Aus der Abteilung Klinische Chemie (Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Oellerich) im Zentrum Innere Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen und aus der Forschungsgruppe bioanalytische Massenspektrometrie (Prof. Dr. rer. nat. H. Urlaub) des Max-Planck-Instituts für biophysikalische Chemie in Göttingen

Untersuchung des Sekretoms chondrogener Progenitorzellen mittels metabolischer Markierung und quantitativer Massenspektrometrie

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Sarah Gaida aus Witzenhausen

Göttingen 2011

Dekan:Prof. Dr. med. C. FrömmelI. Berichterstatter:Prof. Dr. rer. nat. Henning UrlaubII. Berichterstatter/in:Prof. Dr. med. Nicolai MiosgeIII. Berichterstatter/in:Prof. Dr. med. dent. Rainer MausbergTag der mündlichen
Prüfung:19.06.2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Knorpelgewebe und Osteoarthrose	2
1.1.1 Molekularer Aufbau des gesunden Gelenkknorpels	2
1.1.2 Kultivierung von Chondrozyten	5
1.1.3 Chondrogene Progenitorzellen	5
1.1.4 Definition, Ätiologie und Epidemiologie der Osteoarthrose	7
1.1.5 Pathogenese der Osteoarthrose	7
1.1.6 Therapie der Osteoarthrose	10
1.2 Massenspektrometrie	10
1.2.1 Ablauf eines massenspektrometrischen Experiments	11
1.2.2 Aufbau und Funktion eines Massenspektrometers	12
1.2.3 Identifikation von Peptiden und Proteinen	15
1.2.3.1 Peptide Mass Fingerprinting	15
1.2.3.2 Fragmentierung von Peptiden im Massenspektrometer	15
1.2.4 Quantifizierung von Peptiden und Proteinen	17
1.2.5 Bioinformatische Auswertung von MS-Daten	20
1.2.6 Proteomik in der Knorpel- und Osteoarthroseforschung	20
1.3 Fragestellung	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien, Feinchemikalien und Enzyme	23
2.1.2 Geräte	24
2.1.3 Probenmaterial	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Biochemische Methoden	25
2.2.1.1 Ethanolpräzipitation	25
2.2.1.2 Trichloressigsäure-Aceton-Präzipitation	26
2.2.1.3 Denaturierende 1D-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
(SDS-PAGE)	26
2.2.2 Massenspektrometrische Methoden	27

2.2.2.1 In-Gel-Hydrolyse von Proteinen	27
2.2.2.2 Extraktion von Peptiden	28
2.2.2.3 Flüssigkeitschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie	29
2.2.2.4 Datenauswertung	30
3 Ergebnisse	31
3.1 Entwicklung einer Methode zur Untersuchung des Sekretoms chondrogener	
Progenitorzellen	31
3.1.1 Präparation der Probensubstanz für die 1D-Gelelektrophorese	32
3.1.1.1 Gelelektrophoretische Untersuchung von 2D-CPC- und 3D-CPC-Medium mit	
10% Kälberserum	32
3.1.1.2 Aufkonzentration der Probensubstanz	34
3.1.1.3 Selektive Entfernung von Albumin	37
3.1.1.4 Optimierung eines 1:1-Verhältnisses von 2D- und 3D-CPC-Medium zur	
quantitativen Analyse des Sekretoms von CPCs mittels metabolischer Markierung	39
3.1.2 Zusammenfassung der entwickelten Methode zur Untersuchung des Sekretoms	
chondrogener Progenitorzellen	40
3.1.3 Untersuchung der Effektivität der Trichloressigsäure-Aceton-Präzipitation mittels	
Massenspektrometrie	42
3.1.4 Entwicklung einer individualisierten Datenbanksuche für die Filterung der	
identifizierten Proteine von Kontaminanten durch fetales Kälberserum	44
3.2 Qualitative Analyse der Protein-Expression von CPCs nach 24 Stunden	45
3.3 Quantitative Analyse der Proteinexpression durch CPCs im 2D- und 3D-Medium nach	24h
	51
4 Diskussion	
4.1 Methodische Aspekte der Proteomanalyse	59
4.2 Proteinidentifikationen im Sekretom chondrogener Progenitorzellen	63
4.3 Differenzierung von CPCs und Erhöhung des chondrogenen Potentials	68
4.4 Vergleich der Sekretome von CPCs und Chondrozyten	73
4.5 Ausblick	75
5 Zusammenfassung	76
6 Literaturverzeichnis	77
7 Anhang	86

Abkürzungsverzeichnis:

ACN	Acetonitril
ADAMTS	Aggrekanase (a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin
	motifs)
a.m.u.	unified atomic mass unit (atomare Masseneinheit)
Arg	Arginin
atm	physikalische Atmosphäre
В	Glutamat
BMP-6	Bone morphogenetic protein 6
BSA	Bovines Serumalbumin
С	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CI	chemische Ionisation
CID	Collison-Induced-Dissociation
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
CPCs	Chondrogene Progenitorzellen (Chondrogenic Progenitor Cells)
CRM	Charged-Residue Modell
D	Aspartat
D-	Dexter (lat.)
1D	ein-dimensional
2D	zwei-dimensional
2D-CPC	undifferenzierte chondrogene Progenitorzellen in Monolayer-Kultur
3D	drei dimensional
3D-CPC	differenzierte chondrogene Progenitorzellen in Alginatkultur
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle´s Medium
DTT	Dithiothreitol
EI	Elektroanstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	<i>Et alii</i> (lat. und andere)

EtOH	Ethanol
EtOH↓	Ethanolpräzipitation
EZM	extrazelluläre Matrix
FKS	fetales Kälberserum
h	Stunden
HCD	higher energy collision induced dissociation
H/L	Schwer/Leicht (Heavy/Light)
HPLC	Hochleitungsflüssigkeitschromatographie (high-performance liquid
	chromatography)
ICAT	Isotopen-codierte Affinitätstags
IEM	Ion Evaporation Model
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP	Insulin-like growth factor binding Protein
IPI	Internationaler Protein-Index
iTRAQ	isobaric tags for relative and absolute quantitation
К	Lysin
kDa	Kilodalton
KK	kalzifizierter Knorpel
kV	Kilovolt
lat.	Lateinisch
LC	Flüssigkeitschromatographie (liquid chromatography)
LTQ	lineare Ionenfalle
Lys	Lysin
mA	Milliampere
MALDI	Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
Mr	Molekulargewichtsmarker

MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
m/z.	Verhältnis von Massenzahl zu Ladungszahl
OA	Osteoarthrose (Osteoarthritis)
OS	oberflächliche Schicht
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
pН	pondus Hydrogenii (lat.)
PMF	Peptide-Mass-Fingerprint
PTX	Pentraxin-related protein
Q-ToF	Quadrupole Time-of-Flight
R	Arginin
S-	Sinister (lat.)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SILAC	Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture
SK	subchondraler Knochen
SLRP	Small leucin-rich proteoglycans
ST	Supplementary Table
TCA	Trichloressigsäure
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TIC	total ion chromatogram
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
ToF	Time-of-Flight
TS	tiefe Schicht
UniProt	Universal Protein Database
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Organisation des gesunden Gelenkknorpels	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Pathogenese der Osteoarthrose	9
Abbildung 3: Typischer Ablauf eines massenspektrometrischen Experiments zur Darstellung	
eines Zell-Proteoms	11
Abbildung 4: Wesentliche Bestandteile eines Massenspektrometers	12
Abbildung 5: Schematischer Aufbau einer ESI-Quelle	13
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Orbitrapmassenanalysators	14
Abbildung 7: Sequenzierung von Peptiden	16
Abbildung 8: SILAC-Aminosäuren Arginin+10 und Lysin+8	18
Abbildung 9: Schematische Darstellung eines SILAC-Experiments zur relativen Quantifizierun	g
von Proteinen aus Zellen in Zellkultur mittels MS	19
Abbildung 10: Proteinidentifikationen und Quantifizierungen in biologischen Proben	20
Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometers	29
Abbildung 12: Auftrennung von Proteinen im 2D-CPC- und 3D-CPC-Medium und 10% FKS	
über 1D-SDS-Gelelektrophorese	33
Abbildung 13: Kultivierung von CPCs in 2D-Kultur und CPCs in 3D-Alginatkultur in	
verschiedenen Medien (2D "schweres Medium"; 3D "leichtes Medium")	34
Abbildung 14: Coomassie-gefärbtes 1D-SDS-Gel: Gelelektrophoretische Auftrennung von	
unpräzipitiertem und mit Ethanol präzipitiertem 2D-CPC-Medium und 3D-CPC-Medium	
(beide ohne FKS mit sekretierten Proteinen)	35
Abbildung 15: Coomassie-gefärbtes 1D-SDS-Gel: Verschiedene Volumina an 2D-CPC-Mediur	n,
das mit EtOH präzipitiert wurde	36
Abbildung 16: Schematisch dargestellter Ablauf der Trichloressigsäure-Aceton-Präzipitation	
modifiziert nach Chen Y et al. (2005)	37
Abbildung 17: Coomassie-gefärbtes 1D-SDS-Gel: 2D-CPC-Medium und 3D-CPC-Medium	
präzipitiert durch TCA-Aceton-Präzipitation und EtOH-Präzipitation im Vergleich zu	
unpräzipitiertem Medium sowie das durch TCA-Aceton-Präzipitation selektiv gefällte BSA	4
	38
Abbildung 18: Coomassie-gefärbtes 1D-SDS-Gel: Optimierung eines 1:1-Verhältnisses an 2D-	
CPC-Medium und 3D-CPC-Medium	40

Abbildung 19: Schematischer Ablauf der entwickelten Methode zur qualitativen und
quantitativen Untersuchung des Sekretoms chondrogener Progenitorzellen41
Abbildung 20: Untersuchung der Effektivität der TCA-Aceton-Präzipitation mittels LC-MS/MS
Abbildung 21: Schnittmengendiagramm identifizierter Proteine in Präzipitat I, Präzipitat II und
Präzipitat III
Abbildung 22: Anzahl der Peptide, die zur Identifikation der Proteine in Präzipitat II und III
herangezogen wurden44
Abbildung 23: Schnittmengen der Proteinidentifizierungen in 3 biologisch voneinander
unabhängigen Replikaten46
Abbildung 24: Funktionen der im Sekretom von CPCs identifizierten Proteine51
Abbildung 25: H/L-Verhältnis über der Anzahl der quantifizierten Proteine im Sekretom von
CPCs
Abbildung 26: TIC von Gelstück 6 (Präzipitat I)55
Abbildung 27: MS- und MS/MS-Spektrum des Peptids PLQALLDGR aus Insulin-like growth
factor binding protein 356
Abbildung 28: MS- und MS/MS-Spektrum des Peptids LLLFSDGNSQGATPAAIEK aus dem
Protein Collagen alpha-1(VI) chain
Abbildung 29: MS- und MS/MS-Spektrum des Peptids NNEEYLALIFEK aus Sulfhydryl oxidase
1

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Proteinidentifikationen im Sekretom von CPCs	50
Tabelle 2: Proteine mit signifikant niedrigem H/L-Verhältnis im Sekretom von CPCs	53
Tabelle 3: Proteine mit signifikant hohen H/L-Verhältnis im Sekretom von CPCs	54
Tabelle 4: Schnittmenge der Proteinidentifikationen im Sekretom gesunder Chondrozyten und	÷
von CPCs	74

1 Einleitung

Osteoarthrose (OA) ist eine der häufigsten Erkrankungen und hat eine große sozioökonomische Bedeutung. Bisher gilt durch OA beschädigter Gelenkknorpel als nicht regenerationsfähig. Therapeutische Interventionen führen deshalb nur zu einer Besserung der Symptome, nicht aber zu einer Ausheilung der Defekte (Lohmander und Roos 2007). Erfolgversprechend sind Forschungen auf dem Gebiet des sogenannten "Tissue Engineerings", bei dem versucht wird, den Knorpel zu regenerieren, anstatt ihn durch Transplantation zu ersetzen. In diesem Zusammenhang gibt es Hinweise, dass chondrogene Progenitorzellen (CPCs) in Zukunft genutzt werden könnten, um defektes Knorpelgewebe zu regenerieren (Koelling und Miosge 2009).

Ein Sekretom beinhaltet das gesamte Repertoir löslicher Proteine, die von einem bestimmten Zelltypen in den Extrazellularraum sekretiert werden (Tjalsma et al. 2000). Im Rahmen einer OA kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen katabolen und anabolen Aktivitäten der Chondrozyten und dadurch bedingt zu einer Umstrukturierung der extrazellulären Matrix (EZM) (Loeser 2006). Die Untersuchung des Sekretoms von CPCs ist deshalb von großem Interesse und Ziel dieser Arbeit. Mit der Massenspektrometrie (MS) steht eine Methode zur Verfügung, diese Zielvorgabe genau und effizient zu erreichen. Bisher wurde eine solche Untersuchung nicht durchgeführt. Es musste deshalb eine Strategie entwickelt werden, um das Medium in das CPCs während der Kultivierung lösliche Proteine sezernieren, dahingehend vorzubereiten, dass es mittels MS untersucht werden konnte. Es sollte weiterhin untersucht werden, wie sich das Sekretom von undifferenzierten CPCs in Monolayer (2D-CPCs) und das Sekretom von in Alginat kultivierten CPCs (3D-CPCs) quantitativ unterscheidet.

In der folgenden Einleitung sollen zunächst die biologischen Hintergründe der Thematik beleuchtet werden (1.1). Da die Massenspektrometrie als Analysemethode gewählt wurde, soll außerdem ein Überblick über die theoretischen Grundlagen und Einsatzmöglichkeiten dieser Technik gegeben werden (1.2).

1.1 Knorpelgewebe und Osteoarthrose

1.1.1 Molekularer Aufbau des gesunden Gelenkknorpels

Knorpelgewebe ist ein gefäßloses und festes sowohl biege- als auch druckelastisches Stützgewebe. Kennzeichnend sind die Knorpelzellen (Chondrozyten), die in kleinen Gruppen (Chondronen) in einer ausgedehnten EZM liegen und keinen Kontakt miteinander haben. Die Chondrozyten sind kugelig geformt, besitzen einen rundlichen Zellkern und enthalten einen hohen Anteil an Fett, Glykogen und Wasser. Sobald sie ausdifferenziert sind, verlieren sie ihre Fähigkeit zur Teilung. Der ausgewachsene artikuläre Knorpel ist ein zellarmes Gewebe mit durchschnittlich 2% Chondrozyten. Mit steigendem Alter nimmt dieser Anteil an Zellen im Gesamtvolumen sowie die Matrixsyntheserate stetig ab. Da Knorpelgewebe frei von Nerven und Gefäßen ist, werden Nährstoffe über Diffusion aufgenommen. Dieses geschieht bei hyalinem Gelenkknorpel über die Synovialflüssigkeit des Gelenkspaltes (Poole et al. 2001).

Die Zusammensetzung und die Struktur der gesamten Knorpelmatrix reflektieren die speziellen mechanischen Eigenschaften dieses Gewebes, wie Zugbelastbarkeit, Druckelastizität und Zell-Matrix-Interaktion (Poole et al. 2001). Die makromolekularen Hauptkomponenten von Knorpelgewebe sind Kollagenfasern vom Typ II, IX und XI, sowie die Proteoglykan-Glycosaminoglykan-Komplexe aus Aggrekan und Hyaluronan und Wasser. In diesem Geflecht aus Kollagenfibrillen und Mikrofilamenten sind zahlreiche nicht-kollagenöse Proteine wie z.B. Biglykan oder Dekorin lokalisiert (Wilson et al. 2009).

Knorpelgewebe organisiert sich in vier verschiedenen Schichten: eine oberflächliche, eine mittlere und eine tiefe Schicht, sowie eine Schicht aus kalzifizierter Knorpelmatrix (Poole et al. 2001). Zusätzlich zu den Schichten ist die Struktur der Knorpelmatrix, die die Chondrozyten umgibt variabel (Abbildung 1).



Abbildung 1: Organisation des gesunden Gelenkknorpels

In a) sind wesentliche Gelenkbestandteile dargestellt. In b) ist der vierschichtige Aufbau des artikulären Knorpels gezeigt. Das Gewebe unterteilt sich in eine oberflächliche Schicht (OS), eine mittlere Schicht (MS), eine tiefe Schicht (TS) und eine Zone kalzifizierten Knorpels (KK). Darunter liegt der subchondrale Knochen (SK). KK und SK werden durch die Tidemark getrennt. Die Schichten unterscheiden sich an Zellgehalt- und Morphologie sowie an Faser- und Proteinzusammensetzung. Diese Gewebebestandteile sind in b) voneinander unabhängig dargestellt. Zusätzlich zu den unterschiedlichen Schichten unterteilt sich die EZM in Zonen, die durch den Abstand zum Chondrozyten definiert werden. Diese sind in c) dargestellt. Die perizelluläre Matrix liegt in unmittelbarer Nähe zum Chondrozyten. An die perizelluläre Matrix schließt sich die terterritoriale Matrix an. Dazwischen liegt die interterritoriale Matrix. (Abbildung modifiziert aus den Publikationen von Hayes et al. 2007, Seite 854; Koelling et al. 2008, Seite 1456 und Heinegard und Saxne 2011, Seite 51)

Matrixzusammensetzung und Homöostase variieren deutlich innerhalb der Zonen, sowie mit dem Abstand zu den Chondrozyten. Die oberflächliche Zone des Gelenkknorpels ist durchzogen von einem dichten Geflecht derber Kollagenfasern vom Typ I, die abgeflacht sind und parallel zur Oberfläche verlaufen. Charakteristisch für die Chondrozyten der oberflächlichen Zone ist die Produktion des Moleküls Lubricin (engl. Superficial Zone Protein), außerdem finden sich hier vermehrt die Proteoglykane Dekorin und Biglykan, die Ihre Rolle in der Stabilisierung der EZM finden. Lubricin reduziert die Reibung an Gelenkoberflächen und wird als ein wichtiger Bestandteil der Synovia gesehen (Jay et al. 2007). Durch diesen Aufbau ist die oberflächliche Zone bestens geeignet, Druck sowie Scher- und Zugkräften zu widerstehen. In der mittleren Zone ist die Anzahl an Zellen niedriger, sie sind runder und die aggrekanreiche Matrix ist ausgedehnter. Die Kollagenfasern haben einen größeren Durchmesser, verlaufen ungeordnet und bestehen hauptsächlich aus verzweigtem Kollagen Typ VI, II und IX (Poole et al. 2001). Charakteristischerweise findet sich in dieser Zone das Molekül Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP), das den Kollagenvorläufer Prokollagen zu Kollagenfasern vernetzen kann. Eingebettet in die Matrix findet sich weiterhin die Phosphohydrolase Cartilage Intermediate Zone Matrix Protein (Mori et al. 2006). In der tiefen Zone sind die Chondrozyten größer. Außerdem sind der Aggrekangehalt sowie der Durchmesser der Fasern hier am größten. Der Kollagengehalt ist am niedrigsten, die Fasern sind senkrecht zur Oberfläche angeordnet. Zwischen der tiefen Zone und dem subchondralen Knochen, befindet sich eine Zone kalzifizierten Knorpels, die als Bindeglied zwischen Knochen- und Knorpelgewebe gesehen werden kann. Diese Zone enthält reichlich Kollagen Typ X und steuert die Angiogenese und den Umbau von Gewebe zu Knochen (Jacenko 2000). Die kalzifizierte Zone wird durch die sog. Tidemark von der Radialzone getrennt. Die Tidemark wird von eng zusammenliegenden Mineralien mit Vesikeln der EZM gebildet (Poole et al. 2001). Alle Chondrozyten sind von einer ca. 2µm starken, kollagenarmen perizellulären Region umgeben. Hier sind vor allem Moleküle und Rezeptoren lokalisiert, die mit der Zelloberfläche interagieren (Heinegard und Saxne 2011). Der perizellulären Region schließt sich die territoriale Zone an. Die Region zwischen den zahlreichen territorialen Regionen, nennt sich interterritoriale Region. Hier finden sich typischerweise zahlreiche Abbauprodukte z.B. von Aggrekan (Poole et al. 2001).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Knorpelgewebe einen komplexen Aufbau aufweist, der sich vor allem durch eine extensive EZM auszeichnet, in der sich zahlreiche Proteine, die für den Metabolismus der Zelle verantwortlich sind, organisieren.

1.1.2 Kultivierung von Chondrozyten

Werden gesunde Chondrozyten in einer zwei-dimensionalen (2D) Zellkultur (Monolayer) angezüchtet, wandeln sie sich zu einem abgeflachten fibroblastenähnlichen Zelltyp und stellen ihre Kollagenproduktion von Typ II, IX und XI auf Typ I, III und V um (Domm et al. 2000). Eine gewebeähnliche Chondrozytenzüchtung bedarf deshalb einer Stabilisierung des ursprünglichen Phänotyps mit einer knorpelspezifischen EZM während der *in-vitro*-Kultiverung. Dies kann durch ein dreidimensionales (3D) Kultursystem aus Alginat erreicht werden (Schulze et al. 2000). Alginat ist ein aus der Braunalge extrahiertes Co-Polymer aus D-Mannuronsäure und L-Guluronsäure. Es lässt sich durch die Zugabe von Kalziumionen in eine gelartige Matrix überführen und durch den Entzug dieser Ionen wieder verflüssigen (De Ceuninck et al. 2004). Die für Chondrozyten charakteristischen sphärischen Zellkerne bleiben im Alginat erhalten (Häuselmann et al. 1994). Die Matrixsynthese der im Alginat kultivierten Zellen ähnelt der im nativen Knorpelgewebe (Häuselmann et al. 1996). Bereits nach 7 Tagen in Alginatkultur formen intakte adulte humane Chondrozyten in Gegenwart von 10 % fetalem Kälberserum (FKS) eine stabile zellassoziierte knorpeltypische EZM (Schulze et al. 2000). Außerdem begünstigt Alginat die Expression von knorpeltypischen EZM-Bestandteilen, wie den Kollagentyp II, IX und XI (Domm et al. 2000).

Auch CPCs differenzieren in der 3D-Alginat-Kultur. Nach 3 Wochen entwickeln sie einen chondrozytenähnlichen Phänotyp und synthetisieren knorpeltypische EZM-Proteine wie Kollagen Typ II (Koelling et al. 2009). Die 3D-CPCs unterscheiden sich also wesentlich von undifferenzierten 2D-CPCs.

1.1.3 Chondrogene Progenitorzellen

Im Folgenden soll aufgezeigt werden, wie sich CPCs von gesunden Chondrozyten unterscheiden, und warum die Untersuchung dieser Zellen von großer Wichtigkeit ist. Eine Progenitorzelle oder Vorläuferzelle ist der Abkömmling einer adulten Stammzelle. Wie Stammzellen, können Progenitorzellen zu einem oder mehreren spezifischen Zelltypen differenzieren. Der wichtigste Unterschied zwischen Stamm- und Progenitorzellen liegt darin, dass Pogenitorzellen sich nicht uneingeschränkt selbst erneuern können. Damit stehen Progenitorzellen zwischen Stammzellen und voll differenzierten Zellen (Seaberg und van der Kooy 2003). Im späten Stadium der OA sind in der pathologisch veränderten extrazellulären Knorpelmatrix Arten von Chondrozyten vorhanden: gesunde typischerweise drei Chondrozyten, fibroblastenartige Chondrozyten und degenerierte Chondrozyten. Die fibroblastenartigen Chondrozyten wurden zunächst als Typ-II-Zellen bezeichnet und konnten 2009 von Koelling et al. als Progenitorzellen identifiziert werden (Khan et al. 2009; Koelling et al. 2009). Es wurde gezeigt, dass diese Zellen Stammzelleigenschaften wie Klonogenität, Multipotenz und migratorische Aktivität besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass sie adipogenes, osteogenes und ein sehr hohes chondrogenes Potential aufweisen und sich ca. 60-mal teilen können. Außerdem können die isolierten CPCs ex vivo knorpelähnliches Gewebe bilden (Koelling et al. 2009).

CPCs finden sich am häufigsten im Regenerationsgewebe, welches den osteoarthrotischen Defekt umgibt, sowie in Zonen, in denen die Tidemark durch Vaskularisation gebrochen ist. Es wird deshalb gemutmaßt, dass sie dem Knochenmark des subchondralen Knochens entspringen und rekrutiert werden, um erkranktes Gewebe zu regenerieren. Im gesunden Gewebe finden sich diese Zellen nicht. An der Geweberegeneration im fortgeschrittenen Stadium der OA sind CPCs zwar beteiligt, da sie jedoch Kollagen Typ I anstatt des knorpeltypischen Kollagens vom Typ II synthetisieren, können sie nur Narbengewebe bilden. Werden CPCs auf Matrigel kultiviert und kommen dadurch mit zahlreichen EZM-Bestandteilen in Kontakt, erhöht sich ihr chondrogenes Potential. Diese EZM-Bestandteile scheinen eine große Rolle im Differenzierungsprozess der CPCs zu spielen. Werden CPCs in Alginat kultiviert, verstärkt sich die Bildung von Kollagen Typ II und perizellulären Kollagenfasern durch den Zusatz chondrogener Mediatoren wie Transforming Growth Factor- β (TGF- β) und Bone Morphogenetic Protein 6 (BMP-6). Aufgrund der migratorischen Fähigkeiten der CPCs, die sich in der Zellkultur zeigten, wurden Matrix abbauende Proteasen wie Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) und Aggrekanasen (ADAMTS) untersucht. MMP-1, MMP-3, MMP-9 MMP-14 und ADAMTS-4 kamen in der EZM von CPCs häufiger vor, als in der EZM von gesunden Chondrozyten (Tesche und Miosge 2005; Koelling et al. 2009; Koelling und Miosge 2009).

Aufgrund ihres hohen chondrogenen Potentials werden CPCs als möglicher Ausgangspunkt für eine zell-basierte Therapie der OA angesehen und sind von großer Bedeutung. Bevor eine solche Therapie zur klinischen Anwendung bereitsteht, müssen zahlreiche wissenschaftliche Fragen geklärt werden. Es muss u.a gezeigt werden, dass manipulierte CPCs eine EZM synthetisieren können, die in einem Reparationsgewebe resultiert, das eine höhere Resistenz gegenüber mechanischen Kräften aufweist als das Narbengewebe, das im Rahmen einer OA entsteht. Weiterhin müssen die optimalen Bedingungen evaluiert werden, um CPCs so zu manipulieren, dass sie eine anhaltende chondrogene Kapazität aufweisen (Koelling und Miosge 2009).

1.1.4 Definition, Ätiologie und Epidemiologie der Osteoarthrose

Die Osteoarthrose (OA) wird auch als Arthrose, *Arthrosis deformans* oder degenerative Gelenkerkrankung bezeichnet (Böcker et al. 2008). OA ist charakterisiert durch die Degeneration des artikulären Knorpels, eine begrenzte intra-artikuläre Entzündung mit Synovialitis und Veränderungen des peri-artikulären und subchondralen Knochens (Goldring und Goldring 2007). In der Folge kommt es zu einer Sklerose (Verdichtung) des subchondralen Knochens und zur Bildung von Osteophyten (Knochenauswüchse im Bereich der Gelenkränder) (Böcker et al. 2008).

An OA leiden ca. 15% der Weltbevölkerung, damit ist OA die weltweit häufigste Gelenkerkrankung (Böcker et al. 2008). Die Häufigkeit nimmt mit steigendem Lebensalter zu und erreicht in der 7. Lebensdekade eine Plateauphase (Prestel 2007). Von OA betroffen sind vor allem die großen, mechanisch besonders belasteten Gelenke, wie das Kniegelenk (Gonarthrose), das Hüftgelenk (Coxarthrose) und das Schultergelenk (Omarthrose). Kiefer-, Ellenbogen-, Hand-, Fuß-, Finger- und Zehengelenke sind weniger häufig betroffen (Böcker et al. 2008; Kuroda et al. 2009).

Man unterscheidet primäre und sekundäre Arthrosen. In 95% der Erkrankungen kommt es zu einer primären Arthrose, bei welcher die Knorpeldegeneration ohne erkennbare Ursache auftritt. Diese Form der OA wird mit einem steigenden Lebensalter assoziiert. Sekundäre Arthrosen haben bekannte Ursachen, wie z.B. Systemerkrankungen (Diabetes mellitus), Gelenkblutungen, Übermäßige Belastung z.B. in Folge von Übergewicht oder angeborenen Gelenkfehlstellungen. Die sekundären Arthrosen machen ca. 5% der Erkrankung aus (Riede et al. 2004).

1.1.5 Pathogenese der Osteoarthrose

Der Entstehung einer Osteoarthrose liegt ein multifaktorielles Geschehen zugrunde. Mechanische Einflüsse, Alterungsprozesse der Knorpelmatrixkomposition und –struktur sowie genetische Faktoren spielen eine große Rolle. Da im Frühstadium der OA eine erhöhte Zellproliferation und eine erhöhte Syntheserate an Matrixproteinen wie Proteinasen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren beobachtet wird, konzentriert sich die aktuelle Forschung

auf den Chondrozyten als zellulären Mediator der Pathogenese der OA . Gestörte Zell-Matrix, Interaktionen wie z.B eine gestörte Integrinproduktion, spielen hierbei eine zentrale Rolle (Loeser 2000; Goldring und Goldring 2007).

Gesteigerte mechanische Belastung kann zunächst in einem Kompensationversuch der Chondrozyten münden, der mit einer gesteigerten Proteoglykansynthese einhergeht und dann dekompensiert. Es kommt hierbei zu einem Schwund der Matrixproteoglykane und zu Chondrozytenapoptosen. Als Folge kommt es zu Fibrillationen an der Oberfläche des Knorpels, die zu tiefen Fissuren werden können (Böcker et al. 2008).

Der Konsens von Experimenten, die die mechanische Belastbarkeit von Knorpelgewebe untersuchten, zeigt, dass durch statische Kompression ein Abbau an Proteoglykanen, eine Verletzung des Kollagennetzwerkes sowie eine verringerte Syntheserate an Matrixproteinen eingeleitet wird (Guilak et al. 2004). Als Antwort auf traumatische Belastung konnte außerdem eine aktivierte Genexpression mit einer resultierenden Erhöhung an Entzündungsmediatoren und Proteasen festgestellt werden (Kurz et al. 2005). Es wurde gezeiget, dass Chondrozyten Rezeptoren besitzen, die auf mechanische Stimulation reagieren (Goldring und Goldring 2007). Viele dieser Rezeptoren reagieren ebenfalls auf Komponenten der EZM, wie z.B. einige Integrine, die als Rezeptoren für Fibronektin und Kollagen-Typ-II-Fragmente dienen (Abbildung 2).



Abbildung 2: Schematische Darstellung der Pathogenese der Osteoarthrose

Durch mechanische Belastung aktiviert, geben die normalerweise untätigen Chondrozyten und die Zellen der Synovia Signalmoleküle ab, die die Produktion von Zytokinen, Chemokinen, Entzündungsmediatoren und Proteasen anregen. Es kommt zu einem Abbau der EZM. Die dadurch entstehenden Produkte führen ebenfalls zu einer vermehrten Aktivierung von Signalmolekülen. Auch anabole Faktoren wie *Bone-Morphogenetic-Protein-2* und TGF-ß werden stärker exprimiert und führen z.B. zu einer Bildung von Osteophyten. Zusätzlich zum Verlust an EZM kommt es zur Proliferation und Hypertrophie der Chondrozyten, zu einer Kalzifizierung der Tidemark sowie zu einer Angiogenese aus Gefäßen des subchondralen Knochens. (Abbildung aus Goldring und Goldring 2007, Seite 629)

Werden diese Rezeptoren aktiviert, stimulieren sie die Produktion von Chemokinen und Zytokinen und schließlich Proteasen, die zu einem Abbau der EZM führen (Millward-Sadler und Salter 2004; Pulai et al. 2005). So konnte z.B. ein Abbau der EZM durch erhöhte Produktion an Matrixmetalloproteinasen wie MMP-1, MMP-3, MMP-8 und MMP-13, und an Aggrekanasen im osteoarthrotisch veränderten Knorpel nachgewiesen werden (Cawston und Wilson 2006). Ist das Knorpelgewebe durch Proteasen und andere Substanzen schwer beschädigt, ist es für die Chondrozyten unmöglich, das geschädigte Gewebe zu regenerieren (Goldring und Goldring 2007). Die Synovialitis ist ein weiterer Faktor, der zur Pathogenese der OA beiträgt. Durch verschiedene Entzündungsmediatoren kommt es hierbei zu einem Ungleichgewicht zwischen

katabolen und anabolen Aktivitäten der Chondrozyten und dadurch bedingt zu einer Umstrukturierung der EZM (Loeser 2006).

1.1.6 Therapie der Osteoarthrose

Beschädigter hyaliner Gelenkknorpel gilt bis heute als nicht regenerationsfähig, deshalb steht bis heute keine spezifische konservative Therapieform zur Therapie der OA zur Verfügung. Die Therapie beschränkt sich meist auf eine rein symptomatische Behandlung. Indikationsbedingt können präventiv chirurgische Eingriffe wie Umstellungs-Osteotomien durchgeführt werden. Im späten Stadium der Arthrose werden häufig Gelenkersatzoperationen durchgeführt. Diese stellen eine weit verbreitete und erfolgreiche Therapieform dar, die die Funktionsfähigkeit des Gelenkes sowie die Schmerzfreiheit sichern soll. Diese Arthroplastiken haben jedoch eine beschränkte Lebensdauer und sind häufig mit Nebenwirkungen verbunden (Tenor et al. 2002; Lohmander und Roos 2007).

Unterschiedliche Methoden zur Reparation oder Regeneration werden unter dem Begriff "Tissue Engineering" zusammengefasst und sind Gegenstand intensiver Forschung (Schulze et al. 2000; Roberts et al. 2011). CPCs werden als vielversprechender Ansatzpunkt für eine zell-basierte Therapie der OA angesehen (Koelling und Miosge 2009).

1.2 Massenspektrometrie

Da für die vorliegende Arbeit die MS als Methode gewählt wurde, sollen die Grundlagen dieser Technik im folgenden Kapitel dargestellt werden.

Unter MS versteht man eine Analysetechnik, die der Bestimmung von Molekülmassen freier Ionen im Hochvakuum dient und zur Identifizieung von Peptiden bzw. Proteinen genutzt wird (Rehm und Letzel 2010). Die Technik wird häufig zur Erforschung eines Proteoms genutzt. Das bedeutet, dass die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus (unter definierten Bedingungen und zu einem definierten Zeitpunkt) erfasst wird. Das Proteom ist dynamisch und ändert sich aufgrund veränderter Bedingungen, wie z.B. Genexpression oder Umweltfaktoren, ständig in seiner qualitativen und quantitativen Proteinzusammensetzung (Hathout 2007). Statt des gesamten Proteoms können auch definierte Bestandteile, sogenannte "Sub-Proteome", gesondert erfasst werden. So beschreibt z.B. das Phosphoproteom die Gesamtheit der Phosphoproteine oder das Sekretom die Gesamtheit der sekretierten Proteine (Tjalsma et al. 2000). Außerdem gibt es Organellenproteome, die sich z.B. auf die Untersuchung des Proteingehaltes in Mitochondrien beziehen (Meisinger et al. 2008). Die Anwendung von Proteomanalysen in biomedizinischer und klinischer Forschung dient u.a. der Entdeckung von krankheitsspezifischen Biomarkern für Diagnostik und Monitoring, gibt Einblick in die Pathologie von verschiedenen Erkrankungen und kann zur Entwicklung neuer Behandlungsmittel führen (Chen E und Yates 2007).

1.2.1 Ablauf eines massenspektrometrischen Experiments

Kultivierte Zellen bestehen in der Regel aus einem einzigen klar definierbaren Zelltypen. Dadurch eignen sie sich besonders für Proteomanalysen mittels MS. Der Ablauf einer solchen Proteomanalyse ist in Abbildung 3 dargestellt.



Abbildung 3: Typischer Ablauf eines massenspektrometrischen Experiments zur Darstellung eines Zell-Proteoms

Unter jedem Pfeil werden verschiedene Möglichkeiten zur Durchführung massenspektrometrischer Experimente dargestellt. (Abbildung modifiziert aus Steen und Mann 2004, Seite 700)

Nach der Zellkultur wird zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Masse eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden angefärbt (z.B. durch Coomassie-Blau) und die Gelspur in der sich die Proteine befinden, wird in einzelne Gelstücke zerschnitten. Die Proteine werden im Gel mit Endoproteinasen zu Peptiden hydrolysiert (sogennanter In-Gel-Verdau) und die Peptide werden anschließend aus dem Gel mit organischem Lösungsmittel (z.B. Acetonitril) extrahiert. Damit nicht alle Peptide gleichzeitig im Massenspektrometer analysiert werden (was zu einem deutlichen Sensitivitätsverlust führen würde), werden die extrahierten Peptide über Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt. In der Regel geschieht dieses durch Umkehrphasen (*reversed phase*) High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC). Die Peptide werden dabei mit steigendem Gehalt an organischem Lösungsmittel (z.B. Acetonitril) von der Chromatographiesäule eluiert; die Elution erfolgt dabei entsprechend der Hydrophobizität der Peptide. Hydrophile Peptide lösen sich bei niedrigen Konzentrationen an organischem Lösungsmittel, hydrophobere Peptide bei höheren Konzentrationen an organischem Lösungsmittel. Anschließend werden die Peptide z.B. mit Elektrosprayionisation (ESI) oder mit Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization (MALDI) ionisiert, um dann im Massenanalysator ihr charakteristisches m/z -Verhältnis zu bestimmen und fragmentiert zu werden (1.2.3.2). Die gewonnenen Daten werden mit den in Datenbanken vorliegenden Proteinsequenzen unter Verwendung einer sog. "Suchmaschinen-Software" verglichen. Die Suchmaschine (z.B. Mascot von Matrix-Science) vergleicht dabei die experimentell bestimmten Massen der Peptide mit allen berechneten Massen der entsprechenden Peptide von Proteinen in einer Datenbank (Perkins et al. 1999). Bei einer genügenden Übereinstimmung von experimentellen Peptidmassen mit den berechneten Peptidmassen ist das entsprechende Protein identifiziert (Steen und Mann 2004).

1.2.2 Aufbau und Funktion eines Massenspektrometers

Ein Massenspektrometer besteht im Wesentlichen aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor (Abbildung 4).



Abbildung 4: Wesentliche Bestandteile eines Massenspektrometers

Die Ionenquelle dient der Erzeugung von Ionen aus der Probensubstanz. Im Messanalysator werden die Ionen nach m/z aufgetrennt. Der Detektor liefert ein Massenspektrum, aus dem die Masse/Ladungszahl bestimmt werden kann (Rehm und Letzel 2010).

Als Ionisierungsmethoden werden häufig die ESI, die MALDI, die Chemische Ionisation (CI) und die Elektroanstoß-Ionisation (EI) angewendet (Rehm und Letzel 2010). In der vorliegenden

Arbeit wurde die ESI eingesetzt. 2002 erhielt John Fenn den Nobelpreis für die Entwicklung dieser Technik (Fenn et al. 1989). Der Begriff "Elektrospray" beschreibt die Dispersion geladener Teilchen aus einer Flüssigkeit in einem elektrostatischen Feld. Die Analytsubstanz wird in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst. Die Lösung wird aus einer Kapillare mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit hinausgesprüht (Abbildung 5).



Abbildung 5: Schematischer Aufbau einer ESI-Quelle

(Abbildung modifiziert aus Schmelzer 2007, Seite 5)

Da eine Potentialdifferenz von ca. 2-5 kV zwischen der Spitze der LC-Kapillare und einer Stahlplatte am Eingang des Massenspektrometers besteht, kommt es zu einer Ladungstrennung. Positive Ionen werden an die Flüssigkeitsoberfläche gezogen, negative Ionen in die entgegengesetzte Richtung gedrängt. Die akkumulierten, positiven Ionen werden weiter Richtung Kathode gezogen, so dass sich schließlich ein sog. Taylor-Konus bildet (Taylor G, 1964). Dieser Taylor-Konus emittiert von seiner Spitze einen kontinuierlichen, feinsten Flüssigkeitsstrom von wenigen Mikrometern Durchmesser (Mann und Wilm 1994). Der Flüssigkeitsstrom ist nicht stabil, er zerfällt nach kurzer Zeit in viele winzige kleine Tröpfchen. Diese Tröpfchen bewegen sich aufgrund der Coulomb-Abstoßung auseinander und bilden so das sog. Elektrospray (Rehm und Letzel 2010). Die Tröpfchen schrumpfen durch die Verdampfung des Lösungsmittels, bis das sog. Rayleigh-Limit erreicht wird. Zunächst wurde angenommen, dass die Tröpfchen bei Überschreitung der Rayleigh-Grenze in einer Reihe von Coulomb-Explosionen in immer kleinere Tröpfchen zerfallen. Neuere Arbeiten konnten zeigen, dass Mikrotröpfchen nicht explodieren. Dieses ist darauf zurückzuführen, dass die Tröpfchen keine perfekte sphärische Form aufweisen, sondern aufgrund einer Tayler-Konus-ähnlichen Verformung von einem verlängerten Ende aus

eine Serie sehr viel kleinerer Mikrotröpfchen emittieren (Gomez und Tang 1994). Es gibt zwei Theorien zum Prozess der Bildung gasförmiger Ionen durch ESI. Das Charged-Residue Modell (CRM) beruht auf der Theorie, dass bei einer Kaskade von Coulomb-Explosionen Mikrotröpfchen entstehen, die nur noch ein einzelnes Analytmolekül enthalten (Clegg und Dole 1971). Das neuere Modell, das als Ion Evaporation Model (IEM) bezeichnet wird, geht davon aus, dass die Bildung desolvatisierter Ionen als direkte Ionenemission von der Oberfläche hochgeladener Tröpfchen, die noch viele Analytmoleküle enthalten, ausgeht (Iribarne 1976; Wang und Cole 2000).

Häufig verwendete Massenanalysatoren sind z.B. Flugzeitanalysatoren (*time-of-flight*, ToF), Quadrupole, elektrische Ionenfallen (*ion traps*) und elektromagnetische Ionenfallen (*ion cyclotron resonance*). Außerdem werden Kombinationen aus verschiedenen Analysatoren eingesetzt, z.B. Quadrupole und Flugzeitanalysatoren oder Quadrupole und lineare Ionenfallen (Rehm und Letzel 2010). Für die Messungen der vorliegenden Studie wurde ein weiterer Analysator verwendet. Dabei handelte es sich um einen sog. Orbitrap-Massenanalysator, der sich in einem Lineare-Ionenfallen-Orbitrap-Hybridmassenspektrometer befindet. Er besteht aus einer äußeren, fassähnlichen Elektrode und einer inneren, spindelähnlichen Elektrode, die zusammen ein elektrostatisches Feld bilden (Scigelova und Makarov 2006). Bei dieser Methode werden die Ionen tangential in die Orbitrap injiziert und anschließend im elektrostatischen Feld festgehalten. Durch die initiale tangentiale Geschwindigkeit der Ionen wird eine zentrifugale Kraft ausgelöst, die die elektrostatische Anziehung der zentralen Elektrode kompensiert. Das elektrostatische Feld, dem die Ionen innerhalb der Orbitrap ausgesetzt sind, löst dadurch eine komplexe spiralförmige Bewegung aus. Diese Bewegung gleicht einem Satelliten auf einer Kreisbahn (*orbit*) (Abbildung 6).



Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Orbitrapmassenanalysators

(Modifiziert aus <u>http://www.textronica.com/images/powered_by_orbitrap_technology.jpg</u>, aufgerufen am 23.06.2011)

Die Ionen kreisen aber nicht nur um die zentrale Elektrode, zusätzlich bewegen sie sich auch auf der Achse der Zentralelektrode hin und her. Die axiale Komponente dieser harmonischen oszillierenden Schwingung ist unabhängig von der initialen Energie, den Winkeln und Positionen der Ionen und umgekehrt proportional zu der Quadratwurzel des *m/z*-Verhältnisses. Dabei ist der Orbitrap-Analysator gleichzeitig Analysator und Detektor (Scigelova und Makarov 2006).

1.2.3 Identifikation von Peptiden und Proteinen

1.2.3.1 Peptide Mass Fingerprinting

Das Peptide Mass Fingerprinting (PMF) stellt die Grundlage der Proteinidentifizierung dar. Proteine werden mit einer spezifischen Protease (z.B. Trypsin) in Peptide gespalten, die anschließend massenspektrometrisch gemessen werden können (Henzel et al. 2003). Das *m/z*-Spektrum der Peptide wird dabei in eine sogenannte "Peakliste" überführt und zur Identifikation an eine Datenbanksuchmaschine gesendet. Diese greift auf Proteinsequenzdatenbanken zurück und errechnet unter Berücksichtung der Spaltregeln der spezifischen Protease die theoretisch entstehenden Peptide des virtuellen Verdaus aller Proteine. Trypsin spaltet z.B. N-terminal nach Lysinen (K) und Argininen (R). Endoproteinase V8 spaltet nach Glutamat (B) und Aspartat (D). Anschließend wird die experimentell erhaltene Massenliste mit einer errechneten Massenliste abgeglichen. Die Ergebnisse werden statistisch ausgewertet und Übereinstimmungen als Identifikationen ausgegeben. Je nach Massengenauigkeit können Proteine bereits anhand weniger Peptidmassen (drei bis zehn) signifikant identifiziert werden (Pappin et al. 1993; Schmelzer 2007).

1.2.3.2 Fragmentierung von Peptiden im Massenspektrometer

Mit der PMF-Technik kann man nur den *m/z*-Wert der Peptide bestimmen, erhält aber keinerlei Struktur- oder Sequenzinformation über das Peptid. Die Weiterentwicklung dieser Technik führte deshalb zu einer weiteren Sequenzierung der Peptide mittels Tandem-MS (MS/MS). Diese Technik macht es möglich aus Fragmentspektren die Aminosäuresequenzen von Peptiden zu rekonstruieren. Kennt man diese Sequenz, kann man z.B. zwei Peptide mit demselben Massengewicht unterscheiden (Marcotte 2007). Der entscheidende Unterschied von PMF zu MS/MS ist, dass bei letzterem im Massenspektrometer ein einzelnes Peptid physikalisch (durch Ionenfilter z.B. sog. Quadrupole) von allen Peptiden abgetrennt werden kann. Das isolierte Peptid

wird in einer Kollisionskammer, z.B. durch den Aufprall auf Argonatome, fragmentiert. Dieser Vorgang wird als *Collision Induced Dissociation* (CID) bezeichnet (Hunt et al. 1980). Dabei bilden sich Produkte der N-terminalen (x,y,z) und C-terminalen (a,b,c) Serie (Abbildung 7).



Abbildung 7: Sequenzierung von Peptiden

a) Peptide werden fragmentiert und können an verschiedenen Bindungen brechen

b) b- und y- Serie entstehen durch den Bruch der Bindungen. Bricht das Fragment NQWFFSK z.B. zwischen W und F entsteht das b3-Ion NQW (Massengewicht 429,19) und das y4-Ion FFSK (Massengewicht 528,28).

c) Es resultiert eine Leiter aus den verschiedenen Fragment-Massengewichten, die mit dem Massenspektrometer ermittelt wird.

d)Das experimentelle Spektrum wird einem theoretischen Spektrum einer Datenbank zugeordnet. (Abbildung aus Marcotte 2007, Seite 756)

Der Massenunterschied zwischen den einzelnen Produktionen der y- und b-Serien entspricht dem der einzelnen Aminosäuren. So kann aus der Masse der im Spektrum sichtbaren Produktionen die N-terminale (b-Serie) oder C-terminale (y-Serie) Aminosäuresequenz bestimmt werden (Roepstorff und Fohlman 1984). Gemäß der oben beschriebenen Datenbank des PMF, wird eine computer-gestütze Datenbanksuche der MS/MS-Daten durchgeführt. Der Unterschied ist jedoch,

dass hier nur die accurate Masse der ausgewählten Peptide und die Masse der Produktionen herangezogen werden. Diese Sequenzierungsart wird als *de-novo*-Sequenzierung bezeichnet und ist theoretisch unabhängig von Proteindatenbanken. Es können deshalb auch Sequenzen von Peptiden unbekannter Proteine ermittelt werden (Steen und Mann 2004). Die gezielte Fragmentierung der Analytlösung wird im Tandem-Massenspektrometer ermöglicht. Die Massenanalyse erfolgt hierbei in zwei Stufen. Bei der MS/MS werden mehrere Analysatoren gekoppelt (Rehm und Letzel 2010; Walther und Mann 2010).

Das Prinzip der datenbankgestützten Sequenzierung unterscheidet sich von der *de-novo*-Sequenzierung dadurch, dass für ein bestimmtes Peptid nur jene Kombinationen in Betracht gezogen werden, die Bestandteil einer Sequenzdatenbank sind. Auf diese Weise genügen wenige Fragmente eines Peptids um es zu identifizieren. Bei diesem Verfahren werden mittels geeigneter Algorithmen, Informationen der Fragmentspektren, mit Peptiden aus Genom- oder Proteindatenbanken abgeglichen. Der Internationale Protein Index (IPI) ist ein Beispiel für eine zuverlässige und häufig genutzte Datenbank, die nicht nur die Sequenzdaten von Proteinen, sondern auch von cDNA-Sequenzen und genomische Daten enthält (Steen und Mann 2004; Schmelzer 2007). Mit entsprechender Software können Übereinstimmungen statistisch bewertet werden und erlauben die Identifizierung des jeweiligen Peptids und des entsprechenden Proteins mit einer genau definierten Wahrscheinlichkeit. Eine häufig verwendete Software ist Mascot (Perkins et al. 1999). Die Interpretation der gewonnenen Daten ist komplex und nicht immer eindeutig. Es konnte gezeigt werden, dass in einem typischen MS/MS-Experiment mehr als 30% der Proteine anhand einer einzigen Peptidsequenz identifiziert werden (Nesvizhskii und Aebersold 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die MS eine Technik ist, die über die Jahre immer sensitiver geworden ist. Zunächst konnten Proteine aus dem Massengewicht mehrerer Peptide errechnet werden. Die Sequenzierung dieser Peptide führte dazu, dass weniger Peptide nötig sind um ein Protein zu identifizieren. Durch die Datenbankgestützte Sequenzierung reichen heute Fragmente einer einzigen Peptidsequenz zur Identifizierung von Proteinen.

1.2.4 Quantifizierung von Peptiden und Proteinen

Mittels Massenspektrometrie können Proteine nicht nur identifiziert, sonden auch relativ und absolut quantifiziert werden. Bei der relativen Quantifizierung wird das Verhältnis eines Proteins in zwei unterschiedlichen Proben gemessen. Hierfür eignen sich z.B. die Methoden Stable

Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC)(Ong et al. 2002); Isotopen-codierte Affinitätstags (ICAT) (Gygi et al. 1999); isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) (Ross et al. 2004) oder DiMethyl Labeling (Boersema et al. 2009). Die Isotopenmarkierung mit Reagenzien wird als chemische Markierung bezeichnet. Bei der SILAC-Methode werden die zu untersuchenden Zellen in einem speziellen Nährmedium kultiviert, das essentielle Aminosäuren (z.B. Arginin oder Lysin) mit definierten Massen enthält (sog. metabolische Markierung). In diesen Aminosäuren liegen eine definierte Anzahl von stabilen Kohlenstoff- bzw. Stickstoffisotopen vor. Die stabilen Isotope eines Elements haben verschiedene Massenzahlen, verhalten sich aber chemisch identisch. Es gibt z.B. das stabile Isotop Kohlenstoff-12 (¹²C) (Atommasse 12 aus 6 Protonen und 6 Neutronen) und das stabile Isotop Kohlenstoff-13 (¹³C) (Atommasse 13 aus 6 Protonen und 7 Netronen). Die ¹²C-Isotope liegen in der Natur zu 98,9% vor. Stabile Isotope ¹³C (1,1%) und Stickstoff-15 (¹⁵N) (0,36%) können deshalb z.B. zur metabolischen Markierung von Proteinen genutzt werden. So ist ein mit ¹³C markiertes Lysin um 6 a.m.u schwerer als das ¹²C enthaltende Lysin und ein mit ¹³C und ¹⁵N markiertes Arginin um 10 a.m.u. schwerer, als Lysin bzw. Arginin welches ¹²C-Atome enthält. Für Lysin steht noch die Markierung mit vier Deuterium (²H) Atomen (sog. Lsyin+4) und mit 6 ¹³C und 2 ¹⁵N-Atomn zur Verfügung (sog. Lysin+8) (Abbildung 8). Arginin kann ebenfalls nur mit ¹³C markiert werden (sog. Arginin+6). Diese Massenunterschiede können mittels Massenspektrometer gemessen werden und so im Sinne der SILAC-Methode für die metabolische Markierung von Proteinen genutzt werden (Ong et al. 2002; Walther und Mann 2010).



Abbildung 8: SILAC-Aminosäuren Arginin+10 und Lysin+8

Durch den gezielten Einbau von ¹³C-Atomen (rote Sternchen) und ¹⁵N-Atomen (grüne Kästchen) wird ein Massenzuwachs von 10 a.m.u. bzw. 8 a.m.u generiert.

Zur relativen Quantifizierung biologischer Proben wird also eine Zellkultur mit Medium mit "leichtem" Arginin und Lysin (¹²C und ¹⁴N) und eine andere Kultur in Medium mit "schwerem" Arginin und Lysin (z.B. Lysin+4 oder Lysin+8; Arginin+6 oder Arginin+10) kultiviert (Abbildung 9). Nach mindestens fünf Zellteilungen enthalten nahezu alle Proteine der Zellen



Abbildung 9: Schematische Darstellung eines SILAC-Experiments zur relativen Quantifizierung von Proteinen aus Zellen in Zellkultur mittels MS

(Abbildung aus Ong und Mann 2007, Seite 2651)

einer Kultur "leichtes" bzw. "schweres" Arginin und/oder Lysin. Für die Quantifizierung werden die Proteine der verschiedenen Kulturen dann im Verhältnis 1:1 gemischt. Das gleiche tryptische Peptid aus den unterschiedlichen Zellkulturen zeigt durch die stabilen mit Isotopen markierten Arginine oder Lysine einen definierten Massenunterschied. Anhand der Intensität dieser unterschiedlichen Massenpeaks des gleichen Peptids kann nun eine relative Quantifizierung stattfinden, indem die Intensität des Peptids im schweren Zustand ins Verhältnis mit der Intensität des leichten Zustandes gesetzt wird. Zur genauen Auswertung solcher quantitativen Daten stehen verschiedene Computerprogramme zur Verfügung, z.B MSQuant oder MaxQuant (Ong und Mann 2007; Cox et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass in einem typischen massenspektrometrischen Experiment nicht der gesamte Proteingehalt einer biologischen Probe identifiziert werden kann. Da für die Quantifizierung nur Peptide mit einem intensiven Signal

herangezogen werden, wird mitunter nur eine Fraktion der identifizierten Proteine einer Probe quantifiziert (Bantscheff et al. 2007) (Abbildung 10).



Abbildung 10: Proteinidentifikationen und Quantifizierungen in biologischen Proben

Blau: Gesamtproteingehalt der Probe Rot: Proteinidentifikationen Gelb: Quantifizierte Proteine (Abbildung aus Bantscheff et al. 2007; Seite 1018)

1.2.5 Bioinformatische Auswertung von MS-Daten

Für die Auswertung der gewonnenen MS-Daten stehen verschiedene Datenbanken wie UniProt (Universal Protein Database), DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) oder Swiss-Prot zur Verfügung.

UniProt ist die umfangreichste bioinformatische Datenbank für Proteine. Sie enthält Information über die Funktion und Struktur von Proteinen und gibt Literaturhinweise für die weitere Recherche. UniProt wird von einem Konsortium herausgegeben, das sich aus dem European Bioinformatics Institute, dem Swiss Institute of Bioinformatics und der Protein Information Resource zusammensetzt (The UniProt Consortium, 2007).

DAVID wird vom amerikanischen Laboratory of Immunopathogenesis and Bioinformatics herausgegeben und besteht aus einer integrierten biologischen Wissensbank (*Knowledgebase*) und weiteren analytischen Werkzeugen, mit dem Ziel, aus großen Gen- oder Proteinlisten, systematische Informationen zu gewinnen (Huang et al. 2009).

1.2.6 Proteomik in der Knorpel- und Osteoarthroseforschung

Es gibt zahlreiche Proteomik-basierte Publikationen zum Thema Knorpelpathophysiologie und OA. Diese sind im Übersichtsartikel von Wilson et al. zusammengefasst (Wilson et al. 2009). Nur wenige Studien widmen sich der Analyse des Sekretoms von Knorpeltransplantaten oder kultivierten Chondrozyten. Bereits 2004 untersuchten Hermansson et al. das Sekretom von gesunden und osteoarthrotisch veränderten, radioaktiv markierten (³⁵S), artikulären Chondrozyten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und Massenspektrometrie. Die Arbeitsgruppe konnte 19 radioaktiv markierte Proteine identifizieren. Bei dem Vergleich von gesundem und erkranktem Gewebe ergab sich eine stark erhöhte Synthese an Kollagen Typ I im osteoarthrotisch veränderten Gewebe (Hermansson et al. 2004). 2010 wurde eine Untersuchung des Sekretoms, sowohl von kultivierten Chondrozyten als auch von Knorpeltransplantaten, veröffentlicht (Polacek et al. 2010). Das Ziel dieser Studie war es, die Profile sekretierter Proteine von Knorpeltransplantaten und Chondrozyten mittels LC/MS-MS qualitativ zu vergleichen. Dabei wurde die SILAC-Methode genutzt, um zwischen sekretierten Proteine im Sekretom gesunder Chondrozyten ermittelt werden.

1.3 Fragestellung

Es gibt Hinweise, dass chondrogene Progenitorzellen (CPCs) in Zukunft genutzt werden könnten, um defektes Knorpelgewebe, das im Rahmen einer OA entstanden ist, im Sinne einer zellbasierten Therapie zu regenerieren (Koelling und Miosge 2009). Knorpelgewebe zeichnet sich im Allgemeinen durch eine extensive EZM aus, in der sich zahlreiche Proteine, die für den Metabolismus der Zelle verantwortlich sind, organisieren. Diese Proteine spielen sowohl bei der Pathogenese der OA (Goldring und Goldring 2007), als auch bei der Entfaltung des chondrogenen Potentials von CPCs, eine zentrale Rolle (Koelling und Miosge 2009). Die Identifikation dieser Bestandteile im Sekretom von CPCs war deshalb von großem Interesse. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die identifizierten Proteine einen Anhaltspunkt geben, dass CPCs eine EZM produzieren können, die gesundem Knorpelgewebe ähnelt. Auch die Identifikation von potentiellen Biomarkern, Signalproteinen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen war von großem Interesse. In diesem Zusammenhang könnten sich u.a. Hinweise auf Faktoren ergeben, die das chondrogene Potential von CPCs verstärken. Auch gestörte Zell-Matrix-Interaktionen spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung der OA (Goldring und Goldring 2007). Die Identifikation von Rezeptoren und Molekülen, die mit dieser Interaktion in einem Zusammenhang stehen, könnten zum Verständnis des Pathomechanismus beitragen. Durch die Umstrukturierung der EZM im Rahmen einer OA kommt es zur Degradierung des Kollagen-Proteoglykan-Netzwerkes (Heinegard und Saxne 2011). Der Vergleich dieser Strukturen und weiterer Proteine im Sekretom von CPCs und gesunden Chondrozyten, wird durch die qualitative MS-Untersuchung ermöglicht und könnte zu einem Verständnis des Gewebemetabolismus dieser Zellen beitragen.

Werden CPCs statt in Monolayer (2D-CPCs) in Alginat kultiviert (3D-CPCs), erhöht sich ihr chondrogenes Potential (Koelling et al. 2009). Es stellte sich deshalb die Frage, ob der quantitative Vergleich der Proteine der Sekretome von undifferenzierten 2D-CPCs und differenzierten 3D-CPCs zu einem verbesserten Verständnis des Prozesses der Differenzierung von CPCs in Alginatkultur beitragen kann. Besonderes Interesse galt hierbei der Identifikation von Proteinen, die durch Zellwachstum in der Alginatkultur stärker oder schwächer exprimiert wurden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war also zum einen die qualitative Analyse des Sekretoms chondrogener Progenitorzellen und zum anderen der quantitive Vergleich von 2D- und 3D-CPCs mittels metabolischer Markierung. Da eine solche Untersuchung bisher nicht durchgeführt worden war, musste zunächst eine Methode entwickelt werden, um das Medium, in dem die CPCs kultiviert wurden, für die massenspektrometrische Untersuchung vorzubereiten. Dafür musste das Volumen des Mediums reduziert und der zellspezifische Proteingehalt konzentriert werden. Weiterhin musste eine Strategie entwickelt werden, um nicht-zellspezifische Proteine z.B. aus fetalem Kälberserum (FKS) von den durch CPCs sekretierten Proteinen zu unterscheiden.

Progenitorzellen konnten nicht nur im osteoarthrotisch veränderten Knorpelgewebe, sondern auch in anderen Geweben, wie z.B. dem Ligament des Zahnhalteapparates, identifiziert werden (Docheva et al. 2010). Die erwarteten Ergebnisse dieser Arbeit sollten deshalb auch der methodischen Weiterentwicklung massenspektrometrischer Untersuchungsverfahren zur Untersuchung anderer Sekretome von Stamm- und Progenitorzellen dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Feinchemikalien und Enzyme

Aceton	Merck
Acetonitril (ACN), LiChrosolv	Merck
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich
Ameisensäure	Merck
CaCl ₂	Merck
Coomassie Brilliant Blau G-250	Serva
Dithiothreitol (DTT, Cleland`s Reagenz für	
Massenspektrometrie)	Calbiochem
Ethanol, LiChrosolv	Merck
H ₂ O, LiChrosolv	Merck
Iodacetamid	Sigma-Aldrich
Methanol, LiChrosolv	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (1,0mm x 10well)	Invitrogen
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen
NuPAGE LDS Sample buffer (4x)	Invitrogen
NuPAGE MOPS SDS Lauf-Puffer (20x)	Invitrogen
NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen
Natriumacetat	Merck
Precision Plus ProteinTM Standards	Bio-Rad
Trypsin sequencing grade	Roche
Trichloressigsäure 99%	Roth

Alle weiteren nicht explizit aufgeführten Standardchemikalien, organische Substanzen, sowie Lösungsmittel, wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Fluka (Schweiz) in dem Reinheitsgrad "pro analysi" (p.a.) bezogen. Wässrige Puffer wurden unter Verwendung von gefiltertem Wasser (Millipore Filteranlage, Billerica, USA) hergestellt und steril filtriert.

2.1.2 Geräte

Magnetrührer RCT basic	Janke&Kunkel
Massenspektrometer LTQ-Orbitrap XL Hybrid	Thermo Fisher Scientific GmbH
Milli-Q-Wasseraufbereitungsanlage	Millipore
pH-Meter	Mettler Toledo
Scanner	Epson
Sorvall Zentrifuge RC5B/Evolution	Kendro
Speed-Vac Konzentrator PD121	Thermo Fisher Scientific GmbH
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermomixer SPD 121	Thermo Fisher Scientific GmbH
Ultraschallgerät Sonorex	Bandelin Electronics
Vortex	Scientific Industries
XCell4SureLock [™] Midi-Cell-Elektrophoresegerät	Invitrogen
Zentrifuge Fresco 17	Heraeus

2.1.3 Probenmaterial

Das Probenmaterial wurde von der durch Prof. Dr. Nicolai Miosge geleiteten Arbeitsgruppe "Orale Biologie und Gewberegeneration" der Universitätsklinik Göttingen zur Verfügung gestellt.

Bei dem Probenmaterial handelte es sich um zwei verschiedene Medien. Ein Medium wurde von CPCs sekretiert, die in einer 2D-Kultur wuchsen, welcher "schwere" SILAC-Aminosäuren zugesetzt waren (Lysin+8 und Arginin+10). Ein weiteres Medium wurde von CPCs sekretiert, die in einer 3D-Zellkultur heranwuchsen (Aminosäuren mit ¹²C und ¹⁴N). Die Methode der Anzüchtung von CPCs erfolgte nach Koelling et al. (Koelling et al. 2009). Das Gewebe wurde von adulten Patienten im Rahmen einer Knietransplantation entnommen. Die Erlaubnis hierfür wurde von der Ethik-Kommission der Universität Göttingen gegeben. Die Patienten waren im späten Stadium an Gonarthrose erkrankt. Eine rheumatische Erkrankung konnte histologisch ausgeschlossen werden. Die Erkrankung wurde mit den Kriterien der "American College of Rheumatology Classification Criteria" (Altman et al. 1986) definiert. Das Gewebe wurde histopathologisch klassifiziert und konnte einer späten Gonarthrose zugeordnet werden (Pritzker et al. 2006). Die Gewebeproben wurden fixiert und in hydrophilem Granulat LR-Gold (London

Resin Company, Reading, UK) gebettet. Zunächst wurde eine Gewebekultur der Gewebeprobe durchgeführt. Nach zehn Tagen wurden die Zellen entfernt und in eine Monokultur mit Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) und 10% FKS überführt. Weiterhin wurden L-Glutamin, sowie Penicillin und Streptomycin zugegeben um die Zellen zu kultivieren.

Zusätzlich wurde eine weitere Kultur im Sinne der SILAC-Technologie mit den "schweren" Aminosäuren Arginin+10 und Lysin+8 angelegt. Nach 21 Tagen wurden die Zellen mit Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen und für 24 Stunden ohne FKS aber mit den SILAC-Aminosäuren Arginin+10 und Lysin+8 kultiviert. Die Kultur wurde dann zentrifugiert, der Überstand (das Medium) wurde gesammelt und bei -80°C gelagert (Probenmaterial 1).

Um zusätzlich eine gewebeähnliche Chondrozytenzüchtung zu erzielen, wurde das Alginatsystem als 3D-Kultursystem angewendet. Die 3D-Kultur wurde initiiert, als eine 70 %ige Konfluenz der Monokultur erreicht war (ohne SILAC-Aminosäuren). Um Alginatkugeln herzustellen, wurden die Zellen in einer 1,2 %igen sterilen niedrigviskösen Alginatlösung resuspendiert (De Ceuninck et al. 2004). Diese Alginatsuspension wurde mit Hilfe einer feinen Kanüle in CaCl₂–Lösung (102 mM) getropft. Die CaCl₂–Lösung wurde wieder abgesaugt, und die entstandenen Alginat-Kugeln wurden in DMEM-Medium mit 10% FKS für drei Tage kultiviert. Nach drei Tagen wurde ein Chondrodiff-Medium angesetzt, um die Alginatkugeln für 24 Tage zu kultivieren. Das Chondrodiff-Medium wurde alle vier Tage gewechselt. Die Alginat-Kugeln wurden dann zehn Minuten mit PBS gewaschen und anschließend für 24h ohne FKS kultiviert. Die Alginat-Kugeln wurden dann bei 1200 UpM zentrifugiert, der Überstand (das Medium) wurde gesammelt und bei -80°C gelagert (Probenmaterial 2).

2.2 Methoden

2.2.1 Biochemische Methoden

2.2.1.1 Ethanolpräzipitation

Damit möglichst große Mengen an Proteinen auf ein SDS-Gel auftragen werden konnten, war es notwendig, die Probensubstanz durch Ethanolfällung zu konzentrieren. Dabei wurde dem Probenmaterial 1/10 des Volumens des Probenmaterials an Natriumacetat (pH 5,3) und die dreifache Menge des Volumens des Probenmaterials an eiskaltem Ethanol (100%, -20°C), zugegeben. Das Gemisch wurde auf dem Vortex-Gerät vermischt und anschließend bei -20°C für zwei Stunden inkubiert. Nachdem die Probe für 30 Minuten bei 13000 UpM und 4°C
zentrifugiert wurde, wurde der Überstand entfernt und das Präzipitat mit 200 μ l Ethanol (80% v/v, -20°C) gewaschen. Dafür wurde die Substanz abermals für 30 Minuten bei 13000 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat anschließend im Vakuum getrocknet.

2.2.1.2 Trichloressigsäure-Aceton-Präzipitation

Um den Proteingehalt zu konzentrieren und zusätzlich die Probensubstanz von Albumin aus fetalem Kälberserum zu reinigen, eignet sich Trichloressigsäure (TCA) in Kombination mit Aceton. TCA bildet mit Albumin einen Komplex, der in organischen Substanzen wie Aceton löslich ist (Chen Y et al. 2005). Dem Probenvolumen wurde das vierfache Volumen an frisch zubereiteter 10% iger eiskalter TCA-Aceton-Lösung (w/v) zugegeben. Anschließend wurde das Gemisch auf dem Vortexgerät vermischt und für 2 Stunden bei -20°C inkubiert. Nach der Zentrifugation der Probe für 30 Minuten bei 13000 UpM und 4°C wurde der Überstand gesammelt (Überstand I) und das Präzipitat mit 1 ml eiskaltem Aceton (100%) gewaschen. Dafür wurde das Gemisch zunächst für 15 Minuten auf Eis inkubiert, um anschließend für 30 Minuten bei 13000 UpM und 4°C zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde abermals entfernt und verworfen und das Präzipitat anschließend im Vakuum getrocknet (Präzipitat I). Um die Effektivität dieser Methode zu testen, wurde dem Überstand I ebenfalls 1ml eiskaltes Aceton (100%) zugegeben. Das Gemisch wurde zunächst für 15 Minuten auf Eis inkubiert, um anschließend für 30 Minuten bei 13000 UpM und 4°C zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde entfernt und gesammelt (Überstand II), um das Präzipitat anschließend im Vakuum zu trocknen (Präzipitat II). Der Überstand II wurde ebenfalls im Vakuum getrocknet (Präzipitat III).

2.2.1.3 Denaturierende 1D-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die 1D-SDS-PAGE wurde das NuPAGE®-System der Firma Invitrogen entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet. Das Gel eignet sich für die Auftrennung von Proteinen mit einer Masse von 10 bis 260 kDa. Bevor die Proteinproben auf ein NuPAGE Novex Bis-Tris Midi Gel 4-12% aufgetragen werden konnten, mussten sie mit verschiedenen Pufferlösungen vorbereitet werden. Hierfür wurden 19,5 µl H₂O und 7,5 µl *NuPAGE-LDS Sample Buffer* sowie 3 µl *NuPAGE-Sample Reducing Agent* zugegeben. Durch den Natriumdodecylsulfat-haltigen *NuPAGE-LDS Sample Buffer* werden Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgelöst. Der *NuPAGE-*

Sample Reducing Agent enthält Dithiothreitol (DTT) und dient der Reduktion von Disulfidbrücken. Anschließend wurden die Proben mit dem Vortex-Gerät gemischt und für 10 Minuten bei 1050 UpM bei 70°C im Thermomixer inkubiert. Parallel wurde das XCell4 SureLockTM Midi-Cell-Elektrophoresegerät mit dem Lauf-Puffer vorbereitet. Es wurden 1000 ml *1x NuPAGE-SDS* Lauf-Puffer präpariert. Dafür wurden 950ml gefiltertes H₂O mit 50 ml *NuPAGE® SDS* Lauf-Puffer (20x) mit dem Magnetrührer gemischt. 200ml dieses Puffers wurden entnommen und mit 500 µl *NuPAGE Antioxidant* gemischt. In die innere Kammer des *XCell4 SureLockTM Midi-Cell-Elektrophoresegerätes wurde letztere* Flüssigkeit eingefüllt. Die äußere Kammer wurde mit dem reinen *NuPAGE-SDS* Lauf-Puffer befüllt. Die vorbereiteten Proben sowie 5 µl *Precision Plus Protein Standards Marker* wurden auf das Gel aufgetragen. Die Apparatur wurde bei 200 Volt und 160 mA gestartet und unter diesen Bedingungen für 50 Minuten laufen gelassen. Das Gel wurde anschließend mit Colloidal Coomassie G-250 bei Raumtemperatur über Nacht gefärbt (Neuhoff et al. 1988). Am nächsten Tag wurde das Gel für drei Stunden mit H₂0 gewaschen und anschließend mittels eines Gel-Scanners digitalisiert.

2.2.2 Massenspektrometrische Methoden

2.2.2.1 In-Gel-Hydrolyse von Proteinen

Die Protein-Spuren von Interesse wurden mit einem Gelschneider (Schmidt und Urlaub 2009) in 23 Banden zerschnitten. Die einzelnen Banden wurden anschließend mit einem sterilen Skalpell in ca. 1 mm² große Stücke zerteilt und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (0,5ml) gesammelt. Um Proteine nach denaturierender 1D-SDS-PAGE (2.2.1.4) massenspektrometrisch identifizieren zu können, müssen sie zuvor mit geeigneten Endoproteinasen im Gel hydrolysiert werden

zu können, müssen sie zuvor mit geeigneten Endoproteinasen im Gel hydrolysiert werden (Shevchenko et al. 2007). Bei dieser Methode ist es außerordentlich wichtig, dass alle Substanzen von äußerster Reinheit sind, um so eine Kontamination der Proben zu vermeiden. Um eine möglichst vollständige Hydrolyse zu gewährleisten, werden zunächst noch verbleibende Disulfidbrücken durch Inkubation mit DTT gespalten und die freien Thiol-Gruppen durch die Zugabe von Iodoacetamid zu Carbamidomethyl-Gruppen modifiziert. In einem ersten Schritt wurden die Gelstückchen 5 Minuten bei 26 °C mit 150 μ l H₂O (LiChrosolv) in einem Thermomixer bei 1050 UpM inkubiert. Die Gelstückchen werden zentrifugiert und der Flüssigkeitsüberstand verworfen. So können vorhandene Essigsäurerückstände von der Färbung des Gels entfernt werden. Anschließend wurden die Gelstückchen mit 150 μ l Acetonitril (ACN) 15 Minuten bei 26°C und 1050 UpM in einem Thermomixer inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Gelstückchen 5 Minuten im Vakuum getrocknet, und anschließend bei 56°C für 50 Minuten mit 100 µl DTT (10 mM in 100 mM NH₄HCO₃, pH 8.0) inkubiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Die Gelstückchen wurden abermals wie oben beschrieben mit Acetonitril dehydriert und anschließend 20 Minuten bei 26°C mit 100 µl Iodoacetamid (55 mM in 100 mM NH4HCO3, pH 8.0) im Dunkeln inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes folgte eine jeweils 15-minütige Inkubation mit 150 µl 100 mM Ammoniumbicarbonat (NH₄HCO₃) und additiv mit 150 µl ACN. Anschließend wurde der gesamte Überstand verworfen, und die Gelstückchen wurden im Vakuum getrocknet. Für die Hydrolyse mit Trypsin wurden die Gelstückchen für 30-45 Minuten auf Eis, mit einem minimalen Volumen an trypsinhaltigem Hydrolysepuffer (Gelstückchen durften gerade bedeckt sein), rehydriert.

	Trypsinhaltiger	Hydrolysepuffer
	Hydrolysepuffer	
Trypsin (12.5 ng/µl)	45 µl	-
NH ₄ HCO ₃ (100 mM, pH 8)	150 µl	195 µl
CaCl ₂ (5 mM)	15 µl	15 µl
H_2O	150 µl	150 μl
Total	360 µl	360 µl

War nach 15 Minuten die Flüssigkeit vollständig absorbiert, wurden abermals 5 μ l Hydrolysepuffer zugegeben. Im Anschluss wurden die Gelstückchen mit 10-15 μ l Hydrolysepuffer bedeckt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.2 Extraktion von Peptiden

Für die massenspektrometrische Untersuchung mussten die durch In-Gel-Hydrolyse generierten Peptide aus dem Gel eluiert werden. Dafür wurden die Gelstückchen zunächst mit 10-15 μ l H₂O und anschließend additiv mit 50 μ l Acetonitril inkubiert (je 15 Minuten bei 37 °C und 1050 UpM im Thermomixer). Der Überstand wurde abgenommen und gesammelt. Anschließend wurden die Gelstückchen 15 Minuten bei 37 °C und 1050 UpM mit 50 μ l 5% iger Ameisensäure (v/v) inkubiert, mit 50 μ l Acetonitril versetzt und erneut für 15 Minuten inkubiert (37°C, 1050 UpM). Die Überstände werden abgenommen, mit den vorherigen vereinigt, im Vakuum getrocknet (ca. 2 Stunden) und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Die Proben wurden vor der Messung mit 10 μ l einer Lösung aus 1% Ameisensäure und 5% ACN (v/v) gelöst und anschließend im Ultraschallbad für 3 Minuten beschallt. Anschließend wurden 8 μ l der Lösung entnommen und in ein Probenröhrchen pippetiert.

2.2.2.3 Flüssigkeitschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrischen Messungen, der durch In-Gel-Hydrolyse gewonnenen Peptide, wurde ein LTQ-Orbitrap-XL-Hybrid-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific GmbH) verwendet.



Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometers

(Modifiziert aus Scigelova und Makarov 2006, Seite 18)

Das LTQ-Orbitrap-XL besteht aus einer ESI-Quelle, einer Ionenfalle mit Detektor und einem gebogenen mit Stickstoff gefüllten Quadrupol (C-trap), zwischen Ionenfalle und Orbitrap-Massenanalysator. Dieser fängt die Ionen und "kühlt" sie durch Kollisionen bevor sie als Ionenpakete mit definierter Energie in die Orbitrap injiziert werden. Weiterhin enthält der LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer eine Hochenergiezelle für die stoßinduzierte Dissoziation (HCD-Zelle) für eine alternative Fragmentierungstechnik (Abbildung 11).

Peptide eluieren über Flüssigkeitschtomatographie (*Liquid-Chromatography*; LC) in das Gerät (1.2.1). Dafür wurden zwei verschiedene Puffer verwendet. Puffer A bestand aus H₂O und 1% (v/v) Ameisensäure. Puffer B bestand aus 95% (v/v) Acetonitril und 0,1% (v/v) Ameisensäure in H₂O. Jeder LC-Durchgang war 50 Minuten lang und folgender Gradient wurde verwendet: Minute 0-5: 0% Puffer B; Minute 6-38: 6-39% Puffer B; 39-44 Minute: 39-90% Puffer B; 45-50 Minute 90-0% Puffer B.

Im LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer werden massenspektrometrisch zuerst die *m/z*-Werte der Vorläufer-Ionen der Peptide (*Precursorions*) durch einen Übersichtsscan mit niedriger

Auflösung in dem Orbitrap-Massenanalysator bestimmt. Die Fragmentierung unter CID-Bedingungen (1.2.3.2) der ausgewählten Precursor-Massen und die Aufnahme der Produktionen (MS/MS-Spektren) erfolgte in der linearen Ionenfalle (LTQ), während parallel in dem Orbitrap-Analysator nochmals ein hochauflösendes MS1-Spektrum gemessen wurde. MS1-Spektren wurden mit einer Spannbreite von 350-1600 m/z durchgeführt. Pro Sekunde wurden fünf Vorläuferionen für das CID-Experiment in der LTQ ausgewählt, wenn die folgenden Kriterien erfüllt wurden: Ladungskonstante +2 oder höher und ein Signalintenstät von \geq 2000 Ionenedetektionen. Die normalisierte Kollisionsenergie bei der CID betrug 37,5 eV. Um Wiederholungen bei der Auswahl der Vorläuferionen zu vermeiden, wurde ein dynamisches Ausschlussverfahren verwendet. Der dynamische Ausschluss dauerte 60 Sekunden. Die massenspektrometrischen Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Ilian Atanassov und Uwe Pleßmann durchgeführt (Abteilung bioanalytische Massenspektrometrie unter Leitung von Prof. Dr. rer. nat. H. Urlaub; Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie Göttingen).

2.2.2.4 Datenauswertung

Die Rohdaten wurden durch die Software des Instrumentes generiert und anschließend auf den lokalen Computer transferiert. Hier wurden sie in das Quant-Modul der Software MaxQuant übertragen. Cox und Mann geben einen detaillierten Überblick über die Informatik des Programmes (Cox und Mann 2008). Zur Datenauswertung wurde Version 1.0.13.13 der MaxQuant-Software genutzt. Das Mascot Programm Version 2.3 wurde genutzt um fünf Peptide für die Fragmentierung auszuwählen. Die IPI-Human-Datenbank wurde für die Datenbanksuche ausgewählt. Ein detailliertes Protokoll für die Anwendung der MaxQuant-Software steht mit dem Protokoll "A practical guide to the MaxQuandt computational platform for SILAC-based quantitative proteomics" zur Verfügung (Cox et al. 2009). Die weitere Aufbereitung der Daten wurde mit Microsoft Excel 2007 und DAVID Bioinformatics Resources 6.7 durchgeführt. Zur Filterung von allgemeinen Kontaminanten (z.B. Keratine aus Luft, Haut oder Haar) wurde die MaxQuant-Datenbank verwendet. Zur gezielten Filterung von experiment-spezifischen Kontaminanten wurde eine von Bunkenborg et al. erstellte Datenbank (Bunkenborg et al. 2010) sowie eine experimentspezifische Datenbank verwendet (3.1.4).

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung einer Methode zur Untersuchung des Sekretoms chondrogener Progenitorzellen

Im Folgenden sollen die wichtigsten Schritte zur Entwicklung einer Metohode für die quantitative Untersuchung des Sekretoms von CPCs dargestellt werden. Dafür musste zunächst das Medium, in dem die CPCs kultiviert wurden, vorbereitet werden, um auf ein 1D-SDS-PAGE aufgetragen werden zu können. Anschließend erfolgten die In-Gel-Hydrolyse und die massenspektrometrische Untersuchung mittels LC-MS/MS.

Für die Untersuchung des Sekretoms von CPCs standen zwei verschiedene Medien zur Verfügung (Abbildung 13). Es handelte sich hierbei zum einen um CPCs, die in einer 2D-Kultur mit "schweren" Aminosäuren (Lysin+8 und Arginin+10) kultiviert wurden und zum anderen um CPCs, die in einer 3D-Alginat-Kultur kultiviert wurden, die "leichte" Aminosäuren enthielt (2.1.3).

Um CPCs zu kultivieren ist 10% FKS notwendig. Da bovines Serumalbumin (BSA) aus FKS, mit einer sehr hohen Abundanz vorliegt, kann es passieren, dass niedrig-abundante zellspezifisch sekretierte Proteine aus dem Medium im Massenspektrometer nicht erfasst werden können. Durch die selektive Entfernung von BSA, kann deshalb die Anzahl identifizierter Proteine und die Auflösung niedrig-abundanter Proteine signifikant erhöht werden (Chen Y et al. 2005). Es war deshalb sinnvoll, eine Möglichkeit zu finden, um die Probensubstanz von Proteinen aus FKS abzureichern.

Das Volumen an Probensubstanz, die auf ein 1D-SDS-NuPAGE (Invitrogen) aufgetragen werden kann, ist auf ca. 20 µl limitiert. Da das Medium einer Zellkultur in der Regel ein hohes Volumen mit einem geringen Proteingehalt aufweist, stellte sich also die Frage, ob das limitierte Volumen von 20 µl ausreicht, um eine ausreichende Anreicherung an Proteinen auf dem Elektrophoresegel zu erreichen oder ob es nötig war, die Proteine vorab aufzukonzentrieren. Die 1D-SDS-PAGE wurde ausgewählt, da es sich hierbei um ein etabliertes Verfahren handelt, das in der von Prof. Dr. rer. nat. Henning Urlaub geleiteten Arbeitsgruppe standardmäßig angewendet wird. Mit diesem Verfahren kann man eine für die MS-Analyse optimale Auftrennung an Proteinen nach dem Molekulargewicht erzielen (4.1).

Für die quantitative massenspektrometrische Untersuchung, mit metabolischer Markierung (SILAC) mussten beide Medien in einem Verhältnis von 1:1 auf eine 1D-SDS-PAGE-Spur aufgetragen werden. Es war also notwendig dieses Verhältnis möglichst genau zu definieren.

Für die quantitative massenspektrometrische Untersuchung von CPCs mit metabolischer Markierung, musste also das Volumen an Medium, bei gleichzeitiger Erhöhung des zellspezifischen, sekretierten Proteingehaltes, reduziert werden. Kontaminanten aus FKS sollten selektiv reduziert werden und für die relative Quantifizierung mit SILAC musste ein 1:1 Verhältnis von "schwerem" 2D-CPC-Medium und "leichtem" 3D-CPC-Medium definiert werden.

3.1.1 Präparation der Probensubstanz für die 1D-Gelelektrophorese

3.1.1.1 Gelelektrophoretische Untersuchung von 2D-CPC- und 3D-CPC-Medium mit 10% Kälberserum

Um zu untersuchen, ob FKS vor der 1D-SDS-PAGE aus dem CPC-Medium entfernt werden musste, wurde in einem ersten Vorversuch, 2D-CPC-Medium und 3D-CPC-Medium das 10% FKS enthielt, auf ein 1D-SDS-PAGE aufgetragen (Abbildung 12).



Abbildung 12: Auftrennung von Proteinen im 2D-CPC- und 3D-CPC-Medium und 10% FKS über 1D-SDS-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese wurde von I. Atanassov durchgeführt (Arbeitsgruppe bioanalytische Massenspektrometrie des Max-Planck-Institutes für biophysikalische Chemie Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Henning Urlaub)

Die Spuren 1 und 2 enthalten verschiedene Mengen an 2D-CPC-Medium und 10% FKS; die Spuren 3 und 4 enthalten verschiedene Mengen an 3D-CPC-Medium und 10% FKS. Die Proteine wurden mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

Mr: Molekulargewichtsmarker

Die Abbildung zeigt eine starke Färbung des Elektrophoresegels im Bereich um 67 kDa. Die Färbung weist auf eine starke Kontamination durch BSA hin. Da der hohe Anteil an Proteinen aus FKS (insbesondere BSA), andere zellspezifisch sekretierte Proteine maskiert, musste ein Methode gefunden werden, um BSA abzureichern.

Nach Angaben der Arbeitsgruppe Orale Biologie und Geweberegeneration der Universitätsklinik Göttingen (Leiter: Prof. Dr. med. Nicolai Miosge), können CPCs für 24 Stunden ohne FKS kultiviert werden, bevor sie anfangen zu degenerieren. Zur Analyse des Sekretoms wurde deshalb Medium zur Verfügung gestellt, das nach einer gründlichen Waschung der CPCs für 24 Stunden ohne FKS kultiviert wurde (Abbildung 13).



Abbildung 13: Kultivierung von CPCs in 2D-Kultur und CPCs in 3D-Alginatkultur in verschiedenen Medien (2D "schweres Medium"; 3D "leichtes Medium")

Durch diese Maßnahme wurde zwar der Anteil an BSA extrem verringert, es konnten dadurch aber nur diejenigen Proteine im Sekretom von CPCs identifiziert werden, die innerhalb von 24h nach der Waschung sekretiert wurden.

3.1.1.2 Aufkonzentration der Probensubstanz

Neben der oben beschriebenen Vorgehensweise BSA in der Probe zu verringern, ist eine andere Notwendigkeit, die sekretierten Proteine aufzukonzentrieren. Das Volumen an Probensubstanz, das auf ein SDS-PAGE-Elektrophoresegel (Invitrogen) aufgetragen werden kann, ist auf 20 µl limitiert. Eine Aufkonzentration kann durch Präzipitation der Proteine erfolgen. Dazu wurde eine EtOH-Präzipitation (2.2.1.1) durchgeführt. Abbildung 14 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung von verschiedenen Mengen an 2D-CPC-Medium und 3D-CPC-Medium (ohne FKS). Es wurde dabei unpräzipitiertes Medium (mit sekretierten Proteinen) mit, durch Ethanol präzipitiertem Medium (mit sekretierten Proteinen), verglichen.



Abbildung 14: Coomassie-gefärbtes 1D-SDS-Gel: Gelelektrophoretische Auftrennung von unpräzipitiertem und mit Ethanol präzipitiertem 2D-CPC-Medium und 3D-CPC-Medium (beide ohne FKS mit sekretierten Proteinen)

Auf den Spuren 1 bis 6 sind verschiedene Volumina an unpräzipitiertem 2D-CPC-Medium und 3D-CPC-Medium aufgetragen. Auf den Spuren 7 und 8 sind je 40 µl an 2D-CPC-Medium und 3D-CPC-Medium, das mit Ethanol präzipitiert wurde, aufgetragen. Mr: Molekulargewichtsmarker

Wit. Wolekulargewichtsmarker

Es zeigte sich, dass CPC-Medium mittels Ethanolpräzipitation aufkonzentriert werden kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass trotz der Kultivierung von CPCs für 24h ohne FKS, Rückstände von FKS im Medium verblieben. Hierbei war im 3D-CPC-Medium mehr BSA aus FKS zu erkennen als im 2D-CPC-Medium (Spuren 2, 4, 6 und 8 im Bereich um 67kDa).

Für das 2D-Medium zeigt sich, dass ohne eine vorherige Konzentration der Substanz, nur eine geringe Menge an Protein auf das Gel aufgetragen werden konnte (Spuren 1, 3 und 5). Wird das 3D-Medium ohne vorherige Konzentration auf das Gel aufgetragen, zeigt sich eine gleichmäßig verteilte Färbung, die auf einen für die massenspektrometrische Untersuchung gut geeigneten Proteingehalt auf dem Gel sowohl bei 13 µl als auch bei 19,5 µl (Spuren 4 und 6) hinweist. Die starke Färbung auf Spur 8 zeigt, dass in 40 µl 3D-Medium zwar viel Protein enthalten ist, aber Salze oder Alginatrückstände dazu führen, dass die Spur verschmiert. Es zeigten sich dadurch keine klaren Banden, so dass 40 µl 3D-CPC-Medium, als das maximale Volumen für die 1D-

SDS-PAGE angesehen werden können. Als nächstes musste mittels 1D-SDS-PAGE herausgefunden werden, bei welchem Volumen an präzipitiertem 2D-CPC-Medium eine gleichmäßige Anreicherung und Auftrennung der Proteine erzielt werden konnten. Abbildung 15 zeigt verschiedene Mengen an 2D-CPC-Medium, das mit EtOH-Präzipitation aufkonzentriert und elektrophoretisch analysiert wurde.



Abbildung 15: Coomassie-gefärbtes 1D-SDS-Gel: Verschiedene Volumina an 2D-CPC-Medium, das mit EtOH präzipitiert wurde

Auf den Spuren 1 bis 5 sind Volumina von 40 µl bis 120 µl 2D-CPC-Medium ohne FKS mit sekretierten Proteinen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Medium wurde zuvor mit EtoH-Präzipitation aufkonzentriert. Mr: Molekulargewichtsmarker (Der Mr wurde auf demselben 1D-SDS-Gel aufgetragen, wie das präzipitierte Medium)

Ab einem Volumen von 80 µl (Spur 3) zeigte sich eine deutlichere Färbung auch im Bereich der Proteine mit kleineren Massen (10 kDa bis 50 kDa). Im Bereich um 67 kDa zeigte sich eine sehr starke Färbung. Diese zeigte, dass Rückstände des hoch-abundanten BSA, trotz der Kultivierung der CPCs für 24h ohne FKS, im Medium zurückblieben. Es erschien deshalb sinnvoll, einen Weg zu finden, BSA selektiv, z.B. durch Präzipitation, zu entfernen.

3.1.1.3 Selektive Entfernung von Albumin

Um niedrig abundante Proteine, die im Serum von Albumin überlagert werden, mittels Massenspektrometrie besser detektieren zu können, wurde eine Methode beschrieben, um Albumin mittels Trichloressigsäure-Aceton-Präzipitation selektiv zu fällen (Chen Y et al. 2005). Um zu testen, ob diese Methode auch für CPC-Medium funktionierte, wurde eine TCA-Aceton-Präzipitation (2.2.1.2) an 2D-CPC-Medium und 3D-CPC-Medium durchgeführt (Abbildung 16).



Abbildung 16: Schematisch dargestellter Ablauf der Trichloressigsäure-Aceton-Präzipitation modifiziert nach Chen Y et al. (2005)

Um mittels 1D-SDS-PAGE zu testen, ob diese Methode im CPC-Medium Albumin selektiv fällen und das Medium aufkonzentrieren kann, wurde die jeweils gleiche Menge an unbehandeltem Medium, an mittels EtOH-Präzipitation aufkonzentriertem Medium und an mittels TCA-Aceton-Präzipitation aufkonzentriertem Medium, auf ein 1D-SDS-Gel aufgetragen. Um die Effektivität der TCA-Aceton-Präzipitation besser einschätzen zu können, wurde weiterhin das Präzipitat II (das präzipitierte Albumin) auf das Gel aufgetragen. Um die Wirksamkeit dieser Technik sowohl für 2D- als auch für 3D-Medium beurteilen zu können, wurden beide Medien nebeneinander auf dem gleichen Gel aufgetragen (Abbildung 17).



Abbildung 17: Coomassie-gefärbtes 1D-SDS-Gel: 2D-CPC-Medium und 3D-CPC-Medium präzipitiert durch TCA-Aceton-Präzipitation und EtOH-Präzipitation im Vergleich zu unpräzipitiertem Medium sowie das durch TCA-Aceton-Präzipitation selektiv gefällte BSA

Die Spuren 1-4 enthalten 2D-CPC-Medium; die Spuren 5-8 enthalten 3D-CPC-Medium. Die Spuren 1 und 5 enthalten unpräzipitiertes Medium; die Spuren 2 und 6 sind mit EtoH präzipitiert; die Spuren 3 und 7 sind mit TCA-Aceton präzipitiert. Die Spuren 4 und 8 enthalten das Präzipitat des Überstandes der TCA-Aceton-Präzipitation (selektiv gefälltes BSA).

Mr: Molekulargewichtsmarker

Abbildung 17 lässt erkennen, dass durch die Präzipitation, sowohl mit TCA-Aceton als auch mit EtoH, eine Aufkonzentration ohne sichtbaren Verlust an sekretierten Proteinen erfolgen kann. Dieses gilt für 2D-CPC-Medium und für 3D-CPC-Medium. Der Vergleich der Spuren 1 und 3 bzw. 7 und 5 zeigt, dass mittels TCA-Aceton-Präzipitation, BSA (aus FKS) selektiv gefällt werden kann. Das gefällte Protein ist auf den Spuren 4 und 8 deutlich zu erkennen. Der Vergleich der Spuren 1 und 2 bzw. 5 und 6 zeigt, dass Albumin durch die EtOH-Präzipitation nicht gefällt wird. Da im Bereich der Proteine mit niedrigem Molekulargewicht (10-50 kDa) auf den Spuren mit 2D-Medium (Spuren 1-3) kaum eine Färbung erkennbar ist, wird deutlich, dass ein größeres Volumen an 2D-CPC-Medium notwendig ist, um eine ausreichende Anreicherung an Proteinen auf dem Elektrophoresegel zu erreichen.

Mittels TCA-Aceton-Präzipitation kann also CPC-Medium aufkonzentriert und störendes BSA (aus FKS) effektiv reduziert werden. Dieser Effekt ist bei der Präzipitation von 2D-CPC-Medium deutlicher als bei der Präzipitation von 3D-CPC-Medium.

3.1.1.4 Optimierung eines 1:1-Verhältnisses von 2D- und 3D-CPC-Medium zur quantitativen Analyse des Sekretoms von CPCs mittels metabolischer Markierung

Um Unterschiede in der Sekretion von Proteinen durch 2D-CPC und 3D-CPC zu erkennen, sollte eine quantitative massenspektrometrische Analyse mittels metabolischer Markierung (SILAC) erfolgen. Dafür musste ein 1:1 Verhältnis beider Medien mittels Gelelektrophorese definiert werden. Dafür musste zunächst bestimmt werden, bei welchem jeweiligen Volumen eine optimale Anreicherung an Proteinen auf dem Elektrophoresegel erreicht werden konnte, um anschließend diese Volumina einander zu nähern. Dafür wurden zunächst verschiedene Volumina mittels TCA-Aceton-Präzipitation präzipitiert und konzentriert und anschließend mittels 1D-Gelelektrophorese beurteilt (Elektrophoresegele nicht gezeigt). Für 2D-Medium zeigten aufgetragene Volumina von 75 μ l bis 100 μ l eine optimale Proteinanreicherung auf dem 1D-SDS-Elektrophoresegel auf. Für 3D-Medium zeigten aufgetragene Volumina von 15 μ l bis 20 μ l eine optimale Proteinanreicherung auf dem 1D-SDS-Elektrophoresegel auf (Abbildung 18).



Abbildung 18: Coomassie-gefärbtes 1D-SDS-Gel: Optimierung eines 1:1-Verhältnisses an 2D-CPC-Medium und 3D-CPC-Medium

Die Spuren 1, 3 und 5 enthalten verschiedene Volumina 3D-CPC-Medium, das mittels TCA-Aceton präzipitiert wurde. Die Spuren 2, 4 und 6 enthalten verschiedene Volumina 3D-CPC-Medium, das ebenfalls mittels TCA-Aceton präzipitiert wurde. Für einen besseren Vergleich sind 2D-CPC-Medium und 3D-CPC-Medium nebeneinander aufgetragen. Spur 7 enthält 100 µl 2D-CPC-Medium und 15 µl 3D-CPC-Medium. Alle Spuren sind auf demselben 1D-SDS-Gel aufgetragen. Mr: Molekulargewichtsmarker

Es zeigte sich, dass bei 15 µl 3D-Medium und 100 µl 2D-Medium das 1:1-Verhältnis am besten erreicht werden konnte (Spuren 5 und 6). Beide Medien wurden für die Analyse mit LC-MS/MS auf eine gemeinsame Spur aufgetragen (Spur 7).

3.1.2 Zusammenfassung der entwickelten Methode zur Untersuchung des Sekretoms chondrogener Progenitorzellen

Für die massenspektrometrische Untersuchung des Sekretoms von 2D-CPCs und 3D-CPCs wurde eine Methode entwickelt, mit der es gelang, das Volumen an Medium zu reduzieren, den sekretierten Proteingeahalt aufzukonzentrieren und BSA abzureichern. Für die quantitative Analyse mit der SILAC-Methode wurde empirisch ein 1:1-Verhältnis von 2D-CPC- und 3D-

CPC-Medium bestimmt. Im Folgenden ist der Ablauf des gesamten Versuchsablaufes zusammengefasst:

Nach der Gewebeentnahme und -kultur wurden parallel zwei verschiedene Zellkulturen durchgeführt, die mit unterschiedlichen Aminosäuren markiert wurden. Es wurde zum einen eine 2D-Kultur durchgeführt, die mit "schweren" SILAC-Aminosäuren markiert wurde und zum anderen eine 3D-Alginat-Kultur, die "leichte" Aminosäuren enthielt (Abbildung 19).



Abbildung 19: Schematischer Ablauf der entwickelten Methode zur qualitativen und quantitativen Untersuchung des Sekretoms chondrogener Progenitorzellen

Beide Kulturen wurden gewaschen um sie möglichst quantitativ von FKS zu befreien. Anschließend wurde jede Kultur für 24h ohne FKS kultiviert. Beide Kulturen wurden nach der Präzipitation mit TCA-Aceton im Verhältnis von 1:1 auf ein Elektrophoresegel aufgetragen, in 23 Gelstückchen zerschnitten, mit Trypsin verdaut und anschließend mit LC-MS/MS analysiert. Anschließend erfolgt die Datenanalyse mit der MaxQuant-Software.

3.1.3 Untersuchung der Effektivität der Trichloressigsäure-Aceton-Präzipitation mittels Massenspektrometrie

Um die Zuverlässigkeit der TCA-Aceton-Präzipitation sicher einschätzen zu können, wurden zusätzlich zum Präzipitat I (der Proteingehalt der das Sekretom von CPCs darstellt) auch die Präzipitate II und III (der Proteingehalt des jeweiligen Überstandes), mittels Massenspektrometrie untersucht (Abbildung 20).



Abbildung 20: Untersuchung der Effektivität der TCA-Aceton-Präzipitation mittels LC-MS/MS

100 µl 2D-CPC-Medium und 15 µl 3D-CPC-Medium wurden vermischt, mit TCA-Aceton präzipitiert und auf ein 1D-SDS-Elektrophoresegel aufgetragen (Präzipitat I). Es handelte sich hierbei um eine rein qualitative Untersuchung ohne metabolische Markierung (SILAC). Der Überstand der Präzipitation wurde erneut mit Aceton präzipitiert und ebenfalls auf das Elektrophoresegel aufgetragen (Präzipitat II). Der Überstand dieser Präzipitation wurde mit dem

Vakuumtrockner getrocknet (Präzipitat III) und ebenfalls auf das Elektrophoresegel aufgetragen. Der Proteingehalt aller drei Präzipitate wurde mit dem Massenspektrometer qualitativ untersucht. Die massenspektrometrische Analyse ergab insgesamt 504 identifizierte Proteine aus dem Sekretom chondrogener Progenitorzellen (Kontaminanten wurden nur durch die Max-Quandt-Software gefiltert) (Abbildung 21).



Abbildung 21: Schnittmengendiagramm identifizierter Proteine in Präzipitat I, Präzipitat III und Präzipitat III

Insgesamt wurden 75 Proteine durch die Präzipitation mit TCA-Aceton im Präzipitat I nicht erfasst.

75 zusätzliche Proteine wurden durch die TCA-Aceton-Präzipitation gefällt und konnten deshalb nur in Präzipitat II und III identifiziert werden. Diese Proteine sind im Anhang in Tabelle-ST-1 dargestellt. Von diesen 75 Proteinen finden sich 47 Proteine nur im Präzipitat II, 19 Proteine finden sich nur im Präzipitat III und 9 Proteine finden sich in den Präzipitaten II und III. Von den Proteinen die in den Präzipitaten II und III, nicht aber in Präzipitat I identifiziert werden konnten, wurden 23 Proteine durch jeweils zwei oder mehr Peptide und 13 Proteie durch fünf oder mehr Peptide, identifiziert (Abbildung 22). Die mehrheitlich geringe Anzahl an Peptididentifikationen, die für die Proteinidentifikation herangezogen wurden, deutete darauf hin, dass es sich hierbei um Proteine mit einer sehr niedrigen Abundanz handelte.



Abbildung 22: Anzahl der Peptide, die zur Identifikation der Proteine in Präzipitat II und III herangezogen wurden

Dargestellt sind diejenigen Proteine, die allein in Präzipitat II und III vorkommen. 52 % der Proteine wurden mit einem Peptid identifiziert. 31% der Proteine konnten mit zwei bis vier Peptiden identifiziert werden. Weitere 17% wurden durch fünf oder mehr Peptide identifiziert.

3.1.4 Entwicklung einer individualisierten Datenbanksuche für die Filterung der identifizierten Proteine von Kontaminanten durch fetales Kälberserum

Um CPCs zu kultivieren, ist eine Zugabe von 10% FKS notwendig. Dieses enthält zahlreiche Proteine und damit auch Peptide, die nach der Hydrolyse mit Endoproteinasen, vom Massenspektrometer erfasst werden und durch gängige Datenbanken humane Proteine identifizieren können. Eine vollständige Aufreinigung der Zellen ohne Rückstände an FKS ist aufgrund der Wechselwirkung der Proteine des FKS mit der Zelloberfläche der CPCs nicht möglich (Bunkenborg et al. 2010). Für die rein qualitative Identifikation von zellspezifisch sekretierten Proteinen, musste also eine Strategie entwickelt werden, um möglichst eindeutig zwischen den von CPCs sekretierten Proteinen und verunreinigenden Proteinen des FKS zu unterscheiden.

Eine mögliche Strategie war die gezielte Erweiterung der gängigen Datenbanken mit humanen Proteinen, die durch die Analyse von reinem FKS identifiziert werden können. Eine solche Datenbank ist bereits publiziert (Bunkenborg et al. 2010).

Eine andere Möglichkeit um sekretierte Proteine von Proteinen des FKS zu diskriminieren, ist die Kultivierung von CPCs unter der Anwesenheit von SILAC-Aminosäuren. Die mit "schweren" Aminosäuren vollständig markierten und sekretierten Proteine können zweifelsfrei von Proteinen des FKS unterschieden werden, da letztere keine "schweren" Aminosäuren besitzen (Hathout 2007). Da innerhalb dieser Arbeit die CPCs des 3D-Mediums nicht in SILAC-Medium kultiviert

werden konnten, war eine Identifikation sekretierter zellspezifischer Proteine über die metabolische Markierung im 3D-Medium nicht möglich (4.1).

Um auch im Sekretom des 3D-Mediums zwischen FKS-spezifischen und von CPCs sekretierten Proteinen unterscheiden zu können, wurden experiment-spezifisch verunreinigende Proteine in einer experimentspezifischen Datenbank gesammelt. Hierfür wurde das 2D-CPC-Medium mit den sekretierten Proteinen die nach metabolischer Markierung ausschliesslich Arginin+10 und Lysin+8 enthielten, mit TCA-Aceton-Präzipitation (entsprechend der in 3.1.2. beschriebenen Probenvorbereitung) vorbereitet und massenspektrometrisch mittles LC-MS/MS analysiert. Diejenigen Proteine, die bei diesen Messungen ausschließlich "leichte" Aminosäuren enthielten, wurden als experimentspezifische verunreinigende Proteine aus FKS definiert. Sekretierte Proteine waren zwangsläufig mit "schweren" Aminosäuren markiert

Bei der Anwendung der von Bunkenborg et al. zur Verfügung gestellten Datenbank (bei der Proteinidentifizierung) fiel auf, dass auch mit "schweren" Aminosäuren markierte Proteine als FKS spezifische Proteine, definiert wurden (z.B. *Protein Wnt 5a* oder *transforming growth factor beta-1*). Die Datenbank wurde daraufhin dahingehend modifiziert, dass Proteine die in das 2D-CPC-Medium sekretiert wurden und "schwere" Aminosäure enthielten, nicht als kontaminierende Proteine aus FKS angesehen wurden.

Die Filterung nach verunreinigenden Proteinen setzte sich also letztlich aus drei Schritten zusammen:

- (1) Filterung mit der Datenbank der MaxQuant-Software
- (2) Filterung mit der modifizierten von Bunkenborg et al. entwickelten Datenbank
- (3) Filterung mit der experiment-spezifischen Datenbank.

3.2 Qualitative Analyse der Protein-Expression von CPCs nach 24 Stunden

Durch den in 3.1.2 beschriebenen Versuchsablauf konnten insgesamt 603 Proteine im 2D- und 3D-CPC-Medium nachgewiesen werden. Es wurden dafür drei biologisch und drei technisch voneinander unabhängige Replikate durchgeführt. 458 Proteine konnten in allen drei biologischen Replikaten identifiziert werden. Insgesamt konnten 64 Proteine nur in einem einzigen Replikat identifiziert werden. 76 % der Proteine konnten demnach in allen 3 Replikaten identifiziert werden. 13% der identifizierten Proteine konnten einmal reproduziert werden. 11% der identifizierten Proteine konnten nicht reproduziert werden (Abbildung 23).



Abbildung 23: Schnittmengen der Proteinidentifizierungen in 3 biologisch voneinander unabhängigen Replikaten

Das Diagramm stellt die Schnittmengen von drei biologisch voneinander unabhängigen Replikaten (BR) unproportional dar. Die Zahlen geben die Anzahl identifizierter Proteine aus 100 μ l 2D-CPC-Medium und 15 μ l 3D-CPC-Medium wieder. Insgesamt wurden 458 Proteine in allen drei massenspektrometrischen Messungen identifiziert. Die Identifikation von 64 Proteinen konnte nicht reproduziert werden (10+7+47).

Trotz der optimierten Probenvorbereitung (Abbildung 19) konnte die Analyse von Kontaminanten aus FKS nicht vollständig vermieden werden. Diese Kontaminanten wurden unter strengen Kriterien mittels Datenanalyse gefiltert (3.1.4.). Daher wurden von 603 identifizierten Proteinen 272 Proteine durch die gezielte Datenbanksuche als Kontaminanten identifiziert (FKS und allgemeine Kontaminanten wie z.B. Keratine). Damit blieben 331 (der 603 identifizierten) Proteine, die dem Ursprung von CPCs zugeordnet werden konnten. Diese Proteine sind im Anhang in Tabelle-ST-2 dargestellt. Von diesen 331 Proteinen, die den CPCs zugeordnet wurden, konnten 41% über die Datenbanksuche mit DAVID- Bioinformatics dem Extrazellularraum zugeordnet werden, 59 % wurden als intrazelluläre Proteine charakterisiert.

Die 131 Proteine, die dem Extrazellularraum und damit prinzipiell dem Sekretom von CPCs zugeordnet werden, sind in Tabelle 1 dargestellt.

Identifizierte Proteine	UniProt-Name	Anzahl identifizierter		
		Peptidsequenzen		n
		in	in	in
		BR	BR	BR
		1	2	3
14-3-3 protein sigma	1433S_HUMAN	5	5	5
72 kDa type IV collagenase	MMP2_HUMAN	17	22	20
A disintegrin and metalloproteinase with				
thrombospondin motifs 1 (ADAMTS-1)	ATS1_HUMAN	3	3	2
Actinin alpha 1 isoform 3	B7TY16_HUMAN	10	10	16
Adipocyte enhancer-binding protein 1	AEBP1_HUMAN	5	7	7
Agrin	AGRIN_HUMAN	16	14	23
Aldose reductase	ALDR_HUMAN	3	1	5
Alpha-actinin-4	ACTN4_HUMAN	9	12	23
Amyloid beta A4 protein	A4_HUMAN	7	7	7
Annexin A2	ANXA2_HUMAN	29	24	31
Apolipoprotein D	APOD_HUMAN	0	2	3
Basement membrane-specific heparan sulfate				
proteoglycan core protein	PGBM_HUMAN	36	32	50
Beta-2-microglobulin	B2MG_HUMAN	6	6	6
C1q and tumor necrosis factor related protein				
3	Q0VAN4_HUMAN	3	3	3
Cadherin-2	CADH2_HUMAN	2	1	1
Calreticulin	CALR_HUMAN	0	0	2
Calumenin, isoform CRA_c	B3KPG9_HUMAN	2	2	2
Cartilage-associated protein	CRTAP_HUMAN	0	0	2
Cathepsin B	CATB_HUMAN	7	8	7
Cathepsin D	CATD_HUMAN	4	4	3
Cathepsin G	CATG_HUMAN	2	0	1
Cathepsin L1	CATL1_HUMAN	4	5	6
Cathepsin Z	CATZ_HUMAN	3	2	2
CD109 antigen	CD109_HUMAN	10	10	10
CD59 glycoprotein	CD59_HUMAN	1	2	2
cDNA FLJ55211, highly similar to Glia-				
derived nexin	B4DIF2_HUMAN	21	22	21
cDNA FLJ59142, highly similar to	_			
Epididymal secretory protein E1	B4DV10_HUMAN	3	2	2
Chitinase-3-like protein 1	CH3L1_HUMAN	8	6	7
Clusterin	CLUS_HUMAN	7	6	8
Coagulation factor IX	FA9 HUMAN	6	6	4
Coiled-coil domain-containing protein 80	CCD80 HUMAN	12	10	12
Collagen alpha-1(I) chain	CO1A1 HUMAN	24	25	28
Collagen alpha-1(III) chain	CO3A1 HUMAN	9	9	9
Collagen alpha-1(VI) chain	CO6A1_HUMAN	38	37	37

Fortsetzung Tabelle 1 (Proteinidentifikationen im Sekretom chondrogener Progenitorzellen)				
Identifizierte Proteine	UniProt-Name	Anzahl	identifiz	zierter
	Chill Fot-ryame	Pentids	sequenze	n
		in	in	in
		BR	BR	BR
		1	2	3
Collagen alpha-1(VII) chain	CO7A1_HUMAN	1	4	1
Collagen alpha-1(VIII) chain	CO8A1_HUMAN	1	2	3
Collagen alpha-1(XII) chain	COCA1_HUMAN	28	23	18
Collagen alpha-1(XIV) chain	COEA1_HUMAN	27	21	24
Collagen alpha-2(I) chain	CO1A2_HUMAN	28	26	28
Collagen alpha-2(V) chain	CO5A2_HUMAN	3	4	1
Collagen alpha-2(VI) chain	CO6A2_HUMAN	26	23	24
Collagen alpha-3(VI) chain	CO6A3_HUMAN	129	120	122
Collagen triple helix repeat-containing protein				
1	CTHR1_HUMAN	6	6	6
Complement C1s subcomponent	C1S_HUMAN	4	2	1
Complement factor H	CFAH_HUMAN	4	2	4
C-type lectin domain family 11 member A	CLC11_HUMAN	4	6	12
Cystatin-C	CYTC_HUMAN	3	3	4
Decorin	PGS2_HUMAN	11	12	13
Ectonucleotide				
pyrophosphatase/phosphodiesterase family				
member 2	ENPP2_HUMAN	12	8	13
EMILIN-1	EMIL1_HUMAN	8	8	10
Extracellular matrix protein 1	ECM1_HUMAN	6	4	3
Fibrillin-1	FBN1_HUMAN	6	3	3
Fibulin-1	FBLN1_HUMAN	11	8	3
Follistatin-related protein 1	FSTL1_HUMAN	5	4	2
Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN	8	4	9
Galectin-1	LEG1_HUMAN	6	6	7
Galectin-3-binding protein	LG3BP_HUMAN	12	7	13
Gelsolin	GELS_HUMAN	31	27	30
Gremlin-1	GREM1_HUMAN	6	6	6
Gremlin-2	GREM2_HUMAN	3	1	3
Growth arrest-specific protein 6	GAS6_HUMAN	10	13	8
Hepatoma-derived growth factor	HDGF_HUMAN	2	1	3
Insulin-degrading enzyme	IDE_HUMAN	2	0	0
Insulin-like growth factor-binding protein 3	IBP3_HUMAN	12	12	11
Insulin-like growth factor-binding protein 4	IBP4_HUMAN	6	6	6
Insulin-like growth factor-binding protein 6	IBP6_HUMAN	5	5	4
Integrin alpha-5	ITA5_HUMAN	1	1	2
Integrin alpha-V	ITAV_HUMAN	0	1	1
Integrin beta-1	ITB1_HUMAN	3	3	1

Fortsetzung Tabelle 1 (Proteinidentifikationen im Sekretom chondrogener Progenitorzellen)				
Identifizierte Proteine	UniProt-Name	Anzahl	identifiz	vierter
	Chill Fot-Ivallic	Pentids	sequenze	n
		in	in	in
		BR	BR	BR
		1	2	3
Interstitial collagenase	MMP1_HUMAN	20	16	20
Lactadherin	MFGM_HUMAN	14	16	14
Laminin subunit alpha-2	LAMA2_HUMAN	5	4	3
Laminin subunit alpha-5	LAMA5_HUMAN	20	4	9
Laminin subunit beta-1	LAMB1_HUMAN	11	12	8
Laminin subunit gamma-1	LAMC1_HUMAN	13	9	8
Latent-transforming growth factor beta-				
binding protein 1	LTBP1_HUMAN	8	9	2
Latent-transforming growth factor beta-				
binding protein 3	LTBP3_HUMAN	1	0	2
Lipocalin-1	LCN1_HUMAN	0	1	2
Long palate, lung and nasal epithelium				
carcinoma-associated protein 1	LPLC1_HUMAN	0	0	5
Lumican	LUM_HUMAN	3	3	3
Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1_HUMAN	6	5	5
Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2_HUMAN	11	9	11
Metalloproteinase inhibitor 3	TIMP3_HUMAN	4	2	5
MHC class I antigen	A2BCW2_HUMAN	4	1	2
Microfibrillar-associated protein 2	MFAP2_HUMAN	2	1	2
Midkine	MK_HUMAN	2	4	4
Neural cell adhesion molecule 1	NCAM1_HUMAN	2	1	1
Neutrophil defensin 1	DEF1_HUMAN	2	0	2
Nidogen-2	NID2_HUMAN	3	2	4
Nucleobindin-2	NUCB2_HUMAN	0	0	2
Olfactomedin-like protein 3	OLFL3_HUMAN	1	0	2
Pappalysin-1	PAPP1_HUMAN	7	9	3
Pentraxin-related protein PTX3	PTX3_HUMAN	18	16	18
Peptidyl-glycine alpha-amidating				
monooxygenase	AMD_HUMAN	1	0	3
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA_HUMAN	9	8	8
Peroxidasin homolog	PXDN_HUMAN	1	2	1
Plasminogen activator inhibitor 1	PAI1_HUMAN	13	11	13
Polymeric immunoglobulin receptor	PIGR_HUMAN	0	0	6
Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	PCOC1_HUMAN	15	9	11
Procollagen C-endopeptidase enhancer 2	PCOC2_HUMAN	2	1	0
Prosaposin	BIAVU8_HUMAN	5	3	2
Protein CYR61	CYR61_HUMAN	6	4	6
Protein FAM3C	FAM3C_HUMAN	0	0	2
Protein Plunc	PLUNC_HUMAN	0	0	3

Fortsetzung Tabelle 1 (Proteinidentifikationen im Sekretom chondrogener Progenitorzellen)				
Identifizierte Proteine	UniProt-Name	Anzahl identifizierter Pentidsequenzen		
		in	in	in
		BR	BR	BR
		1	2	3
Protein S100-A7	S10A7_HUMAN	0	1	2
Protein Wnt-5a	WNT5A_HUMAN	2	2	3
Putative uncharacterized protein COL9A1	A6NEQ6_HUMAN	1	1	2
Putative uncharacterized protein				
DKFZp686H17246	Q68DS3_HUMAN	5	5	5
Ribonuclease 4	RNAS4_HUMAN	1	1	2
Ribonuclease inhibitor	RINI_HUMAN	0	0	2
Secreted frizzled-related protein 1	SFRP1_HUMAN	3	1	4
Serine protease 23	PRS23_HUMAN	1	3	3
Serine protease HTRA1	HTRA1_HUMAN	13	10	13
Serpin B5	SPB5_HUMAN	5	1	1
SPARC	SPRC_HUMAN	6	6	6
SPARC-related modular calcium-binding				
protein 1	SMOC1_HUMAN	1	2	1
Stanniocalcin-1	STC1_HUMAN	1	1	2
Stanniocalcin-2	STC2_HUMAN	7	5	6
Sulfhydryl oxidase 1	QSOX1_HUMAN	22	21	23
Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and				
pentraxin domain-containing protein 1	SVEP1_HUMAN	3	2	2
Tenascin	TENA_HUMAN	55	51	49
Tenascin-X	TENX_HUMAN	22	15	13
Thrombospondin-2	TSP2_HUMAN	5	4	4
Thrombospondin-3	TSP3_HUMAN	3	1	2
Transferrin receptor protein 1	TFR1_HUMAN	0	0	2
Transforming growth factor beta-1	TGFB1_HUMAN	1	1	3
Vasorin	VASN_HUMAN	4	4	4
Versican core protein	CSPG2_HUMAN	18	17	15
Vitamin K-dependent protein S	PROS_HUMAN	4	5	2
Zinc-alpha-2-glycoprotein	ZA2G_HUMAN	1	1	8
Zymogen granule protein 16 homolog B	ZG16B_HUMAN	4	0	2

Tabelle 1: Proteinidentifikationen im Sekretom von CPCs

Die Funktionen der Proteine des Sekretoms von CPCs, wurden mit Hilfe der UniProt-Datenbank evaluiert und in Gruppen kategorisiert (Abbildung 24).



Abbildung 24: Funktionen der im Sekretom von CPCs identifizierten Proteine

Ein Großteil der Proteine ist für Struktur und Erhalt des EZM-Netzwerkes verantwortlich (23%). Es ließen sich zahlreiche Wachstumsfaktoren sowie Zytokine und Chemokine identifizieren (17%). Außerdem konnten einige Proteasen (16%) und Proteinaseinhibitoren (7%) nachgewiesen werden. 17% der identifizierten Proteine sind für Zell-Matrix- oder Zell-Zell-Interaktionen verantwortlich. Einige Proteine konnten keiner dieser Funktionen zugeordnet werden oder ihre Funktion ist bisher nicht bekannt (9%).

3.3 Quantitative Analyse der Proteinexpression durch CPCs im 2D- und 3D-Medium nach 24h

Die Ergebnisse der quantitativen MS-Analyse zeigen für ein bestimmtes detektiertes Peptid das quantifiziert werden soll, ein Paar an markierten "schweren" und unmarkierten "leichten" Signalen (*Peaks*). Anhand der Intensität dieser unterschiedlichen Massenpeaks des gleichen Peptids kann nun eine relative Quantifizierung stattfinden, indem die Intensität des Peptids im schweren Zustand ins Verhältnis mit der Intensität des leichten Zustandes gesetzt wird. Man spricht von einem Schwer/Leicht-Verhältnis (engl. Heavy/Light-Ratio; H/L-Ratio).

Für 89 extrazelluläre Proteine konnten quantitative massenspektrometrische Daten erhalten werden und so für die Quantifizierung herangezogenen wurden. Diese Proteine sind im Anhang in Tabelle-ST-3 aufgelistet und werden in Abbildung 25 entsprechend ihres H/L-Verhältnisses

dargestellt. Für die Berechnung des H/L-Verhältnisses wurde der Mittelwert aus drei technischen und 3 biologischen Replikaten verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der Computersoftware "MaxQuant" (Cox et al. 2009).



Abbildung 25: H/L-Verhältnis über der Anzahl der quantifizierten Proteine im Sekretom von CPCs

24 Proteine zeigten ein logarithmisches H/L-Verhältnis das kleiner als -2 ist (Tabelle 2). Ein solches Verhältnis wird als signifikant angesehen (Kashyap et al. 2010). Ist das H/L-Verhältnis erniedrigt, bedeutet dieses, dass das jeweilige Protein im leichten Zustand häufiger vorhanden ist und damit auch auch stärker exprimiert wird. Die Proteine kommen demnach im 3D-Medium signifikant häufiger vor als im 2D-Medium.

Quantifiziertes Protein	UniProt Name	H/L- Verhältnis (log2)
Collagen triple helix repeat-containing protein		
1	CTHR1_HUMAN	-6,7
Gelsolin	GELS_HUMAN	-6,5
Growth arrest-specific protein 6	GAS6_HUMAN	-5,4
A disintegrin and metalloproteinase with		
thrombospondin motifs 1 (ADAMTS-1)	ATS1_HUMAN	-4,9
Fibulin-1	FBLN1_HUMAN	-4,7
Pentraxin-related protein PTX3	PTX3_HUMAN	-4,1
Coiled-coil domain-containing protein 80	CCD80_HUMAN	-4,1
Insulin-like growth factor-binding protein 3	IBP3_HUMAN	-3,8

Metalloproteinase inhibitor 3	TIMP3_HUMAN	-3,6
Collagen alpha-1(III) chain	CO3A1_HUMAN	-3,4
Annexin A2	ANXA2_HUMAN	-3,3
Collagen alpha-1(XII) chain	COCA1_HUMAN	-3,2
Pappalysin-1	PAPP1_HUMAN	-2,9
Adipocyte enhancer-binding protein 1	AEBP1_HUMAN	-2,9
Plasminogen activator inhibitor 1	PAI1_HUMAN	-2,7
Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN	-2,5
Aldose reductase	ALDR_HUMAN	-2,5
Midkine	MK_HUMAN	-2,4
Stanniocalcin-2	STC2_HUMAN	-2,3
Stanniocalcin-1	STC1_HUMAN	-2,3
Ribonuclease 4	RNAS4_HUMAN	-2,2
Cathepsin D	CATD_HUMAN	-2,2
Actinin alpha 1 isoform 3	B7TY16_HUMAN	-2,2
Chitinase-3-like protein 1	CH3L1_HUMAN	-2,2

Tabelle 2: Proteine mit signifikant niedrigem H/L-Verhältnis im Sekretom von CPCs

15 Proteine zeigten ein signifikant hohes logarithmisches H/L-Verhältnis (Tabelle 3). Ist das H/L-Verhältnis erhöht, bedeutet dieses, dass das entsprechende Protein im leichten Zustand weniger exprimiert wird. Die Proteine kommen demnach im 2D-Medium häufiger vor als im 3D-Medium.

Quantifiziertes Protein	UniProt Name	H/L- Verhältnis (log2)
Insulin-like growth factor-binding protein 6	IBP6_HUMAN	5,6
Interstitial collagenase	MMP1_HUMAN	5,1
Galectin-3-binding protein	LG3BP_HUMAN	5,1
Cathepsin L1	CATL1_HUMAN	4,8
Agrin	AGRIN_HUMAN	3,8
Beta-2-microglobulin	B2MG_HUMAN	3,8
Cystatin-C	CYTC_HUMAN	3,5
Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1_HUMAN	3,3
Sulfhydryl oxidase 1	QSOX1_HUMAN	2,8
Latent-transforming growth factor beta-binding		
protein 1	LTBP1_HUMAN	2,8
Laminin subunit alpha-5	LAMA5_HUMAN	2,8
Extracellular matrix protein 1	ECM1_HUMAN	2,5
Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2_HUMAN	2,5
cDNA FLJ59142, highly similar to Epididymal	B4DV10_HUMAN	2,3

secretory protein E1		
Vasorin	VASN_HUMAN	2,1

Tabelle 3: Proteine mit signifikant hohen H/L-Verhältnis im Sekretom von CPCs

Um die Quantifizierung zu verifizieren, wurde der Prozentsatz an eingebauten, "schweren" Aminosäuren für jedes markierte Protein mit der MaxQuant-Software ermittelt. Die Qualität der quantifizierten Signale wurde weiterhin durch die manuelle Inspektion der MS-Spektren validiert. Die relative Abundanz von Peptiden kann auf MS/MS-Ebene anhand von Chromatogrammen (TIC; engl. total ion chromatogram), die die Anzahl detektierter Ionen in Relation zur Zeit des Gradienten der Flüssigkeitschromatographie wiedergeben, abgeschätzt werden. Abbildung 26 zeigt ein Beispiel eines TIC von "leichten" und "schweren" Peptiden nach In-Gel-Verdau der Proteine eines Gelstückes aus der Probe Präzipitat I (siehe Abbildung 20). Das TIC repräsentiert die Ionenintensitäten aller im Massenspektrometer detektierten Peptide über der Trennzeit des angelegten Gradienten der Flüssigkeitschromatographie und ist somit im Prinzip vergleichbar mit einem UV Chromtagramm. Zu jedem Zeitpunkt, an dem das TIC von dem Massenspektrometer aufgenommen wird, kann der m/z-Wert des entsprechenden Peptides bestimmt werden. Sind gewisse Kriterien (Intensität, Isotopenverteilung und Ladungszustand) erfüllt, wird ein Peptid automatisch zur Sequenzierung ausgewählt. Abbildung 27, 28 und 29 zeigen Beispiele für die Detektion von "leichten" und "schweren" Peptidpaaren (Feld 27A, 28A und 29A) und die entsprechende massenspektrometrische Sequenzierung (Feld 27B, 28B und 29B). Die Ionenintensitäten der Peptide sind dabei quantitativ, d.h. sie repräsentieren für dieses Peptidepaar die Menge an "leichten" und "schweren" Peptid in der Probe. Abbildung 27 zeigt ein Beispiel für die massenspektrometrische Quantitifizierung eines Peptides aus dem Protein Insulin-like growth factor binding protein 3, welches im Sekretom der 3D-CPC Zellen signifikant stärker vorhanden ist. Abbildung 28 zeigt ein Beispiel für ein Peptid aus dem Protein Collagen alpha-1 (VI) chain welches im Sekretom von 2D- und 3D CPC äquimolar vorhanden ist. Abbildung 29 zeigt ein Beispiel für ein Peptid aus dem Protein Sulfhydryl oxidase 1, das im Sekretom von 2D-CPC Zellen stärker vorhanden ist. Für die Peptide, die aus jedem Gelstück eluiert wurden, wurde die Flüssigkeits-chromatographische Trennung dreimal durchgeführt (technische Replikate). Der Gesamte Versuch wurde zweimal wiederholt (biologische Replikate). Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse darzustellen, sind die TICs der biologischen und technischen Replikate im Anhang dargestellt (Abbildungen ST-4 bis ST-6).



Abbildung 26: TIC von Gelstück 6 (Präzipitat I)

Auf der Y-Achse wird die relative Ionenintensität (normalisiert zum Peptid mit dem stärksten Signal) angegeben. Sie ist proportional zu der Anzahl an Ionen die in jeder Sekunde der lüssigkeitschromatographischen Trennung von der Trennsäule in das Massenspktrometer eluieren und detektiert werden. Die X-Achse repräsentiert die Zeit des Flüssigkeitschromatographie-Gradienten. Durch die verwendeten Parameter der Flüssigkeitschromatographie (siehe 2.2.2.3) eluieren die meisten Ionen im Zeitfenster zwischen 10 und 40 Minuten von der HPLC-Säule.



Abbildung 27: MS- und MS/MS-Spektrum des Peptids PLQALLDGR aus *Insulin-like* growth factor binding protein 3.

A: Ionenintensität des "leichten" und "schweren" Peptides PLQALLDGR aus *Insulin-like growth factor binding protein 3*. Das "schwere" Peptid besitzt ein Arginin +10 am C-Terminus. Da das Peptid zweifach geladen ist (Ladungszustand+2) beträgt der gemessene m/z Unterschied 5. Aus der unterschiedlichen Intensität dieses Peptidpaares wird deutlich, dass dieses Peptid in der "leichten" Form signifikant erhöht vorliegt, d.h. im Sekretom von 3D-CPC Zellen. Das H/L-Verhältnis beträgt 0.05< (log). B: Fragmentionenspektrum und Fragmentionenserien der "leichten" Peptides. Die Zuordnung der y- und b Fragmentionen zu der Sequenz des Peptides ist ebenfalls aufgeführt. Das rot markierte R am C-Terminus der Peptidsequenz steht für die "schwere" Aminosäure Arginin+10.



Abbildung 28: MS- und MS/MS-Spektrum des Peptids LLLFSDGNSQGATPAAIEK aus dem Protein *Collagen alpha-1(VI) chain*

A: Ionenintensität des "leichten" und "schweren" Peptides LLLFSDGNSQGATPAAIEK aus *Collagen alpha-I(VI) chain.* Das "schwere" Peptid besitzt ein Lysin +8 am C-Terminus. Da das Peptid zweifach geladen ist (Ladungszustand+2) beträgt der gemessene m/z Unterschied 4. Aus den Intensitäten dieses Peptidpaares wird deutlich, dass die Peptide in der "leichten" und "schweren" Form in einem ausgeglichenen Verhältnis vorliegen, d.h., dass sie im Sekretom von 3D- und 2D-CPC Zellen in ähnlicher Quantität vorliegen. Das H/L-Verhältnis beträgt 1,18 (log). B: Fragmentionenspektrum und Fragmentionenserien der Peptide. Die Zuordnung der y- und b Fragmentionen zu der Sequenz des Peptides ist ebenfalls aufgeführt. Das rot markierte K am C-Terminus der Peptidsequenz steht für die "schwere" Aminosäure Lysin +8.



Abbildung 29: MS- und MS/MS-Spektrum des Peptids NNEEYLALIFEK aus Sulfhydryl oxidase 1

A: Ionenintensität des "leichten" und "schweren" Peptides NNEEYLALIFEK aus *Sulfhydryl oxidase 1*. Das "schwere" Peptid besitzt ein Lysin +8 am C-Terminus. Da das Peptid zweifach geladen ist (Ladungszustand+2) beträgt der gemessene m/z Unterschied 4. Aus der unterschiedlichen Intensität dieses Peptidpaares wird deutlich, dass dieses Peptid in der "schweren" Form signifikant erhöht vorliegt, d.h. im Sekretom von 2D-CPC Zellen. Das H/L-Verhältnis beträgt 7,56 (log). B: Fragmentionenspektrum und Fragmentionenserien der Peptide. Die Zuordnung der y- und b Fragmentionen zu der Sequenz des Peptides ist ebenfalls aufgeführt. Das rot markierte K am C-Terminus der Peptidsequenz steht für die "schwere" Aminosäure Lysin +8.

4 Diskussion

4.1 Methodische Aspekte der Proteomanalyse

Die rasche Entwicklung der Massenspektrometrie macht es möglich, dass hunderte bis tausende verschiedener Proteine in komplexen Proben wie z.B. Zellen, Organellen oder Körperflüssigkeiten identifiziert werden können. Insbesondere bei der Analyse von Körperflüssigkeiten gibt es einen sehr hohen dynamischen Bereich, durch den es erschwert ist, niedrig-abundante Proteine zu identifizieren (Gnatenko et al. 2006). Eine ähnliche Problematik stellte sich bei der Analyse des Sekretoms von CPCs. Neben dieser Problematik des dynamischen Bereiches ergab sich eine weitere Schwierigkeit daraus, dass die Proben zahlreiche Proteine aus FKS enthielten. eigentlichen Neben der Massenspektrometrie war deshalb die Probenvorbereitung von entscheidender Bedeutung. Demzufolge diente der erste Teil dieser Arbeit der Probenoptimierung.

Eine Schwierigkeit, die sich durch die Anwesenheit von FKS während der Zellkultur ergab, war die Diskrimination zwischen endogenen Proteinen der CPCs und verunreinigenden Proteinen des FKS. Daher wurde zu Beginn der Probenvorbereitung eine Strategie entwickelt, um zum einen hoch abundantes Albumin aus dem Medium zu entfernen und zum anderen zwischen Proteinidentifikationen aus CPC-Medium und FKS zu diskriminieren. Es war deshalb notwendig, die in FKS kultivierten Zellen ausführlich zu waschen und anschließend für 24 Stunden ohne FKS zu kultivieren. Durch diesen Ansatz können nur die innerhalb von 24 Stunden sekretierten Proteine vom Massenspektrometer erfasst werden. BSA konnte durch diese Maßnahmen zwar stark reduziert aber nicht gänzlich entfernt werden. Dieses Problem wurde auch in anderen wissenschaftlichen Arbeiten beschrieben und kann durch die Wechselwirkung der restlichen FKS-Proteine an der Zelloberfläche während der Zellkultur erklärt werden (Hathout 2007). Eine denkbare Alternative zur Kultivierung der Zellen unter Anwesenheit von FKS wäre die Durchführung der Proteomstudie mit einer FKS-freien Zellkultur. Dennoch sind auch in Abwesenheit von FKS andere Wachstumsfaktoren, wie z.B. Transferrin notwendig, die eine Kontaminierung der Probensubstanz verursachen können (Bunkenborg et al. 2010).

Da trotz der Waschung der Zellen Rückstände von FKS in der Probensubstanz zurück blieben, wurden zusätzlich verschiedene Präzipitationsbedingungen von endogenen Proteinen getestet, die ermöglichen sollten, dass hauptsächlich FKS getrennt wird. Dadurch sollte die Abtrennung der Probensubstanz von hochabundanten Proteinen wie BSA erfolgen, um so die Detektion von

weniger abundanten Proteinen zu ermöglichen. Die besten Ergebnisse wurden mit der TCA-Aceton-Präzipitationsmethode erzielt (Chen et al. 2005). Mit dieser Methode konnte das CPC-Medium sowohl aufkonzentriert als auch von einem Großteil des BSA im FKS abgetrennt werden. Der Vorteil von Präzipitations- gegenüber alternativen Strategien wie Ultrafiltration liegt darin, dass ein großes Probenvolumen aufkonzentriert werden kann und außerdem Verluste durch die unspezifische Bindung von Proteinen an den Filter vermieden werden können. Da bei Präzipitationsmethoden die Überstände abermals präzipitiert werden können, kann der gesamte Proteingehalt mittels 1D-Gelelektrophorese oder Massenspektrometrie untersucht werden. Da z.B. Albumin ein Transportprotein ist und deshalb andere Proteine binden kann, war es wichtig, auch die Überstände der Präzipitation auf ihren Proteingehalt hin zu untersuchen. Um die Effektivität der TCA-Aceton-Präzipitation zu testen, wurden deshalb alle Filtrate mittels Massenspektrometrie untersucht. Durch die Vorversuche dieser Arbeit, konnte gezeigt werden, dass die modifizierte TCA-Aceton-Präzipitation eine einfache und hoch effiziente Methode ist, um CPC-Medium für die nachfolgende massenspektrometrische Untersuchung aufzubereiten und die Anzahl identifizierter Proteine zu erhöhen. Zwar werden einige Proteine mit niedrigem Molekulargewicht durch diese Methode entfernt, es ist jedoch möglich, diese Proteine separat zu identifizieren. Proteine des FKS fanden sich zwar immer noch in der vorbereiteten Probensubstanz, waren aber deutlich abgereichert. Es konnten 504 Proteine im Präzipitat des Probenmaterials identifiziert werden. Demgegenüber befanden sich in den präzipitierten Überständen 75 Proteine, die nicht im Präzipitat des Probenmaterials identifiziert werden konnten. Die Funktionen der Proteine die im Rahmen dieses Vorversuches identifiziert wurden, wurden in dieser Arbeit nicht evaluiert. Dass viele der Proteine, die nur in den Überständen der Präzipitation identifiziert werden konnten, mit sehr wenigen Peptiden identifiziert wurden, deutete darauf hin, dass diese Proteine in sehr geringer Menge vorlagen. Die Identifikation solcher Proteine ist außerordentlich wichtig, da diesen niedrig-abundanten Proteinen häufig wichtige Funktionen zukommen (Domon und Aebersold 2006). Die massenspektrometrische Untersuchung sekretierter Proteine dient u.a. der Entdeckung von diagnostischen Biomarkern und Mediatoren in Pathomechanismen. Die meisten dieser wichtigen Faktoren (z.B. Zytokine und Interleukine) haben ein niedriges Molekulargewicht und liegen mit einer niedrigen Abundanz vor (Greening und Simpson 2010). Eine ideale Methode zur Aufreinigung des Probenmaterials von FKS würde deshalb nur hoch abundante Proteine entfernen, eine solche Methode steht jedoch bisher nicht zur Verfügung. In der aktuellen Literatur wird das Belassen, d.h. das NichtAbtrennen von hoch-abundanten Proteinen diskutiert (Domon und Aebersold 2006). Da im CPC-Medium aber nicht-endogene, hoch-abundante Proteine aus FKS, die massenspektrometrische Untersuchung von endogenen Proteinen erschweren, war hier eine Entfernung der hochabundanten Proteine sinnvoll.

Durch veränderte Bedingungen während der Zellkultur und die Präzipitation mit TCA-Aceton, konnte ein Großteil der verunreinigenden FKS-Proteine entfernt werden. Eine gänzliche Entfernung dieser Proteine aus dem CPC-Medium gelang nicht. Das Problem der Diskrimination zwischen Proteinen aus FKS und Proteinen aus der Probensubstanz kann durch Datenbanksuche, unter Zuhilfenahme der SILAC-Technologie oder durch eine serumfreie Zellkultur gelöst werden (Bunkenborg et al. 2010). Unter Nutzung der SILAC-Technologie zur Diskrimination von Kontaminanten werden SILAC-Aminosäuren in alle neu synthetisierten Proteine inkorporiert. Peptide mit unmarkierten Aminosäuren werden zwangsläufig als Kontaminanten klassifiziert. Durch diese metabolische Markierung können endogene Proteine auch im Hintergrund von FKS eindeutig nachgewiesen werden (Hathout 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine individualisierte Datenbanksuche entwickelt, die die SILAC-Methode zur Erstellung einer verbesserten Datenbanksuche nutzt, um die restlichen Proteine des FKS von endogenen Proteinen der CPCs zu unterscheiden (3.1.4). Dies ist eine einfache und sichere Möglichkeit, um die Proteine des FKS auszugrenzen. Die Möglichkeit, dass es mit dieser Strategie zu falsch negativen Identifizierungen kommen kann, konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden. Das Protein Cartilage Oligomeric Matrix Protein ist beispielsweise ein typisches Protein des Knorpelgewebes. In dem mit "schweren" SILAC-Aminosäuren markierten 2D-CPC-Medium und dem entsprechenden Sektretom war dieses Protein nicht metabolisch markiert und wurde deshalb durch die individualisierte Datenbanksuche zwangsläufig als Kontaminante kategorisiert. Da im Rahmen dieser Arbeit 3D-CPC-Zellen im entsprechenden Medium nicht metabolisch markiert werden konnten, blieb es unklar, ob Cartilage Oligomeric Matrix Protein tatsächlich im Sekretom der 3D-CPC-Zellen vorkam oder nur in FKS (beides "leichte" Aminosäuren). Ein Versuchsaufbau, bei dem auch die 3D-CPCs metabolisch markiert wären, war zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht möglich, da durch die Abteilung Orale Biologie und Geweberegeneration keine solchen CPCs zur Verfügung gestellt werden konnten.

Um die durch TCA-Aceton-Präzipitation konzentrierten und gereinigten Proteine des Sekretoms entsprechend ihrer molekularen Masse zu separieren, wurde die 1D-SDS-PAGE durchgeführt. Diese dient der Auftrennung der komplexen Probe nach ihrem Molekulargewicht. Die
Komplexität der Probe wird dadurch stark reduziert (Laemmli 1970). Je besser das komplexe Probenmaterial auftrennen werden kann, desto besser ist das Ergebnis bei der massenspektrometrischen Untersuchung. 1D-SDS-PAGE besitzt weiterhin die Vorteile, dass sie eine etablierte Methode in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Urlaub ist, und dass die Proteine in verschiedenen Molekulargewichtsbereichen getrennt voneinander in-Gel-hydrolysiert werden können, um anschließend einzelnd mit dem Massenspektrometer analysiert zu werden (23 Gelstückchen). Dieses bietet den entscheidenden Vorteil, dass nicht unbedingt die ganze Probe analysiert werden muss, sondern spezifische Bereiche nach Bedarf separat analysiert werden können. Eine Alternative zu dieser Methode ist die zweidimensionale Gelelektrophorese, welche die Proteine zusätzlich zu ihrer molekularen Masse auch entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt separiert. Diese Methode gibt zwar einen guten Überblick über den Proteingehalt im Medium, hat aber den Nachteil, dass Sie weniger reproduzierbare Ergebnisse liefert und dass ein Verlust an Proteinen des Probenmaterials damit verbunden ist. Zudem können hier nur sichtbare Proteinbereiche ("Spots") analysiert werden, Gegebenenfalls niedrig abundante Proteine, die kein Signal zeigen, werden nicht erfasst. Auch sind sehr hydrophobe Proteine oder Proteine mit extremen isoelektrischen Punkten mit der 2D-Gelelektrophorese schwerer nachzuweisen (Rehm und Letzel 2010). Eine weitere Alternative zur 1D-SDS-PAGE stellt die direkte Hydrolyse der Proteine in der Lösung selbst dar. Dazu werden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen z.B in Gegenward von Harnstoff mit Trypsin hydrolysiert. Da das zu erwartende Peptidgemisch zu komplex ist, um es mit nur einem Chromatographieschritt in das Massenspektrometer zu eluieren, kann eine sog. 2D-Chromatographie verwendet werden (1. Chromatographie starker Kationenaustauscher, 2. Umkehrphasen Chromatographie) (Washburn et al. 2001).

Aufgrund der hohen Komplexität der Probe und den zu erwartenden niedrig abundanten Proteinen wurde zur Detektion von Proteinen im Sekretom die LC-ESI-MS/MS-Technik eingesetzt. Diese Technik ermöglicht höchste Sensitivität. heutzutage die zur unvoreingenommenden (d.h. ohne Verwendung von Protein-spezifischen Antikörpern) Proteinidentifizerung. Für die massenspektrometrischen Messungen innerhalb dieser Arbeit standen ein *ESi-LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer* sowie ein ESI-Q-TOF-Massenspektrometer zur Verfügung. Das LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer verfügt über Fourier-Transformations (FT)-Analysator, einen der zum einen ein sehr hohes Auflösungsvermögen und zum anderen eine sehr hohe Massengenauigkeit ermöglicht. Das Instrument bietet ferner die Möglichkeit verschiedene Fragmentationsmethoden zur Sequenzierung der Peptide einzusetzen, nämlich CID in der linearen Ionenfalle oder HCD-Fragmentierung (*higher energy collision induced dissociation*) in einer separaten HCD-Kollisions-Zelle (Olsen et al. 2007). Da die zur Auswertung von SILAC-Proben entwickelte Software MaxQuant optimal für dieses Instrument geeignet ist, eignet es sich bestens zur Analyse von SILAC-Proben (Cox und Mann 2008). Im Vergleich zum Orbitrap-XL-Massenspektrometer hat das in der Arbeitsgemeinschaft von Prof. Dr. rer. nat. Henning Urlaub vorhandene ESI-Q-TOF-Massenspektrometer deutliche Nachteile und wurde für die Analyse dieser komplexen Probe nicht verwendet. Die Massengenauigkeit ist beispielsweise um den Faktor 10 kleiner und außerdem ist das Gerät im Vergleich zum Orbitrap-Gerät deutlich langsamer bei der Sequenzierung der Peptide. Durch die geringere Massengeanuigkeit des Q-TOF-Gerätes kann die MaxQuant Software nicht verwendet werden, so dass SILAC-Proben mit dieser Technik nicht ausgewertet werden können. Erst die neuste Generation der Q-TOF-Geräte (z.B. Q-Tof 5600 der Firma ABSciex oder Synapt G2 der Firma Waters GmbH) besitzt eine vergleichbare Massengenaugkeit im Vergleich zum Orbitrap-Gerät.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine gut funktionierende Methode für die qualitative und quantitative Untersuchung des Sekretoms von CPCs aufgezeigt werden. Sie dient als Grundlage, die an verschiedenen Stellen weiter modifiziert werden kann und muss. Bisher gibt es wenige publizierte Sekretomanalysen von Stamm- oder Progenitorzellen. Die Entwicklung dieser Methode kann deshalb auch als Grundlage für Sekretomanalysen anderer Stamm- oder Progenitorzellen dienen.

4.2 Proteinidentifikationen im Sekretom chondrogener Progenitorzellen

In dieser Studie konnten zahlreiche EZM-Bestandteile identifiziert werden, die Anhaltspunkte zum Verständnis der Zellbiologie von CPCs geben können. Weiterhin konnten verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren im Sekretom chondrogener Progenitorzellen identifiziert werden, die Einblick in die Signalwege des Metabolismus der EZM von CPCs geben. Eine Auswahl dieser Biomoleküle soll nachfolgend diskutiert werden. Für eine bessere Übersicht sind diejenigen Proteine, die im Sekretom von CPCs identifiziert werden konnten, unterstrichen:

An mesenchymalen Stammzellen konnte gezeigt werden, dass <u>TGF-ß1</u> der wichtigste Initiator der Chondrogenese ist. Die Proliferation der Chondroblasten und der Aufbau der EZM wird durch <u>TGF-ß1</u> stark stimuliert (Iwasaki et al. 1993; Van der Kraan et al. 2011). Latent TGF-ß-

binding Proteine können an TGF-ß binden und haben zwei bekannte Funktionen. Zum einen sind sie Regulatoren der TGF-ß-Verfügbarkeit und zum anderen strukturelle Bestandteile der EZM (Todorovic et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass CPCs nach Zugabe von <u>TGF-ß1</u> die Sekretion von Kollagen Typ II und perizellulären Kolagenfasern verstärken (Koelling et al. 2009). Dies spricht dafür, dass <u>TGF-ß1</u> ein entscheidender Faktor für die Entfaltung des chondrogenen Potentials von CPCs ist. Im Sekretom von CPCs konnte der Wachstumsfaktor <u>TGF-ß1</u> mit seinen zwei Partnern *Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1* und *Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1* und Latent-transforming dieser Zellen konnte demnach gezeigt werden, dass <u>TGF-ß1</u> ein Faktor ist, der von CPCs selbst sekretiert wird. Es ist denkbar, dass die Verfügbarkeit von <u>TGF-ß1</u> in CPCs durch die Latent-TGF-ß-binding-Proteine gehemmt wird, so dass das chondrogene Potential dieser Zellen unterdrückt wird. Dies ist ein Ansatzpunkt der weiterer Untersuchung bedarf.

Wnt-Proteine haben diverse Funktionen bei der Organogenese von Säugetieren. <u>Protein Wnt-5a</u> ist ein Faktor der bei der chondrogenen Differenzierung eine wichtige Rolle spielt (Kawakami et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass das <u>Protein Wnt-5a</u> in Chondrozyten die Produktion von Kollagen Typ II unterdrückt (Ryu und Chun 2006). Zusammen mit einigen Wnt-Proteinen konnten im osteoarthrotisch veränderten Knorpelgewebe auch eine Gruppe Wnt-assoziierter Rezeptoren, sog. *frizzled receptors*, nachgewiesen werden (Ryu und Chun 2006). Diese löslichen Proteine funktionieren als Modulatoren des Wnt-Signalweges und haben dadurch eine Rolle in der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung. Von <u>Secreted frizzled-related Protein 1</u> wird angenommen, dass dieses Protein eine Rolle in der Pathogenese der OA hat und einen potentiellen Biomarker für diese Erkrankung darstellt (Lane et al. 2006). Die Identifizierung von <u>Wnt-5a</u> und <u>Secreted frizzled-related Protein 1</u> im Sekretom chondrogener Progenitorzellen gibt den Hinweis, dass Wnt-5a eine Rolle im gestörten Kollagen-Typ-II-Metabolismus von CPCs spielen könnte.

Matrizelluläre Proteine sind mit der Chondrogenese in der Embryonalentwicklung assoziiert. Beim Erwachsenen werden sie mit einer Wundheilung in Verbindung gebracht. Durch die Bindung an Integrin-Rezeptoren kann z.B. das matrizelluläre <u>Protein CYR61</u> aktiviert werden und aktiviert so eine Signal-Transduktion, die in der Regulation von Zellproliferation, -migration, -adhäsion und –differenzierung mündet. Außerdem kann dieses Protein die Funktion zahlreicher Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie TGF-ß, BMP`s und Wnt-Proteinen regulieren. Weiterhin kann die Selbsterneuerungskapazität von Stammzellen durch matrizelluläre Proteine erhöht werden (Chen und Lau 2009). Die Identifikation von <u>Protein CYR61</u> im Sekretom von CPCs deutet auf ein chondrogenes Potential dieser Zellen hin und könnte in den Signalwegen von TGFß oder *Wnt-5a* eine Rolle spielen.

Weiterhin wurden einige Zytokine wie Gremlin-1, Gremlin-2 und Protein FAM3C im Sekretom chondrogener Progenitorzellen identifiziert. Gremlin-1 und Gremlin-2 sind beide BMP-Antagonisten. Über die Rolle von <u>Gremlin-2</u> im Knorpelgewebe ist bisher nichts bekannt. Gremlin-1 formt einen Komplex mit BMP-2, BMP-4 und BMP-7 und verhindert so die Bindung zwischen BMP und Rezeptor. Es kommt normalerweise in der Embryogenese in großen Konzentrationen vor, wird aber im Rahmen einer OA reaktiviert. Das Gleichgewicht von BMP und Gremlin-1 scheint im Rahmen einer OA gestört zu sein, deshalb wird Gremlin-1 als möglicher Angriffspunkt für die Therapie OA von angesehen (http://www.uniprot.org/uniprot/Q9H772, aufgerufen am 30.06.2011; Tardif et al. 2004). Hier könnte außerdem ein möglicher Angriffspunkt sein, das chondrogene Potential von CPCs zu erhöhen. Die Rolle von Gremlin-2 und FAM3C im EZM-Stoffwechsel von CPCs konnte durch die Literaturrecherche nicht gedeutet werden.

Im Sekretom von CPCs konnten zahlreiche Proteine des Kollagen-Proteoglykan-Netzwerkes ermittelt werden. Diese Proteine geben Einblick in die Struktur der EZM von CPCs nach 24h. Eine Auswahl dieser Proteine soll nachfolgend diskutiert werden:

Kollagen Typ II ist die Hauptkomponente des gesunden artikulären Knorpels, aber auch Kollagene vom Typ III, VI, IX, X, XI, XII und XIV spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Kollagennetzwerkes (Eyre 2002). Im Sekretom von CPCs konnten nach 24h Kollagene vom Typ I, III, V, VI, VII, VIII, XII und XIV nachgewiesen werden. Es deutet sich an, dass sich das Kollagennetzwerk von CPCs und gesunden Chondrozyten unterscheidet. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass es sich um die initiale Kollagenproduktion nach 24h handelt und dass auch gesunde Chondrozyten ex Vivo ihre Kollagenproduktion auf Kollagen Typ I, III und V umstellen (Domm et al. 2000). Bei gesunden bovinen Chondrozyten konnte erst nach 7 Tagen in Alginatkultur eine knorpelspezifische Anhäufung von Kollagen Typ II konnte sogar erst nach 14 Tagen in Alginatkultur nachgewiesen werden (Schulze et al. 2000). Auch im Sekretom gesunder Chondrozyten konnte nach 10 Tagen kein Kollagen Typ II nachgewiesen werden (Polacek et al. 2010). Bevor CPCs für eine Zellbasierte-Therapie der OA zum Einsatz

kommen, wäre also u.a. eine in-vivo-Untersuchung des Sekretoms dieser Zellen sinnvoll. Weiterhin wurden andere Wichtige Proteine des Kollagen-Proteoglykan-Netzwerkes identifiziert. Prominente Beispiele sind Dekorin, Lumikan, Tenaskine, Thrombospondine, Laminine und Integrine, Fibrillin-1, Fibulin-1, Collagen triple helix repeat-containing protein 1 und Versikan. Es zeigt sich, dass CPCs bereits nach 24h anfagen ein Netzwerk an Glykoproteinen zu bilden, dass viele Bestandteile der EZM von gesunden Chondrozyten beinhaltet. Tenascin z.B. ist ein Protein, von dem angenommen wird, dass es die Chondrogenese fördert und zu einem stabilen Kollagen-Proteoglykan-Netzwerk beiträgt (Okamura et al. 2010). Dekorin und Lumikan gehören zu einer Gruppe sog. Small leucin-rich proteoglycans (SLRP) und haben eine wichtige Rolle in der Stabilisierung der EZM (Knudson und Knudson 2001). Die im Sekretom von CPCs identifizierten Proteine <u>Thrombospondin-2</u> und <u>Thrombospondin-3</u> gehören zu einer Gruppe von fünf extrazellulären Glykoproteinen. Thrombospondin-2 wird eine Rolle in Wachstum und Regeneration von Knorpelgewebe zugesprochen, während über die Rolle von Thrombospondin-3 im Knorpelgewebe bisher nichts bekannt ist (Adams und Lawler 2004; Taylor et al. 2009). Fibulin-1 ist an der Formation von großen Proteoglykankomplexen beteiligt. Außerdem bindet Fibulin-1 die Aggrekanase ADAMTS-1. Es wird deshalb vermutet, dass diesem Protein eine Rolle bei der kontrollierten Degradierung des Proteoglykannetzwerkes zukommt. Fibulin-1 kann zahlreiche andere EZM-Proteine wie Fibronectin, Nidogen-1, Laminin-1 und Connective-tissue growth factor binden. Es wird deshalb vermutet, dass Fibulin-1 eine Funktion im Wachstum und bei der Proliferation von Gewebe zukommt (Timpl et al. 2003). Versikan ist ein Proteoglykan, das seine Rolle vornehmlich in der Matrix-Organisation während der Chondrogenese einnimmt. Im laufe der Chondrogenese nimmt die Versikan Produktion ab und wird im ausdifferenzierten Gewebe durch die Produktion von Aggrekan ersetzt (Knudson und Knudson 2001). Die Identifikation von Versikan im Sekretom von CPCs deutet darauf hin, dass CPCs ein hohes chondrogenes Potential aufweisen.

Proteasen haben eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes des EZM-Metabolismus. Einige prominente Beispiele dieser Enzyme konnten im Sekretom von CPCs identifiziert werden: <u>MMP-1</u> und <u>MMP-2</u>, <u>ADAMTSs</u>, zahlreiche <u>Cathepsine</u>, <u>Procollagen C-</u> <u>endopeptidase enhancer 1 und 2</u> sowie <u>Cystatin-C</u>. Die Aktivität dieser Proteine wird u.a. durch tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) reguliert (Goldring und Goldring 2007). Im Sekretom von CPCs konnten <u>TIMP-1 -2 und -3</u> identifiziert werden. Ob die Identifizierung dieser Proteine auf einen katabolen oder anabolen EZM-Metabolismus von CPCs oder auf ihr migratives Potential hinweist, konnte durch diese Untersuchung nicht geklärt werden.

Die Kommunikation zwischen Chondrozyten, sowie zwischen Chondrozyt und EZM ist für die Aufrechterhaltung der Homöostase im hyalinen Knorpelgewebe verantwortlich. Da Chondrozyten keine Zell-Zell Kontakte aufweisen, sind Zell-Matrix Interaktionen unabdinglich. Gestörte Zell-Matrix-Interaktionen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer OA (Goldring und Goldring 2007). Im Rahmen einer OA ändert sich z.B. die Expression des Integrin-Musters. Integrine fungieren als Rezeptoren für Kollagen Typ II und Fibronectin. Die Aktivierung dieser Rezeptoren stimuliert die Produktion von Proteasen, Zytokinen und Chemokinen. Laminine repräsentieren eine Gruppe von adhäsiven Glykoproteinen die Bindungen mit Integrinen, Kollagenen und Nidogenen eingehen. Interaktionen mit Laminin regulieren verschiedene zelluläre und physiologische Prozesse (Akalu und Brooks 2005). Es wird angenommen, dass Nidogene eine unterstützende Rolle in der embryonalen Entwicklung von Knorpelgewebe spielen. Im gesunden Knorpelgewebe kommen Nidogen-1 und Nidogen-2 vor. Im perizellulären Gewebe der späten Osteoarthrose konnte vermehrt Nidogen-2 nachgewiesen werden, während die Expression von Nidogen-1 hier abnahm. Eine Regenerationsaktivität dieser Proteine wird angenommen. Beide Nidogene konnten im Bereich der tiefen Fissuren, wo die Tidemark gebrochen ist, in sehr hohen Konzentrationen nachgewiesen werden (Kruegel et al. 2008). Im Sekretom von CPCs wurden zahlreiche Proteine ermittelt, die an Zell-Matrix Interaktionen beteiligt sind, z.B. einige Laminine, Integrine und Nidogen-2. Der Nachweis von Nidogen-2 im Sekretom von CPCs spricht dafür, dass diese erhöhte Konzentration durch die Sekretion von CPCs verursacht ist.

Durch die angewendete Methode zur Untersuchung des Sekretoms von CPCs wurden weiterhin zahlreiche intrazelluläre Proteine identifiziert. Dieses ist ein gängiges Phänomen bei der Untersuchung von Sekretomen und könnte durch den Bruch von Zellen bei der Lysierung oder durch Vesikel im Rahmen einer Exozytose begründet sein. Hathout beschreibt, dass trotz einer vorsichtigen Handhabung der Zell- und Probenpräparation bei der Untersuchung von Sekretomen zahlreiche nichtsekretierte Proteine im Medium von kultivierten Zellen detektiert werden konnten (Hathout 2007). Es konnte bisher nicht geklärt werden, ob das Aufkommen von intrazellulären Proteinen auf einen physiologischen Mechanismus zurückgeführt werden kann. In diesem Zusammenhang konnte 2002 erstmals ein nicht-klassischer sekretorischer Mechanismus (*nonclassical secretory pathway*) nachgewiesen werden. Ein Protein über das keine Information

über ein extrazelluläres Vorkommen bekannt war, wurde grün fluoreszierend markiert und konnte im Extrazellularraum von Ovarialzellen nachgewiesen werden (Tanudji et al. 2002; Hathout 2007). Auch für Interleukin-1ß konnte ein solcher Weg demonstriert werden. Dieses Phänomen wird auf den Transport durch Vesikel zurückgeführt (Rubartelli und Sitia 1991).

4.3 Differenzierung von CPCs und Erhöhung des chondrogenen Potentials

Chondrogene Progenitorzellen, die in einer 3D-Alginat-Kultur kultiviert werden, differenzieren innerhalb von 3 Wochen zu einem chondrozytenähnlichen Phänotyp (Koelling et al. 2009). Es stellte sich nun die Frage, ob diese Differenzierungstendenz der CPCs mittels Massenspektrometrie bestätigt werden konnte und ob diese Tendenz bereits durch die innerhalb von 24h sezernierten Proteine darzustellen ist (Abbildung 19). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das Sekretom von CPCs in 2D- und in 3D-Kultur, bereits nach 24h signifikant unterscheidet. Der quantitative Vergleich zeigte, dass einige Proteine im 3D-Medium signifikant häufiger und andere wiederum signifikant geringer exprimiert werden.

Einige **im 3D-Medium signifikant stärker exprimierte Proteine** weisen darauf hin, dass die Synthese der EZM im 3D-Medium aktiviert wird und das chondrogene Potential der CPCs durch die Differenzierung in Alginat erhöht wird. Die für diese These relevanten Funktionsweisen dieser Proteine sollen nachfolgend dargestellt werden (die im CPC-Medium quantifizierten Proteine sind unterstrichen):

<u>Chitinase-3-like Protein 1</u> wird auch Cartilage Glycoprotein 39 genannt und ist ein potentieller Biomarker, der bei OA in der synovialen Flüssigkeit nachgewiesen werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass <u>Chitinase-3-like protein 1</u> einen positiven Effekt auf die Proliferation und die Proteoglykansynthese des artikulären Knorpelgewebes ausübt. Bei der Aufrechterhaltung der Gewebe-Homöostase spielt es eine wichtige Rolle. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieses Protein im späten Stadium der Osteoarthrose signifikant weniger exprimiert wird (Knorr et al. 2003). Bei differenzierten CPCs wird dieses Protein stärker exprimiert. Dieses ist ein Indikator, dass differenzierte CPCs näher an gesunden Chondrozyten stehen, als undifferenzierte CPCs.

<u>Fibulin-1</u> ist ein struktureller Bestandteil der EZM und funktioniert als Ligand für die Organisation der Proteoglykane Aggrekan und Versikan. Die <u>Fibulin-1</u>-Expression ist im erwachsenen Knorpel sehr gering. Im unausgereiften Knorpelgewebe in Wachstumsfugen hingegen, findet eine signifikante Expression dieses Proteins statt. Es wird deshalb angenommen,

dass diesem Protein eine initiale Rolle bei der Organisation des Proteoglykannetzwerkes im Knorpelwachstum zukommt (Knudson und Knudson 2001).

Im 3D-Medium von CPCs werden die alpha-1 Kette von Kollagen XII sowie die alpha-1 Kette von Kollagen Typ III signifikant stärker exprimiert. Kollagen Typ III konnte in verschiedenen Studien im gesunden und im osteoarthrotisch veränderten Knorpelgewebe nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Kollagen Typ III und Kollagen Typ II in Fibrillen des gesunden artikulären Knorpels kopolymerisieren (Wu et al. 1996). Im an OA erkrankten Knorpelgewebe wird Kollagen Typ III von Chondrozyten nur in Anwesenheit von Kollagen Typ I synthetisiert (Aigner et al. 1993). Kollagen Typ XII gehört mit den Kollagenen vom Typ IX und XIV zu einer Gruppe von Kollagenen, die nicht kovalent in die EZM des artikulären Knorples eingebunden sind. Die Funktion von Kollagen Typ XII ist bisher nicht bekannt, es wird jedoch angenommen, dass es mit anderen kleinen Proteoglykanen wie Dekorin und Biglykan sowohl kooperieren als auch kompetitieren kann (Eyre 2002). Die Hochregulation von Kollagen Typ III und Typ XII könnte ein Hinweis auf eine bereits innerhalb von 24 Stunden beginnende, verstärkte Umstrukturierung des Kollagennetzwerkes in der dreidimensionelen Kultur sein. Generell kann ein stabiles Kollagennetzwerk erst nach 7 Tagen in Alginatkultur nachgewiesen werden (Schulze et al. 2001), so dass eine Hochregulierung dieser Fasern innerhalb von 24 Stunden nicht zu erwarten war.

Über <u>Collagen triple helix repeat-containing protein 1</u> im Knorpelgewebe ist wenig bekannt, es wird angenommen, dass dieses Protein als negativer Regulator eines Kollagenabbaus in der EZM von Knorpelgewebe agiert (http://www.uniprot.org/uniprot/Q96CG8; aufgerufen am 16.06.2011) und die Migration von Zellen fördert (Pyagay et al. 2005).

<u>Metalloproteinase inhibitor 3</u> (TIMP-3) ist ein Proteinasehemmer, der die Degeneration des artikulären Knorpels hemmt. Er bindet an Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP's) und Kollagenasen und deaktiviert sie. Es konnte gezeigt werden, dass <u>TIMP-3</u> im gesunden Knorpelgewebe in größeren Konzentrationen zu finden ist als im an OA erkrankten Knorpel (Morris et al. 2010).

Weiterhin werden durch die Differenzierung von CPCs auch Proteasen wie <u>ADMTS-1</u> und <u>Cathepsin D</u> hochreguliert, dieses entspricht auf den ersten Blick nicht der These, dass die Differenzierung von CPCs zu einer verminderten Degeneration des Gewebes führt. Die Hochregulierung dieser Proteine kann aber auch als Zeichen für eine Migration der Zellen interpretiert werden.

Eine definitive Prognose hinsichtlich der Matrixzusammensetzung und des Kollagennetzwerkes kann durch den Nachweis der genannten Proteine nach 24h nicht gegeben werden. Es zeichnet sich aber eine klare Tendenz, dass die Differenzierung von CPCs zu einer Matrix-Struktur führt, die näher in die Richtung von gesundem Knorpelgewebe rückt.

Weiterhin wurden durch die Differenzierung von CPCs einige Wachstumsfaktoren und mit Wachstumsfaktoren assoziierte Proteiene stärker exprimiert, die auf ein erhöhtes chondrogenes Potential von 3D-CPCs hinweisen. Die Literatur, die diese These stützt, soll im Folgenden dargestellt werden:

Insulin-like growth factors (IGF's) spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation des heranwachsenden Knorpelgewebes in Wachstumsfugen und in der Matrix-Homeostase des ausgewachsenen artikulären Knorpels. Diese Faktoren wiederum werden durch eine Gruppe von *IGF-binding-proteins* (IGFBP's) reguliert. Verschiedene dieser Faktoren können die IGF's entweder aktivieren oder hemmen. Das in 3D-CPC-Medium hochregulierte Protein <u>IGFBP-3</u> kann die IGF-Aktion modulieren und ist ein unabhängiger Ligand der als Signalmolekül fungieren kann. Es konnte zwar gezeigt werden, dass <u>IGFBP-3</u> im osteoarthrotisch veränderten Knorpel ist bisher jedoch nicht geklärt (Morales 2002; Hunziker et al. 2008). Bei Myoblasten konnte gezeigt werden, dass <u>IGFBP-3</u> einen stimulierenden Effekt auf die Zellproliferation ausübt (Foulstone et al. 2003).

<u>Pappalysin-1</u> ist eine Metalloproteinase, die die IGFBP's vom Typ 4 und Typ 5 spaltet, so dass IGF-1 aktiviert wird. Es wird angenommen, dass dieses Protein in proliferative Prozesse wie Wundheilung und die Remodellation von Knochengewebe involviert ist (Bischof und Tseng 1986).

<u>Adipocyte enhancer-binding protein 1</u>, ist ein Protein, das die Proliferation von Adipozyten verstärkt. In Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass das adipogene Potential dieser Zellen durch *Adipocyte enhancer-binding protein 1* erhöht wird (Freytag et al. 1994). Dies könnte einen Hinweis sein, dass nicht nur das chondrogene, sondern auch das adipogene Potential von CPCs durch die Differenzierung in Alginat erhöht wird.

Der Wachstumsfaktor <u>Growth arrest-specific protein 6</u> scheint bei Zellwachstum, -adhäsion und –migration eine wichtige Rolle zu spielen. Weiterhin hat dieses Protein einen positiven Effekt auf die Differenzieung von Fibroblasten (Maree et al. 2007). Das Protein <u>Coiled-coil domain-</u> <u>containing protein 80</u> kann an zahlreiche Proteine der EZM binden und verstärkt den Aufbau der EZM. Im Haarfollikel von Mäusen konnte gezeigt werden, dass dieses Protein einen positiven Effekt auf die Differenzierung von Osteoblasten hat (Liu et al. 2004). Dieser Aspekt könnte einen Hinweis geben, dass durch Differenzierung in Alginat nicht nur das chondrogene, sondern auch das osteogene Potential der CPCs erhöht wird.

<u>Midikine</u> ist ein Wachstumsfaktor der Wachstum und Migration verschiedener Zelltypen reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass durch *Midikine* die Proliferation von Chondrozyten *in vivo* und *in vitro* stimuliert wird. Es wird angenommen, dass *Midikine* zur Regeneration von erkranktem Knorpel eingesetzt werden kann (Zhang et al. 2010).

<u>Stanniocalcin-1</u> ist ein Protein, das eine Rolle in der Regulation des Wachstums während der Knochenentwicklung einnimmt. Es wird zudem eine Rolle in der chondrogenen und myogenen Differenzierung angenommen. Während der Knochenentwicklung konnte <u>Stanniocalcin</u> auch in chondrogenen Progenitorzellen des Knochengewebes, Chondrozyten und Osteoblasten nachgewiesen werden. Die genaue Funktion dieses Proteins ist noch unbekannt (Filvaroff et al. 2002). Die verstärkte Sekretion von <u>Stanniocalcin-1</u> in differenzierten CPCs weist auf ein erhöhtes osteogenes Potential dieser Zellen hin.

Die gezeigten Funktionsweisen der Proteine, die von CPCs im dreidimensionalen Medium in signifikant größerer Menge sezerniert werden, zeichnen das Bild einer verstärkten Differenzieung des Gewebes mit einer Erhöhung des chondrogenen und migrativen Potentials dieser Zellen. Andere Proteine wie z.B. <u>Gelsolin</u> oder <u>Pentraxin-related protein PTX3</u> ergeben in diesem Kontext keinen Sinn. Die Literaturrecherche dieser Proteine gibt aber auch keinen Hinweis auf einen verringerten oder gestörten Metabolismus innerhalb der EZM.

Bei den *in 3D-Medium signifikant geringer exprimierten Proteinen* handelt es sich hingegen vornehmlich um Proteasen und Mediatoren, die auf einen katabolen EZM-Stoffwechsel hinweisen. Die in der Literatur beschriebenen relevanten Funktionsweisen dieser Proteine sollen nachfolgend dargestellt werden:

Das Protein <u>Interstitial collagenase</u> gehört zu der Familie der Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP). Es lysiert Kollagene vom Typ I, II, III, VII und X und spielt eine zentrale Rolle bei der Degeneration der Extrazellulären Matrix von Knorpelgewebe (Desrochers et al. 1991).

Auch <u>Cathepsin L1</u> ist eine Protease die an der Degeneration von Gewebe beteiligt ist und kann mit Cystatin einen Komplex bilden (Majerle und Jerala 2003). <u>Cystatin-C</u> wird ebenfalls signifikant geringer exprimiert. Unter physiologischen Bedingungen wird die Aktivität von Cystein-Proteasen (Cathepsine) durch verschiedene Cystatine reguliert. Insbesonder <u>Cystatin-C</u> wird mit OA in Verbindung gebracht. Es wird angenommen, dass die Herabregulierung von Cystatin-C mit einer Degeneration von artikulärem Knorpel korreliert (Morko et al. 2004).

<u>Galectin-3-binding protein</u> konnte in Fibroblasten, Makrophagen, Osteoklasten und im zerstörten osteoarthrotisch veränderten Knorpelgewebe nachgewiesen werden und ist ein potentieller Biomarker für rheumatische Erkrankungen. Eine Rolle in der Immunabwehr wird angenommen. Da <u>Galectin-3-binding Protein</u> nicht nur Galectin-3, sondern auch Kollagen Typ V, Kollagen Typ VI, ß-Integrine und Fibronektin binden kann, wird eine Beteiligung dieses Proteins bei der Degeneration der EZM angenommen (Ohshima et al. 2003).

<u>Metalloproteinase inhibitor 1</u> (TIMP-1) und <u>Metalloproteinase inhibitor 2</u> (TIMP-2) bilden Komplexe mit MMP'S und deaktivieren sie irreversibel (Goldring und Goldring 2007). Die Herabregulierung dieser Proteine durch die Differenzierung von CPCs erscheint zunächst widersprüchlich. Es konnte aber in mehreren Studien auf RNA-Ebene gezeigt werden, dass die Expression von <u>TIMP-1</u> im Rahmen der Gewebezerstörung einer OA heraufreguliert wird (Takahashi et al. 1999). Für <u>TIMP-2</u> wird angenommen, dass es die Proliferation von Zellen in quiescenten Geweben unterdrückt

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=7 077, aufgerufen am 20.06.2011). Eine katabole Rolle dieser Proteine bei der Differenzierung von CPCs ist demnach denkbar.

Über die Rolle von <u>Insulin-like growth factor-binding protein 6</u> (IGFBP-6) im artikulären Knorpel ist wenig bekannt. In Osteoblasten ist IGFBP-6 ein Suppressor der IGF-2-Aktivität. Eine Zellproliferation wird dadurch gehemmt (Reid 2006).

<u>Vasorin</u> ist ein Protein das auf der oberfläche von Zellen lokalisiert ist und erstmals 2004 in Blutgefäßen nachgewisen wurde. Es kann direkt an den Wachstumsfaktor TGF-ß binden und so seine Wirkung abschwächen (Ikeda et al. 2004). Über die Wirkung von Vasorin im Rahmen einer OA ist bisher nichts bekannt.

Ein weiterer Faktor der der Regulierung von TGF-ß dient, ist das ebenfalls signifikant herabregulierte <u>Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1</u>. Dieser Faktor bindet TGF-ß und inhibiert so seine Wirkung (Le Goff et al. 2008).

Das Protein <u>Sulfhydryl oxidase 1</u> ist ein weiterer Indikator, dass differenzierte CPCs ein proliferatives Potential aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Protein in quieszenten Zellen, nicht aber in proliferierenden Zellen, exprimiert wird (Coppock et al. 2000).

Durch die vorliegende Studie konnte eine Tendenz gezeigt werden, dass CPCs das Potential haben ein Reparationsgewebe zu bilden, das dem gesunden hyalinen Knorpelgewebe ähnelt und dass dieses Potential durch die Differenzierung dieser Zellen noch erhöht wird. Diese Tendenz die sich bereits nach 24h andeutet, sollte durch eine Weiterentwicklung der Methode im Sinne einer Untersuchung des Sekretoms nach mehreren Tagen, bzw. Wochen bestätigt werden.

4.4 Vergleich der Sekretome von CPCs und Chondrozyten

Im Sekretom kultivierter Chondrozyten konnten mittels LC/MS-MS 94 Proteine ermittelt werden (Polacek et al. 2010). Von diesen 94 Proteinen konnten 56 Proteine im Sekretom chondrogener Progenitorzellen identifiziert werden (Tabelle 4).

Identifiziertes Protein	UniProt-Name
14-3-3 protein theta	1433T_HUMAN
Annexin A2	ANXA2_HUMAN
Apolipoprotein D	APOD_HUMAN
Beta-2-microglobulin	B2MG_HUMAN
Complement C1r subcomponent	C1R_HUMAN
Complement C1s subcomponent	C1S_HUMAN
Cathepsin B	CATB_HUMAN
Cathepsin D	CATD_HUMAN
Cathepsin Z	CATZ_HUMAN
Coiled-coil domain-containing protein 80	CCD80_HUMAN
CD109 antigen	CD109_HUMAN
Complement factor H	CFAH_HUMAN
Chitinase-3-like protein 1	CH3L1_HUMAN
Clusterin	CLUS_HUMAN
Collagen alpha-1(I) chain	CO1A1_HUMAN
Collagen alpha-2(I) chain	CO1A2_HUMAN
Collagen alpha-2(V) chain	CO5A2_HUMAN
Collagen alpha-1(VI) chain	CO6A1_HUMAN
Collagen alpha-3(VI) chain	CO6A3_HUMAN
Collagen alpha-1(XII) chain	COCA1_HUMAN
Calsyntenin-1	CSTN1_HUMAN
Cystatin-C	CYTC_HUMAN
Fibrillin-1	FBN1_HUMAN
Follistatin-related protein 1	FSTL1_HUMAN
Growth arrest-specific protein 6	GAS6_HUMAN
Serine protease HTRA1	HTRA1_HUMAN
Insulin-like growth factor-binding protein 4	IBP4_HUMAN
Insulin-like growth factor-binding protein 6	IBP6_HUMAN

Laminin subunit alpha-2	LAMA2_HUMAN
Laminin subunit beta-1	LAMB1_HUMAN
Laminin subunit gamma-1	LAMC1_HUMAN
L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA_HUMAN
Lumican	LUM_HUMAN
Lactadherin	MFGM_HUMAN
72 kDa type IV collagenase precursor	MMP2_HUMAN
Epididymal secretory protein E1	NPC2_HUMAN
Olfactomedin-like protein 3	OLFL3_HUMAN
Plasminogen activator inhibitor 1	PAI1_HUMAN
Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	PCOC1_HUMAN
Basement membrane-specific heparan sulfate	
proteoglycan core protein	PGBM_HUMAN
Decorin	PGS2_HUMAN
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB_HUMAN
Profilin-1	PROF1_HUMAN
Pentraxin-related protein PTX3	PTX3_HUMAN
Sulfhydryl oxidase	QSOX1_HUMAN
Ribonuclease 4	RNAS4_HUMAN
SPARC	SPRC_HUMAN
Stanniocalcin-2	STC2_HUMAN
Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin	
domain-containing protein 1	SVEP1_HUMAN
Tetranectin	TETN_HUMAN
Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1_HUMAN
Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2 HUMAN

 Tabelle 4: Schnittmenge der Proteinidentifikationen im Sekretom gesunder Chondrozyten und von CPCs

38 Proteine konnten im Sekretom gesunder Chondrozyten aber nicht im Sekretom chondrogener Progenitorzellen identifiziert werden (Tabelle-ST-7 im Anhang).

Durch den Vergleich der Sekretome von gesunden Chondrozyten und von CPCs konnte gezeigt werden, dass CPCs zahlreiche EZM-Bestandteile sezernieren, die Bestandteil einer gesunden EZM sind. Dies spricht dafür, dass CPCs ein hohes Potential aufweisen eine EZM zu bilden, die in einem Reparationsgewebe mündet, dass dem gesunden Knorpelgewebe ähnelt. Mehr als die Hälfte der Proteine des Sekretoms gesunder Chondrozyten konnte im Sekretom von CPCs reproduziert werden. Bei den nicht reproduzierten Proteinen konnten häufig andere Mitglieder einer Proteinfamilie identifiziert werden. In der EZM gesunder Chondrozyten konnte beispielsweise das Protein *Chitinase-3-like protein 2* identifiziert werden. Im Sekretom von CPCs

wurde hingegen *Chitinase-3-like protein 1* identifiziert. Es zeigt sich, dass die EZM von gesunden Chondrozyten und CPCs eine große Ähnlichkeit aufweist.

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglichte, das Sekretom von CPCs mittels MS zu untersuchen. Eine Weiterentwicklung dieser Methode ist insofern sinnvoll, dass bisher nur die innerhalb von 24h sekretierten Proteine erfasst werden können. Dieses Ziel könnte durch die Etablierung einer serumfreien Zellkultur für CPCs erreicht werden. Ein weiteres Problem, dass sich aus der Anreicherung der Zellkultur mit FKS ergibt, ist die Diskrimination zwischen Kontaminanten aus FKS und Identifikationen im CPC-Medium. Die Methode könnte deshalb durch eine andere SILAC-Strategie modifiziert werden. Hierbei sollte die 3D-Kultur ebenfalls mit SILAC-Aminosären markiert werden um noch sicherer zwischen Kontaminanten aus FKS und Proteinidentifikationen im CPC-Medium unterscheiden zu können. Die Weiterentwicklung dieser Methode dient nicht nur der Untersuchung von CPCs, sondern könnte für andere Progenitor- oder Stammzell-Untersuchungen angewendet oder modifiziert werden.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der Osteoarthrose-Therapie sind Forschungen auf dem Gebiet des "*Tissue Engineerings*" erfolgsversprechend. In diesem Zusammenhang gibt es Hinweise, dass chondrogene Progenitorzellen in Zukunft genutzt werden könnten, um defektes Knorpelgewebe im Sinne einer zell-basierten Therapie zu regenerieren (Koelling und Miosge 2009). Auf dem Weg zu diesem Ziel, ist es von großer Bedeutung, die CPCs dahingehend zu manipulieren, dass sie EZM-Bestandteile sezernieren, die zum Aufbau eines Reparationsgewebes führen, das gesundem Knorpelgewebe ähnelt.

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse von in Alginat differenzierten und undifferenzierten chondrogenen Progenitorzellen entwickelt. Dafür wurde der Proteingehalt einer 2D-Zellkultur ("schwer" markierte SILAC-Aminosäuren) und der Proteingehalt einer 3D-Alginat-Zellkultur ("leichte" Aminosäuren) mittels TCA-Aceton-Präzipitation aufbereitet, extrahiert, auf ein 1D-SDS-PAGE-Gel aufgetragen, mit Trypsin verdaut und anschließend mit LC-MS/MS analysiert. Es wurde eine individualisierte Datenbanksuche entwickelt, die der Diskrimination von Kontaminanten diente.

Durch die qualitative Analyse des Sekretoms von CPCs konnte gezeigt werden, dass CPCs eine EZM produzieren können, die der EZM von gesundem Knorpelgewebe ähnelt. Auch die Identifikation von EZM-Bestandteilen, Signal Proteinen und Wachstumsfaktoren gab einige aufschlussreiche Informationen. Insbesondere ergaben sich Hinweise, dass Faktoren wie TGF-ß1, *Growth arrest specific Protein 6, Midikine* und *Protein CYR61* das chondrogene Potential von CPCs verstärken könnten. Das Protein *Wnt-5a* könnte eine Rolle im gestörten Kollagen-Typ-II-Metabolismus von CPCs spielen.

Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass durch die Differenzierung der CPCs in 3D-Alginat-Kultur einige Proteine stärker exprimiert werden, die für die Regeneration von an OA erkranktem Knorpel von Bedeutung sind und die Expression anderer Proteine unterdrückt wird, deren Funktionen einen katabolen Stoffwechsel indizieren.

Die vorliegenden Ergebnisse stützen die Vermutung, dass CPCs in Zukunft für eine zell-basierte Therapie der Osteoarthrose angewendet werden können. Die Entwicklung einer Methode zur qualitativen und quantitativen Untersuchung der Sekretome von undifferenzierten und differenzierten CPCs mittels Massenspektrometrie soll als Grundlage dienen, die auch für die Untersuchung anderer Progenitor- oder Stammzellen herangezogen werden kann.

76

6 Literaturverzeichnis

Adams JC, Lawler J (2004): The thrombospondins. Int J Biochem Cell Biol 36: 961-968

- Aigner T, Bertling W, Stoss H, Weseloh G, von der Mark K (1993): Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. J Clin Invest <u>91</u>: 829-837
- Akalu A, Brooks PC: Matrix, extracellular and interstitial; in: Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine; hrsg. v. Meyers RA; Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2005, 45-70
- Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, et al. (1986): Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. Arthritis Rheum <u>29</u>: 1039-1049
- Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B (2007): Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. Anal Bioanal Chem <u>389</u>: 1017-1031
- Bischof P, Tseng L (1986): In vitro release of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) by human endometrial cells. Am J Reprod Immunol Microbiol <u>10</u>: 139-142
- Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H: Pathologie, 4. Auflage; Urban & Fischer Verlag, München 2008
- Boersema PJ, Raijmakers R, Lemeer S, Mohammed S, Heck AJ (2009): Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. Nat Protoc <u>4</u>: 484-494
- Bunkenborg J, García GE, Paz MIP, Andersen JS, Molina H (2010): The minotaur proteome: Avoiding cross-species identifications deriving from bovine serum in cell culture models. Proteomics <u>10</u>: 3040-3044
- Cawston TE, Wilson AJ (2006): Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. Best Pract Res Clin Rheumatol <u>20</u>: 983-1002
- Chen CC, Lau LF (2009): Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. Int J Biochem Cell Biol <u>41</u>: 771-783
- Chen EI, Yates JR (2007): Cancer proteomics by quantitative shotgun proteomics. Mol Oncol <u>1</u>: 144-59
- Chen Y-Y, Lin S-Y, Yeh Y-Y, Hsiao H-H, Wu C-Y, Chen S-T, Wang AHJ (2005): A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum. Electrophoresis <u>26</u>: 2117-2127

- Clegg GA, Dole M (1971): Molecular beams of macroions. 3. Zein and polyvinylpyrrolidone. Biopolymers <u>10</u>: 821-6
- Coppock D, Kopman C, Gudas J, Cina-Poppe DA (2000): Regulation of the quiescence-induced genes: quiescin Q6, decorin, and ribosomal protein S29. Biochem Biophys Res Commun 269: 604-610
- Cox J, Mann M (2008): MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nat Biotech <u>26</u>: 1367-1372
- Cox J, Matic I, Hilger M, Nagaraj N, Selbach M, Olsen JV, Mann M (2009): A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. Nat. Protocols <u>4</u>: 698-705
- De Ceuninck F, Lesur C, Pastoureau P, Caliez A, Sabatini M (2004): Culture of chondrocytes in alginate beads. Methods Mol Med <u>100</u>: 15-22
- Docheva D, Padula D, Popov C, Weishaupt P, Pragert M, Miosge N, Hickel R, Bocker W, Clausen-Schaumann H, Schieker M (2010): Establishment of immortalized periodontal ligament progenitor cell line and its behavioural analysis on smooth and rough titanium surface. Eur Cell Mater <u>19</u>: 228-241
- Domm C, Fay J, Schünke M, Kurz B (2000): Die Redifferenzierung von dedifferenzierten Gelenkknorpelzellen in Alginatkultur. Orthopade <u>29</u>: 91-99
- Domon B, Aebersold R (2006): Mass Spectrometry and Protein Analysis. Science 312: 212-217
- Eyre D (2002): Collagen of articular cartilage. Arthritis Res 4: 30-35
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science <u>246</u>: 64-71
- Filvaroff EH, Guillet S, Zlot C, Bao M, Ingle G, Steinmetz H, Hoeffel J, Bunting S, Ross J, Carano RA (2002): Stanniocalcin 1 alters muscle and bone structure and function in transgenic mice. Endocrinology <u>143</u>: 3681-3690
- Foulstone EJ, Savage PB, Crown AL, Holly JM, Stewart CE (2003): Role of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) in the differentiation of primary human adult skeletal myoblasts. J Cell Physiol <u>195</u>: 70-79
- Freytag SO, Paielli DL, Gilbert JD (1994): Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. Genes Dev <u>8</u>: 1654-1663
- Gnatenko DV, Perrotta PL, Bahou WF (2006): Proteomic approaches to dissect platelet function: Half the story. Blood <u>108</u>: 3983-3991

Goldring MB, Goldring SR (2007): Osteoarthritis. J Cell Physiol 213: 626-34

- Gomez A, Tang K (1994): Charge and fission of droplets in electrostatic sprays. Phys Fluids <u>6</u>: 404-414
- Greening DW, Simpson RJ (2010): A centrifugal ultrafiltration strategy for isolating the lowmolecular weight (<or=25K) component of human plasma proteome. J Proteomics <u>73</u>: 637-48
- Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, Pisetsky DS, Setton LA, Weinberg JB (2004): The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. Clin Orthop Relat Res <u>423</u>: 17-26
- Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R (1999): Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. Nat Biotechnol <u>17</u>: 994-999
- Hathout Y (2007): Approaches to the study of the cell secretome. Expert Rev Proteomics <u>4</u>: 239-248
- Häuselmann HJ, Masuda K, Hunziker EB, Neidhart M, Mok SS, Michel BA, Thonar EJ (1996): Adult human chondrocytes cultured in alginate form a matrix similar to native human articular cartilage. Am J Physiol <u>271</u>: 742-752
- Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ (1994): Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. J Cell Sci <u>107</u>: 17-27
- Hayes AJ, Hall A, Brown L, Tubo R, Caterson B (2007): Macromolecular organization and in vitro growth characteristics of scaffold-free neocartilage grafts. J Histochem Cytochem 55: 853-866
- Heinegard D, Saxne T (2011): The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. Nat Rev Rheumatol <u>7</u>: 50-56
- Henzel WJ, Watanabe C, Stults JT (2003): Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. J Am Soc Mass Spectrom <u>14</u>: 931-942
- Hermansson M, Sawaji Y, Bolton M, Alexander S, Wallace A, Begum S, Wait R, Saklatvala J (2004): Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin betaA (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. J Biol Chem <u>279</u>: 43514-43521
- Huang W, Sherman BT, Lempicki RA (2009): Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc <u>4</u>: 44-57
- Hunt DF, Sethi SK, Shabanowitz J (1980): Studies of negative ions by collision-induced decomposition and hydrogen-deuterium exchange techniques. Environ Health Perspect <u>36</u>: 33-38

- Hunziker EB, Kapfinger E, Martin J, Buckwalter J, Morales TI (2008): Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) is closely associated with the chondrocyte nucleus in human articular cartilage. Osteoarthritis Cartilage <u>16</u>: 185-194
- Ikeda Y, Imai Y, Kumagai H, Nosaka T, Morikawa Y, Hisaoka T, Manabe I, Maemura K, Nakaoka T, Imamura T (2004): Vasorin, a transforming growth factor beta-binding protein expressed in vascular smooth muscle cells, modulates the arterial response to injury in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A <u>101</u>: 10732-10737
- Iribarne J (1976): On the evaporation of small ions from charged droplets. J Chem Phys 64: 2287
- Iwasaki M, Nakata K, Nakahara H, Nakase T, Kimura T, Kimata K, Caplan AI, Ono K (1993): Transforming growth factor-beta 1 stimulates chondrogenesis and inhibits osteogenesis in high density culture of periosteum-derived cells. Endocrinology 132: 1603-1608
- Jacenko O (2000): Genetic-engineered models of skeletal diseases Collagen type X. Methods Mol Biol <u>137</u>: 471-90
- Jay GD, Torres JR, Rhee DK, Helminen HJ, Hytinnen MM, Cha CJ, Elsaid K, Kim KS, Cui Y, Warman ML (2007): Association between friction and wear in diarthrodial joints lacking lubricin. Arthritis Rheum <u>56</u>: 3662-3669
- Kashyap MK, Harsha HC, Renuse S, Pawar H, Sahasrabuddhe NA, Kim MS, Marimuthu A, Keerthikumar S, Muthusamy B, Kandasamy K (2010): SILAC-based quantitative proteomic approach to identify potential biomarkers from the esophageal squamous cell carcinoma secretome. Cancer Biol Ther <u>10</u>: 796-810
- Kawakami Y, Wada N, Nishimatsu SI, Ishikawa T, Noji S, Nohno T (1999): Involvement of Wnt-5a in chondrogenic pattern formation in the chick limb bud. Dev Growth Differ <u>41</u>: 29-40
- Khan IM, Williams R, Archer CW (2009): One flew over the progenitor's nest: migratory cells find a home in osteoarthritic cartilage. Cell stem cell <u>4</u>: 282-4
- Knorr T, Obermayr F, Bartnik E, Zien A, Aigner T (2003): YKL-39 (chitinase 3-like protein 2), but not YKL-40 (chitinase 3-like protein 1), is up regulated in osteoarthritic chondrocytes. Ann Rheum Dis <u>62</u>: 995-998
- Knudson CB, Knudson W (2001): Cartilage proteoglycans. Semin Cell Dev Biol 12: 69-78
- Koelling S, Miosge N (2009): Stem cell therapy for cartilage regeneration in osteoarthritis. Expert Opin Biol Ther <u>9</u>: 1399-405
- Koelling S, Kruegel J, Klinger M, Schultz W, Miosge N (2008): Collagen IX in weight-bearing areas of human articular cartilage in late stages of osteoarthritis. Arch Orthop Trauma Surg <u>128</u>: 1453-1459

- Koelling S, Kruegel J, Irmer M, Path JR, Sadowski B, Miro X, Miosge N (2009): Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis. Cell stem cell <u>4</u>: 324-335
- Kruegel J, Sadowski B, Miosge N (2008): Nidogen-1 and nidogen-2 in healthy human cartilage and in late-stage osteoarthritis cartilage. Arthritis Rheum <u>58</u>: 1422-1432
- Kuroda S, Tanimoto K, Izawa T, Fujihara S, Koolstra JH, Tanaka E (2009): Biomechanical and biochemical characteristics of the mandibular condylar cartilage. Osteoarthritis Cartilage <u>17</u>: 1408-1415
- Kurz B, Lemke AK, Fay J, Pufe T, Grodzinsky AJ, Schunke M (2005): Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury. Ann Anat <u>187</u>: 473-85
- Laemmli UK (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature <u>227</u>: 680-685
- Lane NE, Lian K, Nevitt MC, Zmuda JM, Lui L, Li J, Wang J, Fontecha M, Umblas N, Rosenbach M, de Leon P, Corr M (2006): Frizzled-related protein variants are risk factors for hip osteoarthritis. Arthritis Rheum <u>54</u>: 1246-1254
- Le Goff C, Morice-Picard F, Dagoneau N, Wang LW, Perrot C, Crow YJ, Bauer F, Flori E, Prost-Squarcioni C, Krakow D (2008): ADAMTSL2 mutations in geleophysic dysplasia demonstrate a role for ADAMTS-like proteins in TGF-beta bioavailability regulation. Nat Genet <u>40</u>: 1119-1123
- Loeser RF (2000): Chondrocyte integrin expression and function. Biorheology 37: 109-16
- Loeser RF (2006): Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. Arthritis Rheum <u>54</u>: 1357-1360
- Lohmander LS, Roos EM (2007): Clinical update: treating osteoarthritis. Lancet 370: 2082-2084
- Majerle A, Jerala R (2003): Protein inhibitors form complexes with procathepsin L and augment cleavage of the propeptide. Arch Biochem Biophys <u>417</u>: 53-58
- Mann M, Wilm M (1994): Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. Anal Chem <u>66</u>: 4390-4390
- Marcotte EM (2007): How do shotgun proteomics algorithms identify proteins. Nat Biotech <u>25</u>: 755-757
- Maree AO, Jneid H, Palacios IF, Rosenfield K, MacRae CA, Fitzgerald DJ (2007): Growth arrest specific gene (GAS) 6 modulates platelet thrombus formation and vascular wall homeostasis and represents an attractive drug target. Curr Pharm Des <u>13</u>: 2656-2661
- Meisinger C, Sickmann A, Pfanner N (2008): The mitochondrial proteome: from inventory to function. Cell <u>134</u>: 22-24

- Millward-Sadler SJ, Salter DM (2004): Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction. Ann Biomed Eng <u>32</u>: 435-446
- Morales TI (2002): The insulin-like growth factor binding proteins in uncultured human cartilage: increases in insulin-like growth factor binding protein 3 during osteoarthritis. Arthritis Rheum <u>46</u>: 2358-2367
- Mori M, Nakajima M, Mikami Y, Seki S, Takigawa M, Kubo T, Ikegawa S (2006): Transcriptional regulation of the cartilage intermediate layer protein (CILP) gene. Biochem Biophys Res Commun <u>341</u>: 121-127
- Morko JP, Soderstrom M, Saamanen AM, Salminen HJ, Vuorio EI (2004): Up regulation of cathepsin K expression in articular chondrocytes in a transgenic mouse model for osteoarthritis. Ann Rheum Dis <u>63</u>: 649-655
- Morris KJ, Cs-Szabo G, Cole AA (2010): Characterization of TIMP-3 in human articular talar cartilage. Connect Tissue Res <u>51</u>: 478-490
- Nesvizhskii AI, Aebersold R (2005): Interpretation of shotgun proteomic data: the protein inference problem. Mol Cell Proteomics <u>4</u>: 1419-40
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis <u>9</u>: 255-262
- Ohshima S, Kuchen S, Seemayer CA, Kyburz D, Hirt A, Klinzing S, Michel BA, Gay RE, Liu FT, Gay S, Neidhart M (2003): Galectin 3 and its binding protein in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum <u>48</u>: 2788-2795
- Okamura N, Hasegawa M, Nakoshi Y, Iino T, Sudo A, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Uchida A (2010): Deficiency of tenascin-C delays articular cartilage repair in mice. Osteoarthritis Cartilage <u>18</u>: 839-848
- Olsen JV, Macek B, Lange O, Makarov A, Horning S, Mann M (2007): Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. Nat Methods <u>4</u>: 709-712
- Ong SE, Mann M (2007): A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). Nat. Protocols <u>1</u>: 2650-2660
- Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M (2002): Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. Mol Cell Proteomics <u>1</u>: 376-386
- Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ (1993): Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. Curr Biol <u>3</u>: 327-332

- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. ELECTROPHORESIS 20: 3551-67
- Polacek M, Bruun JA, Johansen O, Martinez I (2010): Differences in the secretome of cartilage explants and cultured chondrocytes unveiled by SILAC technology. J Orthop Res <u>28</u>: 1040-9
- Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S (2001): Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. Clin Orthop Relat Res: 26-33
- Prestel U: Effekte eines Knorpelpräparates bei der Gonarthrose nach zweimonatigem Follow-up eine randomisierte, placebo kontrollierte Doppel-Blind-Studie. Med. Diss. Freiburg i. Br. 2007
- Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB (2006): Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. Osteoarthritis Cartilage <u>14</u>: 13-29
- Pulai JI, Chen H, Im HJ, Kumar S, Hanning C, Hegde PS, Loeser RF (2005): NF-kappa B mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments. J Immunol <u>174</u>: 5781-5788
- Pyagay P, Heroult M, Wang Q, Lehnert W, Belden J, Liaw L, Friesel RE, Lindner V (2005): Collagen triple helix repeat containing 1, a novel secreted protein in injured and diseased arteries, inhibits collagen expression and promotes cell migration. Circ Res <u>96</u>: 261-268
- Rehm H, Letzel T: Der Experimentator: Proteinbiochemie/ProteomicsSpektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2010
- Reid IR: IV. Pathogenesis; in: Dynamics of bone and cartilage metabolism; hrsg. v. Seibel MJ,Robins SP und Bilezikian JP; Academic Press Inc., Burlington 2006, 221-223
- Riede U, Bianchi L, Schaefer H: Allgemeine und spezielle Pathologie, 5. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2004
- Roberts S, Genever P, McCaskie A, Bari CD (2011): Prospects of stem cell therapy in osteoarthritis. Regen Med <u>6</u>: 351-366
- Roepstorff P, Fohlman J (1984): Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. Biomed Mass Spectrom <u>11</u>: 601
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S (2004): Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents. Mol Cell Proteomics <u>3</u>: 1154-1169
- Rubartelli A, Sitia R (1991): Interleukin 1 beta and thioredoxin are secreted through a novel pathway of secretion. Biochem Soc Trans <u>19</u>: 255-259

- Ryu JH, Chun JS (2006): Opposing roles of WNT-5A and WNT-11 in interleukin-1beta regulation of type II collagen expression in articular chondrocytes. J Biol Chem <u>281</u>: 22039-22047
- Schmelzer C: Massenspektrometrische Charakterisierung von Proteinhydrolysaten: Verdaustudien an β-Casein und Strukturuntersuchungen an Elastin. Nat. Diss. Halle-Wittenberg 2007
- Schmidt C, Urlaub H: iTRAQ-Labeling of In-Gel Digested Proteins for Relative Quantification; in: Proteomics: Methods and Protocols; hrsg. v. Reinders J und Sickmann A; Humana Press Springer, Heidelberg 2009, 207-226
- Schulze M, Kuettner KE, Cole AA (2000): Adulte humane Chondrozyten in Alginatkultur. Orthopade <u>29</u>: 100-106
- Scigelova M, Makarov A (2006): Orbitrap Mass Analyzer Overview and Applications in Proteomics. PROTEOMICS <u>6</u>: 16-21
- Seaberg RM, van der Kooy D (2003): Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. Trends Neurosci <u>26</u>: 125-131
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M (2007): In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nat. Protocols <u>1</u>: 2856-2860
- Steen H, Mann M (2004): The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. Nat Rev Mol Cell Biol <u>5</u>: 699-711
- Takahashi K, Goomer RS, Harwood F, Kubo T, Hirasawa Y, Amiel D (1999): The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1beta(IL-1beta), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage <u>7</u>: 182-190
- Tanudji M, Hevi S, Chuck SL (2002): Improperly folded green fluorescent protein is secreted via a non-classical pathway. J Cell Sci <u>115</u>: 3849-3857
- Tardif G, Hum D, Pelletier JP, Boileau C, Ranger P, Martel-Pelletier J (2004): Differential gene expression and regulation of the bone morphogenetic protein antagonists follistatin and gremlin in normal and osteoarthritic human chondrocytes and synovial fibroblasts. Arthritis Rheum <u>50</u>: 2521-2530
- Taylor DK, Meganck JA, Terkhorn S, Rajani R, Naik A, O'Keefe RJ, Goldstein SA, Hankenson KD (2009): Thrombospondin-2 influences the proportion of cartilage and bone during fracture healing. J Bone Miner Res <u>24</u>: 1043-1054
- Taylor G (1964): Disintegration of Water Drops in an Electric Field. Proc Math Phys Eng Sci 280: 383-397

- Tenor H, Hedbom E, Hauselmann HJ, Schudt C, Hatzelmann A (2002): Phosphodiesterase isoenzyme families in human osteoarthritis chondrocytes--functional importance of phosphodiesterase 4. Br J Pharmacol <u>135</u>: 609-618
- Tesche F, Miosge N (2005): New aspects of the pathogenesis of osteoarthritis: the role of fibroblast-like chondrocytes in late stages of the disease. Histol Histopathol <u>20</u>: 329-37
- The UniProt Consortium (2007): The Universal Protein Resource (UniProt). Nucleic Acids Res 35: 193-197
- Timpl R, Sasaki T, Kostka G, Chu M-L (2003): Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. Nat Rev Mol Cell Biol <u>4</u>: 479-489
- Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JD, Bron S, van Dijl JM (2000): Signal peptide-dependent protein transport in Bacillus subtilis: a genome-based survey of the secretome. Microbiol Mol Biol Rev <u>64</u>: 515-547
- Todorovic V, Jurukovski V, Chen Y, Fontana L, Dabovic B, Rifkin DB (2005): Latent TGF-beta binding proteins. Int J Biochem Cell Biol <u>37</u>: 38-41
- Van der Kraan PM, Goumans MJ, Blaney Davidson E, Ten Dijke P (2011): Age-dependent alteration of TGF-beta signalling in osteoarthritis. Cell Tissue Res <u>11</u>: 1194-1196
- Walther TC, Mann M (2010): Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. J Cell Biol <u>190</u>: 491-500
- Wang G, Cole RB (2000): Charged residue versus ion evaporation for formation of alkali metal halide cluster ions in ESI. Anal Chim Acta <u>406</u>: 53-65
- Washburn MP, Wolters D, Yates JR, 3rd (2001): Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. Nat Biotechnol <u>19</u>: 242-247
- Wilson R, Whitelock JM, Bateman JF (2009): Proteomics makes progress in cartilage and arthritis research. Matrix Biol <u>28</u>: 121-128
- Wu J, Murray J, Eyre D (1996): Evidence for copolymeric crosslinking between types II and III collagens in human articular cartilage. Trans Orthop Res Soc <u>21</u>: 42-43
- Zhang ZH, Li HX, Qi YP, Du LJ, Zhu SY, Wu MY, Lu HL, Yu Y, Han W (2010): Recombinant human midkine stimulates proliferation of articular chondrocytes. Cell Prolif <u>43</u>: 184-194

7 <u>Anhang</u>

Tabelle-ST-5: Proteinidentifikationen in Präzipitat II und Präzipitat III aus 100 μl 2D- und 15 μl 3D-CPC-Medium

Proteinname	UniProt-Name	Anzahl	Identifiziert in
		identifizierter	Präzipitat
		Peptide	
60S acidic ribosomal protein P2	RLA2_HUMAN	1	II und III
Protein Plunc	PLUNC_HUMAN	4	II und III
Protein S100-A14	S10AE_HUMAN	1	II und III
Protein S100-A16	S10AG_HUMAN	1	II und III
Plakophilin-1	PKP1_HUMAN	2	II und III
Protein-glutamine gamma-			II und III
glutamyltransferase E	TGM3_HUMAN	3	
Protein-glutamine gamma-			II und III
glutamyltransferase K	TGM1_HUMAN	5	
Ribonuclease inhibitor	RINI_HUMAN	2	II und III
Ig kappa chain C region	IGKC_HUMAN	4	II und III
Calpain-1 catalytic subunit	CAN1_HUMAN	1	II
Histidine ammonia-lyase	HUTH_HUMAN	1	II
Protein POF1B	POF1B_HUMAN	1	II
hypothetical protein			II
XP_002342618	Nicht benannt	1	
cDNA FLJ59211, highly similar to			II
Glucosidase 2 subunit beta	B4DJQ5_HUMAN	1	
26S proteasome non-ATPase			II
regulatory subunit 5	PSMD5_HUMAN	1	
Nucleobindin-1	NUCB1_HUMAN	3	II
cDNA FLJ60299, highly similar to			II
Rab GDP dissociation inhibitor			
beta	B4DLV7_HUMAN	7	
Nucleobindin-2	NUCB2_HUMAN	3	II
Thioredoxin domain-containing	TXND5_HUMAN	2	II

protein 5			
Cartilage-associated protein	CRTAP_HUMAN	2	II
Pigment epithelium-derived factor	PEDF_HUMAN	8	II
Phosphatidylinositol-5-phosphate			II
4-kinase type-2 alpha	PI42A_HUMAN	2	
Serpin B3	SPB3_HUMAN	5	II
Hsp90 co-chaperone Cdc37	CDC37_HUMAN	1	II
Polymerase I and transcript release			II
factor	PTRF_HUMAN	1	
Beta-actin-like protein 2	ACTBL_HUMAN	10	II
Serine/threonine-protein			II
phosphatase 2A regulatory subunit			
Β'	PTPA_HUMAN	2	
Chondroadherin	CHAD_HUMAN	1	II
Reticulocalbin-1	RCN1_HUMAN	4	II
Diablo homolog, mitochondrial	DBLOH_HUMAN	1	II
L-aminoadipate-semialdehyde			II
dehydrogenase-			
phosphopantetheinyl transferase	ADPPT_HUMAN	1	
Nucleoside diphosphate kinase	Q32Q12_HUMAN	6	II
Purine nucleoside phosphorylase	PNPH_HUMAN	1	II
Non-specific cytotoxic cell			II
receptor protein 1 homolog	NCRP1_HUMAN	2	
Nicotinamide N-methyltransferase	NNMT_HUMAN	3	II
Eukaryotic translation initiation			II
factor 3 subunit J	EIF3J_HUMAN	1	
Probable phosphoglycerate mutase			II
4	PGAM4_HUMAN	5	
Complement factor D	CFAD_HUMAN	1	II
UMP-CMP kinase	KCY_HUMAN	1	II
Platelet-activating factor			II
acetylhydrolase IB subunit gamma	PA1B3_HUMAN	1	
Charged multivesicular body	CHM4B_HUMAN	3	II

protein 4b			
Ubiquitin carboxyl-terminal			II
hydrolase isozyme L1	UCHL1_HUMAN	2	
Protein FAM3C	FAM3C_HUMAN	2	II
Protein CutA	CUTA_HUMAN	1	II
Eukaryotic translation elongation			II
factor 1 epsilon-1	MCA3_HUMAN	1	
Cofilin-2	COF2_HUMAN	5	II
Putative uncharacterized protein			II
DKFZp686H17246	Q68DS3_HUMAN	5	
Putative uncharacterized protein			II
SUMO3	A8MU27_HUMAN	1	
Hemoglobin subunit alpha	HBA_HUMAN	5	II
Serum amyloid A-4 protein	SAA4_HUMAN	1	II
Ribonuclease UK114	UK114_HUMAN	2	II
SH3 domain-binding glutamic			II
acid-rich-like protein	SH3L1_HUMAN	2	
Prothymosin alpha	PTMA_HUMAN	1	II
Protein S100-A4	S10A4_HUMAN	1	II
Cystatin-B	CYTB_HUMAN	1	II
Small proline-rich protein 2G	SPR2G_HUMAN	1	II
Desmoglein-4	DSG4_HUMAN	1	III
Protocadherin beta-4	PCDB4_HUMAN	1	III
Polymeric immunoglobulin			III
receptor	PIGR_HUMAN	6	
Putative uncharacterized protein			III
DKFZp686C02218	Q7Z374_HUMAN	5	
Long palate, lung and nasal			III
epithelium carcinoma-associated			
protein 1	LPLC1_HUMAN	5	
Glial fibrillary acidic protein	GFAP_HUMAN	3	III
V-set and immunoglobulin			III
domain-containing protein 8	VSIG8_HUMAN	1	

Serpin B5	SPB5_HUMAN	1	III
60S ribosomal protein L8	RL8_HUMAN	1	III
Basic salivary proline-rich protein			III
3	PRB3_HUMAN	2	
Zymogen granule protein 16			III
homolog B	ZG16B_HUMAN	2	
Histone H1.3	H13_HUMAN	1	III
Beta-globin gene from a			III
thalassemia patient,	Q14473_HUMAN	3	
Immunoglobulin J chain	IGJ_HUMAN	1	III
40S ribosomal protein S18	RS18_HUMAN	1	III
40S ribosomal protein S13	RS13_HUMAN	1	III
Histone H3.3	H33_HUMAN	1	III
cDNA FLJ57527, highly similar to			III
60S ribosomal protein L31	B7Z4C8_HUMAN	1	
40S ribosomal protein S28	RS28_HUMAN	1	III

Tabelle-ST-6: Proteinidentifikationen in	Präzipitat I aus	100 µl 2D- ui	nd 15 µl 3D-CPC-
Medium			

Proteinname	UniProt-Name	Anzahl identifizierter		zierter
		Peptide	ę	
		in	in	in
		Probe	Probe	Probe
		1	2	3
10 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH10_HUMAN	2	2	1
14-3-3 protein beta/alpha	1433B_HUMAN	6	6	10
14-3-3 protein epsilon	1433E_HUMAN	7	8	15
14-3-3 protein eta	1433F_HUMAN	4	6	6
14-3-3 protein gamma	1433G_HUMAN	7	6	10
14-3-3 protein sigma	1433S_HUMAN	5	5	5
14-3-3 protein theta	1433T_HUMAN	8	7	9
14-3-3 protein zeta/delta	1433Z_HUMAN	10	8	14
40S ribosomal protein S15a	RS15A_HUMAN	2	2	2
40S ribosomal protein S5	RS5_HUMAN	2	1	1
60S acidic ribosomal protein P0	RLA0_HUMAN	8	5	7
60S ribosomal protein L12	RL12_HUMAN	3	3	3
60S ribosomal protein L22	RL22_HUMAN	5	6	4
60S ribosomal protein L30	RL30_HUMAN	2	2	2
72 kDa type IV collagenase	MMP2_HUMAN	17	22	20
A disintegrin and metalloproteinase with				
thrombospondin motifs 1	ATS1_HUMAN	3	3	2
Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC_HUMAN	15	15	22
Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	23	23	24
Actinin alpha 1 isoform 3	B7TY16_HUMAN	10	10	16
Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	ARC1B_HUMAN	1	2	3
Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2_HUMAN	1	1	2
Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	ARPC4_HUMAN	3	2	3
Adenylate kinase 1 variant	Q53EY8_HUMAN	2	1	2
Adipocyte enhancer-binding protein 1	AEBP1_HUMAN	5	7	7
ADP-ribosylation factor 1	ARF1_HUMAN	3	4	4

ADP-ribosylation factor 4	ARF4_HUMAN	5	4	6
Agrin	AGRIN_HUMAN	16	14	23
Aldo-keto reductase family 1 member C3	AK1C3_HUMAN	3	1	3
Aldose reductase	ALDR_HUMAN	3	1	5
Alpha-actinin-4	ACTN4_HUMAN	9	12	23
Alpha-enolase	ENOA_HUMAN	12	10	13
Alpha-N-acetylglucosaminidase	ANAG_HUMAN	2	2	3
Aminopeptidase N	AMPN_HUMAN	9	9	11
Amyloid beta A4 protein	A4_HUMAN	7	7	7
Annexin A2	ANXA2_HUMAN	29	24	31
Annexin A5	ANXA5_HUMAN	16	11	19
Annexin A6	ANXA6_HUMAN	1	1	5
Basement membrane-specific heparan sulfate				
proteoglycan core protein	PGBM_HUMAN	36	32	50
Beta-2-microglobulin	B2MG_HUMAN	6	6	6
Beta-actin	A1E282_HUMAN	23	23	24
Beta-actin-like protein 2	ACTBL_HUMAN	7	7	8
Beta-enolase	ENOB_HUMAN	1	1	2
Bleomycin hydrolase	BLMH_HUMAN	2	1	1
C1q and tumor necrosis factor related protein				
3	Q0VAN4_HUMAN	3	3	3
Cadherin-2	CADH2_HUMAN	2	1	1
Calsyntenin-1	CSTN1_HUMAN	7	8	5
Calumenin, isoform CRA_c	B3KPG9_HUMAN	2	2	2
Carbonyl reductase [NADPH] 1	CBR1_HUMAN	4	1	2
Cathepsin B	CATB_HUMAN	7	8	7
Cathepsin D	CATD_HUMAN	4	4	3
Cathepsin L1	CATL1_HUMAN	4	5	6
Cathepsin Z	CATZ_HUMAN	3	2	2
Caveolin-1	CAV1_HUMAN	5	4	7
Caveolin-1	CAV1_HUMAN	4	3	6
CD109 antigen	CD109_HUMAN	10	10	10
CD59 glycoprotein	CD59_HUMAN	1	2	2

Anhang
Tabelle-ST-2

cDNA FLJ40895 fis, clone UTERU2002294,				
highly similar to Prostaglandin E synthase 3				
(EC 5.3.99.3)	B3KUY2_HUMAN	6	6	7
cDNA FLJ50617, highly similar to Tubulin				
beta-7 chain	B4DQN9_HUMAN	15	11	14
cDNA FLJ51495, highly similar to ADP-				
ribosylation factor 5	B4DLJ3_HUMAN	3	2	4
cDNA FLJ54776, highly similar to Cell				
division control protein 42 homolog	B4E1U9_HUMAN	3	2	5
cDNA FLJ55211, highly similar to Glia-				
derived nexin	B4DIF2_HUMAN	21	22	21
cDNA FLJ56786, moderately similar to 40S				
ribosomal protein S16	B4DP32_HUMAN	2	3	2
cDNA FLJ58953, highly similar to 40S				
ribosomal protein S20	B4DW28_HUMAN	2	4	3
cDNA FLJ59142, highly similar to				
Epididymal secretory protein E1	B4DV10_HUMAN	3	2	2
cDNA FLJ61136, highly similar to Ras-				
related protein Rab-11A	B4DMN1_HUMAN	3	2	3
cDNA, FLJ92537, highly similar to Homo				
sapiens procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-				
dioxygenase (lysine hydroxylase, Ehlers-				
Danlos syndrome type VI) (PLOD), mRNA	B2R5M9_HUMAN	1	5	1
cDNA, FLJ94117, highly similar to Homo				
sapiens actinin, alpha 3 (ACTN3), mRNA	B2R8Y4_HUMAN	5	5	8
cDNA, FLJ94534, highly similar to Homo				
sapiens capping protein (actin filament),				
gelsolin-like(CAPG), mRNA	B2R9S4_HUMAN	2	4	3
Cellular retinoic acid-binding protein 2	RABP2_HUMAN	2	1	2
Chitinase-3-like protein 1	CH3L1_HUMAN	8	6	7
Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1_HUMAN	8	7	11
Chloride intracellular channel protein 4	CLIC4_HUMAN	6	4	5
Clathrin heavy chain 1	CLH1_HUMAN	2	4	2
Clusterin	CLUS_HUMAN	7	6	8

Coagulation factor IX	FA9_HUMAN	6	6	4
Coatomer subunit gamma	COPG_HUMAN	2	1	1
Cofilin-1	COF1_HUMAN	6	7	10
Cofilin-2	COF2_HUMAN	2	2	5
Coiled-coil domain-containing protein 80	CCD80_HUMAN	12	10	12
Collagen alpha-1(I) chain	CO1A1_HUMAN	24	25	28
Collagen alpha-1(III) chain	CO3A1_HUMAN	9	9	9
Collagen alpha-1(III) chain	CO3A1_HUMAN	6	7	6
Collagen alpha-1(VI) chain	CO6A1_HUMAN	38	37	37
Collagen alpha-1(VII) chain	CO7A1_HUMAN	1	4	1
Collagen alpha-1(VIII) chain	CO8A1_HUMAN	1	2	3
Collagen alpha-1(XII) chain	COCA1_HUMAN	28	23	18
Collagen alpha-1(XIV) chain	COEA1_HUMAN	27	21	24
Collagen alpha-2(I) chain	CO1A2_HUMAN	28	26	28
Collagen alpha-2(V) chain	CO5A2_HUMAN	3	4	1
Collagen alpha-2(VI) chain	CO6A2_HUMAN	26	23	24
Collagen alpha-2(VI) chain	CO6A2_HUMAN	20	19	19
Collagen alpha-3(VI) chain	CO6A3_HUMAN	129	120	122
Collagen triple helix repeat-containing protein				
1	CTHR1_HUMAN	6	6	6
Complement C1r subcomponent	C1R_HUMAN	11	5	8
Complement C1s subcomponent	C1S_HUMAN	4	2	1
Complement factor H	CFAH_HUMAN	4	2	4
C-type lectin domain family 11 member A	CLC11_HUMAN	4	6	12
Cystatin-C	CYTC_HUMAN	3	3	4
Cytochrome c oxidase subunit 2	COX2_HUMAN	2	2	1
Decorin	PGS2_HUMAN	11	12	13
Destrin	DEST_HUMAN	3	2	4
Ectonucleotide				
pyrophosphatase/phosphodiesterase family				
member 2	ENPP2_HUMAN	12	8	13
Elongation factor 1-alpha 1	EF1A1_HUMAN	8	8	8
Elongation factor 1-beta	EF1B_HUMAN	3	1	2

Elongation factor 1-delta	EF1D_HUMAN	6	4	6
Elongation factor 1-gamma	EF1G_HUMAN	2	1	3
EMILIN-1	EMIL1_HUMAN	8	8	10
Endoplasmin	ENPL_HUMAN	9	8	9
Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-				
chromosomal	IF1AY_HUMAN	2	2	3
Extracellular matrix protein 1	ECM1_HUMAN	6	4	3
F-actin-capping protein subunit alpha-1	CAZA1_HUMAN	3	1	3
Fibrillin-1	FBN1_HUMAN	6	3	3
Fibulin-1	FBLN1_HUMAN	11	8	3
Follistatin-related protein 1	FSTL1_HUMAN	5	4	2
Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN	8	4	9
Fructose-bisphosphate aldolase C	ALDOC_HUMAN	2	1	1
Fumarylacetoacetase	FAAA_HUMAN	1	1	2
Galectin-1	LEG1_HUMAN	6	6	7
Galectin-3-binding protein	LG3BP_HUMAN	12	7	13
Gamma-glutamylcyclotransferase	GGCT_HUMAN	1	4	2
Gelsolin	GELS_HUMAN	31	27	30
Gelsolin	GELS_HUMAN	17	16	19
Glial fibrillary acidic protein	GFAP_HUMAN	1	1	3
Glutathione S-transferase P	GSTP1_HUMAN	2	1	2
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	A4UCT1_HUMAN	11	10	10
Glycogen phosphorylase, brain form	PYGB_HUMAN	1	1	3
Glycogen phosphorylase, liver form	PYGL_HUMAN	1	1	2
Gremlin-1	GREM1_HUMAN	6	6	6
Gremlin-2	GREM2_HUMAN	3	1	3
Growth arrest-specific protein 6	GAS6_HUMAN	10	13	8
Guanine nucleotide-binding protein				
G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	GBB1_HUMAN	3	2	1
Guanine nucleotide-binding protein				
G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	GBB2_HUMAN	2	2	1
Guanine nucleotide-binding protein subunit				
alpha-13	GNA13_HUMAN	2	2	2

Anhang
Tabelle-ST-2

Guanine nucleotide-binding protein subunit				
beta-2-like 1	GBLP_HUMAN	9	7	8
Heat shock protein 94c	Q58FF2_HUMAN	2	1	3
Heat shock protein HSP 90-alpha	HS90A_HUMAN	32	36	33
Heat shock protein HSP 90-beta	HS90B_HUMAN	26	29	30
Hepatoma-derived growth factor	HDGF_HUMAN	2	1	3
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins				
C1/C2	HNRPC_HUMAN	2	2	2
High mobility group protein B1	HMGB1_HUMAN	4	4	3
High mobility group protein B2	HMGB2_HUMAN	3	1	3
Hsc70-interacting protein	F10A1_HUMAN	3	4	4
Ig kappa chain V-III region NG9	KV303_HUMAN	2	2	1
Importin subunit beta-1	IMB1_HUMAN	2	1	2
Insulin-like growth factor-binding protein 3	IBP3_HUMAN	12	12	11
Insulin-like growth factor-binding protein 4	IBP4_HUMAN	6	6	6
Insulin-like growth factor-binding protein 6	IBP6_HUMAN	5	5	4
Integrin alpha-5	ITA5_HUMAN	1	1	2
Integrin beta-1	ITB1_HUMAN	3	3	1
Interstitial collagenase	MMP1_HUMAN	20	16	20
Lactadherin	MFGM_HUMAN	14	16	14
Lactoylglutathione lyase	LGUL_HUMAN	1	2	2
Lamin-A/C	LMNA_HUMAN	3	2	10
Lamin-B1	LMNB1_HUMAN	1	1	1
Laminin subunit alpha-2	LAMA2_HUMAN	5	4	3
Laminin subunit alpha-5	LAMA5_HUMAN	20	4	9
Laminin subunit beta-1	LAMB1_HUMAN	11	12	8
Laminin subunit gamma-1	LAMC1_HUMAN	13	9	8
Latent-transforming growth factor beta-				
binding protein 1	LTBP1_HUMAN	8	9	2
Leucine-rich repeat and coiled-coil domain-				
containing protein 1	LRCC1_HUMAN	1	1	2
LIM and SH3 domain protein 1	LASP1_HUMAN	2	2	3
L-lactate dehydrogenase	B7Z5E3_HUMAN	18	17	19

L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB_HUMAN	12	11	11
Lumican	LUM_HUMAN	3	3	3
Lysosomal alpha-mannosidase	MA2B1_HUMAN	2	2	2
Macrophage migration inhibitory factor	MIF_HUMAN	2	2	2
Major vault protein	MVP_HUMAN	8	11	13
Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDHC_HUMAN	3	3	3
Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDHM_HUMAN	11	10	11
Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1_HUMAN	6	5	5
Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2_HUMAN	11	9	11
Metalloproteinase inhibitor 3	TIMP3_HUMAN	4	2	5
MHC class I antigen	A2BCW2_HUMAN	4	1	2
Microfibrillar-associated protein 2	MFAP2_HUMAN	2	1	2
Midkine	MK_HUMAN	2	4	4
Moesin	MOES_HUMAN	2	5	5
Myosin light chain kinase, smooth muscle	MYLK_HUMAN	1	1	2
Nascent polypeptide-associated complex				
subunit alpha	NACA_HUMAN	2	3	4
Neural cell adhesion molecule 1	NCAM1_HUMAN	2	1	1
Neuronal pentraxin-1	NPTX1_HUMAN	4	4	7
Nicotinamide N-methyltransferase	NNMT_HUMAN	3	2	3
Nidogen-2	NID2_HUMAN	3	2	4
Nucleophosmin	NPM_HUMAN	4	3	4
Osteoclast-stimulating factor 1	OSTF1_HUMAN	3	1	2
Pappalysin-1	PAPP1_HUMAN	7	9	3
Pentraxin-related protein PTX3	PTX3_HUMAN	18	16	18
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA_HUMAN	9	8	8
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB_HUMAN	8	7	6
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	PPIC_HUMAN	3	3	3
Peroxidasin homolog	PXDN_HUMAN	1	2	1
Peroxiredoxin-2	PRDX2_HUMAN	5	3	4
Peroxiredoxin-6	PRDX6_HUMAN	4	3	3
Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase				
type-2 alpha	PI42A_HUMAN	1	1	2

Phosphoserine aminotransferase	B4DHQ3_HUMAN	5	3	6	
Plasminogen activator inhibitor 1	PAI1_HUMAN	13	11	13	
Poly(rC)-binding protein 1	PCBP1_HUMAN	1	2	1	
Polypeptide N-					
acetylgalactosaminyltransferase 5	GALT5_HUMAN	1	2	2	
Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	PCOC1_HUMAN	15	9	11	
Profilin	B4DNH1_HUMAN	2	2	1	
Profilin-1	PROF1_HUMAN	7	6	8	
Proliferation-inducing protein 28	Q6LES2_HUMAN	4	2	9	
Prolow-density lipoprotein receptor-related					
protein 1	LRP1_HUMAN	8	6	8	
Prosaposin	B1AVU8_HUMAN	5	3	2	
Proteasome subunit alpha type-4	PSA4_HUMAN	1	2	2	
Proteasome subunit alpha type-7-like	PSA7L_HUMAN	2	3	2	
Proteasome subunit beta type-5	PSB5_HUMAN	2	2	1	
Protein CYR61	CYR61_HUMAN	6	4	6	
Protein Wnt-5a	WNT5A_HUMAN	2	2	3	
Putative uncharacterized protein COL9A1	A6NEQ6_HUMAN	1	1	2	
Putative uncharacterized protein					
DKFZp686H17246	Q68DS3_HUMAN	5	5	5	
Putative uncharacterized protein					
ENSP00000374274	B5MDQ5_HUMAN	2	2	2	
Putative uncharacterized protein HPRT1	A8MSU4_HUMAN	1	1	1	
Putative uncharacterized protein RAN	B5MDF5_HUMAN	4	5	4	
Putative uncharacterized protein RPSAP18	A6NE09_HUMAN	3	3	2	
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	IQGA1_HUMAN	1	2	1	
Ras-related protein Rab-10	RAB10_HUMAN	3	1	3	
Ras-related protein Rab-1A	RAB1A_HUMAN	6	3	4	
Ras-related protein Rab-7a	RAB7A_HUMAN	4	1	2	
Ras-related protein Rap-1A	RAP1A_HUMAN	2	1	1	
Ras-related protein R-Ras	RRAS_HUMAN	2	1	2	
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	GDIR1_HUMAN	2	3	2	
Rho-related GTP-binding protein RhoC	RHOC_HUMAN	5	4	5	
Ribonuclease UK114UK114_HUMAN212SacsinSACS_HUMAN121Secreted frizzled-related protein 1SFRP1_HUMAN314Septin-2SEPT2_HUMAN212Serine protease 23PRS23_HUMAN133Serine protease HTRA1HTRA1_HUMAN131013Serine/threonine-protein phosphatase PP1- beta catalytic subunitPP1B_HUMAN112Serine/threonine-protein phosphatase PP1- beta catalytic subunitBP35_SPB5_HUMAN511SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like proteinB72268_HUMAN112Single-stranded DNA binding protein 1, isoform CRA_cB72268_HUMAN323SPARCSPRC_HUMAN666SPARC-related modular calcium-binding protein 1SMOC1_HUMAN121Spring factor, arginine/serine-rich 1SFRS1_HUMAN333Stanniocalcin-1STC2_HUMAN112Sulfhydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN22123Syntenin-1SDCB1_HUMAN112TenascinTENA_HUMAN555148Tenascin-XTENA_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN222Syntenin-1RENA_HUMAN222	Ribonuclease 4	RNAS4_HUMAN	1	1	2
---	--	--------------	----	----	----
SacsinSACS_HUMAN121Secreted frizzled-related protein 1SFRP1_HUMAN314Septin-2SEPT2_HUMAN212Serine protease 23PRS23_HUMAN133Serine protease HTRA1HTRA1_HUMAN131013Serine/threonine-protein phosphatase PP1- beta catalytic subunitPP1B_HUMAN112Serpin B5SPB5_HUMAN511SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like proteinB7Z268_HUMAN112Single-stranded DNA binding protein 1, isoform CRA_cB7Z268_HUMAN323SPARCSPRC_HUMAN666SPARCSPRC_HUMAN121Sperindine synthaseSPEE_HUMAN122Splicing factor, arginine/serine-rich 1SFRS1_HUMAN333Stanniocalcin-1STC1_HUMAN1122Suthhydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN2222Syntenin-1SDCB1_HUMAN55148TenascinTENA_HUMAN555149Tenascin-XTENA_HUMAN21513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN222Syntenin-1PRDX3_HUMAN222	Ribonuclease UK114	UK114_HUMAN	2	1	2
Secreted frizzled-related protein 1SFRP1_HUMAN314Septin-2SEPT2_HUMAN212Serine protease 23PRS23_HUMAN133Serine protease HTRA1HTRA1_HUMAN131013Serine/threonine-protein phosphatase PP1- beta catalytic subunitPP1B_HUMAN112Serpin B5SPB5_HUMAN511SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like proteinF72Single-stranded DNA binding protein 1, isoform CRA_cB7Z268_HUMAN323SPARCSPRC_HUMAN666SPARC-related modular calcium-binding protein 1SMOC1_HUMAN122Splicing factor, arginine/serine-rich 1SFRS1_HUMAN333Stanniocalcin-1STC1_HUMAN1122Sudh/ydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN222123Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN322Syntenin-1SDCB1_HUMAN1122Tenascin-XTENA_HUMAN555148Tenascin-XTENA_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN222Syntenin-1TENA_HUMAN2222	Sacsin	SACS_HUMAN	1	2	1
Septin-2SEPT2_HUMAN212Serine protease 23PRS23_HUMAN133Serine protease HTRA1HTRA1_HUMAN131013Serine/threonine-protein phosphatase PP1- beta catalytic subunitPP1B_HUMAN112Serpin B5SPB5_HUMAN5111SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like proteinSH3L1_HUMAN112Single-stranded DNA binding protein 1, isoform CRA_cB7Z268_HUMAN323SPARCSPRC_HUMAN666SPARC-related modular calcium-binding protein 1SMOC1_HUMAN121Spermidine synthaseSPEE_HUMAN122Splicing factor, arginine/serine-rich 1SFRS1_HUMAN333Stanniocalcin-1STC2_HUMAN112Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN112Syntenin-1SDCB1_HUMAN1122Syntenin-1TENA_HUMAN555148Tenascin-XTENA_HUMAN22151313Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN222Syntenin-1RENX_HUMAN2222	Secreted frizzled-related protein 1	SFRP1_HUMAN	3	1	4
Serine protease 23PRS23_HUMAN133Serine protease HTRA1HTRA1_HUMAN131013Serine/threonine-protein phosphatase PP1- beta catalytic subunitPP1B_HUMAN112Serpin B5SPB5_HUMAN5111SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like proteinSH3L1_HUMAN112Single-stranded DNA binding protein 1, isoform CRA_cB7Z268_HUMAN323SPARCSPRC_HUMAN666SPARC-related modular calcium-binding protein 1SMOC1_HUMAN122Splicing factor, arginine/serine-rich 1SFRS1_HUMAN333Stanniocalcin-1STC1_HUMAN1122Sulfhydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN222123Syntenin-1SVEP1_HUMAN3222Syntenin-1TENA_HUMAN555148TenascinTENA_HUMAN555149Tenascin-XTENA_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN222Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN222	Septin-2	SEPT2_HUMAN	2	1	2
Serine protease HTRA1HTRA1_HUMAN131013Serine/threonine-protein phosphatase PP1- beta catalytic subunitPP1B_HUMAN112Serpin B5SPB5_HUMAN511SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like proteinSH3L1_HUMAN112Single-stranded DNA binding protein 1, isoform CRA_cB7Z268_HUMAN323SPARCSPRC_HUMAN666SPARCSPRC_HUMAN121Sperindine synthaseSPEE_HUMAN122Splicing factor, arginine/serine-rich 1SFRS1_HUMAN333Stanniocalcin-1STC1_HUMAN1122Suthfydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN222123Syntenin-1SDCB1_HUMAN3222Syntenin-1SDCB1_HUMAN112TenascinTENA_HUMAN555148Tenascin-XTENA_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN222Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN222Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN222	Serine protease 23	PRS23_HUMAN	1	3	3
Serine/threonine-protein phosphatase PP1- beta catalytic subunitPP1B_HUMAN112Serpin B5SPB5_HUMAN511SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like proteinSH3L1_HUMAN112Single-stranded DNA binding protein 1, isoform CRA_cB7Z268_HUMAN323SPARCSPRC_HUMAN666SPARCSPRC_HUMAN121Spermidine synthaseSPEE_HUMAN122Splicing factor, arginine/serine-rich 1SFRS1_HUMAN333Stanniocalcin-1STC1_HUMAN1122Sulfhydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN222123Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN322Syntenin-1SDCB1_HUMAN1122TenascinTENA_HUMAN555148Tenascin-XTENA_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN222	Serine protease HTRA1	HTRA1_HUMAN	13	10	13
beta catalytic subunitPP1B_HUMAN1112Serpin B5SPB5_HUMAN511SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like proteinSH3L1_HUMAN112Single-stranded DNA binding protein 1, isoform CRA_cB7Z268_HUMAN323SPARCSPRC_HUMAN666SPARC-related modular calcium-binding protein 1SMOC1_HUMAN121Spermidine synthaseSPEE_HUMAN122Splicing factor, arginine/serine-rich 1SFRS1_HUMAN333Stanniocalcin-1STC1_HUMAN112Sulfhydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN222123Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN322Syntenin-1SDCB1_HUMAN1122TenascinTENA_HUMAN555149Tenascin-XTENA_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN222Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN222	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-				
Serpin B5SPB5_HUMAN511SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like proteinSH3L1_HUMAN112Single-stranded DNA binding protein 1, isoform CRA_cB7Z268_HUMAN323SPARCSPRC_HUMAN666SPARC-related modular calcium-binding protein 1SMOC1_HUMAN121Spermidine synthaseSPEE_HUMAN122Splicing factor, arginine/serine-rich 1SFRS1_HUMAN333Stanniocalcin-1STC1_HUMAN112Sulfhydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN222123Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN322Syntenin-1TENA_HUMAN555148TenascinTENA_HUMAN22151313Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrialPRDX3_HUMAN222	beta catalytic subunit	PP1B_HUMAN	1	1	2
SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like proteinSH3L1_HUMAN1112Single-stranded DNA binding protein 1, isoform CRA_cB7Z268_HUMAN323SPARCSPRC_HUMAN666SPARC-related modular calcium-binding protein 1SMOC1_HUMAN121Spermidine synthaseSPEE_HUMAN122Splicing factor, arginine/serine-rich 1SFRS1_HUMAN333Stanniocalcin-1STC1_HUMAN112Sulfhydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN222123Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN322Syntenin-1SDCB1_HUMAN1122TenascinTENA_HUMAN555148Tenascin-XTENA_HUMAN22151313Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrialPRDX3_HUMAN222	Serpin B5	SPB5_HUMAN	5	1	1
proteinSH3L1_HUMAN1112Single-stranded DNA binding protein 1, isoform CRA_cB7Z268_HUMAN323SPARCSPRC_HUMAN666SPARC-related modular calcium-binding protein 1SMOC1_HUMAN121Spermidine synthaseSPEE_HUMAN122Splicing factor, arginine/serine-rich 1SFRS1_HUMAN333Stanniocalcin-1STC1_HUMAN112Sulfhydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN222123Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN322Syntenin-1TENA_HUMAN555148TenascinTENA_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN222Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN222	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like				
Single-stranded DNA binding protein 1, isoform CRA_cB7Z268_HUMAN323SPARCSPRC_HUMAN666SPARC-related modular calcium-binding protein 1SMOC1_HUMAN121Spermidine synthaseSPEE_HUMAN122Splicing factor, arginine/serine-rich 1SFRS1_HUMAN333Stanniocalcin-1STC1_HUMAN112Stanniocalcin-2STC2_HUMAN756Sulfhydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN222123Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN322TenascinTENA_HUMAN555148Tenascin-XTENA_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrialPRDX3_HUMAN222	protein	SH3L1_HUMAN	1	1	2
isoform CRA_cB7Z268_HUMAN323SPARCSPRC_HUMAN666SPARC-related modular calcium-binding protein 1SMOC1_HUMAN121Spermidine synthaseSPEE_HUMAN122Splicing factor, arginine/serine-rich 1SFRS1_HUMAN333Stanniocalcin-1STC1_HUMAN112Stanniocalcin-2STC2_HUMAN756Sulfhydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN222123Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN322Syntenin-1SDCB1_HUMAN1122TenascinTENA_HUMAN555148Tenascin-XTENA_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrialPRDX3_HUMAN222	Single-stranded DNA binding protein 1,				
SPARCSPRC_HUMAN666SPARC-related modular calcium-binding protein 1SMOC1_HUMAN121Spermidine synthaseSPEE_HUMAN122Splicing factor, arginine/serine-rich 1SFRS1_HUMAN333Stanniocalcin-1STC1_HUMAN112Stanniocalcin-2STC2_HUMAN756Sulfhydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN222123Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN322Syntenin-1SDCB1_HUMAN1122TenascinTENA_HUMAN555148Tenascin-XTENA_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrialPRDX3_HUMAN222	isoform CRA_c	B7Z268_HUMAN	3	2	3
SPARC-related modular calcium-binding protein 1SMOC1_HUMAN121Spermidine synthaseSPEE_HUMAN122Splicing factor, arginine/serine-rich 1SFRS1_HUMAN333Stanniocalcin-1STC1_HUMAN112Stanniocalcin-2STC2_HUMAN756Sulfhydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN222123Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN322Syntenin-1SDCB1_HUMAN1122TenascinTENA_HUMAN555148Tenascin-XTENX_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrialPRDX3_HUMAN222	SPARC	SPRC_HUMAN	6	6	6
protein 1SMOC1_HUMAN121Spermidine synthaseSPEE_HUMAN122Splicing factor, arginine/serine-rich 1SFRS1_HUMAN333Stanniocalcin-1STC1_HUMAN112Stanniocalcin-2STC2_HUMAN756Sulfhydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN222123Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN322Syntenin-1SDCB1_HUMAN1122TenascinTENA_HUMAN555148Tenascin-XTENA_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin domain-containing protein 17PRDX3_HUMAN222	SPARC-related modular calcium-binding				
Spermidine synthaseSPEE_HUMAN122Splicing factor, arginine/serine-rich 1SFRS1_HUMAN333Stanniocalcin-1STC1_HUMAN112Stanniocalcin-2STC2_HUMAN756Sulfhydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN222123Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN322Syntenin-1SDCB1_HUMAN112TenascinTENA_HUMAN555148Tenascin-XTENA_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN222	protein 1	SMOC1_HUMAN	1	2	1
Splicing factor, arginine/serine-rich 1SFRS1_HUMAN333Stanniocalcin-1STC1_HUMAN112Stanniocalcin-2STC2_HUMAN756Sulfhydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN222123Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN322Syntenin-1SDCB1_HUMAN1122TenascinTENA_HUMAN555148Tenascin-XTENA_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrialPRDX3_HUMAN222	Spermidine synthase	SPEE_HUMAN	1	2	2
Stanniocalcin-1STC1_HUMAN1112Stanniocalcin-2STC2_HUMAN756Sulfhydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN222123Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN322Syntenin-1SDCB1_HUMAN1122TenascinTENA_HUMAN555148Tenascin-XTENX_HUMAN555149Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrialPRDX3_HUMAN222	Splicing factor, arginine/serine-rich 1	SFRS1_HUMAN	3	3	3
Stanniocalcin-2STC2_HUMAN756Sulfhydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN222123Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN322Syntenin-1SDCB1_HUMAN112TenascinTENA_HUMAN555148TenascinTENA_HUMAN555149Tenascin-XTENX_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrialPRDX3_HUMAN222	Stanniocalcin-1	STC1_HUMAN	1	1	2
Sulfhydryl oxidase 1QSOX1_HUMAN222123Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN322Syntenin-1SDCB1_HUMAN112TenascinTENA_HUMAN555148TenascinTENA_HUMAN555149Tenascin-XTENX_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrialPRDX3_HUMAN222	Stanniocalcin-2	STC2_HUMAN	7	5	6
Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN322Syntenin-1SDCB1_HUMAN112TenascinTENA_HUMAN555148TenascinTENA_HUMAN555149Tenascin-XTENX_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrialPRDX3_HUMAN222	Sulfhydryl oxidase 1	QSOX1_HUMAN	22	21	23
pentraxin domain-containing protein 1SVEP1_HUMAN322Syntenin-1SDCB1_HUMAN112TenascinTENA_HUMAN555148TenascinTENA_HUMAN555149Tenascin-XTENX_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrialPRDX3_HUMAN222	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and				
Syntenin-1SDCB1_HUMAN112TenascinTENA_HUMAN555148TenascinTENA_HUMAN555149Tenascin-XTENX_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrialPRDX3_HUMAN222	pentraxin domain-containing protein 1	SVEP1_HUMAN	3	2	2
TenascinTENA_HUMAN555148TenascinTENA_HUMAN555149Tenascin-XTENX_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrialPRDX3_HUMAN222	Syntenin-1	SDCB1_HUMAN	1	1	2
TenascinTENA_HUMAN555149Tenascin-XTENX_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrialPRDX3_HUMAN222	Tenascin	TENA_HUMAN	55	51	48
Tenascin-XTENX_HUMAN221513Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrialPRDX3_HUMAN222	Tenascin	TENA_HUMAN	55	51	49
Thioredoxin domain-containing protein 17TXD17_HUMAN332Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrialPRDX3_HUMAN222	Tenascin-X	TENX_HUMAN	22	15	13
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrialPRDX3_HUMAN222	Thioredoxin domain-containing protein 17	TXD17_HUMAN	3	3	2
mitochondrial PRDX3_HUMAN 2 2 2	Thioredoxin-dependent peroxide reductase,				
	mitochondrial	PRDX3_HUMAN	2	2	2
Thrombospondin-2TSP2_HUMAN544	Thrombospondin-2	TSP2_HUMAN	5	4	4
Thrombospondin-3TSP3_HUMAN312	Thrombospondin-3	TSP3_HUMAN	3	1	2

Thy-1 membrane glycoprotein	THY1_HUMAN	3	3	3
Transaldolase	TALDO_HUMAN	2	1	4
Transforming growth factor beta-1	TGFB1_HUMAN	1	1	3
Transforming protein RhoA	RHOA_HUMAN	4	5	5
Transgelin	TAGL_HUMAN	2	1	4
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	TERA_HUMAN	1	1	1
Triosephosphate isomerase	Q53HE2_HUMAN	10	8	7
Tubulin alpha-1C chain	TBA1C_HUMAN	13	7	11
Tubulin beta-2C chain	TBB2C_HUMAN	15	9	11
Tumor necrosis factor-inducible gene 6				
protein	TSG6_HUMAN	4	6	3
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1_HUMAN	3	3	4
Vasorin	VASN_HUMAN	4	4	4
Versican core protein	CSPG2_HUMAN	18	17	15
Vimentin	VIME_HUMAN	15	16	25
Vitamin K-dependent protein S	PROS_HUMAN	4	5	2
Voltage-dependent anion-selective channel				
protein 1	VDAC1_HUMAN	3	3	3
Voltage-dependent calcium channel subunit				
alpha-2/delta-1	CA2D1_HUMAN	1	2	2
Zinc-alpha-2-glycoprotein	ZA2G_HUMAN	1	1	8
	•			

Identifikation anhand zweier Peptidsequenzen:

40S ribosomal protein S7	RS7_HUMAN	3	1	0
60S ribosomal protein L11	RL11_HUMAN	2	2	0
Alcohol dehydrogenase [NADP+]	AK1A1_HUMAN	3	0	5
Alcohol dehydrogenase class-3	ADHX_HUMAN	1	0	1
Apolipoprotein D	APOD_HUMAN	0	2	3
Argininosuccinate synthase	ASSY_HUMAN	0	1	1
BTB/POZ domain-containing protein				
KCTD12	KCD12_HUMAN	2	0	2
Calcineurin-like phosphoesterase domain-	CPPED_HUMAN	2	1	0

containing protein 1				
Carrier family 6, member 8 variant	Q59EV6_HUMAN	0	1	2
Cathepsin G	CATG_HUMAN	2	0	1
cDNA FLJ56442, highly similar to ATP-				
citrate synthase (EC 2.3.3.8)	B4DIM0_HUMAN	0	1	2
cDNA, FLJ94230, highly similar to Homo				
sapiens thioredoxin-like 1 (TXNL1), mRNA	B2R960_HUMAN	0	1	2
Charged multivesicular body protein 4b	CHM4B_HUMAN	0	1	3
Desmoglein-4	DSG4_HUMAN	0	2	1
DNA mismatch repair protein Msh2	MSH2_HUMAN	0	2	1
F-actin-capping protein subunit alpha-2	CAZA2_HUMAN	2	0	2
Heat shock 70 kDa protein 4	HSP74_HUMAN	1	0	1
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-				
like	HNRDL_HUMAN	1	0	2
Integrin alpha-V	ITAV_HUMAN	0	1	1
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDHC_HUMAN	0	2	1
Latent-transforming growth factor beta-				
binding protein 3	LTBP3_HUMAN	1	0	2
Leucine-rich repeat-containing protein 15	LRC15_HUMAN	0	2	1
Lipocalin-1	LCN1_HUMAN	0	1	2
Neuroblast differentiation-associated protein				
AHNAK	AHNK_HUMAN	2	0	1
Neutrophil defensin 1	DEF1_HUMAN	2	0	2
Nucleosome assembly protein 1-like 1	NP1L1_HUMAN	2	0	1
Olfactomedin-like protein 3	OLFL3_HUMAN	1	0	2
Peptidyl-glycine alpha-amidating				
monooxygenase	AMD_HUMAN	1	0	3
Procollagen C-endopeptidase enhancer 2	PCOC2_HUMAN	2	1	0
Protein S100-A11	S10AB_HUMAN	1	0	2
Protein S100-A7	S10A7_HUMAN	0	1	2
Protein SET	SET_HUMAN	1	0	4
Serpin H1	SERPH_HUMAN	3	3	0
S-formylglutathione hydrolase	ESTD_HUMAN	0	1	3

similar to MHC class I antigen	IPI00739274			
		2	1	0
Splicing factor, arginine/serine-rich 3	SFRS3_HUMAN	3	2	0
Zymogen granule protein 16 homolog B	ZG16B_HUMAN	4	0	2
Identifikation anhand einer Peptidsequenz				
Autophagy-related protein 3	ATG3_HUMAN	0	0	2
Calreticulin	CALR_HUMAN	0	0	2
Cartilage-associated protein	CRTAP_HUMAN	0	0	2
DNA-dependent protein kinase catalytic				
subunit	PRKDC_HUMAN	0	5	0
FACT complex subunit SSRP1	SSRP1_HUMAN	0	2	0
Insulin-degrading enzyme	IDE_HUMAN	2	0	0
Long palate, lung and nasal epithelium				
carcinoma-associated protein 1	LPLC1_HUMAN	0	0	5
Mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming	A7Y9J9_HUMAN	0	0	2
Myosin-6	MYH6_HUMAN	0	0	15
Myosin-7	MYH7_HUMAN	0	0	15
Nucleobindin-2	NUCB2_HUMAN	0	0	2
Nucleolin	NUCL_HUMAN	0	3	0
Poly [ADP-ribose] polymerase 1	PARP1_HUMAN	0	6	0
Polymeric immunoglobulin receptor	PIGR_HUMAN	0	0	6
Protein FAM3C	FAM3C_HUMAN	0	0	2
Protein Plunc	PLUNC_HUMAN	0	0	3
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase				
Κ	TGM1_HUMAN	0	0	3
Ribonuclease inhibitor	RINI_HUMAN	0	0	2
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium				
ATPase 1	AT2A1_HUMAN	0	0	3
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium				
ATPase 3	AT2A3_HUMAN	0	0	3
Serine/threonine-protein phosphatase 2A	PTPA_HUMAN	0	0	2

regulatory subunit B'				
Small proline-rich protein 3	SPRR3_HUMAN	2	0	0
Transcriptional activator protein Pur-alpha	PURA_HUMAN	0	0	2
Transcriptional activator protein Pur-beta	PURB_HUMAN	0	0	2
Transferrin receptor protein 1	TFR1_HUMAN	0	0	2
Xaa-Pro dipeptidase	PEPD_HUMAN	0	0	2

Tabelle-ST-7: Proteine im Sekretom chondrogener Progenitorzellen, die für die Quantifizierung herangezogen wurden

Proteinname	UniProt Name	Schwer/Leicht-
		Verhältnis (log2)
Collagen triple helix repeat-containing protein	CTHR1_HUMAN	-6,7
1		
Gelsolin	GELS_HUMAN	-6,5
Growth arrest-specific protein 6	GAS6_HUMAN	-5,4
A disintegrin and metalloproteinase with	ATS1_HUMAN	-4,9
thrombospondin motifs 1		
Fibulin-1	FBLN1_HUMAN	-4,7
Pentraxin-related protein PTX3	PTX3_HUMAN	-4,2
Coiled-coil domain-containing protein 80	CCD80_HUMAN	-4,1
Insulin-like growth factor-binding protein 3	IBP3_HUMAN	-3,8
Metalloproteinase inhibitor 3	TIMP3_HUMAN	-3,7
Collagen alpha-1(III) chain	CO3A1_HUMAN	-3,4
Annexin A2	ANXA2_HUMAN	-3,3
Collagen alpha-1(XII) chain	COCA1_HUMAN	-3,2
Pappalysin-1	PAPP1_HUMAN	-2,9
Adipocyte enhancer-binding protein 1	AEBP1_HUMAN	-2,9
Plasminogen activator inhibitor 1	PAI1_HUMAN	-2,7
Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN	-2,5
Aldose reductase	ALDR_HUMAN	-2,5
Midkine	MK_HUMAN	-2,4
Stanniocalcin-2	STC2_HUMAN	-2,3
Stanniocalcin-1	STC1_HUMAN	-2,3
Ribonuclease 4	RNAS4_HUMAN	-2,2
Cathepsin D	CATD_HUMAN	-2,2
Actinin alpha 1 isoform 3	B7TY16_HUMAN	-2,2
Chitinase-3-like protein 1	CH3L1_HUMAN	-2,2
Lactadherin	MFGM_HUMAN	-2,0
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA_HUMAN	-1,9
Tenascin	TENA_HUMAN	-1,9

Laminin subunit alpha-2	LAMA2_HUMAN	-1,6
Amyloid beta A4 protein	A4_HUMAN	-1,5
Alpha-actinin-4	ACTN4_HUMAN	-1,4
Vitamin K-dependent protein S	PROS_HUMAN	-1,4
cDNA FLJ55211, highly similar to Glia-	B4DIF2_HUMAN	-1,4
derived nexin		
Integrin beta-1	ITB1_HUMAN	-1,3
Serine protease 23	PRS23_HUMAN	-1,3
Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and	SVEP1_HUMAN	-1,3
pentraxin domain-containing protein 1		
Serine protease HTRA1	HTRA1_HUMAN	-1,2
Protein Wnt-5a	WNT5A_HUMAN	-0,9
Collagen alpha-3(VI) chain	CO6A3_HUMAN	-0,9
Collagen alpha-1(I) chain	CO1A1_HUMAN	-0,9
Collagen alpha-2(VI) chain	CO6A2_HUMAN	-0,8
Galectin-1	LEG1_HUMAN	-0,8
Secreted frizzled-related protein 1	SFRP1_HUMAN	-0,7
CD59 glycoprotein	CD59_HUMAN	-0,5
Peptidyl-glycine alpha-amidating	AMD_HUMAN	-0,4
monooxygenase		
Laminin subunit beta-1	LAMB1_HUMAN	-0,2
Collagen alpha-2(I) chain	CO1A2_HUMAN	-0,08
EMILIN-1	EMIL1_HUMAN	-0,05
Decorin	PGS2_HUMAN	-0,01
Versican core protein	CSPG2_HUMAN	0,03
Collagen alpha-1(VI) chain	CO6A1_HUMAN	0,06
Thrombospondin-2	TSP2_HUMAN	0,1
Olfactomedin-like protein 3	OLFL3_HUMAN	0,2
Peroxidasin homolog	PXDN_HUMAN	0,2
Laminin subunit gamma-1	LAMC1_HUMAN	0,3
Complement C1s subcomponent	C1S_HUMAN	0,4
SPARC	SPRC_HUMAN	0,7
Cathepsin Z	CATZ_HUMAN	0,7

CD109 antigen	CD109_HUMAN	0,8
MHC class I antigen	A2BCW2_HUMAN	0,9
Cathepsin B	CATB_HUMAN	1,0
Collagen alpha-2(VI) chain	CO6A2_HUMAN	1,1
Follistatin-related protein 1	FSTL1_HUMAN	1,1
C-type lectin domain family 11 member A	CLC11_HUMAN	1,2
Nidogen-2	NID2_HUMAN	1,2
72 kDa type IV collagenase	MMP2_HUMAN	1,3
Clusterin	CLUS_HUMAN	1,3
Insulin-like growth factor-binding protein 4	IBP4_HUMAN	1,3
Fibrillin-1	FBN1_HUMAN	1,5
Basement membrane-specific heparan sulfate	PGBM_HUMAN	1,5
proteoglycan core protein		
Ectonucleotide	ENPP2_HUMAN	1,5
pyrophosphatase/phosphodiesterase family		
member 2		
Microfibrillar-associated protein 2	MFAP2_HUMAN	1,6
Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	PCOC1_HUMAN	1,7
Collagen alpha-1(XIV) chain	COEA1_HUMAN	1,9
Complement factor H	CFAH_HUMAN	1,9
Vasorin	VASN_HUMAN	2,1
cDNA FLJ59142, highly similar to Epididymal	B4DV10_HUMAN	2,3
secretory protein E1		
Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2_HUMAN	2,5
Extracellular matrix protein 1	ECM1_HUMAN	2,5
Laminin subunit alpha-5	LAMA5_HUMAN	2,8
Latent-transforming growth factor beta-binding	LTBP1_HUMAN	2,8
protein 1		
Sulfhydryl oxidase 1	QSOX1_HUMAN	2,8
Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1_HUMAN	3,3
Cystatin-C	CYTC_HUMAN	3,5
Beta-2-microglobulin	B2MG_HUMAN	3,8
Agrin	AGRIN_HUMAN	3,8
	·	

Cathepsin L1	CATL1_HUMAN	4,8
Galectin-3-binding protein	LG3BP_HUMAN	5,1
Interstitial collagenase	MMP1_HUMAN	5,2
Insulin-like growth factor-binding protein 6	IBP6_HUMAN	5,6



Anhang Abblidung-ST-4

Abbildung ST-4: TICs (technische Replikate) von Gelstück 6 aus Präzipitat 1 des ersten Replikates (BR1)

Anhang Abblidung-ST-5



Abbildung ST-5: TICs (technische Replikate) von Gelstück 6 aus Präzipitat 1 des zweiten biologischen Replikates (BR2)

Anhang Abblidung-ST-6



Abbildung ST-6: TICs (technische Replikate) von Gelstück 6 aus Präzipitat 1 des dritten biologischen Replikates (BR3)

Tabelle-ST-7: Proteine die nur im Sekretom gesunder Chonrozyten identifiziert werden konnten (aus Polacek et al. 2010)

Proteinname	UniProt-Name
Alpha-1-antichymotrypsin	AACT_HUMAN
Angiopoietin-related protein 7	ANGL7_HUMAN
Transforming growth factor-beta-	
induced protein ig-h3	BGH3_HUMAN
Complement factor D	CFAD_HUMAN
Chitinase-3-like protein 2	CH3L2_HUMAN
Cartilage intermediate layer protein 1	CILP1_HUMAN
Complement C3	CO3_HUMAN
Collagen alpha-1(V) chain	CO5A1_HUMAN
Collagen alpha-1(XI) chain	COBA1_HUMAN
Cartilage oligomeric matrix protein	COMP_HUMAN
Chondroitin sulfate proteoglycan 4	CSPG4_HUMAN
Connective tissue growth factor	CTGF_HUMAN
Dermatopontin	DERM_HUMAN
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	FBLN3_HUMAN
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	FBLN4_HUMAN
Fibronectin	FINC_HUMAN
Glutathione peroxidase 3	GPX3_HUMAN
Hemopexin	HEMO_HUMAN
Insulin-like growth factor-binding protein 2	IBP2_HUMAN
Insulin-like growth factor-binding protein 7	IBP7_HUMAN
Plasma protease C1 inhibitor	IC1_HUMAN
Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat protein	ISLR_HUMAN
Integrin beta-like protein 1	ITGBL_HUMAN
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITIH4_HUMAN
Lysyl oxidase homolog 1	LOXL1_HUMAN
Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA	MA1A1_HUMAN
Stromelysin-1	MMP3_HUMAN

Anhang Tabelle-ST-7

Matrilysin	MMP7_HUMAN
Nidogen-1	NID1_HUMAN
Osteomodulin	OMD_HUMAN
Pigment epithelium-derived factor	PEDF_HUMAN
Biglycan	PGS1_HUMAN
Proteoglycan-4	PRG4_HUMAN
Plasma retinol-binding protein	RETBP_HUMAN
Target of Nesh-SH3	TARSH_HUMAN
Thrombospondin-1	TSP1_HUMAN
Vascular cell adhesion protein 1	VCAM1_HUMAN
Alpha-1-antitrypsin	A1AT_HUMAN