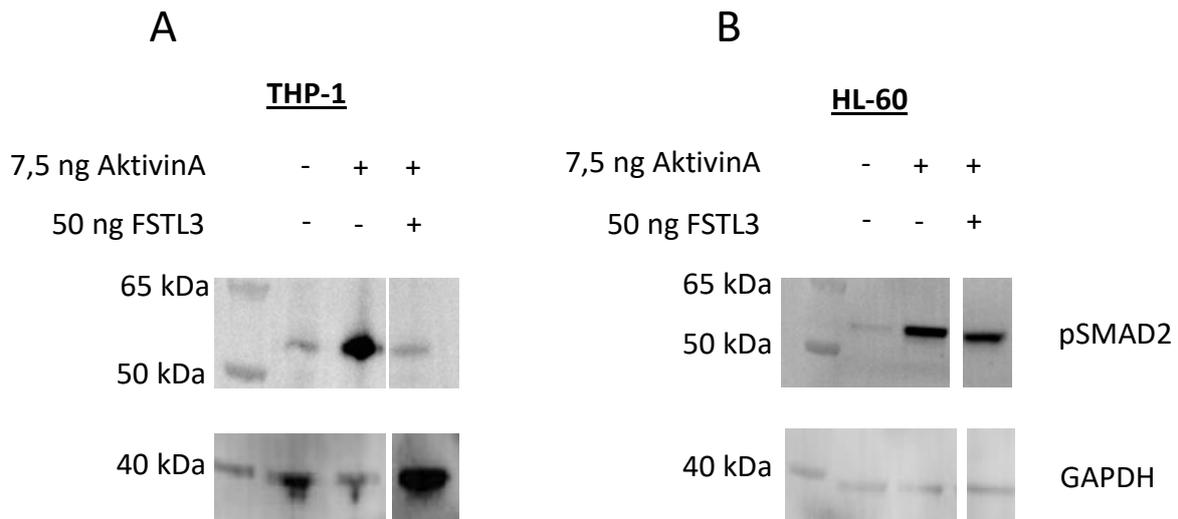


Abbildung 20: Western Blot Immunfärbung gegen pSMAD2 in AML Zelllinien HL-60 und THP-1. Immunfärbung gegen pSMAD2 in **A**) THP-1 (AML Zelllinie) und **B**) HL-60 (Akute promyelozytische Leukämie Zelllinie) zeigte ein intensives Signal nach 7,5 ng/ml AktivinA Behandlung und ein schwaches Signal nach 7,5 ng/ml AktivinA und gleichzeitiger 50 ng/ml FSTL3 Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Als Ladekontrolle diente das Haushaltsprotein GAPDH.

4.4.2 AktivinA in HSPZ

Es wurde gezeigt, dass die Liganden der TGF β -Familienproteine, wie AktivinA, autokrin wirken und Effekte auf die Proliferation und Proliferationskinetik haben (Fan *et al.*, 2002). Ferner konnte in embryonalen Stammzellen gezeigt werden, dass speziell der Aktivin Signalweg autokrin konstitutiv aktiviert wird (Ogawa *et al.*, 2007). Da in dem hier verwendeten HSPZ Zellkulturmodell die Funktionsweise von FSTL3 validiert werden sollte, wurde im Folgenden nachgewiesen, dass HSPZ AktivinA bilden und somit autokrin den Aktivin Signalweg aktivieren können. Dafür wurde mittels qRT-PCR die relative Genexpression von *AktivinA* (Dimer aus *InhibinA* (*INHBA*)) in nativen unbehandelten HSPZ ermittelt. HSPZ von gesunden Probanden sowie MDS- und AML-HSPZ können *INHBA* exprimieren und demnach das Protein translatieren. Die Expression von *INHBA* scheint in HSPZ in AML-Patienten höher zu sein.

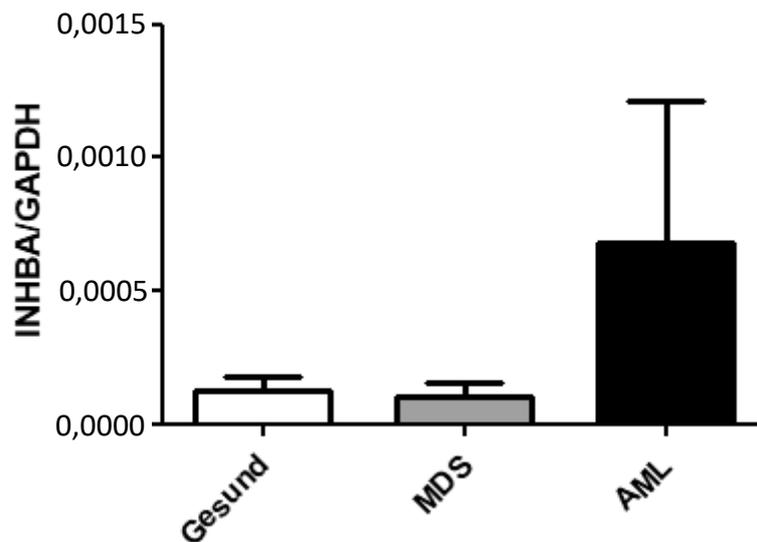


Abbildung 21: qRT-PCR Analyse der mRNA von *INHBA* in HSPZ von gesunden Probanden, MDS- und AML-Patienten. Gesunde und MDS-HSPZ zeigten eine geringere *INHBA* Expression im Vergleich zu MSZ aus AML-Patienten. Für die Analyse wurden HSPZ aus 8 gesunden, 9 MDS- und 9 AML-Patienten verwendet. *INHBA* wurde in Relation zu dem Haushaltsgen *GAPDH* gesetzt und durch qRT-PCR quantifiziert.

4.4.3 FSTL3 scheint keinen Einfluss auf die Proliferation von HSPZ zu haben

In dieser Arbeit wurde analysiert ob das von MSZ differentiell sekretierte Protein FSTL3 funktionelle Effekte auf HSPZ hat. Dafür wurden HSPZ aus gesunden Probanden und MDS/AML-Patienten 72 Stunden mit rekombinantem FSTL3 behandelt und anschließend die funktionellen Effekte auf die Proliferation, Differenzierung und den SMAD Signalweg untersucht. Vorexperimente mit HSPZ zeigten im Gegensatz zu den Zelllinien, dass eine Behandlung mit 10 ng/ml FSTL3 die größten Effekte auf die Proliferation zeigten. Aus dem Grund wurde im Folgenden diese Konzentration verwendet. Um den Einfluss von FSTL3 auf die Proliferation von HSPZ zu analysieren wurde die Zellzahl nach 72 stündiger Behandlung mit FSTL3 ermittelt und die CPD berechnet (Abbildung 22). Wie in 4.3 beschrieben, zeigten unbehandelte HSPZ aus MDS- und AML-Patienten (n= 10) eine signifikant verminderte Proliferation im Vergleich zu HSPZ aus dem Knochenmark von gesunden Probanden (n= 5) auf. Die Behandlung von HSPZ aus gesunden Probanden mit 10 ng/ml FSTL3 zeigte keinen Einfluss auf die Proliferation der HSPZ. Auch die mit 10 ng/ml FSTL3 behandelten HSPZ aus MDS- und AML-Patienten wiesen keine signifikante Veränderung der Proliferation auf. Demnach scheint das Protein unter den berücksichtigten Bedingungen keinen Effekt auf die Proliferation zu erzielen.

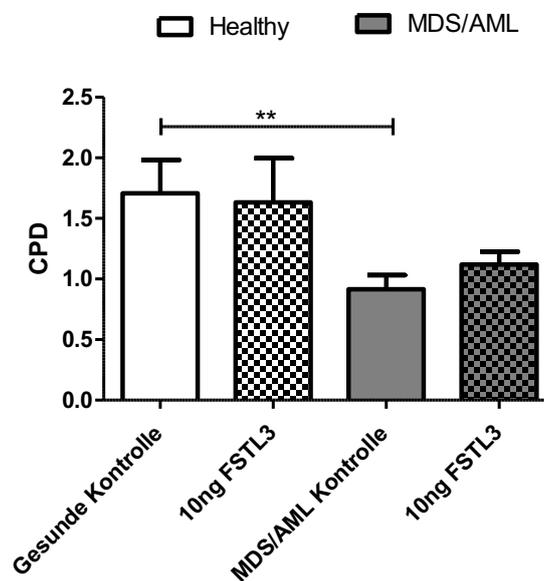


Abbildung 22: Kumulative Populationsverdopplung von HSPZ aus dem Knochenmark. MDS/AML-HSPZ (n= 10) zeigten eine signifikant verminderte Proliferation als HSPZ aus gesunden Probanden. Die Behandlung von HSPZ aus gesunden Probanden (n= 5) mit 10 ng/ml FSTL3 zeigte keine Auswirkung auf die Proliferation. Dagegen wiesen mit 10 ng/ml FSTL3 behandelten HSPZ aus MDS/AML-Patienten eine geringfügig erhöhte Proliferation.

4.4.4 FSTL3 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Differenzierung von HSPZ

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von FSTL3 auf die Differenzierungsfähigkeit von HSPZ untersucht. Die Analyse der Differenzierungsfähigkeit der HSPZ in die einzelnen Zelltypen wurde mittels CFU Bestimmung (3.2.1.7) durchgeführt. Hierfür wurden wiederum HSPZ aus gesunden Probanden (n= 5) und HSPZ aus MDS/AML-Patienten (n= 9) über einen Zeitraum von 72 Stunden mit 10 ng/ml FSTL3 behandelt, bevor sie in den CFU Assay eingesetzt wurden. Nach 14-tägiger Kultivierung wurden die differenzierten weißen und roten Kolonien mikroskopisch ermittelt (Abbildung 23). Wie in 4.3 gezeigt, haben HSPZ von MDS/AML-Patienten eine signifikant verminderte Differenzierungsfähigkeit im Vergleich zu HSPZ aus gesunden Probanden. Die Behandlung HSPZ aus gesunden Probanden sowie aus MDS/AML-Patienten mit 10 ng/ml FSTL3 zeigte keinen Effekt auf die Differenzierungsfähigkeit der HSPZ (Abbildung 23).

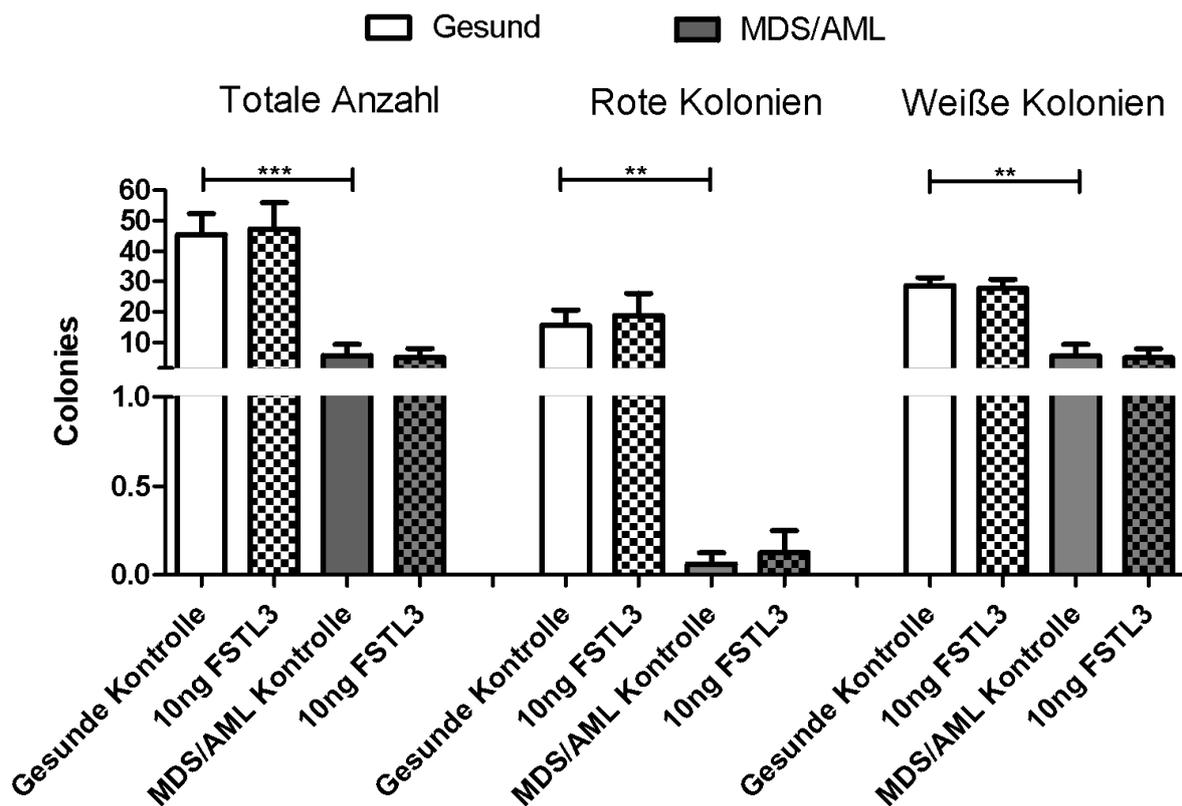


Abbildung 23: Differenzierungsfähigkeit von HSPZ nach FSTL3 Behandlung. Die Kolonienanzahl der Erythrozyten Vorläuferzellen (rote Kolonien) und der Granulozyt- Makrophagen Vorläuferzellen (weiße Kolonien) sind signifikant vermindert in MDS/AML-HSPZ (n= 9) im Vergleich zu den gesunden HSPZ (n= 5). Die Behandlung mit 10 ng/ml FSTL3 zeigte keinen Effekt auf die Differenzierungsfähigkeit von gesunden sowie MDS/AML-HSPZ.

4.4.5 FSTL3 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Phosphorylierung von SMAD2 in HSPZ

FSTL3 ist involviert im Aktivin-Signalweg und führt durch die Bindung an Aktivin zu dessen biologischer Neutralisierung (Maguer-Satta *et al.*, 2001). Folglich kommt es zu Effekten des Aktivin Signalweges mit Auswirkungen auf die SMAD2 Phosphorylierung. Der Einfluss von FSTL3 auf die Aktivierung des Aktivin-Signalweges wurde mittels Immunfärbung von SMAD2 und phosphoryliertem SMAD2 (pSMAD2) untersucht. Dafür wurden die Proteine nach 3-tägiger Behandlung der HSPZ mit 10 ng/ml FSTL3 isoliert und anschließend durch Western Blot und Immunfärbung die Abundanz von SMAD2 und pSMAD2 nachgewiesen. Wie in Abbildung 19 dargestellt, waren die Level von pSMAD2 in MDS/AML-HSPZ höher als die pSMAD2 Level in HSPZ von gesunden Probanden. Die 3-tägige Behandlung mit 10 ng/ml FSTL3 hatte keinen Einfluss auf die pSMAD2 Level (Abbildung 24 A). Weder die HSPZ der gesunden Probanden noch der der MDS/AML-Patienten zeigten eine Veränderung der Phosphorylierung von SMAD2 nach Behandlung von 10 ng/ml FSTL3 (Abbildung 24 B).

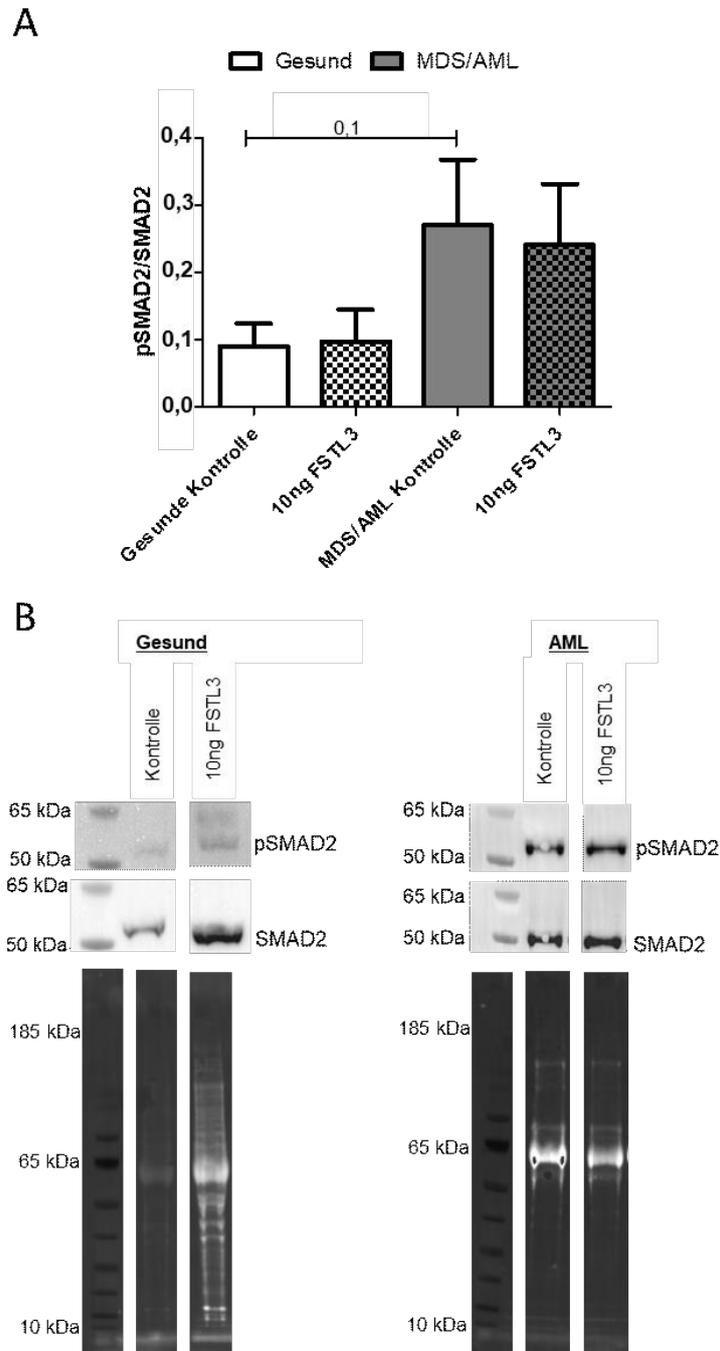


Abbildung 24: Western Blot, Immunfärbung gegen SMAD2 und pSMAD2 nach FSTL3 Behandlung von HSPZ. A) Level von pSMAD2 sind deutlich höher in HSPZ aus MDS/AML-Patienten im Vergleich zu HSPZ aus gesunden Probanden. 10 ng/ml FSTL3 zeigte keinen Effekt auf die Phosphorylierung von SMAD2 in HSPZ aus gesunden sowie MDS/AML-Patienten. Signale wurde auf Gesamtproteinmenge und unphosphoryliertem SMAD2 normalisiert. **B)** Zwei Beispiele der Immunfärbung gegen pSMAD2 und SMAD2 sowie die geladene Gesamtproteinmenge in HSPZ aus einem gesunden Probanden und HSPZ aus einem AML-Patienten. Es sind jeweils die unbehandelte Kontrolle und die 10 ng/ml FSTL3 behandelte Probe dargestellt.

5 Diskussion

MDS und AML sind Knochenmarkserkrankungen, deren Hauptmerkmal über alle Subtypen hinweg eine ineffektive Hämatopoese ist. Obwohl beide Erkrankungen von einem Defekt der HSPZ ausgehen gerät das Knochenmark-Mikromilieu, und dabei speziell die MSZ, immer mehr in den Fokus. Um die Grundlage zum Verständnis der Wechselwirkung zwischen MSZ und HPSZ im Knochenmark zu legen, wurde in dieser Arbeit das Sekretom von MSZ von MDS- und AML-Patienten mithilfe eines proteomanalytischen Ansatzes analysiert. Hierzu wurden die MSZ aus dem Knochenmark von 30 Probanden und Patienten isoliert, die Überstände gewonnen und differenziell verglichen.

5.1 Methodische Aspekte

5.1.1 Das Modellsystem

Es konnte gezeigt werden, dass das Mikromilieu im Knochenmark und insbesondere MSZ eine wichtige Rolle in der Hämatopoese spielen. Ziel dieser Arbeit war es möglichst umfassend zu beschreiben, dass Sekretome und damit mögliche Zielproteine an der Interaktion von MSZ und Umgebung beteiligt sind. Da eine *in vivo* Charakterisierung des MSZ-Sekretoms aufgrund der Heterogenität des Knochenmark-Mikromilieus keine spezifischen Aussagen über die beteiligten Zelltypen zulässt, wurde ein *in vitro* Zellmodell von MSZ, welches zuvor aus Patienten und gesunden Probanden isoliert wurde, verwendet. Von Vorteil dabei ist die einfache Art der Probenentnahme, sodass ausreichend Material zur nachgelagerten Analyse gesammelt werden kann. Ein weiterer Vorteil ist, dass Variationen des Sekretoms, die durch Ereignisse in einer vereinfachten *in vitro* Umgebung induziert werden, untersucht werden können (Kupcova Skalnikova, 2013; Nonnis *et al.*, 2016). Da die Analyse des Sekretoms durch die in den Kultivierungsmedien vorhandenen hochabundanten Serumbestandteile stark beeinflusst wird, wurden die Zellen nach der Kultivierung mit serumhaltigem Medium und einer Konfluenz von ca. 80 % unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Dies stellt einen entscheidenden Schritt dar, um Maskierung und Kontamination des Sekretomprofils durch die reichlich vorhandenen Serumproteine zu vermeiden (Colzani *et al.*, 2009; Finoulst *et al.*, 2011; Kupcova Skalnikova, 2013). Hierbei stellte sich heraus, dass eine Kultivierung von 48 Stunden ausreichend Material ergab und, dass die Zellen keine Veränderung der Morphologie sowie eine hohe Vitalität (> 95 %) aufwiesen.

5.1.2 Aufarbeitung der MSZ-Sekretome

Typischerweise zeichnen sich die Zellkulturüberstände durch geringe Proteinkonzentrationen (ng/ml-Skala) aus. Aus dem Grund muss das Medium vor der Analyse konzentriert werden. Dazu werden in der Literatur 31 Strategien beschrieben. Dazu gehören die Ultrafiltration (Yamashita *et al.*, 2007), die Fällung (Makridakis *et al.*, 2010) und die Dialyse gefolgt von der Lyophilisierung (Planque *et al.*, 2009). Die hier eingesetzte Ultrafiltration ist eine Filtermembran-basierte Probenvorbereitung und dient zur Konzentrierung von Proben bis 20 ml. Dadurch eignet sie sich besonders für Sekretome (Schmudlach *et al.*, 2016). Der zeitliche Aufwand der Proteinkonzentration ist mit ca. 1 h Zentrifugation gering. In eigenen Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass der Proteinverlust bei der Ultrafiltration um bis zu 20 % geringer ist als mit der vergleichenden Methode, der Proteinfällung durch Trichloressigsäure. Vor der massenspektrometrischen Analyse erfolgte der Verdau der Proteine mittels der In-Gel Methode. Diese kann leicht für gering konzentrierte Proteinproben (1–10 µg/µl) durchgeführt werden und entfernt jegliche Salz- oder Lipidkontamination ohne weitere Reinigungsschritte durchführen zu müssen (Gundry *et al.*, 2009).

5.1.3 Sekretomanalyse mithilfe der Massenspektrometrie

Für die Sekretomanalyse können verschiedene Methoden (z. B. 2-D Gelelektrophorese, antikörperbasierte Verfahren, Massenspektrometrie) verwendet werden. Der hier verwendete MS-basierte Ansatz zeigt gegenüber anderen Methoden zur Proteinanalyse, wie z. B. der 2-D Gelelektrophorese oder antikörperbasierte Verfahren, folgende Vorteile auf. Die Menge des einzusetzenden Materials ist bedeutend geringer als für die 2-D Gelelektrophorese. Des Weiteren kann eine globale, gleichzeitige Identifizierung und Quantifizierung von hunderten von Proteinen erfolgen, was sich bei antikörperbasierten Verfahren als schwierig erweist (Walpurgis *et al.*, 2012). Für komplexe Proben gilt heutzutage immer noch der hier verwendete peptidbasierte (*bottom up*) Ansatz als Goldstandard (Megger *et al.*, 2013). Der Vorteil dieser Methodik ist die gleichzeitige Identifizierung und Quantifizierung der Proben. Die in dieser Arbeit verwendete markierungsfreie Quantifizierung mittels Massenspektrometrie besitzt den Vorteil, dass die Proben ohne weitere Manipulation, wie z. B. der Inkorporation von schweren Aminosäuren (SILAC) oder der chemischen Modifikationen des Analyten (z. B. bei iTRAQ oder der Dimethyl-Markierung), quantifiziert werden können. Den bedeutendsten Vorteil der markierungsfreien Quantifizierung stellt der sehr hohe dynamische Bereich dieser Methode dar, welcher wesentlich höher liegt als bei

Methoden die sich der Markierung mit stabilen Isotopen bedienen (Liu *et al.*, 2013; Old *et al.*, 2005).

5.2 Biologische Diskussion

5.2.1 MSZ Analyse von gesunden Probanden

Um einen generellen Überblick über das Sekretom von MSZ zu bekommen wurden in einer Vorstudie 8 MSZ-Sekretome, sowie 4 MSZ-Proteome aus dem Knochenmark gesunder Probanden analysiert. Neben der Charakterisierung des Sekretoms diente die Analyse zur Einordnung von Kontaminationen aus der Kultivierung und Aufarbeitung der Zellen. Diese Art der kombinierten Analyse wurde bereits von anderen Gruppen erfolgreich angewandt (Grube *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2011; Stuess *et al.*, 2015). Bioinformatische Programme, die für die Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen benutzt werden (z. B. Maxquant), vollziehen einen Datenbankabgleich mit einer Kontaminantenliste, um potentielle Kontaminationen zu identifizieren. Dabei sind jedoch nur die kontaminierenden Proteine aus der Probenvorbereitung, wie z. B. Kälberserum, enthalten. In unserer Analyse wurden Proteine als Kontaminanten definiert, die zwar jeweils im Sekretom und Proteom identifiziert wurden, aber signifikant im Proteom angereichert waren.

Bei der Analyse der Sekretome von 8 gesunden MSZ wurden 650 Proteine identifiziert und 2220 Proteine in den 4 Proteom Proben. Enes *et al.* haben mittels massenspektrometrischer datenunabhängiger Erfassungsanalyse (*data-independent acquisition* (DIA)) 2772 Proteine in einer Proteomanalyse von MSZ aus dem Knochenmark von gesunden Probanden (n= 3) identifiziert (Rolandsson Enes *et al.*, 2017). Mindaye *et al.* konnten in sechs kommerziell erhältlichen MSZ Zelllinien mittels ESI MS 3866 Proteine identifizieren. Die Anzahl an Proteinidentifizierungen im Proteom in dieser Arbeit liegt leicht unter bereits publizierten Daten, was mitunter der niedrigen Probenanzahl zuzuschreiben ist.

Die GO-Annotierung der gefilterten 315 Proteine im Sekretom bestätigt, durch den im MSZ-Sekretom erhaltenen Anstieg von extrazellulären Proteinen auf mehr als 60 %, die ausgewählten Selektionskriterien im Vergleich zu dem ungefilterten Sekretom. Der Vergleich mit anderen Studien, die auf die Charakterisierung des humanen MSZ abgeleiteten Sekretoms abzielten, ergab, dass von mir annotierte Kontaminanten Teil der publizierten Sekretomlisten waren (Maffioli *et al.*, 2017; Pires *et al.*, 2016; Teixeira *et al.*, 2016). Beispielsweise wurden Proteine wie Serumalbumin, *Cysteine and glycine-rich protein 1* (CRP1) und *Neuroblast differentiation-associated protein* AHNAK, die in dieser Studie als Kontaminationen

eingestuft wurden, als Kandidatenproteine in anderen Studien von MSZ-Sekretomen in Betracht gezogen. Serumalbumin stellt dabei eine Kontamination aus der Zellaufarbeitung und der Kultivierung mit serumhaltigem Medium dar. CRP1 und AHNAK dagegen sind 2 zytoplasmatische bzw. nukleäre Proteine für die es, bis dato, keinen Nachweis der Sekretion gibt und welche in der vorliegenden Studie signifikant im Proteom angereichert waren. Teixeira und Kollegen analysierten den Überstand aus humanen Knochenmark-MSZ unter statischen Kulturbedingungen durch Massenspektrometrie (120 Proteine) und berichteten über Proteine aus Zellkulturmedium, wie z. B. Serumalbumin und Haptoglobin, als Kandidaten-Sekretionsproteine (Teixeira *et al.*, 2016). Maffioli und Kollegen verwendeten einen massenspektrometrischen Ansatz und identifizierten im MSZ-Sekretom (257 Proteine) verschiedene Kern- oder Zytoplasmaproteine (z. B. CRP1 und AHNAK), die aufgrund einer Anreicherung im Proteom in dem hier durchgeführten Ansatz ausgeschlossen wurden (Maffioli *et al.*, 2017). Das Entfernen von Proteinen die im Proteom angereichert sind könnte zur Folge haben, dass man richtig-positive Proteine entfernt. Dies hätte zur Folge, dass gering sekretierte Proteine, die kumuliert in der Zelle vorliegen, rausgefiltert werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass man nicht bekannte sekretorische Proteine ausschließt, die über den noch wenig erforschten Weg der unkonventionellen Sekretion aus der Zelle geschleust werden. Aus dem Grund muss das Entfernen von Proteinen aus dem Sekretom mit Bedacht und Sorgfalt durchgeführt werden. Jedoch bestätigen die Ergebnisse der Zunahme an extrazellulären Proteinen, dass, vor der Integration von Sekretomdaten aus Knochenmark-MSZ in einen biologischen Kontext, sowohl der Beitrag von toten Zellen als auch von Zellkulturmedium berücksichtigt werden muss.

Der komplette Intensitätsbereich der MSZ Proteine im Sekretom wurde in die drei Abundanzbereiche hochabundant, mittelabundant und niedrigabundant geteilt. Zu den hochabundanten Proteinen zählten viele extrazelluläre Matrixproteine (EZM Proteine), wie z. B. Kollagene oder Fibrilline. Es ist bekannt, dass diese EZM Proteine eine wichtige Rolle bei der Adhäsion hämatopoetischer Zellen innerhalb der Knochenmark-Mikroumgebung spielen und Schlüsselkomponenten für die Knochenmark-Mikroumgebung darstellen (Ichioka *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 1995). Klein *et al.* zeigten, dass Kollagen Typ VI ein starkes Adhäsivsubstrat für verschiedene mononukleäre Knochenmark Zellen ist (Klein *et al.*, 1995). Lu *et al.* haben bei Myelofibrose nachgewiesen, dass die Progression von malignem HSPZ zu einer erhöhten Expression des EZM-Proteins Kollagen Typ 1 (COL1A1) beiträgt (Lu *et al.*, 2015). Unter den Kandidatenproteinen, die mit dem beobachteten regenerativen Phänotyp

verbunden waren, berichteten sie z. B. von *Insulin-like Growth Factor 2* (IGF2), welches auch in unserer Studie im mittleren Abundanzbereich gefunden wurde (Kuljanin *et al.*, 2017). Proteine, die dem biologischen Prozess der Signaltransduktion und Zellkommunikation zugeordnet wurden, sind meist dem mittleren und niedrig abundanten Bereich zugeordnet worden. Im Bereich geringer Abundanz wurden verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren identifiziert, wie z. B. VEGFC, TGF β 1, TGF β 2 und GDF6. Jedoch wurden einige Zytokine, wie z. B. IL6 oder CCL2, die bekannterweise von MSZ sekretiert werden nicht identifiziert. Dies zeigten auch Ranganath *et al.* durch LC-MS/MS Analysen, bei denen die Identifizierung vieler Zytokine und Wachstumsfaktoren aufgrund der geringen Abundanz nicht möglich war (Ranganath *et al.*, 2012). Eine geringe Identifizierung niedrig abundanter Zytokine wird begünstigt durch hochabundante Serumproteine aus der Zellkultivierung, die eine Verschiebung des dynamischen Bereichs zur Folge haben und niedrig abundante Zytokine und Wachstumsfaktoren maskieren (Latosinska *et al.*, 2015).

Die im niedrig abundanten Bereich identifizierten Mitglieder der TGF β -Familie sind Zytokine, die eine wichtige Rolle in Krebserkrankungen, Immunregulation und Wundheilung spielen (Li *et al.*, 2006). In Säugetieren sind drei TGF β -Isoformen beschrieben: TGF β 1, TGF β 2 und TGF β 3. TGF β 1 ist ein zu den Zytokinen zählendes Signalmolekül und spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Zellen und Geweben. Weiterhin gewinnt TGF β 1 aufgrund seiner zentralen Funktion bei der Kontrolle von Entzündungsreaktionen großes Interesse auf dem Gebiet der hämatologischen Erkrankungen (Li und Flavell, 2008). In verschiedenen Experimenten mit Knochenmarkszellen konnte eine Beteiligung von TGF β 1 an verschiedenen Erkrankungen, darunter hämatologische Erkrankungen, gezeigt werden (Bruns *et al.*, 2012; Rio und Bueren, 2016; Sing *et al.*, 1988; Zhou *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2008). Bruns *et al.* zeigten zudem eine Beziehung zwischen der Überexpression von TGF β 1 in der Knochenmark-Mikroumgebung und der verringerten Unterstützungskapazität für Stammzellen beim multiplen Myelom (Bruns *et al.*, 2012). Bei hämatologischen Erkrankungen, wie z. B. MDS, führte eine Überaktivierung der TGF β -Signalgebung zur Suppression der roten Reihe (Zhou *et al.*, 2008). *Stromal cell-derived factor 1* (SDF1), auch bekannt als *CXC-Motiv-Chemokin 12* (CXCL12), wurde im mittleren Abundanzbereich gefunden. SDF1 wirkt als ein wichtiger hämatopoetischer Wachstumsfaktor und scheint die Mobilisierung, Migration und Rekrutierung von MSZ zu verbessern (Askari *et al.*, 2003). Hwang *et al.* zeigten eine erhöhte Expression von SDF1 in Knochenmark-MSZ im Vergleich zu MSZ anderer Gewebe. Dies führte zu der Annahme, dass SDF1 eine Rolle bei der

Mobilisierung von Knochenmark-MSZ spielen könnte (Hwang *et al.*, 2009). Durch die Charakterisierung und die Identifizierung verschiedener Proteine wie SDF1 oder Mitglieder der TGF β -Familie im Sekretom von MSZ, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Sekretomdaten aus kulturexpandiertem MSZ, die aus dem Knochenmark gesunder Probanden stammen, mit physiologischen Prozessen verknüpft werden können.

Eine detaillierte Analyse der 315 Proteine des MSZ-Sekretoms zeigte, dass 25 % der Proteine am Zellwachstum und/oder -erhalt beteiligt waren und 22 % an Signaltransduktion und Zellkommunikation. Kuljanin und Kollegen, die das Sekretom der MSZ mit einem regenerativen Phänotyp mittels eines SILAC-basierten quantitativen Proteomik-Ansatzes analysierten, wiesen bereits darauf hin, dass die sekretierten Proteine mit Zellwachstum, Matrixremodellierung und proangiogenen Eigenschaften assoziiert waren (Kuljanin *et al.*, 2017). Ferner wurde gezeigt, dass MSZ durch die Sekretion einzelner Wachstumsfaktoren einen regenerativen Effekt auf das Zellwachstum verschiedener Zelltypen haben können (Lee *et al.*, 2018; Leuning *et al.*, 2017; Reinders *et al.*, 2014; Schepers und Fibbe, 2016).

Durch Analyse der Peptidmuster von Sekretomen und Zelllysaten konnten in dieser Arbeit insgesamt 17 Proteine als Kandidaten für die proteolytische Prozessierung identifiziert werden. Für 10 Proteinkandidaten (PTPRK, VASN, CAD11, NRP1, PTK7, LRP1, CD44, PLXB2, NOTC2/3) wurde bereits eine proteolytische Spaltung von der Zelloberfläche beschrieben (Artigiani *et al.*, 2003; Golubkov und Strongin, 2012; Kim *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2009; Malapeira *et al.*, 2011; Nagano und Saya, 2004). Plexin-B2 (PLXB2), ein Semaphor-Rezeptor, wurde in mehreren Zelllinien proteolytisch prozessiert (Artigiani *et al.*, 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *Tyrosine-protein kinase-like 7* (PTK-7), ein Bestandteil der kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalwege, in invasiven Fibrosarkom-HT1080-Zellen proteolytisch abgespaltet werden kann (Golubkov und Strongin, 2012). Für die anderen 7 Proteine (MXRA8, CD248, 4F2, APMAP, ENPP1, CKAP4, ITB1) ist in der Literatur keine proteolytische Prozessierung beschrieben. Das Protein CD248, das auch als Endosialin bezeichnet wird, ist ein *Single-Pass*-Transmembranrezeptor und wird auf MSZ exprimiert (Lax *et al.*, 2010). Es ist assoziiert mit Matrix-Metalloproteinase-Aktivität und scheint eine Rolle in Gewebeumbau und -reparatur zu spielen, die durch proteolytische Verarbeitung positiv beeinflusst werden (Bagley *et al.*, 2009). Der in dieser Arbeit angewandte Ansatz, der die Peptidmuster von Sekretomen und Zelllysaten vergleicht, zeigte, dass es Hinweise für mögliche proteolytisch prozessierte Proteine gibt. Diese könnten eine funktionelle Rolle bei der Signalgebung von Zellen im menschlichen Knochenmark spielen.

5.2.2 Differenzielle MSZ-Sekretomanalyse von gesunden Probanden, MDS- und AML-Patienten

Durch die differenzielle massenspektrometrische Analyse von 30 MSZ-Sekretomen aus gesunden Probanden sowie MDS/AML-Patienten konnten insgesamt 1432 Proteine identifiziert und 568 Proteine relativ quantifiziert werden. Bis dato wurde noch keine vergleichende MS Analyse des Sekretoms von MSZ aus dem Knochenmark von Patienten mit MDS und AML durchgeführt. Bisher analysierten Gruppen ausschließlich MSZ-Sekretome gesunder Probanden, wie die Gruppe um Enes und Kollegen, die mittels massenspektrometrischer datenunabhängiger Erfassungsanalyse (*data-independent acquisition* (DIA)) 961 Proteine im Sekretom von MSZ aus dem Knochenmark von gesunden Probanden (n= 3) identifizieren konnten (Rolandsson Enes *et al.*, 2017). Maffioli und Kollegen identifizierten durch einen LC-ESI-MS/MS Ansatz 257 Proteine im MSZ-Sekretom (Maffioli *et al.*, 2017). Auch Rocha *et al.* haben das Sekretom von gesunden MSZ durch LC-ESI-MS/MS in Bezug auf die Chondrogene Differenzierung untersucht. Sie konnten in drei biologischen Replikaten mit je 8 Fraktionen 1043 Proteine identifizieren. Kim *et al.*, die das Sekretom von kommerziell erhältlichen MSZ mit einem Flugzeit-Massenspektrometer untersuchten, konnten 315 Proteine identifizieren. Aufgrund der hohen Anzahl von 30 humanen Knochenmark-MSZ-Sekretomen von drei verschiedenen Patienten- und Probandengruppen, die erstmals für eine differentielle Sekretomstudie von MSZ verwandt wurden, konnte in der hier vorliegenden Arbeit eine überdurchschnittliche Anzahl von 1432 Proteinen identifiziert werden.

Neben der Analyse der MSZ-Sekretome aus gesunden Probanden wurden MSZ-Sekretome aus MDS- und AML-Patienten analysiert. MDS ist eine heterogene Erkrankung des Knochenmarks bei der der normale Reifungsprozess der Blutzellen gestört ist. Diese Patienten haben ein hohes Risiko in eine AML überzugehen, bei der eine hohe Anzahl dysplastische Zellen und Vorläuferzellen (Blasten) gebildet werden. Da beide Erkrankungen zwar im Knochenmark stattfinden, aber an sich unterschiedlich zu betrachten sind, wurden im Folgenden MSZ-Sekretome aus Patienten mit MDS und Patienten mit AML separat analysiert.

5.2.2.1 Differentielle Analyse des Sekretoms vom MDS-Patienten

Der in dieser Arbeit zum ersten Mal durchgeführte differenzielle quantitative Vergleich zwischen dem MSZ-Sekretom aus gesunden Probanden und dem MSZ-Sekretom aus MDS-Patienten ergab 12 signifikant differenziell unterschiedliche Proteine. Hierbei zeigte sich, dass

die 12 differenziellen Proteine unterschiedlichen Proteingruppen angehören. Eine GO-Annotierung der biologischen Prozesse zeigte, dass 25 % der Proteine, darunter SOD2, COL8A1 und LTBP2, in Zellwachstum und/oder -erhaltung und weiterhin 25 % (TKT, GALNT1, B4GALT1) in dem biologischen Prozess Metabolismus involviert sind. Diese biologischen Prozesse spiegeln hauptsächlich die Prozesse der MSZ-Sekretom Studie von gesunden Probanden wieder. Die Anzahl an differenziellen Proteinen scheint bei der hohen Anzahl quantifizierter Proteine gering. Dies könnte auf die Heterogenität der Probengruppen zurückzuführen sein. Es ist bekannt, dass eine Heterogenität von Patientenproben durch unterschiedliche Altersgruppen oder verschiedene Vorerkrankungen zu Stande kommen kann (Fidler und Hart, 1982; Heppner, 1984). Elsafadi und Kollegen konnten diese molekulare und funktionelle Heterogenität durch zytochemische Färbungen, Differenzierungsassays, Durchflusszytometrie und Elektronenmikroskopie in kultivierten gesunden MSZ aus dem Knochenmark zeigen (Elsafadi *et al.*, 2016). Trotz der im Vorfeld der Studie durchgeführten klinischen Charakterisierungen der Patienten (u. a. Vorerkrankungen, Alter, Geschlecht) und der daraus resultierenden Auswahl der Patienten ist eine Heterogenität der Patientenproben unvermeidbar.

5.2.2.2 Differentielle Analyse des Sekretoms von AML-Patienten

In der quantitativen Analyse zwischen dem MSZ-Sekretom aus gesunden Probanden und dem von AML-Patienten zeigten 34 Proteine einen signifikant differentiellen Unterschied auf. In diesem quantitativen Vergleich liegt die Anzahl der signifikant unterschiedlichen Proteine höher als im Vergleich der Sekretomen von gesunden Probanden und MDS-Patienten. Im Vergleich zu MDS zeigte sich, dass mit 50 % der Proteine (darunter S100A8, COL2A1, COL3A1, FSTL3) ein höherer Anteil eine Rolle im Prozess Zellwachstum und/oder -erhaltung spielt.

Für die folgende funktionelle Validierung wurde das differentielle Protein FSTL3 verwendet. Das Protein *Follistatin-related protein 3* (FSTL3) wies mit einer sechsmal höheren Abundanz in MSZ von gesunden Probanden und einem p-Wert von 0,002 einen hochsignifikanten Unterschied auf. Weiterhin wurde FSTL3 in dieser Studie nicht im Proteom nachgewiesen. FSTL3 ist ein beschriebenes sezerniertes Glykoprotein mit einem Signalpeptid und gehört demnach zu den klassisch sekretierten Proteinen. Es ist bekannt, dass es als ein bindendes und antagonistisches Protein für Mitglieder der TGF β -Familie (TGF β s, Aktivine, knochenmorphogenetische Proteine (BMPs)) wirkt (Abbildung 25). Dabei inhibiert FSTL3 hauptsächlich das Protein Aktivin, welches in Zellen durch seinen entsprechenden Aktivin-

Signalweg Prozesse beeinflussen kann (Abbildung 25). Aktivin ist ein sekretiertes Protein, das von einer Vielzahl von Geweben produziert wird und dem wichtige endokrine und parakrine Funktionen zugeschrieben werden. Es wurde gezeigt, dass Aktivin grundlegende Prozesse, wie Zellproliferation und -differenzierung, Entwicklung und Reproduktion, steuert (DePaolo, 1997; Phillips und de Kretser, 1998). Mehrere Studien haben gezeigt, dass Aktivin sowie FSTL3 von Knochenmark Stromazellen produziert und sekretiert werden. Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen den beiden Faktoren und der hämatopoetischen Differenzierung, insbesondere in Zellen der Erythroid-Linie, gezeigt werden (Hayette *et al.*, 1998; Yamashita *et al.*, 1992; Yu und Dolter, 1997). Ferner wird FSTL3 aber auch mit einigen Erkrankungen, wie Niereninsuffizienz und Brustkrebs in Verbindung gebracht (Kralisch *et al.*, 2017; Mukherjee *et al.*, 2007). Bis dato existiert jedoch kein spezieller Zusammenhang zwischen FSTL3 und den hämatologischen Erkrankungen MDS oder AML.

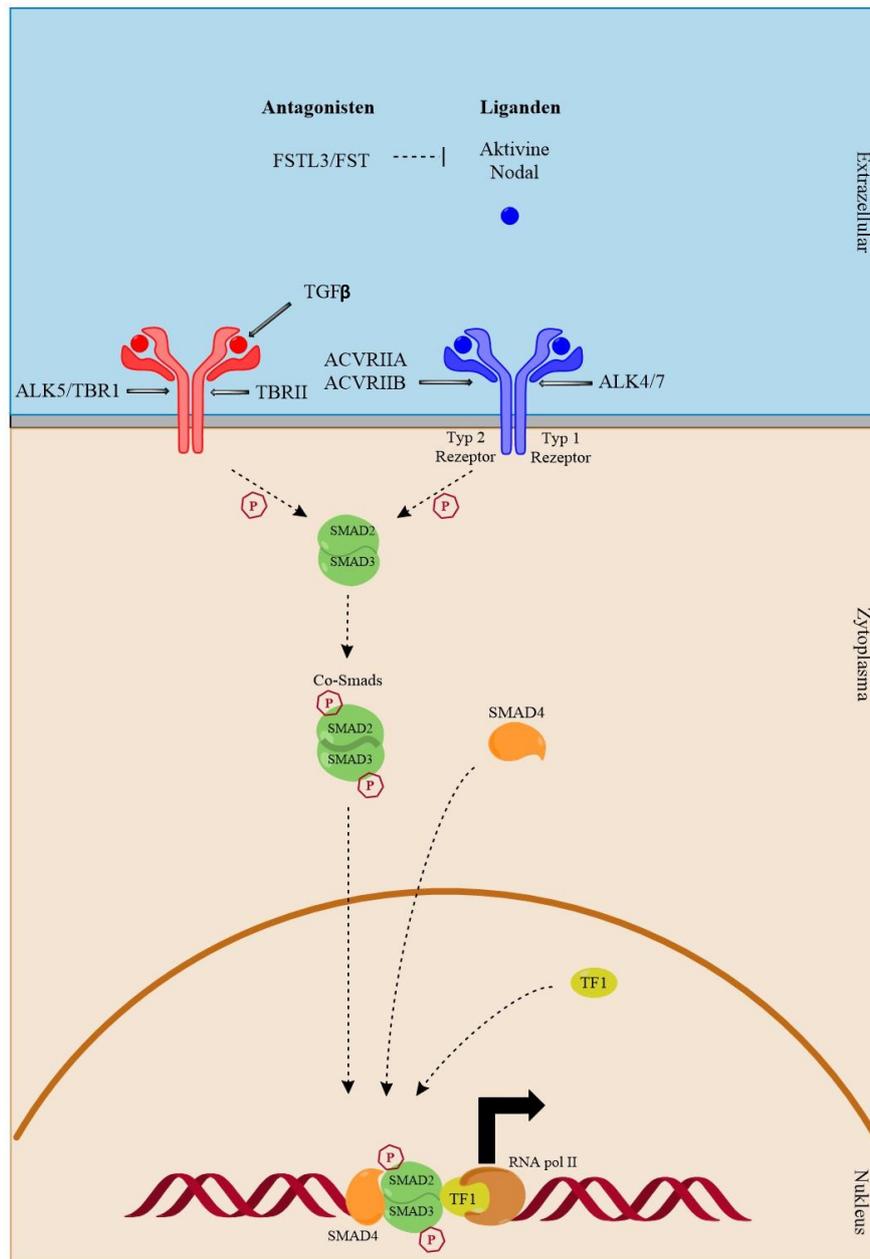


Abbildung 25: Aktivin-Signalweg. Extrazelluläre Liganden: Aktivine oder Nodal binden an Typ 1 (ACVRIIA / IIB) und Typ 2 Transmembranrezeptoren (ALK4/7), während TGFβ-Wachstumsfaktoren an TBR1 /ALK5 und TBR2 binden. Nodal erfordert die zusätzliche Bindung des Transmembran-Korezeptors CRIPTO1, um einen aktivierten Rezeptorkomplex mit Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren zu bilden. Der aktivierte Rezeptorkomplex (sowohl für Aktivin/Nodal als auch für TGFβ-Signalwege) phosphoryliert SMAD2- und SMAD3-Proteine, die im Komplex mit SMAD4 in den Zellkern gelangen. SMAD-Proteine wirken als Transkriptionsregulatoren und sind in der Lage die Transkription ihrer Ziel-Loci durch Rekrutierung von epigenetischen Modifikationen zu induzieren oder zu unterdrücken, was die Zugänglichkeit des umgebenden Chromatins durch epigenetische Modifikationen an Histonen oder DNA weiter modulieren wird. In einigen Zelltypen können SMAD2- und SMAD3-Proteine mit SMAD1, SMAD5 oder SMAD8 interagieren, die normalerweise die BMP4-Signalgebung vermitteln und so die Kommunikation zwischen den Aktivin/Nodal- und BMP-Signalwegen vermitteln (Modifiziert nach Pauklin und Vallier, 2015).

Aus den vorliegenden Ergebnissen der differentiellen Sekretomstudie wurde die Hypothese aufgestellt, dass das von MSZ sekretierte FSTL3 Effekte auf die Aktivin-Signalkaskade und damit einhergehend auf die SMAD-Signalkaskade der HSPZ haben könnte (Abbildung 26). Es ist bekannt, dass HSPZ unterschiedliche zelluläre Reaktionen auf die TGF β -SMAD Signalgebung zeigen. Diese Signaltransduktion beeinflusst den Zellzykluszustand und damit die Proliferationskapazitäten (Challen *et al.*, 2010). Die Signalgebung, durch bspw. AktivinA, wird durch lösliche Bindungsproteine streng reguliert. FSTL3 bindet mit hoher Affinität an AktivinA und verhindert, dass Aktivin an seine eigenen Rezeptoren bindet, wodurch seine Signalgebung blockiert wird (Abbildung 25). Wie bei anderen Mitgliedern der TGF β -Familie funktioniert die Aktivin Signalkaskade über einen heteromeren Komplex von transmembranen Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren: Aktivin bindet an einen Typ-II-Rezeptor, der ein Aktivin Typ I-Rezeptor-Signal entlang des SMAD-Wegs rekrutiert, phosphoryliert und somit aktiviert. Aktivin und TGF β wirken durch SMAD2 und SMAD3. Phosphoryliertes SMAD2 und SMAD3 bilden einen heteromeren Komplex mit dem gemeinsamen Mediator SMAD4, translozieren in den Zellkern und aktivieren die Transkription von Zielgenen in einer zelltypspezifischen Weise durch Interaktion mit DNA und anderen nukleären Faktoren (Abbildung 25) (Derynck *et al.*, 1998; Massague und Wotton, 2000; ten Dijke *et al.*, 2000; Wrana, 2000).

Somit wurde postuliert, dass das sekretierte FSTL3 von gesunden MSZ freies AktivinA im Knochenmark-Mikromilieu bindet. Das gebundene und damit inaktive AktivinA kann nicht an seinen, auf den HSPZ befindlichen, Rezeptor binden. Folglich wird die Signaltransduktion in den HSPZ inhibiert und die normalen Hämatopoese kann stattfinden (Abbildung 26 links). Eine geringere FSTL3 Sekretion von MSZ in hämatologisch erkrankten Patienten würde zu einer vermehrten Aktivierung führen und damit zu einer erhöhten Signaltransduktion mit Effekten auf bspw. die Proliferation und Differenzierung der HSPZ. Dies könnte die Pathogenese von MDS und AML begünstigt (Abbildung 26 rechts).

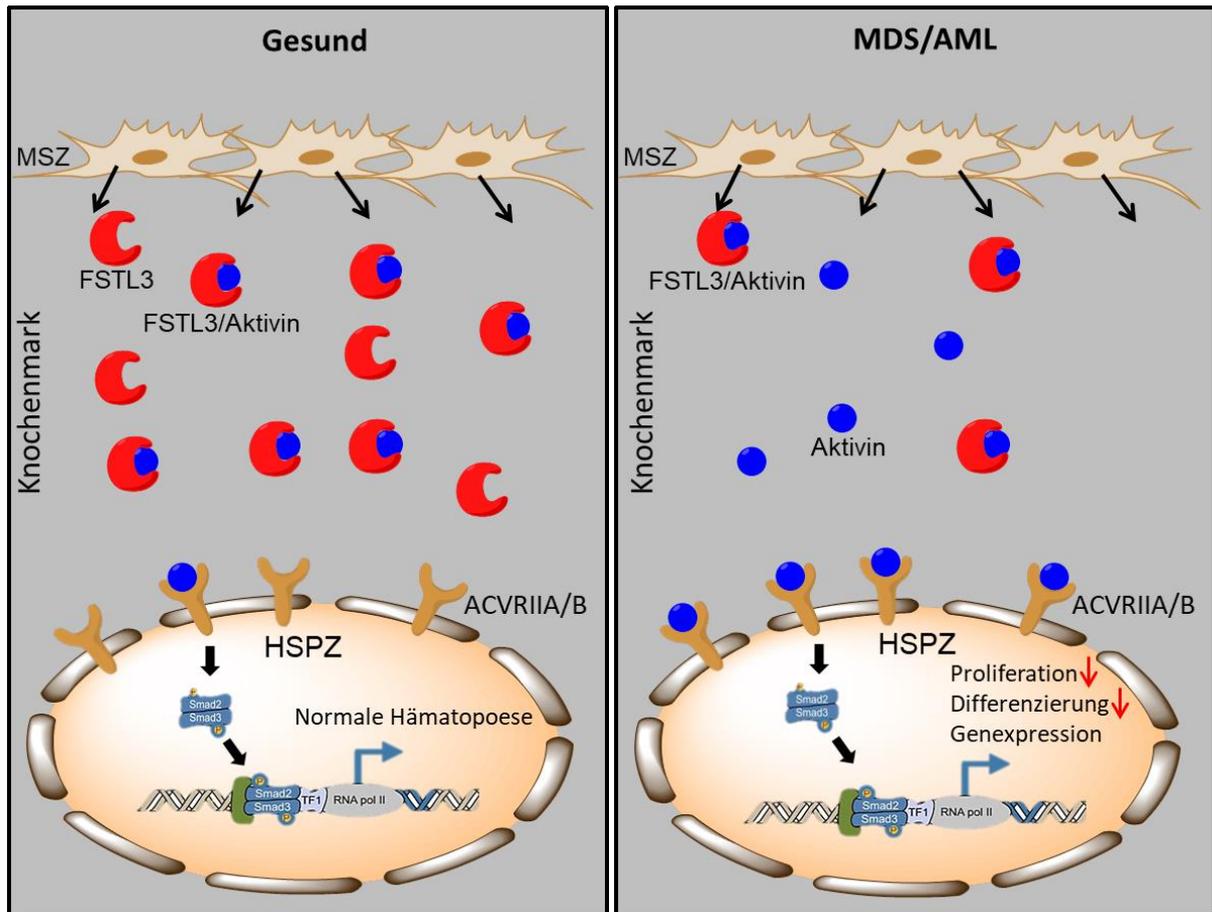


Abbildung 26: Mögliche funktionelle Effekte der differentiellen Sekretion von FSTL3 auf HSPZ im MDS und AML Kontext. Die verminderte Sekretion von FSTL3 von MSZ aus hämatologisch erkrankten Patienten führt zu einer verminderten Inhibition von Aktivin und folglich zu einer höheren Aktivierung des Aktivin Signalweges und der SMAD Signalisierung in HSPZ. Dies könnte Effekte auf die Proliferation, Differenzierung und Genexpression der HSPZ im Knochenmark haben, was zur Pathogenese von MDS und AML beitragen könnte.

5.3 Funktionelle Validierung von FSTL3

In dieser Arbeit wurde FSTL3 als signifikant differentiell von MSZ sekretierter Kandidat zwischen gesunden Probanden und MDS/AML-Patienten identifiziert. FSTL3 könnte Effekte auf die für MDS und AML hauptsächlich verantwortlichen HSPZ haben. Aus dem Grund wurden HSPZ aus dem Knochenmark von gesunden Probanden und MDS/AML-Patienten isoliert, 72 Stunden mit humanem rekombinanten FSTL3 behandelt und anschließend die Effekte von FSTL3 auf die Proliferation und die Differenzierung von HSPZ und auf den Aktivin Signalweg untersucht.

5.3.1 Methodische Aspekte der funktionellen Validierung von FSTL3 an HSPZ

Der erste Ansatz für eine funktionelle Validierung von FSTL3 im MDS/AML Kontext war die Inkubation von HSPZ mit dem konditionierten Überstand der MSZ und gleichzeitiger Inhibierung von FSTL3. Da jedoch kein funktionierender antagonisierender Antikörper für FSTL3 erhältlich war, konnte keine Inhibierung von FSTL3 durchgeführt werden. Deshalb wurden in einem nächsten Schritt HSPZ *in vitro* mit rekombinanten FSTL3 behandelt, um funktionelle Effekte von FSTL3 auf HSPZ zu untersuchen. FSTL3 ist ein Antagonist für die TGF β -Familienmitglieder, insbesondere AktivinA. Aus dem Grund wurde in einem ersten Schritt untersucht, ob die HSPZ in dem verwendeten Zellkulturmodell, den Liganden *AktivinA* exprimieren können. Die Ergebnisse zeigten, dass HSPZ aus gesunden Probanden sowie aus MDS/AML-Patienten *AktivinA* (Dimer aus *INHBA*) exprimieren können und eine höhere Expression in HSPZ aus hämatologisch erkrankten Patienten zu verzeichnen war. Dadurch ist eine autokrine Funktion von AktivinA möglich. Dies deckt sich mit bereits publizierten Daten, die eine Expression und eine aktive Bildung von AktivinA in HSPZ zeigten (Hayette *et al.*, 1998; Patella *et al.*, 2006; Portale *et al.*, 2018; Yamashita *et al.*, 1992; Yu und Dolter, 1997). Neueste Publikationen demonstrierten, dass eine hohe Expression von *INHBA* (folglich AktivinA) ein negativer prognostischer Faktor für AML ist (Si *et al.*, 2018). Ferner scheint AktivinA ein Schlüsselfaktor zu sein, der den Leukämiezellen einen Migrationsvorteil gegenüber der gesunden Hämatopoese verschafft (Portale *et al.*, 2018). Um die Ko-Kultur mit FSTL3 zu optimieren wurde in Vorexperimenten an humanen HSPZ die Konzentration vom kommerziell erhältlichen humanen rekombinanten FSTL3 Protein austitriert und die Dauer der FSTL3 Ko-Kultur ermittelt. Anhand von Proliferationsanalysen zeigte die Ko-Kultur mit 10 ng/ml FSTL3 den eindeutigsten Effekt. Zusätzlich erwies sich eine Inkubationsdauer von 72 Stunden als optimal. Dieser Zeitintervall wurde auch schon in anderen HSPZ und MSZ Ko-Kultur Experimenten verwendet (Geyh *et al.*, 2013). Die Effekte auf die Funktionalität der

HSPZ wurde, nach Ko-Kultur mit FSTL3, durch Analyse der Proliferation, Differenzierung und der veränderten Proteinabundanz von phosphoryliertem und unphosphoryliertem SMAD2 untersucht.

Für die Proliferationsexperimente wurde eine bestimmte HSPZ Zellzahl ($0,2 \times 10^6$) in 6-Well ausgesetzt und nach drei Tagen Ko-Kultur mittels automatisierter Zellzählung die Proliferationsfähigkeit ermittelt. Dabei ist zu beachten, dass mögliche Pipettierungenauigkeiten eine Varianz in den Proliferationszahlen zu Folge haben könnte. Durch die im Labor standardisierte angewandte Methode wurde dieser Fehler möglichst gering gehalten. Eine zusätzliche Varianz der Proliferationsrate einzelner humaner Primärproben entsteht durch die biologische Varianz der Zellen und Vorerkrankungen und dem Alter der Probanden/Patienten (Fidler und Hart, 1982; Heppner, 1984). Aufgrund der relativ geringen Probenanzahl ist diese Varianz demnach nicht zu vernachlässigen. Um die Differenzierungsfähigkeit der HSPZ zu untersuchen wurde der koloniebildende Einheiten Assay (CFU) eingesetzt. Durch ihre Fähigkeit zur Bildung von Kolonien in einem semisoliden Medium ist der CFU heutzutage immer noch der Goldstandard um das Proliferations- und Differenzierungsmuster von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu untersuchen. Die Anzahl und die Morphologie der Kolonien, die durch eine festgelegte Anzahl von eingesetzten Zellen gebildet werden, liefern vorläufige Informationen über die Differenzierung und Proliferation von Progenitoren (Sarma *et al.*, 2010). Um einen hohen Fehler bei den Analysen zu vermeiden führt einzig die strenge Standardisierung dieser Methode zu reproduzierbaren Ergebnissen (Pamphilon *et al.*, 2013). Die Effekte auf den SMAD2 Signalweg wurden durch Western Blot Analysen der beiden Faktoren SMAD2 und phosphoryliertes SMAD2 durchgeführt. Durch die Ko-Kultur der HSPZ mit FSTL3 sollte freies AktivinA gebunden werden, wodurch es zu einer Inhibierung des Aktivin Signalweges kommen sollte. Dies hätte zur Folge, dass weniger SMAD2 phosphoryliert würde.

5.3.2 Knochenmark-HSPZ aus hämatopoetisch erkrankten Patienten zeigen funktionelle Defizite

MDS und AML sind Erkrankungen des Knochenmarks bei der der normale Reifungsprozess der Blutzellen gestört ist und es zu Anomalien in der Proliferation und Differenzierung von erythroiden und myeloiden Vorläuferzellen kommt. Diese Beobachtung, welche in der klinischen Diagnostik festgestellt wird, konnte in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die aus dem Knochenmark von gesunden Probanden und hämatologisch erkrankten Patienten isolierten HSPZ wurden für 72 Stunden kultiviert. Dabei zeigte die funktionelle Analyse der Proliferationsfähigkeit, dass MDS/AML-HSPZ (n= 10) signifikant geringer proliferieren als gesunde HSPZ (n= 5) und dieses Ergebnis das klinische Bild von MDS und AML widerspiegelt. Diese Beobachtung konnte auch im Zuge der Differenzierungsfähigkeit von HSPZ aus hämatopoetisch erkrankten Patienten *in vitro* gezeigt werden. Die Differenzierungsfähigkeit in die rote Linie sowie in die weiße Linie war erheblich vermindert. Auch dieses Ergebnis spiegelt die klinische Symptomatik, wie sie bei Patienten mit MDS und AML auftritt, wider. Einige wenige Studien konnten ähnliche Effekte bei erythroiden und myeloiden Vorläuferzellen in MDS zeigen. So stellten Li und Kollegen sowie Sawada und Kollegen Anomalien in der Proliferation und Differenzierung von erythroiden und myeloiden Vorläuferzellen in MDS fest (Li *et al.*, 2016; Sawada, 1994). Diese Ergebnisse zeigen, dass der experimentelle *in vitro* Ansatz erfolgreich war und sich die mangelnde Funktionalität der HSPZ in MDS und AML widerspiegelt. In dieser Arbeit zeigte sich eine erhöhte Phosphorylierung von SMAD2 in HSPZ von MDS/AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Dies weist auf eine Beteiligung der TGF β -Ligandenfamilie und der SMAD-Signalkaskade in HSPZ aus hämatologischen erkrankten Patienten hin. Die meisten vorangegangenen Studien fokussierten sich auf den TGF β -Signalweg und dem damit zusammenhängenden SMAD Signalweg und dessen Rolle in hämatologischen Erkrankungen. Insgesamt zeigt die TGF β -SMAD Signalgebung eine wesentliche Funktion bei der Kontrolle der Selbsterneuerung von Stammzellen in verschiedenen Geweben, darunter auch im hämatopoetischen System (Huang und Huang, 2005). Es wurde gezeigt, dass die Überaktivierung der TGF β -Signalgebung bei HSPZ ein wichtiger Mechanismus ist, der die hämatopoetische Insuffizienz bei MDS vermittelt (Bhagat *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2008). Desweiteren zeigte sich eine mRNA-Überexpression von *TGF β 1* in HSPZ von Patienten mit MDS und AML durch quantitative Analyse sowie durch Analyse von Daten von 173 AML-Proben, die mit 967 Proben gesunden Gewebes verglichen wurden (Geyh *et al.*, 2018b). Wu und Kollegen haben eine abnormale Expression des TGF β -Typ-II-Rezeptors bei AML

festgestellt (Wu *et al.*, 2017). Ferner wurde gezeigt, dass HSPZ von Patienten mit AML veränderte TGF β -Signaltransduktionswege aufweisen, welches ihnen ermöglicht sich der TGF β -vermittelten Wachstumskontrolle zu entziehen (Koschmieder *et al.*, 2001). Diese bereits veröffentlichten Publikationen zeigen, dass TGF β und dadurch die SMAD Signalkaskade als einer der stärksten Inhibitoren des Wachstums von HSPZ *in vitro* eingestuft wird und, dass das Wachstum von HSPZ durch Wirkungen, sowohl auf den Zellzyklus als auch auf die Apoptose, regulieren kann (Fortunel *et al.*, 2000; Jacobsen *et al.*, 1995; Veiby *et al.*, 1996). Sowohl der Aktivin Signalweg als auch der TGF β -Signalweg wirken über die SMAD Signalkaskade. Zhou *et al.* zeigten, dass *SMAD2* in MDS konstitutiv aktiviert ist und in Genexpressionsprofilen von MDS-HSPZ Zellen überexprimiert wird. Aktivin besitzt dieselben aktivierenden Eigenschaften wie TGF β und gemeinsam nutzen sie Rezeptoren und Transduktionsproteine (Utsugisawa *et al.*, 2006). Die Beteiligung von Aktivin im Gegensatz zu TGF β ist jedoch in hämatopoetischen Stammzellen bislang unklar (Pauklin und Vallier, 2015). Einige Publikationen weisen auf eine aktive Rolle in der Hämatopoese hin (Shao *et al.*, 1992; Shav-Tal und Zipori, 2002; Yu und Dolter, 1997). Neuste Publikationen zeigten hohe Expressionen von INHBA in AML und, dass diese hohe Expression ein Prognosefaktor für AML ist (Si *et al.*, 2018). Weiterhin wurde aktuell gezeigt, dass AktivinA einen Schlüsselfaktor darstellt, der Leukämiezellen einen Migrationsvorteil gegenüber einer gesunden Hämatopoese innerhalb der leukämischen Nische verleiht (Portale *et al.*, 2018). Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit, die eine erhöhte Abundanz von phosphoryliertem SMAD2 zeigten, unterstützen die Hypothese, dass die SMAD Signalkaskade eine Rolle in MDS und AML spielt. Die genauen Zusammenhänge müssen jedoch weiter im Detail erforscht werden.

5.3.3 FSTL3 hat keinen funktionellen Effekt auf HSPZ

In der vorliegenden Arbeit konnte *in vitro*, trotz vorab optimierter Experimentbedingungen, kein signifikanter Effekt von FSTL3 nach 72 stündiger Ko-Kultur mit 10 ng/ml FSTL3 auf die Proliferation, Differenzierung und auf die SMAD Signalkaskade von HSPZ gezeigt werden. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine Studien der Proliferationsfähigkeit, Differenzierungsfähigkeit sowie der Auswirkungen auf die SMAD Signalkaskade von HSPZ nach FSTL3 Behandlung. Das Knochenmarkmikromilieu ist ein komplexes System verschiedenster Zellen und Faktoren, die im gesunden Menschen durch fein abgestimmte Prozesse zu einer normalen Blutbildung führen. Wenn diese fein abgestimmten Prozesse außer Kontrolle geraten kann es zu hämatologischen Erkrankungen kommen. Das für die Validierung von FSTL3 angewandte HSPZ Zellkulturmodell stellt unter Umständen eine zu einfache Umgebung für die Komplexität des Knochenmarks sowie von Erkrankungen wie MDS und AML dar. Dies könnte mitunter ursächlich für den nicht vorhandenen Effekt von FSTL3 sein. Die aktuelle Forschung geht davon aus, dass nicht nur ein einzelner Faktor ursächlich für MDS und/oder AML ist, sondern, dass eine multifaktorielle Ursache im Knochenmark vorliegt (Corey *et al.*, 2007). Der Aktivin Weg kann mitunter nicht nur durch FSTL3 inhibiert werden, sondern auch von anderen Faktoren, wie Follistatin (FST) oder Nodal. Diese wurden in dieser Studie nicht berücksichtigt und könnten zusätzlich die Funktion von FSTL3 beeinflussen. Ein mögliches Zusammenspiel der einzelnen Inhibitoren muss in weiteren Experimenten analysiert werden. Auch weitere autokrine HSPZ Prozesse, z. B. eine höhere Expression von AktivinA nach Inkubation mit FSTL3, könnten zu einem funktionellen Ausgleich der Neutralisierung von FSTL3 führen. Ein weiterer Aspekt ist die Komplexität des SMAD Signalweges. Es ist bekannt, dass SMAD- und ERK-Signalwege eine Rolle bei der Regulierung der zellulären Proliferation spielen (Robertson und Mukherjee, 2012). Jedoch ist die Beteiligung des Aktivin Signalweges im Gegensatz zu TGF β in hämatopoetischen Stammzellen bislang unklar (Pauklin und Vallier, 2015). Außerdem könnte der TGF β -Signalweg oder der WNT-Signalweg eine höhere Dominanz in der Hämatopoese im Knochenmark aufweisen, was zu einer nur geringeren Beteiligung des Aktivin-Signalweges führen und damit auch für eine geringe Beteiligung von FSTL3 sprechen würde. Diese Annahme wird gestützt von Publikationen die zeigen, dass der TGF β - und der WNT-Signalweg eine große Rolle in der Differenzierung und Proliferation der HSPZ spielen (Huang und Huang, 2005; Masckauchan *et al.*, 2005). Durch eine höhere Anzahl an HSPZ Proben könnte der Effekt von FSTL3 deutlicher hervortreten. Dies war jedoch im Zuge der Zeit und des vorhandenen Patientenmaterials nicht möglich. Auch weitere Analysen nach

HSPZ Behandlung mit FSTL3, wie z. B. der LTC-IC (*Human long-term culture-initiating cell assay*), könnten deutlichere Effekte zeigen. Der LTC-IC ist ein Assay, bei dem über einen langfristigen Zeitraum hämatopoetische Zellen mit einer anhaftenden Stromaschicht kultiviert werden und im Anschluss die Differenzierung in myeloide Vorläufer, reife Granulozyten und Makrophagen quantifiziert wird. Weiterhin zeigen neueste Erkenntnisse, dass AktivinA scheinbar einen Schlüsselfaktor darstellt, der den Leukämiezellen einen Migrationsvorteil gegenüber der gesunden Hämatopoese verschafft (Portale *et al.*, 2018). Aus dem Grund wäre die Analyse der Zellmigration und die Zellinvasion von HSPZ nach FSTL3 Behandlung mittels einer Boyden-Kammer denkbar.

Zusammenfassend wurde eine erste Validierung von FSTL3 an HSPZ durchgeführt, jedoch sind noch weitere Experimente nötig, um eine Rolle von FSTL3 in der defekten Hämatopoese in MDS und AML zu beweisen.

6 Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels massenspektrometrischer Sekretomanalyse von Knochenmark-MSZ gezeigt werden, dass eine Vielzahl der Proteine des Sekretoms von Knochenmark-MSZ aus gesunden Probanden für Zellwachstum und Zellkommunikation verantwortlich sind. Die zum ersten Mal durchgeführte massenspektrometrische differenzielle Sekretomanalyse von Knochenmark-MSZ zeigte signifikant differenziell sekretierte Proteine zwischen gesunden Probanden und MDS/AML-Patienten. Das differentielle Protein FSTL3 zeigte in den hier verwendeten Analysen keinen signifikanten Effekt auf die Funktionalität von HSPZ. Jedoch weisen in dem Zusammenhang erste Anzeichen auf eine Beteiligung des SMAD Signalweges in MDS und AML hin. Um die Rolle von FSTL3 und den damit zusammenhängenden Aktivin/SMAD-Signalweg in der Hämatopoese zu charakterisieren, sollte es das Ziel zukünftiger Analysen sein, weitere HSPZ zu analysieren und andere Komponenten des Aktivin/SMAD-Signalweges zu untersuchen. Auch eine Validierung weiterer differenzieller Kandidaten aus der Sekretomstudie sollte zukünftig im Interesse stehen, um die Rolle sekretierter Proteine von MSZ in Bezug auf MDS und AML weiter zu analysieren.

7 Literaturverzeichnis

- Aanei, C. M., Flandrin, P., Eloae, F. Z., Carasevici, E., Guyotat, D., Wattel, E. und Campos, L. (2012). **Intrinsic growth deficiencies of mesenchymal stromal cells in myelodysplastic syndromes**. *Stem Cells Dev* 21, 1604-1615, doi: 10.1089/scd.2011.0390.
- Aebbersold, R., Agar, J. N., Amster, I. J., Baker, M. S., Bertozzi, C. R., Boja, E. S., Costello, C. E., Cravatt, B. F., Fenselau, C., Garcia, B. A., Ge, Y., Gunawardena, J., Hendrickson, R. C., Hergenrother, P. J., Huber, C. G., Ivanov, A. R., Jensen, O. N., Jewett, M. C., Kelleher, N. L., Kiessling, L. L., Krogan, N. J., Larsen, M. R., Loo, J. A., Ogorzalek Loo, R. R., Lundberg, E., MacCoss, M. J., Mallick, P., Mootha, V. K., Mrksich, M., Muir, T. W., Patrie, S. M., Pesavento, J. J., Pitteri, S. J., Rodriguez, H., Saghatelian, A., Sandoval, W., Schluter, H., Sechi, S., Slavoff, S. A., Smith, L. M., Snyder, M. P., Thomas, P. M., Uhlen, M., Van Eyk, J. E., Vidal, M., Walt, D. R., White, F. M., Williams, E. R., Wohlschlagel, T., Wysocki, V. H., Yates, N. A., Young, N. L. und Zhang, B. (2018). **How many human proteoforms are there?** *Nat Chem Biol* 14, 206-214, doi: 10.1038/nchembio.2576.
- Anderson, N. G. und Anderson, N. L. (1996). **Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future**. *Electrophoresis* 17, 443-453, doi: 10.1002/elps.1150170303.
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. D., Cazzola, M. und Vardiman, J. W. (2016). **The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia**. *Blood* 127, 2391-2405, doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.
- Artigiani, S., Barberis, D., Fazzari, P., Longati, P., Angelini, P., van de Loo, J. W., Comoglio, P. M. und Tamagnone, L. (2003). **Functional regulation of semaphorin receptors by proprotein convertases**. *J Biol Chem* 278, 10094-10101, doi: 10.1074/jbc.M210156200.
- Askari, A. T., Unzek, S., Popovic, Z. B., Goldman, C. K., Forudi, F., Kiedrowski, M., Rovner, A., Ellis, S. G., Thomas, J. D., DiCorleto, P. E., Topol, E. J. und Penn, M. S. (2003). **Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy**. *Lancet* 362, 697-703, doi: 10.1016/S0140-6736(03)14232-8.
- Aul, C., Gattermann, N., Heyll, A., Germing, U., Derigs, G. und Schneider, W. (1992a). **Primary myelodysplastic syndromes: analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system**. *Leukemia* 6, 52-59.
- Aul, C., Gattermann, N. und Schneider, W. (1992b). **Age-related incidence and other epidemiological aspects of myelodysplastic syndromes**. *Br J Haematol* 82, 358-367.
- Baberg, F., Geyh, S., Waldera-Lupa, D., Stefanski, A., Zilkens, C., Haas, R., Schroeder, T. und Stuhler, K. (2019). **Secretome analysis of human bone marrow derived mesenchymal stromal cells**. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1867, 434-441, doi: 10.1016/j.bbapap.2019.01.013.
- Bagley, R. G., Weber, W., Rouleau, C., Yao, M., Honma, N., Kataoka, S., Ishida, I., Roberts, B. L. und Teicher, B. A. (2009). **Human mesenchymal stem cells from bone marrow express tumor endothelial and stromal markers**. *Int J Oncol* 34, 619-627.

- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. und Kuster, B. (2007). **Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review**. *Anal Bioanal Chem* 389, 1017-1031, doi: 10.1007/s00216-007-1486-6.
- Bartholin, L., Maguer-Satta, V., Hayette, S., Martel, S., Gadoux, M., Corbo, L., Magaud, J. P. und Rimokh, R. (2002). **Transcription activation of FLRG and follistatin by activin A, through Smad proteins, participates in a negative feedback loop to modulate activin A function**. *Oncogene* 21, 2227-2235, doi: 10.1038/sj.onc.1205294.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. und Brunak, S. (2004). **Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0**. *J Mol Biol* 340, 783-795, doi: 10.1016/j.jmb.2004.05.028.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R. und Sultan, C. (1976). **Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group**. *Br J Haematol* 33, 451-458.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R. und Sultan, C. (1982). **Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes**. *Br J Haematol* 51, 189-199.
- Bessarabova, M., Ishkin, A., JeBailey, L., Nikolskaya, T. und Nikolsky, Y. (2012). **Knowledge-based analysis of proteomics data**. *BMC Bioinformatics* 13 Suppl 16, S13, doi: 10.1186/1471-2105-13-S16-S13.
- Bhagat, T. D., Zhou, L., Sokol, L., Kessel, R., Caceres, G., Gundabolu, K., Tamari, R., Gordon, S., Mantzaris, I., Jodlowski, T., Yu, Y., Jing, X., Polineni, R., Bhatia, K., Pellagatti, A., Boulwood, J., Kambhampati, S., Steidl, U., Stein, C., Ju, W., Liu, G., Kenny, P., List, A., Bitzer, M. und Verma, A. (2013). **miR-21 mediates hematopoietic suppression in MDS by activating TGF-beta signaling**. *Blood* 121, 2875-2881, doi: 10.1182/blood-2011-12-397067.
- Blau, O., Hofmann, W. K., Baldus, C. D., Thiel, G., Serbent, V., Schumann, E., Thiel, E. und Blau, I. W. (2007). **Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia**. *Exp Hematol* 35, 221-229, doi: 10.1016/j.exphem.2006.10.012.
- Bonfield, T. L. und Caplan, A. I. (2010). **Adult mesenchymal stem cells: an innovative therapeutic for lung diseases**. *Discov Med* 9, 337-345.
- Boulais, P. E. und Frenette, P. S. (2015). **Making sense of hematopoietic stem cell niches**. *Blood* 125, 2621-2629, doi: 10.1182/blood-2014-09-570192.
- Brown, K. J., Formolo, C. A., Seol, H., Marathi, R. L., Duguez, S., An, E., Pillai, D., Nazarian, J., Rood, B. R. und Hathout, Y. (2012). **Advances in the proteomic investigation of the cell secretome**. *Expert Rev Proteomics* 9, 337-345, doi: 10.1586/epr.12.21.
- Bruns, I., Cadeddu, R. P., Brueckmann, I., Frobel, J., Geyh, S., Bust, S., Fischer, J. C., Roels, F., Wilk, C. M., Schildberg, F. A., Hunerliturkoglu, A. N., Zilkens, C., Jager, M., Steidl, U., Zohren, F., Fenk, R., Kobbe, G., Brors, B., Czibere, A., Schroeder, T., Trumpp, A. und Haas, R. (2012). **Multiple myeloma-related deregulation of bone marrow-derived CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells**. *Blood* 120, 2620-2630, doi: 10.1182/blood-2011-04-347484.
- Bryder, D., Rossi, D. J. und Weissman, I. L. (2006). **Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell**. *Am J Pathol* 169, 338-346, doi: 10.2353/ajpath.2006.060312.

- Catherman, A. D., Skinner, O. S. und Kelleher, N. L. (2014). **Top Down proteomics: facts and perspectives**. *Biochem Biophys Res Commun* 445, 683-693, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.041.
- Challen, G. A., Boles, N. C., Chambers, S. M. und Goodell, M. A. (2010). **Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1**. *Cell Stem Cell* 6, 265-278, doi: 10.1016/j.stem.2010.02.002.
- Cheson, B. D., Bennett, J. M., Kopecky, K. J., Buchner, T., Willman, C. L., Estey, E. H., Schiffer, C. A., Doehner, H., Tallman, M. S., Lister, T. A., Lo-Coco, F., Willemze, R., Biondi, A., Hiddemann, W., Larson, R. A., Lowenberg, B., Sanz, M. A., Head, D. R., Ohno, R., Bloomfield, C. D., International Working Group for Diagnosis, S. o. R. C. T. O. und Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid, L. (2003). **Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia**. *J Clin Oncol* 21, 4642-4649, doi: 10.1200/JCO.2003.04.036.
- Colzani, M., Waridel, P., Laurent, J., Faes, E., Ruegg, C. und Quadroni, M. (2009). **Metabolic labeling and protein linearization technology allow the study of proteins secreted by cultured cells in serum-containing media**. *J Proteome Res* 8, 4779-4788, doi: 10.1021/pr900476b.
- Corey, S. J., Minden, M. D., Barber, D. L., Kantarjian, H., Wang, J. C. und Schimmer, A. D. (2007). **Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases**. *Nat Rev Cancer* 7, 118-129, doi: 10.1038/nrc2047.
- Cox, J. und Mann, M. (2008). **MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification**. *Nat Biotechnol* 26, 1367-1372, doi: 10.1038/nbt.1511.
- Cox, J. und Mann, M. (2011). **Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology**. *Annu Rev Biochem* 80, 273-299, doi: 10.1146/annurev-biochem-061308-093216.
- Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., Jones, S. P. und Roberts, I. (2006). **The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis**. *Blood Rev* 20, 161-171, doi: 10.1016/j.blre.2005.11.002.
- DePaolo, L. V. (1997). **Inhibins, activins, and follistatins: the saga continues**. *Proc Soc Exp Biol Med* 214, 328-339.
- Derynck, R., Zhang, Y. und Feng, X. H. (1998). **Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses**. *Cell* 95, 737-740.
- Desiderio, D. M. und Kai, M. (1983). **Preparation of stable isotope-incorporated peptide internal standards for field desorption mass spectrometry quantification of peptides in biologic tissue**. *Biomed Mass Spectrom* 10, 471-479, doi: 10.1002/bms.1200100806.
- Dimopoulos, M., Spencer, A., Attal, M., Prince, H. M., Harousseau, J. L., Dmoszynska, A., San Miguel, J., Hellmann, A., Facon, T., Foa, R., Corso, A., Masliak, Z., Olesnyckyj, M., Yu, Z., Patin, J., Zeldis, J. B., Knight, R. D. und Multiple Myeloma Study, I. (2007). **Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma**. *N Engl J Med* 357, 2123-2132, doi: 10.1056/NEJMoa070594.
- Dohner, H., Estey, E. H., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Buchner, T., Burnett, A. K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R. A., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M. A., Sierra, J., Tallman, M. S., Lowenberg, B., Bloomfield, C. D. und European, L. (2010). **Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations**

- from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 115, 453-474, doi: 10.1182/blood-2009-07-235358.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. und Horwitz, E. (2006). **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.** *Cytotherapy* 8, 315-317, doi: 10.1080/14653240600855905.
- Dorfer, V., Pichler, P., Stranzl, T., Stadlmann, J., Taus, T., Winkler, S. und Mechtler, K. (2014). **MS Amanda, a universal identification algorithm optimized for high accuracy tandem mass spectra.** *J Proteome Res* 13, 3679-3684, doi: 10.1021/pr500202e.
- Ellison, R., Holland, J. und Weil, M. (2016). **Arabinosyl cytosine: a useful agent in the treatment of acute leukemia in adults.** *Blood*. 1968;32(4):507-523. *Blood* 128, 883, doi: 10.1182/blood-2016-06-725101.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G. und Nielsen, H. (2007). **Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools.** *Nature Protocols* 2, 953-971, doi: 10.1038/nprot.2007.131.
- Eng, J. K., McCormack, A. L. und Yates, J. R. (1994). **An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database.** *J Am Soc Mass Spectrom* 5, 976-989, doi: 10.1016/1044-0305(94)80016-2.
- Estey, E. und Dohner, H. (2006). **Acute myeloid leukaemia.** *Lancet* 368, 1894-1907, doi: 10.1016/S0140-6736(06)69780-8.
- Fan, X., Valdimarsdottir, G., Larsson, J., Brun, A., Magnusson, M., Jacobsen, S. E., ten Dijke, P. und Karlsson, S. (2002). **Transient disruption of autocrine TGF-beta signaling leads to enhanced survival and proliferation potential in single primitive human hemopoietic progenitor cells.** *J Immunol* 168, 755-762.
- Feller, C. und Aebersold, R. (2018). **A Proteomic Connectivity Map.** *Cell Syst* 6, 403-405, doi: 10.1016/j.cels.2018.04.007.
- Fenaux, P., Mufti, G. J., Hellstrom-Lindberg, E., Santini, V., Finelli, C., Giagounidis, A., Schoch, R., Gattermann, N., Sanz, G., List, A., Gore, S. D., Seymour, J. F., Bennett, J. M., Byrd, J., Backstrom, J., Zimmerman, L., McKenzie, D., Beach, C., Silverman, L. R. und International Vidaza High-Risk, M. D. S. S. S. G. (2009). **Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study.** *Lancet Oncol* 10, 223-232, doi: 10.1016/S1470-2045(09)70003-8.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. und Whitehouse, C. M. (1989). **Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.** *Science* 246, 64-71.
- Fidler, I. J. und Hart, I. R. (1982). **Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications.** *Science* 217, 998-1003.
- Finoulst, I., Vink, P., Rovers, E., Pieterse, M., Pinkse, M., Bos, E. und Verhaert, P. (2011). **Identification of low abundant secreted proteins and peptides from primary culture supernatants of human T-cells.** *J Proteomics* 75, 23-33, doi: 10.1016/j.jprot.2011.03.034.
- Fortunel, N. O., Hatzfeld, A. und Hatzfeld, J. A. (2000). **Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis.** *Blood* 96, 2022-2036.

- Frenette, P. S., Pinho, S., Lucas, D. und Scheiermann, C. (2013). **Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine**. *Annu Rev Immunol* 31, 285-316, doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095919.
- Frisch, B. J., Ashton, J. M., Xing, L., Becker, M. W., Jordan, C. T. und Calvi, L. M. (2012). **Functional inhibition of osteoblastic cells in an in vivo mouse model of myeloid leukemia**. *Blood* 119, 540-550, doi: 10.1182/blood-2011-04-348151.
- Fritsch, S., Metzeler, K., Hiddemann, W. und Buske, C. (2006). **[Diagnostics and therapy of acute myeloid leukemia]**. *Dtsch Med Wochenschr* 131, 2401-2406, doi: 10.1055/s-2006-955022.
- Ge, Q., Zhang, H., Hou, J., Wan, L., Cheng, W., Wang, X., Dong, D., Chen, C., Xia, J., Guo, J., Chen, X. und Wu, X. (2018). **VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms**. *Mol Med Rep* 17, 1667-1675, doi: 10.3892/mmr.2017.8059.
- Germing, U., Aul, C., Niemeyer, C. M., Haas, R. und Bennett, J. M. (2008). **Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes**. *Ann Hematol* 87, 691-699, doi: 10.1007/s00277-008-0499-3.
- Geyh, S., Oz, S., Cadeddu, R. P., Frobel, J., Bruckner, B., Kundgen, A., Fenk, R., Bruns, I., Zilkens, C., Hermsen, D., Gattermann, N., Kobbe, G., Germing, U., Lyko, F., Haas, R. und Schroeder, T. (2013). **Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells**. *Leukemia* 27, 1841-1851, doi: 10.1038/leu.2013.193.
- Geyh, S., Rodriguez-Paredes, M., Jager, P., Koch, A., Bormann, F., Gutekunst, J., Zilkens, C., Germing, U., Kobbe, G., Lyko, F., Haas, R. und Schroeder, T. (2018a). **TGFbeta1-mediated functional inhibition of mesenchymal stromal cells in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia**. *Haematologica*, doi: 10.3324/haematol.2017.186734.
- Geyh, S., Rodriguez-Paredes, M., Jager, P., Koch, A., Bormann, F., Gutekunst, J., Zilkens, C., Germing, U., Kobbe, G., Lyko, F., Haas, R. und Schroeder, T. (2018b). **Transforming growth factor beta1-mediated functional inhibition of mesenchymal stromal cells in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia**. *Haematologica* 103, 1462-1471, doi: 10.3324/haematol.2017.186734.
- Gillet, L. C., Leitner, A. und Aebersold, R. (2016). **Mass Spectrometry Applied to Bottom-Up Proteomics: Entering the High-Throughput Era for Hypothesis Testing**. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 9, 449-472, doi: 10.1146/annurev-anchem-071015-041535.
- Gluck, U., Zipori, D., Wetzler, M., Berrebi, A., Shaklai, M., Drezen, O., Zaizov, R., Luria, D., Marcelle, C., Stark, B. und *et al.* (1989). **Long-term proliferation of human leukemia cells induced by mouse stroma**. *Exp Hematol* 17, 398-404.
- Golubkov, V. S. und Strongin, A. Y. (2012). **Insights into ectodomain shedding and processing of protein-tyrosine pseudokinase 7 (PTK7)**. *J Biol Chem* 287, 42009-42018, doi: 10.1074/jbc.M112.371153.
- Grafe, I., Alexander, S., Peterson, J. R., Snider, T. N., Levi, B., Lee, B. und Mishina, Y. (2018). **TGF-beta Family Signaling in Mesenchymal Differentiation**. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, doi: 10.1101/cshperspect.a022202.

- Greenberg, P. L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Sole, F., Bennett, J. M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., Kantarjian, H., Kuendgen, A., Levis, A., Malcovati, L., Cazzola, M., Cermak, J., Fonatsch, C., Le Beau, M. M., Slovak, M. L., Krieger, O., Luebbert, M., Maciejewski, J., Magalhaes, S. M., Miyazaki, Y., Pfeilstocker, M., Sekeres, M., Sperr, W. R., Stauder, R., Tauro, S., Valent, P., Vallespi, T., van de Loosdrecht, A. A., Germing, U. und Haase, D. (2012). **Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes**. *Blood* 120, 2454-2465, doi: 10.1182/blood-2012-03-420489.
- Grube, L., Dellen, R., Kruse, F., Schwender, H., Stuhler, K. und Poschmann, G. (2018). **Mining the Secretome of C2C12 Muscle Cells: Data Dependent Experimental Approach To Analyze Protein Secretion Using Label-Free Quantification and Peptide Based Analysis**. *J Proteome Res* 17, 879-890, doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00684.
- Gry, M., Rimini, R., Stromberg, S., Asplund, A., Ponten, F., Uhlen, M. und Nilsson, P. (2009). **Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines**. *BMC Genomics* 10, 365, doi: 10.1186/1471-2164-10-365.
- Gundry, R. L., White, M. Y., Murray, C. I., Kane, L. A., Fu, Q., Stanley, B. A. und Van Eyk, J. E. (2009). **Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow**. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 10*, Unit10 25, doi: 10.1002/0471142727.mb1025s88.
- Haag, A. M. (2016). **Mass Analyzers and Mass Spectrometers**. *Adv Exp Med Biol* 919, 157-169, doi: 10.1007/978-3-319-41448-5_7.
- Halfon, S., Abramov, N., Grinblat, B. und Ginis, I. (2011). **Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging**. *Stem Cells Dev* 20, 53-66, doi: 10.1089/scd.2010.0040.
- Hayette, S., Gadoux, M., Martel, S., Bertrand, S., Tigaud, I., Magaud, J. P. und Rimokh, R. (1998). **FLRG (follistatin-related gene), a new target of chromosomal rearrangement in malignant blood disorders**. *Oncogene* 16, 2949-2954, doi: 10.1038/sj.onc.1201807.
- Heppner, G. H. (1984). **Tumor heterogeneity**. *Cancer Res* 44, 2259-2265.
- Huang, S. S. und Huang, J. S. (2005). **TGF-beta control of cell proliferation**. *J Cell Biochem* 96, 447-462, doi: 10.1002/jcb.20558.
- Hwang, J. H., Shim, S. S., Seok, O. S., Lee, H. Y., Woo, S. K., Kim, B. H., Song, H. R., Lee, J. K. und Park, Y. K. (2009). **Comparison of cytokine expression in mesenchymal stem cells from human placenta, cord blood, and bone marrow**. *J Korean Med Sci* 24, 547-554, doi: 10.3346/jkms.2009.24.4.547.
- Ichioka, S., Kouraba, S., Sekiya, N., Ohura, N. und Nakatsuka, T. (2005). **Bone marrow-impregnated collagen matrix for wound healing: experimental evaluation in a microcirculatory model of angiogenesis, and clinical experience**. *Br J Plast Surg* 58, 1124-1130, doi: 10.1016/j.bjps.2005.04.054.
- Isern, J. und Mendez-Ferrer, S. (2011). **Stem cell interactions in a bone marrow niche**. *Curr Osteoporos Rep* 9, 210-218, doi: 10.1007/s11914-011-0075-y.
- Jacobsen, F. W., Stokke, T. und Jacobsen, S. E. (1995). **Transforming growth factor-beta potently inhibits the viability-promoting activity of stem cell factor and other cytokines and induces apoptosis of primitive murine hematopoietic progenitor cells**. *Blood* 86, 2957-2966.
- Jing, D., Fonseca, A. V., Alakel, N., Fierro, F. A., Muller, K., Bornhauser, M., Ehninger, G., Corbeil, D. und Ordemann, R. (2010). **Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells--modeling the niche**

- compartments in vitro.** *Haematologica* 95, 542-550, doi: 10.3324/haematol.2009.010736.
- Jungblut, P. R., Zimny-Arndt, U., Zeindl-Eberhart, E., Stulik, J., Koupilova, K., Pleissner, K. P., Otto, A., Muller, E. C., Sokolowska-Kohler, W., Grabher, G. und Stoffler, G. (1999). **Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases.** *Electrophoresis* 20, 2100-2110, doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19990701)20:10<2100::AID-ELPS2100>3.0.CO;2-D.
- Kall, L., Krogh, A. und Sonnhammer, E. L. (2007). **Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server.** *Nucleic Acids Res* 35, W429-432, doi: 10.1093/nar/gkm256.
- Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988). **Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.** *Anal Chem* 60, 2299-2301.
- Kaushansky, K. (2006). **Lineage-specific hematopoietic growth factors.** *N Engl J Med* 354, 2034-2045, doi: 10.1056/NEJMra052706.
- Kim, M. S., Pinto, S. M., Getnet, D., Nirujogi, R. S., Manda, S. S., Chaerkady, R., Madugundu, A. K., Kelkar, D. S., Isserlin, R., Jain, S., Thomas, J. K., Muthusamy, B., Leal-Rojas, P., Kumar, P., Sahasrabudde, N. A., Balakrishnan, L., Advani, J., George, B., Renuse, S., Selvan, L. D., Patil, A. H., Nanjappa, V., Radhakrishnan, A., Prasad, S., Subbannayya, T., Raju, R., Kumar, M., Sreenivasamurthy, S. K., Marimuthu, A., Sathe, G. J., Chavan, S., Datta, K. K., Subbannayya, Y., Sahu, A., Yelamanchi, S. D., Jayaram, S., Rajagopalan, P., Sharma, J., Murthy, K. R., Syed, N., Goel, R., Khan, A. A., Ahmad, S., Dey, G., Mudgal, K., Chatterjee, A., Huang, T. C., Zhong, J., Wu, X., Shaw, P. G., Freed, D., Zahari, M. S., Mukherjee, K. K., Shankar, S., Mahadevan, A., Lam, H., Mitchell, C. J., Shankar, S. K., Satishchandra, P., Schroeder, J. T., Sirdeshmukh, R., Maitra, A., Leach, S. D., Drake, C. G., Halushka, M. K., Prasad, T. S., Hruban, R. H., Kerr, C. L., Bader, G. D., Iacobuzio-Donahue, C. A., Gowda, H. und Pandey, A. (2014). **A draft map of the human proteome.** *Nature* 509, 575-581, doi: 10.1038/nature13302.
- Kim, Y. S., Jung, J. A., Kim, H. J., Ahn, Y. H., Yoo, J. S., Oh, S., Cho, C., Yoo, H. S. und Ko, J. H. (2011). **Galectin-3 binding protein promotes cell motility in colon cancer by stimulating the shedding of protein tyrosine phosphatase kappa by proprotein convertase 5.** *Biochem Biophys Res Commun* 404, 96-102, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.11.071.
- Klein, G., Muller, C. A., Tillet, E., Chu, M. L. und Timpl, R. (1995). **Collagen type VI in the human bone marrow microenvironment: a strong cytoadhesive component.** *Blood* 86, 1740-1748.
- Korn, C. und Mendez-Ferrer, S. (2017). **Myeloid malignancies and the microenvironment.** *Blood* 129, 811-822, doi: 10.1182/blood-2016-09-670224.
- Koschmieder, S., Hofmann, W. K., Kunert, J., Wagner, S., Ballas, K., Seipelt, G., Hoelzer, D., Ottmann, O. G. und Kalina, U. (2001). **TGF beta-induced SMAD2 phosphorylation predicts inhibition of thymidine incorporation in CD34+ cells from healthy donors, but not from patients with AML after MDS.** *Leukemia* 15, 942-949.
- Kose, S., Aerts-Kaya, F., Kopru, C. Z., Nemutlu, E., Kuskonmaz, B., Karaosmanoglu, B., Taskiran, E. Z., Altun, B., Uckan Cetinkaya, D. und Korkusuz, P. (2018). **Human bone marrow mesenchymal stem cells secrete endocannabinoids that stimulate in vitro hematopoietic stem cell migration effectively comparable to beta-adrenergic stimulation.** *Exp Hematol* 57, 30-41 e31, doi: 10.1016/j.exphem.2017.09.009.

- Kralisch, S., Hoffmann, A., Kloting, N., Bachmann, A., Kratzsch, J., Stolzenburg, J. U., Dietel, A., Beige, J., Anders, M., Bast, I., Bluher, M., Zhang, M. Z., Harris, R. C., Stumvoll, M., Fasshauer, M. und Ebert, T. (2017). **FSTL3 is increased in renal dysfunction**. *Nephrol Dial Transplant* 32, 1637-1644, doi: 10.1093/ndt/gfw472.
- Krause, D. S., Fulzele, K., Catic, A., Sun, C. C., Dombkowski, D., Hurley, M. P., Lezeau, S., Attar, E., Wu, J. Y., Lin, H. Y., Divieti-Pajevic, P., Hasserjian, R. P., Schipani, E., Van Etten, R. A. und Scadden, D. T. (2013). **Differential regulation of myeloid leukemias by the bone marrow microenvironment**. *Nat Med* 19, 1513-1517, doi: 10.1038/nm.3364.
- Krause, D. S. und Scadden, D. T. (2015). **A hostel for the hostile: the bone marrow niche in hematologic neoplasms**. *Haematologica* 100, 1376-1387, doi: 10.3324/haematol.2014.113852.
- Kuljanin, M., Bell, G. I., Sherman, S. E., Lajoie, G. A. und Hess, D. A. (2017). **Proteomic characterisation reveals active Wnt-signalling by human multipotent stromal cells as a key regulator of beta cell survival and proliferation**. *Diabetologia* 60, 1987-1998, doi: 10.1007/s00125-017-4355-7.
- Kumar, C. und Mann, M. (2009). **Bioinformatics analysis of mass spectrometry-based proteomics data sets**. *FEBS Lett* 583, 1703-1712, doi: 10.1016/j.febslet.2009.03.035.
- Kupcova Skalnikova, H. (2013). **Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome**. *Biochimie* 95, 2196-2211, doi: 10.1016/j.biochi.2013.07.015.
- Latosinska, A., Frantzi, M., Mullen, W., Vlahou, A. und Makridakis, M. (2015). **Targeting the proteome of cellular fractions: focus on secreted proteins**. *Methods Mol Biol* 1243, 29-41, doi: 10.1007/978-1-4939-1872-0_2.
- Lavallee-Adam, M., Rousseau, J., Domecq, C., Bouchard, A., Forget, D., Faubert, D., Blanchette, M. und Coulombe, B. (2013). **Discovery of cell compartment specific protein-protein interactions using affinity purification combined with tandem mass spectrometry**. *J Proteome Res* 12, 272-281, doi: 10.1021/pr300778b.
- Lax, S., Hardie, D. L., Wilson, A., Douglas, M. R., Anderson, G., Huso, D., Isacke, C. M. und Buckley, C. D. (2010). **The pericyte and stromal cell marker CD248 (endosialin) is required for efficient lymph node expansion**. *Eur J Immunol* 40, 1884-1889, doi: 10.1002/eji.200939877.
- Lee, J. H., Park, J. und Lee, J. W. (2018). **Therapeutic use of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in acute lung injury**. *Transfusion*, doi: 10.1111/trf.14838.
- Lerat, H., Lissitzky, J. C., Singer, J. W., Keating, A., Herve, P. und Charbord, P. (1993). **Role of stromal cells and macrophages in fibronectin biosynthesis and matrix assembly in human long-term marrow cultures**. *Blood* 82, 1480-1492.
- Leuning, D. G., Reinders, M. E., Li, J., Peired, A. J., Lievers, E., de Boer, H. C., Fibbe, W. E., Romagnani, P., van Kooten, C., Little, M. H., Engelse, M. A. und Rabelink, T. J. (2017). **Clinical-Grade Isolated Human Kidney Perivascular Stromal Cells as an Organotypic Cell Source for Kidney Regenerative Medicine**. *Stem Cells Transl Med* 6, 405-418, doi: 10.5966/sctm.2016-0053.
- Li, B., Liu, J., Qu, S., Gale, R. P., Song, Z., Xing, R., Liu, J., Ren, Y., Xu, Z., Qin, T., Zhang, Y., Fang, L., Zhang, H., Pan, L., Hu, N., Cai, W., Zhang, P., Huang, G. und Xiao, Z. (2016). **Colony-forming unit cell (CFU-C) assays at diagnosis: CFU-G/M cluster predicts overall survival in myelodysplastic syndrome**

- patients independently of IPSS-R.** *Oncotarget* 7, 68023-68032, doi: 10.18632/oncotarget.12105.
- Li, M. O. und Flavell, R. A. (2008). **Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10.** *Immunity* 28, 468-476, doi: 10.1016/j.immuni.2008.03.003.
- Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K. und Flavell, R. A. (2006). **Transforming growth factor-beta regulation of immune responses.** *Annu Rev Immunol* 24, 99-146, doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737.
- List, A., Dewald, G., Bennett, J., Giagounidis, A., Raza, A., Feldman, E., Powell, B., Greenberg, P., Thomas, D., Stone, R., Reeder, C., Wride, K., Patin, J., Schmidt, M., Zeldis, J., Knight, R. und Myelodysplastic Syndrome-003 Study, I. (2006). **Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion.** *N Engl J Med* 355, 1456-1465, doi: 10.1056/NEJMoa061292.
- Liu, H., Sadygov, R. G. und Yates, J. R., 3rd (2004). **A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics.** *Anal Chem* 76, 4193-4201, doi: 10.1021/ac0498563.
- Liu, N. Q., Dekker, L. J., Stingl, C., Guzel, C., De Marchi, T., Martens, J. W., Foekens, J. A., Luider, T. M. und Umar, A. (2013). **Quantitative proteomic analysis of microdissected breast cancer tissues: comparison of label-free and SILAC-based quantification with shotgun, directed, and targeted MS approaches.** *J Proteome Res* 12, 4627-4641, doi: 10.1021/pr4005794.
- Liu, Y., Beyer, A. und Aebersold, R. (2016). **On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance.** *Cell* 165, 535-550, doi: 10.1016/j.cell.2016.03.014.
- Lopez-Villar, O., Garcia, J. L., Sanchez-Guijo, F. M., Robledo, C., Villaron, E. M., Hernandez-Campo, P., Lopez-Holgado, N., Diez-Campelo, M., Barbado, M. V., Perez-Simon, J. A., Hernandez-Rivas, J. M., San-Miguel, J. F. und del Canizo, M. C. (2009). **Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome.** *Leukemia* 23, 664-672, doi: 10.1038/leu.2008.361.
- Lottspeich, F. (2009). **Introduction to proteomics.** *Methods Mol Biol* 564, 3-10, doi: 10.1007/978-1-60761-157-8_1.
- Lu, M., Xia, L., Liu, Y. C., Hochman, T., Bizzari, L., Aruch, D., Lew, J., Weinberg, R., Goldberg, J. D. und Hoffman, R. (2015). **Lipocalin produced by myelofibrosis cells affects the fate of both hematopoietic and marrow microenvironmental cells.** *Blood* 126, 972-982, doi: 10.1182/blood-2014-12-618595.
- Lu, Y., Xiang, H., Liu, P., Tong, R. R., Watts, R. J., Koch, A. W., Sandoval, W. N., Damico, L. A., Wong, W. L. und Meng, Y. G. (2009). **Identification of circulating neuropilin-1 and dose-dependent elevation following anti-neuropilin-1 antibody administration.** *MAbs* 1, 364-369.
- Luo, X., Liu, Y., Wang, R., Hu, H., Zeng, R. und Chen, H. (2011). **A high-quality secretome of A549 cells aided the discovery of C4b-binding protein as a novel serum biomarker for non-small cell lung cancer.** *J Proteomics* 74, 528-538, doi: 10.1016/j.jprot.2011.01.011.
- Maffioli, E., Nonnis, S., Angioni, R., Santagata, F., Cali, B., Zanotti, L., Negri, A., Viola, A. und Tedeschi, G. (2017). **Proteomic analysis of the secretome of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells primed by pro-**

- inflammatory cytokines.** *J Proteomics* 166, 115-126, doi: 10.1016/j.jprot.2017.07.012.
- Maguer-Satta, V., Bartholin, L., Jeanpierre, S., Gadoux, M., Bertrand, S., Martel, S., Magaud, J. P. und Rimokh, R. (2001). **Expression of FLRG, a novel activin A ligand, is regulated by TGF-beta and during hematopoiesis [corrected].** *Exp Hematol* 29, 301-308.
- Maguer-Satta, V. und Rimokh, R. (2004). **FLRG, member of the follistatin family, a new player in hematopoiesis.** *Mol Cell Endocrinol* 225, 109-118, doi: 10.1016/j.mce.2004.07.009.
- Maier, T., Guell, M. und Serrano, L. (2009). **Correlation of mRNA and protein in complex biological samples.** *FEBS Lett* 583, 3966-3973, doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.036.
- Makarov, A. (2000). **Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis.** *Anal Chem* 72, 1156-1162.
- Makridakis, M., Roubelakis, M. G., Bitsika, V., Dimuccio, V., Samiotaki, M., Kossida, S., Panayotou, G., Coleman, J., Candiano, G., Anagnou, N. P. und Vlahou, A. (2010). **Analysis of secreted proteins for the study of bladder cancer cell aggressiveness.** *J Proteome Res* 9, 3243-3259, doi: 10.1021/pr100189d.
- Malapeira, J., Esselens, C., Bech-Serra, J. J., Canals, F. und Arribas, J. (2011). **ADAM17 (TACE) regulates TGFbeta signaling through the cleavage of vadorin.** *Oncogene* 30, 1912-1922, doi: 10.1038/onc.2010.565.
- Mann, M. und Kelleher, N. L. (2008). **Precision proteomics: the case for high resolution and high mass accuracy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18132-18138, doi: 10.1073/pnas.0800788105.
- Masckauchan, T. N., Shawber, C. J., Funahashi, Y., Li, C. M. und Kitajewski, J. (2005). **Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells.** *Angiogenesis* 8, 43-51, doi: 10.1007/s10456-005-5612-9.
- Massague, J. und Wotton, D. (2000). **Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system.** *EMBO J* 19, 1745-1754, doi: 10.1093/emboj/19.8.1745.
- Mayer, R. J., Davis, R. B., Schiffer, C. A., Berg, D. T., Powell, B. L., Schulman, P., Omura, G. A., Moore, J. O., McIntyre, O. R. und Frei, E., 3rd (1994). **Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B.** *N Engl J Med* 331, 896-903, doi: 10.1056/NEJM199410063311402.
- McGowan, J. V., Chung, R., Maulik, A., Piotrowska, I., Walker, J. M. und Yellon, D. M. (2017). **Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity.** *Cardiovasc Drugs Ther* 31, 63-75, doi: 10.1007/s10557-016-6711-0.
- Medyouf, H., Mossner, M., Jann, J. C., Nolte, F., Raffel, S., Herrmann, C., Lier, A., Eisen, C., Nowak, V., Zens, B., Mudder, K., Klein, C., Oblander, J., Fey, S., Vogler, J., Fabarius, A., Riedl, E., Roehl, H., Kohlmann, A., Staller, M., Haferlach, C., Muller, N., John, T., Platzbecker, U., Metzgeroth, G., Hofmann, W. K., Trumpp, A. und Nowak, D. (2014). **Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit.** *Cell Stem Cell* 14, 824-837, doi: 10.1016/j.stem.2014.02.014.
- Megger, D. A., Bracht, T., Meyer, H. E. und Sitek, B. (2013). **Label-free quantification in clinical proteomics.** *Biochim Biophys Acta* 1834, 1581-1590, doi: 10.1016/j.bbapap.2013.04.001.

- Mendez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., Macarthur, B. D., Lira, S. A., Scadden, D. T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G. N. und Frenette, P. S. (2010). **Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche**. *Nature* 466, 829-834, doi: 10.1038/nature09262.
- Moore, K. A. und Lemischka, I. R. (2006). **Stem cells and their niches**. *Science* 311, 1880-1885, doi: 10.1126/science.1110542.
- Mukherjee, A., Sidis, Y., Mahan, A., Raheer, M. J., Xia, Y., Rosen, E. D., Bloch, K. D., Thomas, M. K. und Schneyer, A. L. (2007). **FSTL3 deletion reveals roles for TGF-beta family ligands in glucose and fat homeostasis in adults**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1348-1353, doi: 10.1073/pnas.0607966104.
- Mukherjee, P. und Mani, S. (2013). **Methodologies to decipher the cell secretome**. *Biochim Biophys Acta* 1834, 2226-2232, doi: 10.1016/j.bbapap.2013.01.022.
- Muntion, S., Ramos, T. L., Diez-Campelo, M., Roson, B., Sanchez-Abarca, L. I., Misiewicz-Krzeminska, I., Preciado, S., Sarasquete, M. E., de Las Rivas, J., Gonzalez, M., Sanchez-Guijo, F. und Del Canizo, M. C. (2016). **Microvesicles from Mesenchymal Stromal Cells Are Involved in HPC-Microenvironment Crosstalk in Myelodysplastic Patients**. *PLoS One* 11, e0146722, doi: 10.1371/journal.pone.0146722.
- Nachtkamp, K., Kundgen, A., Strupp, C., Giagounidis, A., Kobbe, G., Gattermann, N., Haas, R. und Germing, U. (2009). **Impact on survival of different treatments for myelodysplastic syndromes (MDS)**. *Leuk Res* 33, 1024-1028, doi: 10.1016/j.leukres.2008.12.019.
- Nagano, O. und Saya, H. (2004). **Mechanism and biological significance of CD44 cleavage**. *Cancer Sci* 95, 930-935.
- Nesterenko, M. V., Tilley, M. und Upton, S. J. (1994). **A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels**. *J Biochem Biophys Methods* 28, 239-242.
- Neukirchen, J., Blum, S., Kuendgen, A., Strupp, C., Aivado, M., Haas, R., Aul, C., Gattermann, N. und Germing, U. (2009). **Platelet counts and haemorrhagic diathesis in patients with myelodysplastic syndromes**. *Eur J Haematol* 83, 477-482, doi: 10.1111/j.1600-0609.2009.01299.x.
- Nonnis, S., Maffioli, E., Zanotti, L., Santagata, F., Negri, A., Viola, A., Elliman, S. und Tedeschi, G. (2016). **Effect of fetal bovine serum in culture media on MS analysis of mesenchymal stromal cells secretome**. *EuPA Open Proteom* 10, 28-30, doi: 10.1016/j.euprot.2016.01.005.
- Ogawa, K., Saito, A., Matsui, H., Suzuki, H., Ohtsuka, S., Shimosato, D., Morishita, Y., Watabe, T., Niwa, H. und Miyazono, K. (2007). **Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells**. *J Cell Sci* 120, 55-65, doi: 10.1242/jcs.03296.
- Old, W. M., Meyer-Arendt, K., Aveline-Wolf, L., Pierce, K. G., Mendoza, A., Sevinsky, J. R., Resing, K. A. und Ahn, N. G. (2005). **Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics**. *Mol Cell Proteomics* 4, 1487-1502, doi: 10.1074/mcp.M500084-MCP200.
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H. und Nakauchi, H. (1996). **Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell**. *Science* 273, 242-245.
- Owen, M. (1988). **Marrow stromal stem cells**. *J Cell Sci Suppl* 10, 63-76.
- Palade, G. (1975). **Intracellular aspects of the process of protein synthesis**. *Science* 189, 867, doi: 10.1126/science.189.4206.867-b.
- Pamphilon, D., Selogie, E., McKenna, D., Cancelas-Peres, J. A., Szczepiorkowski, Z. M., Sacher, R., McMannis, J., Eichler, H., Garritsen, H., Takanashi, M., van de

- Watering, L., Stroncek, D. und Reems, J. A. (2013). **Current practices and prospects for standardization of the hematopoietic colony-forming unit assay: a report by the cellular therapy team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative.** *Cytotherapy* 15, 255-262, doi: 10.1016/j.jcyt.2012.11.013.
- Patella, S., Phillips, D. J., Tchongue, J., de Kretser, D. M. und Sievert, W. (2006). **Follistatin attenuates early liver fibrosis: effects on hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G137-144, doi: 10.1152/ajpgi.00080.2005.
- Pauklin, S. und Vallier, L. (2015). **Activin/Nodal signalling in stem cells.** *Development* 142, 607-619, doi: 10.1242/dev.091769.
- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. und Cottrell, J. S. (1999). **Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data.** *Electrophoresis* 20, 3551-3567, doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. und Nielsen, H. (2011). **SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions.** *Nat Methods* 8, 785-786, doi: 10.1038/nmeth.1701.
- Phillips, D. J. und de Kretser, D. M. (1998). **Follistatin: a multifunctional regulatory protein.** *Front Neuroendocrinol* 19, 287-322, doi: 10.1006/frne.1998.0169.
- Pires, A. O., Mendes-Pinheiro, B., Teixeira, F. G., Anjo, S. I., Ribeiro-Samy, S., Gomes, E. D., Serra, S. C., Silva, N. A., Manadas, B., Sousa, N. und Salgado, A. J. (2016). **Unveiling the Differences of Secretome of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, Adipose Tissue-Derived Stem Cells, and Human Umbilical Cord Perivascular Cells: A Proteomic Analysis.** *Stem Cells Dev* 25, 1073-1083, doi: 10.1089/scd.2016.0048.
- Planque, C., Kulasingam, V., Smith, C. R., Reckamp, K., Goodglick, L. und Diamandis, E. P. (2009). **Identification of five candidate lung cancer biomarkers by proteomics analysis of conditioned media of four lung cancer cell lines.** *Mol Cell Proteomics* 8, 2746-2758, doi: 10.1074/mcp.M900134-MCP200.
- Pleyer, L., Valent, P. und Greil, R. (2016). **Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Normal and Dysplastic Hematopoiesis-Masters of Survival and Clonality?** *Int J Mol Sci* 17, doi: 10.3390/ijms17071009.
- Pompa, A., De Marchis, F., Pallotta, M. T., Benitez-Alfonso, Y., Jones, A., Schipper, K., Moreau, K., Zarsky, V., Di Sansebastiano, G. P. und Bellucci, M. (2017). **Unconventional Transport Routes of Soluble and Membrane Proteins and Their Role in Developmental Biology.** *Int J Mol Sci* 18, doi: 10.3390/ijms18040703.
- Portale, F., Cricri, G., Bresolin, S., Lupi, M., Gaspari, S., Silvestri, D., Russo, B., Marino, N., Ubezio, P., Pagni, F., Vergani, P., Te Kronnie, G., Valsecchi, M. G., Locatelli, F., Rizzari, C., Biondi, A., Dander, E. und D'Amico, G. (2018). **ActivinA: a new leukemia-promoting factor conferring migratory advantage to B-cell precursor-acute lymphoblastic leukemic cells.** *Haematologica*, doi: 10.3324/haematol.2018.188664.
- Prockop, D. J. (1997). **Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues.** *Science* 276, 71-74.
- Rabouille, C. (2017). **Pathways of Unconventional Protein Secretion.** *Trends Cell Biol* 27, 230-240, doi: 10.1016/j.tcb.2016.11.007.

- Ranganath, S. H., Levy, O., Inamdar, M. S. und Karp, J. M. (2012). **Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease**. *Cell Stem Cell* 10, 244-258, doi: 10.1016/j.stem.2012.02.005.
- Rankin, E. B., Narla, A., Park, J. K., Lin, S. und Sakamoto, K. M. (2015). **Biology of the bone marrow microenvironment and myelodysplastic syndromes**. *Mol Genet Metab* 116, 24-28, doi: 10.1016/j.ymgme.2015.07.004.
- Recher, C., Beyne-Rauzy, O., Demur, C., Chicanne, G., Dos Santos, C., Mas, V. M., Benzaquen, D., Laurent, G., Huguet, F. und Payrastre, B. (2005). **Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia**. *Blood* 105, 2527-2534, doi: 10.1182/blood-2004-06-2494.
- Rehm, H. und Letzel, T. (2010). **Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics**, Springer.
- Reinders, M. E., Leuning, D. G., de Fijter, J. W., Hoogduijn, M. J. und Rabelink, T. J. (2014). **Mesenchymal stromal cell therapy for cardio renal disorders**. *Curr Pharm Des* 20, 2412-2429.
- Rio, P. und Bueren, J. A. (2016). **TGF-beta: a master regulator of the bone marrow failure puzzle in Fanconi anemia**. *Stem Cell Investig* 3, 75, doi: 10.21037/sci.2016.09.17.
- Robertson, R. D. und Mukherjee, A. (2012). **Synexpression group analyses identify new functions of FSTL3, a TGFbeta ligand inhibitor**. *Biochem Biophys Res Commun* 427, 568-573, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.098.
- Rolandsson Enes, S., Ahrman, E., Palani, A., Hallgren, O., Bjermer, L., Malmstrom, A., Scheduling, S., Malmstrom, J. und Westergren-Thorsson, G. (2017). **Quantitative proteomic characterization of lung-MSC and bone marrow-MSC using DIA-mass spectrometry**. *Sci Rep* 7, 9316, doi: 10.1038/s41598-017-09127-y.
- Sabattini, E., Bacci, F., Sagrarnoso, C. und Pileri, S. A. (2010). **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview**. *Pathologica* 102, 83-87.
- Saleh, M., Shamsasanjan, K., Movassaghpourakbari, A., Akbarzadehlaleh, P. und Molaeipour, Z. (2015). **The Impact of Mesenchymal Stem Cells on Differentiation of Hematopoietic Stem Cells**. *Adv Pharm Bull* 5, 299-304, doi: 10.15171/apb.2015.042.
- Sarma, N. J., Takeda, A. und Yaseen, N. R. (2010). **Colony forming cell (CFC) assay for human hematopoietic cells**. *J Vis Exp*, doi: 10.3791/2195.
- Sawada, K. (1994). **Impaired proliferation and differentiation of myelodysplastic CD34+ cells**. *Leuk Lymphoma* 14, 37-47, doi: 10.3109/10428199409049649.
- Schepers, K., Campbell, T. B. und Passegue, E. (2015). **Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities**. *Cell Stem Cell* 16, 254-267, doi: 10.1016/j.stem.2015.02.014.
- Schepers, K. und Fibbe, W. E. (2016). **Unraveling mechanisms of mesenchymal stromal cell-mediated immunomodulation through patient monitoring and product characterization**. *Ann N Y Acad Sci* 1370, 15-23, doi: 10.1111/nyas.12984.
- Schira, J., Falkenberg, H., Hendricks, M., Waldera-Lupa, D. M., Kogler, G., Meyer, H. E., Muller, H. W. und Stuhler, K. (2015). **Characterization of Regenerative Phenotype of Unrestricted Somatic Stem Cells (USSC) from Human Umbilical Cord Blood (hUCB) by Functional Secretome Analysis**. *Mol Cell Proteomics* 14, 2630-2643, doi: 10.1074/mcp.M115.049312.

- Schmalzing, M., Aringer, M., Bornhauser, M. und Atta, J. (2017). **[Myelodysplastic syndrome, acute leukemia and stem cell transplantation]**. *Z Rheumatol* 76, 26-32, doi: 10.1007/s00393-017-0369-2.
- Schmudlach, A., Felton, J., Cipolla, C., Sun, L., Kennedy, R. T. und Dovichi, N. J. (2016). **Sample preparation protocol for bottom-up proteomic analysis of the secretome of the islets of Langerhans**. *Analyst* 141, 1700-1706, doi: 10.1039/c5an02265g.
- Schofield, R. (1978). **The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell**. *Blood Cells* 4, 7-25.
- Schroeder, T., Geyh, S., Germing, U. und Haas, R. (2016). **Mesenchymal stromal cells in myeloid malignancies**. *Blood Res* 51, 225-232, doi: 10.5045/br.2016.51.4.225.
- Schwanhausser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W. und Selbach, M. (2013). **Corrigendum: Global quantification of mammalian gene expression control**. *Nature* 495, 126-127, doi: 10.1038/nature11848.
- Seita, J. und Weissman, I. L. (2010). **Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation**. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2, 640-653, doi: 10.1002/wsbm.86.
- Severino, V., Farina, A. und Chambery, A. (2013). **Analysis of secreted proteins**. *Methods Mol Biol* 1002, 37-60, doi: 10.1007/978-1-62703-360-2_4.
- Shao, L., Frigon, N. L., Jr., Sehy, D. W., Yu, A. L., Lofgren, J., Schwall, R. und Yu, J. (1992). **Regulation of production of activin A in human marrow stromal cells and monocytes**. *Exp Hematol* 20, 1235-1242.
- Shav-Tal, Y. und Zipori, D. (2002). **The role of activin a in regulation of hemopoiesis**. *Stem Cells* 20, 493-500, doi: 10.1634/stemcells.20-6-493.
- Si, T., Lu, Y., Li, F., Jiang, L., Pei, R. und Zhou, J. X. (2018). **High expression of INHBA is an adverse prognostic factor for de novo acute myeloid leukemia**. *Leuk Lymphoma* 59, 114-120, doi: 10.1080/10428194.2017.1324157.
- Sing, G. K., Keller, J. R., Ellingsworth, L. R. und Ruscetti, F. W. (1988). **Transforming growth factor beta selectively inhibits normal and leukemic human bone marrow cell growth in vitro**. *Blood* 72, 1504-1511.
- Skalnikova, H., Motlik, J., Gadher, S. J. und Kovarova, H. (2011). **Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines**. *Proteomics* 11, 691-708, doi: 10.1002/pmic.201000402.
- Small, I., Peeters, N., Legeai, F. und Lurin, C. (2004). **Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences**. *Proteomics* 4, 1581-1590, doi: 10.1002/pmic.200300776.
- Smith, A., Howell, D., Patmore, R., Jack, A. und Roman, E. (2011). **Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network**. *Br J Cancer* 105, 1684-1692, doi: 10.1038/bjc.2011.450.
- Smith, B. J. (1984). **SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins**. *Methods Mol Biol* 1, 41-55, doi: 10.1385/0-89603-062-8:41.
- Stastna, M. und Van Eyk, J. E. (2012). **Investigating the secretome: lessons about the cells that comprise the heart**. *Circ Cardiovasc Genet* 5, o8-o18, doi: 10.1161/CIRCGENETICS.111.960187.
- Stiess, M., Wegehingel, S., Nguyen, C., Nickel, W., Bradke, F. und Cambridge, S. B. (2015). **A Dual SILAC Proteomic Labeling Strategy for Quantifying**

- Constitutive and Cell-Cell Induced Protein Secretion.** *J Proteome Res* 14, 3229-3238, doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00199.
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G. A., Zelenetz, A. D. und Jaffe, E. S. (2016). **The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms.** *Blood* 127, 2375-2390, doi: 10.1182/blood-2016-01-643569.
- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N. T., Roth, A., Bork, P., Jensen, L. J. und von Mering, C. (2017). **The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible.** *Nucleic Acids Res* 45, D362-D368, doi: 10.1093/nar/gkw937.
- Tallman, M. S., Gilliland, D. G. und Rowe, J. M. (2005). **Drug therapy for acute myeloid leukemia.** *Blood* 106, 1154-1163, doi: 10.1182/blood-2005-01-0178.
- Teixeira, F. G., Panchalingam, K. M., Assuncao-Silva, R., Serra, S. C., Mendes-Pinheiro, B., Patricio, P., Jung, S., Anjo, S. I., Manadas, B., Pinto, L., Sousa, N., Behie, L. A. und Salgado, A. J. (2016). **Modulation of the Mesenchymal Stem Cell Secretome Using Computer-Controlled Bioreactors: Impact on Neuronal Cell Proliferation, Survival and Differentiation.** *Sci Rep* 6, 27791, doi: 10.1038/srep27791.
- ten Dijke, P., Miyazono, K. und Heldin, C. H. (2000). **Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling.** *Trends Biochem Sci* 25, 64-70.
- Terskikh, A. V., Miyamoto, T., Chang, C., Diatchenko, L. und Weissman, I. L. (2003). **Gene expression analysis of purified hematopoietic stem cells and committed progenitors.** *Blood* 102, 94-101, doi: 10.1182/blood-2002-08-2509.
- Utsugisawa, T., Moody, J. L., Aspling, M., Nilsson, E., Carlsson, L. und Karlsson, S. (2006). **A road map toward defining the role of Smad signaling in hematopoietic stem cells.** *Stem Cells* 24, 1128-1136, doi: 10.1634/stemcells.2005-0263.
- Valent, P., Horny, H. P., Bennett, J. M., Fonatsch, C., Germing, U., Greenberg, P., Haferlach, T., Haase, D., Kolb, H. J., Krieger, O., Loken, M., van de Loosdrecht, A., Ogata, K., Orfao, A., Pfeilstocker, M., Ruter, B., Sperr, W. R., Stauder, R. und Wells, D. A. (2007). **Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference.** *Leuk Res* 31, 727-736, doi: 10.1016/j.leukres.2006.11.009.
- Varga, G., Kiss, J., Varkonyi, J., Vas, V., Farkas, P., Paloczi, K. und Uher, F. (2007). **Inappropriate Notch activity and limited mesenchymal stem cell plasticity in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes.** *Pathol Oncol Res* 13, 311-319, doi: PAOR.2007.13.4.0311.
- Veiby, O. P., Jacobsen, F. W., Cui, L., Lyman, S. D. und Jacobsen, S. E. (1996). **The flt3 ligand promotes the survival of primitive hemopoietic progenitor cells with myeloid as well as B lymphoid potential. Suppression of apoptosis and counteraction by TNF-alpha and TGF-beta.** *J Immunol* 157, 2953-2960.
- Villarreal, L., Mendez, O., Salvans, C., Gregori, J., Baselga, J. und Villanueva, J. (2013). **Unconventional secretion is a major contributor of cancer cell line secretomes.** *Mol Cell Proteomics* 12, 1046-1060, doi: 10.1074/mcp.M112.021618.
- Waldera Lupa, D. M., Kalfalah, F., Safferling, K., Boukamp, P., Poschmann, G., Volpi, E., Gotz-Rosch, C., Bernerd, F., Haag, L., Huebenthal, U., Fritsche, E.,

- Boege, F., Grabe, N., Tigges, J., Stuhler, K. und Krutmann, J. (2015). **Characterization of Skin Aging-Associated Secreted Proteins (SAASP) Produced by Dermal Fibroblasts Isolated from Intrinsically Aged Human Skin.** *J Invest Dermatol* 135, 1954-1968, doi: 10.1038/jid.2015.120.
- Walpurgis, K., Kohler, M., Thomas, A., Wenzel, F., Geyer, H., Schanzer, W. und Thevis, M. (2012). **Validated hemoglobin-depletion approach for red blood cell lysate proteome analysis by means of 2D PAGE and Orbitrap MS.** *Electrophoresis* 33, 2537-2545, doi: 10.1002/elps.201200151.
- Wilhelm, M., Schlegl, J., Hahne, H., Gholami, A. M., Lieberenz, M., Savitski, M. M., Ziegler, E., Butzmann, L., Gessulat, S., Marx, H., Mathieson, T., Lemeer, S., Schnatbaum, K., Reimer, U., Wenschuh, H., Mollenhauer, M., Slotta-Huspenina, J., Boese, J. H., Bantscheff, M., Gerstmair, A., Faerber, F. und Kuster, B. (2014). **Mass-spectrometry-based draft of the human proteome.** *Nature* 509, 582-587, doi: 10.1038/nature13319.
- Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F. und Williams, K. L. (1996). **Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it.** *Biotechnol Genet Eng Rev* 13, 19-50.
- Wrana, J. L. (2000). **Regulation of Smad activity.** *Cell* 100, 189-192.
- Wu, Y., Su, M., Zhang, S., Cheng, Y., Liao, X. Y., Lin, B. Y. und Chen, Y. Z. (2017). **Abnormal expression of TGF-beta type II receptor isoforms contributes to acute myeloid leukemia.** *Oncotarget* 8, 10037-10049, doi: 10.18632/oncotarget.14325.
- Yamashita, R., Fujiwara, Y., Ikari, K., Hamada, K., Otomo, A., Yasuda, K., Noda, M. und Kaburagi, Y. (2007). **Extracellular proteome of human hepatoma cell, HepG2 analyzed using two-dimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.** *Mol Cell Biochem* 298, 83-92, doi: 10.1007/s11010-006-9354-9.
- Yamashita, T., Takahashi, S. und Ogata, E. (1992). **Expression of activin A/erythroid differentiation factor in murine bone marrow stromal cells.** *Blood* 79, 304-307.
- Yu, J. und Dolter, K. E. (1997). **Production of activin A and its roles in inflammation and hematopoiesis.** *Cytokines Cell Mol Ther* 3, 169-177.
- Zhao, Z., Wang, Z., Li, Q., Li, W., You, Y. und Zou, P. (2012). **The different immunoregulatory functions of mesenchymal stem cells in patients with low-risk or high-risk myelodysplastic syndromes.** *PLoS One* 7, e45675, doi: 10.1371/journal.pone.0045675.
- Zhou, A., Webb, G., Zhu, X. und Steiner, D. F. (1999). **Proteolytic processing in the secretory pathway.** *J Biol Chem* 274, 20745-20748.
- Zhou, H. S., Carter, B. Z. und Andreeff, M. (2016). **Bone marrow niche-mediated survival of leukemia stem cells in acute myeloid leukemia: Yin and Yang.** *Cancer Biol Med* 13, 248-259, doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0023.
- Zhou, L., Nguyen, A. N., Sohal, D., Ying Ma, J., Pahanish, P., Gundabolu, K., Hayman, J., Chubak, A., Mo, Y., Bhagat, T. D., Das, B., Kapoun, A. M., Navas, T. A., Parmar, S., Kambhampati, S., Pellagatti, A., Braunchweig, I., Zhang, Y., Wickrema, A., Medicherla, S., Boulwood, J., Plataniias, L. C., Higgins, L. S., List, A. F., Bitzer, M. und Verma, A. (2008). **Inhibition of the TGF-beta receptor I kinase promotes hematopoiesis in MDS.** *Blood* 112, 3434-3443, doi: 10.1182/blood-2008-02-139824.

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Knochenmark-Mikromilieus	2
Abbildung 2: Die Hämatopoese im Menschen	4
Abbildung 3: Mesenchymale Stromazellen (MSZ) und ihr Potential.....	5
Abbildung 4: Überleben und Risiko des Übergangs in AML von Patienten mit MDS nach IPSS-R.....	9
Abbildung 5: Wege der Sekretion.....	16
Abbildung 6: MS Analyse des Sekretoms und Proteoms von MSZ aus dem Knochenmark ..	44
Abbildung 7: Gruppierung der sekretierten Proteine nach ihrem Abundanzbereich	46
Abbildung 8: Charakterisierung des MSZ-Sekretoms	47
Abbildung 9: Beispiel der Ergebnisse der LSPFP Analyse	48
Abbildung 10: Abundanz der sekretierten Proteine SerpinE1 und Angiotensin (AGT) im MSZ-Sekretom	49
Abbildung 11: Abundanz des intrazellulären Proteins Beta-Tubulin	50
Abbildung 12: Signifikant differentiell sekretierte Proteine von MSZ aus gesunden Probanden und MDS-Patienten.....	52
Abbildung 13: Signifikant differentiell sekretierte Proteine von MSZ aus gesunden Probanden und AML-Patienten.....	54
Abbildung 14: Box-Plot der Intensität von FSTL3 im MSZ-Sekretom von gesunden Probanden, MDS-Patienten und AML-Patienten.....	57
Abbildung 15: Absolute Konzentration von FSTL3 im MSZ-Sekretom von gesunden Probanden und AML-Patienten.....	58
Abbildung 16: qRT-PCR der Genexpression von <i>FSTL3</i> in MSZ von gesunden Probanden, MDS- und AML-Patienten.....	59
Abbildung 17: Kumulative Populationsverdopplung von HSPZ aus dem Knochenmark	60
Abbildung 18: Differenzierungsfähigkeit von HSPZ aus gesunden Probanden und MDS/AML-Patienten	61
Abbildung 19: Western Blot, Immunfärbung gegen SMAD2 und pSMAD2 von HSPZ aus gesunden Probanden und MDS/AML-Patienten.....	63
Abbildung 20: Western Blot Immunfärbung gegen pSMAD2 in AML Zelllinien HL-60 und THP-1	65
Abbildung 21: qRT-PCR Analyse der mRNA von <i>INHBA</i> in HSPZ von gesunden Probanden, MDS- und AML-Patienten.....	66
Abbildung 22: Kumulative Populationsverdopplung von HSPZ aus dem Knochenmark	67

Abbildung 23: Differenzierungsfähigkeit von HSPZ nach FSTL3 Behandlung	68
Abbildung 24: Western Blot, Immunfärbung gegen SMAD2 und pSMAD2 nach FSTL3 Behandlung von HSPZ.....	70
Abbildung 25: Aktivin-Signalweg	80
Abbildung 26: Mögliche funktionelle Effekte der differentiellen Sekretion von FSTL3 auf HSPZ im MDS und AML Kontext	82
Abbildung 27: Grafische Darstellung von LSPFP	113
Tabelle 1: WHO-Klassifizierung myelodysplastischer Syndrome sowie deren Merkmale im Blut und Knochenmark nach Stand 2016.....	8
Tabelle 2: WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie (AML).....	11
Tabelle 3: Symptomatik der AML bei Erstdiagnose (Fritsch <i>et al.</i> , 2006).....	12
Tabelle 4: Laborgeräte	22
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 6: Chemikalien	23
Tabelle 7: Puffer und Lösungen	25
Tabelle 8: Auflistung verwendeter Primer	27
Tabelle 9: Primäre Antikörper.....	27
Tabelle 10: Sekundäre Antikörper	28
Tabelle 11: Verwendete Software	28
Tabelle 12: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten MDS/AML-Patienten und gesunden Probanden für die Aufarbeitung von MSZ und/oder HSPZ.....	29
Tabelle 13: Protokoll zur Isolation der CD34+ HSPZ	31
Tabelle 14: Reihenfolge und Inkubationszeiten der Silberfärbung.....	36
Tabelle 15: Teilschritte des 120 min. HPLC-Gradienten.....	39
Tabelle 16: Teilschritte des 60 min. HPLC-Gradienten.....	40
Tabelle 17: Einstellung des Massenspektrometers (Q Exactive Plus)	40
Tabelle 18: Parametereinstellungen für die Datenbankanalyse mit Proteom Discoverer	42
Tabelle 19: Differentielle Proteine im MSZ-Sekretom zwischen gesunden Probanden und MDS-Patienten.....	55
Tabelle 20: Differentielle Proteine im MSZ-Sekretom zwischen gesunden Probanden und AML-Patienten. Anreicherungsfaktor basierend auf dem Vergleich der gemittelten Intensität im Sekretom und Proteom.....	56

Tabelle 23: Signifikant angereicherte Proteine im MSZ-Sekretom aus gesunden Probanden im Vergleich zum Proteom (67 Proteine).....	113
Tabelle 24: Proteinliste des MSZ-Sekretoms aus gesunden Probanden (315 Proteine)	115

9 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
1D	Eindimensional
bp	Basenpaar
BSA	Rinderalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
ca.	circa, etwa
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CFU	Koloniebildende Einheit (<i>Colony Forming Unit</i>)
CHAPS	3-[N-(Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfat
CID	Collision-induced Dissociation
CO ₂	Kohlendioxid
CPD	Kumulative Populationverdopplung (<i>Cumulative Population Doublings</i>)
Da	Dalton
DEPC	Diethyldicarbonat, Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol
FBS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FDR	<i>false discovery rate</i>
FLT-3 Ligand	FMS-related tyrosine kinase 3 Ligand
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GO	<i>Gene Ontology</i>
H ₂ O	Wasser
HCD	<i>High-energy collision dissociation</i>
HPGM	<i>Hematopoietic Progenitor Growth Medium</i>

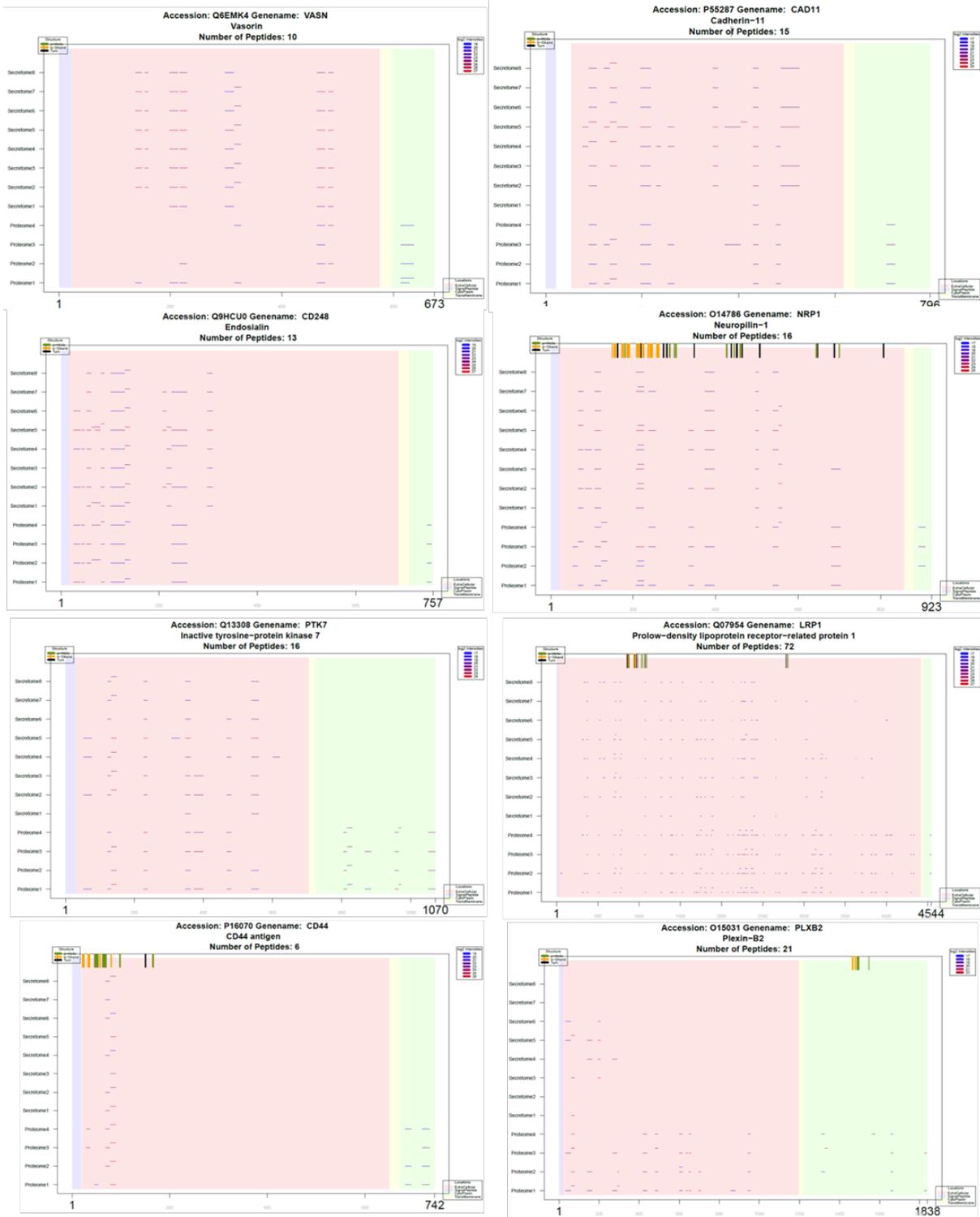
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilo-Dalton
KM	Knochenmark
LC-ESI-MS	Kopplung von HPLC und ESI-MS
M	Molar
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
max.	maximal
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MNC	Mononukleäre Zellen (<i>Mononuclear Cells</i>)
mRNA	messenger RNA
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
MSZ	Mesenchymale Stromazellen
MW	Molekulargewicht
ng	Nanogramm
PAGE	Polyacrylamidgel Elektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PSG	Penicillin/ Streptomycin/ L-Glutamin
PSMs	Peptide spectrum matches
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	<i>quantitative Realtime-PCR</i>
RAEB	<i>Refractory anemia with excess blasts</i>
RCMD	<i>Refractory anemia with excess blasts</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur

sAML	sekundäre Akute Myeloische Leukämie
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
sek	Sekunde(n)
SILAC	stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
WHO	Weltgesundheitsorganisation (world health organisation)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

10 Anhang

10.1 Abbildungen





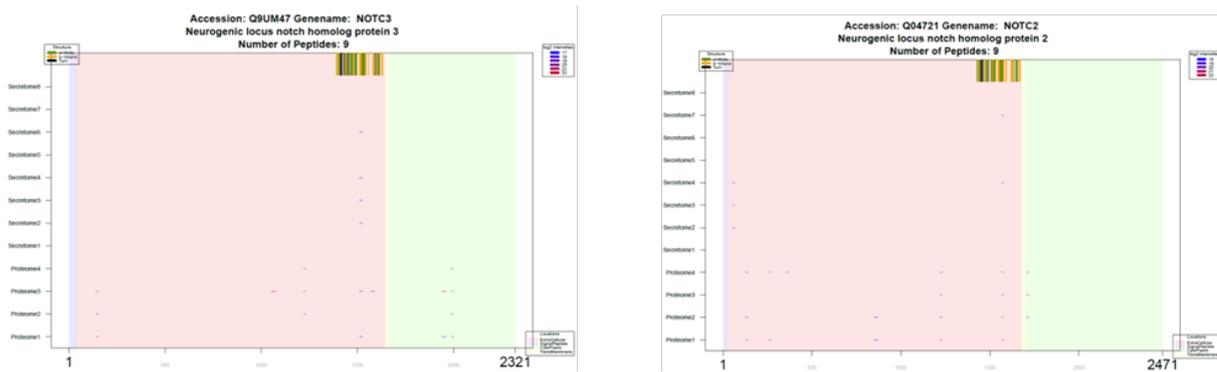


Abbildung 27: Grafische Darstellung von LSPFP. Für 17 Proteine des MSZ-Sekretoms wurde vorhergesagt, dass sie während der Proteinsekretion proteolytisch prozessiert werden. Für 8 einzelne Sekretom- und 4 zelluläre Proteomproben (y-Achse) wird jedes identifizierte und quantifizierte Peptid durch eine farbcodierte (massenspektrometrische Intensität) Linie auf seine jeweilige Position in der Proteinsequenz (x-Achse) abgebildet. Für jede Protein-Annotation werden Informationen aus UniProtKB (Topologie, molekulare Verarbeitung und Sekundärstruktur) sowie der Akzessions-, Gen- und Proteinname und die Anzahl der identifizierten Peptide eingezeichnet.

10.2 Tabellen

Tabelle 21: Signifikant angereicherte Proteine im MSZ-Sekretom aus gesunden Probanden im Vergleich zum Proteom (67 Proteine).

Uniprot-ID	Genname	Signal - peptid	Q-Wert	Peptide	Studentischer t-test Q-Wert Sekretom_Proteom	Studentische t-test Differenz Sekretom_Proteom
P07602	SAP	x	1,83	9	0,02	1,50
P21810	PGS1	x	7,32	17	0,00	6,09
A1L4H1	SRCRL	x	2,98	19	0,00	4,77
P16112	PGCA	x	3,29	44	0,00	7,18
P07711	CATL1	x	2,49	5	0,00	2,28
P26022	PTX3	x	5,07	21	0,00	7,99
Q12805	FBLN3	x	8,05	18	0,00	7,99
P09486	SPRC	x	6,94	21	0,00	6,46
P51884	LUM	x	6,69	14	0,00	10,88
O14498	ISLR	x	4,40	10	0,00	4,99
P35442	TSP2	x	2,90	39	0,00	4,79
Q08380	LG3BP	x	6,75	19	0,00	7,12
P12109	CO6A1	x	5,35	58	0,00	2,99
O95084	PRS23	x	1,25	3	0,04	1,52
P07093	GDN	x	5,20	21	0,00	6,11
P61916	NPC2	x	1,49	4	0,03	1,52
Q8IX30	SCUB3	x	3,35	18	0,00	3,74
P12110	CO6A2	x	4,43	41	0,00	1,85
P61769	B2MG	x	3,93	6	0,00	3,93
P13611	CSPG2	x	4,06	25	0,00	5,03

Q12841	FSTL1	x	4,46	25	0,00	7,42
P07942	LAMB1	x	4,42	57	0,00	2,53
Q15063	POSTN	x	5,69	21	0,00	6,02
Q76M96	CCD80	x	3,41	19	0,00	3,27
P02452	CO1A1	x	2,88	91	0,00	1,78
P08123	CO1A2	x	6,38	95	0,00	3,38
Q13586	STIM1	x	1,48	2	0,00	3,51
Q92743	HTRA1	x	2,85	19	0,01	1,40
P05121	PAI1	x	7,06	25	0,00	9,18
P02461	CO3A1	x	4,00	40	0,00	2,38
Q08431	MFGM	x	2,18	15	0,01	1,72
Q6EMK 4	VASN	x	2,93	10	0,00	1,85
O95965	ITGBL	x	7,26	20	0,00	7,87
Q14766	LTBP1	x	5,60	32	0,00	6,86
P01033	TIMP1	x	8,49	10	0,00	10,02
P35052	GPC1	x	3,64	13	0,01	1,48
Q15582	BGH3	x	4,26	42	0,00	4,33
Q16363	LAMA4	x	5,73	61	0,00	6,73
O00622	CYR61	x	1,63	6	0,00	2,26
P35555	FBN1	x	3,91	93	0,00	3,19
P08572	CO4A2	x	4,31	39	0,00	5,54
Q15113	PCOC1	x	4,00	29	0,00	4,13
O95967	FBLN4	x	3,40	15	0,00	3,12
Q9Y4K0	LOXL2	x	1,88	19	0,01	1,86
P05997	CO5A2	x	2,98	50	0,00	2,73
Q15262	PTPRK	x	3,12	9	0,00	3,41
Q02818	NUCB1	x	2,42	22	0,00	2,64
P29279	CTGF	x	3,32	18	0,00	2,42
Q92626	PXDN	x	4,33	32	0,00	2,40
Q16270	IBP7	x	9,62	16	0,00	6,72
P27658	CO8A1	x	1,71	22	0,00	2,72
P17936	IBP3	x	3,79	21	0,00	7,41
P02462	CO4A1	x	3,00	12	0,00	3,25
P08253	MMP2	x	6,41	37	0,00	9,48
Q14118	DAG1	x	5,57	6	0,00	4,17
P23142	FBLN1	x	2,98	12	0,00	3,58
Q969H8	MYDGF	x	2,08	4	0,00	2,68
P11047	LAMC1	x	3,91	59	0,00	2,16
Q92859	NEO1	x	2,91	12	0,00	2,19
P12107	COBA1	x	9,87	12	0,00	4,25
P20908	CO5A1	x	2,96	35	0,00	1,84
O75326	SEM7A	x	2,81	19	0,00	3,48
Q10471	GALT2		3,28	15	0,00	3,25
P12955	PEPD		4,62	8	0,00	2,28

P00491	PNPH		3,32	8	0,00	2,24
O00560	SDCB1		3,74	5	0,00	2,05
Q14019	COTL1		1,30	6	0,03	1,69

Tabelle 22: Proteinliste des MSZ-Sekretoms aus gesunden Probanden (315 Proteine)

Nummer	Uniprot-ID	Signalpeptid
1	Q6UX72	
2	Q92859	x
3	P12821	x
4	O75882	x
5	Q13332	x
6	P21926	
7	Q7Z7M9	
8	Q8NBJ4	
9	Q86Y38	
10	P49788	
11	Q13586	x
12	P15291	
13	P18827	x
14	Q93063	
15	Q7Z7M0	x
16	Q8IZF6	x
17	O43570	x
18	P16188	x
19	Q5KU26	
20	P33908	
21	Q8WVQ1	
22	P30530	x
23	Q6UXY8	
24	P09603	x
25	Q6EMK4	x
26	Q16706	
27	Q9NRB3	
28	P40189	x
29	Q13443	x
30	Q10471	
31	O75063	
32	P26572	
33	P05067	x
34	O43184	x
35	O00391	x
36	Q9P0K1	x
37	P23470	x

38	Q14118	x
39	Q15262	x
40	Q16394	
41	Q9UKM7	
42	O94985	x
43	P19021	x
44	O60462	x
45	O43505	
46	Q13591	x
47	P43235	x
48	P09871	x
49	P07602	x
50	P21810	x
51	P07585	x
52	Q14515	x
53	Q9UI42	x
54	A1L4H1	x
55	P16112	x
56	P07711	x
57	O00462	x
58	P28799	x
59	Q4LDE5	x
60	Q96S86	x
181	O00622	x
181	O00622	x
182	P35555	x
182	P35555	x
183	O60565	x
183	O60565	x
184	P03950	x
184	P03950	x
185	P01344	x
185	P01344	x
186	P08572	x
186	P08572	x
187	P22304	x
187	P22304	x
188	P58215	x
188	P58215	x
189	Q8IUX7	x
189	Q8IUX7	x
190	Q9BY76	x
190	Q9BY76	x
191	Q9GZX9	x
191	Q9GZX9	x

192	Q15113	x
192	Q15113	x
193	O95967	x
193	O95967	x
194	Q9Y4K0	x
194	Q9Y4K0	x
195	Q9BZM5	x
195	Q9BZM5	x
196	P00751	x
196	P00751	x
197	P34059	x
197	P34059	x
198	P05997	x
198	P05997	x
199	Q8NCF0	x
199	Q8NCF0	x
200	P35443	x
200	P35443	x
201	Q9BUD6	x
201	Q9BUD6	x
202	Q9H4F8	x
202	Q9H4F8	x
203	Q02818	x
203	Q02818	x
204	P29279	x
204	P29279	x
205	Q92626	x
205	Q92626	x
206	P16035	x
206	P16035	x
207	P01034	x
207	P01034	x
208	Q16270	x
208	Q16270	x
209	O95633	x
209	O95633	x
210	P04114	x
210	P04114	x
211	P06396	x
211	P06396	x
212	Q68BL7	x
212	Q68BL7	x
213	Q13822	x
213	Q13822	x
214	P39059	x

214	P39059	x
215	Q86UD1	x
215	Q86UD1	x
216	P27658	x
216	P27658	x
217	P17936	x
217	P17936	x
218	P35858	x
218	P35858	x
219	P10124	x
219	P10124	x
220	P02462	x
220	P02462	x
221	P24592	x
221	P24592	x
222	P14543	x
222	P14543	x
223	Q8N6G6	x
223	Q8N6G6	x
224	P35556	x
224	P35556	x
225	Q16769	x
225	Q16769	x
226	Q7Z7G0	x
226	Q7Z7G0	x
227	P10646	x
227	P10646	x
228	P34096	x
228	P34096	x
229	P08253	x
229	P08253	x
230	O00468	x
230	O00468	x
231	O95450	x
231	O95450	x
232	P25940	x
232	P25940	x
233	P19883	x
233	P19883	x
234	P23142	x
234	P23142	x
235	P01137	x
235	P01137	x
236	O75095	x
236	O75095	x

237	P78539	x
237	P78539	x
238	Q14393	x
238	Q14393	x
239	Q14112	x
239	Q14112	x
240	P00742	x
240	P00742	x
301	Q8IZD9	
302	Q8NCM8	
303	Q8NFP9	
304	Q8WZ42	
305	Q96G03	
306	Q9H3Z7	
307	Q9NYF3	
308	Q9UHY7	
309	Q9Y6X6	
310	P55210	
311	Q8WUJ0	
312	P12955	
313	P00491	
314	O00560	
315	Q14019	

10.3 Veröffentlichung

Teile der Dissertation stammen aus der Publikation Baberg *et al.* 2019. Im Detail wurden die Ergebnisse des Abschnitts 4.1 sowie Teile der Diskussion (5.2.1) aus diesem Manuskript übernommen. Die Zellkultur-Experimente, molekularbiologischen- sowie die massenspektrometrischen Arbeiten wurden von Herrn Baberg durchgeführt. Konkret umfassten diese Arbeiten die Kultivierung der MSZ aus gesunden Probanden, die Generierung des Sekretoms sowie die Ernte des Proteoms. Die anschließende Probenvorbereitung sowie die Analyse mittels Massenspektrometrie und deren bioinformatische Auswertung wurde von Herrn Baberg durchgeführt. Des Weiteren war Herr Baberg Hauptautor des Manuskriptes samt Erstellung der Abbildungen.

10.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stühler und Herrn PD Dr. Schroeder für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes.

Ein großes Dankeschön gilt Anja Stefanski, Stefanie Geyh und Daniel Waldera-Lupa, die durch ihre fachliche und organisatorische Betreuung sowie ihre freundliche und geduldige Art eine große Unterstützung während dieser Arbeit waren. Vielen Dank!

Weiter möchte ich der kompletten Arbeitsgruppe des Molecular Proteomics Laboratory sowie des Forschungslabors der Klinik für Hämatologie, Onkologie u. Klinische Immunologie für das angenehme und wundervolle Betriebsklima danken.

Zum Schluss möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Frau Jasmin, meiner Tochter Emma, meinen Eltern Brigitte und Thomas und meiner gesamten Familie für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion bedanken.

10.5 Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, den

.....

(Falk Baberg)