

Studie oxidativer Veränderungen während der neuronalen Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen mithilfe der Proteomanalyse

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Katrin Charlotte Brenig

aus Linnich

Düsseldorf, November 2018

aus dem Molecular Proteomics Laboratory
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. K. Stühler
2. Prof. Dr. D. Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Mai 2019

Mathilda & Julian

Zusammenfassung

Ein gängiges Modellsystem um initiale Prozesse der neuronalen Differenzierung zu untersuchen, ist die humane Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y. Obwohl die durch Retinsäure induzierten Vorgänge zunehmend mit redox-sensitiven Prozessen in Verbindung gebracht werden, sind die molekularen Auswirkungen auf die Proteine nicht vollständig aufgeklärt. In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss von oxidativen Veränderungen während der frühen Zeitpunkte der neuronalen Differenzierung des Zellmodells mithilfe der Proteomanalyse untersucht.

Infolge des angewandten Differenzierungsprotokolls kommt es zu einer signifikanten Extension der Neuriten, einem phänotypischen Merkmal des neuronalen Differenzierungsprozesses. Mittels quantitativer Massenspektrometrie wurden zwei Proteomanalysen durchgeführt, welche die differenziellen Proteinabundanzen in einem dynamischen Verlauf zwischen 0-48Std. und nach 120Std. darstellen. Dadurch konnten veränderte Abundanzen von Markerproteinen nachgewiesen werden, die am Retinsäure-Signalweg (z.B. CRABP2) und der neuronalen Differenzierung (z.B. RET) beteiligt sind. Unterstützt wurden diese Ergebnisse durch quantitative mRNA Daten. Einhergehend mit der größten morphologischen Veränderung nach 48Std. legen auch die Proteomanalysen nahe, dass die Zellen von einem proliferierenden in einen differenzierenden Zustand übergehen. Die, mithilfe von redox-sensitiven Sensoren (RoGFP2), durchgeführten Experimente weisen schließlich auf einen signifikanten Anstieg von zytosolischen H_2O_2 nach zweistündiger Retinsäurebehandlung hin, an dem wahrscheinlich eine Aktivität des NADPH-Oxidase-Komplexes-2 beteiligt ist. Für die globale Analyse von reversibel oxidierten Proteinen wurde ein redox-spezifisches Proteinanreicherungsprotokoll etabliert, welches einen Nachweis mittels quantitativer Massenspektrometrie ermöglichte. Während zwischen 0-3Std. nur <0,5% der Proteine eine Veränderung in der Abundanz aufwiesen, zeigten im Redox-Proteom nach 2Std. Retinsäurebehandlung 275 (16%) der 1769 quantifizierten cysteinhaltigen Proteine signifikante Unterschiede. Darunter solche mit bereits bekanntem Bezug zu redox-sensitiven Prozessen und/oder der neurologischen Entwicklung (z.B. RAC1). Für 57 dieser 275 Proteine lieferten die Ergebnisse zudem Informationen über die potenziell reversibel oxidierten Cysteine. Schließlich wurde gezeigt, dass eine Veränderung des zellulären Redoxzustandes, durch Zugabe des Reduktionsmittels N-Acetylcystein oder des Radikalfängers Butylhydroxyanisol, sowohl Auswirkungen auf die Abundanz von Markerproteinen hat als auch zu signifikant verkürzten Neuriten führt. Dieses Experiment ist ein weiterer Hinweis darauf, dass zelluläre Redoxprozesse an der neuronalen Differenzierung des Zellmodells beteiligt sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Modelle vorgeschlagen, die die molekularen Auswirkungen veränderter ROS-Mengen erklären. (1) ROS sind Teil des Autoregulationsmechanismus mit dem die zelluläre Retinsäure-Homöostase kontrolliert wird. (2) Ein frühzeitiger ROS-Anstieg führt zu gezielten oxidativen Modifizierungen an Proteinen *downstream* des klassischen Retinsäure-Signalweges.

Potenziell redox-sensitive Proteine können dabei Teile von Signalkaskaden sein, die auf veränderte energetische Bedürfnisse der neuronal differenzierenden Zelle reagieren und zu der Ausbildung phänotypischer Merkmale beitragen können.

Summary

The human neuroblastoma cell line SH-SY5Y is a common model system to study the initial phases of neuronal differentiation. Although the progression induced by retinoic acid is increasingly associated with redox-sensitive processes, the molecular effects on proteins are not fully elucidated. Here, the influence of oxidative changes during the early stages of neuronal differentiation was investigated using proteome analysis.

The applied differentiation protocol results in neurite outgrowth, a characteristic event of the neuronal differentiation process. Using quantitative mass spectrometry-based proteomics changes in protein abundance were analyzed in a dynamic time course between 0 - 48 h and after 120 h. In combination with quantitative mRNA data, changes in marker proteins involved in the retinoic acid signaling pathway (e.g. CRABP2) as well as neuronal differentiation (e.g. RET) were detected. Along with the largest morphological change within 48 h, proteome analyzes indicates a cellular change from proliferation to differentiation. Subsequently, experiments with redox-sensitive sensors (RoGFP2) indicate a significant increase in cytosolic H₂O₂ after 2 h of retinoic acid treatment, probably involving the activity of the NADPH oxidase-2 complex. A redox-specific protein enrichment protocol was established to facilitate the global analysis of reversibly oxidized proteins by quantitative mass spectrometry. While only <0.5% of the proteins showed a change in abundance between 0 - 3 h, the analysis of the redox proteome revealed profound changes after 2 h of treatment. Out of 1769 quantified cysteine containing proteins, 275 showed a significant difference between retinoic acid treated and control cells. Among these are proteins with known connections to redox-sensitive processes and/or neurological development (e.g. RAC1). Furthermore, the results provided valuable hints about the reversibly oxidized cysteines for 57 of these 275 proteins. Finally, the addition of reducing agent N-acetylcysteine or the free radical scavenger butylated hydroxyanisole led to a change in the cellular redox state, affected the abundance of marker proteins and reduced the neurite elongation. This experiment is another indication that the cellular redox state is important for the neuronal differentiation of the model.

Based on the data obtained in this thesis, two models were proposed explaining the molecular effects of altered ROS levels. (1) ROS are part of the autoregulatory mechanism by which cellular retinoic acid homeostasis is controlled. (2) An early increase in ROS leads to targeted oxidative modifications of proteins downstream of the classical retinoic acid signaling pathway. Potentially redox-sensitive proteins can be part of signaling cascades that react according to altered energetic needs of neuronal differentiating cells and contribute to phenotypic characteristics.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	III
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Reaktive Spezies und oxidative Modifizierungen an Proteinen	1
1.1.1 Cystein als Ziel oxidativer Modifizierungen	1
1.1.2 Reaktive Sauerstoffspezies	4
1.2 Quellen reaktiver Sauerstoffspezies	5
1.2.1 Mitochondriale Entstehung	6
1.2.2 Enzymatische Entstehung	7
1.2.3 Kontrolle des zellulären Redoxstatus	9
1.3 Redox-getriebene Prozesse während der neuronalen Differenzierung	11
1.3.1 Bi-Funktionalität von reaktiven Sauerstoffspezies	13
1.4 Humane Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y als Modellsystem	14
1.4.1 Modellsystem zur Studie redox-sensitiver Prozesse	14
1.4.2 Modellsystem zur Studie neuronaler Differenzierung	16
1.4.3 Kultivierung und neuronale Differenzierung durch Retinsäure	16
1.5 Redox-spezifische Analysen	19
1.5.1 Kriterien für die redox-spezifische Probenaufarbeitung	20
1.5.2 Quantitative Thiolnachweise	22
1.5.3 Manipulation des zellulären Redoxzustandes	26
2. Zielsetzung der Arbeit	27
3. Material und Methoden	28
3.1 Chemikalien	28
3.2 Molekularbiologische Methoden	28
3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion	29
3.2.2 Aufreinigung von DNA	30
3.2.3 DNA-Restriktion	30
3.2.4 DNA-Ligation	30
3.2.5 DNA-Quantifizierung	31
3.2.6 Herstellung und Transformation chemokompetenter Bakterienzellen	31
3.2.7 Sequenzierung von DNA	31
3.2.8 Transfektion von Zellen	31
3.3 Kultivierung von humanen SH-SY5Y-Zellen	32
3.3.1 Stabile Isotopenmarkierung von Aminosäuren in der Zellkultur	32
3.3.2 Neuronale Differenzierung und Behandlungen	32
3.3.3 Mikroskopie	33
3.4 Detektion Reaktiver Spezies	33
3.4.1 Farbstoffbasierter Nachweis	34
3.4.2 Konfokalmikroskopie genetisch kodierter Sensoren	34
3.4.3 Detektion genetisch kodierter Sensoren auf 96-Wellplatten	35
3.5 Probenvorbereitung für die Proteinanalytik	35
3.5.1 Zellernte und Zellaufschluss	35
3.5.2 Proteinreinigung über Größenausschlusschromatographie	36
3.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	36
3.5.4 Proteinnachweis über SDS-PAGE	37

3.5.5	Silberfärbung von Proteingelen	37
3.6	Aufarbeitung für die redox-spezifische Proteomanalyse.....	38
3.6.1	Zellernte und Zellaufschluss.....	38
3.6.2	Vorbereitung der Thiopropyl-Sepharose 6B-Matrix.....	38
3.6.3	Aufarbeitung über die Thiopropyl-Sepharose 6B-Matrix.....	39
3.7	Vorbereitung der Proben für die Massenspektrometrie.....	39
3.7.1	In-Gel-Verdau und Peptidextraktion.....	39
3.7.2	Hochleistungsflüssigchromatographie.....	40
3.7.3	Massenspektrometrischer Nachweis.....	40
3.8	Bioinformatische Datenanalyse	41
3.8.1	Quantifizierung der Neuritenlänge und Bestimmung der Zellzahl.....	41
3.8.2	Ratiometrische Auswertung konfokalmikroskopischer Aufnahmen.....	41
3.8.3	Ratiometrische Auswertung der Fluoreszenzdaten.....	42
3.8.4	Massenspektrometrische Proteinidentifizierung.....	42
3.9	Quantitative Auswertung massenspektrometrischer Daten	42
3.9.1	Aufarbeitung der Daten.....	42
3.9.2	Proteomstudie 120 Std.-Proteom	43
3.9.3	Vergleich der Proteom- mit Transkriptomdaten.....	44
3.9.4	Proteomstudie RA-Zeitreihe	45
3.9.5	Redox-Proteomstudie.....	45
3.9.6	Proteomstudie Wirkstoff-Studie.....	46
3.9.7	Hauptkomponentenanalyse und Hierarchisches Cluster	47
3.9.8	Soft cluster-Analyse.....	47
3.9.9	Anreicherungsanalysen, Visualisierung von Signalwegen und Netzwerken.....	47
3.9.10	Venn-Analyse	48
4.	Ergebnisse	49
4.1	Mikroskopische Betrachtung der Zellmorphologie	49
4.2	Differenzielle Proteomstudien retinsäurebehandelter SH-SY5Y-Zellen.....	51
4.2.1	Proteomanalyse nach 120 Std. Behandlung.....	51
4.2.2	Vergleich der Proteom- mit Transkriptomdaten.....	55
4.2.3	Verlauf der Proteomänderungen zwischen 0-48 Std. Behandlung	57
4.3	Analyse des zellulären Redoxzustandes	62
4.3.1	Analyse des globalen Redoxzustandes.....	63
4.3.2	Funktionelle Validierung des genetisch kodierte H ₂ O ₂ -Sensors RoGFP2-ORP1	63
4.3.3	Verwendung von RoGFP2-ORP1, um die Entstehung von H ₂ O ₂ zu überprüfen	67
4.3.4	Verwendung von NCF1-RoGFP2, um eine Beteiligung der NOX-Komplexe zu überprüfen	68
4.4	Differenzielle Analyse des Redox-Proteoms von SH-SY5Y-Zellen.....	69
4.4.1	Veränderungen infolge der Behandlung mit dem Oxidationsmittel Diamid	69
4.4.2	Veränderungen infolge der zweistündigen Retinsäurebehandlung	71
4.4.3	Quantifizierung carbamidomethylierter Peptide als Hinweis auf redox-sensitive Cysteine.....	75
4.4.4	Überprüfung der Abundanzveränderungen in dem Redox-Proteom	76
4.5	Manipulation des zellulären Redoxzustandes retinsäurebehandelter SH-SY5Y-Zellen.....	78
4.5.1	Differenzielle Proteomstudie nach BHA- bzw. NAC-Behandlung.....	79
4.5.2	Veränderung der Zellmorphologie nach BHA- bzw. NAC-Behandlung	83
5.	Diskussion	85
5.1	SH-SY5Y-Zellen als Modellsystem zur Studie redox-spezifischer Änderungen der Proteine während der neuronalen Differenzierung	85
5.1.1	Methodische Aspekte der Proteom- und Transkriptomanalyse	85

5.1.2	Die Extension der Neuriten kann durch Veränderungen des Redoxzustandes beeinflusst werden.....	86
5.1.3	Die Expression von Markerproteinen weist auf die Funktionalität des Retinsäure-Signalweges und die neuronale Differenzierung hin	87
5.1.4	Hinweise auf einen ROS-Anstieg nach zweistündiger Retinsäurebehandlung.....	89
5.1.5	Die differenzielle Proteomanalyse weist nicht auf Abundanzänderungen von Proteinen hin, die an der Kontrolle des Redoxzustandes beteiligt sind	91
5.2	Methodische Aspekte der redox-spezifischen Proteomanalyse	92
5.2.1	Die Abundanz im Redox-Proteom ist unabhängig von der Proteinmenge und der Anzahl der Cysteine pro Protein	92
5.2.2	Diamid und Retinsäure zeigen einen unterschiedlichen Einfluss auf das Redox-Proteom	93
5.2.3	Identifizierung von potenziell redox-sensitiven Proteinen.....	94
5.2.4	Analyse der carbamidomethylierten Peptide als Hinweis auf das redox-sensitive Cystein.....	95
5.3	Die Retinsäurebehandlung führt zu globalen Veränderungen des Redox-Proteoms.....	98
5.3.1	Retinsäure-Signalweg.....	99
5.3.2	Energiehaushalt.....	101
5.3.3	Zytoskelett-Dynamik.....	103
5.3.4	Fazit und Ausblick.....	111
6.	Anhang	113
	Abkürzungsverzeichnis	134
	Literatur	137
	Danksagung	160
	Erklärung	161

Abbildungsverzeichnis

Oxidative Cystein-Modifizierungen.....	3
Funktionelle Rolle von redox-sensitiven Cysteinen.....	4
Quellen reaktiver Sauerstoffspezies.....	6
Kontrolle der intrazellulären Superoxidanion- und H ₂ O ₂ -Mengen.....	11
Einfluss des Redoxzustandes auf die neuronale Entwicklung.....	14
Übersicht über Markierungsstrategien von Cys-PTMs.....	24
Schematische Darstellung des Sensorproteins RoGFP2-ORP1.....	34
Projektübersicht.....	49
Zellmorphologie der Retinsäure behandelten Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y.....	50
Arbeitsablauf für die Probenvorbereitung der Proteomanalyse.....	51
Retinsäure-induzierte Veränderungen des Proteoms nach 120 Std. Behandlung.....	52
Quantifizierung bekannter Markerproteine nach 120Std. Retinsäurebehandlung.....	53
Vergleich der Proteom- und Transkriptomdaten von 120 Std. retinsäurebehandelten Zellen.....	56
Vergleich der Transkriptom- und Proteomdaten mit einer veröffentlichten Liste der Top-50-regulierten Gene.....	57
Retinsäure-induzierte Änderungen des Proteoms zwischen 0-48 Std.....	58
Dynamische Veränderungen des Proteoms und assoziierte biologische Prozesse.....	59
Retinsäure-abhängige Abundanz der Proteine CRABP2 und RET.....	60
Nachweis reaktiver Spezies in retinsäurebehandelten SH-SY5Y-Zellen.....	63
Konfokalmikroskopische Aufnahmen und softwarebasierte Ratio-Analyse des Sensors RoGFP2-ORP1 in stabil transfizierten SH-SY5Y-Zellen.....	65
Funktionalitätstest des Sensors RoGFP2-ORP1 im Mikrotiterplattenlesegerät.....	66
Veränderung der Fluoreszenz-Ratio von RoGFP2-ORP1 zwischen 0-3Std. Behandlung.....	67
Retinsäure induziert die Oxidation des Sensors NCF1-RoGFP2.....	68
Schematischer Arbeitsablauf für die redox-spezifische Proteomanalytik.....	69
Diamid-induzierte Veränderungen des Redox-Proteoms.....	71
Retinsäure-induzierte Veränderungen des Redox-Proteoms.....	73
RAC1 als Kandidatenprotein für eine reversible Oxidation nach Retinsäurebehandlung.....	75
Quantifizierung der carbamidomethylierten Peptide des Redox-Proteoms.....	76
BHA und NAC reduzieren die Fluoreszenzintensität des redox-sensitiven Farbstoffes.....	78
Einfluss von BHA und NAC auf das Proteom von retinsäurebehandelten SH-SY5Y-Zellen.....	79
Direkter und indirekter Wirkstoff-Effekt.....	80
BHA und NAC verändern die Abundanz von VGF und CALM1, aber nicht von RET.....	81
Gruppierung von BHA- und NAC-sensitiven Proteinen.....	83
BHA und NAC unterdrücken die durch Retinsäure hervorgerufene Verlängerung der Neuriten.....	84
Übersicht des Retinsäure-Signalweges.....	88
Redox-Proteom: Anzahl der Cysteine pro Protein.....	93
Modell für einen redox-sensitiven Rückkopplungsmechanismus, um die Retinsäure-Homöostase zu erhalten.....	101
Strukturproteine und Rho-GTPasen der redox-spezifischen Proteomanalyse.....	105
Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk.....	110
Mögliche molekulare Auswirkungen von RS während der Retinsäure-induzierten neuronalen Differenzierung.....	111
Beispielhafte Darstellung der Qualitätskontrolle für die Proteomanalysen.....	113
Mittlere MS-Signalintensitäten des Thiol-TPS-Datensatzes.....	114
Relative Abundanzänderung der Komponenten des klassischen Retinsäure-Signalweges im Proteom und Transkriptom.....	114

Tabellenverzeichnis

Beispiele für biologisch relevante aktivierte Formen des Sauerstoffs.....	5
Vektoren und DNA-Konstrukte.....	28
Primer für die Klonierung des pCDNA3-NCF1-RoGFP2-Konstruktes.....	28
PCR-Einstellungen.....	29
SOE-PCR-Einstellungen.....	29
Proteinreinigung über Größenausschlusschromatographie.....	36
Gradient der Flüssigchromatographie.....	40
Parameter für die ESI-MS/MS-Analyse.....	41
Übersicht der massenspektrometrischen Proteomanalyse.....	42
Zuordnung zu Retinsäure-abhängigen Prozessen anhand der GO-Kategorien.....	44
Redox-Proteom: Methodische Übersicht.....	45
Wirkstoff-Studie: Methodische Übersicht.....	46
Funktionelle Anreicherungsanalyse der Proteine mit einer erhöhten Abundanz nach 120 Std. Behandlung.....	54
Quantifizierte Proteine die mit der Kontrolle des zellulären Redoxzustandes, der zellulären Antwort auf oxidativen Stress, Lipid-Oxidation und DNA-Reparatur verbunden sind.....	61
Funktionelle Anreicherungsanalyse potenziell reversibel oxidierter Proteine.....	74
Überprüfen der Abundanzveränderung der redox-sensitiven Kandidatenproteine.....	77
Einfluss von BHA und NAC auf Proteine, die an der Kontrolle der zellulären Redox-Homöostase beteiligt sind.....	82
Potenziell redox-sensitive Cysteine der Kandidatenproteine.....	96
120 Std.-Proteom: Liste der 80 differenziellen Proteine.....	115
RA-Zeitreihe: Liste der 177 differenziellen Proteine.....	117
RA-Zeitreihe: Anreicherungsanalyse der Cluster 4 und 7.....	121
Cys _{ox} -TPS: Liste der 275 differenziellen Proteine innerhalb des Redox-Proteoms.....	122
Liste der 73 differenziellen carbamidomethylierten Peptide.....	127
Wirkstoff-Studie: Liste der 68 Proteine mit Wirkstoff-Effekt.....	131
Zusammengefasste GO-Kategorien für die Beschreibung der BHA- und NAC-sensitiven Proteine.....	133

1. Einleitung

1.1 Reaktive Spezies und oxidative Modifizierungen an Proteinen

Reaktive Sauerstoff-, Stickstoff- und Schwefelspezies, welche allgemein als ROS, RNS bzw. RSS abgekürzt werden, werden unter anderem als Antwort auf bestimmte intrinsische oder extrinsische Stimuli generiert. Die Zeiten in denen reaktive Spezies (RS) lediglich als Indikatoren für zellulären Stress oder den Zelltod galten, sind längst überholt. Dahingegen beschäftigt sich ein stetig wachsendes Forschungsfeld mit den feinen Regulationsmechanismen, die durch RS bedient werden können. Neben der Ätiologie und Progression von Krankheiten, z.B. bei neurodegenerativen Erkrankungen, Krebs, Adipositas und Diabetes, spielen RS in vielen physiologischen Prozessen als intrazelluläre Signalmoleküle eine wichtige Rolle, so z.B. bei der Kontrolle des Zellwachstums, der Proliferation, der Differenzierung, der Zellmigration und der Apoptose (Finkel, 2003; Miller & Chang, 2007; S. G. Rhee, 2006; Ye, Zhang, Townsend, & Tew, 2015). Reaktive Spezies können mit nahezu jedem biologischen Molekül interagieren. Die oxidative Modifizierung von Proteinen repräsentiert einen eleganten Mechanismus, wie ein oxidatives Signal in eine biologische Antwort übersetzt werden kann (Paulsen & Carroll, 2013). Diese streng kontrollierten und ausbalancierten Antworten beinhalten Protein-Protein Interaktionen (Z. Guo, Kozlov, Lavin, Person, & Paull, 2010; Sobotta et al., 2015), katalytische Aktivität oder Ligandenbindungen (Andersen, 2004; Paulsen et al., 2012) sowie die Regulation von diversen Proteinfunktionen und der Proteinstabilität (Kulathu et al., 2013; Lee, Baek, Soetandyo, & Ye, 2013). Das prominenteste Target von oxidativen Modifizierungen an Proteinen ist die Aminosäure Cystein, doch können auch die Aminosäuren Histidin, Methionin, Tryptophan und Tyrosin modifiziert werden.

1.1.1 Cystein als Ziel oxidativer Modifizierungen

Was aber macht das Cystein zu einem so interessanten Ziel? Cystein gehört neben Glutaminsäure, Prolin und Tryptophan zu den am häufigsten konservierten Aminosäuren. Insbesondere Tryptophan als größte und hydrophobste sowie Cystein als einzige Thiol-enthaltende Aminosäure, sind in Ihrer Funktion schwer bzw. nicht zu ersetzen. Marino und Gladyshev argumentieren in einer ihrer Arbeiten, dass die Konservierung der Cysteine einem hohen evolutiven Druck standhalten muss, sodass eben diese funktionell relevanten Cysteinreste besonders stark von anderen Resten isoliert werden und zudem innerhalb des Proteins verborgen liegen (Marino & Gladyshev, 2010). Cystein hat einen besonderen Stellenwert in der Biologie. Das große polarisierbare Schwefelatom ist elektronenreich und als Thiol vorliegend eines der stärksten Nukleophile eines Proteins. Anders, als bei der relativ unreaktiven Thioetherform des Methionin-Schwefels, ist die Thiolform (Sulfhydryl/SH) des Cysteins ionisierbar (Thiolatanion/S⁻). Dieser Wechsel zwischen protonierter und deprotonierter Form ist entscheidend für die Reaktivität des Cysteins und hängt von Faktoren wie der Säurekonstante

(pKa-Wert) der Thiolgruppe sowie dem vorliegenden pH-Wert ab (Marino & Gladyshev, 2010; Wall, Oh, Diers, & Landar, 2012). Als mittlerer pKa-Wert der Thiol-Seitenkette von Cysteinen wird häufig 8,14 angegeben (Lide, 2010). Maßgeblich von dessen Mikroumgebung beeinflusst variiert der pKa-Wert einer proteinogenen Thiolgruppe jedoch zwischen 2,5 und 12. Hieran sind insbesondere benachbarte positiv geladene Aminosäuren, Wasserstoffbrücken und die N-terminale Lokalisierung des Cysteins an einer α -Helix (*N-cap*) beteiligt (Iqbalsyah, Moutevelis, Warwicker, Errington, & Doig, 2006; Lutolf, Tirelli, Cerritelli, Cavalli, & Hubbell, 2001; Salsbury, Knutson, Poole, & Fetrow, 2008). Zum Beispiel liegen die pKa-Werte für freies Cystein und dem ubiquitär vorkommenden niedermolekularen Thiol Glutathion (GSH) bei 8,3 bzw. 8,8. In den aktiven Zentren von Enzymen hingegen liegen teilweise pKa-Werte $\leq 3,5$ vor. Wie etwa bei den zwei aktiven Cysteinen des *thiol-disulfide interchange protein* (DsbA, *Escherichia coli/E. Coli*), welche pKa-Werte von 3,5 und 10 aufweisen (Nelson & Creighton, 1994). Der Zusammenhang zwischen dem pKa-Wert und dem pH-Wert verdeutlicht, warum nicht alle Cysteine die gleiche inhärente Reaktivität besitzen (Wall et al., 2012). Während ein Thiol mit hohem pKa-Wert von 8,4 bei einem physiologischen pH-Wert (7,4) nur zu 10% als Thiolanion vorliegt, sind es bei einem Thiol mit einem pKa-Wert von 6,4 bereits 90%. Damit ist ein Thiol mit geringerem pKa-Wert reaktiver und wahrscheinlich auch zugänglicher für RS (Wall et al., 2012). Einen weiteren Einfluss auf die Reaktivität hat zudem die Zugänglichkeit des Cysteins innerhalb des Proteins. Das Cystein-Analogon Selenocystein besitzt eine ähnliche Reaktivität. Die intrinsische Chemie unterscheidet sich jedoch aufgrund der stabilisierten deprotonierten Se-Form bei einem geringeren pKa-Wert ($\sim 5,2$; Copeland, 2005).

Da das Schwefelatom die Möglichkeit besitzt in verschiedenen Oxidationszuständen vorzuliegen (-2 bis +6), können eine Vielzahl von posttranslationalen Modifizierungen an den Cysteinen entstehen (Cys-PTM, Abbildung 1.1). Jede dieser Cys-PTMs hat eine spezifische Reaktivität, woraus spezielle physiologische Eigenschaften folgen. Die Thiol-/Thiolatgruppe ist zugänglich für Alkylierungen durch Elektrophile und kann zudem in eine Reihe weiterer Oxidationszustände gebracht werden. Die Reaktion mit einem Nitrosonium (NO^+) führt zu einer Nitrosylierung. Durch Reaktion mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) hingegen bildet sich in einer Zwei-Elektronen-Oxidation die sehr labile und hochreaktive Sulfensäure (oder Sulfenylierung), welche als Ausgangspunkt für verschiedenste Cys-PTMs dient. Die Geschwindigkeitskonstante mit der eine Sulfensäure weiter reagieren kann variiert zwischen $20 - 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ Sek.}^{-1}$ (Winterbourn & Hampton, 2008). Die Reaktion mit Protein-Thiolen führt beispielsweise zu intra- oder intermolekularen Disulfiden und die Reaktion mit dem Tripeptid GSH zu einer Glutathionylierung. Eine weitere Oxidation der Sulfensäure durch H_2O_2 führt bei einer deutlich langsameren Reaktionsgeschwindigkeit ($0,1 - 100 \text{ M}^{-1} \text{ Sek.}^{-1}$) zu einer Sulfin- und letztlich Sulfonsäure (Crane, Parsonage, Poole, & Claiborne, 1995; Peskin et al., 2007). Die weitestgehend

irreversiblen Sulfin- und Sulfonsäuren werden häufig mit Krankheiten und oxidativem Stress assoziiert (Andersen, 2004; Klaunig & Kamendulis, 2004). Reagiert die Sulfen-, Sulfin- oder Sulfonsäure mit einem benachbarten Amidstickstoff, entsteht das zyklische Sulfenyl-, Sulfin- bzw. Sulfonamid. Sowohl die S-S- als auch die S-N-Bindung können durch das Thioredoxin- oder Glutathion-System wieder reduziert werden. Daher dienen diese Modifizierungen häufig als Schutz vor einer Überoxidation (C. Berndt, Lillig, & Holmgren, 2007).

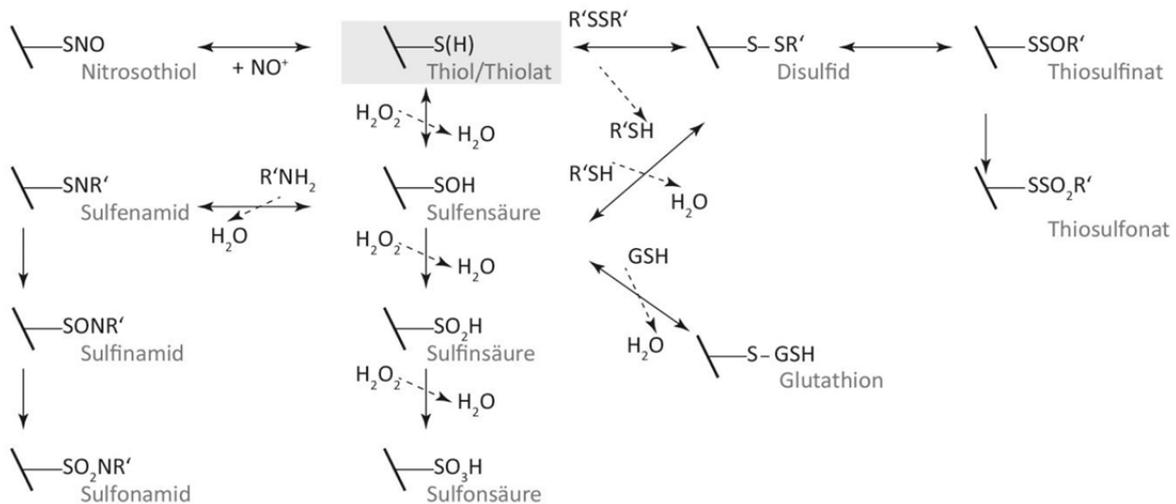


Abbildung 1.1 Oxidative Cystein-Modifizierungen.

Zunächst wird durch H_2O_2 das Thiol/Thiolat zu einer Sulfensäure oxidiert. Die Sulfensäure kann unter erhöhten H_2O_2 -Mengen/oxidativem Stress schnell zu einer Sulfin- oder Sulfonsäure oxidiert werden. Die hochreaktive Sulfensäure kann eine Reihe weiterer Reaktionen eingehen. Reagiert diese mit einem benachbarten, freien oder Disulfid-gebundenem Cystein, entsteht ein Disulfid. Eine Oxidation der Disulfide kann zu der Entstehung eines Thiosulfinats oder Thiosulfonats führen. Reagiert die Sulfensäure mit dem niedermolekularen Glutathion (GSH), entsteht das spezielle gemischte Glutathion-Disulfid (Glutathion). Die Reaktion mit dem Amid des Peptidrückgrades hingegen führt zu der Entstehung eines zyklischen Sulfenamids, welches ebenfalls zu den höher oxidierten Formen Sulfin- und Sulfonamid umgesetzt werden kann. Die Reaktion mit dem Nitrosoniumion (NO^+) führt zu einem Nitrosothiol. Die vereinfachte Darstellung wurde modifiziert nach S. E. Leonard & Carroll, 2011; C. E. Paulsen & Carroll, 2013.

Die Vielzahl der größtenteils reversiblen Cys-PTMs zeigt, wie hoch spezifisch und variabel eine Modifizierung an einer einzelnen Aminosäure sein kann. Durch den besonderen Ionisierungszustand der Cysteine, der damit einhergehenden Nukleophilie und Zugänglichkeit für redox-getriebene Prozesse, werden die diversen Funktionen an Proteinen verschiedener Klassen ermöglicht. Cysteine sind Strukturgeber, sie fungieren als sogenannte molekulare Schalter, ermöglichen Redoxkatalysen, die Bindung von Metallionen oder dienen als katalytische Nukleophile (Abbildung 1.2; Giles, Giles, & Jacob, 2003; Pace & Weerapana, 2013). Dies und der Balanceakt eines Cysteins zwischen produktiver und pathogener Reaktivität machen gleichermaßen deutlich, warum das derzeitige Forschungsfeld in diesem Gebiet rasant wachsend und zugleich ambitioniert ist.

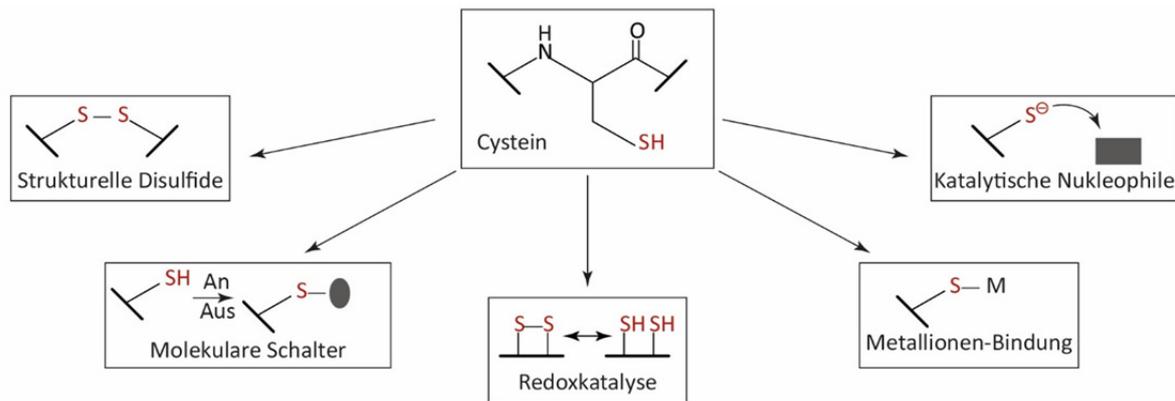


Abbildung 1.2 Funktionelle Rolle von redox-sensitiven Cysteinen.

Cysteine können in Proteinen als strukturgebende Elemente dienen. Darüber hinaus führen sie diverse Funktionen aus: als molekulare Schalter, bei der Redoxkatalyse, der Metallionen-Bindung oder als katalytische Nucleophile. Abbildung aus Pace & Weerapana, 2013.

1.1.2 Reaktive Sauerstoffspezies

Sauerstoff ist ein zentrales Oxidationsmittel in aeroben Organismen und kann Oxidationszahlen von +2 bis -2 zugeordnet werden. Aufgrund der starken Elektronegativität von Sauerstoff kommt es in fast allen Verbindungen mit negativen Oxidationsstufen vor. Eine Ausnahme bilden Verbindungen mit dem elektronegativeren Fluor (Sauerstofffluoride, Oxidationsstufe +2 und +1). Oxide bezeichnen Verbindungen mit Sauerstoff in der Oxidationsstufe -2 (z.B. H_2O und CO) und Peroxide (z.B. H_2O_2) mit der Oxidationsstufe -1. Die Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung in Peroxiden ist labil und neigt zu einer homolytischen Spaltung unter der Bildung von Radikalen (z.B. Superoxidanion/ O_2^- , Oxidationsstufe -1/2). Neben dem stabilen Triplett-Sauerstoff (3O_2), dem Grundzustand von O_2 , existieren zwei erlaubte und energetisch erreichbare Singulett-Zustände (1O_2) des Sauerstoffs (Jakubowski, 2008; Weiss, 2008). Im Gegensatz zu dem reaktionsträgen Triplett-Sauerstoff sind diese kurzlebig, hochreaktiv und werden zu den ROS gezählt (Gerald Karp, 2004). Drei der häufigsten ROS in biologischen Systemen sind das zuvor erwähnte radikalische Superoxidanion, welches auch als Dioxid oder Hyperoxidation bezeichnet wird, das Hydroxylradikal (OH^\cdot) und H_2O_2 (Ye et al., 2015). Weitere Beispiele für biologisch relevante ROS sind Hypochlorige Säure ($HOCl$) und verschiedene Stickstoff-Sauerstoff-Verbindungen, wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO), Peroxynitrit ($ONOO^-$) und Stickstoffdioxid (NO_2).

Die biologisch relevanten ROS Superoxidanion, Hydroxylradikal und H_2O_2 haben die Eigenschaft, ineinander überführbar zu sein (Wilson & Gonzalez-Billault, 2015). Das Superoxidanion dismutiert spontan mit hoher Geschwindigkeit zu $H_2O_2 + O_2$ ($\sim 10^5 M^{-1} Sek^{-1}$) und wird zusätzlich durch die 10^4 x schnellere Superoxid-Dismutase (SOD)-katalysierte Reaktion ($\sim 10^9 M^{-1} Sek^{-1}$) umgesetzt (Gardner, Raineri, Epstein, & White, 1995; Hsu et al., 1996; Tyler, 1975). H_2O_2 kann durch eine Übergangsmetallionen-katalysierte Reaktion (meist Fe^{2+}/Cu^+) in einem Ein-Elektronen-Transfer zu dem stark oxidierenden Hydroxylradikal reduziert werden (Fenton-Reaktion). Diese Reaktion hängt weitestgehend von der Fe^{2+} -Zugänglichkeit in dem Zytoplasma ab (Nunez et al., 2012). Eine weitere

Möglichkeit des H_2O_2 -Abbaus besteht durch die Haber-Weiss-Reaktion, bei der H_2O_2 mit Superoxid-anion reagiert und das Hydroxylradikal freigesetzt wird (Kehrer, 2000). Das Hydroxylradikal besitzt ein Redoxpotential von etwa +2,3 V und ist damit hochreaktiv und mit einer Halbwertszeit von $T_{V1/2} = 10^{-9}$ Sek. sehr kurzlebig (Giorgio, Trinei, Migliaccio, & Pelicci, 2007). Aufgrund der irreversiblen Modifizierungen die Hydroxylradikale an Makromolekülen vornehmen, besitzt diese Spezies eine hohe biologische Toxizität (Ye et al., 2015). Im Gegensatz dazu ist H_2O_2 ein mildes Oxidationsmittel (+0,32 V) und hat mit $T_{V1/2} = 10^{-5}$ Sek. eine längere zelluläre Halbwertszeit (Giorgio et al., 2007). Die in Tabelle 1.1 aufgeführten Reduktionspotentiale beziehen sich auf die Affinität zu Elektronen und sind relativ zu Wasserstoff (0 V) angegeben. Verglichen mit dem Superoxidanion- und Hydroxylradikal, besitzt H_2O_2 die geringste Reaktivität, die höchste Stabilität und ist elektrisch neutral, was diese Spezies zu einem ausgezeichneten Signalmolekül macht (Giorgio et al., 2007).

Tabelle 1.1 Beispiele für biologisch relevante aktivierte Formen des Sauerstoffs.

Aufgrund der hohen Oxidationskraft werden die Intermediate zwischen molekularem Sauerstoff (O_2) und Wasser (H_2O) als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bezeichnet. ROS besitzen verschiedene Eigenschaften, wie das Reduktionspotential und die intrazelluläre Halbwertszeit ($T_{1/2}$). Das Reduktionspotential beschreibt die Affinität einer Substanz für Elektronen und wird relativ zu Wasserstoff (0 V) gesetzt. Mit geringerem Reduktionspotential steigen die Elektronegativität einer Substanz und damit deren Oxidationskraft. Die Halbwertszeit beschreibt die Stabilität eines Moleküls. Tabelle und Text modifiziert nach Giorgio, Trinei et al. 2007 und Ye et al., 2015.

	ROS			
	O_2	$\text{O}_2^{\cdot-}$	H_2O_2	OH^{\cdot}
		Superoxidanion	Wasserstoffperoxid	Hydroxylradikal
Reduktionspotential (V)		0,94	0,32	2,31
$T_{1/2}$ (Sek.)		10^{-6}	10^{-5}	10^{-9}

1.2 Quellen reaktiver Sauerstoffspezies

Biologische Systeme sind einer kontinuierlichen Zufuhr an ROS ausgesetzt, welche sowohl durch endogene Reaktionen als auch externe Quellen, wie z.B. UV-Lichtexposition, dem Metabolismus verschiedener Medikamente und Xenobiotika, Zigarettenrauch und Strahlung, gebildet werden können (L. B. Poole, 2015; Trachootham, Lu, Ogasawara, Nilsa, & Huang, 2008; Winterbourn & Hampton, 2008). Zu den primären Quellen der intrazellulären ROS-Produktion gehören die Elektronentransportkette der Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum (ER) und die NADPH-Oxidase-Komplexe (NOX; Abbildung 1.3).

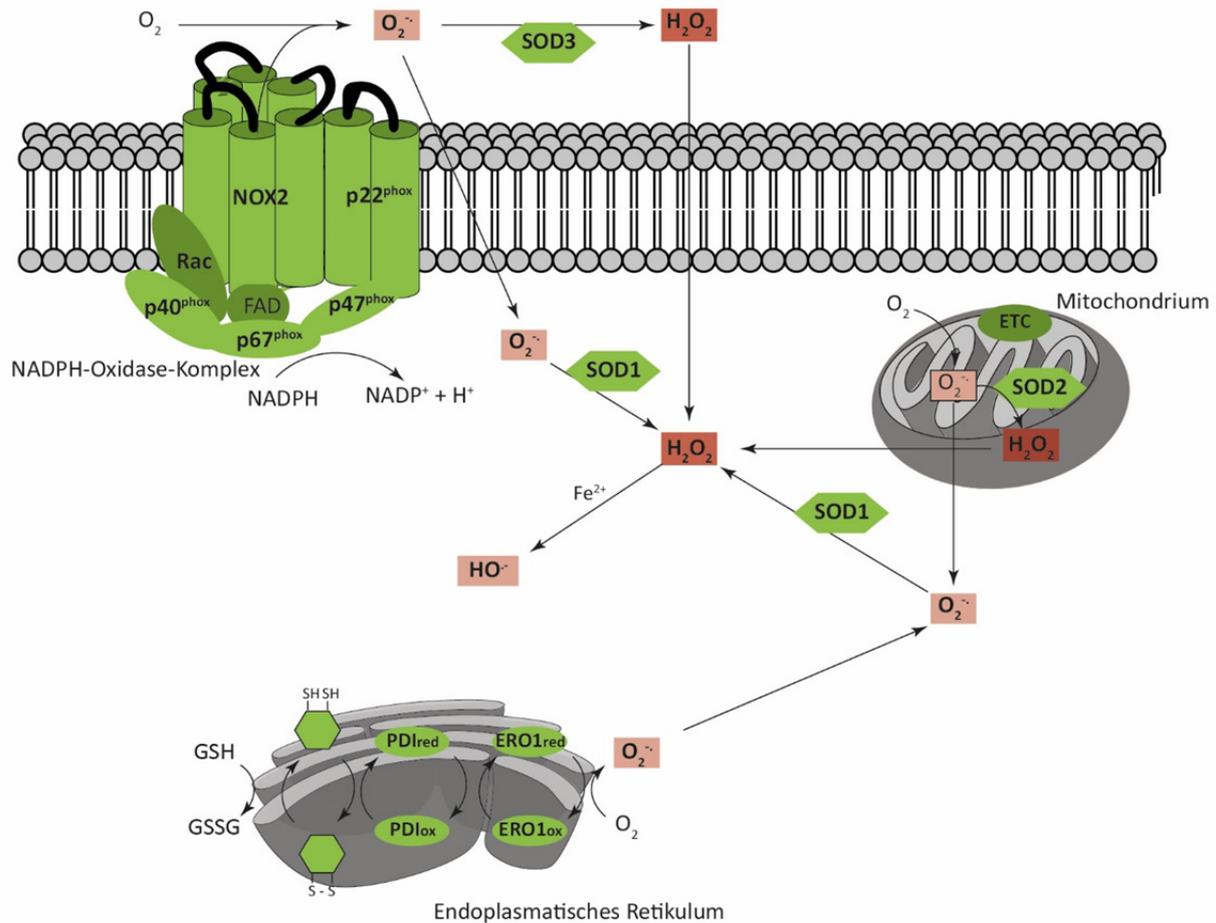


Abbildung 1.3 Quellen reaktiver Sauerstoffspezies.

Primäre Quellen von radikalischen und nicht-radikalischen reaktiven Sauerstoffspezies sind die Elektronentransportkette der Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum und die NADPH-Oxidase-Komplexe. Innerhalb der Zelle können die biologisch relevanten ROS ineinander überführt werden. Die Aktivität der Superoxidation (O₂^{•-}) abbauenden Superoxid-Dismutasen (SOD) führt zu der Freisetzung von H₂O₂, welches wiederum Fe²⁺-katalysiert zu dem Hydroxylradikal (OH[•]) umgesetzt werden kann. GSH/GSSG: Glutathion in reduzierter und oxidierte Form, ERO1: Oxidoreduktin-1, PDI: Protein-Disulfid-Isomerase, NADP⁺/NADPH: Nicotinamidadenindinukleotidphosphat/reduzierte Form. Modifiziert nach (Ye et al., 2015).

1.2.1 Mitochondriale Entstehung

Zur Gewinnung von Adenosintriphosphat (ATP) schleust die mitochondriale Elektronentransportkette (ETC) Elektronen von reduzierten metabolischen Komponenten wie Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und FADH₂ über die vier Proteinkomplexe hin zu molekularem Sauerstoff, welcher dabei zu Wasser reduziert wird. Der dabei entstehende Protonengradient über der mitochondrialen Membran dient der ATP-Gewinnung über den ATP-Synthase-Komplex-V. Während dieses Prozesses kommt es zu einem Einstrom von Elektronen in die mitochondriale Matrix (Komplex I und III) und den Intermembranraum (Komplex III). Etwa 0,15-2% des aufgenommenen molekularen Sauerstoffs werden durch die Elektronentransportkette zu Superoxidationen reduziert (Chance, Sies, & Boveris, 1979; St-Pierre, Buckingham, Roebuck, & Brand, 2002).

Geht man von einer 70 kg schweren Person aus, liegt der Sauerstoffkonsum pro Tag, alleine für die Umsetzung der benötigten Kalorien aus der Nahrung, bei etwa 21,6 Mol (B. A. Wagner, Venkataraman, & Buettner, 2011). Hieraus ergibt sich ein nicht zu vernachlässigender Anteil an entstehendem Superoxidanionen und H_2O_2 alleine aus der ETC. Verschiedene Krankheitsbilder werden mit mitochondrialen Dysfunktionen und dadurch erhöhter ROS-Produktion in Verbindung gebracht, wie neurodegenerative Erkrankungen, Krebs und Diabetes (de Moura, dos Santos, & Van Houten, 2010; Kirkinezos & Moraes, 2001; Victor, Rocha, Banuls, Bellod, & Hernandez-Mijares, 2011). Der Organismus hat verschiedene Möglichkeiten, die mitochondriale Superoxidanionen-Produktion zu kontrollieren, z.B. über das Zusammenspiel des Adaptorproteins p66(Shc) mit der Mangan-Superoxid-Dismutase (Mn-SOD bzw. SOD2) oder durch Inhibierung der Pyruvat-Kinase M2, was zu einer vermehrten Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten aus dem Pentosephosphatweg führt (Anastasiou et al., 2011; Bernardi, Petronilli, Di Lisa, & Forte, 2001; Giorgio et al., 2005; Orsini et al., 2004).

1.2.2 Enzymatische Entstehung

Bei oxidativem Stress kann es in dem ER vermehrt zu der Produktion von ROS kommen (Abbildung 1.3). Das ER dient als Protein-Faltungs-Maschinerie, bei der eine Vielzahl von Chaperonen und Sensoren fehlgefaltete oder ungefaltete Proteine detektieren. Zu diesen gehören die Enzyme Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) und das ER Oxidoreduktin-1 (ERO1), welche die oxidative Faltung im ER kontrollieren (Tu, Ho-Schleyer, Travers, & Weissman, 2000). PDI spaltet und verknüpft Disulfidbrücken von Proteinen und ist damit direkt an der korrekten Faltung der Proteine beteiligt (Townsend et al., 2009). Regeneriert bzw. reoxidiert wird PDI durch ERO1, ein Prozess, bei dem unter O_2 -Verbrauch H_2O_2 freigesetzt wird (Malhotra & Kaufman, 2007; Townsend et al., 2009; Tu et al., 2000). Ebenfalls kommt es bei dem Hormon-Metabolismus des ERs zu einem Elektronenausstrom der NADPH-Cytochrom-P450-Reduktasen, was zu einem Anstieg von Superoxidanion führt (Cross & Jones, 1991).

In vielen enzymatischen Reaktionen, die z.B. durch die Xanthin- und Aldehyd-Oxidasen oder die Häm-Peroxidasen katalysiert werden, entsteht das Superoxidanion, welches zu H_2O_2 dismutiert, als Nebenprodukt (de Groot & Littauer, 1989; G., 2009). Die Autooxidation von reduziertem Flavin-Mononukleotid (FMNH_2), reduziertem Flavin-Adenindinukleotid (FADH_2) und Aldehyden kann ebenfalls zu einem Anstieg von Superoxidanionen führen (J, 1999; Tyler, 1975). Der Abbau von Superoxidanionen durch die SOD führt, wie zuvor beschrieben, zu der Entstehung von H_2O_2 . Es existieren drei Isoformen des Metall-enthaltenden Enzyms: SOD1 (Kupfer-Zink) an der Plasmamembran, dem Zytoplasma und dem Nukleus, SOD2 (Mangan) welches hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert ist und die in der extrazellulären Matrix lokalisierte SOD3 (Kupfer-Zink)

(Limon-Pacheco & Gonsebatt, 2009; Nightingale et al., 2012; Trachootham et al., 2008). Die Expression und Aktivität von SOD3 wird direkt mit der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Verbindung gebracht (Kemp, Gray, Mallam, Scolding, & Wilkins, 2010; Nightingale et al., 2012). Eine Vielzahl von Enzymen bildet H_2O_2 ohne Superoxidanion als Intermediat, z.B. Xanthin-, Glukose-, Lysyl-, Monoamin- und D-Aminosäure-Oxidasen. Auch wird dieses in dem peroxisomalen Signalweg während der beta-Oxidation von Fettsäuren freigesetzt (Finkel, 1998; Kamata & Hirata, 1999; Niimura, Poole, & Massey, 1995). Eine weitere RS-Quelle sind aktivierte Phagozyten des Immunsystems, die an der Entstehung von Hypochlorsäuren beteiligt sind (Hackam et al., 1997; Klebanoff, 2005; Lukacs, Rotstein, & Grinstein, 1990; Pitt, Mayorga, Stahl, & Schwartz, 1992; Winterbourn, Hampton, Livesey, & Kettle, 2006; Winterbourn & Kettle, 2013).

Eine wichtige Quelle von zellulärem ROS sind die NOX-Komplexe (Abbildung 1.3). Die Stimulation verschiedener Zelloberflächenrezeptoren führt zu einer Aktivierung der NOX-Komplexe, woraufhin diese erhöhte Mengen von Superoxidanionen generieren, welches spontan oder enzymkatalysiert zu H_2O_2 dismutiert (Bedard & Krause, 2007). NOX-abgeleitetes H_2O_2 fungiert als Signalmolekül in einer Vielzahl von Signalwegen, beispielsweise bei der all-*trans*-Retinsäure (Retinsäure)-induzierten neuronalen Differenzierung, der *platelet-derived growth factor* (PDGF)-induzierten Signaltransduktion in vaskulären glatten Muskelzellen, der mechano-chemo-Transduktion im Herzen und den *epidermal growth factor* (EGF)-induzierten Signalwegen (Bae et al., 1997; Dickson, Gatie, Spice, & Kelly, 2017; Nitti et al., 2010; Prosser, Ward, & Lederer, 2011; Sundaresan, Yu, Ferrans, Irani, & Finkel, 1995; Wen, Hwang, & Kelly, 2012; Zhu et al., 2016). Abhängig von dem Zell- und Gewebetyp werden sieben verschiedene Mitglieder beschrieben: NOX1-5 sowie die zwei Dualen-NADPH-Oxidasen DUOX1 und DUOX2. Alle Enzyme der NOX-Familie sind Transmembranproteine, die Elektronen durch die Membran transportieren, um Superoxidanion zu produzieren. Ihnen liegen bestimmte konservierte Struktureigenschaften vor. Sie besitzen eine C-Terminale NADPH- und eine FAD-Bindestelle, sechs konservierte Transmembrandomänen und vier hoch konservierte Häm-bindende Histidine in der zweiten und fünften Transmembrandomäne. Hinzu kommen Isoform-spezifische Regulationsmechanismen, wie die Calciumbindung oder die Bindung von Co-Aktivator-Proteinen (Bedard & Krause, 2007). Aktiviertes NOX transportiert Elektronen von zytoplasmatischen NADPH über FAD sowie Häm-Cofaktoren über die Plasmamembran und die intrazellulären Membranen auf molekularen Sauerstoff, wodurch Superoxidanionen produziert werden. Das Superoxidanion dismutiert spontan oder enzymkatalysiert zu H_2O_2 und O_2 . DUOX1 und DUOX2 werden extrazelluläre Peroxidasedomänen zugesprochen, die eine direkte Zwei-Elektronen-Reduktion von O_2 zu H_2O_2 katalysieren (Ameziane-El-Hassani et al., 2005). H_2O_2 gelangt nun durch Diffusion oder Aquaporin-Kanäle in die Zelle und kann dort als Signalmolekül fungieren. Proportional zu der ROS-

Produktion steigt die intrazelluläre Protonenkonzentration an und führt zu einer lokalen Ansäuerung. Hierdurch kommt es zu einer positiven Nettoladung auf der ROS-produzierenden Seite, was wiederum den Elektronenfluss anregt. Eine Studie in Phagosomen zeigte, dass ein nicht-selektiver Kationenkanal (*transient receptor potential cation channel subfamily M member-2/TRPM2*) durch NOX-stammende ROS aktiviert wird und die Plasmamembran wieder depolarisiert (Di et al., 2012). Durch diesen Mechanismus kann die Intensität und Dauer der NOX-induzierten ROS-Produktion reguliert werden (Di et al., 2012).

Eine bisher nicht geklärte Frage ist, wie ein ortsspezifischer Effekt von H_2O_2 ausgelöst werden kann. Eine Hypothese schlägt vor, dass Aquaporine zu NOX-reichen, sogenannten *lipid rafts* (Cholesterinreiche Bereiche in Zellmembranen), dirigiert werden (Ishikawa, Cho, Yuan, Inoue, & Nakae, 2006). Abhängig von Stimulus und Zelltyp wurde bereits mehrfach gezeigt, dass es zu einer zeitlichen und räumlichen Ansammlung von NOX-Proteinen in *lipid rafts* oder fokalen Adhäsionen sowie subzellulären Kompartimenten, wie dem ER und Nukleus, kommt (Basuroy, Bhattacharya, Leffler, & Parfenova, 2009; Chen, Craige, & Keaney, 2009; Meischl et al., 2006; Serrander et al., 2007; Weyemi et al., 2012; Wu et al., 2005).

1.2.3 Kontrolle des zellulären Redoxstatus

Wie ist es möglich, dass in der Zelle sowohl eine ausgeglichene Redox-Homöostase als auch eine spezifische Redox-Signalweiterleitung existieren? Um ROS als Signalmolekül zu nutzen, ist die Kontrolle der ROS-Menge entscheidend (Wilson, Munoz-Palma, & Gonzalez-Billault, 2018). Eine adäquate Balance zwischen der Bildung und der Eliminierung von ROS wird durch verschiedene pro- und antioxidative Signalwege gewährleistet (Y. Zhang et al., 2011). Dabei spielen verschiedene enzymatische und nicht-enzymatische Komponenten eine Rolle, deren funktionelle Redundanz verdeutlicht, wie essentiell dieses Zusammenspiel ist (Ye et al., 2015).

Der Redoxzustand einer Zelle basiert im Wesentlichen auf den relativen Mengen der reduzierten und oxidierten Formen von sogenannten Redoxpaaren. Neben den zuvor erwähnten Redoxpaaren aus oxidiertem und reduziertem Glutathion (GSSG/GSH), Thioredoxin ($\text{TXN}_{\text{ox}}/\text{TXN}_{\text{red}}$), $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ und dem Superoxidanion/Sauerstoff, gehören zu diesen unter anderem auch Cystin/Cystein, NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ und Ascorbat/Dehydroascorbat (Ostrakhovitch & Semenikhin, 2013). Akkumuliert die oxidierte Spezies verschiebt sich der zelluläre Redoxzustand und es kommt vermehrt zu Oxidationsreaktionen (Droge, 2002; Ostrakhovitch & Semenikhin, 2013). Eine entscheidende Rolle bei der Instandhaltung der Redox-Balance spielen die sogenannten antioxidativ wirkenden Enzyme SOD, Katalase, Glutathion-Peroxidase und Peroxiredoxin. Dabei bildet die SOD formal die erste Abwehr gegen freie Superoxidanionen, da sie die Dismutation von O_2^- zu H_2O_2 katalysiert (Abbildung

1.4A). Das durch die SOD freigesetzte H_2O_2 wird von der hocheffizienten Katalase zu O_2 und H_2O abgebaut (Chelikani, Fita, & Loewen, 2004). Beide Enzyme liegen in Säugetieren stets gemeinsam vor und deren konzertierte Aktivität ist wichtig, um die Signaltransduktion durch Superoxidanionen und H_2O_2 zu gewährleisten (Bauer, 2014; Ye et al., 2015).

Zusätzlich zu der Aktivität der Katalase erfolgt die Reduktion von H_2O_2 sowie anderen organischen Peroxiden durch die Glutathion-Peroxidase und Peroxiredoxin (Gilbert, 1990; Holmgren, 1985; C. H. J. Williams, 1992). Die Glutathion-Peroxidasen nutzen dabei GSH zur Reduktion der Peroxide, wohingegen die meisten Peroxiredoxine das auf einem Protein basierende TXN verwenden (Chae et al., 1994). Die H_2O_2 -abbauende Glutathion-Peroxidase-1 (GPX1) ist die meist vorkommende Isoform und wird in dem Zytoplasma sowie den Mitochondrien nahezu jeden Gewebes gefunden (Lubos, Loscalzo, & Handy, 2011). Eine erhöhte Spezifität für Lipid-Hydroperoxyde weist GPX4 auf, welche ebenfalls in verschiedenen Zellen exprimiert wird (W. S. Yang et al., 2014). GPX2 und GPX3 hingegen sind extrazelluläre Enzyme des Darms bzw. Plasmas (Muller, Lustgarten, Jang, Richardson, & Van Remmen, 2007). Bislang wurden acht verschiedene Isoformen der humanen Glutathion-Peroxidase identifiziert, welche sich durch ihre zelluläre Lokalisierung und Substratspezifität unterscheiden. Die Familie der Peroxiredoxine kommt sowohl in Prokaryoten und Archaea als auch in Eukaryoten vor. In Säugetieren werden sechs Isoformen des Enzymes unterschieden, welche in drei verschiedene Klassen unterteilt werden: 1) Typische 2-Cystein-Peroxiredoxine (PRDX1-4) bilden als Homodimere während der Katalyse eine intermolekulare Disulfidbrücke. Sie werden in unterschiedlichen Kompartimenten wie dem Zytosol, an Membranen, dem Golgi-Apparat und den Mitochondrien nachgewiesen. 2) Atypische 2-Cystein-Peroxiredoxine (PRDX5) sind Monomere, welche eine intramolekulare Disulfidbrücke mit einer Sulfensäure als Intermediat bilden. PRDX5 gehört zu den häufigsten Säugetier-Peroxidasen und wird ubiquitär gefunden. 3) 1-Cystein-Peroxiredoxine (PRDX6) bilden ebenfalls Sulfensäure als Intermediat (Chae et al., 1994; Knoops, Goemaere, Van der Eecken, & Declercq, 2011; S. G. Rhee, Kang, Chang, Jeong, & Kim, 2001; Z. A. Wood, Schroder, Robin Harris, & Poole, 2003). Neben der Funktion als ROS-abbauende Enzyme spielen Peroxiredoxine eine Rolle in der Signaltransduktion, der Differenzierung und sie wirken als Chaperone (Barranco-Medina, Lazaro, & Dietz, 2009). Beide Systeme fungieren in einer dynamischen Kaskade, welche an den Redoxzustand der Nicotinamiddinukleotide gekoppelt ist (Abbildung 1.4B; Gilbert, 1990; C. H. J. Williams, 1992). Die Reduktion beider Substanzen (Regeneration) erfolgt anschließend unter NADPH-Verbrauch. Während die Thioredoxin-Reduktasen für die Regeneration von TXN_{ox} zuständig sind, wird GSSG durch die Glutathion-Reduktasen reduziert und regeneriert (L. B. Poole, 2005; L. B. Poole et al., 2000; C. H. Williams et al., 2000). Das Thiol-enthaltende GSH dient zudem als direktes Reduktions-

äquivalent, z.B. für Glutathion-Peroxidasen oder gemeinsam mit Glutaredoxinen (A. P. Fernandes & Holmgren, 2004; Gleason & Holmgren, 1988; Holmgren, 1988, 1989; L. B. Poole, 2015).

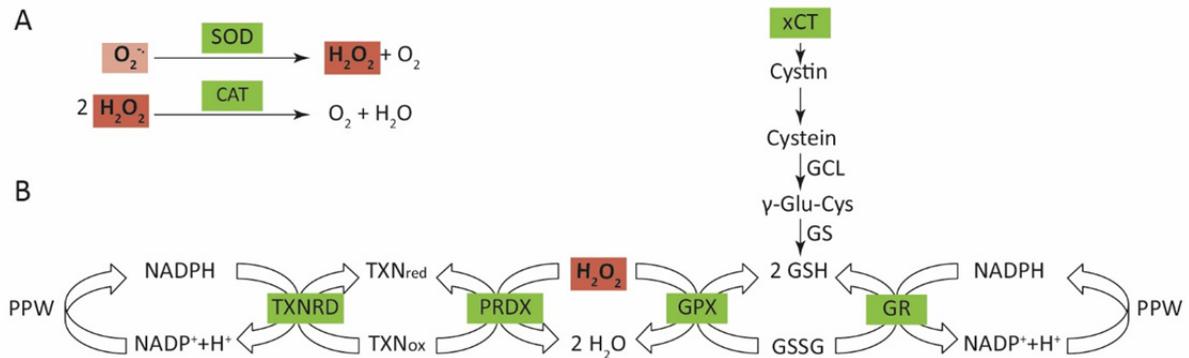


Abbildung 1.4 Kontrolle der intrazellulären Superoxidation- und H₂O₂-Mengen.

(A) Die erste Abwehr gegen Superoxidationen ($O_2^{\cdot-}$) bilden die Superoxid-Dismutasen (SOD1-3), da sie die Dismutation von $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 katalysieren. Entstehendes H_2O_2 kann von der Katalase (CAT) zu O_2 und H_2O abgebaut werden. (B) Eine weitere Möglichkeit, die H_2O_2 -Mengen zu kontrollieren bildet das Glutathion (GSH)- und Thioredoxin (TXN)-System. Das NADPH/NADP⁺+H⁺-Redoxpaar aus dem Pentosephosphatweg (PPW) dient als Hauptelektronenquelle beider Systeme, deren Reaktionen durch Glutathion-Peroxidasen (GPX) bzw. Peroxiredoxine (PRDX) katalysiert werden. Glutathion-Reduktasen (GR) und Thioredoxin-Reduktasen (TXNRD) dienen der Regeneration von oxidiertem Glutathion (GSSG) und oxidiertem Thioredoxin (TXNox). Bereitstellung von GSH: Die Aktivierung des Cystin/Glutamat-Antiporters (xCT) führt zu einem Import von Cystin, welches intrazellulär zu Cystein reduziert wird. In einer Zweischritt-Reaktion wird Cystein durch das Enzym Glutamat-Cystein-Ligase (GCL) zu γ -Glutamylcystein (γ -Glu-Cys) und darauffolgend durch die Glutathion-Synthetase (GS) zu GSH umgesetzt. NADP⁺/NADPH: Nicotinamadenindinukleotidphosphat/reduzierte Form. Die vereinfachte Darstellung wurde modifiziert nach Ostrakhovitch und Semenikhin 2013.

In diesem Zusammenhang stellt sich schließlich die Frage nach dem physiologischen Bereich von ROS. Für H_2O_2 wurden kürzlich Konzentrationen zwischen 1nM und 10nM vorgeschlagen (Sies, 2017). Um die Effekte der ROS an den Grenzen dieses Konzentrationsbereichs zu beschreiben, wurde in diesem Zusammenhang das Konzept des oxidativen Eustresses aufgestellt. Letztlich sollte beachtet werden, dass der physiologische Bereich der ROS-Konzentration von Zelltyp zu Zelltyp variiert und abhängig von dem jeweiligen Entwicklungsstand der Zelle ist (Wilson et al., 2018). Unter der Berücksichtigung der verschiedenen Eigenschaften von Superoxidationen, H_2O_2 und Hydroxylradikale wird sich der physiologische Bereich zudem für die jeweilige Spezies unterscheiden (Wilson et al., 2018).

1.3 Redox-getriebene Prozesse während der neuronalen Differenzierung

Dynamische Veränderungen des Redoxzustandes während der Neurogenese bilden eine Möglichkeit, die Prozesse zwischen Differenzierung und Proliferation streng zu kontrollieren (Vieira, Alves, & Vercelli, 2011). Die Studien von Otto Warburg über die Oxidationen am Seeigel-Ei während der Befruchtung gehörten zu den ersten, die die Relevanz des Redoxzustandes für die Entwicklungs- und

Differenzierungsprozesse aufzeigten (Warburg, 1910). Neunzehnhundertsiebenundachtzig veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Eugene Roberts eine Arbeit, in der sie zeigten, dass die Präsenz von 88 mM H_2O_2 und die Verwendung von Puffersystemen in der Kultivierung von embryonalen Mäusezellen zu einer Erhöhung der neuronalen Viabilität und der Differenzierung führten (Bologa, Sharma, Dahl, & Roberts, 1987). Der Einfluss von RS auf die neuronale Differenzierung, insbesondere mit Hinblick auf NOX-abgeleitetes H_2O_2 als Signalmolekül, wurde in den nachfolgenden Jahren vermehrt Gegenstand der Forschung (Kennedy, Sandiford, Skerjanc, & Li, 2012; Wilson et al., 2018). Dabei wiesen verschiedene Studien einen Einfluss auf die neuronale Polarität, das Neuritenwachstum und die axonale Spezifizierung nach (Frese et al., 2015; Wilson et al., 2016). Beispielsweise zeigten Mausmodelle mit einer verringerten Produktion von RS, hervorgerufen durch eine blockierte NOX-Aktivität (gp91^{phox} und gp47^{phox}), makroskopisch ein normal entwickeltes Gehirn. Die kognitiven Leistungen der Mäuse und die neuronale Plastizität, also die Fähigkeit der Neuronen sich in ihrer Funktion und Anatomie zu adaptieren, was die Umstrukturierung des Zytoskeletts beinhaltet, waren dahingegen vermindert (Dickinson, Peltier, Stone, Schaffer, & Chang, 2011; Kishida et al., 2006). Gleichermaßen führte eine fehlende NOX-Aktivität *in vivo* und *in vitro* zu einer verringerten Proliferationsrate und verringerten Anzahl von neuronalen Stammzellen (Dickinson et al., 2011). In kultivierten Neuronen des Hippocampus führte eine Inhibierung von NOX2 zu einer beeinträchtigten Polarisation, wohingegen eine zunehmende NOX2-Aktivität, durch eine Überexpression von p47^{phox}, das axonale Wachstum förderte (Wilson et al., 2016). Auch in anderen Modellsystemen und Organismen wurde ein NOX-abhängiger Einfluss auf das Neuritenwachstum gefunden, z.B. bei der Retinsäure-induzierten neuronalen Differenzierung von kultivierten Neuroblastomzellen, Primärkulturen von Körnerzellen (*cerebellar granule cells*), sensitiven Neuronen des Zebrafischs und Aplysiazellen (Dickson et al., 2017; Munnamalai & Suter, 2009; Munnamalai et al., 2014; Nitti et al., 2010; Olguin-Albuerne & Moran, 2015; Rieger & Sagasti, 2011; Wen et al., 2012). Studien an neuronalen Vorläuferzellen zeigten, dass auch durch die Aktivität des Tumorsuppressor-Proteins p53 die ROS-Mengen verändert werden und die Entwicklung zu reifen Neuronen beeinflusst wird (Forsberg & Di Giovanni, 2014; Forsberg et al., 2013; Quadrato & Di Giovanni, 2013).

Verschiedene Arbeiten befassten sich mit den Komponenten der TXN- und GSH-Systeme und stellten eine wichtige Verbindung zwischen enzymatisch-katalysierten Redoxreaktionen und den Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen her (C. Berndt & Lillig, 2015). Bei Mäusen resultiert das Fehlen der Thioredoxin-Proteine TXN1 und TXN2, der entsprechenden Thioredoxin-Reduktasen (TXNRD1 und TXNRD2), aber auch des Nukleoredoxins in einer erhöhten Sterblichkeit der Embryonen oder einer kurzen Lebensdauer der neugeborenen Tiere (Conrad et al., 2004; Jakupoglu et al., 2005; Matsui et al., 1996; Nonn, Williams, Erickson, & Powis, 2003). Eine verringerte Aktivität der Reduktase

glutaredoxin-2 (GLRX2) führt zu einer fehlgeleiteten Entwicklung des kardio-vaskulären Systems und des Gehirns in Zebrafisch-Embryonen (Bräutigam et al., 2013; Bräutigam et al., 2011). Zudem wurde ein modulierender Effekt von H₂O₂ auf die Proliferation und Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen NPC nachgewiesen, welcher in einen direkten Zusammenhang mit der Aktivität der redox-sensitiven Deacetylase *sirtuin-2* gebracht wurde (Perez Estrada, Covacu, Sankavaram, Svensson, & Brundin, 2014).

1.3.1 Bi-Funktionalität von reaktiven Sauerstoffspezies

Neben dem positiven Einfluss der ROS auf die neuronale Entwicklung wird stets die destruktive Auswirkung von entarteten Mengen betont. Beispielsweise kann Hypoxie, eine Mangelversorgung mit Sauerstoff, die embryonale und adulte Neurogenese fördern (T. G. Fernandes, Diogo, Fernandes-Platzgummer, da Silva, & Cabral, 2010; Vieira et al., 2011). Wohingegen Embryonen, welche an dem embryonalen Tag 10.5 (E10.5) mit einer erhöhten Sauerstoffkonzentration konfrontiert wurden, Fehlbildungen des Neuralrohrs und Gehirns zeigten (Ornoy, Rand, & Bischoff, 2010). Die Bi-Funktionalität von H₂O₂ während der neuronalen Entwicklung wurde 2018 von C. Wilson graphisch aufgearbeitet (Wilson et al., 2018). Abbildung 1.5 zeigt den postulierten physiologischen Bereich von H₂O₂ und die Auswirkungen auf die neuronale Entwicklung (Sies, 2017; Wilson et al., 2018). Eine H₂O₂-Konzentration über dem physiologischen Bereich der Zelle (>100nM) führte in Zellen des Hippocampus und Spinalganglions dazu, dass der axonale Wachstumskegel kollabierte und das Axon degenerierte (Morinaka et al., 2011; Quinta et al., 2016; Wilson & Gonzalez-Billault, 2015). Erhöhte ROS-Mengen innerhalb des physiologischen Bereichs (oxidativer Eustress) förderten sowohl das axonale als auch das dendritische Wachstum in Primärkulturen von Neuronen des Hippocampus und Cortex (Wilson et al., 2016). Moderate bis geringe Mengen von H₂O₂ werden zumeist mit einer normalen neuronalen Entwicklung und axonalen Regeneration in Verbindung gebracht (Munnamalai & Suter, 2009; Munnamalai et al., 2014; Olguin-Albuerne & Moran, 2015; Rieger & Sagasti, 2011; Wilson, Nunez, & Gonzalez-Billault, 2015). Bei Konzentrationen unterhalb des physiologischen Bereichs, beispielsweise durch einen Verlust der NOX2-Aktivität, können die neuronale Polarisation und das axonale Wachstum negativ beeinträchtigt werden (Wilson et al., 2015). Wichtig und kritisch sind in diesem Zusammenhang die Quelle, zeitliche Abstimmung und Lokalisierung entstehender ROS. Aspekte, die durch Verwendung spezifischer Methoden adressiert werden müssen (Wilson et al., 2018). Letztlich weisen die Ergebnisse darauf hin, dass ein ausbalancierter Redoxzustand maßgeblich für einen korrekten Ablauf der neuronalen Entwicklung und der Funktionalität der Neuronen ist. Bereits kleine Veränderungen können die Entwicklung auf verschiedenen Ebenen entscheidend beeinflussen.

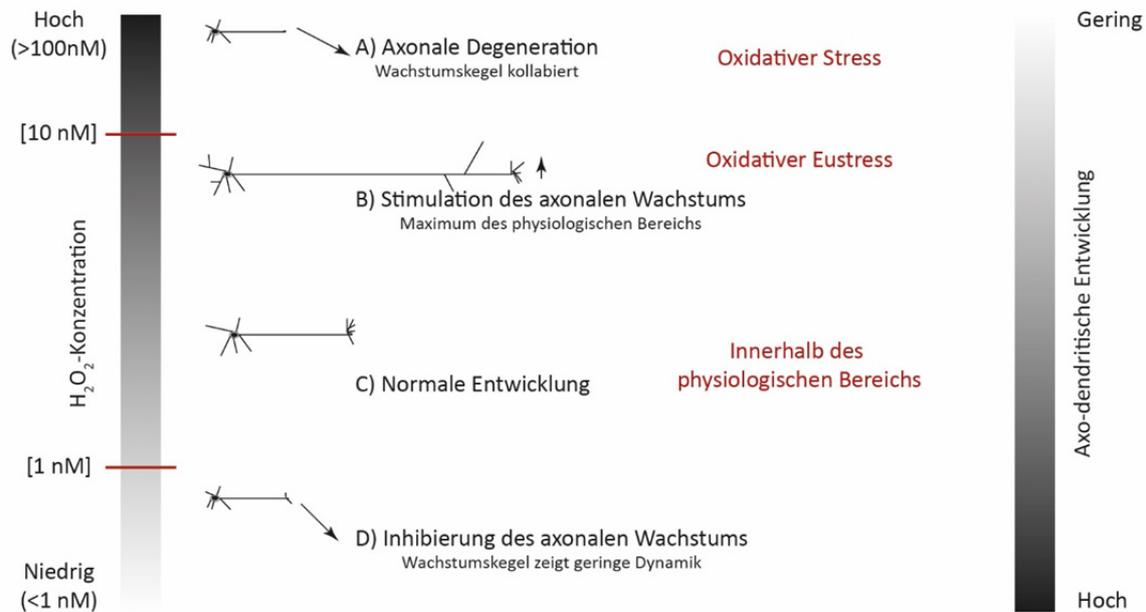


Abbildung 1.5 Einfluss des Redoxzustandes auf die neuronale Entwicklung.

Positive und negative Auswirkungen von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Abhängigkeit von dessen Konzentration. (A) Zu hohe und deregulierte Mengen führen zu einer oxidativen Stresssituation, was dazu führt, dass der Wachstumskegel der Neuronen kollabiert und das Axon degeneriert (Morinaka et al., 2011; Quinta et al., 2016; Wilson & Gonzalez-Billault, 2015). (B-C) Innerhalb des physiologischen Bereichs (1-10 nM) fördern erhöhte Mengen die neuronale Entwicklung sowie das axonale und dendritische Wachstum (Wilson et al., 2016). Moderate und geringe Mengen sind wichtig für eine normale neuronale Entwicklung und axonale Regeneration (Munnamalai & Suter, 2009; Munnamalai et al., 2014; Olguin-Albuerno & Moran, 2015; Rieger & Sagasti, 2011; Wilson et al., 2015). (D) Zu niedrige Mengen können die Polarisation der Neuronen des Hippocampus und das axonale Wachstum beeinflussen, wodurch die neuronale Entwicklung inhibiert wird (Wilson et al., 2015). Modifiziert nach Wilson et al., 2018.

1.4 Humane Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y als Modellsystem

Die humane Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y ist ein gängiges Modellsystem, um die ersten Phasen der neuronalen Differenzierung zu untersuchen (de Bittencourt Pasquali et al., 2016). Die Zelllinie resultiert aus der SK-N-SH-Linie, die aus der Knochenmarkbiopsie eines metastasenbildenden Neuroblastoms einer vierjährigen Patientin stammt und 1970 kultiviert wurde (Biedler, Roffler-Tarlov, Schachner, & Freedman, 1978). Die Zugabe des Vitamin-A-Metaboliten Retinsäure führt innerhalb von vier bis acht Tagen zu der funktionellen und morphologischen Ausbildung eines neuronalen Phänotyps (da Frota Junior et al., 2011; Encinas et al., 2000).

1.4.1 Modellsystem zur Studie redox-sensitiver Prozesse

Die durch Retinsäure induzierte neuronale Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen wird zunehmend mit redox-sensitiven Prozessen in Verbindung gebracht. Dieser Zusammenhang wurde insbesondere in differenzierten SH-SY5Y-Zellen, also nach vier- bis achttägiger Retinsäurebehandlung, untersucht. Dabei wurden veränderte Expressionsmengen von NOX-Untereinheiten nachgewiesen, einer der Hauptquellen von zellulärem ROS (1.2.2): Verglichen mit den undifferenzierten Zellen zeigten die

differenzierten Zellen einen kontinuierlichen Anstieg der p67^{phox}-Expression über zwei, vier und sieben Tage hinweg (Nitti et al., 2010) sowie eine erhöhte Expression der NOX-Untereinheit p47^{phox} nach acht Tagen (Nitti et al., 2007). Verschiedene Studien adressierten den direkten Nachweis von zytoplasmatischen ROS, der infolge der neuronalen Differenzierung freigesetzt wird. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es nach vier Tagen zu erhöhten und nach sieben Tagen zu verringerten Mengen von Superoxidanionen und H₂O₂ kommt (Lopes et al., 2017; Silvis, McCormick, Spitz, & Kinningham, 2016). Einen weiteren Hinweis auf den Zusammenhang zwischen Veränderungen des zellulären Redoxzustandes und der Retinsäure-induzierten neuronalen Differenzierung geben die veränderten Mengen und Aktivitäten von antioxidativ wirkenden Enzymen (de Bittencourt Pasquali et al., 2016; Lopes et al., 2017; Schneider et al., 2011; Silvis et al., 2016). Es wurde gezeigt, dass es nach vier- sowie fünftägiger neuronaler Differenzierung zu einer signifikant erhöhten Aktivität der SOD2 und nach siebentägiger neuronaler Differenzierung zu einer erhöhten Aktivität der Katalase, Glutathion-Reduktase und Glutathion-S-Transferase (GST) kommt (Lopes et al., 2017; Schneider et al., 2011; Silvis et al., 2016). Dahingegen weisen undifferenzierte Zellen eine vergleichsweise höhere Aktivität der Thioredoxin-Reduktase auf (Lopes et al., 2017). SH-SY5Y-Zellen, untersucht an Tag fünf und sieben nach Beginn der Retinsäure-induzierten neuronalen Differenzierung, weisen zudem eine veränderte Sensibilität gegenüber oxidativem Stress, ausgelöst durch H₂O₂ oder 6-OHDA, auf (Forster et al., 2016; Lopes et al., 2017; Schneider et al., 2011). Dies wird mit den veränderten Mengen und Aktivitäten der antioxidativ wirkenden Proteine in Verbindung gebracht (Schneider et al., 2011). Eine direkte Verknüpfung entstehender ROS mit den morphologischen Veränderungen der Zelle erfolgte 2010 von Nitti et al. Diese zeigten, dass durch Zugabe des NOX-Inhibitors DPI die Neuritenextension in differenzierten SH-SY5Y-Zellen (sieben Tage) unterbunden wird (Nitti et al., 2010). Sechs Jahre später wiesen Silvis et al. auf einen Zusammenhang zwischen der Expression des neuronalen Markerproteins Neurofilament-Medium-Polypeptid (NF-M) und der Entstehung von ROS in vier Tage differenzierten SH-SY5Y-Zellen hin (Silvis et al., 2016).

Auch in anderen Modellsystemen wird die Retinsäure-induzierte neuronale Differenzierung mit der Entstehung von ROS in Verbindung gebracht. F9-Zellen zeigten beispielsweise an dem vierten Tag der neuronalen Differenzierung eine erhöhte Gen- und Proteinexpression von NOX1 und NOX4 (Dickson et al., 2017). Erhöhte Mengen der akzessorischen Untereinheiten wurden in diesem Zusammenhang nicht gefunden. Ebenfalls wird in F9-Zellen auf dynamische Veränderungen der zytoplasmatischen ROS hingewiesen (Dickson et al., 2017; Wen et al., 2012).

1.4.2 Modellsystem zur Studie neuronaler Differenzierung

In vitro können durch Retinsäurebehandlung verschiedene post-mitotische Stammzellen zu einem neuronalen Phänotypen induziert werden, was auf die Rolle von Retinsäure bei dem Wechsel zwischen Proliferation und Differenzierung hindeutet (Jones-Villeneuve, McBurney, Rogers, & Kalnins, 1982). In Retinsäure-Zielgeweben vermitteln die hormonabhängigen Retinsäure-Kernrezeptoren (RARs) und die Retinoid-X-Rezeptoren (RXRs) die Retinsäure-abhängige transkriptionelle Aktivität (Bastien & Rochette-Egly, 2004; Samarut & Rochette-Egly, 2012). RAR/RXR-Heterodimere binden an spezifische DNA-Bereiche, die sogenannten *retinoic acid response elements* (RAREs) (Balmer & Blomhoff, 2002; Bastien & Rochette-Egly, 2004). Es wird angenommen, dass durch die Bindung von Retinsäure an RAR der RAR/RXR-Heterodimer die Repressionsmaschinerie abstößt und stattdessen die Aktivierungsmechanismen ansteuert (Bastien & Rochette-Egly, 2004; Samarut & Rochette-Egly, 2012). Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass die transkriptionelle Aktivität, die durch die Kernrezeptoren vermittelt wird, abhängig von dem Redoxzustand der Zelle ist (Casadevall & Sarkar, 1998; Demary, Wong, Liou, Faller, & Spanjaard, 2001; U. H. Park et al., 2009). Veränderungen des zellulären Redoxzustandes, durch Zugabe von GSH oder DTT, führen zu einer veränderten DNA-Bindung und RAR-Aktivität (Demary et al., 2001). Ziele für oxidative Modifizierungen durch ROS, wie H₂O₂, sind dabei vermutlich die zwei Zink-Finger-Motive der RARs (Casadevall & Sarkar, 1998). Retinsäure ist zudem ein Ligand für weitere Retinoid-Rezeptoren, die teils in Differenzierungsprozesse involviert sind, z.B. für den PPAR β/δ -Waise-Rezeptor (Berry & Noy, 2007; Di-Poi, Tan, Michalik, Wahli, & Desvergne, 2002; Shaw, Elholm, & Noy, 2003; Tan, Michalik, Desvergne, & Wahli, 2004). Neben der sogenannten klassischen bzw. genomischen Retinsäure-Signaltransduktion werden sogenannte nicht-genomische Wirkungsweisen beschrieben, die über eine Reihe von Kinasekaskaden initiiert werden (Pasquali et al., 2008; Zanutto-Filho et al., 2008). In SH-SY5Y-Zellen führt die Retinsäurebehandlung, z.B. zu einer Aktivierung der *phosphatidylinositol-3-kinase* und *mitogen-activated protein kinase* (PI3K-ERK1/2)-Signalwege, welche entscheidend für die Aktivierung der neuronalen Differenzierungsprozesse sind (Masia, Alvarez, de Lera, & Barettoni, 2007). Eine Subpopulation der RAR α -Rezeptoren befindet sich an der Plasmamembran und initiiert die Signalkaskade bereits wenige Minuten nach der Retinsäure-Bindung (Masia et al., 2007).

1.4.3 Kultivierung und neuronale Differenzierung durch Retinsäure

Es existieren verschiedene Methoden, um SH-SY5Y-Zellen zu einem vornehmlich neuronalen Phänotyp auszudifferenzieren. Typischerweise wird Retinsäure in einer Konzentration von 1-10 μ M zu dem Kulturmedium gegeben, welches entweder serumfrei ist oder nur geringe Serumengen (0-15% FBS) aufweist (Lotan, 1996; Melino, Thiele, Knight, & Piacentini, 1997). In der Literatur findet man weitere Divergenzen, die das zugegebene Neurotrophin (Retinsäure, *brain-derived neurotrophic*

factor/BDNF, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate/TPA), die Verwendung von Oberflächenbeschichtungen (z.B. Laminin, Fibronectin oder Kollagen) und die Differenzierungslänge (4-12 Tage) betreffen (Chiocchetti et al., 2016; Dwane, Durack, & Kiely, 2013; Encinas et al., 2000; Gilany et al., 2008; Korecka et al., 2013; Lopes et al., 2017; Nishida et al., 2008). Darüber hinaus bestehen seitens der Lieferanten der Zelllinie verschiedene Empfehlungen für das Kulturmedium (darunter DMEM/F12, MEM/F12, RPMI 1640; Xicoy et al., 2017). SH-SY5Y-Kulturen bestehen aus adhären und schwebenden Zellen. Einige Studien adressieren den Unterschied beider Zelltypen, doch wird in den meisten Fällen der schwebende Anteil der Zellen mit dem Kultivierungsmedium entfernt (Kovalevich & Langford, 2013). In der Literatur werden die verschiedenen Phänotypen klassischerweise als neuroblastischer- und epithelialer-Phänotyp (R. A. Ross, Spengler, & Biedler, 1983) oder neuroblastischer (N)- und substrat-adhärenter (S)-Typ beschrieben (Encinas et al., 2000).

Die durch Retinsäure angesteuerten neuronalen Differenzierungsprozesse in SH-SY5Y-Zellen beinhalten mehrere überprüfbare Ereignisse. Dazu zählt die Ausbildung und Extension der Neuriten, welche bereits nach 24 Std. neuronaler Differenzierung beobachtet werden kann (Encinas et al., 2000; Lopes et al., 2010). Die veränderte Expression von wesentlichen Komponenten des Retinsäure-Signalweges, z.B. die der *cellular retinoic acid binding proteins type-1* und 2 (CRABP1 und CRABP2), der Cytochrom-P26-Enzyme (CYP26) und der Kernrezeptoren *RAR* und *RXR*, weist auf eine Ansteuerung eben dieses Signalweges hin (Begemann, Schilling, Rauch, Geisler, & Ingham, 2001; D'Aniello & Waxman, 2015; Feng, Hernandez, Waxman, Yelon, & Moens, 2010; Kashyap et al., 2013). Die Proteine CRABP1 und CRABP2 ermöglichen die Verteilung von Retinsäure zu den RARs und der Retinsäure-Degradationsmaschinerie (Cai et al., 2012; Dolle, Ruberte, Leroy, Morriss-Kay, & Chambon, 1990; Durand, Saunders, Leroy, Leid, & Chambon, 1992; Romand et al., 2000; Ruberte, Dolle, Chambon, & Morriss-Kay, 1991). Eine Hydroxylierung durch die CYP26-Enzyme hingegen führt zu der Degradation von Retinsäure (S. Abu-Abed et al., 2001; S. S. Abu-Abed et al., 1998; Niederreither et al., 2002; Pennimpede et al., 2010; Y. Sakai et al., 2001). Ein weiterer Hinweis ist die Expression von bekannten neuronalen Markern, wie z.B. *microtubule-associated protein-2* (MAP2), *tubulin β -3 chain* (TUBB3), NF-M und *N-myc proto-oncogene protein* (MYCN) (Encinas et al., 2000; Jimmy Rodriguez Murillo, 2017; Korecka et al., 2013; Lopes et al., 2010; Silvis et al., 2016; Wartiovaara, Barnabe-Heider, Miller, & Kaplan, 2002). Auch eine erhöhte Expression des Rezeptors *proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor* (RET) gilt auf RNA-Ebene als ein Marker der Retinsäure-Antwort (Angrisano et al., 2011; Oppenheimer, Cheung, & Gerald, 2007; Patrone, Puliti, Bocciardi, Ravazzolo, & Romeo, 1997). Wie zuvor beschrieben existieren verschiedene Protokolle für die neuronale Differenzierung der SH-SY5Y-Zellen, woraus unterschiedliche Phänotypen resultieren. So wird z.B. durch die zusätzliche Verwendung von BDNF die Ausbildung eines reiferen neuronalen Phänotyps erreicht (Chiocchetti et

al., 2016; Goldie, Barnett, & Cairns, 2014). Dieser Phänotyp wird noch weiter gefördert, wenn anstelle einer sequentiellen Zugabe beider Reagenzien die Stimulation kontinuierlich erfolgt (Chiocchetti et al., 2016; Encinas et al., 2000). Die gängige neuronale Differenzierungsmethode, welche bis 2014 in 72% der publizierten Studien verwendet wurde, ist die exklusive Zugabe von Retinsäure (Goldie et al., 2014). Infolge der verschiedenen Protokolle für die neuronale Differenzierung bestehen jedoch unterschiedliche Forschungsergebnisse hinsichtlich der identifizierten neuronalen Marker. In globalen, differenziellen Studien wurden bislang insbesondere Veränderungen in der Gentranskription der Zellen beschrieben (Chiocchetti et al., 2016; Forster et al., 2016; Korecka et al., 2013; Krishna et al., 2014; Nishida et al., 2008; Teppola, Sarkanen, Jalonen, & Linne, 2016). Diese zeigten vornehmlich die Ausprägung eines dopaminergen Phänotyps, welcher neben erhöhten Dopaminmengen eine Veränderung in der Expression von dopaminergen Markern und eine Suppression anderer Neurotransmitter Phänotypen aufweist (Korecka et al., 2013). Aufgrund dieser dopaminergen Eigenschaften werden SH-SY5Y-Zellen häufig für die Studie der Parkinson-Krankheit verwendet (Xicoy et al., 2017). Bis zu diesem Zeitpunkt existierten wenige Proteomstudien, welche die differenzielle Analyse von retinsäurebehandelten zu unbehandelten Zellen adressierten. Zu diesen gehören vornehmlich Arbeiten die sich der 2D-DIGE-Methode bedienen (Cimmino et al., 2007; Gilany et al., 2008; Sitek et al., 2005). Im Verlauf dieser Arbeit wurden schließlich zwei umfassende Studien publiziert, welche die molekularen und zeitabhängigen Ereignisse in Retinsäure- und *nerve growth factor* (NGF)- bzw. BDNF-induzierten Differenzierungsprozessen beleuchteten (Emdal et al., 2015; Jimmy Rodriguez Murillo, 2017). Proteine, die in diesen Studien als Indiz für eine erfolgreiche Ansteuerung der Retinsäure-abhängigen neuronalen Differenzierungsprozesse herangezogen wurden, sind z.B. *elastin microfibril interface-located protein-1* (EMILIN-1), *neural cell adhesion molecule-2* (NCAM1) und das *neurosecretory protein* VGF (Emdal et al., 2015; Jimmy Rodriguez Murillo, 2017).

Neben dem bekannten Zusammenhang zwischen ROS und den Retinsäure-induzierten neuronalen Differenzierungsprozessen, bietet die Verwendung des humanen Zellmodells mit Hinblick auf die geplanten (Redox-) Proteomstudien weitere Vorteile. Zum einen erlaubt es die Zelllinie, große Mengen Zellmaterial relativ einfach und kostengünstig zu kultivieren, was gegenüber der Verwendung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) ein wesentlicher Vorteil ist. Im Gegensatz zu der Verwendung von primärem humanem neuronalem Material bestehen bei der Verwendung der Zelllinie zudem keine ethischen Bedenken. Ein weiterer Vorteil ist, dass durch die angesteuerte neuronale Differenzierung der Zellzyklus synchronisiert und eine relativ homogene Zellpopulation geschaffen wird (Hammerle et al., 2013; J. Qiao et al., 2012). In der Regel zeigen undifferenzierte SH-SY5Y-Zellen, wie andere Zellen auch, eine asynchrone Wachstumspopulation (Encinas et al., 2000; R. A. Ross et al., 1983).

1.5 Redox-spezifische Analysen

Die Identifizierung und Charakterisierung von oxidativen Cys-PTMs ist unabdingbar, um ihre Rolle innerhalb eines biologischen Systems verstehen zu können. In den vergangenen Jahren wurden eine Reihe selektiver Reagenzien entwickelt, die die Analyse modifizierter Cysteine erleichtern. Zusammen mit massenspektrometrischen Methoden können so globale, Cystein-spezifische und quantitative Analysen der Cys-PTMs innerhalb des Proteoms (Redox-Proteom) durchgeführt werden. Dies ermöglicht die globale Studie von Proteinoxidationen in Abhängigkeit von umgebungsbedingten Faktoren, z.B. unter Stress oder dem Einfluss genetischer Faktoren. Zudem können intrinsische Signalkaskaden infolge eines Stimulus untersucht und einzelne Proteine in einen direkten Zusammenhang mit bestimmten Redoxkaskaden gebracht werden.

Die Proteomanalyse hat den Anspruch, die Gesamtheit, der zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimierten Proteine darzustellen. Hochkomplexe Protein- oder Peptidlösungen werden in verschiedene Dimensionen aufgetrennt und anschließend aufgrund der Intensität der auftretenden Signale analysiert und gegebenenfalls über mehrere Proben hinweg quantifiziert. Zu den klassischen Methoden zählen die zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese und die massenspektrometriebasierte Analyse (Klose & Kobalz, 1995; Ong et al., 2002; Silva et al., 2005). Eine der meist genutzten Techniken ist die *liquid chromatography-tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS) (N. Q. Liu et al., 2013). Eine Vielzahl verschiedener LC-MS/MS-Methoden ermöglicht dem Analysten eine nahezu maßgeschneiderte Anwendung zu konfigurieren, um komplexe Proteingemische sowohl aus der Zellkultur als auch aus tierischen, pflanzlichen und humanen Geweben zu analysieren. Die Methoden können anhand der verwendeten Markierungsstrategien und Quantifizierungsmethoden unterteilt werden: Markierungsstrategien nutzen dabei chemische (z.B. *isotope coded affinity tag/ICAT*, *Tandem Mass Tag/TMT* und Dimethylmarkierungen), metabolische (z.B. *stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture/SILAC*), isobare (z.B. *isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation/iTRAQ*) oder enzymatische Markierungen (z.B. ^{18}O) für eine relative Quantifizierung (Boersema, Raijmakers, Lemeer, Mohammed, & Heck, 2009; Gygi, Rist, et al., 1999; H. C. Lin et al., 2013; Ong et al., 2002; Thompson et al., 2003; Yao, Freas, Ramirez, Demirev, & Fenselau, 2001). Darüber hinaus wird die markierungsfreie Methode (*label-free quantification/LFQ*) genutzt. Bei der LFQ-Methode erfolgt die Quantifizierung über die Signale der eluierten Peptide im MS-Spektrum (Ionenintensität) oder anhand der in einem Tandemmassenspektrometer identifizierten Anzahl der MS/MS-Spektren (*spectral counting*) (Bondarenko, Chelius, & Shaler, 2002; H. Liu, Sadygov, & Yates, 2004; Ono et al., 2006). Für eine absolute Quantifizierung (AQUA) werden Standards mit einer bekannten Konzentration eingesetzt, z.B. synthetische Peptide, die optional mit inkorporierten stabilen Isotopen oder posttranslationalen Modifizierungen versehen werden können (Kettenbach, Rush, & Gerber, 2011).

Eine der ersten Strategien für die proteomanalytische Studie reversibel oxidiertes Cysteine ist die Biotin-Switch-Methode (*biotin switch technique*/BST), welche 2001 veröffentlicht wurde (Jaffrey & Snyder, 2001). Wenige Jahre später modifizierten Jakob und Toledano die BST-Methode durch wertvolle Änderungen, wie etwa dem Konservieren des Thiolstatus in der Zellkultur durch Ansäuern mit Trichloressigsäure (Le Moan, Clement, Le Maout, Tacnet, & Toledano, 2006; Leichert & Jakob, 2004). Seitdem wurde eine Vielzahl von Techniken entwickelt. Ein Großteil basiert nach wie vor auf den drei Schritten der BST-Methode: (1) der Alkylierung freier Thiole, beispielsweise mit zellpermeablen Reagenzien wie N-Ethylmaleimid (NEM), (2) der selektiven Reduktion von Nitrosylierungen, Sulfonylierungen oder Glutathionylierungen oder der globalen Reduktion reversibel oxidiertes Thiole, (3) der Markierung der vormals oxidierten Thiole mit verschiedenen Thiol-reaktiven Reagenzien. In der Regel werden diese mit Reporter-Tags versehen, die einen Fluoreszenznachweis, eine Anreicherung und/oder Quantifizierung über gelbasierte-Methoden und/oder eine LC-MS/MS-Analyse erlauben. Die Vorgehensweise wird als indirekte Nachweismethode bezeichnet und nimmt einen großen Stellenwert bei der redox-spezifischen Proteinanalytik ein. Darüber hinaus existiert eine Reihe von direkten Strategien, um Cys-PTMs nachzuweisen. Der folgende Abschnitt soll die gängigsten Techniken zusammenfassen und einige der Vor- bzw. Nachteile erläutern. Sowohl bei der Analyse des gesamten Proteoms als auch bei der Betrachtung einzelner Proteine ist es vorteilhaft, wenn bestimmte Prinzipien der redox-sensitiven Probenaufarbeitung berücksichtigt werden. Diese werden daher zunächst thematisiert.

1.5.1 Kriterien für die redox-spezifische Probenaufarbeitung

1.5.1.1 Reaktivität von Thiolgruppen

Neben den freien Thiolen an den Cysteinen von Proteinen können Thiole auch durch Reduktion gewonnen werden, z.B. mit den Reagenzien 2-Mercaptoethanol (β -Mercaptoethanol) oder Dithiothreitol (DTT). β -Mercaptoethanol ist im Gegensatz zu DTT flüchtig. Die Konzentration in der Lösung verringert sich somit zeitlich und führt daher zu weniger kontrollierten oder auch unvollständigen Reaktionen. Diese mono- bzw. dithiolischen Reduktionsmittel müssen nach der Verwendung aus dem Reaktionsansatz entfernt werden, um eine Rückbildung der Disulfide zu vermeiden (Hansen & Winther, 2009). Bei der Verwendung von Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), einem nicht-thiolhaltigen Reduktionsmittel, kann auf den zusätzlichen Aufarbeitungsschritt weitestgehend verzichtet werden. Jedoch wurden in einigen Arbeiten Nebenreaktionen mit Maleimiden und Haloacetamiden beschrieben, welche die Markierungsreaktion inhibieren könnten (Getz, Xiao, Chakrabarty, Cooke, & Selvin, 1999; John A. Burns, 1991). Aufgrund der Toxizität von β -Mercaptoethanol werden vermehrt DTT und TCEP als Reduktionsmittel eingesetzt. DTT dient als Reduktionsmittel bei pH-Bereichen >7 und schützt die Thiolgruppen vor einer weiteren Oxidation

(Cleland, 1964). TCEP ist dahingegen bei einem weiten pH-Bereich (pH 1,5 - 8,5) reaktiv. Insbesondere bei redox-sensitiven Probenaufarbeitungen sollte jedoch bedacht werden, dass die Verwendung von TCEP in Wasser zu einer Ansäuerung (pH ~ 2,5) führt (S. S. Rhee & Burke, 2004). Weiter wird die Stabilität von TCEP im Gegensatz zu DTT nur bei nicht-chelatierenden Puffern gewährleistet (Getz et al., 1999).

1.5.1.2 Thiol-reaktive Reagenzien

Disulfidbindungen können eine Reihe von Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen eingehen, vor allem wenn angreifende und abgehende Thiolgruppe günstig zueinander orientiert sind. Um diese Austauschreaktionen weitestgehend zu vermeiden, können Thiol-Blockierungsschritte eingebracht werden, insbesondere vor der Zugabe von denaturierenden Reagenzien. Hierfür werden Thiol-reaktive Reagenzien wie Iodacetamid (IAM), Maleimide (z.B. NEM), Benzyl-Halide und Bromomethyl-Ketone (BK) eingesetzt, die stabile Thioether mit den Thiolen bilden.

Die Wahl des pH-Wertes für die Markierungsreaktion wird dadurch beeinflusst, dass ein hoher pH-Bereich den Thiol-Disulfid-Austausch fördert, während ein geringer pH-Bereich zu einer unvollständigen Markierungsreaktion führen kann (Hansen & Winther, 2009). Da die Stabilität der meisten Reagenzien mit zunehmendem pH-Wert abnimmt, wird meist ein pH-Bereich von 7,0 - 7,5 für die Markierungsreaktionen als Kompromiss gewählt (Wiederschain, 2011). Studien in HEK293-Zellen zeigten, dass intrazellulär eingesetztes Iodacetamid im Vergleich zu Maleimid stabiler, aber auch toxischer ist (D. Lin, Saleh, & Liebler, 2008). Mögliche Nebenreaktionen von Iodacetamiden können mit Methionin-, Histidin- oder Tyrosinresten auftreten, durch Verwendung von Maleimiden aber vermieden werden (Granier et al., 2007; Lang, Spratt, Guillemette, & Palmer, 2005). Nebenreaktionen mit den freien Aminogruppen eines Proteins, außer der N-terminalen α -Aminogruppe, sind bei Reaktionsbedingungen unter pH 8 aufgrund der Protonierung weitestgehend vermeidbar (Z. Yang & Attygalle, 2007). Durch Zugabe von Glutathion, Cystein oder Mercaptobernsteinsäure kann die lichtempfindliche Reaktion schließlich gestoppt werden (Wiederschain, 2011). Reversible Thiol-Reagenzien können zudem genutzt werden, um Thiole über eine asymmetrische Disulfidbrücke zu markieren, z.B. durch wasserlösliche Thiosulfate ($R-SSO_3^-$) oder einer Sepharose mit inkorporierter Disulfidbrücke (z.B. Thiopropyl-Sepharose; Wiederschain, 2011). Diese reversible Markierung kann durch Zugabe eines Reduktionsmittels wieder gespalten werden. Eine Strategie für die redox-spezifische Probenaufarbeitung besteht darin, die Proben zunächst mit TCA zu quenchen und im Anschluss daran die Thiole bei neutralem pH-Wert zu alkylieren (Le Moan et al., 2006; Leichert & Jakob, 2004; Zander, Phadke, & Bardwell, 1998).

1.5.2 Quantitative Thiolnachweise

Ein Großteil der indirekten Methoden basiert auf dem Nachweis über den Reaktivitätsverlust gegenüber des verwendeten Thiol-Markierungsreagenz. Kommt es zu einer oxidativen Modifizierung des Thiols, kann dieses nicht mehr mit dem Markierungsreagenz reagieren und es resultiert ein Signalverlust (Abbildung 1.6A).

Quantitative Methoden, die auf der bereits erwähnten BST-Methode basieren, werden als indirekter Nachweis bezeichnet, da sowohl reduzierte als auch oxidierte Cysteine markiert werden (Abbildung 1.6B). In dem ursprünglichen BST-Protokoll wurden zunächst die freien Thiole mit dem Blockierungsreagenz Methanthiosulfonat blockiert, die nitrosylierten Proteine durch Ascorbat selektiv reduziert und letztlich die freien Thiole mit Biotin-HPDP markiert (Kharitonov, Sundquist, & Sharma, 1995). Auch hier wurden eine Vielzahl quantitativer Techniken eingesetzt, z.B. SILAC, das Einbringen isobarer Markierungen für die absolute und relative Quantifizierung sowie die markierungsfreie Quantifizierung über *spectral counting* (Knut H. Dahl, 1981; Mavridou, Stevens, Ferguson, & Redfield, 2007; Winterbourn & Metodiewa, 1999). Durch Zugabe von DTT, TCEP, rekombinantem Glutaredoxin oder Arsenit als Reduktionsmittel kann die Anwendung auf reversibel oxidierte, glutathionylierte oder sulfenylierte Proteine erweitert werden (Berti & Storer, 1995; Knut H. Dahl, 1981). Neben der Anwendung von Biotin besteht die Möglichkeit einer Matrix-assistierten Aufarbeitung (Forrester et al., 2009; J. Guo et al., 2014; Paulech et al., 2013).

L. Leichert und F. Gehrke etablierten gemeinsam mit U. Jakob, basierend auf der BST-Methode und der ICAT-Technologie, eine Thiol-sensitive Strategie, welche die Reaktion mit Iodacetamid nutzt und als OxICAT bezeichnet wird (Leichert et al., 2008). Freie Thiole einer Zellprobe werden zunächst mit leichtem ICAT (^{12}C) alkyliert, danach werden reversibel oxidierte Cysteine reduziert und anschließend die naszierenden Thiole mit schwerem ICAT (^{13}C) markiert. Mithilfe einer Biotineinheit an dem ICAT-Molekül können markierte Peptide oder Proteine angereichert und über ein spaltbares 9-Carbon-Linker-Molekül eluiert werden. Die quantitative Auswertung der massenspektrometrischen Analyse erfolgt anhand der Signalintensitäten gleicher, ebenfalls markierter Peptide, die sich jedoch aufgrund der Isotopenmarkierungen um 9 Da unterscheiden. Die relative Signalintensität eines Peptides spiegelt dessen Redoxzustand wider. Mit dieser Strategie wurden neben der Aufklärung des Hefe-Redox-Proteoms eine Vielzahl von globalen Proteomstudien in verschiedenen Organismen durchgeführt (Brandes, Reichmann, Tienson, Leichert, & Jakob, 2011; Chouchani et al., 2017; Hillion et al., 2017; Knoefler et al., 2012; Menger et al., 2015). OxICAT wird oft als Gold-Standard für die globale Quantifizierung bezeichnet, da es eine exakte Bestimmung des modifizierten Cysteins und die relative Quantifizierung der oxidierten Spezies ermöglicht. Eine potenzielle Limitierung resultiert aus der Spezifität der Iodoacetylgruppe für Thiolate. Deshalb müssen zunächst alle Thiole reduziert werden,

was mit der Verwendung des unspezifischen TCEPs zu einem Verlust der Information über die genaue Cys-PTM einhergeht. OxICAT ermöglicht den Vergleich zweier Proben. Für einen quantitativen Multiplex-Proteomics-Ansatz kann der *iodoacetyl tandem mass tag* (Iodo-TMT) Anwendung finden. Beide Methoden werden für die relative Quantifizierung eingesetzt (Thompson et al., 2003).

Um das Problem der sterischen Hinderung durch die relativ großen Iodo-TMT-Moleküle zu umgehen, wurde die Technik *isotopic tandem orthogonal proteolysis activity-base protein profiling* (isoTOP-ABPP) entwickelt (Deng et al., 2013; Weerapana et al., 2010). Diese nutzt ein Markierungsreagenz mit einer einfacheren Struktur. Die IAM-Einheit ist mit einer Alkingruppe funktionalisiert, wodurch sie für eine Click-Reaktion zugänglich gemacht wird. Über diese wird letztlich ein funktionalisiertes Peptid erstellt, welches ein isotoptenmarkiertes Valin trägt, eine Biotineinheit sowie eine Proteaseschnittstelle, welche die zu analysierende Masse stark verringert. Unterschiede im Ausmaß der Alkylierung einzelner Peptide zeigen Unterschiede in der Reaktivität der Cysteine an. Hochreaktive Cysteine sollen demnach bei geringen Konzentrationen des Reagenzes vollständig markiert sein, während es bei Cysteinen mit geringer Reaktivität zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg kommt. Ein Nachteil dieser Technik kann jedoch, je nach gewähltem experimentellem Ansatz, in der geringen Membrangängigkeit und Zytotoxizität des Reagenzes gesehen werden. Die Verwendung von α -Bromomethyl-Keton soll diese negativen Eigenschaften des IAM umgehen. Durch Verwendung eines mit Alkin und photolabiler Schutzgruppe versehenen α -Bromomethyl-Ketons wurden beispielsweise redox-spezifische Änderungen in EGF-stimulierten A431-Zellen nachgewiesen. Insgesamt wurden 300 Cysteine mit einem zulässigen Ratio von schwerer zu leichter Markierung quantifiziert und daraufhin 50 putativ redox-sensitive Proteine innerhalb des EGFR-Signalweges identifiziert (Abo & Weerapana, 2015).

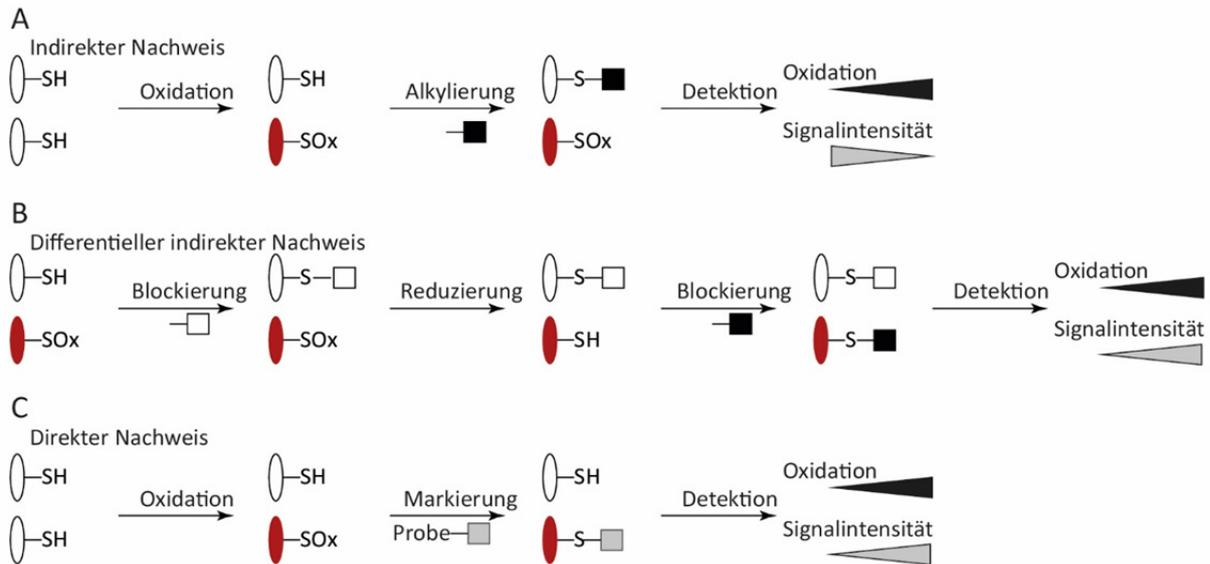


Abbildung 1.6 Übersicht über Markierungsstrategien von Cys-PTMs.

A) Indirekter Nachweis über den Reaktivitätsverlust der Thiol-reaktiven Probe. B) Indirekter Nachweis durch differenzielle Alkylierung von reduzierten und oxidierten Cysteinen. C) Direkter Nachweis für spezifische Cys-PTMs. Modifiziert nach Paulsen und Carroll 2013.

Der direkte Nachweis spezieller Cys-PTMs (Abbildung 1.6C) ist eine erstrebenswerte Technik, wird jedoch aufgrund der zuvor beschriebenen instabilen Natur der Modifizierungen erschwert. Die Proben werden bei diesem Ansatz mit einem Cys-PTM-spezifischen Markierungsreagenz behandelt und diese über adäquate Reporter-Tags nachgewiesen. Beispielsweise gelang 1974 erstmals die Detektion der Sulfensäure in der *glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) mittels radioaktivem Benzylamin (Allison, Benitez, & Johnson, 1973; Benitez & Allison, 1974). Aufgrund der instabilen Natur des entstehenden Sulfenamids in Gegenwart von biologischen Aminen und Thiolen wurde dieser Ansatz vermutlich nicht weiter für Proteomanalysen verfolgt. Viele der verwendeten Reagenzien für den Nachweis sulfenylierter Proteine basieren auf 5,5-Dimethylcyclohexan-1,3-dion (Dimedon). Hierunter fallen das Biotin-konjugierte Derivat DCP-Bio1, die fluoreszenzmarkierten Proben DCP-Rho1 und DCP-FL sowie das Alkin-enhaltende Dyn-2, welches über eine Click-Reaktion verschiedene Auslese- bzw. Analysemethoden ermöglicht (Paulsen et al., 2012; Leslie B. Poole et al., 2007). Die Sulfenylierungsleveln von *M. trunculata*, *S. meliot* und in osteoarthritischen Chondrozyten nach Fibronectinbehandlung wurden beispielsweise mithilfe von DCP-Bio1 analysiert (Oger, Marino, Guignonis, Pauly, & Puppo, 2012; S. T. Wood et al., 2016). In einer weiteren Anwendung von DCP-Bio1 wurde die Isoform-spezifische Regulierung von Akt durch PDGF-induzierte ROS nachgewiesen (Wani et al., 2011). Eine elegante Methode findet insbesondere in den Arbeitsgruppen um K. Carroll und D. Liebler Anwendung. Über eine kupferkatalysierte Click-Reaktion werden Dyn-2-markierte Proteine biotinyliert und anschließend über einen spaltbaren Linker eluiert. So konnten zum einen quantitative Proteomstudien durchgeführt und zum anderen die Peroxid-abhängige Sulfenylierung

des EGF-Rezeptors nachgewiesen werden (Akter et al., 2015; Gupta & Carroll, 2014; Paulsen et al., 2012; J. Yang, Gupta, Carroll, & Liebler, 2014; Jing Yang et al., 2015). Die intuitive Herangehensweise, Dimedon direkt für den Sulfensäurenachweis zu verwenden, fand bisher so gut wie keine Anwendung. Aus der geringen Abundanz der Sulfensäure resultiert der Bedarf einer Anreicherung, jedoch fehlt bislang ein System, um die mit Dimedon markierten Proteine oder Peptide aus dem Lysat zu filtern. Dennoch wird Dimedon für den Sulfensäurenachweis an isolierten Proteinen verwendet. Beispielsweise wurde so die Entstehung einer Sulfensäure an dem Selenocystein der Glutathion-Peroxidasen-4 nachgewiesen (Ingold et al., 2018).

Chemische Markierungen, die es erlauben eine Kreuzreaktion zwischen Sulfensäuren und Nitrosothiolen zu untersuchen, wurden ebenfalls für Proteomanalysen eingesetzt (Majmudar et al., 2016). Des Weiteren können sulfhydrierte Proteine über einen *tag-switch* Ansatz analysiert werden (C. M. Park, Macinkovic, Filipovic, & Xian, 2015; D. Zhang et al., 2014). Der direkte Nachweis glutathionylierter Proteine wird über biotiniliertes GSH, wie etwa Glutathion-Ethyl-Ester (Biotin-GEE), N,N-biotinyl glutathione disulfide (Biotin-GSSG) und Glutathionylspermidin, ermöglicht (Brennan et al., 2006; Chiang et al., 2012). Ebenfalls können durch einen Stimulus induzierte Disulfidbrücken über eine diagonale Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nachgewiesen werden (Cumming, 2008; Sommer & Traut, 1974). Hierbei wird das Proteingemisch zunächst über eine nicht-reduzierende Gelelektrophorese anhand des Molekulargewichts aufgetrennt. Dieser Gelbereich wird ausgeschnitten und die Proteine werden innerhalb des Gels reduziert und alkyliert. Im Anschluss wird der Gelstreifen um 90°C versetzt auf ein zweites Gel platziert und die Proteine werden in einer zweiten Dimension unter reduzierenden Konditionen aufgetrennt. Proteine mit einer Disulfidbrücke erscheinen nun als Spots über dem Gel verteilt. Dahingegen finden sich Proteine ohne Disulfidbrücke in einer diagonal über das Gel verlaufenden Linie wieder. Mithilfe dieser Technik wurden beispielsweise Disulfid-verknüpfte Proteine in Zellkulturlysaten von Herzmuskelzellen detektiert (Brennan et al., 2004). Eine weitere gelbasierte Methode ist die Kombination von Thiol-reaktiven fluoreszierenden Proben mit einer 2D-SDS-PAGE, z.B. bei dem Redox-DIGE-Ansatz (Hochgrafe, Mostertz, Albrecht, & Hecker, 2005; Yano, Wong, Lee, Cho, & Buchanan, 2001). Ein Vergleich der Redox-DIGE- und OxICAT-Techniken zeigte komplementäre Eigenschaften, aber eine höhere Spezifität der OxICAT-Methode (C. Fu et al., 2008).

Die dargestellten direkten Markierungsstrategien werden bereits erfolgreich für die Analyse einzelner Proteine verwendet. Die Einzelproteinanalyse hat den Vorteil, dass die Reaktionsbedingungen gezielt auf das jeweilige Protein und auch Cystein abgestimmt werden können. Eine Vorgehensweise, die bei der Analyse eines komplexen Proteingemisches nicht möglich ist. Um ein Proteom hinsichtlich oxidativer Modifizierungen zu untersuchen, müssen immer Kompromisse bezüglich der Reaktions-

bedingungen eingegangen werden, was die Effektivität der Markierung verringert und die Analyse deutlich erschwert.

1.5.3 Manipulation des zellulären Redoxzustandes

Eine weitere Möglichkeit den Einfluss von RS auf das Proteom bzw. einzelne Proteine zu untersuchen, ist die Analyse infolge einer Veränderung des zellulären Redoxzustandes. Dies kann durch die Zugabe eines Reduktionsmittels (z.B. N-Acetylcystein/NAC) oder eines Radikalfängers (z.B. Butylhydroxyanisol/BHA) erfolgen. Das wasserlösliche NAC wirkt als acetylierte Form des Cysteins auf den Cystin/Glutamat-Antiporter (xCT) und moduliert so den Glutathionspiegel der Zelle (Sadowska, 2012). Cystin, welches in einer oxidativen Umgebung zu Cystin oxidiert, wird im Austausch zu Glutamat in die Zelle transportiert (siehe auch Abbildung 1.4). Dadurch werden die extrazellulären Glutamatspiegel reguliert und die Aufnahme von Cystin in die Zelle verbessert. Intrazellulär wird Cystin zu Cystein reduziert, der limitierenden Ausgangssubstanz für die Glutathionbildung. Der synthetische Phenolether BHA ist in lipophiler Umgebung wirksam und beeinflusst die Abundanz und Aktivität von Flavoproteinen (Cummings & Prough, 1983; Jaiswal, 1994; Pinkus, Weiner, & Daniel, 1996; B. Sun & Fukuhara, 1997; Wefers, Komai, Talalay, & Sies, 1984). Beide Substanzen verändern die zellulären Mengen an RS durch unterschiedliche Wirkmechanismen. Die Auswirkungen auf den zellulären Redoxzustand werden nicht in jedem Fall als exklusiv antioxidativ oder prooxidativ beschrieben, weshalb die Verwendung des Begriffs Antioxidationsmittel nachfolgend bewusst vermieden wird.

2. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll im Modellsystem der mit Retinsäure behandelten SH-SY5Y-Zellen untersucht werden, inwieweit Redox-Prozesse bei der neuronalen Differenzierung eine Rolle spielen. Dabei sind wesentlichen Aspekte, ob und wann reaktive Spezies im Verlauf der neuronalen Differenzierung entstehen und ob sich damit einhergehende Veränderungen von Proteinen nachweisen lassen.

Zunächst soll eine umfassende Charakterisierung des Modellsystems erfolgen, die neben der mikroskopischen Betrachtung der Zellmorphologie differenzielle und quantitative Proteomanalysen beinhaltet. Es soll sowohl das Proteom von Zellen analysiert werden, die einer mehrtägigen Retinsäurebehandlung unterlagen als auch die dynamischen Veränderungen der Proteinabundanzen zu früheren Zeitpunkten.

Um eine redox-spezifische Analytik durchführen zu können sollen Methoden etabliert werden, mit deren Hilfe (1) Veränderungen des zellulären Redoxzustandes detektiert werden können und die (2) eine quantitative Analyse von reversibel oxidierten Proteinen in einem proteomanalytischen Ansatz ermöglichen. Die etablierten Methoden sollen schließlich an dem Modellsystem angewendet werden.

Basierend auf den Ergebnissen der globalen Redox-Proteomanalyse sollen mittels bioinformatischer Analyse (1) Proteine identifiziert werden, die Kandidaten für eine physiologisch relevante reversible Oxidation an den Cysteinen sind und (2) biologische Prozesse herausgearbeitet werden, an denen die potenziell redox-sensitiven Proteine beteiligt sind.

Weiter soll überprüft werden, ob die Redoxprozesse in einen direkten Bezug zu den phänotypischen Veränderungen der Zelle gebracht werden können und ob dieser Phänotyp durch Wirkstoffe, die sich auf den Redoxzustand der Zelle auswirken, veränderbar ist.

Diese Arbeit soll dabei helfen, die molekularen Auswirkungen von oxidativen Veränderungen auf die Proteine während der neuronalen Differenzierung zu beschreiben.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen VWR, Carl Roth, Sigma Aldrich oder Life Technologies bezogen.

3.2 Molekularbiologische Methoden

Die Klonierung spezifischer Proteinfragmente erforderte eine Reihe verschiedener Schritte. Die DNA-Fragmente wurden amplifiziert, aufgereinigt, enzymatisch verdaut, erneut aufgereinigt und in den Zielvektor ligiert. Schließlich erfolgte die Transformation in *E. coli*. Die in dieser Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Methoden wurden nach den Angaben der Hersteller der verwendeten Enzyme (New England Biolabs, Frankfurt a.M., DE) und Kits durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, wurden die molekularbiologischen Arbeiten mit autoklaviertem Reinstwasser durchgeführt und die Reaktionen bei der jeweils angegebenen Temperatur in einem Thermocycler inkubiert.

Tabelle 3.1 Vektoren und DNA-Konstrukte.

Vektor	Größe	Enzyme	Quelle des Vektors
pLPCX-Grx1-RoGFP2	900 bp	-	Dr. Dick, Heidelberg, DE
pLPCX-RoGFP2-ORP1		Bsu15I, BglIII	Dr. Dick, Heidelberg, DE
pOTB7-NCF1	1 100 bp	-	transOMIC technologies, Huntsville, US
pCDNA3	5 600 bp	HindIII, NotI, EcoRV	LifeTechnologies/Invitrogen (Thermo Scientific)

Tabelle 3.2 Primer für die Klonierung des pCDNA3-NCF1-RoGFP2-Konstruktes.

Bezeichnung	Sequenz	Enzyme
p47 fw	5´-CTCGAGCTCAAGCTTATGGGGGACACCTTCATCCGT-3´	HindIII
p47 rv	5´-ATCTCTAGACCGACGGCAGACGCCAGCTTCCG-3´	XbaI
RoGFP2 fw	5´-CGGAAGCTGGCGTCTGCCGTCACTAGTGGTGGTTCAGGTGGTG-3´	-
RoGFP2 rv	5´-TCTAGAGTCGCGGCCGCTTTACTTGTACAGCTCGTCCAT-3´	NotI

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Das Konstrukt NCF1-RoGFP2 wurde über eine *splicing by overlap extension-polymerase chain reaction* (SOE-PCR) hergestellt. In einem ersten Schritt wurden die Zielfragmente RoGFP2 (aus dem Vektor pLPCX-Grx1-RoGFP2) und NCF1 über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die DNA-Vorlage (Template, Tabelle 3.1) und die Primer (Tabelle 3.2) wurden in einem 50 µl Reaktionsansatz zusammengefügt:

PCR-Reaktionsansatz

Phusion HF Buffer (5x)	5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
fw Primer (10 pmol/µl)	1,25 µl
rv Primer (10 pmol/µl)	1,25 µl
Template NCF1/RoGFP2 (1 µg/µl)	1 µl
Phusion DNA Polymerase (2 unit/µl)	0,5 µl
H ₂ O	40 µl

Tabelle 3.3 PCR-Einstellungen.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	98°C	30 Sek.	1
Denaturierung	98°C	10 Sek.	
Primer Hybridisierung	55°C	15 Sek.	25
Elongation	72°C	30 Sek.	
Elongation	72°C	7 Min.	1

Die Amplifizierung der DNA wurde mit den in Tabelle 3.3 aufgeführten Einstellungen durchgeführt. Im Anschluss der PCR wurden die DNA-Fragmente aufgereinigt und jeweils 1/10 der aufgereinigten Produkte über eine zweiten PCR (SOE-PCR) zusammengefügt (Tabelle 3.4):

SOE-PCR-Reaktionsansatz

Phusion HF Buffer (5x)	5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Primer p47 fw (10 pmol/µl)	1,25 µl
Primer RoGFP2 rv (10 pmol/µl)	1,25 µl
Aufgereinigte NCF1-DNA	5 µl
Aufgereinigte RoGFP2-DNA	5 µl
Phusion DNA Polymerase (2 unit/µl)	0,5 µl
H ₂ O	31 µl

Tabelle 3.4 SOE-PCR-Einstellungen.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	98°C	30 Sek.	1
Denaturierung	98°C	10 Sek.	
Primer Hybridisierung	55°C	15 Sek.	28
Elongation	72°C	60 Sek.	
Elongation	72°C	7 Min.	1

1/10 des SOE-PCR-Produktes wurde über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Präsenz eines 2 024 bp großen DNA-Fragments überprüft. Das verbleibende Produkt wurde aufgereinigt und für den Restriktionsverdau verwendet.

3.2.2 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung der DNA erfolgte über zwei verschiedene Techniken. DNA-Fragmente und Vektoren wurden über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, die Banden spezifischer Größe mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und mittels eines *Agarose Gel DNA Extraktion Kits* (Roche, Mannheim, DE) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Das Produkt der SOE-PCR wurde mithilfe des *High Pure PCR Purification Kits* (Roche, Mannheim, DE) aufgereinigt.

3.2.3 DNA-Restriktion

Die DNA-Fragmente (Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2) wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben verdaut (Thermo Fisher Scientific, Dreieich). Simultan wurde der Zielvektor pCDNA3 (3-4 µg) vor der Ligation verdaut. Um eine Rezirkulation während der angestrebten Ligation zu verhindern, wurde der verdaute Vektor pCDNA3 durch Zugabe von 2 µl Fast AP* (Thermosensitive Alkaline Phosphatase, 1 unit/µl, in 2 µl Puffer R und 16 µl H₂O) für 10 Min., 37°C dephosphoryliert. Um sogenannte *blunt ends* zu generieren, wurden dem Restriktionsansatz pLPCX-RoGFP2-ORP1 (Bsu15I, BgIII) 4,5 µl 2 mM dNTPs, 0,5 µl T4 Polymerase (5 unit/µl) und 4,5 µl H₂O zugegeben und die DNA-Synthese für 5 Min., Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

3.2.4 DNA-Ligation

Die Ligation der vorbereiteten Inserts in den verdauten Zielvektor erfolgte entsprechend der nachstehend aufgeführten Reaktionsansätzen für 1 Std., 22°C. Durch die Erwärmung auf 65°C für 10 Min. wurde die T4-Ligase inaktiviert und die Reaktion damit beendet.

pCDNA3-NCF1-RoGFP2 (2 024 bp)

SOE-PCR Produkt (HindIII, NotI)	8 µl
pCDNA3 (HindIII, NotI)	4 µl
Puffer T4-DNA-Ligase	1,5 µl
T4-DNA-Ligase (5 unit/µl)	1,5 µl

pCDNA3-RoGFP2-ORP1 (1 144 bp)

pLPCX-RoGFP2-ORP1 (Bsu15I, BgIII)	7 µl
pCDNA3 (EcoRV)	3,5 µl
Puffer T4-DNA-Ligase	1,5 µl
T4-DNA-Ligase (5 unit/µl)	1,5 µl
PEG4000	1,5 µl

3.2.5 DNA-Quantifizierung

Die Konzentration und Reinheit der verwendeten DNA-Fragmente wurde photometrisch bestimmt (NanoDrop 1000, ThermoFisher).

3.2.6 Herstellung und Transformation chemokompetenter Bakterienzellen

Aus einzelnen Bakterienkolonien des Bakterienstamms *E. coli* XL1-Blue wurde zunächst eine 3 ml über-Nacht Kultur angelegt (Warmluftschüttler, 37°C, 180 U/Min.). Aus dieser Kultur wurden 200 µl entnommen und in 100 ml Super-Optimal-Browth-Medium (20 g/l Pepton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 2,5 mM KCl, pH 7,0 autoklaviert; zugesetzt mit 10 mM MgCl₂ und 10 mM MgSO₄) überführt. Die Kultur wurde bis zu einer OD_{600nm} von etwa 0,5 inkubiert (Warmluftschüttler, 37°C, 180 U/Min.) und im Anschluss durch Zentrifugation bei 800 rpm pelletiert (Zentrifuge Universal 30 RF, Rotor Typ 1424A). Das Sediment wurde in 40 ml kaltem TB-Puffer (0,75 g/l Pipes, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl (pH 6,7), 10,88 g/l Mangan(II)-Chlorid) resuspendiert und für 10 Min. auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Sediment in 10 ml kaltem TB-Puffer aufgenommen, 750 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben und für 10 Min. auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde à 200 µl aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu der weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die kompetenten Bakterienzellen wurden zügig aufgetaut und jeweils ein 100 µl Aliquot zu einem Ligationsansatz pipettiert. Dieser Ansatz wurde für 30 Min. auf Eis inkubiert, im Anschluss für 90 Sek., 42°C erwärmt (Hitzeschock) und erneut 5 Min. auf Eis gekühlt. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Kulturplatten (10 g/l Pepton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7,4, autoklaviert, 15 g Agar/l, optional: 100 µg Ampicillin/l) ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.7 Sequenzierung von DNA

Hergestellte DNA-Plasmide wurde mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Dies erfolgte am Biologisch Medizinischen Forschungszentrum, Genomics & Transcriptomics Labor, Prof. Dr. Köhrer nach den dort vorgegebenen Richtlinien.

3.2.8 Transfektion von Zellen

Die Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte mithilfe des Reagenz Lipofectamine3000 (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt) nach den Angaben des Herstellers. SH-SY5Y-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 1x10⁴ Zellen/cm² auf 24-Wellplatten ausgesät und über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 500 ng DNA und 1 µl P3000-Reagenz sowie 0,75 µl Lipofectamine3000-Reagenz/Well behandelt. Der Expressionsvektor beinhaltete eine Geneticin-Resistenz wodurch positiv transfizierte Zellen durch die Zugabe von 1% G-418 (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) selektiert wurden.

3.3 Kultivierung von humanen SH-SY5Y-Zellen

Humane SH-SY5Y-Zellen (Public Health England, Bestellnummer: 94030304, Lotnummer: 13C014, Passage: 17) wurden, wenn nicht anders angegeben, in 50% Dulbecco's-Modified-Eagle's-Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, Hamburg, DE), 50% Minimum-Essential-Medium (MEM, Sigma-Aldrich, Hamburg, DE), 10% dialysiertem fetalem Kälberserum (Life Technologies, Darmstadt, DE), 1% Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich, Hamburg, DE), 2% Aminosäuren (M5550, Sigma-Aldrich, Hamburg, DE) bei 37°C in 5% CO₂ Atmosphäre kultiviert. In einem Rhythmus von 48 Std. wurden die Zellen nach Abnahme des Kulturmediums mit 0,05 % Trypsin (Serva Elektrophoresis, Mannheim) für etwa 3 Min., 37°C inkubiert und gelöst. Dieser Prozess wurde durch die Zugabe des zweifachen Volumens an Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde für 5 Min., 600 rpm (Zentrifuge Universal 30 RF, Rotor Typ 1424A) zentrifugiert und der Überstand verworfen, um sowohl abgestorbenes Zellmaterial als auch Trypsin zu entfernen. Das Zellpellet wurde in einem entsprechenden Volumen an frischem Medium aufgenommen und für die weitere Kultivierung verwendet. Die verwendeten Volumina wurden anhand der Empfehlungen *useful numbers for cell culture* der Firma Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, DE ausgewählt. Die Zellen wurden routinemäßig hinsichtlich ihrer Viabilität überprüft. Hierfür wurden diese mit Trypanblau angefärbt und in einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt oder mittels des Laktat-Dehydrogenase-Zytotoxizitätstests (Roche, Basel, CH) nach Herstellerangaben detektiert. Die maximale Passagenzahl betrug 15.

3.3.1 Stabile Isotopenmarkierung von Aminosäuren in der Zellkultur

Für die stabile Isotopenmarkierung von Aminosäuren in der Zellkultur (SILAC) wurden die SH-SY5Y-Zellen über fünf Passagen auf SILAC-Medium kultiviert. Dieses wurde im Fall der Kontrolle mit isotopenmarkiertem L-Lysin (L-Lys) und L-Arginin (L-Arg) versehen: 500 ml Lys-/Arg-/Glu-defizientes DMEM (PAN Biotech, Aidenbach, DE), 10% dialysiertes fetales Kälberserum, 1,8 mM L-Glu (Life Technologies, Darmstadt, DE), 80,9 mg L-Lys+4 (Euriso-top, Saarbrücken, DE), 22 mg L-Arg+10 (Euriso-top, Saarbrücken, DE). Nach der Behandlung wurden die verschieden kultivierten Proben 1:1 kombiniert und lysiert.

3.3.2 Neuronale Differenzierung und Behandlungen

Für die Behandlung mit 10 µM Retinsäure (all-*trans*-Retinsäure, R 2625, Sigma-Aldrich, Hamburg, DE) wurden die Zellen, wenn nicht anders angegeben, mit einer Dichte von 1x10⁴ Zellen/cm² ausgesät und zunächst über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag erfolgte die Stimulation mit Retinsäure, 0,5 mM Diamid bzw. der Lösungsmittelkontrolle Ethanol (EtOH). Bei den Zellen wurde stets alle 48 Std. ein Medienwechsel vorgenommen, mit oder ohne Zugabe der entsprechenden Stimulantien. Die Stimulation mit 5 µM Apocynin (Sigma-Aldrich, Hamburg, DE), 5 µM Diphenyleneiodonium Chlorid (DPI, Sigma-Aldrich, Hamburg, DE) erfolgte 30 Min. vor Retinsäure- bzw. Lösungsmittelzugabe.

500 μM N-Acetylcystein (Sigma-Aldrich, Hamburg, DE) oder 150 μM Butylhydroxyanisol (Sigma-Aldrich, Hamburg, DE) wurde zeitgleich zu Retinsäure bzw. der Lösungsmittelkontrolle zugegeben. Da EtOH als Lösungsmittel für alle Substanzen diente, wurde dieses stets als Kontrolle verwendet.

3.3.3 Mikroskopie

Wenn nicht anders angegeben wurden die Bildaufnahmen an einem Axioplan Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy, Jena), ausgestattet mit einem 40 x Objektiv, einer Quecksilberdampflampe und einer Digitalkamera aufgenommen. Die Verarbeitung der Bilder erfolgte mittels der Programme AxioVision (Carl Zeiss Microscopy, Jena) und FIJI (Wayne Rasband, NIH Bethesda, USA-MD) sowie dem PlugIn CellCounter (Version 07.12.2010).

3.4 Detektion Reaktiver Spezies

Um veränderte Mengen von RS zu detektieren, wurden unterschiedliche Nachweistechiken eingesetzt. Der zellmembranpermeable und frei-diffundierbare Farbstoff CellROX Green diente dazu, den globalen Redoxzustand der Zelle zu analysieren (3.4.1). Eine spezifische Detektion der ROS, in diesem Fall H_2O_2 , wurde durch genetisch kodierte Sensorproteine ermöglicht (3.4.2 und 3.4.3). Durch Einführen zweier Cysteine in die β -Fass Struktur des *green fluorescent proteins* (GFP) wurde von Meyer und Dick 2010 die redox-sensitive Variante RoGFP erstellt. RoGFP kann als Biosensor genutzt werden, um dynamische Änderungen des Redoxpotentials einer Zelle zu beobachten (Gutscher et al., 2009; Meyer & Dick, 2010). Durch Fusion mit einer enzymatischen Einheit kann eine erhöhte Spezifität für bestimmte RS eingeführt werden. So führte beispielsweise die Kombination mit der Hefe Thiol-Peroxidase (*glutathione peroxidase-like peroxiredoxin HYR1*) zu einem H_2O_2 -sensitiven Sensor (Abbildung 3.1A), während die Kombination mit humanem *glutaredoxin-1* einen Glutathion-sensitiven Sensor generierte. Die Sensoren können gezielt in bestimmten subzellulären Kompartimenten exprimiert werden, wie dem Zytosol, den Mitochondrien, dem ER oder an der Plasmamembran. Die Verknüpfung von RoGFP2 und p47^{phox} (NCF1) ermöglicht so die subzelluläre Positionierung eines redox-sensitiven, fluoreszierenden Reporterproteins direkt an den NOX-Komplex (Pal, Basu Thakur, Li, Minard, & Rodney, 2013). Dadurch wird der an der Plasmamembran lokalisierte Sensor zu einem Großteil durch entstehendes H_2O_2 oxidiert (Pal et al., 2013; Pal, Monroe, Palmieri, Sardiello, & Rodney, 2014). Das Detektionsprinzip basiert auf einer redox-abhängigen Verschiebung des Extinktionsmaximums. Ein vermehrt reduziert vorliegender Sensor zeigt ein Extinktionsmaximum bei 485 nm, wohingegen ein vornehmlich oxidiertes Sensor ein Extinktionsmaximum bei 405 nm aufweist, die Emission erfolgt jeweils bei 535 nm. Die zwei Extinktionsmaxima mit inversen Intensitätsveränderungen ermöglichen konzentrationsunabhängige, ratiometrische Messungen (Abbildung 3.1B). Fluoreszenzratio bezeichnet nachfolgend das Verhältnis der detektierten Fluoreszenzintensitäten. Der Grad der Sensoroxidation dient schließlich der Einschätzung des Redoxzustandes der Zelle.

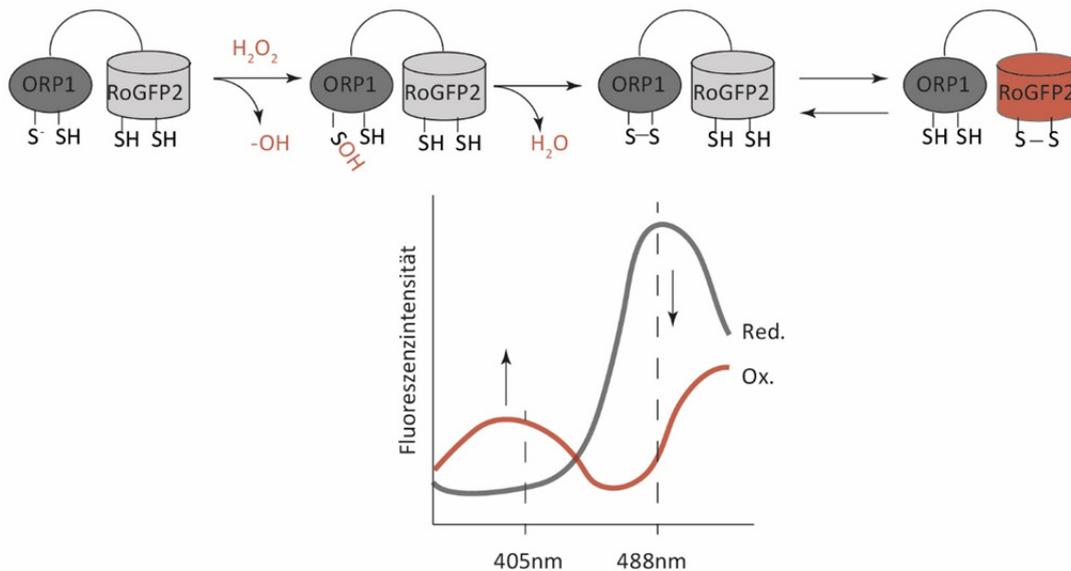


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung des Sensorproteins RoGFP2-ORP1.

A) Die Spezifität des Sensors RoGFP2-ORP1 für H_2O_2 beruht auf der Fusion von RoGFP2 mit der Thiol-Peroxidase ORP1. Kommt es zu einer Reaktion mit H_2O_2 wird zunächst die Peroxidaseeinheit zu einer Sulfensäure oxidiert, welche rasch zu einer Disulfidbrücke in der gleichen Domäne konvertiert. Daraufhin gehen die ORP1- und RoGFP2-Domänen einen Thiol-Disulfid-Austausch ein, was zu der Entstehung eines RoGFP2-Disulfids führt. B) Die Möglichkeit der ratiometrischen Messung beruht auf einer Verschiebung des Extinktionsmaximums zwischen reduziertem (488 nm) und oxidiertem (405 nm) Zustand der RoGFP2-Untereinheit. Die Abbildung wurde modifiziert nach Meyer und Dick 2010.

3.4.1 Farbstoffbasierter Nachweis

Die Durchführung erfolgte wie von *Molecular Probes by Life Technologies* beschrieben. In Kürze dargestellt wurden 3×10^4 Zellen/cm² über Nacht auf Greiner 96-Wellplatten kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen für 5 Min. mit 1 mM H_2O_2 oder H_2O behandelt. Die Behandlung mit 10 μ M Retinsäure oder der Lösungsmittelkontrolle erfolgte stündlich über ein Zeitfenster von insgesamt 5 Std. Zu einem festgelegten Zeitpunkt wurde 5 μ M des CellROX Green Reagenz (Thermo Fisher Scientific, Idstein, DE) zu den Zellen gegeben und diese erneut für 30 Min., 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium entfernt und die Zellen dreimal mit vorgewärmter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte bei einer Extinktion (ex.) = 485 nm und Emission (em.) = 535 nm in einem DTX 880 Multimode Detektor System (Molecular Devices, Biberach an der Riss, DE), bei einer Integrationszeit von 40 ms.

3.4.2 Konfokalmikroskopie genetisch kodierter Sensoren

Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen erfolgten am Institut für Nutzpflanzenwissenschaften der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Hierfür wurden die stabil transfizierten SH-SY5Y-Zellen mit einer Zelldichte von $0,5-1 \times 10^4$ Zellen/cm² auf Schalen der Firma Ibidi (München, DE) ausgesät und über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen für 15 Min. mit 1 mM DTT oder 10 mM H_2O_2 behandelt. Die redox-spezifischen Sensoren wurden bei einer Wellenlänge von ex.=405 nm und ex.=488 nm angeregt und die Intensität bei em.=517 nm mit einem LSM510, Axio

Observer Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy, Jena, DE) ausgelesen. Bei dem verwendeten Objektiv handelte es sich um ein C-Apochromat 40x/1,20 W Korr FCS M27, mit einer konfokalen Blende von jeweils 63,40 µm. Die Bildaufbereitung erfolgte mit dem Programm Zen 2012 (Carl Zeiss Microscopy, Göttingen, DE).

3.4.3 Detektion genetisch kodierter Sensoren auf 96-Wellplatten

Stabil transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden in 100 µl Medium (3.3) bei einer Zelldichte von $0,03 \times 10^6$ - $0,05 \times 10^6$ Zellen/Well, in schwarzen 96-Wellplatten (Greiner, Kremsmünster, AU) mit klarem Boden über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen durch Zugabe von 10 µl des vorgewärmten Reagenz (finale Konzentration: 10 µM Retinsäure, EtOH, 1 mM DTT, 0,5mM Diamid, 10 mM H₂O₂, 5 µM Apocynin bzw. 5 µM DPI) stimuliert. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurde das Medium mit einer Mehrkanalpipette vollständig abgezogen und die Zellen mit 100 µl vorgewärmtem *reaction monitoring* (RM)-Puffer (130mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂, 10 mM D-Glukose, 10mM D-Glukose, 20mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), pH7,7, steril filtriert) überdeckt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit einem DTX 880 Multimode Detektor alternierend bei ex. 405 nm und em. 535 nm sowie ex. 485 nm und em. 535 nm. Die Messungen erfolgten im *bottom read*-Modus, bei einer Integrationszeit von 200 ms und einer minimalen Replikatzahl von acht.

3.5 Probenvorbereitung für die Proteinanalytik

3.5.1 Zellernte und Zellaufschluss

Wenn nicht anders angegeben erfolgte die Zellernte nach dem Standardprotokoll des Molecular Proteomics Laboratory, Düsseldorf. Die Zellkulturschalen wurden auf einem Eisbett platziert und das Kulturmedium mittels einer Pipette entfernt. Adhärente Zellen wurden zweimal mit 2-5 ml eisgekühlter PBS gewaschen und dieses letztlich vollständig entfernt. Um die Zellen zu lösen, wurde folgend 1 ml PBS auf die Zellen gegeben und diese mit einem Gummischaber in serpentinenartigen Bewegungen von der Zellschale gelöst. Mittels Pipette wurde die Zellsuspension in ein tariertes, gekühltes 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, DE) überführt und anschließend durch Zentrifugation (5 Min., 800 x g, 4°C) pelletiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, wurde das Gewicht des Pellets bestimmt. Bis zu Ihrer weiteren Verwendung wurden die Pellets bei -80°C gelagert.

Für den Zellaufschluss wurde dem Zellpellet in einem ersten Schritt die dreifache Volumenmenge, bezogen auf das eingewogene Pelletgewicht, an entsprechendem Aufschlusspuffer zugefügt. Die Pellets wurden entweder von Hand mit einem Pistel gemörsert oder durch Zugabe einer Metallkugel in einem TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, DE) für 30 Sek. bei maximaler Kraft zerstoßen. Die

Suspension wurde für sechsmal 10 Sek. in einem Eiswasserbad mit Ultraschall behandelt und schließlich für 15 Min., $16\,000 \times g$, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Diese Schritte wurden anschließend mit der Zugabe der zweifachen Volumenmenge Aufschlusspuffer wiederholt und die resultierenden Lysate vereint.

3.5.2 Proteinreinigung über Größenausschlusschromatographie

Die Aufarbeitung von (markierten) Proteinen erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie in Bio-Spin Chromatographie Säulen (Bio-Rad, Heidelberg, DE). Die Methode wurde für die Aufreinigung von 50-100 μl Probenvolumen (Mini-Spin) und 10-75 μl Probenvolumen (Micro-Spin) etabliert. In Kürze: Drei Gramm der Bio-Gel P6-Matrix (Bio-Rad, Heidelberg, DE) wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, VWR, Langenfeld, DE) gewogen und auf 50 ml Volumen mit H_2O aufgefüllt. Nach 4 Std. wurde die Bio-Gel P6-Matrix dreimal mit H_2O gewaschen (30Sek., $1000 \times g$, RT). Danach folgte ein Waschschrift mit 70% EtOH für 30 Sek., $300 \times g$, RT und zweimal mit steriler entgaster PBS 30 Sek., $300 \times g$, RT. Die Matrix wurde in PBS und 3 mM Natrium Azid aufgenommen (50% Matrix) und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Die Spinsäulen wurden auf ein leeres 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, DE) gesetzt. Die Bio-Gel P6-Matrix wurde gemischt und abhängig von dem benötigten Probenvolumen eines der in Tabelle 3.5 aufgelisteten Protokolle angewandt.

Tabelle 3.5 Proteinreinigung über Größenausschlusschromatographie.

Probenvolumen	10-75 μl	50-100 μl
Säule	Micro Bio-Spin	Mini Bio-Spin
Matrixvolumen	0,6 ml	1 ml
Zentrifugationszeit	2 Min., $1000 \times g$, RT	2 Min., $1000 \times g$, RT
Waschschrift	2 x 600 μl PBS, 2 Min. $1000 \times g$, RT	2 x 600 μl PBS, 2 Min. $1000 \times g$, RT
	Reaktionsgefäß erneuern	
	Probe auftragen	
Elution	5 Min., $1000 \times g$, RT	5 Min., $1000 \times g$, RT

3.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Quantifizierung der Proteinkonzentration erfolgte über das Pierce™ 660 nm Protein Assay-Protokoll (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE). Durch die Bindung von Proteinen an einen Farbstoff-Metall-Komplex kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 420 nm hin zu 660 nm. Durch den Vergleich mit einer BSA-Standardreihe konnte die Konzentration der Proteinmischung in einem Bereich von $0,031 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ - $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bestimmt werden. Die Messungen wurden an einem DTX 880 Multimode Detektor System durchgeführt.

Proben welche in Probenpuffer (vierfach konzentriert: 30% (v/v) Glycerin, 12% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 150 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid (Tris-HCl), 0,5% (w/v) Bromphenolblau, optional: 600 mM DTT, pH 7,0) aufgearbeitet wurden und deren Proteinkonzentration nicht über einen Nachweis mittels Pierce™ 660 nm Protein Assay-Protokoll ermittelt werden konnte, wurde das *ion detergent compatibility*-Reagenz hinzugefügt (Thermo Fisher Scientific, Dreieich).

3.5.4 Proteinnachweis über SDS-PAGE

Für eine Überprüfung der Präsenz, der quantitativen Abschätzung von Proteinmengen und der Aufreinigung von Proteinproben wurde die eindimensionale Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet. Durch Zugabe des anionischen Detergenz' SDS wurden die Proteine denaturiert und ihre Eigenladung maskiert. Im Anschluss wurden die Proteine über ein unter Spannung stehendes Polyacrylamidgel entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt.

Eine definierte Probenmenge wurde mit Probenpuffer versetzt und für 10 Min., 37°C (Harnstoff enthaltende Proben) oder für 10 Min., 56-90°C inkubiert. Die Trennung erfolgte in Novex 4-20 % Tris-Glycine Fertiggele (Life Technologies, Darmstadt, DE). Zunächst wurden die Taschen mit Laufpuffer (1 M 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure, 1 M Tris-Base, 2% (w/v) SDS, 20 mM EDTA, pH 7,7) ausgespült und mit der Probe befüllt. Eine Tasche wurde mit 3 µl des Größenstandards befüllt. Der Eintritt der Proteine in das Gel erfolgte über 5-15 Min., 50 V und die Trennung anschließend für 45-60 Min., 200 V. Die SDS-PAGE wurde für die Trennung von Proteingemischen über die gesamte Länge des Gels oder für eine Aufreinigung im Bereich des Sammelgels genutzt und durch eine Silberfärbung visualisiert (3.5.5).

3.5.5 Silberfärbung von Proteingelen

Die Visualisierung der Proteine nach der SDS-PAGE erfolgte mit einer Silberfärbung. Um zu verhindern, dass die Proteine aus dem Gel diffundieren wurde zunächst eine Säurefixierung durchgeführt, hierfür wurden die Gele für 15 Min. – 24 Std. in 50 ml Fixierlösung (50% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure) eingelegt. In einem zweiten Schritt wurden die Gele für 15-120 Min in 50 ml Inkubationslösung (30% (v/v) Ethanol 500 mM Natriumacetat, 8 mM Natriumthiosulfat) eingeweicht und im Anschluss dreimal mit 50 ml Reinstwasser gewaschen. Die Färbung erfolgte über die Zugabe von 50 ml einer 6 mM Silbernitratlösung für 15-30 Min. Im Anschluss wurden die Gele kurz mit Reinstwasser gespült und schließlich für 1 Min. in 50 ml 236 mM Natriumcarbonat gespült. Die Entwicklung erfolgte mittels 0,01% (v/v) Formaldehyds in 50 ml 236 mM Natriumcarbonat für 1-7 Min. Nach ausreichender Entwicklung wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 ml 50 mM EDTA-haltiger Stopplösung beendet. Anschließend wurde das Gel erneut für 10 Min. in Reinstwasser gewaschen.

3.6 Aufarbeitung für die redox-spezifische Proteomanalyse

Für die redox-spezifische Proteomanalyse wurde ein Protokoll modifiziert, das die Aufarbeitung potenziell reversibel oxidierter Proteine über eine Thiopropyl-Sepharose 6B-Matrix (TPS-Matrix; GE Healthcare, Freiburg, DE) mit anschließender massenspektrometrischer Analyse nutzt (J. Guo et al., 2014; Paulech et al., 2013).

3.6.1 Zellernte und Zellaufschluss

Die Zellen wurden bis zu einer Wachstumsdichte von 7×10^6 Zellen/cm² kultiviert. Die Zellschalen wurden auf einem Eisbett platziert und zweimal mit eiskaltem, entgastem PBS gewaschen. Nach vollständiger Entfernung des PBS, wurden die Zellen mit 20% (v/v) TCA bedeckt und für 30 Min., 4°C inkubiert. Durch diesen Schritt wurde der pH-Wert auf zwei gesenkt, so sollte der Oxidationszustand der Thiole konserviert werden. Die präzipitierten Zellen wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Lobind Eppendorf, Hamburg, DE) überführt und für 10 Min., $13000 \times g$, 4°C zentrifugiert. Die resultierenden Pellets wurden mit 10% und 5% TCA gewaschen und im Anschluss in 400 µl entgastem Zellaufschlusspuffer (8 M Harnstoff, 1% SDS, 250 mM HEPES, pH 7,5, mit zugesetzten 100 mM NEM oder 10 mM DTT) resuspendiert. Unter Lichtausschluss wurden die Proteine für 1,5 Std., 850 rpm, 37°C alkyliert bzw. reduziert. Anschließend wurden die Proteine mit 1,6 ml, 100% Aceton (-20°C) über Nacht präzipitiert. Am folgenden Tag wurden die Proteine für 10 Min., $13\ 000 \times g$, 4°C pelletiert, mit 500 µl 100% und 70% Aceton gewaschen. Im Anschluss erneut zentrifugiert und in 400 µl Resuspensionspuffer (250 mM HEPES, 8 M Harnstoff, 0,1% SDS, pH 7,7) resuspendiert. Oxidierte Thiole wurden nun durch erneute Zugabe von 10 mM DTT für 1 Std., 850 rpm, 37°C reduziert. Überschüssiges DTT wurde durch Ultrafiltration in Amicon Ultra-0,5 ml Filter, 10 kDa Trenngrenze des Molekulargewichts (Merck Millipore, Darmstadt), entfernt. Hierzu wurden die Proben zunächst bei $14\ 000 \times g$, 10°C gefiltert und in einem ersten Schritt mit 0,5 ml 8 M Harnstoff und einem zweiten Schritt mit kaltem H₂O (ultrarein) bei jeweils 14°C gewaschen. Die Proben wurden für 5 Min., $1\ 000 \times g$, RT aus dem Filter zentrifugiert und dieser wurde erneut mit 50 µl Anreicherungs-Kopplungspuffer (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7,5 optional: 10 mM DTT) gespült. Im Anschluss wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung (3.5.3) durchgeführt und die Proben auf 100 µg bzw. 200 µg Protein/240 µl Anreicherungs-Kopplungspuffer eingestellt.

3.6.2 Vorbereitung der Thiopropyl-Sepharose 6B-Matrix

Alle verwendeten Lösungen wurden zuvor auf RT gebracht. Es wurden 35 mg TPS-Matrix/200 µg Protein in 1 ml H₂O für 15 Min., RT quellen gelassen, vorsichtig durch pipettieren resuspendiert und erneut 10 Min., RT quellen gelassen. Vor der Verwendung wurde die TPS-Matrix jeweils fünfmal mit H₂O und Anreicherungs-Kopplungspuffer gewaschen.

3.6.3 Aufarbeitung über die Thiopropyl-Sepharose 6B-Matrix

Die für die Aufarbeitung bestimmten Proben wurden für eine vollständige Reduktion der Cysteine und Löslichkeit der Proteine mit 20 mM DTT und 0,1% SDS versehen. Die Proben wurde mit 100 µl vorbereiteter TPS-Matrix in einer Zentrifugationssäule (Sigma-Aldrich, Hamburg, DE) für 2 Std., 850 rpm, RT inkubiert. Ungebundene Proteine wurden durch stringente Waschschrte entfernt. Hierfür wurde die TPS-Matrix jeweils fünfmal alternierend mit 500 µl 8 M Harnstoff, 2 M NaCl, 80% Acetonitril/0,1% Trifluoressigsäure, 25 mM HEPES pH 7,7 gewaschen. Die Elution der an die TPS-Matrix gebundenen Proteine erfolgte durch Zugabe von 50 µl bzw. 100 µl Probenpuffer (30% (v/v) Glycerin, 12% (w/v) SDS, 150 mM Tris-HCl, 0,5% (w/v) Bromphenolblau, 150 mM DTT, pH 7,0) 20 Min., 850 rpm, 42°C. Die eluierten Proteine wurden in dem Bereich des Sammelgels einer SDS-PAGE vereint, reduziert und mit Iodacetamid umgesetzt (3.7.1). Die zuvor Matrix gebundenen Proteine sollen so durch eine Carbamidomethylierung (CA) markiert werden (Abbildung 4.16). Die extrahierten Proteine werden schließlich über LC-MS/MS analysiert. Eine erhöhte Proteinabundanz in dem Redox-Proteom weist auf eine vermehrte reversible Oxidation des Proteins hin.

3.7 Vorbereitung der Proben für die Massenspektrometrie

3.7.1 In-Gel-Verdau und Peptidextraktion

Die über Gelelektrophorese aufgetrennten und silbergefärbten Proteinbanden wurden mithilfe eines Skalpells ausgeschnitten und für 7 Min. mit Entfärbelösung (15 mM Natriumthiosulfat, 50 mM Kaliumhexacyanoferrat) entfärbt. Anschließend wurden die Banden dreimal alternierend für 10 Min. mit 10 mM Ammoniumbicarbonat (NH_4HCO_3) und 10 mM NH_4HCO_3 , 50% Acetonitril (v/v) gewaschen und schließlich in einem Vakuumkonzentrator (Eppendorf, Hamburg, DE) eingetrocknet (≥ 30 Min.). Für einen optimalen Verdau wurden die Proteine durch Zugabe von 50 µl 10 mM DTT in 50 mM NH_4HCO_3 reduziert (45 Min., 56°C) und mit 50 µl 55 mM Iodacetamid in 50 mM NH_4HCO_3 carbamidomethyliert (abgedunkelt, 30 Min., RT). Der Verdau erfolgte durch die Zugabe von 2-6 µl Trypsinlösung (33,3 µg/ml in 50 mM NH_4HCO_3 , NB Premium Grade, Serva Electrophoresis, Heidelberg, DE) über Nacht, 37°C. Für die Extraktion der Peptide wurden die Gelbanden mit 10 µl einer 1:1-Lösung (v/v) aus Acetonitril und 0,1% Trifluoressigsäure bedeckt und anschließend für 15 Min. in einem mit Eis gefüllten Ultraschallbad behandelt. Der Überstand wurde abgenommen und die Schritte einmal wiederholt. Beide Überstände wurden vereint und das Acetonitril im Vakuumkonzentrator entfernt.

3.7.2 Hochleistungsflüssigchromatographie

Für die Analyse der Proben mittels HPLC ESI-MS/MS wurden die extrahierten Peptide zunächst mittels online *reversed-phase* nano-HPLC (UltiMate3000 RSLC nano system Thermo Scientific, Idstein) aufgetrennt. Zunächst wurden die Peptide auf einer Vorsäule (Aclaim PepMap100 C18, 2 cm Länge, 3 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße, 75 µm Innendurchmesser, Thermo Scientific, Idstein) für 10 Min. bei einer Flussrate von 6 µl/min und 0,1% Trifluoressigsäure als mobile Phase aufkonzentriert. Im Anschluss erfolgte die Trennung der Peptide über eine C18 PepMapRSLC-Säule (Aclaim 25 cm Länge, 2 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße, 75 µm Innendurchmesser, Thermo Scientific, Idstein) über einen linearen Gradienten von 4% zu 40% Lösungsmittel B (Lösungsmittel A: 0,1% (v/v) Ameisensäure, Lösungsmittel B: 0,1% (v/v) Ameisensäure, 84% Acetonitril), bei einer Flussrate von 300 nl/Min. Der verwendete Gradient ist in Tabelle 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.6 Gradient der Flüssigchromatographie.

Die verwendeten Lösungsmittel waren A: 0,1% Ameisensäure und B: 0,1% (v/v) Ameisensäure, 84% Acetonitril. Die Flussrate betrug 0,3 µl/Min.

Retentionszeit bis [min]	% B	Vorgang
10,00	4,0	Beladen der Vorsäule
15,00	10,0	Beladen der analytischen Säule
78,00	20,0	Linearer Gradient
128,00	40	Linearer Gradient
130,00	95	
137	95	
141	50	
145,5	96	
150,5	4	Spülen und equilibrieren der Säulen
153	96	
158,5	4	
180	4	

3.7.3 Massenspektrometrischer Nachweis

Die Proteinanalyse einzelner Proteine sowie die Identifizierung und Quantifizierung hochkomplexer Proteingemische erfolgte über ein Orbitrap Elite Hybrid Ionenfallen-Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE) oder ein Q Exactive Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE), welche mit einer nano-Elektrospray-Ionisation (ESI)-Quelle ausgestattet und an ein nano-HPLC-System gekoppelt sind. In Tabelle 3.7 sind einige massenspektrometrischen Parameter der verwendeten ESI-MS/MS-Systeme aufgeführt. Es wurde ein Top20 datenabhängiger Modus verwendet. Ionen mit einfacher und >dreifacher Ladung wurden von der Fragmentierung ausgeschlossen. Die 20 intensivsten Signale des Übersichtsscans wurden ausgewählt, isoliert und erneut fragmentiert.

Tabelle 3.7 Parameter für die ESI-MS/MS-Analyse.

Parameter	Orbitrap Elite	Q Exactive Plus
Spray Spannung	1,4 kV	1,4 kV
Temperatur der Ionentransferkapillare	275 °C	250°C
Druck des Kollisionsgases (Helium)	1,3 mTorr	-
Normalisierte Kollisionsenergie	35%	30%
MS Scan Bereich	350-1 700 m/z	250-2 000 m/z
MS Auflösung	60 000	70 000
Isolationsfenster	2 m/z	2 m/z
MS/MS Scan-Bereich	150-2 000 m/z	200-2 000 m/z
MS/MS Scantyp/Auflösung	Modus: normal	17 500
Schwellenwert der Intensität für die MS/MS Auswahl	500 counts	0
Ausschlusszeit eines Ions nach Aufnahme eines MS/MS-Spektrums	45 Sek.	10 Sek.
Fragmentierungsmethode	CID	HCD

3.8 Bioinformatische Datenanalyse

3.8.1 Quantifizierung der Neuritenlänge und Bestimmung der Zellzahl

Für die Quantifizierung der Neuritenlänge wurde das Verhältnis von Zelllänge zu Zellbreite bestimmt, indem Bildaufnahmen der SH-SY5Y-Zellen mithilfe des Programmes ImageJ (Version 1.51s) vermessen wurden. Hierbei wurde eine Gesamtzahl von 40 Zellen ausgewertet und die Ergebnisse als Mittelwerte, +/- deren Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte über eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Vergleichstest nach Tukey.

Die Zellzahl eines definierten Bereiches wurde über ImageJ mit dem PlugIn CellCounter bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert +/- die Standardabweichung der Zellzahl von 500mm². Mittels zweifaktorieller Varianzanalyse wurde überprüft, ob es durch Retinsäurebehandlung oder Co-Behandlung mit BHA bzw. NAC, zu signifikanten Unterschieden gekommen ist.

3.8.2 Ratiometrische Auswertung konfokalmikroskopischer Aufnahmen

Um die ratiometrischen Veränderungen der Sensorproteine (3.4) zu analysieren, wurden die Zeiss LSM-Dateien der konfokalmikroskopischen Aufnahmen mittels des Programms *Redox Ratio Analysis* (Fricker, 2016) im *basic batch process* ausgewertet. Die Aufnahmen wurden auf die Autofluoreszenz der Zellen und den Hintergrund korrigiert. Die Darstellung der Signale bei 405 nm/535nm und 485 nm/535nm erfolgte über die Ratio $((405 \text{ nm}/535\text{nm})/((485 \text{ nm}/535\text{nm}))$, welches das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Sensor beschreibt. Basierend auf diesen Ratios beinhaltet die statistische Auswertung die Berechnung des geometrischen Mittelwertes, deren Standardabweichung und einem Student t-Test auf Signifikanz ($n=10$, $p\text{-Wert} \leq 0,001$). Der dynamische Bereich des Sensorproteins entspricht der Differenz zwischen maximaler (H₂O₂-behandelt) und minimaler (DTT-behandelt) gemessener Intensitäts-Ratio.

3.8.3 Ratiometrische Auswertung der Fluoreszenzdaten

Die Datenausgabe des DTX 880 Multimode Detektors erfolgte als XLS-Format, welches weiter in Excel 2007 (MS Office, Microsoft, Redmond, USA) bearbeitet wurde. Die erhobenen Werte beider Fluoreszenzkanäle wurden zunächst auf die Autofluoreszenz von Wildtyp SH-SY5Y-Zellen normalisiert und anschließend die Ratio 405 nm/535nm zu 485 nm/535nm bestimmt. Die Ratios wurden gemittelt, deren Standardabweichung berechnet sowie die statistische Signifikanz über einen Student t-Test bzw. eine Varianzanalyse bestimmt.

3.8.4 Massenspektrometrische Proteinidentifizierung

Für die Peptididentifizierung, Proteinidentifizierung und Quantifizierung, wurden im Rahmen der Proteomanalysen die generierten .raw Dateien mithilfe des Programmes MaxQuant und der implementierten Suchmaschine Andromeda prozessiert (Max Planck Institut für Biochemie, Planegg, DE; Tabelle 3.8). Hierfür wurden, wenn nicht anders angegeben, die voreingestellten Parameter verwendet. Die Angaben der verwendeten Programmversion sowie das Datum der verwendeten Datenbankeinträge aus der SwissProt KB (*homo sapiens*) sind in Tabelle 3.8 aufgelistet. Für die Quantifizierung wurden die in MaxQuant implementierte LFQ-Methode oder die SILAC-Markierung genutzt.

Tabelle 3.8 Übersicht der massenspektrometrischen Proteomanalyse.

Bei den durch Andromeda verwendeten Datenbanken handelt es sich stets um die *homo sapiens* UniProt/SwissProt Datenbank ohne Trembl-Einträge. Die Anzahl der Sequenzeinträge steht in Klammern.

Studie	Massenspektrometer	MaxQuant Version	Datenbank
120 Std.-Proteom	Q Exactive Plus	1.5.3.30	07.03.2016 (20 197)
RA-Zeitreihe	Orbitrap Elite	1.4.1.2	19.11.2013 (20 183)
Redox-Proteom	Q Exactive Plus	1.5.3.30	07.03.2016 (20 197)
Kandidaten Validierung	Orbitrap Elite	1.5.3.30	07.03.2016 (20 197)
Wirkstoff-Studie	Q Exactive Plus	1.5.0.30	26.11.2014 (20 183)

3.9 Quantitative Auswertung massenspektrometrischer Daten

3.9.1 Aufarbeitung der Daten

Für alle durchgeführten Proteomanalysen wurde eine Qualitätskontrolle durchgeführt, welche die folgenden Schritte beinhaltet: (1) Der *total ion current* (TIC) der Einzelmessungen soll, als Maßstab für die geladene Menge an Peptiden, über alle Messungen in einem gleichen Größenbereich liegen. (2) Die Anzahl aufgenommener MS- und MS/MS-Spektren innerhalb einer Studie sollen maximal eine Abweichung von 10% des jeweiligen Mittelwertes über alle Läufe zeigen. (3) Mithilfe des R-Skriptes PTXQC v.0.92.1 (Bielow, Mastrobuoni, & Kempa, 2016) wurden die Studien hinsichtlich der Probenvorbereitung, Chromatographie und Leistung des Massenspektrometers überprüft. Dieses diente insbesondere dazu, den Abgleich der Retentionszeiten und die Übertragung des Identifikators (ID) zu

kontrollieren (Anhang 6, Abbildung 6.1). (4) Die generierten Proteinlisten wurden in das Programm Perseus (Max Planck Institut für Biochemie, Planegg, DE) importiert und logarithmiert (Cox et al., 2014). (5) Wenn nicht anders angegeben wurde nach folgenden Kriterien gefiltert: Entfernung der *reverse* Einträge, der Identifizierungen *by site* sowie potenzieller Kontaminanten (MaxQuant Kontaminanten Liste 1.5.0.30 (Varjosalo et al., 2013)). (6) Wenn nicht anders angegeben, wurden nur Proteinidentifizierungen zugelassen, die in mindestens vier von fünf bzw. fünf von sechs Replikaten innerhalb einer Gruppe identifiziert wurden.

Bei der für die Quantifizierung genutzten LFQ-Methode wird, vereinfacht dargestellt, zunächst für jedes Protein die Ratio der Peptidintensitäten zwischen zwei Proben berechnet. Dabei werden nur diese Peptidspezies betrachtet, die in beiden Proben vorkommen. Folgend wird die paarweise Protein-Ratio aus allen Peptiden gebildet. Als vorgegebener Parameter wird von MaxQuant eine minimale Anzahl von zwei Peptid-Ratios angegeben, um ein Protein als zuverlässig identifiziert anzugeben. Werden diese zwei gemeinsamen Peptidspezies nicht identifiziert ist der Ausgabewert Null und wird als fehlender Wert bezeichnet. Das Programm Perseus bietet die Möglichkeit fehlende Werte innerhalb einer Gruppe, mit Werten aus einer Normalverteilung aufzufüllen. Dies erfolgte in den hier durchgeführten Studien mit den Parametern: *width*=0,3 und *down shift*=1,8 (Cox et al., 2014). Zugunsten der Statistik wurde mit Proteingruppen, die in einem der Behandlungszustände keinen Wert aufwiesen gleichermaßen verfahren. Dies konnte dazu führen, dass Daten für ein Protein eingefügt wurden, welches tatsächlich nicht in der Zelle vorlag. Ein Protein mit diesem Kriterium könnte biologisch jedoch interessant sein und wurde daher nicht aus statistischen Gründen aus der Analyse herausgenommen. Die statistischen Auswertungen erfolgten, wenn nicht anders angegeben mit den Programmen Perseus Version 1.5.3.1 (Tabelle 3.8), R (Version 3.2.0, 3.2.3 und 3.4.2, GNU GPL, www-r-project.org) sowie Excel 2007 und 2010 (MS Office, Microsoft, Redmond, USA). Detaillierte Angaben erfolgen in den Abschnitten für die entsprechenden Studien.

3.9.2 Proteomstudie 120 Std.-Proteom

In der Studie 120 Std.-Proteom wurde ein differenzieller Vergleich von drei Gruppen durchgeführt (n=6): Zellen in unbehandeltem Zustand zu dem Zeitpunkt Null Stunden (0 Std.), nach 120 Std. Behandlung mit Retinsäure (120 Std. RA) und nach 120 Std. unter Kontrollbedingungen (120 Std. EtOH). Es wurden folgende Parameter während der Proteinidentifizierung berücksichtigt, konstante Modifizierung: Carbamidomethylierung (m/z = 57,021), variable Modifizierung: Methionin Oxidation (m/z = 15,9949) und N-terminale Proteinacetylierung (m/z = 42,0106), die *match between runs*-Funktion wurde aktiviert. Die statistische Auswertung erfolgte über eine Varianzanalyse, mit anschließendem multiplen Vergleichstest nach Tukey. Für die Beherrschung multipler Testprobleme wurde eine Korrektur nach Benjamini-Hochberg durchgeführt. Bei einem korrigierten p-Wert $\leq 0,05$

wurden die Unterschiede als signifikant angesehen. Die Zuordnung einzelner Proteine zu Retinsäure-abhängigen Prozessen erfolgte anhand der in Tabelle 3.9 dargestellten GO-Kategorien

Tabelle 3.9 Zuordnung zu Retinsäure-abhängigen Prozessen anhand der GO-Kategorien.

GO-Kategorie	Anzahl assoziierter Proteine in der Studie 120Std.-Proteom
Biological process	
Retinoic acid biosynthetic process	2
Retinoic acid catabolic process	1
Retinoic acid metabolic process	5
Retinoic acid receptor signaling pathway	6
Retinoid metabolic process	11
Retinol metabolic process	3
Retinol transport	1
Molecular function	
Retinoic acid 4-hydroxylase activity	1
Retinoic acid binding	4
Retinoic acid receptor binding	3
Retinoid binding	6
Retinol binding	3
Retinol dehydrogenase activity	1
Retinol metabolism	5

a KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

3.9.3 Vergleich der Proteom- mit Transkriptomdaten

Die Transkriptomdaten wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Köhrer zur Verfügung gestellt (GTL, BMFZ, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, DE). Für den Vergleich wurden folgende quantitative Daten verwendet: Proteom: LFQ-Werte der Studie 120Std.-Proteom aus der Gruppe 120Std. RA und 120Std. EtOH, diese wurden wie zuvor beschrieben aufbereitet. Transkriptom: log₁₀ RPKM (*reads per kilobase million*), es wurden nur Einträge zugelassen, die in mindestens drei von drei Replikaten vorhanden waren. Die Einträge der Proteom- und Transkriptomdatensätze wurden anhand der UniProt IDs verknüpft. Für die Korrelationsanalyse nach Pearson wurden die 2771 gemeinsamen Dateneinträge isoliert und die Einträge mit einer differentiellen Abundanz basierend auf den Proteomdaten (n=80) sowie die verbleibenden Einträge (n=2691) getrennt betrachtet. Die 2D-Anreicherung der Annotationen wurde basierend auf den Differenzen der mittleren Intensitäten von Retinsäure- und Kontrollproben berechnet. Bei einem p-Wert ≤0,02 wurden die Kategorien als angereichert angesehen. Die Auswertung wurde mithilfe des Programmes Perseus 1.6.0.7 durchgeführt.

3.9.4 Proteomstudie RA-Zeitreihe

Für die Darstellung des zeitlichen Retinsäure-Effekts wurden die SH-SY5Y-Zellen zu dem Zeitpunkt 0 Std. mit der Lösungsmittelkontrolle EtOH und zu vier weiteren Zeitpunkten, 1 Std., 3 Std., 8 Std. und 48 Std., mit Retinsäure oder EtOH behandelt ($n=5$). Die Proteinidentifizierung erfolgte wie für die Studie 120 Std.-Proteom beschrieben. Die statistische Auswertung erfolgte über eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Faktor 1: Behandlung, Faktor 2: Zeit), mit anschließendem Vergleichstest nach Tukey sowie einer Korrektur nach Benjamini-Hochberg. Bei einem korrigierten p -Wert $\leq 0,05$ wurden die Unterschiede als signifikant angesehen.

3.9.5 Redox-Proteomstudie

Für die redox-spezifische differenzielle Proteomanalyse von SH-SY5Y-Zellen wurden diese mit Retinsäure, Diamid und EtOH behandelt und unter zwei verschiedenen Bedingungen aufgeschlossen (Tabelle 3.10).

Tabelle 3.10 Redox-Proteom: Methodische Übersicht.

Angegeben sind die für die redox-spezifische Proteomanalyse verwendeten Behandlungen und Lysebedingungen, $n=5$.

Datensatz	Behandlung	Lysepuffer	Anmerkung
Diamid	Diamid EtOH	NEM	Reversibel oxidiert
Cys _{ox} -TPS	Retinsäure EtOH	NEM	Reversibel oxidiert
Thiol-TPS	Retinsäure EtOH	DTT	Vollständig reduziert

Als Suchparameter für die Proteinidentifizierung wurden als variable Modifizierungen Carbamidomethylierung und NEM-Modifizierung ($m/z=125,0467$) an Cysteinresten sowie die Oxidation am Methionin verwendet. Die maximale Anzahl Modifizierungen pro Peptid betrug vier. Die drei Datensätze wurden als unterschiedliche Parametergruppen betrachtet und somit getrennt voneinander normalisiert. Zusätzlich zu den in 3.8.4 aufgeführten Filterschritten wurden im Laufe der statistischen Auswertung der über die TPS-Matrix aufgearbeiteten Proben, alle nicht-Cystein tragenden Proteine entfernt (R-Skript, MPL). Wurden innerhalb einer Gruppe mehr als drei Werte aufgefüllt, sind diese Proteine entsprechend gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte über die *significance analysis of microarrays* (SAM)-Methode, mit einem konstanten $S_0=0,1$ und einer *false discovery rate* (FDR) von 0,05 (5%). Das Repliket EtOH-5 der Thiol-TPS-Proben zeigte in wiederholten Messungen eine stark abweichende mittlere Intensität. Daher wurde dieses Repliket aus der Analyse ausgeschlossen (Anhang 6, Abbildung 6.2). Der Vergleich der Anzahl Cysteine/Protein erfolgte mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test in R.

3.9.5.1 Differenzielle Analyse der carbamidomethylierten Peptide

Es wurden nur Modifizierungen berücksichtigt, die eine Lokalisierungswahrscheinlichkeit $>0,75$ haben und in mindestens vier von fünf Replikaten in einer Gruppe identifiziert wurden. Irreversible Oxidationsformen (z.B. Sulfin- oder Sulfonsäuren) wurden mit den eingestellten Suchparametern nicht gesondert betrachtet. Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften von Iodacetamid und NEM wurde für die Betrachtung einzelner Cysteine im Folgenden die normalisierte Intensität der carbamidomethylierten Peptide herangezogen. Die Intensitäten der carbamidomethylierten Peptide wurden auf die mittlere LFQ-Intensität des jeweiligen Proteins innerhalb der Gruppe normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgte über die *significance of microarrays* (SAM)-Methode, bei einer FDR = 0,05 und einem S0-Wert = 0,05.

3.9.5.2 Kandidaten-Validierung der redox-spezifischen Proteomanalyse

Die Behandlung der auf SILAC-Medium kultivierten SH-SY5Y-Zellen erfolgte mit Retinsäure bzw. EtOH (n=5). Die redox-spezifische Aufarbeitung (3.6) und die Suchparameter für die Proteinidentifizierung (3.9.5) geschah wie zuvor beschrieben. Die Quantifizierung über SILAC erfolgte nach den folgenden Parametern: Typ: Standard, Multiplizität = 2: schwere Isotopen Markierung: L-Arg+10, L-Lys+4. Maximale Anzahl markierter Aminosäuren pro Peptid: 3. Bei den Ratios handelt es sich um die Ratios Leicht/Schwer ($R_{L/S}$), welche \log_2 transformiert wurden. Es wurden nur Proteinidentifizierungen zugelassen, die in mindestens drei der fünf Replikate einer Gruppe identifiziert wurden.

3.9.6 Proteomstudie Wirkstoff-Studie

Die im Rahmen der Wirkstoff-Studie durchgeführten Behandlungen mit Retinsäure bzw. EtOH und den Wirkstoffen NAC bzw. BHA sind in Tabelle 3.11 aufgeführt. Die Proteinidentifizierung erfolgte wie zuvor für die Studie 120 Std.-Proteom beschrieben. Wurden innerhalb einer Gruppe mehr als drei Werte aufgefüllt, sind diese Proteine entsprechend gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte über eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Faktor 1: Retinsäurebehandlung- oder Kontrolle, Faktor 2: Wirkstoff-Behandlung), mit anschließendem Vergleichstest nach Tukey sowie einer Korrektur nach Benjamini-Hochberg. Bei einem korrigierten p-Wert $\leq 0,05$ wurden die Unterschiede als signifikant angesehen.

Tabelle 3.11 Wirkstoff-Studie: Methodische Übersicht.

Angabe sind die verwendeten Behandlungskombinationen, n = 5. NAC: N-Acetylcystein, BHA: Butylhydroxyanisol

#	Behandlung	Wirkstoff
1	EtOH	EtOH
2	Retinsäure	EtOH
3	Retinsäure	NAC
4	EtOH	NAC
5	Retinsäure	BHA
6	EtOH	BHA

Der Effekt der Wirkstoffe NAC und BHA auf die Abundanz der Proteine wurde anhand der folgenden Kriterien in einen direkten und indirekten Effekt unterteilt. Direkter Wirkstoff-Effekt: (1) signifikant unterschiedliche Abundanz zwischen Retinsäurebehandlung- und Kontrolle, (2) signifikant unterschiedliche Abundanz zwischen Retinsäure+Wirkstoff und Retinsäurebehandlung. Indirekter Wirkstoff-Effekt: (1) kein signifikanter Unterschied zwischen Retinsäure und Kontrolle und (2) signifikanter Unterschied zwischen Retinsäure und Wirkstoff. Die angegebenen Ratios berechnen sich aus den gemittelten LFQ-Intensitäten aller Replikate.

3.9.7 Hauptkomponentenanalyse und Hierarchisches Cluster

Die Analysen wurden basierend auf den nicht aufgefüllten log₂ LFQ-Intensitäten berechnet (Perseus). Bei der Hauptkomponentenanalyse wurden nur diese Proteingruppen mit aufgenommen, die einen Eintrag in jeder experimentellen Gruppe, in jedem Replikat aufwiesen. Das euklidische Cluster der experimentellen Gruppen und quantifizierten Proteingruppen erfolgte über die Mittelwerte.

3.9.8 Soft cluster-Analyse

Um den Zusammenhang zwischen Zeit und Behandlung der RA-Zeitreihe zu visualisieren, wurde eine *fuzzy c-mean* Clusteranalyse mit dem M-Fuzz Package (Version 2.38.0) in Bioconductor (Version 3.6), durchgeführt (Huber et al., 2015; Kumar & E Futschik, 2007). Die Cluster wurden basierend auf den log₂ LFQ-Intensitäten der Proteine erstellt, welche in retinsäurebehandelten Zellen quantifiziert wurden. Diese wurden wie zuvor beschrieben aufgefüllt und im Rahmen der Clusteranalyse normalisiert. Es wurden neun verschiedene Cluster mit einem $m1 = 2,03$ (*fuzzification*-Parameter) erstellt.

3.9.9 Anreicherungsanalysen, Visualisierung von Signalwegen und Netzwerken

Die Anreicherungsanalysen erfolgten mithilfe verschiedener Strategien. Diesen zugrunde liegt die Zuordnung der GO-Kategorien zu den identifizierten Proteinen.

Die Analyse der Kategorie biologische Prozesse (BP) erfolgte über das Programm Cytoscape (<http://www.cytoscape.org>) und dem PlugIn ClueGO mit der Erweiterung CluePedia (<http://www.ici.upmc.fr/cluego/>). Die GOBP-Annotierungen wurden am 05.10.2017 aktualisiert. Die Parameter wurden wie folgt gesetzt: Benjamini-Hochberg korrigierter p-Wert $\leq 0,01$, Netzwerk Spezifität „Medium“, GO-Kategorie Begrenzung „*min level = 3*“, „*max level = 8*“, „*min percentage = 4,0*“. Die GO-Kategorien wurden fusioniert, gruppiert und über einen Kappa Score $\geq 0,4$ begrenzt. Als Hintergrunddatensatz diente jeweils die gesamte Menge der identifizierten Proteine des entsprechenden Datensatzes.

Die Anreicherungsanalyse innerhalb der Cluster erfolgte über einen exakten Test nach Fisher (Benjamini-Hochberg korrigierter p-Wert $\leq 0,05$, Perseus Version 1.6.0.7). Bei diesem bezieht sich eine Anreicherung auf die Anzahl der Proteine, welche zu einer Kategorie gezählt werden, nicht aber auf die Abundanzunterschiede.

Bei der angewendeten eindimensionalen (1D)-Anreicherungsanalyse werden die Proteine anhand ihrer GO-Kategorien gruppiert und es wird überprüft, ob die dazugehörigen Proteinabundanzen in einer Gruppe bevorzugt größer oder kleiner sind als die globale Verteilung der Abundanzen (Cox & Mann, 2012). Die Berechnung wurde basierend auf den Differenzen der gemittelten \log_2 LFQ-Intensitäten (Retinsäurebehandlung gegen Kontrolle) mit dem Programm Perseus (Version 1.6.0.7) durchgeführt. Als Grenze für die Ausgabe angereicherter GO-Kategorien wurde ein Benjamini-Hochberg korrigierter p-Wert $\leq 0,01$ gesetzt.

Die Netzwerkanalyse der Proteingruppen aus der Wirkstoff-Studie und dem Redox-Proteom erfolgte mit dem online Programm String (<http://string-db.org>; Version 10.5 (Snel, Lehmann, Bork, & Huynen, 2000)). Als Quelle für die angegebenen Interaktionen, wurden experimentelle Daten und häufige gemeinsame Erwähnungen in Fachpublikationen zugelassen. Dargestellt sind Proteine, die mindestens eine Verknüpfung zu einem weiteren Protein aufweisen.

3.9.10 Venn-Analyse

Venn-Analysen wurden über die Webseite der Bioinformatics & Evolutionary Genomics (VIB, Gent, Belgien) mit den zur Quantifizierung genutzten Proteinen durchgeführt.

4. Ergebnisse

Mithilfe der Proteomanalyse wurden im Rahmen dieser Arbeit die molekularen Auswirkungen von oxidativen Veränderungen während der frühen Zeitpunkte der neuronalen Differenzierung untersucht. Als Modellsystem diente die humane Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y, welche durch die Zugabe von Retinsäure innerhalb von fünf bis sieben Tagen in einen neuronähnlichen Zelltyp übergeht. Um zu überprüfen, ob sich das gewählte Modellsystem für die geplanten redox-spezifischen Proteomstudien eignet, wurde dieses zunächst detailliert charakterisiert. Diese Charakterisierung beinhaltete die mikroskopische Betrachtung der Zellmorphologie und quantitative Analysen des Proteoms (4.1 und 4.2) sowie die Detektion von RS (4.3). Darauf aufbauend wurde eine Analyse redox-spezifischer Veränderungen des Proteoms durchgeführt (4.4) und schließlich untersucht, wie sich Veränderungen des zellulären Redoxzustandes auf die neuronale Differenzierung auswirken (4.5).

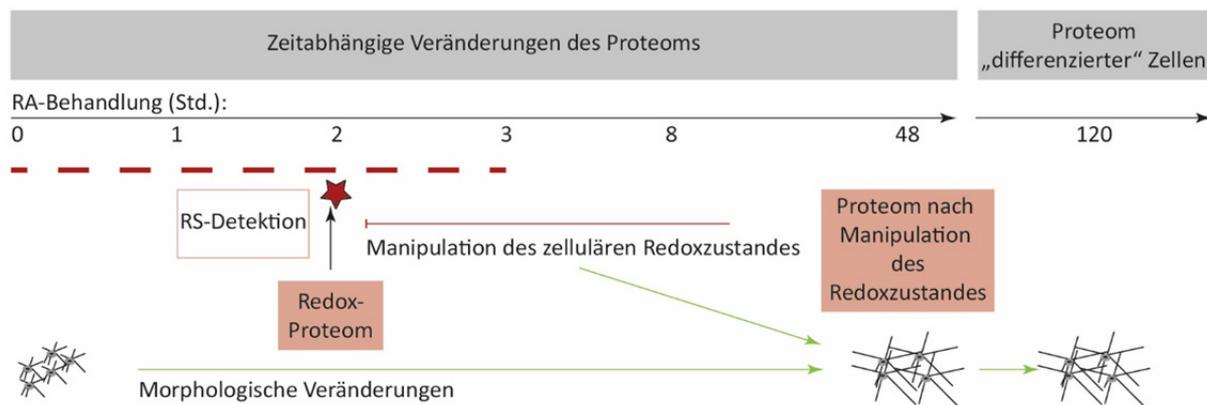


Abbildung 4.1 Projektübersicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss reaktiver Spezies (RS) bei der Retinsäure (RA)-induzierten neuronalen Differenzierung der humanen Zelllinie SH-SY5Y untersucht. Zu diesem Zweck wurde zunächst der Effekt der RA-Behandlung betrachtet und schließlich die Veränderungen untersucht, welche auf entstandene reaktive Spezies zurückgeführt werden können.

4.1 Mikroskopische Betrachtung der Zellmorphologie

Zunächst wurde überprüft, ob die SH-SY5Y-Zellen mit den bereits bekannten Veränderungen der Zellmorphologie auf das verwendete Differenzierungsprotokoll reagieren. Die Behandlung mit Retinsäure führte innerhalb von 48 Std. zu einer zweifachen Zunahme der Neuritenlänge verglichen zu der Kontrolle (ermittelt über die Ratio Zelllänge/Zellbreite; $p = 5,3 \times 10^{-11}$). Ein Vergleich zwischen den Zeitpunkten 48 Std. und 120 Std. zeigte keine weitere Veränderung (Abbildung 4.2A und B). Die Zytotoxizität von Retinsäure und der Lösungsmittelkontrolle EtOH wurde mittels Laktat-Dehydrogenase-Zytotoxizitätstest überprüft. Die Sterberate der Zellen lag nach 120 Std. Retinsäurebehandlung bei 9,7% und nach 120 Std. EtOH-Behandlung bei 8,6%. Es konnte kein signifikanter Unterschied zu der Sterberate in dem Kulturmedium (9,4%) festgestellt werden (Abbildung 4.2C).

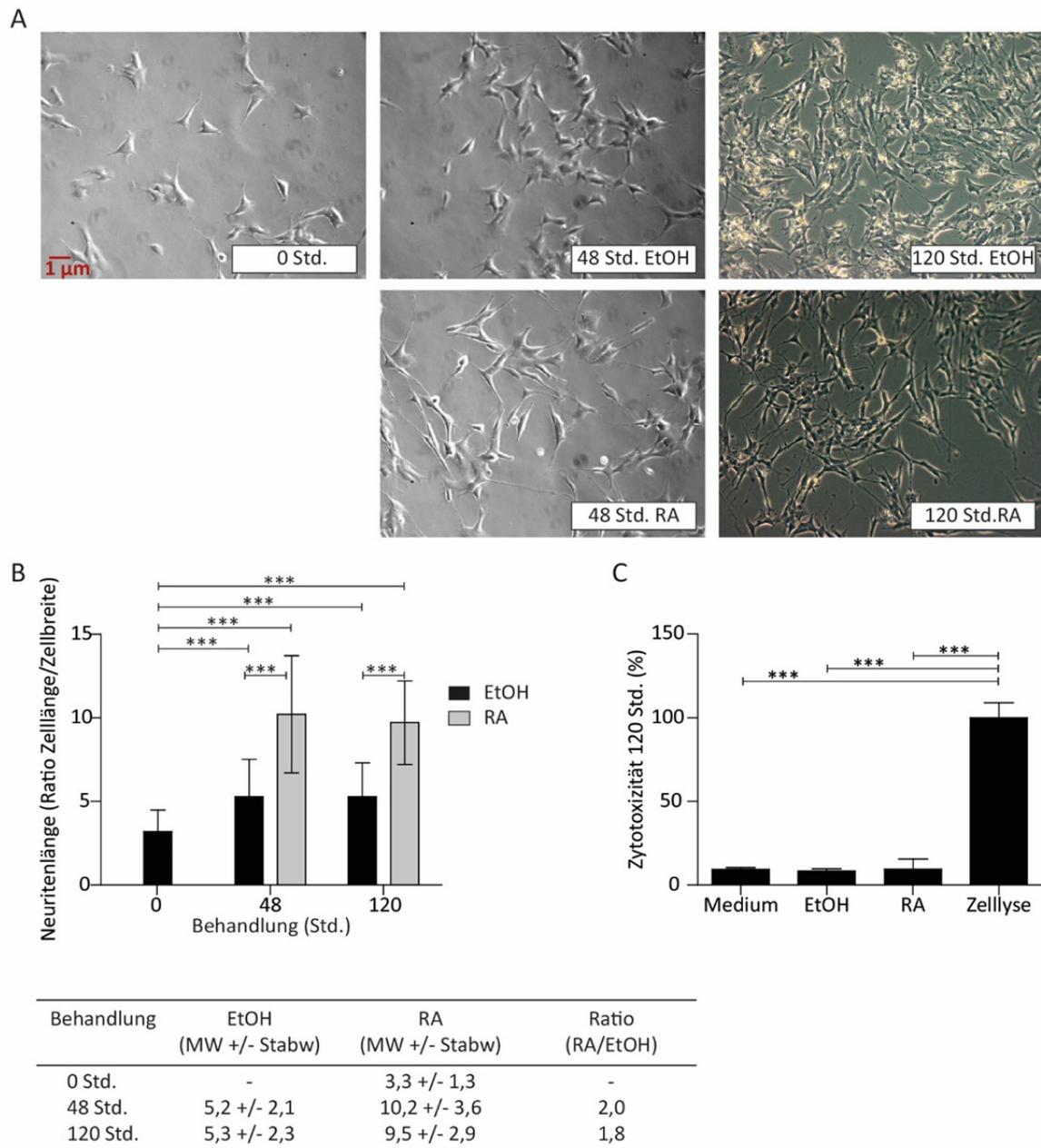


Abbildung 4.2 Zellmorphologie der Retinsäure behandelten Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y.

(A) Mikroskopische Aufnahmen der verwendeten SH-SY5Y-Zelllinie (B) die nach 48 Std. und 120 Std. Behandlung mit 10 μ M Retinsäure (RA) eine signifikante Erhöhung der Neuritenlänge (Ratio Zelllänge/Zellbreite) gegenüber der Kontrolle (EtOH) und dem Zeitpunkt 0 Std. zeigten. Für die Quantifizierung wurden jeweils 40 Zellen vermessen. (C) Die Sterberate der Zellen lag unter 10%. Dargestellt ist der Mittelwert +/- die Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte über eine zweifaktorielle (B) und einfaktorielle (C) Varianzanalyse mit anschließendem Tukey Vergleichstest. Die Sterne *** markieren einen p-Wert $\leq 0,001$.

4.2 Differenzielle Proteomstudien retinsäurebehandelter SH-SY5Y-Zellen

Die Extension der Neuritenlänge ist ein wichtiger morphologischer Indikator für eine Induktion des neuronalen Differenzierungsprozesses in dem Modellsystem. Einen weiteren Hinweis gibt die veränderte Expression von Komponenten des Retinsäure-Signalweges und verschiedenen Markerproteinen. Obgleich es sich um ein sehr gut charakterisiertes Modellsystem handelt, wurden insbesondere Veränderungen in der Gentranskription der Zellen beschrieben und nur wenige globale Proteomstudien durchgeführt. Bis zu diesem Zeitpunkt umfasste dies Proteomstudien, welche die 2D-DIGE-Analytik verwendeten oder die molekularen Auswirkungen einer Co-Behandlung mit NGF bzw. BDNF untersuchten (Cimmino et al., 2007; Emdal et al., 2015; Gilany et al., 2008; Jimmy Rodriguez Murillo, 2017; Sitek et al., 2005). Um nachfolgend Hinweise auf globale Veränderungen der Proteine zu gewinnen, die durch die neuronale Differenzierung hervorgerufen werden, wurden differenzielle Proteomanalysen mit retinsäurebehandelten Zellen und Kontrollzellen durchgeführt. Abbildung 4.3 zeigt eine Skizze des Standard-Arbeitsablaufs für die sogenannte *bottom-up*-Analyse komplexer Lysate.

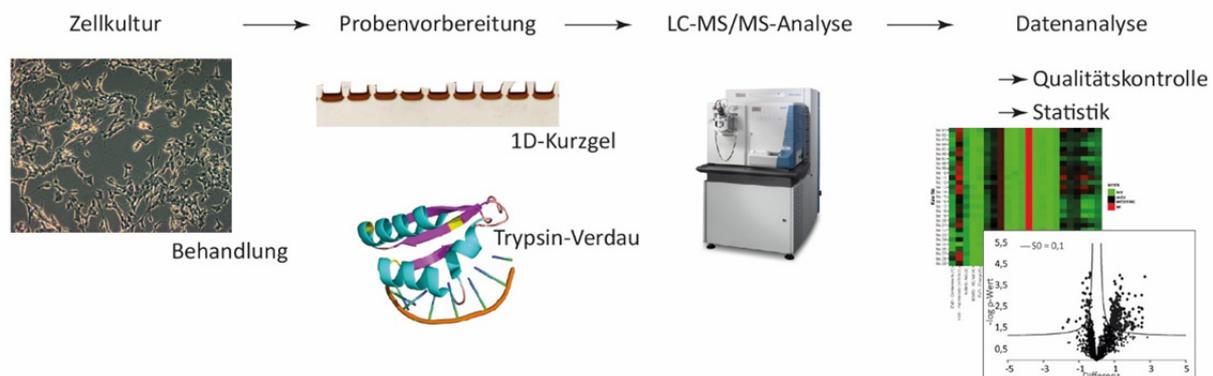


Abbildung 4.3 Arbeitsablauf für die Probenvorbereitung der Proteomanalyse.

Zunächst wurden die SH-SY5Y-Zellen für die angegebene Zeitdauer mit Retinsäure oder dem entsprechenden Kontrollreagenz behandelt. Die Probenvorbereitung erfolgte über eine SDS-PAGE im Bereich des Sammelgels mit anschließendem Trypsinverdau. Nach der LC-MS/MS-Analytik wurde die Datenanalyse durchgeführt. Diese beinhaltete standardmäßig eine Qualitätskontrolle sowie eine statistische Aufarbeitung der Daten (3.9).

4.2.1 Proteomanalyse nach 120 Std. Behandlung

Eine neuronale Differenzierung der SH-SY5Y-Zellen findet nach vier bis acht Tagen Retinsäurebehandlung statt (da Frota Junior et al., 2011; Encinas et al., 2000). Für einen differenziellen Vergleich wurden daher Zellen in unbehandeltem Zustand zu dem Zeitpunkt 0Std. (0Std.), nach 120Std. Behandlung mit 10 μ M Retinsäure (120Std.RA) und nach 120Std. unter Kontrollbedingungen (120Std. EtOH) verwendet (n = 6; Abbildung 4.4). Die Studie wird im Folgenden als 120Std.-Proteom bezeichnet.

Mittels Massenspektrometrie konnten insgesamt 3 935 Proteine identifiziert und für 2 771 Proteine quantitative Daten erhoben werden. Nach 120 Std. Zellkultivierung stieg die Anzahl der quantifizierten Proteine um 9%, sowohl in den retinsäurebehandelten als auch in den Kontrollzellen (Abbildung 4.4A). Die Anzahl der exklusiv vorkommenden Proteine in jeder Gruppe lag unter 5%. Die hierarchische Clusteranalyse zeigte, dass sich die drei Behandlungszustände mit Ausnahme eines Replikates (120 Std. RA 3) voneinander abgrenzten und die Behandlungsdauer einen größeren Einfluss auf das Proteom hatte als die Retinsäurebehandlung (Abbildung 4.4B). Ein Vergleich der Kontrollproben zu den Zeitpunkten 0 Std. und 120 Std. zeigte, dass die Abundanz von 860 Proteinen (31% der gesamt quantifizierten Proteine) signifikant durch die Kultivierungszeit beeinflusst wurde.

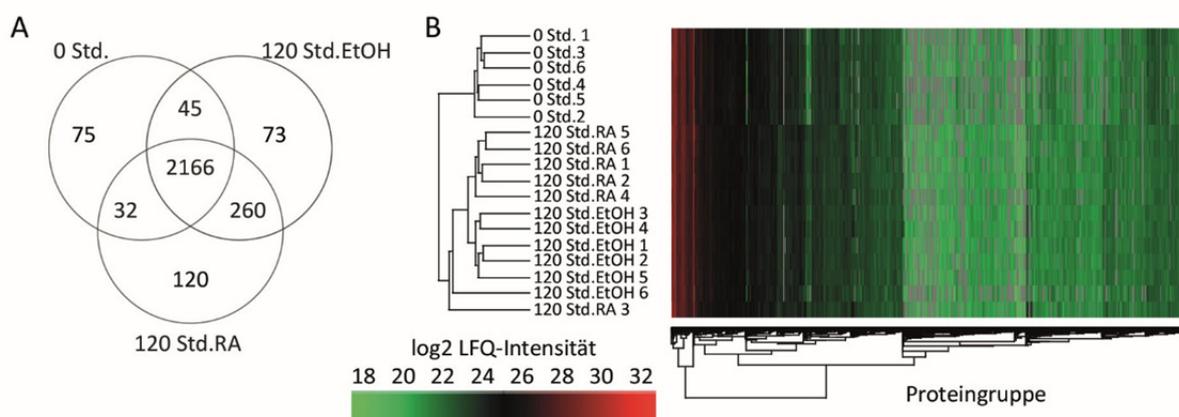


Abbildung 4.4 Retinsäure-induzierte Veränderungen des Proteoms nach 120 Std. Behandlung.

Die Differenzielle und quantitative Analyse umfasste Retinsäure (RA)-behandelte und Kontrollzellen (EtOH) zu den Zeitpunkten 0 Std. und 120 Std. (A) Mittels eines Venn-Diagramms werden die Anzahl sowie die Verteilung der 2 771 quantifizierten Proteine innerhalb der drei Probensets dargestellt. (B) Die Proteine gruppieren in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und der Behandlung. Dies ist mithilfe einer hierarchischen euklidischen Clusteranalyse dargestellt.

Um festzustellen, ob es infolge des angewandten Differenzierungsprotokolls zu veränderten Abundanzen von bekannten neuronalen Markerproteinen kommt, wurde ein paarweiser Vergleich der Gruppen 120 Std. RA und 120 Std. EtOH durchgeführt. Dieser ergab zunächst, dass die Abundanz von 48 Proteinen durch die Retinsäurebehandlung erhöht und von 32 verringert wurde (Anhang 6, Tabelle 6.1). Zu den Proteinen mit der stärksten Abundanzveränderung zählen unter anderem die bekannten Markerproteine *neural cell adhesion molecule-2* (NCAM2) und *elastin microfibril interfacelocated protein-1* (EMILIN1; Abbildung 4.5A; Singh and Kaur 2007, Jimmy Rodriguez Murillo 2017). Ein Anstieg des zytoskelettalen Markerproteins *microtubule-associated protein-2* (MAP2) wurde nicht detektiert (Abbildung 4.5). Sowohl in retinsäurebehandelten als auch in den Kontrollzellen wurde *tubulin β -3 chain* (TUBB3) nachgewiesen (Abbildung 4.5B), ein Marker für die neuronale Abstammung der Zelllinie (Constantinescu, Constantinescu, Reichmann, & Janetzky, 2007; Katsetos, Legido, Perentes, & Mork, 2003).

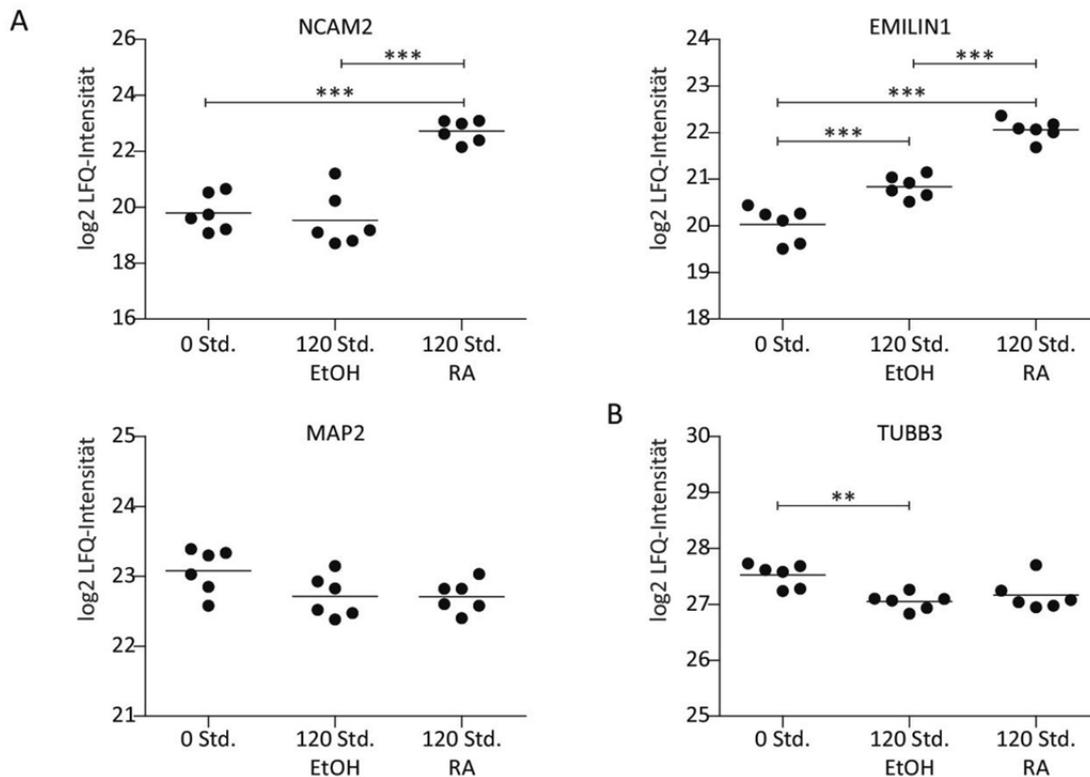


Abbildung 4.5 Quantifizierung bekannter Markerproteine nach 120 Std. Retinsäurebehandlung.

(A) Abundanz der neuronalen Markerproteine *neural cell adhesion molecule-2* (NCAM2), *elastin microfibril interface-located protein-1* (EMILIN1) und *microtubule-associated protein-2* (MAP2) sowie (B) *tubulin β -3 chain* (TUBB3) als Marker für eine neuronale Abstammung. Darstellung der log₂ LFQ-Intensitäten aller Replikate, gekennzeichnet ist der Mittelwert. Die statistische Auswertung erfolgte über eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Vergleichstest nach Tukey sowie einer Korrektur nach Benjamini-Hochberg. Die Sterne markieren einen p-Wert $** \leq 0,01$ und $*** \leq 0,001$.

Nachfolgend wurde überprüft ob durch die Retinsäurebehandlung die Abundanz von Komponenten des klassischen Retinsäure-Signalweges verändert wurde und ob es zu einer Anreicherung von Proteinen kommt, welche mit neuronalen Kategorien assoziiert sind. Zu diesem Zweck wurden die 48 Proteine mit einer signifikant erhöhten Abundanz hinsichtlich einer Anreicherung von assoziierten biologischen Prozessen (GO-Kategorie *biological process*/GOBP) analysiert. Dies erfolgte vor dem Hintergrund der gesamt quantifizierten Proteine der Studie mithilfe des Programms Cytoscape und des PlugIn ClueGO/CluePedia (3.9). Die Analyse zeigte, dass sowohl Proteine der GO-Kategorie *retinoid metabolic process* ($p = 9,8 \times 10^{-4}$) angereichert sind als auch Proteine welche mit GO-Kategorien assoziiert sind, die verschiedene neuronale Entwicklungsprozesse beschreiben (Tabelle 4.1B). Neben den in Tabelle 4.1B dargestellten Proteinen wurden innerhalb der 2 771 Proteine 29 weitere Proteine quantifiziert die, basierend auf spezifischen GO-Kategorien (Tabelle 3.9), mit Retinsäure-abhängigen Prozessen in Verbindung gebracht werden konnten. Darunter Retinsäure-bindende Proteine (z.B. CRABP1) und Retinsäure-Rezeptor bindende Proteine (z.B. *SNW domain-containing protein-1*/SNW1, *alpha-actinin-4* und *CCR4-NOT transcription complex subunit-1*).

Tabelle 4.1 Funktionelle Anreicherungsanalyse der Proteine mit einer erhöhten Abundanz nach 120 Std. Behandlung.

Achtundvierzig Proteine zeigten eine erhöhte Abundanz nach der Retinsäurebehandlung im Vergleich zu der 120 Std. Kontrolle (EtOH). Die Analyse der GO-Kategorien *biological process* und *cellular component* dieser Proteine erfolgte vor dem Hintergrund der gesamten Proteine des Datensatzes mit dem Programm Cytoscape und dem PlugIn ClueGO. Die GO-Kategorien sind fusioniert und gruppiert. Die dargestellten p-Werte wurden nach dem Verfahren von Benjamini-Hochberg korrigiert.

GO-ID	GO-Kategorie	p-Wert	Assoziierte Proteine (a(%))	Gennamen
(A) Biological process				
0001523	Retinoid metabolic process	$9,8 \times 10^{-4}$	4 (33,3)	CRABP2, CYP26A1, RBP1, STRA6
0061564	Axon development	$8,8 \times 10^{-3}$	7 (6,6)	CNP, CRABP2, MAP1B, NCAM1, NCAM2, RET, SPTBN1
0120036	Plasma membrane bounded cell projection organization	$6,2 \times 10^{-3}$	13 (4,3)	ATP7A, CNP, CRABP2, DBNL, DPYSL3, ELAVL4, ITGA1, LIMA1, MAP1B, NCAM1, NCAM2, RET, SPTBN1
0048812	Neuron projection morphogenesis	$1,6 \times 10^{-3}$	10 (7,4)	ATP7A, CNP, CRABP2, DBNL, ELAVL4, ITGA1, MAP1B, NCAM1, RET, SPTBN1
0008361	Regulation of cell size	$4,7 \times 10^{-3}$	5 (11,9)	ADD1, ATP7A, CRABP2, MAP1B, RET
0061564	Axon development	$2,7 \times 10^{-3}$	7 (6,3)	CNP, CRABP2, MAP1B, NCAM1, NCAM2, RET, SPTBN1
(B) Cellular component				
0001725	Stress fiber	$1,94 \times 10^{-3}$	4 (14,8)	CNN2, FLNB, LIMA1, SYNPO2
0005903	Brush border	$1,94 \times 10^{-3}$	4 (14,8)	ADD3, ATP7A, FLNB, LIMA1
0014069	Postsynaptic density	$2,10 \times 10^{-3}$	5 (11,1)	ADD3, CNN3, DBNL, MAP1B, SPTBN1
0015629	Actin cytoskeleton	$1,69 \times 10^{-3}$	10 (6,6)	ADD1, CNN2, CNN3, DBNL, DPYSL3, FLNB, LIMA1, PGM1, SPTBN1, SYNPO2
0044297	Cell body	$2,40 \times 10^{-3}$	8 (6,7)	ATP7A, CNN3, DPYSL3, FLNB, GAL, ITGA1, RBP1, RET
0097458	Neuron part	$3,14 \times 10^{-3}$	14 (4,3)	ADD3, ATP7A, CNN3, DBNL, DPYSL3, ERC1, FLNB, GAL, ITGA1, MAP1B, NCAM2, RET, SCG2, SPTBN1
0036477	Somatodendritic compartment	$4,35 \times 10^{-3}$	8 (5,5)	ATP7A, CNN3, DBNL, FLNB, GAL, ITGA1, MAP1B, RET
0043025	Neuronal cell body	$5,90 \times 10^{-3}$	6 (6,5)	ATP7A, CNN3, FLNB, GAL, ITGA1, RET

a Anzahl der Proteine welche mit der angegebenen Kategorie assoziiert sind. Der Prozentuale Anteil bezieht sich auf die Gesamtzahl der Proteine dieser Kategorie.

Weiter wurde überprüft, ob vermehrt Proteingruppen bestimmter zellulärer Kompartimente oder Regionen durch die Retinsäurebehandlung in ihrer Abundanz verändert wurden. Tabelle 4.1B zeigt unter anderem eine Anreicherung der Kategorie *postsynaptic density* ($p = 2,1 \times 10^{-3}$). Beispielsweise tragen das Protein *calponin-3* (CNN3) und das *microtubule-associated-protein-1-B* (MAP1B) diese GO-Kategorie. Es wurden ebenfalls Proteine die Bestandteile der Neuronen bilden in den retinsäurebehandelten Zellen nachgewiesen, z.B. die Kupfer-transportierende ATPase-1 (ATP7A), und der an der Plasmamembran lokalisierte Rezeptor *proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor* (RET; $p = 5,9 \times 10^{-3}$).

4.2.2 Vergleich der Proteom- mit Transkriptomdaten

Mithilfe der zuvor beschriebenen Proteomanalyse konnten bereits Hinweise auf eine erfolgreiche Ansteuerung des neuronalen Differenzierungsprozesses gefunden werden. Zu diesem Zeitpunkt basierten die beschriebenen Markerproteine des Modellsystems vornehmlich auf Genanalysen, z. B. von Korecka et al. im Jahr 2013. Für ein detaillierteres Bild wurden die Daten der 120 Std.-Proteom-Studie daher durch eine Transkriptomstudie ergänzt, welche ebenfalls den Vergleich von 120 Std. retinsäurebehandelten und unbehandelten SH-SY5Y-Zellen adressierte. Diese, mit der Methode RNA-Seq durchgeführte Studie, wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Köhrer (GTL, BMFZ, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, DE) zur Verfügung gestellt.

Zunächst stellte sich die Frage, wie groß der Effekt der Retinsäurebehandlung auf Genebene ist. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein paarweiser Vergleich der quantifizierten Gene in den retinsäurebehandelten und Kontrollzellen durchgeführt (SAM-Methode). Es wurden nur Einträge zugelassen, die in mindestens drei von drei Replikaten vorhanden waren (14 091 von insgesamt 55 075 Geneinträgen). Eine Regulation wurde bei 1 125 der 14 091 Gene festgestellt. Um zu überprüfen, inwieweit die zuvor beschriebenen Abundanzveränderungen der Proteine mit einer Veränderung auf Genebene übereinstimmen, wurden beide *Omics*-Experimente anhand der UniProt-Einträge miteinander gepaart. Hierbei standen aus den Proteomdaten 2 771 Einträge und aus den Transkriptomdaten 11 658 Einträge zur Verfügung. Für 97% der mittels Massenspektrometrie quantifizierten Proteine lagen ebenfalls quantitative Transkriptomdaten vor (Abbildung 4.6A). Nachfolgend wurden die Einträge basierend auf den massenspektrometrischen Daten getrennt betrachtet: Zum einen die Einträge mit einer zuvor gezeigten, signifikanten differentiellen Abundanz ($n=80$) und zum anderen die Einträge, die keine differentielle Abundanz aufwiesen ($n=2\,691$). Es zeigte sich, dass die Mittelwertdifferenzen (RA-EtOH) von Gen- und Proteinebene der 80 differentiellen Einträge miteinander korrelieren ($\rho=0,87$). Größere Abweichungen wurden bei den nicht-differentiellen Einträgen verzeichnet ($\rho=0,25$; Abbildung 4.6B und C).

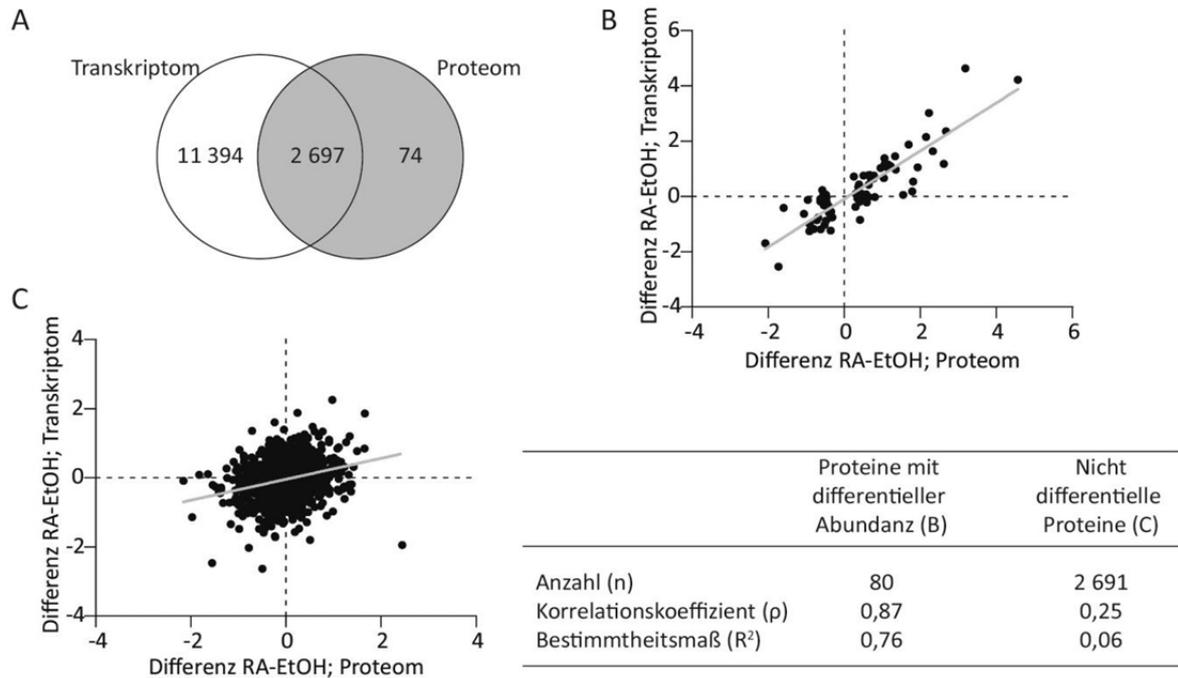


Abbildung 4.6 Vergleich der Proteom- und Transkriptomdaten von 120 Std. retinsäurebehandelten Zellen.

(A) Zu 97% der mittels Massenspektrometrie quantifizierten Proteine lagen quantitative Transkriptomdaten (RNA-Seq) vor. (B-C) Vergleich relativer Änderungen von Proteinen und mRNA. Jeder Punkt repräsentiert den Intensitätsunterschied auf Protein- (X-Achse) und mRNA-Ebene (Y-Achse) zwischen Retinsäure (RA)- und Kontrollbehandlung (EtOH). Dargestellt sind die Differenzen der logarithmierten Intensitätsmittelwerte. Für die Korrelationsanalyse nach Pearson wurden die gemeinsamen Einträge basierend auf den Proteomdaten getrennt: (B) 80 Einträge mit einer signifikanten differentiellen Abundanz und (C) 2 691 Einträge, die keine differentielle Abundanz aufwiesen. Die lineare Regressionsgerade ist jeweils in grau eingezeichnet.

Ergänzend zu den bereits auf Proteinebene identifizierten Komponenten des Retinsäure-Signalweges, gaben die Transkriptomdaten zusätzliche Informationen über (mindestens) 10 Gene, welchen Retinsäure-abhängigen Prozessen zugesprochen werden (Anhang 6, Abbildung 6.3). Ein Vergleich der Proteom- und Transkriptomdaten, mit einer Liste der Top-50-regulierten Gene nach einer achttägigen Behandlung mit 1 μ M Retinsäure (Korecka et al., 2013) zeigte, dass 62% der von Korecka et al. beschriebenen Gene ebenfalls in den Transkriptomdaten quantifiziert wurden. Die Schnittmenge mit den Proteomdaten lag bei 2% (Abbildung 4.7).

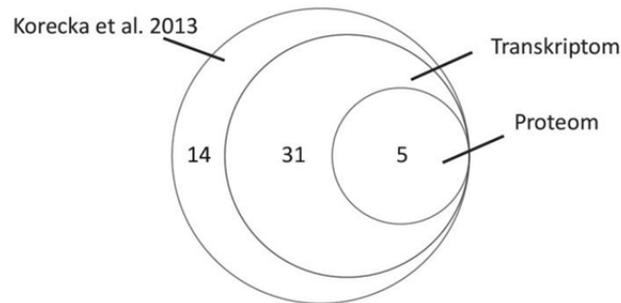


Abbildung 4.7 Vergleich der Transkriptom- und Proteomdaten mit einer veröffentlichten Liste der Top-50-regulierten Gene.

Die herangezogene Liste basiert auf Mikroarraydaten von SH-SY5Y-Zellen nach achttägiger Behandlung mit 1 μ M Retinsäure (Korecka et al., 2013). Der Vergleich der Daten zeigte, dass 62% der 50 Gene ebenfalls in den 120 Std.-behandelten Zellen mittels Transkriptomanalyse und 2% mittels Proteomanalyse nachgewiesen wurden.

4.2.3 Verlauf der Proteomänderungen zwischen 0-48 Std. Behandlung

Die Vermessung der Neuritenlängen ergab, dass nach 48 Std. Retinsäurebehandlung bereits signifikante morphologische Veränderungen vorstattgegangen sind. Folgend wurde überprüft, ob in den ersten 48 Std. bereits Veränderungen auf Proteinebene zu detektieren sind, welche Einblicke in den frühen Prozess der Retinsäure-induzierten neuronalen Differenzierung der Zellen geben können. Weiter stellte sich die Frage, ob es zu einer veränderten Abundanz von Proteinen kommt, die mit der Redox-Homöostase, oxidativen Faltung von Proteinen oder oxidativem Stress assoziiert sind. Um dies zu überprüfen, wurde die differenzielle Analyse auf fünf Zeitpunkte ausgeweitet (RA-Zeitreihe). SH-SY5Y-Zellen wurden für jeweils 0 Std., 1 Std., 3 Std., 8 Std. und 48 Std. mit Retinsäure oder der Lösungsmittelkontrolle behandelt ($n = 5, 3, 9, 4$), was nachfolgend als frühe Zeitpunkte definiert wurde. Im Anschluss daran wurde das Proteom mittels markierungsfreier Massenspektrometrie untersucht.

Insgesamt wurden 3 464 Proteine identifiziert, wovon 2 303 Proteine quantifiziert und für die statistische Auswertung herangezogen wurden. Innerhalb des untersuchten Zeitraums wiesen 873 Proteine eine differenzielle Abundanz auf, die signifikant durch die Kultivierungszeit geprägt ist. Eine Behandlungsabhängige Abundanzveränderung zeigten 70 Proteine und bei 76 Proteinen war eine differenzielle Veränderung der Abundanz zu verzeichnen, welche sowohl auf die Retinsäurebehandlung als auch die Kultivierungszeit zurückzuführen ist. Eine Darstellung der Proteine mit differenzieller Abundanz zu den distinkten Zeitpunkten zeigt, dass die größten Veränderungen nach 48 Std. Behandlung detektiert wurden (Abbildung 4.8A). Zu diesem Zeitpunkt wurde die Abundanz von 6% der Proteine signifikant verändert. Eine vollständige Auflistung aller differenziellen Proteine befindet sich in Anhang 6, Tabelle 6.2.

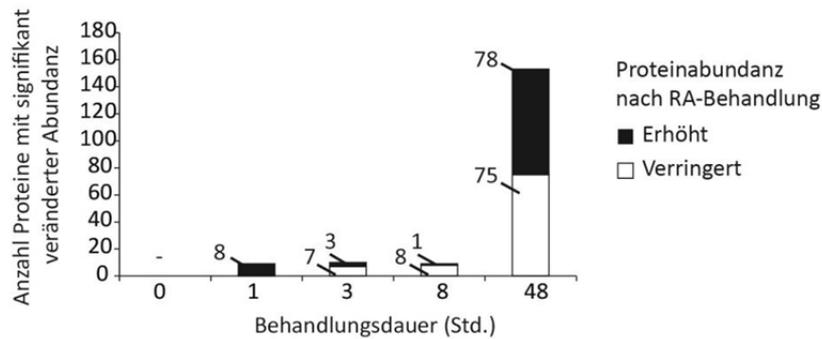


Abbildung 4.8 Retinsäure-induzierte Änderungen des Proteoms zwischen 0-48 Std.

Anzahl der Proteine mit einer signifikanten Abundanzänderung ($p \leq 0,05$). Die Balken markieren den Anteil der Proteine, welche eine erhöhte (weiß) oder verringerte (schwarz) Abundanz nach Retinsäurebehandlung aufwiesen. Die statistische Auswertung erfolgte über eine zweifaktorielle Varianzanalyse, mit anschließendem Vergleichstest nach Tukey sowie einer Korrektur nach Benjamini-Hochberg.

Die dynamischen Veränderungen der Proteinabundanz wurden mithilfe einer *soft cluster*-Analyse untersucht (Kumar & E Futschik, 2007). Hierbei wurden alle quantifizierten Proteine in retinsäurebehandelten Zellen betrachtet. Bei der Methode des *fuzzy c-means clustering* wird jedem Profil ein Grad der Zugehörigkeit zu einem bestimmten Cluster zugeteilt, in Abbildung 4.9 repräsentiert durch eine farbige Markierung. Insgesamt wurden neun Cluster erstellt: Cluster 1, 5 und 7 zeigen Proteine, die in ihrer Abundanz zu verschiedenen Zeitpunkten ansteigen. In den Clustern 2, 4 und 9 sind Proteine enthalten deren Abundanz sinkt. Proteine die ein eher transientes Profil aufweisen werden in den Clustern 3, 6 und 8 zusammengefasst. Die Komponenten des klassischen Retinsäure-Signalweges, wie das *retinol binding protein-1* (RBP1) und der Rezeptor *stimulated as retinoic acid gene-6* (STRA6) finden sich beispielsweise in den Clustern 1 und 7 wieder. Um zu überprüfen, ob sich die Veränderung der Zellmorphologie auf Proteinebene widerspiegelt, wurde die GO-Kategorisierung *biological process* der Proteine einzelner Cluster über einen exakten Test nach Fisher betrachtet. Dies erfolgte vor dem Hintergrund aller Proteine des Datensatzes (Abbildung 4.9). Cluster 4 fasst Proteine zusammen, deren Abundanz nach dreistündiger Retinsäurebehandlung abnimmt. Zugehörige Proteine zeigten eine Anreicherung von Kategorien, die mit der Translation assoziiert sind (z.B. *translation*; Anreicherungsfaktor/AF=2,03; $p=7,48 \times 10^{-4}$), auch Kategorien, die mit der Ribosomentätigkeit zusammenhängen sind angereichert (z.B. *ribosome biogenesis*; AF=5,52; $p=6,97 \times 10^{-4}$). Signifikant wenige Proteine des Clusters 4 werden mit der Kategorie *response to chemical stimulus* assoziiert (AF=0,66; $p=0,003$). Eine Betrachtung des Clusters 7, welche Proteine beinhaltet, die nach achtstündiger Retinsäurebehandlung in der Abundanz zunehmen, hingegen zeigte eine Abreicherung von Proteinen, die mit der Translation assoziiert sind (*translation*; AF=0,20; $p=0,002$). Angereichert sind in Cluster 7 dagegen Proteine, die mit Kategorien assoziiert sind, welche bei der Regulation des

Zytoskeletts oder neurologischen Prozessen eine Rolle spielen (z. B. *extracellular structure organization*; $AF = 3,63$; $p = 1,77 \times 10^{-5}$).

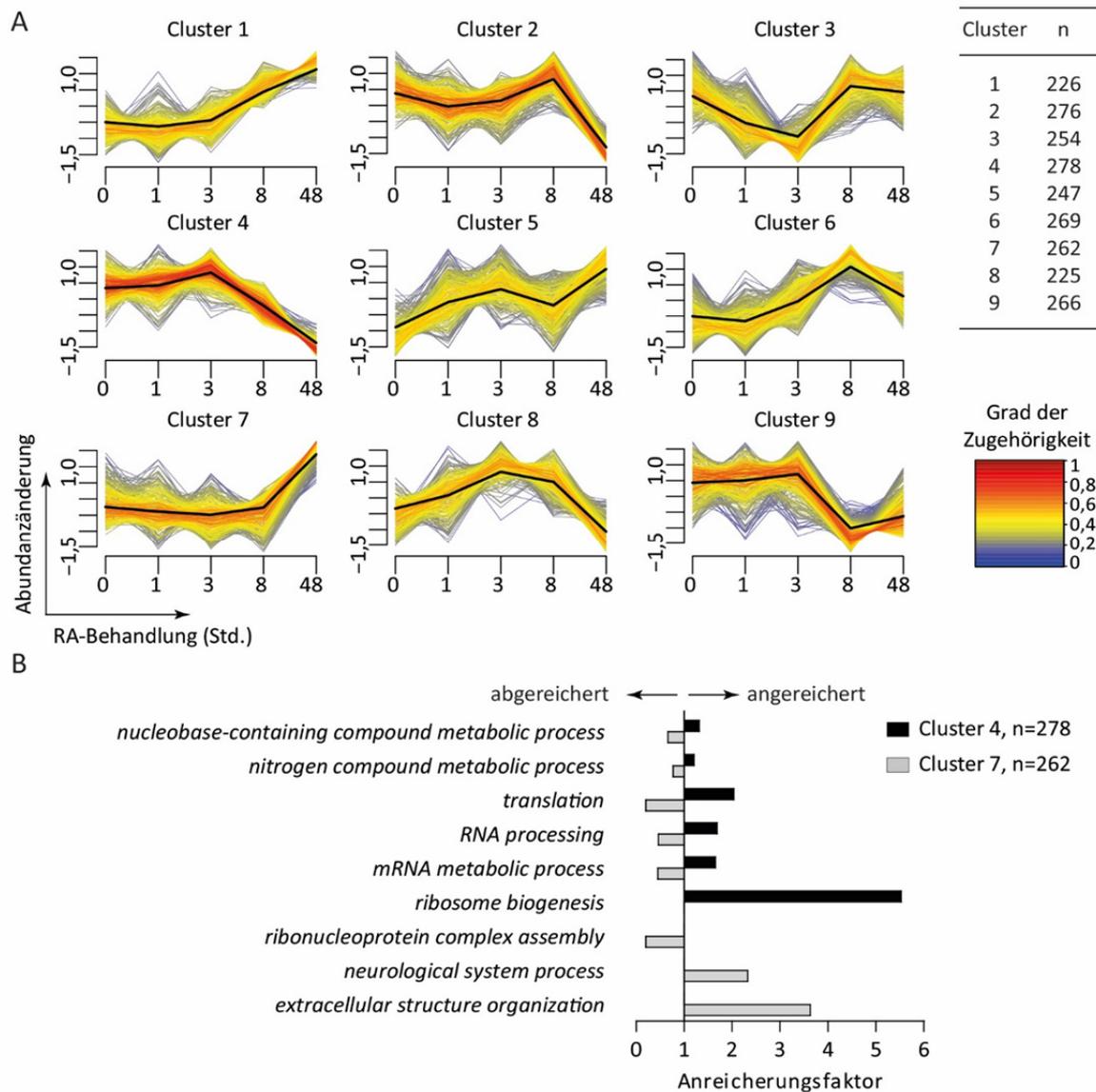


Abbildung 4.9 Dynamische Veränderungen des Proteoms und assoziierte biologische Prozesse.

(A) *Soft cluster*-Analyse aller quantifizierten Proteine während der 48 Std. andauernden Retinsäurebehandlung (nach Kumar and M 2007). Die y-Achse ist \log_{10} transformiert und normalisiert. Jeder Verlauf ist hinsichtlich des Grades der Zugehörigkeit zu dem Cluster farbig markiert. Die Tabelle listet die Anzahl der Proteine innerhalb der gewählten Cluster. (B) GO-Kategorie *biological process*: Signifikant ab- (Anreicherungsfaktor < 1) oder angereichert (> 1) in Cluster 4 und 7. Basierend auf einem exakten Test nach Fisher, vor dem Hintergrund aller 2 303 Proteine des Datensatzes. Benjamini-Hochberg korrigierter p-Wert $\leq 0,05$, siehe auch Anhang 6, Tabelle 6.3.

Zu den Proteinen mit einer besonders starken Zunahme der Abundanz gehört das Retinsäuretransportierende Protein CRABP2, welches eine >150 -fache Erhöhung im Vergleich zu der Kontrolle aufweist ($p = 1,35 \times 10^{-13}$; Abbildung 4.10A). Auch das Profil des Rezeptors RET fällt durch eine besonders frühe und starke Zunahme auf. Eine erhöhte Expression des Rezeptors *RET* gilt auf RNA-Ebene als ein Marker der Retinsäure-Antwort (Angrisano et al., 2011; Oppenheimer et al., 2007;

Patrone et al., 1997). RET zeigte bereits nach dreistündiger Retinsäurebehandlung eine 1,25-fache Zunahme in der Abundanz verglichen zu der Kontrolle ($p=0,03$). Innerhalb von 48 Std. stieg die Abundanz weiter bis auf das 24,5-fache an ($p=5,86 \times 10^{-14}$, Abbildung 4.10B). In der vorrangegangenen Proteomstudie (120 Std. Proteom, 4.2.1) wurde RET ebenfalls quantifiziert und eine 21,1-fache Erhöhung der Abundanz nach 120 Std. Stimulation festgestellt (Abbildung 4.10C). Auch aus den zur Verfügung gestellten Transkriptomdaten wird die Induktion ersichtlich (2,2-fache Erhöhung, $p=4,7 \times 10^{-4}$).

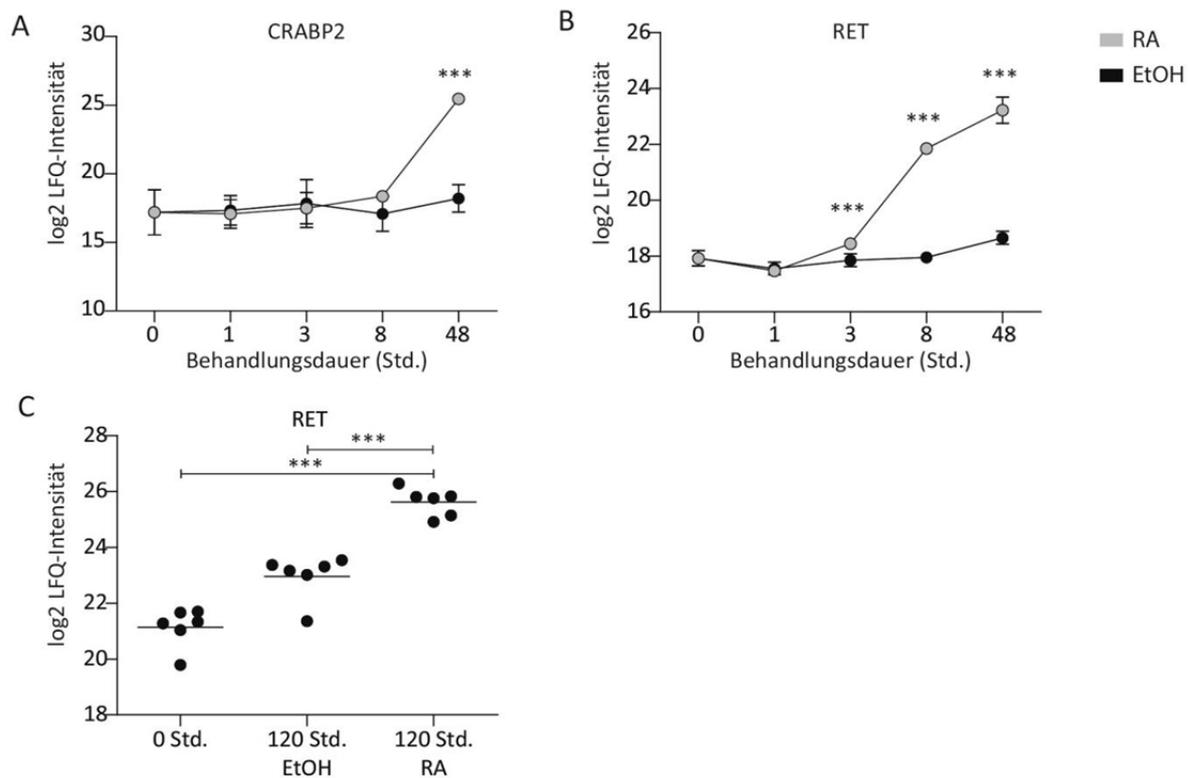


Abbildung 4.10 Retinsäure-abhängige Abundanz der Proteine CRABP2 und RET.

Zeitlicher Verlauf (0 - 48 Std.) der Proteinabundanzen von (A) CRABP2 und (B) RET nach Retinsäure (RA)- und der Kontrollbehandlung (EtOH). Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung der log₂ LFQ-Intensitäten. (C) Log₂ LFQ-Intensitäten von RET nach 0 Std. und 120 Std. Kontroll- bzw. RA-Behandlung, der Mittelwert ist gekennzeichnet (A). Die statistische Auswertung erfolgte über eine zweifaktorielle (A) bzw. einfaktorielle (B) Varianzanalyse, mit anschließendem Vergleichstest nach Tukey sowie einer Korrektur nach Benjamini-Hochberg. Die Sterne markieren einen p-Wert $***p \leq 0,001$.

Um Hinweise auf redox-abhängige Prozesse zu erhalten, wurde die Abundanz von Proteinen kontrolliert die an dem Abbau von Superoxidanionen, H₂O₂ und anderen organischen Peroxiden beteiligt sind. Darüber hinaus wurden die Proteomdaten auf Einträge überprüft, denen die Gen Ontologie-Annotation molekulare Funktion (GOMF): *antioxidant activity* zugeordnet ist (Tabelle 4.2). Der Vergleich zwischen den retinsäurebehandelten und Kontrollzellen zeigte, dass die quantifizierten Proteine keine Abundanzänderung infolge der Retinsäurebehandlung aufwiesen. Eine signifikante Veränderung über die Zeit wurde bei sechs Proteinen detektiert, z.B. bei der H₂O₂-abbauenden

Katalase (CAT, $p=3,07 \times 10^{-2}$). Weiter wurde überprüft, ob es zu einer Abundanzänderung von Proteinen kommt, die an der oxidativen Faltung im ER beteiligt sind. Hier zeigte sich eine signifikante Abnahme der PDIA4-Abundanz zum Zeitpunkt 1Std. (Ratio Retinsäure/EtOH: 0,82; p-Wert zum Zeitpunkt 1Std.=0,04). Als Hinweis auf oxidative Schäden an DNA, Lipiden oder Proteinen wurden die Abundanzveränderungen von Proteinen mit der GOMF-Annotation *cellular response to oxidative stress, lipid oxidation* und der Zuordnung zu dem KEGG-Signalweg *base excision repair* betrachtet. Insgesamt wurden 33 Proteine mit einer der Annotationen quantifiziert, von denen vier einen signifikanten Abundanzunterschied infolge der Retinsäurebehandlung nach frühestens acht Stunden aufwiesen (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2 Quantifizierte Proteine die mit der Kontrolle des zellulären Redoxzustandes, der zellulären Antwort auf oxidativen Stress, Lipid-Oxidation und DNA-Reparatur verbunden sind.

Proteine mit einer statistisch signifikanten Änderung der Abundanz über die Zeit, basierend auf dem korrigierten p-Wert* der zweifaktoriellen ANOVA oder im Vergleich von Retinsäure (RA) zu der Kontrolle EtOH, sind grau unterlegt. Die Ratio wurde aus den gemittelten LFQ-Intensitäten ermittelt. Die Pfeile zeigen an, ob die Ratio zu dem entsprechenden Zeitpunkt sinkt oder steigt.

Genname	p-Wert*	p-Wert RA vs. EtOH				Ratio (RA/EtOH)				Differenziell
		Zeit	1Std.	3Std.	8Std.	48Std.	1Std.	3Std.	8Std.	
<u>Abbau von Superoxidationen und Peroxiden</u>										
SOD2	$8,7 \times 10^{-1}$	1,0	1,0	1,0	$6,7 \times 10^{-1}$	1,07	1,05	1,17	0,69	
SOD1	$4,7 \times 10^{-1}$	1,0	$4,9 \times 10^{-1}$	1,0	$9,5 \times 10^{-1}$	1,06	1,24	1,09	1,14	
CAT	$3,1 \times 10^{-2}$	1,0	1,0	1,0	$4,3 \times 10^{-1}$	1,00	0,96	0,95	1,33	
GPX1	$2,1 \times 10^{-5}$	$9,8 \times 10^{-1}$	1,0	$2,0 \times 10^{-1}$	1,0	0,77	1,13	1,89	0,96	
TXNDC17	$3,9 \times 10^{-2}$	$9,9 \times 10^{-1}$	$9,2 \times 10^{-1}$	$5,1 \times 10^{-1}$	1,0	0,91	1,14	1,22	0,98	
PRDX4	$3,8 \times 10^{-4}$	$9,8 \times 10^{-1}$	$9,6 \times 10^{-1}$	$9,9 \times 10^{-1}$	1,0	0,94	0,93	0,94	1,04	
PRDX6	$1,9 \times 10^{-1}$	$9,7 \times 10^{-1}$	$7,8 \times 10^{-1}$	1,0	$9,5 \times 10^{-1}$	0,94	0,92	1,02	0,94	
PRDX2	$8,0 \times 10^{-1}$	1,0	1,0	1,0	1,0	1,06	0,98	1,03	1,06	
PRDX1	$2,4 \times 10^{-1}$	$9,9 \times 10^{-1}$	$9,5 \times 10^{-1}$	$9,9 \times 10^{-1}$	1,0	0,92	1,11	1,08	0,96	
PRDX4	$4,1 \times 10^{-1}$	$9,4 \times 10^{-1}$	1,0	$7,8 \times 10^{-1}$	1,0	0,90	1,08	1,15	0,98	
GSTK1	$1,0 \times 10^{-1}$	1,0	$6,8 \times 10^{-1}$	1,0	$9,3 \times 10^{-1}$	0,94	1,22	0,94	1,15	
GMMPR;GPX4	$2,8 \times 10^{-3}$	1,0	$5,7 \times 10^{-1}$	1,0	$9,4 \times 10^{-1}$	1,20	1,69	1,19	0,71	
MGST3	$1,7 \times 10^{-2}$	1,0	$1,2 \times 10^{-1}$	1,0	1,0	1,12	0,68	1,04	0,90	
NXN	$5,7 \times 10^{-1}$	$9,4 \times 10^{-1}$	1,0	1,0	1,0	1,30	1,18	0,88	1,16	
<u>Oxidative Faltung im ER</u>										
PDIA6	$6,4 \times 10^{-01}$	1,0	1,0	$8,4 \times 10^{-1}$	1,0	1,01	0,99	0,86	0,99	
PDIA4	$1,1 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^{-2}$	$7,7 \times 10^{-1}$	$9,8 \times 10^{-1}$	$9,4 \times 10^{-2}$	0,82	0,91	0,94	1,19	1Std. ↓
ERO1L	$9,5 \times 10^{-1}$	$9,8 \times 10^{-1}$	1,0	1,0	1,0	0,93	0,97	1,00	1,02	
<u>Zelluläre Antwort auf oxidativen Stress</u>										
KSR2	$2,4 \times 10^{-1}$	$8,2 \times 10^{-1}$	$9,8 \times 10^{-1}$	1,0	1,0	1,31	1,19	0,96	1,00	
RELA	$2,3 \times 10^{-1}$	1,0	1,0	$9,6 \times 10^{-1}$	1,0	0,96	0,99	1,11	1,00	
ATP5B	$6,3 \times 10^{-1}$	1,0	$9,9 \times 10^{-1}$	1,0	1,0	0,81	0,51	0,73	1,20	
TXNL1	$2,0 \times 10^{-2}$	$9,0 \times 10^{-1}$	1,0	$7,1 \times 10^{-1}$	$9,8 \times 10^{-1}$	0,87	1,09	1,20	0,90	
PRKRA	$9,9 \times 10^{-3}$	$9,9 \times 10^{-1}$	1,0	1,0	$3,1 \times 10^{-1}$	0,92	1,00	0,96	1,21	
CDK1	$6,9 \times 10^{-1}$	1,0	1,0	1,0	1,0	0,97	1,03	0,95	0,88	
ATP5B	$5,5 \times 10^{-2}$	1,0	1,0	1,0	1,0	0,95	0,95	1,00	0,95	

PARP1	2,7x10 ⁻²	1,0	9,9x10 ⁻¹	1,0	7,0x10 ⁻¹	1,01	1,10	1,01	0,85	
G6PD	2,7x10 ⁻³	6,6x10 ⁻¹	1,0	4,3x10 ⁻¹	2,8x10 ⁻⁴	0,92	1,03	1,11	1,26	48Std.↑
APEX1	8,2x10 ⁻²	1,0	1,0	7,4x10 ⁻¹	1,0	0,97	0,97	0,88	0,94	
Fortsetzung Tabelle 4.2										
PPIF	7,4x10 ⁻¹	1,0	9,3x10 ⁻¹	1,0	8,2x10 ⁻¹	0,93	0,79	0,99	0,76	
MAPK8	8,1x10 ⁻¹	1,0	9,3x10 ⁻¹	9,9x10 ⁻¹	1,0	0,87	1,45	1,32	0,85	
ATP7A	1,8x10 ⁻⁸	9,8x10 ⁻¹	1,0	1,0	5,0x10 ⁻¹²	0,83	1,03	1,06	6,83	48Std.↑
SLC25A24	1,3x10 ⁻²	6,8x10 ⁻¹	3,0x10 ⁻¹	1,0	5,1x10 ⁻¹	0,87	0,83	0,95	1,17	
SIN3A	1,7x10 ⁻¹	1,0	1,0	4,6x10 ⁻²	1,0	0,84	1,06	0,44	1,12	8Std.↓
PARK7	2,8x10 ⁻³	1,0	9,9x10 ⁻¹	1,0	1,0	1,01	1,04	1,03	0,98	
ADPRHL2	5,4x10 ⁻¹	9,7x10 ⁻¹	1,0	7,9x10 ⁻⁰¹	9,6x10 ⁻¹	1,50	1,09	1,81	1,53	
<u>Lipid-Oxidation</u>										
HADHB	2,6x10 ⁻²	1,0	1,0	1,0	3,2x10 ⁻⁰¹	0,95	1,02	0,99	1,15	
ABCD3	8,2x10 ⁻⁴	1,0	9,8x10 ⁻¹	1,0	9,9x10 ⁻¹	1,14	0,83	0,87	1,19	
POR	3,2x10 ⁻⁴	7,2x10 ⁻¹	8,2x10 ⁻¹	1,0	1,0	1,14	1,12	1,03	1,04	
SCP2	8,2x10 ⁻²	4,7x10 ⁻¹	9,8x10 ⁻¹	1,0	1,0	0,81	1,12	0,98	0,99	
HSD17B4	2,8x10 ⁻³	9,9x10 ⁻¹	1,0	1,0	1,0	0,96	1,04	0,98	1,03	
ACOX1	7,7x10 ⁻¹	5,3x10 ⁻¹	1,0	8,8x10 ⁻¹	1,0	1,34	1,05	1,23	1,02	
<u>DNA-Reparatur</u>										
LIG1	1,2x10 ⁻²	1,0	1,0	1,0	8,3x10 ⁻¹	1,00	0,88	1,11	0,74	
POLD1	3,6x10 ⁻¹	7,6x10 ⁻¹	1,0	9,6x10 ⁻¹	9,9x10 ⁻¹	1,22	1,10	1,15	0,89	
HMGB1;HMGB1P1	3,2x10 ⁻¹	1,0	9,9x10 ⁻¹	1,0	1,0	1,06	1,20	1,04	1,16	
PCNA	4,4x10 ⁻¹	1,0	1,0	1,0	4,9x10 ⁻²	1,02	1,00	1,02	1,18	48Std.↑
RPA2	2,7x10 ⁻¹	1,0	1,0	1,0	1,0	1,00	1,05	1,01	0,97	
XRCC1	6,0x10 ⁻¹	1,0	8,9x10 ⁻¹	9,8x10 ⁻¹	1,0	0,90	1,39	1,28	0,95	
FEN1	4,3x10 ⁻¹	7,7x10 ⁻¹	5,4x10 ⁻¹	1,0	1,0	0,86	1,20	1,03	1,01	
POLD2	5,1x10 ⁻⁵	1,0	9,9x10 ⁻¹	7,3x10 ⁻¹	9,9x10 ⁻¹	0,95	1,10	1,19	0,90	
LIG3	2,0x10 ⁻²	1,0	1,0	1,0	1,0	1,03	1,25	1,26	1,05	
DDB1	7,6x10 ⁻²	1,0	1,0	1,0	1,0	0,96	1,01	1,05	0,96	

4.3 Analyse des zellulären Redoxzustandes

Neben den beschriebenen Veränderungen der Proteinabundanz wurde überprüft, ob es 1-5Std. nach Beginn der neuronalen Differenzierung zu einer Veränderung des zellulären Redoxzustandes kommt. Bislang ist bekannt, dass es in differenzierten SH-SY5Y-Zellen, nach vier- bzw. siebentägiger Retinsäurebehandlung, zu veränderten Mengen von Superoxidanionen und H₂O₂ kommt (Lopes et al., 2017; Silvis et al., 2016). Um ein möglichst umfassendes Bild des intrazellulären Redoxzustandes zu erhalten, wurden verschiedene Nachweistechiken eingesetzt. Zunächst wurde der globale Redoxzustand der Zellen mittels des redox-sensitiven Farbstoffes CellROX Green analysiert, da dieser durch verschiedene RS oxidiert werden kann. Da der Farbstoff DNA-bindend ist, werden primär Signale des Zellkerns und der Mitochondrien detektiert. Eine H₂O₂-spezifische und schließlich ortsabhängige Detektion, wurde durch die genetisch kodierten Sensorproteine RoGFP2-Orp1 bzw. NCF1-RoGFP2 ermöglicht (Meyer & Dick, 2010; Pal et al., 2013). Mithilfe der Experimente sollte schließlich ein geeigneter Zeitpunkt für die geplante globale Analyse der reversibel-oxidierten Proteine (Redox-Proteom, 4.4) ermittelt werden.

4.3.1 Analyse des globalen Redoxzustandes

Der redox-sensitive Farbstoff CellROX Green zeigte im reduzierten Zustand eine geringe Fluoreszenz. Die Oxidation des Farbstoffes durch Zugabe des Oxidationsmittels H_2O_2 führte zu einem Anstieg der messbaren Fluoreszenzintensität bei einer Extinktion von 485 nm und Emission von 520 nm (Abbildung 4.11A). Dieser Anstieg in der Fluoreszenzintensität dient als Hinweis auf einen erhöhten oxidativen Zustand innerhalb der Zellen. Verschiedene Zeitpunkte nach Stimulation mit Retinsäure wurden hinsichtlich der veränderten CellROX Green-Fluoreszenz untersucht. Nach dreistündiger Behandlung der Zellen mit Retinsäure wurde eine signifikant erhöhte Fluoreszenzintensität des Farbstoffes detektiert ($p = 0,006$), was auf vermehrtes Vorkommen von RS schließen lässt. Nachfolgend sank die Fluoreszenzintensität zurück auf das Ausgangsniveau (Abbildung 4.11B).

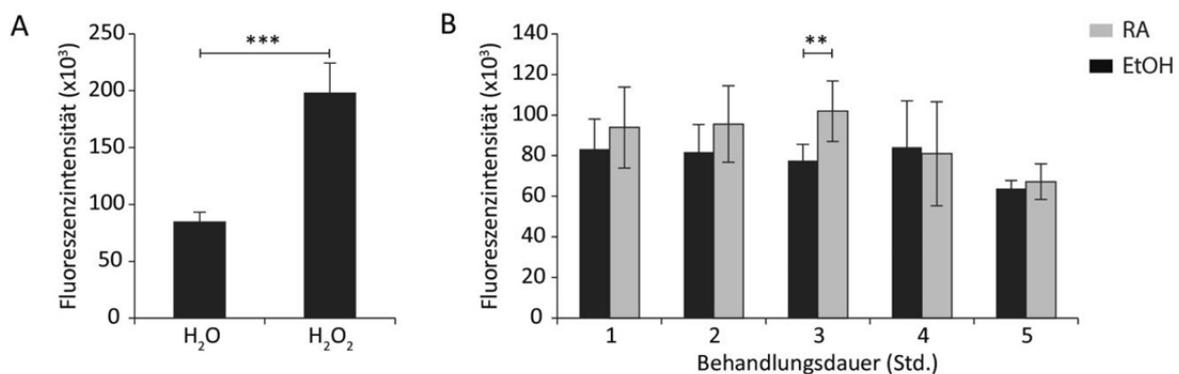


Abbildung 4.11 Nachweis reaktiver Spezies in retinsäurebehandelten SH-SY5Y-Zellen.

Eine erhöhte Fluoreszenzintensität des Farbstoffes CellROX Green wurde nach (A) 5 min., 1 mM H_2O_2 - und nach (B) 3 Std. Retinsäure (RA)-Behandlung detektiert. Angegeben sind die Mittelwerte von $n = 6$, +/- deren Standardabweichung. Mittels eines Student t-Tests wurde überprüft, ob es durch die Behandlung zu einem signifikanten Unterschied zwischen behandelten und Kontrollzellen kommt. Die Sterne markieren einen p-Wert ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

4.3.2 Funktionelle Validierung des genetisch kodierten H_2O_2 -Sensors RoGFP2-ORP1

Das vorrangegangene Experiment lässt schlussfolgern, dass in den Zellen nach dreistündiger Retinsäurebehandlung ein vermehrt oxidativer Zustand vorliegt. Um zu überprüfen, ob dies mit einem Anstieg von H_2O_2 einhergeht, wurden die stabil mit RoGFP2-ORP1 transfizierten SH-SY5Y-Zellen genutzt. Neben der erhöhten Spezifität für H_2O_2 hat die Verwendung der genetisch kodierten Sensoren gegenüber dem Gebrauch von CellROX Green den Vorteil, dass die Ergebnisse unabhängig von der Konzentration des Sensors, der zu detektierenden Signalintensität und einer Photobleichung sind (Gutscher et al., 2009; Meyer & Dick, 2010; Pal et al., 2014). Nach erfolgreicher Klonierung (3.2) und der Herstellung stabil transfizierter SH-SY5Y-Zelllinien (3.2.8), wurde zunächst die Funktionalität des Sensors mittels konfokaler Mikroskopie überprüft (3.4.2). Im Anschluss wurde ein Detektionsverfahren im Mikrotiterplattenlesegerät aufgesetzt, was die Aufnahme einer Vielzahl von Zellen ermöglichte (3.4.3).

4.3.2.1 Detektion mittels Konfokalmikroskopie

Für die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellen für 15 min mit 10 mM H₂O₂ oder 1 mM DTT behandelt und die resultierenden Fluoreszenzänderungen betrachtet (Abbildung 4.12A). Die Fluoreszenzratio, also das Verhältnis der detektierten Intensitäten, entspricht dem Grad der Sensoroxidation und dient schließlich der Einschätzung des Redoxzustandes der Zelle. Verglichen zu der Kontrolle kann in den behandelten Zellen nach H₂O₂-Zugabe ein Anstieg ($p = 9,8 \times 10^{-21}$) bzw. nach DTT-Zugabe eine Verringerung ($p = 3,8 \times 10^{-7}$) der Fluoreszenz-Ratio ermittelt werden (Abbildung 4.12B). Weshalb auf eine vermehrte Oxidation (32% +/- 0,6) bzw. Reduktion (zu 6,2% +/- 0,1 oxidiert) der vorliegenden Sensorproteine geschlossen werden kann (Abbildung 4.12C). Der dynamische Bereich der Sensorproteine konnte durch die Differenz der maximal und minimal erreichten Fluoreszenz-Ratio mit 1,57 +/- 0,04 bestimmt werden. Unter physiologischen Bedingungen lagen die Sensorproteine der betrachteten Zellen vermehrt in einem reduktivem Zustand vor (92,3%; Abbildung 4.12C und in Abbildung 4.12B markiert durch einen Stern).

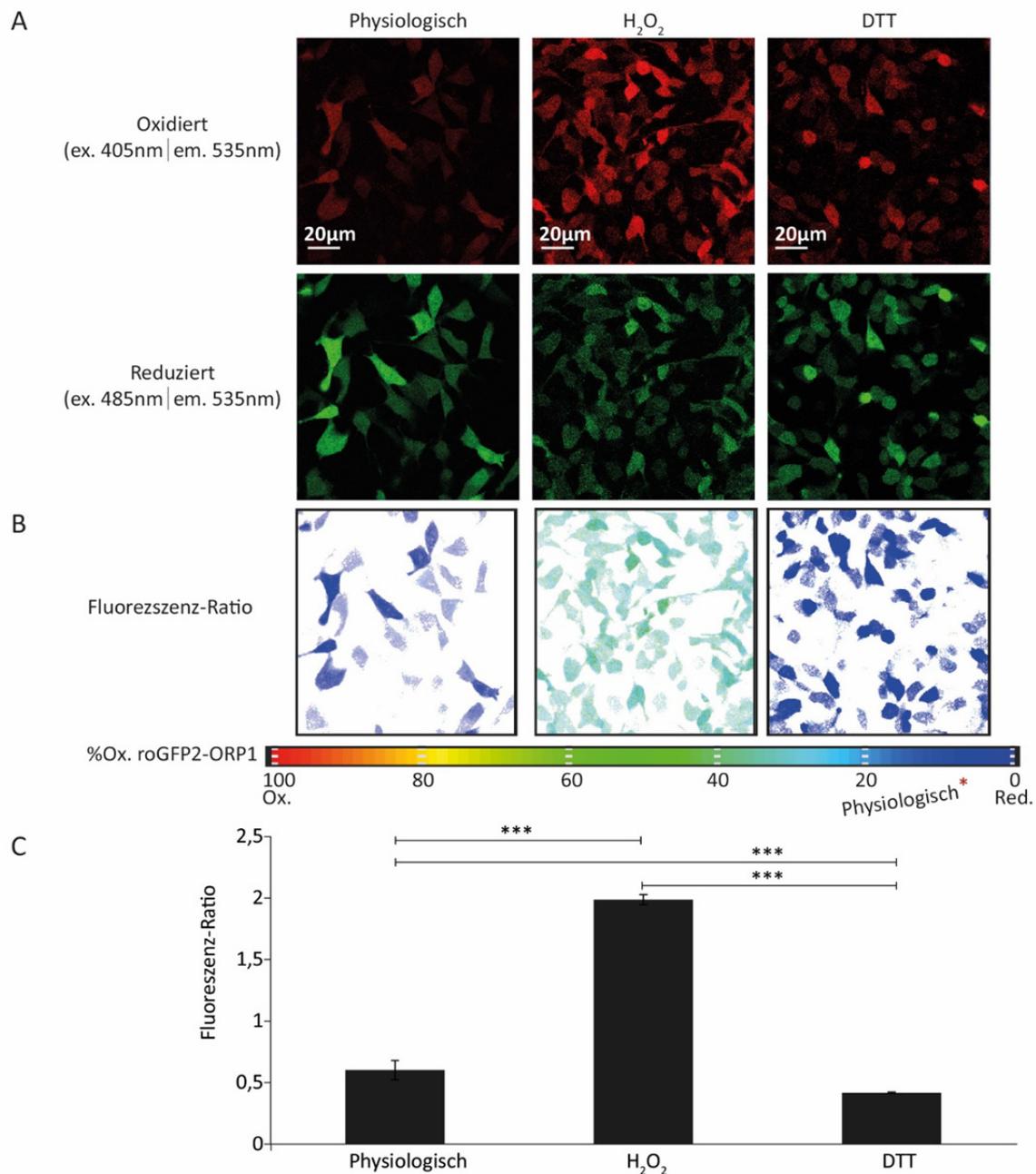


Abbildung 4.12 Konfokalmikroskopische Aufnahmen und softwarebasierte Ratio-Analyse des Sensors RoGFP2-ORP1 in stabil transfizierten SH-SY5Y-Zellen.

(A) Darstellung der zellulären Fluoreszenz der drei Behandlungszustände bei ex. 405nm|em. 535nm (oxidiert) und ex. 485nm|em. 535nm (reduziert). (B) Die normalisierte Fluoreszenz-Ratio wurde mithilfe des Programms RRA Ratio Analysis bestimmt (Fricker, 2016). Die Farbskala illustriert den Grad der Sensor-Oxidation. Unter physiologischen Bedingungen zeigten die Sensoren einen vermehrt reduzierten Zustand (92,3%). (C) Die Fluoreszenz-Ratios zeigten eine Oxidation der Sensoren nach 15 min, 10 mM H_2O_2 bzw. Reduktion nach 15 min, 1mM DTT. Anhand der maximal und minimal erreichten Fluoreszenz-Ratio kann der dynamische Bereich des Sensors in den Zellen bestimmt werden. Gezeigt sind das geometrische Mittel und die Standardabweichung von 10 Zellen. Mittels einer Varianzanalyse und einem Post-hoc Test nach Tukey wurde überprüft, ob es durch die Behandlungen zu einem signifikanten Unterschied kommt. Die Sterne markieren einen $***p \leq 0,001$.

4.3.2.2 Detektion im Mikrotiterplattenlesegerät

Zur Bestätigung, dass der verwendete Sensor über das DTX 880 Multimode Detektor-System auslesbar ist, wurde dessen Fluoreszenz-Ratio zunächst unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen bestimmt und mit der basalen Fluoreszenz-Ratio verglichen. Um einen autofluoreszenz-Effekt der Zelle auszuschließen, wurde das Experiment vergleichend mit Wildtyp SH-SY5Y-Zellen durchgeführt (Abbildung 4.13A) und die Signale des Sensors auf diese Hintergrundfluoreszenz normalisiert (3.8.3). Die Ergebnisse zeigten, dass der hier verwendete Sensor signifikant durch die 15 min Behandlung mit dem jeweiligen Reagenz oxidiert wurde (Abbildung 4.13B). Verglichen zu der Kontrolle führte die Zugabe von 10 mM H₂O₂ zu einem 2,8-fachen ($p = 1,7 \times 10^{-8}$) und die Zugabe von 0,5 mM Diamid zu einem dreifachen Anstieg der Fluoreszenz-Ratio ($p = 3,1 \times 10^{-8}$). Der dynamische Bereich, welcher mit dem Verfahren abgedeckt wurde, beträgt $0,61 \pm 0,13$. Einhergehend mit den zuvor gezeigten Daten wurde nur ein geringer reduktiver Effekt (1 mM DTT, 15 min) gemessen ($p = 0,03$). Die konfokal-mikroskopischen Aufnahmen zeigten bereits, dass ein Großteil der Sensoren unter physiologischen Bedingungen im reduzierten Zustand vorlag.

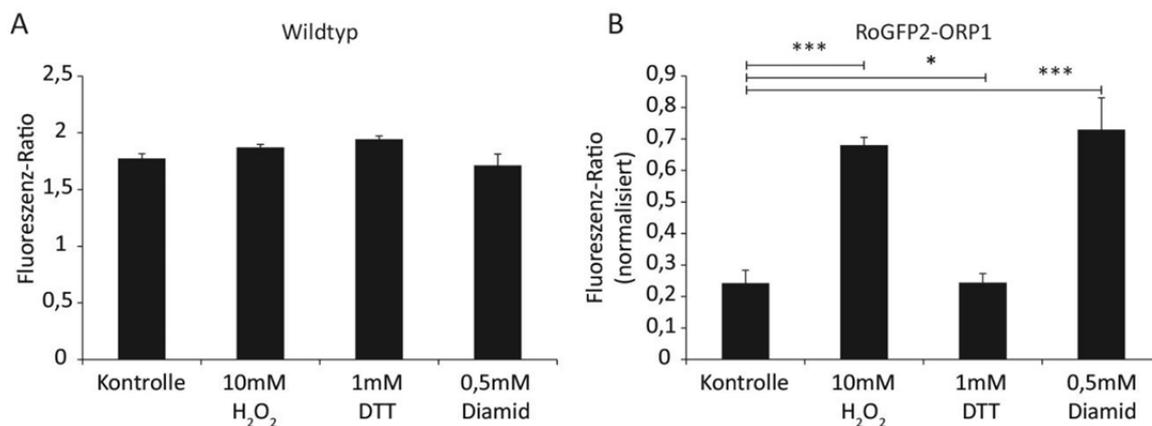


Abbildung 4.13 Funktionalitätstest des Sensors RoGFP2-ORP1 im Mikrotiterplattenlesegerät.

Zunächst wurde die Funktionalität des Sensorproteins in SH-SY5Y-Zellen überprüft. Die Zugabe von H₂O₂ und Diamid führte nicht zu einem Anstieg der Fluoreszenz-Ratio in (A) Wildtyp-Zellen, jedoch in (B) stabil mit RoGFP2-ORP1 transfizierten Zellen. Dargestellt sind die gemittelten (A) bzw. normalisierten und gemittelten (B) Fluoreszenz-Ratios \pm Standardabweichung, $n = 8$. Mittels Varianzanalyse wurde überprüft, ob es durch die Behandlung zu signifikanten Unterschieden zwischen behandelten und Kontrollzellen kommt. Die Sterne markieren p -Werte $*p \leq 0,05$ und $***p \leq 0,001$.

4.3.3 Verwendung von RoGFP2-ORP1, um die Entstehung von H₂O₂ zu überprüfen

Als Hinweis auf entstehendes H₂O₂ wurden die Fluoreszenz-Ratios der Sensorproteine zu verschiedenen Zeitpunkten nach Retinsäurebehandlung ermittelt (Abbildung 4.14A). Im Vergleich zu der Kontrolle, wurde nach zweistündiger Behandlung ein Anstieg in der RoGFP2-ORP1 Fluoreszenz-Ratio beobachtet ($p=0,002$), was auf einen Anstieg von zellulärem H₂O₂ deutet. Dahingegen weist die verringerte Fluoreszenz-Ratio nach dreistündiger Retinsäurebehandlung ($p=1,3 \times 10^{-4}$), auf verminderte H₂O₂-Mengen im Vergleich zu der Kontrollzelle hin.

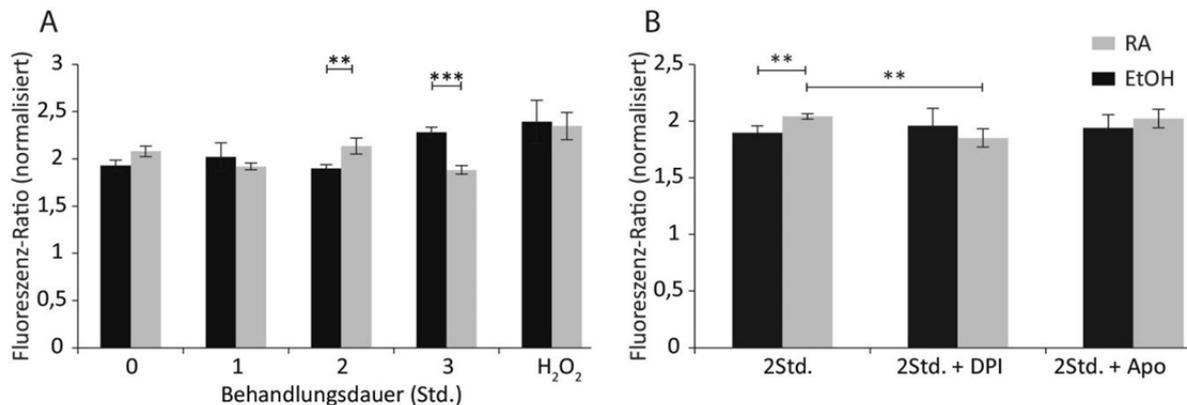


Abbildung 4.14 Veränderung der Fluoreszenz-Ratio von RoGFP2-ORP1 zwischen 0-3 Std. Behandlung.

(A) Verglichen zu der Kontrolle (EtOH), führte die Retinsäure (RA)-behandlung zu einer Erhöhung der Fluoreszenz-Ratio nach 2 Std. und Verringerung nach 3 Std. (B) Durch die zweistündige Behandlung mit Retinsäure wurde die Fluoreszenz-Ratio erhöht, dieser Effekt wurde durch eine 30-minütige Vorbehandlung mit Diphenyleiodonium (DPI) aufgehoben, nicht jedoch durch Apocynin (Apo). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=8$. Die Sterne markieren einen signifikanten Unterschied zwischen behandelten und Kontrollzellen. Die mittels Student t-Test bzw. Varianzanalyse bestimmte Signifikanz betrug $**p \leq 0,01$ und $***p \leq 0,001$.

Erhöhte ROS-Mengen in neuronal differenzierten SH-SY5Y-Zellen wurden bereits mit der Aktivität der NOX-Komplexe in Verbindung gebracht (Nitti et al., 2010). Nachfolgend wurde überprüft, ob diese Beteiligung für den angenommenen H₂O₂-Anstieg nach zweistündiger Retinsäurebehandlung bestätigt werden kann. Die katalytische Untereinheit der NOX-Proteine ist ein NADPH-abhängiges Flavocytochrom, welches radikalische Superoxidanionen produziert, die folgend zu H₂O₂ dismutieren. Um diese Radikalentstehung zu blockieren, wurden der unkompetitive Flavoenzym Inhibitor Diphenyleiodonium (DPI) (Cross, 1987; Cross & Jones, 1986; Doussiere & Vignais, 1992) und der Inhibitor Apocynin (t Hart, Simons, Knaan-Shanzer, Bakker, & Labadie, 1990) verwendet. Wurden die Zellen 30 Min. vor Beginn der Retinsäurezugabe zusätzlich mit DPI behandelt, unterdrückte dies den durch Retinsäure-induzierten Anstieg der Fluoreszenz-Ratio ($p=2 \times 10^{-3}$, Abbildung 4.14B). Die Zugabe von Apocynin löste diesen Effekt nicht aus.

4.3.4 Verwendung von NCF1-RoGFP2, um eine Beteiligung der NOX-Komplexe zu überprüfen

Um die Beteiligung der NOX-Komplexe weiter zu überprüfen, wurde das Sensorprotein RoGFP2 mit der organisatorischen Untereinheit p47^{phox} (NCF1) des NOX2-Komplexes fusioniert (NCF1-RoGFP2, Pal, Basu Thakur et al. 2013). Die RoGFP2-Fluoreszenz der stabil mit NCF1-RoGFP2 transfizierten SH-SY5Y-Zellen wurde über das zuvor etablierte Mikrotiterplatten-Verfahren gemessen. Zunächst wurde die Funktionalität des Sensors getestet und der dynamische Bereich bestimmt. NCF1-RoGFP2 wurde durch die Zugabe von 10 mM H₂O₂ oder 0,5 mM Diamid oxidiert. Nach Zugabe von 1 mM DTT zeigte dieses Sensorprotein, wie das zuvor beschriebene RoGFP2-ORP1, eine geringe Veränderung der Fluoreszenz-Ratio (Abbildung 4.15A). Der dynamische Bereich, welcher mit dem Verfahren abgedeckt werden konnte, beträgt 0,54 +/- 0,02. Einhergehend mit den zuvor gezeigten Experimenten, wurden stabil mit NCF1-RoGFP2 transfizierte SH-SY5Y-Zellen mit Retinsäure oder EtOH behandelt, was eine Erhöhung der Fluoreszenz-Ratio nach zwei Stunden auslöste ($p = 3 \times 10^{-3}$, Abbildung 4.15B). Die erhöhte Fluoreszenz-Ratio weist auf eine vermehrte Produktion von Superoxidanionen bzw. davon abgeleitetem H₂O₂ hin, die vermutlich auf die NOX-Komplexe zurückzuführen ist.

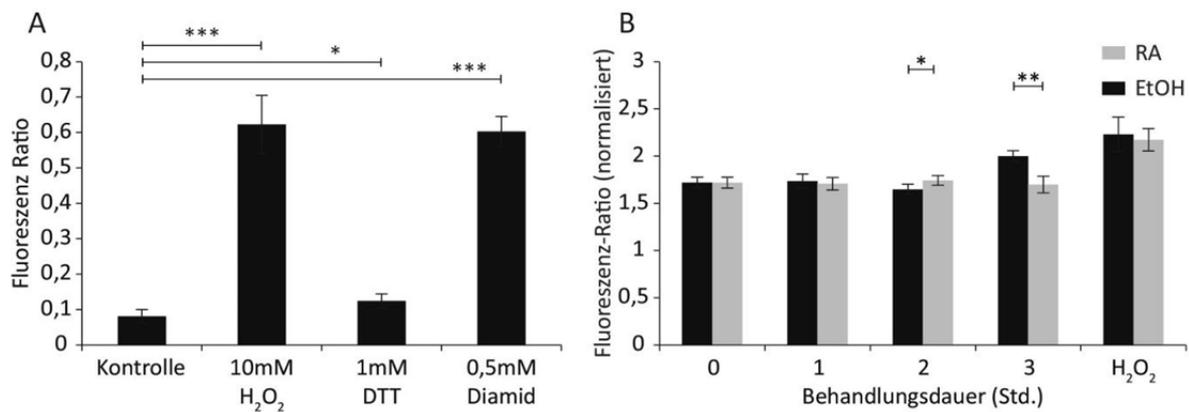


Abbildung 4.15 Retinsäure induziert die Oxidation des Sensors NCF1-RoGFP2.

(A) Zunächst wurde die Funktionalität des Sensorproteins in stabil transfizierten SH-SY5Y-Zellen überprüft. Die Zugabe von H₂O₂ und Diamid führte zu einem Anstieg der Fluoreszenz-Ratio. (B) Die Stimulation mit Retinsäure führt zu einer Erhöhung der Fluoreszenz-Ratio nach 2 Std. und Verringerung nach 3 Std. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung, n=8. Mittels Varianzanalyse wurde überprüft, ob es durch die Behandlung zu signifikanten Unterschieden kommt. Die Sterne markieren einen signifikanten Unterschied zwischen behandelten und Kontrollzellen * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

4.4 Differenzielle Analyse des Redox-Proteoms von SH-SY5Y-Zellen

Die Ergebnisse legen nahe, dass es nach zweistündiger Retinsäurebehandlung zu einem Anstieg von zellulärem H_2O_2 kommt (4.3.3). Um zu überprüfen, ob es zeitgleich zu reversiblen Oxidationen an Proteinen kommt wurde eine redox-spezifische differenzielle Proteomanalyse mittels Massenspektrometrie durchgeführt (Redox-Proteom). Redox-sensitive Modifizierungen an Cysteinresten sind labil, schnelllebig und gegebenenfalls niedrig abundant. Daher erfordert ihre Analyse spezielle Aufarbeitungs-, Derivatisierungs- und Anreicherungstechniken, welche im Rahmen dieser Arbeit etabliert und angewendet wurden. Für die Analyse reversibel oxidiertes Cysteine wurde ein bereits beschriebenes Protokoll zur redox-spezifischen Proteomanalytik modifiziert (J. Guo et al., 2014; Paulech et al., 2013). Diese Technik bedient sich einer Thiopropyl-Sepharose 6B-Matrix (TPS-Matrix) unterstützen Aufarbeitung der Proben (3.6 und Abbildung 4.16).

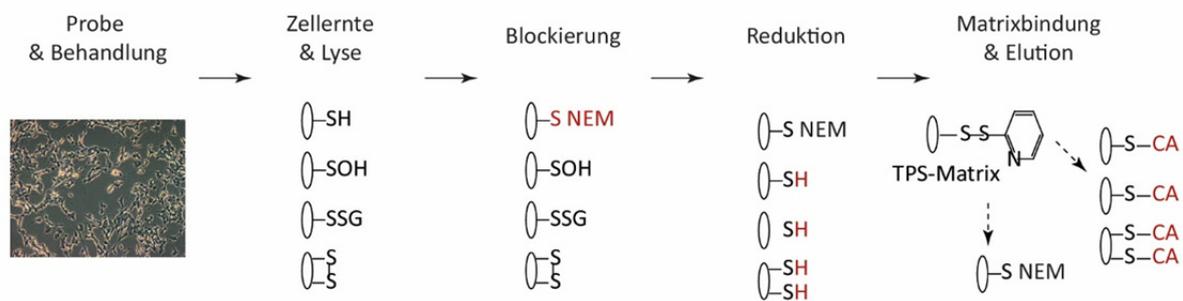


Abbildung 4.16 Schematischer Arbeitsablauf für die redox-spezifische Proteomanalytik.

Die Zellen wurden mit $10\ \mu\text{M}$ Retinsäure, $0,5\ \text{mM}$ Diamid oder dem Kontrollreagenz EtOH behandelt. Anschließend erfolgte die Zellernte unter sauren Bedingungen. Die Lyse wurde optional unter Zugabe des Blockierungsreagenz N-Ethylmaleimid (NEM) durchgeführt. Im Anschluss wurden die vormals oxidierten Cysteine reduziert und an die Thiopropyl-Sepharose 6B-Matrix (TPS-Matrix) gebunden. Nach erfolgreicher Elution wurden die Proteine über einen *in-gel*-Verdau aufgearbeitet (nicht dargestellt) und in diesem Prozess mittels Iodacetamid carbamidomethyliert (CA). SH: Thiol, SOH: Sulfenylierung, SSG: Glutathionylierung, SS: Disulfidbrücke.

4.4.1 Veränderungen infolge der Behandlung mit dem Oxidationsmittel Diamid

Um die Methode zu etablieren, wurde zunächst eine differenzielle Analyse reversibel oxidiertes Proteine infolge einer Behandlung mit dem Thiol-spezifischen Oxidationsmittel Diamid durchgeführt. SH-SY5Y-Zellen wurden für 15 min mit $0,5\ \text{mM}$ Diamid behandelt ($n=5$). Diamid oxidiert in einer Zweischritt-Reaktion intrazelluläres GSH zu GSSG und induziert dadurch die Bildung von gemischten Protein-SSG-Disulfiden (Hansen, Roth, & Winther, 2009; Kosower & Kosower, 1995; Kosower, Kosower, Wertheim, & Correa, 1969; Schuppe, Moldeus, & Cotgreave, 1992). Um irreversible Überoxidationen zu vermeiden, wurde auf die Zugabe von H_2O_2 als Oxidationsmittel verzichtet. Insgesamt konnten für 1863 Proteine quantitative Daten erhoben werden. Proteine, die kein Cystein trugen, wurden zuvor aus dem Datensatz entfernt (4%). In einer Hauptkomponentenanalyse lassen sich die durch die Behandlung hervorgerufenen Unterschiede beider Gruppen

vereinfacht darstellen (Abbildung 4.17A). Ein paarweiser Vergleich der quantifizierten Proteine in den Diamid-behandelten und Kontrollproben (EtOH) zeigt, dass 254 Proteine eine erhöhte Abundanz nach der Diamidbehandlung und 53 nach der Kontrollbehandlung aufwiesen. (Abbildung 4.17B). Infolge der Aufarbeitung über die TPS-Matrix, weist eine erhöhte Proteinabundanz in dem Redox-Proteom auf eine erhöhte Abundanz einer oxidierten Proteinspezies hin.

Aufgrund der TPS-Matrix assistierten Aufarbeitung wurden die potenziell reversibel oxidierten Cysteine, welche an die TPS-Matrix gebunden haben, durch eine Carbamidomethylierung und die verbleibenden Cysteine durch NEM markiert. Damit weist eine erhöhte Abundanz der carbamidomethylierten Peptidspezies sowohl auf eine vermehrte reversible Oxidation als auch auf das betreffende Cystein hin. (3.9.5). Die quantitative Auswertung der carbamidomethylierten Peptide zeigte, dass unter der Verwendung des Oxidationsmittels Diamid erhöhte Abundanzen von Peptiden in der carbamidomethylierten Form detektiert wurden. Es konnten quantitative Daten für 865 Proteine, die mit mindestens einem carbamidomethylierten Peptid identifiziert wurden, erhoben werden (Abbildung 4.17B, graue Markierung). Von den insgesamt 1241 zur Quantifizierung genutzten carbamidomethylierten Peptiden zeigten 552 eine signifikant erhöhte Abundanz in den oxidierten Proben. Darunter befinden sich carbamidomethylierte Peptide von Proteinen mit bereits beschriebenen redox-sensitiven Cysteinen (z. B. Cys-91 von PRDX6, $p = 3 \times 10^{-5}$; Abbildung 4.17C). Die erhöhte Abundanz von Proteinen und carbamidomethylierten Peptiden in dem Redox-Proteom, nach der Behandlung mit dem Oxidationsmittel Diamid, deutet auf eine erfolgreiche Aufarbeitung von reversibel oxidierten Proteinen hin.

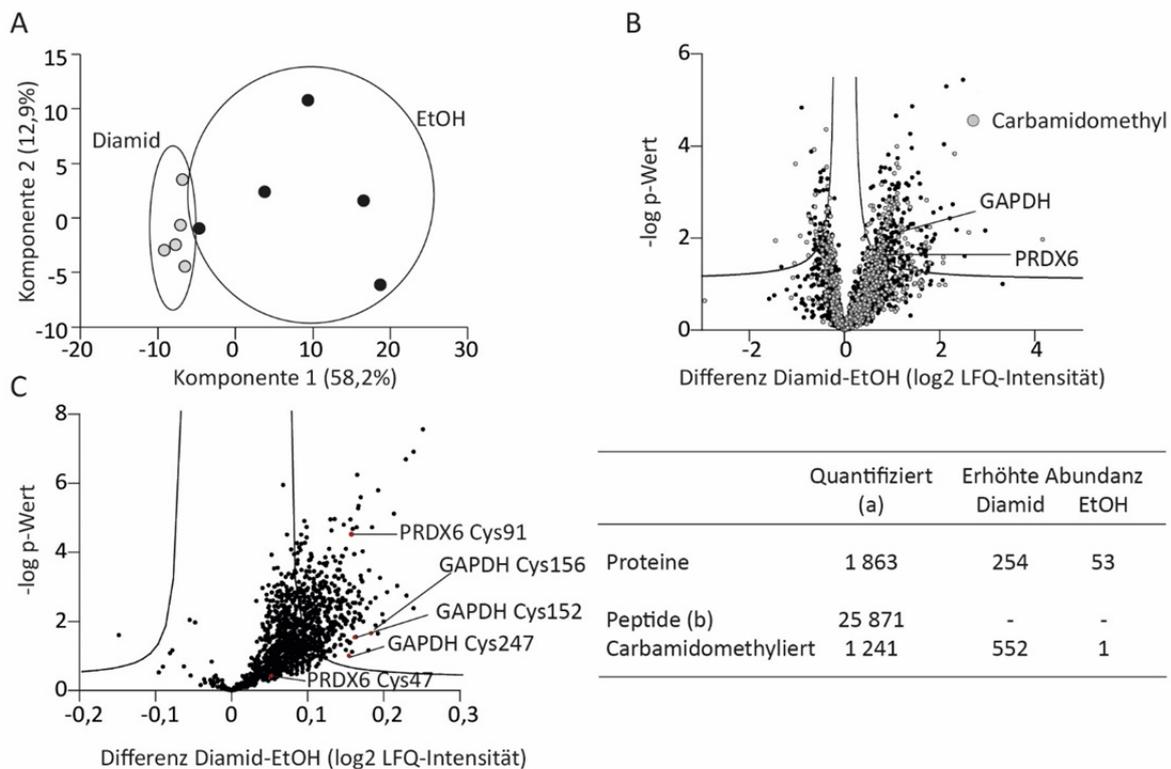


Abbildung 4.17 Diamid-induzierte Veränderungen des Redox-Proteoms.

Differenzielle Analyse reversibel oxidiertes Proteine von SH-SY5Y-Zellen nach 15 min Behandlung mit 0,5 mM Diamid oder der Kontrolle (EtOH). (A) Die quantifizierten Proteine beider Gruppen (umrandet) unterscheiden sich anhand des Behandlungszustandes. Durch die 1. Hauptkomponente können 58,2% und durch die 2. Hauptkomponente 12,9% der Varianzen erklärt werden. (B) Paarweiser Vergleich der quantifizierten Proteine zur Visualisierung statistisch signifikanter Differenzen mithilfe eines Volcano Plots (FDR=0,05). Proteine, welche infolge der Diamid- oder Kontrollbehandlung eine erhöhte Abundanz in dem Redox-Proteom aufwiesen, also potenziell reversibel oxidiert sind, liegen oberhalb der eingezeichneten Tusher-Linie ($S_0 = 0,1$). Bei 865 Proteinen wurden Peptide mit mindestens einem carbamidomethylierten Cystein identifiziert und quantifiziert (graue Punkte). (C) Die gleiche Abbildung wie in (B), jedoch wurden die Daten auf Basis der normalisierten Intensitäten carbamidomethylierter Peptide, mit einer FDR = 0,05 und $S_0 = 0,05$, berechnet. Die Normalisierung erfolgte auf die mittlere LFQ-Intensität des jeweiligen Proteins innerhalb der Gruppe. (a) Cysteinhaltige Proteine. (b) Summe der zur Quantifizierung genutzten spezifischen (*unique*) und nicht eindeutig zu einer Proteingruppe zugeordneten (*razor*) Peptide.

4.4.2 Veränderungen infolge der zweistündigen Retinsäurebehandlung

Nachfolgend wurden redox-spezifische Änderungen in retinsäurebehandelten und Kontrollzellen analysiert. SH-SY5Y-Zellen wurden wie bereits beschrieben für 2 Std. mit Retinsäure oder der Lösungsmittelkontrolle (EtOH) behandelt, geerntet, aufgearbeitet und analysiert ($n = 5, 3, 6$). Insgesamt wurden für 1 813 Proteine quantitative Daten erhoben. Die nachfolgende Analyse beinhaltet die 1 769 cysteintragenden Proteine (Cys_{ox} -TPS). Ein paarweiser Vergleich zeigt eine differenzielle Abundanz von 275 Proteinen, von denen 241 vermehrt in den retinsäurebehandelten und 34 in den Kontrollzellen quantifiziert wurden (Abbildung 4.18A und Anhang 6, Tabelle 6.4). Unter diesen 275 Proteinen befinden sich unter anderem die redox-aktiven Peroxiredoxine (PRDX1, $p = 4,8 \times 10^{-3}$; PRDX5, $p = 6,9 \times 10^{-3}$ und PRDX6, $p = 0,02$) und vier der zuvor genannten Proteine des klassischen Retinsäure-

Signalweges (z. B. RBP1, $p = 0,03$ und SNW1, $p = 0,002$). Da es sich bei den 275 Proteinen um potenziell reversibel oxidierte Proteine handelt, werden diese nachfolgend als Kandidatenproteine bezeichnet.

Weiter wurde überprüft, ob die Abundanzunterschiede der Proteine innerhalb des Redox-Proteoms auf dem Thiolstatus der Proteine basieren. Zu diesem Zweck wurden identisch behandelte Proben aufgearbeitet jedoch, anders als bei dem zuvor gezeigten Cys_{ox}-TPS, mit einem DTT-haltigen Puffer aufgeschlossen. Dadurch wurden die TPS-Matrix-reaktiven Cysteine zu der Thiolform reduziert und für die TPS-Matrix zugänglich gemacht (Thiol-TPS, $n = 5$). Nach der massenspektrometrischen Analyse zeigte sich, dass das Replikat EtOH-5 auch nach wiederholter Messung eine um das 13-fach erhöhte Signalintensität aufwies (Anhang 6, Abbildung 6.2). Daher wurde EtOH-5 aus der nachfolgenden Analyse ausgeschlossen. Insgesamt wurden in den verbleibenden neun Proben 1817 cysteinhaltige Proteine quantifiziert. Der Vergleich dieser 1817 Proteine zeigte eine signifikante Erhöhung der LFQ-Intensität von drei Proteinen nach Retinsäurebehandlung (*guanine nucleotide-binding protein-like 3-like protein/GNL3L*, *vacuolar protein sorting-associated protein 26B/VPS26B*, *signal peptides complex subunit-2/SPCS2*) und bei einem in der Kontrolle. Zu den quantifizierten Proteinen zählen ebenfalls die 275 Kandidatenproteine. Bei 274 wurde nach der Zugabe des Reduktionsmittels DTT keine signifikante Abundanzänderung detektiert (Abbildung 4.18B, rote Markierung). Lediglich das zuvor erwähnte SPCS2 bildete eine Ausnahme, da dieses eine signifikant erhöhte Abundanz in dem Cys_{ox}-TPS- und Thiol-TPS-Redox-Proteom aufwies.

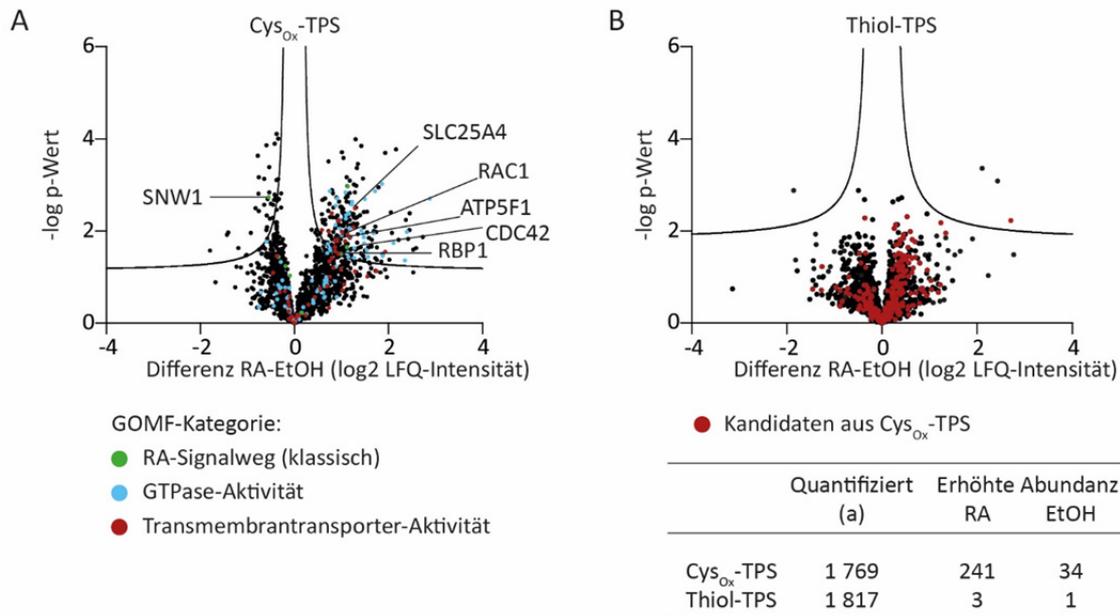


Abbildung 4.18 Retinsäure-induzierte Veränderungen des Redox-Proteoms.

Differenzielle Abundanz reversibel oxidiertes (CysOx-TPS, A), und durch DTT-Zugabe reduziertes (Thiol-TPS, B), Proteine in SH-SY5Y-Zellen nach 2 Std. Behandlung. Proteine welche infolge der Retinsäure (RA)- oder Kontrollbehandlung (EtOH) eine erhöhte Abundanz in dem Redox-Proteom aufwiesen, liegen oberhalb der eingezeichneten Tusher-Linie (FDR=0,05 und S0=0,1). Basierend auf einer 1D-Anreicherungsanalyse sind die Proteine verschiedener GO-Kategorien (*molecular function*; GOMF) farbig markiert. Von den 275 Kandidatenproteinen mit einer signifikant erhöhten oder verringerten Abundanz in dem CysOx-TPS-Datensatz (A), zeigte nur eines eine erhöhte Abundanz in dem Thiol-TPS-Datensatz (rot markiert in B). Identifizierte Komponenten des Retinsäure-Signalweges sind in (B) rot markiert. (a) Bezogen auf cysteininhaltige Proteine.

Nachfolgend wurde innerhalb des Redox-Proteoms überprüft, ob es durch die Retinsäurebehandlung zu einer erhöhten Abundanz von Proteinen kommt, die bestimmten molekularen Funktionen zugeordnet werden können (Tabelle 4.3). Die 1D-Anreicherungsanalyse (3.9.9) zeigte, dass guanin-nukleotidbindende Proteine und Proteine mit GTPase-Aktivität nach Retinsäurebehandlung mit erhöhter Abundanz detektiert wurden. Darunter die kleinen GTPasen der Rho (*ras-homologue*)-Familie: *ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (RAC1) ($p=0,01$) und *cell division control protein-42* (CDC42, $p=0,02$), welche maßgeblich an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind. Auch Proteine die mit der GO-Kategorie *substrate-specific transmembrane transporter activity* assoziiert sind wurden nach der Retinsäurebehandlung mit einem potenziell erhöhten Oxidationszustand identifiziert. Bei diesen handelt es sich größtenteils um mitochondriale Proteine und solche, die mit energetischen Prozessen in Zusammenhang stehen (z.B. die mitochondriale *ATP synthase F(0) complex subunit B1/ATP5F1*, $p=0,01$ und die *ADP/ATP translocase-1/SLC25A4*, $p=0,004$).

Tabelle 4.3 Funktionelle Anreicherungsanalyse potenziell reversibel oxidierter Proteine.

Mittels 1D-Anreicherungsanalyse wurde überprüft, ob Proteine der GO-Kategorie *molecular function* eine erhöhte oder verringerte Abundanz in den 2 Std. retinsäurebehandelten Zellen verglichen zu den Kontrollzellen (EtOH) aufweisen. Als Grenze für die Ausgabe angereicherter GO-Kategorien wurde ein Benjamini-Hochberg korrigierter p-Wert $\leq 0,01$ gesetzt.

GO-Kategorie	Anzahl Proteine	Score	p-Wert
Catalytic activity	808	0,14	$1,30 \times 10^{-4}$
GDP binding	23	0,68	$4,55 \times 10^{-6}$
GTP binding	108	0,34	$1,65 \times 10^{-6}$
GTPase activity	85	0,37	$3,37 \times 10^{-6}$
Guanyl nucleotide binding	109	0,33	$3,16 \times 10^{-6}$
Guanyl ribonucleotide binding	109	0,33	$2,37 \times 10^{-6}$
Myosin binding	11	0,73	$2,38 \times 10^{-3}$
Oxidoreductase activity	125	0,29	$1,43 \times 10^{-5}$
Structural constituent of ribosome	59	0,50	$1,13 \times 10^{-7}$
Substrate-specific transmembrane transporter activity	51	0,35	$2,18 \times 10^{-3}$
Threonine-type peptidase activity	11	0,72	$3,05 \times 10^{-3}$
Adenyl nucleotide binding	314	-0,17	$3,84 \times 10^{-4}$
ATP binding	310	-0,18	$1,18 \times 10^{-4}$
ATPase activity	112	-0,24	$1,80 \times 10^{-3}$
ATP-dependent RNA helicase activity	38	-0,36	$8,68 \times 10^{-3}$
DNA binding	188	-0,22	$2,05 \times 10^{-4}$
Helicase activity	58	-0,34	$1,02 \times 10^{-3}$
Nucleocytoplasmic transporter activity	9	-0,76	$6,46 \times 10^{-3}$
RNA-dependent ATPase activity	38	-0,36	$8,06 \times 10^{-3}$
Sequence-specific DNA binding	52	-0,35	$1,77 \times 10^{-3}$
Zinc ion binding	92	-0,28	$6,35 \times 10^{-4}$

Eine besondere Relevanz in dem untersuchten Kontext hat das Kandidatenprotein RAC1 (Abbildung 4.19A). RAC1 ist eine regulatorische Untereinheit des NOX-Komplexes und steht in einem direkten Zusammenhang mit der Aktivität der Rezeptor-Tyrosin-Kinase RET (Fukuda, Kiuchi, & Takahashi, 2002). RAC1 wurde ebenfalls in den Proteomstudien dieser Arbeit quantifiziert und zeigte eine Retinsäure-unabhängige Abundanz in den ersten 48 Std. (Abbildung 4.19B). Die Abundanz des Proteins sinkt nach 120 Std. sowohl in retinsäurebehandelten Zellen als auch in den Kontrollzellen (Abbildung 4.19C).

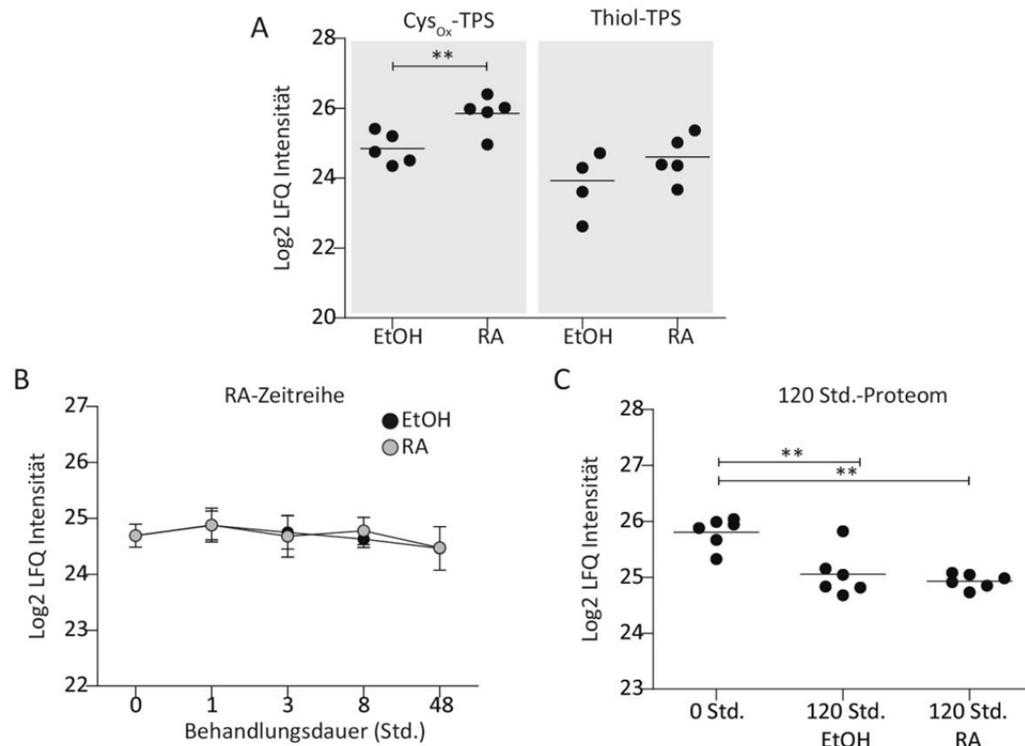


Abbildung 4.19 RAC1 als Kandidatenprotein für eine reversible Oxidation nach Retinsäurebehandlung.

(A) Redox-Proteom: RAC1 zeigte signifikant unterschiedliche Abundanzen in Retinsäure (RA)-behandelten und Kontrollzellen (EtOH, Cys_{ox}-TPS), was auf eine reversible Oxidation des Proteins hinweist. Diese Unterschiede werden nach Zugabe des Reduktionsmittels DTT nicht mehr detektiert (Thiol-TPS). (B) In der Proteomstudie RA-Zeitreihe wurden zwischen 0-48 Std. keine Abundanzunterschiede aufgrund der Behandlung detektiert. (C) Nach 120 Std. sank die Abundanz des Proteins RAC1 sowohl in den RA-behandelten als auch in den Kontrollzellen. Die statistische Auswertung wurde auf log₂ transformierte Werte angewandt und erfolgte (A) über die SAM-Methode, mit einer FDR=0,05 und einem konstanten S0=0,1 oder einer zweifaktoriellen (B) bzw. einfaktoriellen (C) Varianzanalyse mit anschließendem Vergleichstest nach Tukey sowie einer Korrektur nach Benjamini-Hochberg. Die Sterne markieren einen p-Wert **p ≤ 0,01 und ***p ≤ 0,001.

4.4.3 Quantifizierung carbamidomethylierter Peptide als Hinweis auf redox-sensitive Cysteine

Um Hinweise auf die potenziell oxidierten Cysteine der 275 Kandidatenproteine zu erlangen, wurden die Daten des vorangegangenen Experiments auf Ebene der carbamidomethylierten Peptide betrachtet. Es konnten quantitative Daten für 129 carbamidomethylierte Peptide an 57 Proteinen erhoben werden. Beispielsweise für die Cysteine Cys18 und Cys81 der kleinen GTPase CDC42, für das katalytisch aktive Cystein des redox-aktiven PRDX5 (Cys100, p=0,01) und für beide Cysteine von PRDX6 (Cys91, p=0,01 und das katalytisch aktive Cys47). Insgesamt wiesen 72 carbamidomethylierte Peptide eine statistisch signifikante erhöhte Abundanz in Abhängigkeit von der Retinsäurebehandlung auf und geben damit einen Hinweis auf das potenziell reversibel oxidierte Cystein (Abbildung 4.20 und Anhang 6, Tabelle 6.5).

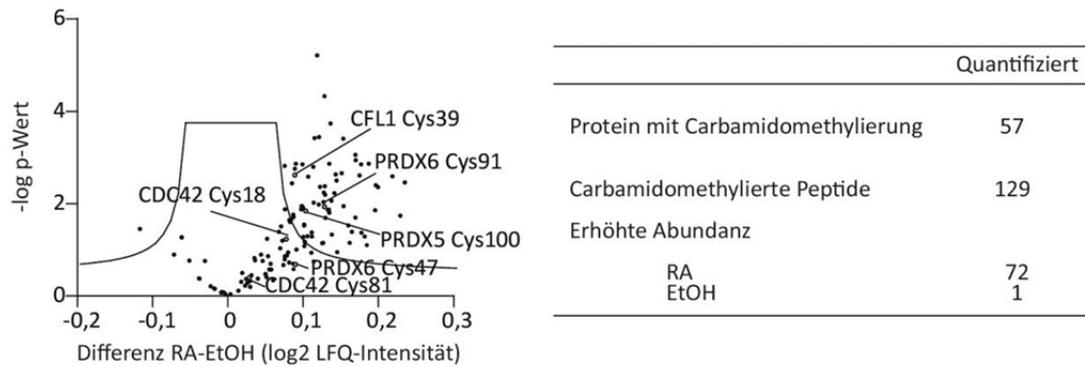


Abbildung 4.20 Quantifizierung der carbamidomethylierten Peptide des Redox-Proteoms.

Die carbamidomethylierten Peptide geben einen Hinweis auf das potenziell reversibel oxidierte Cystein. Innerhalb der 275 Kandidatenproteine konnten quantitative Daten für 129 carbamidomethylierte Peptide erhoben werden. Carbamidomethylierte Peptide welche infolge der Retinsäure (RA)- oder EtOH-Behandlung eine erhöhte Abundanz in dem Redox-Proteom aufwiesen, liegen oberhalb der eingezeichneten Tusher-Linie (FDR = 0,05 und $S_0 = 0,05$).

4.4.4 Überprüfung der Abundanzveränderungen in dem Redox-Proteom

Bei 275 Proteinen wurde eine veränderte Abundanz in dem Redox-Proteom detektiert, welche ein Indiz für eine reversible Oxidation infolge der Retinsäurebehandlung und damit ein Hinweis auf ein redox-sensitives Protein ist. Diese Abundanzveränderung wurde nachfolgend in einem unabhängigen Experiment überprüft. Zu diesem Zweck wurde erneut eine globale Analyse des Redox-Proteoms durchgeführt, jedoch erfolgt die Quantifizierung der Peptide über die Methode der Stablen Isotopen Markierung von Aminosäuren in der Zellkultur (SILAC, Ong et al., 2002). Ein Vorteil der Quantifizierung über SILAC liegt darin, dass die Proben direkt nach dem Zellaufschluss vereint und ab diesem Schritt gemeinsam prozessiert werden können. Varianzen durch unterschiedliche Proben-vorbereitung werden somit reduziert (N. Q. Liu et al., 2013). Für diesen Zweck wurden zusätzlich zu den mit Retinsäure behandelten und Kontrollzellen, EtOH-behandelte Zellen in Medium kultiviert, welches die isotopenmarkierten Aminosäuren L-Lys+4/L-Arg+10 enthielt (schwere Markierung). Nach der Zelllyse wurden die Retinsäure- und Kontrollproben in gleichem Verhältnis mit den isotopenmarkierten Proben kombiniert (3.3.1). Im Anschluss daran wurden diese wie zuvor beschrieben über die Methode der redox-spezifischen Proteomanalyse aufgearbeitet und massen-spektrometrisch analysiert ($n = 5$).

Der experimentelle Ansatz ergab 228 quantifizierbare Ratios von leicht zu schwer markierten Proteinen ($R_{L/S}$). In vielen Fällen war die Bildung der SILAC-Ratios nicht möglich, da bei den schwer markierten Proben die Signale fehlten. Zudem zeigten die fünf Kontrollen eine hohe Abweichung untereinander. Durch die angelegten Filterkriterien (mindestens drei Proteinidentifizierungen pro Behandlungszustand; 3.9), reduzierte sich die Anzahl der für die Auswertung genutzten SILAC-Ratios von 419 identifizierten auf 228 zur Quantifizierung genutzten. Einhundertneundneunzig (11%) der

in dem vorangegangenen Experiment (Cys_{ox}-TPS) quantifizierten Proteine wurden in diesem Experiment erneut quantifiziert, darunter 39 der Kandidatenproteine (14%). Für jedes quantifizierbare Protein zeigte die Ratio (Retinsäure/EtOH) der mittleren $R_{L/S}$ an, nach welcher Behandlung das Protein eine erhöhte Abundanz in dem Redox-Proteom aufwies. Damit gibt die Ratio (Retinsäure/EtOH) einen Hinweis darauf, dass mehr potenziell redox-sensitives Protein vorliegt. In Tabelle 4.4 sind die 23 potenziell redox-sensitiven Kandidatenproteine aufgelistet, welche eine Ratio Retinsäure/EtOH ≤ 1 (erhöht in der Kontrolle) oder ≥ 1 (erhöht nach Retinsäurebehandlung) aufwiesen.

Tabelle 4.4 Überprüfen der Abundanzveränderung der redox-sensitiven Kandidatenproteine.

Für eine unabhängige Überprüfung der Kandidatenproteine wurde die Aufarbeitung des Redox-Proteoms in SH-SY5Y-Zellen 2 Std. nach Retinsäure (RA)- oder Kontrollbehandlung (EtOH) wiederholt. Die Proteine wurden mittels SILAC markiert und anschließend quantifiziert (n = 5). Dargestellt sind die 23 Kandidatenproteine die eine Ratio (RA/EtOH), gebildet aus den mittleren log₂ Ratios Leicht/Schwer ($R_{L/S}$), ≤ 1 (erhöhte Abundanz in der Kontrolle) oder ≥ 1 (erhöhte Abundanz nach Retinsäurebehandlung) aufwiesen.

Proteinname	Genname	Ratio (RA/EtOH)	Anzahl Peptide (a)	Sequenz Abdeckung (% a)
14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	13,5	7	34,3
ADP/ATP translocase-3	SLC25A6	5,6	3	11,1
Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	GNAI3	2,4	5	16,1
Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A1	2,4	16	41,1
ADP/ATP translocase 2; ADP/ATP translocase-2	SLC25A5	2,3	8	27,2
Thioredoxin domain-containing protein-5	TXNDC5	1,9	10	20,8
60S ribosomal protein L13a	RPL13A	1,5	3	16,7
14-3-3 protein epsilon	YWHAE	1,4	10	45,1
Adenosylhomocysteinase	AHCY	1,4	8	19,9
14-3-3 protein theta	YWHAQ	1,4	13	50,2
Profilin-1	PFN1	1,3	5	47,1
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1	1,1	8	23,5
Peroxiredoxin-6	PRDX6	1,1	11	46,4
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like1	GNB2L1	1,1	4	15,5
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRNPA1; HNRNPA1L2	1,1	9	30,4
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	UBE2K	1,1	6	41,5
L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	1,0	10	25,9
60S acidic ribosomal protein P0	RPLP0; RPLPOP6	1,0	10	40,7
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1	$R_{L/S}$ RA:0,6 (b)	8	40,6
Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	1,0	20	39,6
Splicing factor 3B subunit 2	SF3B2	0,9	12	16,2
RNA-binding protein MEX3A	MEX3A	0,9	7	22,5
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	SFPQ	0,8	15	24,3

a Zur Quantifizierung genutzte Peptide (*unique* und *razor*).

b In der Kontrolle wurden keine Peptide quantifiziert.

4.5 Manipulation des zellulären Redoxzustandes retinsäurebehandelter SH-SY5Y-Zellen

Die zweistündige Retinsäurebehandlung führte zu einem signifikanten Anstieg reaktiver Spezies (4.3). Während es zu Beginn der neuronalen Differenzierungsprozesse nur zu geringen Veränderungen des Proteoms kommt (4.2.3), wurden profunde Veränderungen des Redox-Proteoms detektiert (4.4.2), welche unter anderem Proteine des Retinsäure-Signalweges als auch Proteine des Zytoskeletts betrafen. Diese Ergebnisse geben weitere Hinweise auf die Beteiligung verschiedener redox-sensitiver Proteine an den frühen neuronalen Differenzierungsprozessen. Um diese Hypothese detaillierter zu analysieren, soll neben den direkten Veränderungen durch entstehende ROS, den reversiblen Oxidationen an den Proteinen, auch ein indirekter ROS-Effekt untersucht werden. Um dies zu erreichen wurde der Redoxzustand der Zellen verändert und die Auswirkungen auf das Proteom und die zelluläre Morphologie betrachtet.

Die Veränderung des Redoxzustandes erfolgte durch Zugabe von zwei verschiedenen Wirkstoffen. Zum einen durch das Reduktionsmittel N-Acetylcystein (500 μM NAC) und zum anderen durch den Radikalfänger Butylhydroxyanisol (150 μM BHA). Ausgehend von dem gezeigten H_2O_2 -Anstieg nach 2Std. (4.3.3 und 4.3.4), erfolgte die Behandlung mit den Wirkstoffen zeitgleich zu der Retinsäurebehandlung. Da in den vorherigen Experimenten nach 48 Std. sowohl größere Veränderungen des Proteoms als auch eine signifikante Veränderung des Phänotyps detektiert werden konnten (4.1 und 4.2.3), wurden die Zellen erneut zu diesem Zeitpunkt analysiert. Um zu überprüfen, ob es infolge der Wirkstoffe zu detektierbaren Veränderungen des zellulären Redoxzustandes kommt, wurde die Fluoreszenz von CellROX Green gefärbten SH-SY5Y-Zellen quantifiziert. In den BHA- oder NAC-behandelten Zellen wurde jeweils eine geringere Fluoreszenzintensität detektiert als in der un-behandelten Kontrolle (Abbildung 4.21A).

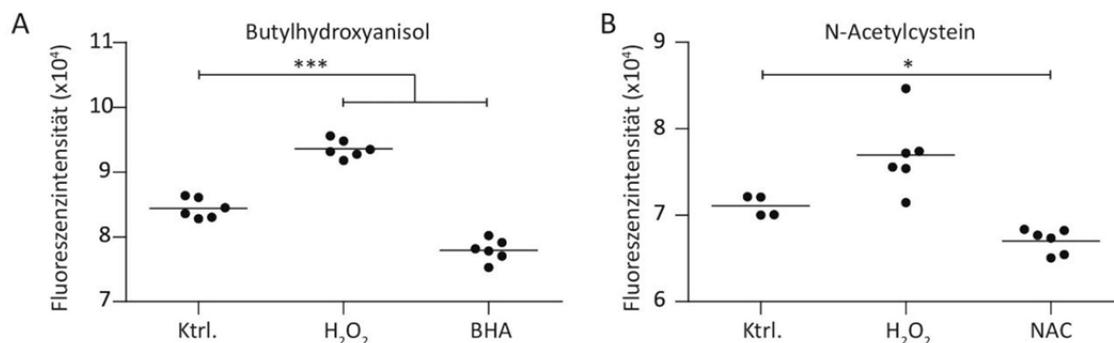


Abbildung 4.21 BHA und NAC reduzieren die Fluoreszenzintensität des redox-sensitiven Farbstoffes.

Die Quantifizierung zeigte, dass durch die Zugabe von (A) Butylhydroxyanisol (BHA) und (B) N-Acetylcystein (NAC) die Fluoreszenzintensität von CellROX Green im Vergleich zu der Kontrollzelle (Ktrl.) sinkt. Angegeben sind die Signalintensitäten der sechs Replikate bzw. vier bezogen auf die Ktrl. des Experimentes B. Die horizontale Linie markiert jeweils den Mittelwert. Mittels einer Varianzanalyse wurde überprüft, ob es durch Zugabe der Wirkstoffe zu signifikanten Unterschieden kommt. Die Sterne markieren einen p-Wert $* \leq 0,05$ und $*** \leq 0,001$.

4.5.1 Differenzielle Proteomstudie nach BHA- bzw. NAC-Behandlung

Um den Einfluss der Wirkstoffe NAC und BHA mittels einer differenziellen Proteomanalyse zu untersuchen, wurden SH-SY5Y-Zellen mit Retinsäure (RA) und zusätzlich mit einer Kombination aus Retinsäure und NAC (RA+NAC) bzw. BHA (RA+BHA) kultiviert. Als Kontrolle diente für alle zugegebenen Substanzen das Lösungsmittel EtOH. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Zellen für die markierungsfreie Proteomanalytik aufgearbeitet und analysiert (n = 5, Wirkstoff-Studie).

Insgesamt wurden 2760 Proteine identifiziert und für 1261 Proteine quantitative Daten erhoben. Zunächst wurden die 39 Proteine mit einer signifikant erhöhten oder verringerten Abundanz nach der Retinsäurebehandlung mit den zuvor beschriebenen Proteinen aus der RA-Zeitreihe, zu dem Zeitpunkt 48 Std., verglichen (Anhang 6, Tabelle 6.2). Für elf der genannten Proteine konnte in diesem Experiment die differenzielle Abundanz bestätigt werden ($p \leq 0,05$), darunter die Proteine mit der größten relativen Änderung (Ratio RA/EtOH ≥ 4 , z.B. CRABP2, RET, PRSS12, VGF und CYP26A1). In einer Hauptkomponentenanalyse lassen sich die Gruppen-Unterschiede, hervorgerufen durch die Retinsäurebehandlung oder Verwendung der Wirkstoffe, vereinfacht darstellen. Die 1. Hauptkomponente erklärt 17,9% der Varianz, die 2. Hauptkomponente 13%. Die durch BHA induzierten quantitativen Änderungen im Proteom waren im Vergleich zu dem Effekt, der durch NAC ausgelöst wurde größer (Abbildung 4.22A). Durch Retinsäure wurde die Abundanz von 39 Proteinen verändert, BHA und NAC hatten einen Einfluss auf die Abundanz von 59 bzw. 17 Proteinen ($p \leq 0,05$). Dreiundzwanzig Proteine wurden durch beide Wirkstoffe beeinflusst (Abbildung 4.22B).

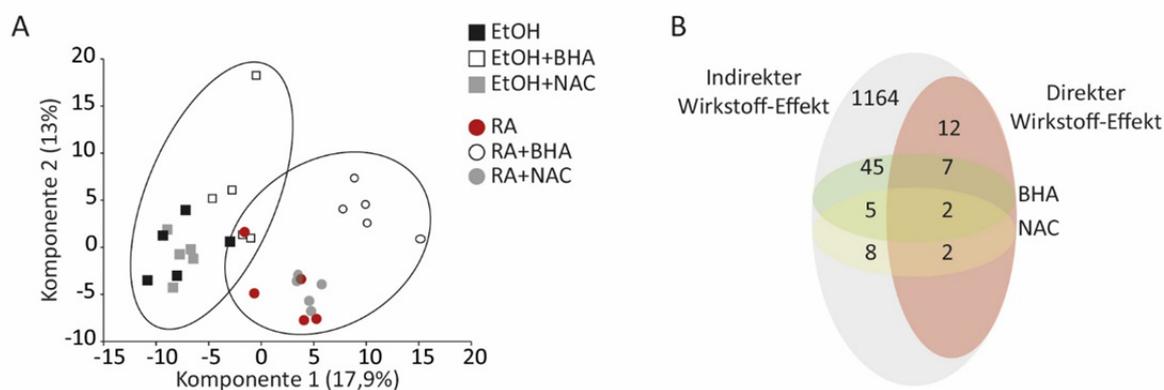


Abbildung 4.22 Einfluss von BHA und NAC auf das Proteom von retinsäurebehandelten SH-SY5Y-Zellen.

Die Zellen wurden für 48 Std. mit Retinsäure (RA), RA und Butylhydroxyanisol (BHA) oder RA und N-Acetylcystein (NAC) behandelt. Als Kontrolle diente jeweils EtOH. (A) Die Hauptkomponentenanalyse verdeutlicht die Effekte, welche durch die RA-Behandlung bzw. die Zugabe der Wirkstoffe NAC oder BHA hervorgerufen wurden. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Varianz, welcher durch die entsprechende Hauptkomponente abgebildet wird. (B) Venn-Diagramm der quantifizierten Proteine. Die durch BHA oder NAC beeinflussten Proteine wurden in 2 Gruppen unterteilt. Direkter Wirkstoff-Effekt: Abundanz wurde durch RA und die Wirkstoffe verändert. Indirekter Wirkstoff-Effekt: Abundanz wurde nur durch die Wirkstoffe verändert.

Im Rahmen der statistischen Auswertung (3.9.6) wurde die Annahme getroffen, dass die Wirkstoffe entweder den zuvor ausgelösten Effekt der Retinsäure aufhoben bzw. verstärkten (direkter Wirkstoff-Effekt: BHA 28%, NAC 10%) oder aber die Abundanz von Proteinen modulierten, welche nicht durch die Retinsäure verändert wurden (indirekter Wirkstoff-Effekt: BHA 4%, NAC 1%; Abbildung 4.23 und Abbildung 4.22B). Anhang 6, Tabelle 6.6 beinhaltet alle Proteine mit einem direkten oder indirekten Wirkstoff-Effekt.

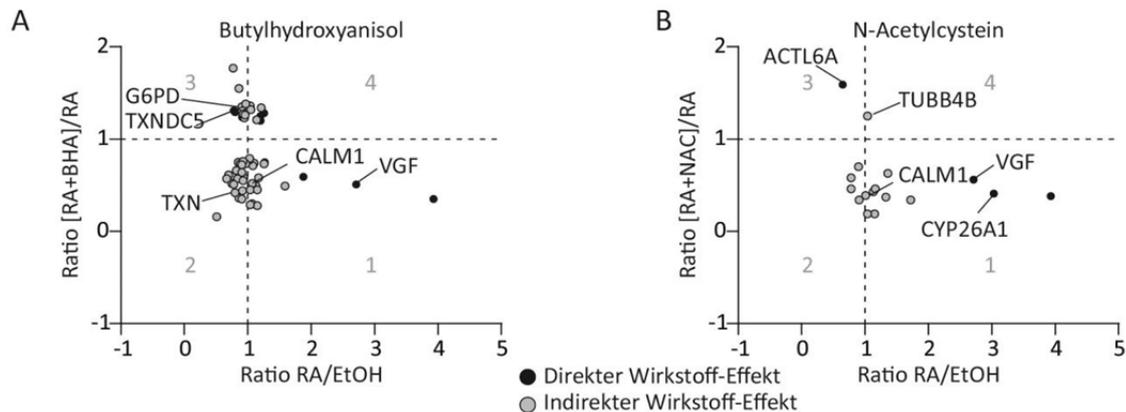


Abbildung 4.23 Direkter und indirekter Wirkstoff-Effekt.

Dargestellt sind die signifikant durch (A) N-Acetylcystein (NAC) oder (B) Butylhydroxyanisol (BHA) veränderten Proteine (\log_2 LFQ-Intensität). X-Achse: Ratio zwischen Retinsäure (RA)-Behandlung und Kontrolle (EtOH). Y-Achse: Ratio RA-Behandlung mit Wirkstoff und RA-Behandlung ohne Wirkstoff (Ratio [RA+Wirkstoff]/RA). Wird eine erhöhte Abundanz durch die Wirkstoffe aufgehoben, befindet sich die Markierung für das entsprechende Protein in dem ersten Quadranten. Bei dem umgekehrten Fall, eine verringerte Abundanz nach RA-Behandlung wird erhöht, liegt die Markierung des Proteins in dem dritten Quadranten. Wird der RA-Effekt durch die Wirkstoffe verstärkt, sind die betroffenen Proteine in dem zweiten (verringert) oder vierten (erhöht) Quadranten dargestellt.

Zu den Proteinen mit einem direkten Wirkstoff-Effekt zählen Proteine die bereits in der RA-Zeitreihe quantifiziert wurden, darunter das Markerprotein VGF (Abbildung 4.24A). Die Abundanz von VGF zeigte nach der Zugabe von BHA und NAC den Status der Kontrolle (VGF, Ratio [RA+BHA]/RA = 0,51, $p = 7,44 \times 10^{-5}$ und Ratio[RA+NAC]/RA = 0,56, $p = 6,25 \times 10^{-6}$). Knapp 30% der Retinsäure-sensitiven Proteine wurden von den Wirkstoffen beeinflusst (Abbildung 4.22). Der Rezeptor RET gehört zu den Proteinen, die keine Veränderung der Abundanz in Abhängigkeit von der BHA- oder NAC-Zugabe zeigten (Abbildung 4.24B). Ein Beispiel für einen indirekten Effekt beider Wirkstoffe ist *calmodulin-1* (CALM1, Abbildung 4.24C). Die Abundanz von CALM1 wird nicht durch die Retinsäurebehandlung verändert. Die Zugabe von Retinsäure in Kombination mit BHA oder NAC führte jedoch zu einer signifikant verringerten Menge des detektierten CALM1, verglichen zu der Probe welche nur mit Retinsäure stimuliert wurde (Ratio[RA+NAC]/RA = 0,43, $p = 2,91 \times 10^{-5}$ und Ratio[RA+BHA]/RA = 0,49 $p = 2,32 \times 10^{-4}$). Der Unterschied zwischen der Kontrolle mit und ohne Wirkstoff ist nicht signifikant.

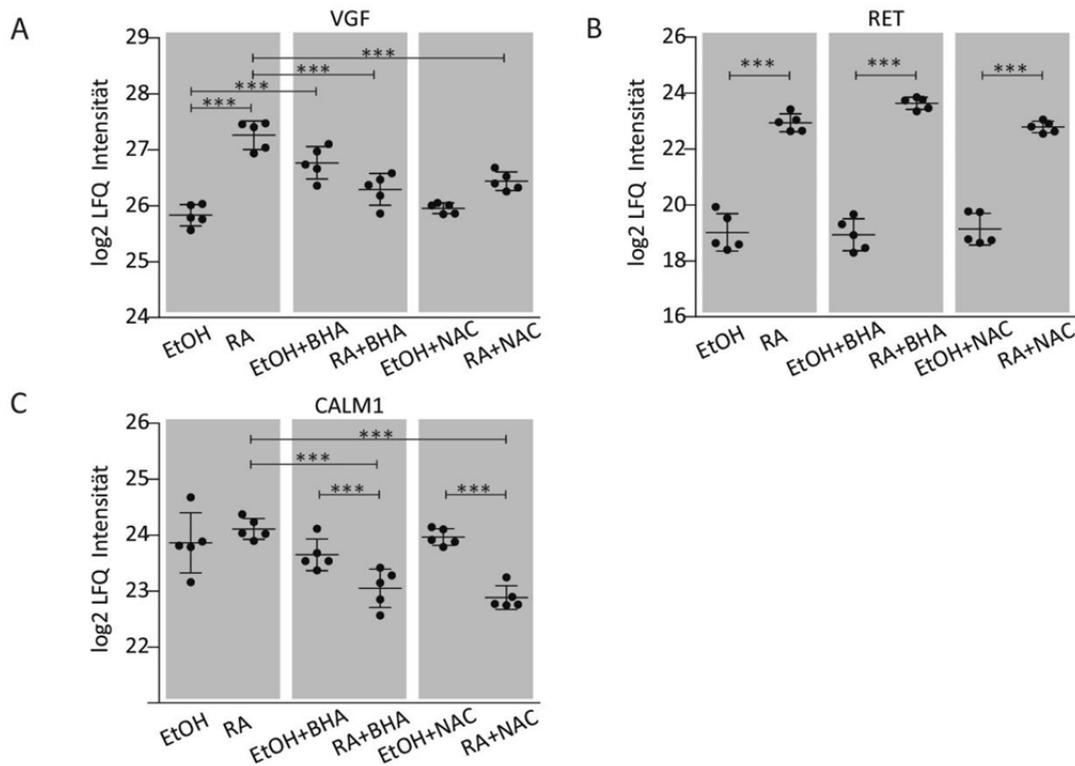


Abbildung 4.24 BHA und NAC verändern die Abundanz von VGF und CALM1, aber nicht von RET.

Beispiele für den Effekt der Wirkstoffe Butylhydroxyanisol (BHA) und N-Acetylcystein (NAC) auf Retinsäure (RA)-behandelte und Kontrollzellen (EtOH). (A) Direkter Wirkstoff-Effekt: *neurosecretory protein* (VGF), (B) die Abundanz der *proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor* (RET) wird von keinem der verwendeten Wirkstoffe beeinflusst und (C) Indirekter Wirkstoff-Effekt: *calmodulin-1* (CALM1). Die statistische Auswertung erfolgte über eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Vergleichstest nach Tukey. Die Sterne markieren einen p-Wert $***p \leq 0,001$.

4.5.1.1 Einfluss auf Proteine der zellulären Redox-Homöostase oder neurologischen Entwicklung

In der Annahme, dass durch die Zugabe von BHA oder NAC der zelluläre Redoxzustand beeinflusst wird, wurde überprüft ob Proteine, die für die zelluläre Redox-Homöostase zuständig sind, durch die Wirkstoffe verändert wurden (Tabelle 4.5). Dabei konnte die Beobachtung gemacht werden, dass durch BHA sowohl Proteine angesprochen wurden, die eine TXN-Aktivität aufweisen (TXN und *thioredoxin domain-containing protein-5/TXNDC5*) als auch Enzyme, die die zellulären Mengen von NAD(P)⁺/NAD(P)H verändern (z.B. *glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase/G6PD*). Die Zugabe von NAC beeinflusste keines der zuvor genannten Proteine. Keiner der Wirkstoffe führte zu einer Veränderung in der Abundanz der quantifizierten SODs, den detektierten Enzymen des GSH-Systems oder den detektierten Peroxiredoxinen.

Tabelle 4.5 Einfluss von BHA und NAC auf Proteine, die an der Kontrolle der zellulären Redox-Homöostase beteiligt sind.

Dargestellt sind ausgewählte Proteine, die RS innerhalb der Zelle kontrollieren oder den Redox-Haushalt der Zelle durch die Umsetzung von NAD(P)⁺/NAD(P)H verändern können. Die Ratio wurde aus den gemittelten LFQ-Intensitäten berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte über eine zweifaktorielle Varianzanalyse, mit anschließendem Vergleichstest nach Tukey sowie einer Korrektur nach Benjamini-Hochberg. Grau unterlegte Einträge weisen auf eine signifikante Abundanzänderung hin ($p < 0,05$). RA: Retinsäure, EtOH: Ethanol, BHA: Butylhydroxyanisol, NAC: N-Acetylcystein., Mito.: Mitochondrium, Cyt.: Zytosol

Proteinname	Genname	RA/EtOH	[RA+BHA] /RA	[RA+NAC] /RA	RA vs. EtOH	[RA+BHA] vs. RA	[RA+NAC] vs. RA
<u>Abbau von Superoxidanionen:</u>							
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1	0,73	0,78	0,99	0,83	0,97	1,00
Superoxide dismutase [Mn]	SOD2	1,34	0,92	0,83	0,54	1,00	0,91
<u>Abbau von H₂O₂:</u>							
Peroxiredoxin-4	PRDX4	1,04	1,06	0,91	1,00	1,00	0,91
Peroxiredoxin-5	PRDX5	0,99	1,03	0,91	1,00	1,00	0,92
Peroxiredoxin-6	PRDX6	0,91	1,11	1,04	0,79	0,75	0,99
<u>TXN- und GSH-System:</u>							
Thioredoxin	TXN	0,67	0,57	0,82	0,55	0,05	0,88
Thioredoxin domain-containing protein 5	TXNDC5	0,96	1,26	0,95	0,99	0,04	0,98
Thioredoxin reductase 1	TXNRD1	1,88	1,17	0,82	0,14	1,00	0,98
Glutaredoxin-3	GLRX3	1,01	1,27	1,33	0,99	0,77	0,62
Glutathione peroxidase 1	GPX1	1,01	0,94	1,08	1,00	1,00	0,98
Glutathione reductase	GSR	0,91	1,95	1,61	1,00	0,30	0,69
<u>NADPH-Bereitstellung:</u>							
Fructose-bisphosphate aldolase-A	ALDOA	0,91	1,31	1,13	0,79	0,01	0,55
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD	0,92	1,24	1,03	0,75	0,02	1,00
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2	NDUFV2	1,04	0,45	0,68	1,00	0,05	0,60

Die zuvor gezeigten Ergebnisse der RA-Zeitreihe (4.2.3) zeigten, dass es innerhalb von 48 Std. zu differenziellen Abundanzänderungen von Proteinen kommt, die bei der Entwicklung anatomischer Strukturen eine Rolle spielen. Daher stellte sich die Frage, ob neurologisch aktive Proteine, die beispielsweise an dem Neuritenwachstum beteiligt sind oder einen Einfluss auf morphologische Prozesse haben, durch die Zugabe der Wirkstoffe beeinflusst wurden. Beide Wirkstoffe beeinflussten Proteine die an der Entwicklung von anatomischen Strukturen, des Axons oder des Nervensystems beteiligt sind, z. B. *tubulin β -4B chain* (TUBB4B) und *actin-like protein-6A* (ACTL6A). Die Abbildung 4.25 zeigt, dass die Abundanz der Proteine durch die Wirkstoffe tendenziell verringert wurde.

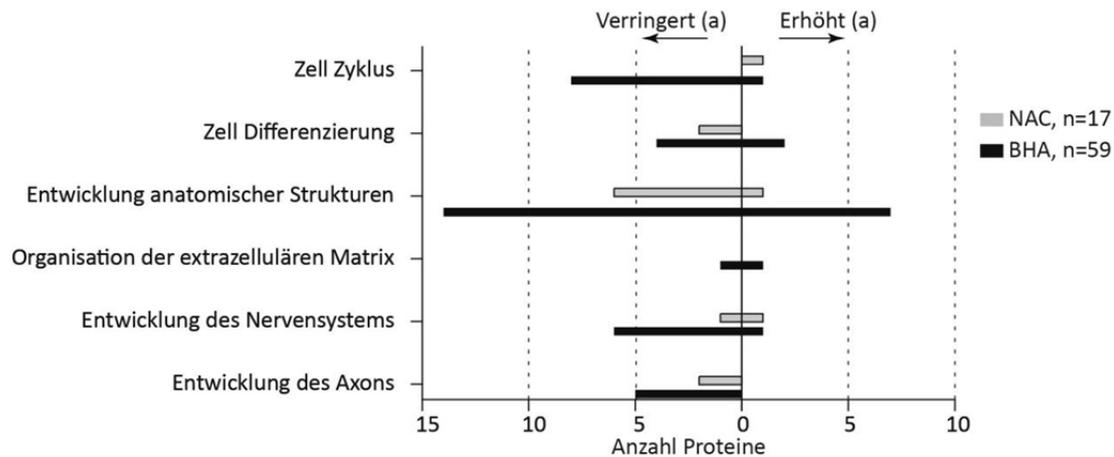


Abbildung 4.25 Gruppierung von BHA- und NAC-sensitiven Proteinen.

Deskriptive Analyse der direkt oder indirekt durch Butylhydroxyanisol (BHA) oder N-Acetylcystein (NAC) beeinflussten Proteine. Die Gruppierung erfolgte anhand der GO-Kategorisierung *biological process*. Angegeben als Anzahl assoziierter Proteingruppen. * Für die Darstellung wurden GO-Kategorien zusammengefasst (Anhang 6, Tabelle 6.7). a Änderung der Proteinabundanz nach Wirkstoffzugabe.

4.5.2 Veränderung der Zellmorphologie nach BHA- bzw. NAC-Behandlung

Die Proteomanalyse zeigte, dass durch NAC oder BHA vermehrt Proteine, die an der Entwicklung und Regulation von zellulären Strukturen beteiligt sind in ihrer Abundanz verändert wurden. Daher stellte sich die Frage, ob es durch diese Prozesse zu messbaren Veränderungen der Zellmorphologie kommt. Um dies zu beantworten, wurden die Zellen wie zuvor in diesem Abschnitt beschrieben kultiviert und die Zellmorphologie analysiert. Die Quantifizierung der Neuritenlängen (Ratio Zelllänge/Zellbreite) bestätigte, dass die durch Retinsäure hervorgerufene 1,9-fache Verlängerung ($p = 1,1 \times 10^{-7}$) durch die Co-Behandlung mit den Wirkstoffen im Durchschnitt um die Hälfte verringert wurde ($0,63 \pm 0,01$; $p = 3,5 \times 10^{-4}$, Abbildung 4.26 A und B). Die Zellform ähnelte nach 48 Std. Retinsäurebehandlung noch stark der von Neuroblasten. Insbesondere bei den Zellen, welche mit einem der Wirkstoffe behandelt wurden, zeigte sich trotz der ausgebildeten, kürzeren Neuriten ein vergleichsweise dickerer Zellkörper (Abbildung 4.26 A). Durch die Behandlung mit Retinsäure wurde die Zellzahl um 58% vermindert ($p = 0,014$), dieser Effekt wurde durch die Wirkstoffe aufgehoben (Abbildung 4.26C). Zusammenfassend reduzieren sowohl NAC als auch BHA die Neuritenextension von retinsäurebehandelten Zellen, welches in diesem Modell ein morphologisches Charakteristikum der neuronalen Differenzierung ist. Dies lässt die Vermutung zu, dass der Redoxzustand der Zelle in diese Prozesse der neuronalen Differenzierung involviert ist und unterstützt damit die vorangegangenen Ergebnisse.

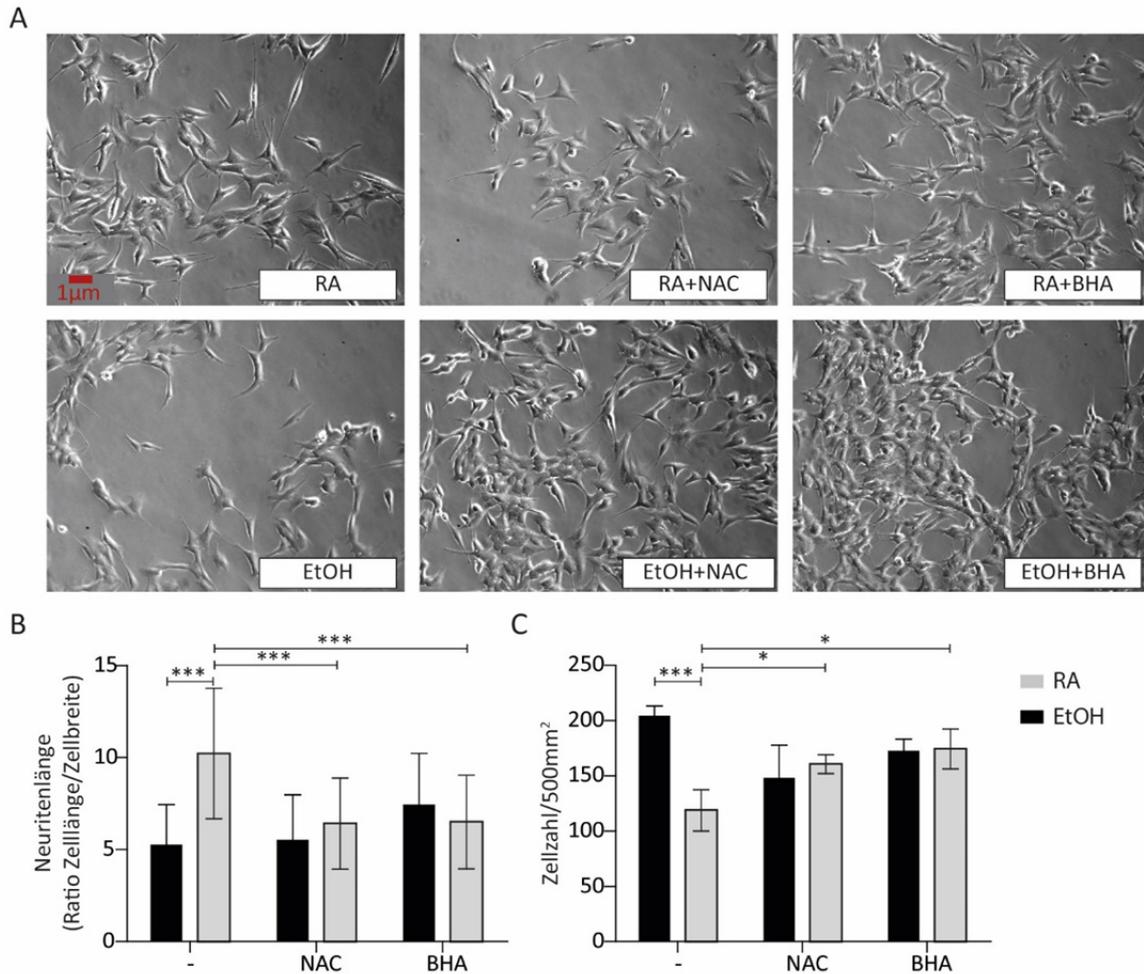


Abbildung 4.26 BHA und NAC unterdrücken die durch Retinsäure hervorgerufene Verlängerung der Neuriten.

(A) SH-SY5Y-Zellen wurden simultan mit N-Acetylcystein (NAC) oder Butylhydroxyanisol (BHA) und Retinsäure (RA) bzw. EtOH (Kontrolle) behandelt. Nach 48 Std. wurden die morphologischen Veränderungen der Zellen unter einem Durchlichtmikroskop (200× Vergrößerung) untersucht. In (B) ist die quantifizierte Neuritenlänge als Ratio von Länge zu Breite des Zellkörpers dargestellt. Für die Quantifizierung wurden jeweils 50 Zellen vermessen. (C) Die Zellzahl eines definierten Bereiches wurde über ImageJ mit dem PlugIn CellCounter bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert +/- die Standardabweichung. Mittels zweifaktorieller Varianzanalyse wurde überprüft, ob es durch die Retinsäurebehandlung oder die verwendeten Wirkstoffe zu signifikanten Unterschieden kommt. Die Sterne markieren einen p-Wert $* \leq 0,05$ und $*** \leq 0,001$.

5. Diskussion

Mithilfe der Proteomanalyse wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss des zellulären Redoxzustandes auf die Proteine, während der neuronalen Differenzierung humaner Zellen, untersucht. Zu diesem Zweck wurde das Modellsystem der Retinsäure-induzierten neuronalen Differenzierung der Zelllinie SH-SY5Y verwendet. Dieses ist ein gängiges Modellsystem zur Studie früher neuronaler Differenzierungsprozesse und wurde bereits mit redox-getriebenen Vorgängen in Verbindung gebracht (Nitti et al., 2010). Die Veränderungen der zellulären ROS-Mengen sowie die Auswirkungen auf das Proteom und Redox-Proteom wenige Stunden nach Beginn der neuronalen Differenzierung sind allerdings nicht vollständig aufgeklärt und wurden im Rahmen dieser Arbeit adressiert.

5.1 SH-SY5Y-Zellen als Modellsystem zur Studie redox-spezifischer Änderungen der Proteine während der neuronalen Differenzierung

5.1.1 Methodische Aspekte der Proteom- und Transkriptomanalyse

Obgleich das gewählte Modellsystem sehr gut charakterisiert ist, existierten zu Beginn dieser Arbeit nur wenig Informationen über die globalen Auswirkungen der Retinsäure-induzierten neuronalen Differenzierung auf die zellulären Proteine. Um einen Ausgangspunkt für die nachfolgenden redox-spezifischen Proteomanalysen zu schaffen, erfolgte daher zunächst eine detaillierte proteom-analytische Charakterisierung des Modellsystems. Diese quantitativen Analysen dienten dazu die Expression bekannter Markerproteine zu überprüfen und die veränderten Proteinabundanzen innerhalb der gewählten Behandlungsdauer einzuordnen.

Eine interne Kontrolle der Kultivierungsbedingungen, und der damit verbundenen Expression bestimmter Proteine, erfolgte durch einen Vergleich der Proteinveränderungen innerhalb der durchgeführten Proteomstudien. Diese interne Kontrolle wurde durch die Transkriptomdaten, welche aus identisch kultiviertem Zellmaterial resultierten, ergänzt (4.2.2). Ein Vergleich der 80 Einträge der signifikant veränderten Proteine mit den mRNA-Daten zeigte eine gute Korrelation zwischen den Proteinen und der entsprechenden RNA ($\rho=0,87$). Von den 80 in ihrer Abundanz signifikant veränderten Proteinen wiesen 50 ebenfalls eine signifikante Änderung auf Genebene auf. Eine geringere Korrelation ($\rho=0,25$) wurde detektiert, wenn die verbleibenden Werte der Proteinabundanzen mit denen der dazugehörigen mRNAs verglichen wurden. Eine moderate Korrelation zwischen Proteom- und Transkriptomdatensätzen wurde auch in anderen Studien beschrieben (N. Q. Liu et al., 2013; Peng, Qin, Zhang, Guo, & Huang, 2015). Durch alternatives Spleißen können verschiedene Varianten eines Genproduktes entstehen, auch Prozesse wie RNA-Interferenz, eine schwankende Effizienz während der Translation, Abbauprozesse und posttranslationale Modifizierungen erklären

Unterschiede zwischen Transkriptom und Proteom (Missler & Sudhof, 1998; Peng et al., 2015). Zudem korrelieren die Mengen von mRNA und exprimierten Protein nur bedingt (Gygi, Rochon, Franza, & Aebersold, 1999). Der Einfluss von posttranslationalen Modifizierungen auf die zellulären Signalwege ist von entscheidender Bedeutung und erfordert die Analyse auf Proteinebene. Bei der hier adressierten Fragestellung ist die Proteomanalyse somit nicht nur eine wichtige Ergänzung zu der Analyse des Genoms, sondern unabdingbar.

5.1.2 Die Extension der Neuriten kann durch Veränderungen des Redoxzustandes beeinflusst werden

Zu Beginn wurde überprüft ob sich die Retinsäure-induzierte neuronale Differenzierung der humanen Zelllinie SH-SY5Y als Modellsystem zur Studie von redox-spezifischen Änderungen der Proteine während der neuronalen Differenzierung eignet. Zunächst wurde untersucht ob es unter den verwendeten Kulturbedingungen zu den beschriebenen Veränderungen der Zellmorphologie kommt, welche als charakteristisches Ereignis des neuronalen Differenzierungsprozesses gelten (Encinas et al., 2000). Der hier betrachtete Übergang der undifferenzierten neuroblastenähnlichen, nicht-polarisierten Zelle, welche meist in Zellclustern wächst, hin zu einem morphologisch neuronähnlichen Zelltyp mit einer signifikanten Extension der Neuriten konnte nach 48 Std. und 120 Std. Retinsäurebehandlung bestätigt werden (4.1). Die Co-Behandlung mit dem Reduktionsmittel NAC oder dem Radikalfänger BHA, welche den Redoxzustand der Zelle beeinflussten (Abbildung 4.21 und Tabelle 4.5), führte unter anderem zu einer signifikanten Reduktion der Neuritenlänge (Abbildung 4.26A und B). Darüber hinaus konnte die durch Retinsäurebehandlung hervorgerufene Verringerung der Zellzahl nicht mehr detektiert werden (Abbildung 4.26C). Dies weist auf eine funktionelle Bedeutung der zellulären ROS-Mengen während der Ausbildung des neuronalen Phänotyps hin und bestätigt damit die Beobachtungen anderer Studien (Nitti et al., 2010; Pak, Son, & Yoo, 2014). Nitti und Kollegen zeigten, dass die Verwendung des NOX-Inhibitors DPI bei einer siebentägigen Kultivierung zu einer verringerten ROS-Produktion und schließlich zu einer Verkürzung der Neuriten führt (Nitti et al., 2010). Auch durch Cadmium-Zugabe kommt es zu einem verringerten Neuritenwachstum, welcher mit erhöhten ROS-Mengen in Verbindung gebracht wird (Pak et al., 2014).

5.1.3 Die Expression von Markerproteinen weist auf die Funktionalität des Retinsäure-Signalweges und die neuronale Differenzierung hin

Die funktionelle und morphologische Ausbildung eines neuronalen Phänotyps wird in der Literatur nach vier bis acht Tagen Kultivierung mit Retinsäure erreicht (da Frota Junior et al., 2011; Encinas et al., 2000). Um die Präsenz von Markerproteinen zu überprüfen, die auf die Funktionalität des Retinsäure-Signalweges und auf eine neuronale Differenzierung hinweisen, wurden die SH-SY5Y-Zellen daher zunächst nach fünftägiger Behandlung analysiert (120Std.-Proteom, 4.2.1 und 4.2.2). Die umfangreichen Proteomanalysen, ergänzt durch die mRNA-Daten der Transkriptomstudie, boten die Möglichkeit, die Veränderungen in der Abundanz von wesentlichen Komponenten des Retinsäure-Signalweges zu quantifizieren und damit auf dessen Funktionalität zu schließen (4.2). Die Behandlung führte unter anderem zu erhöhten mRNA-Mengen des Retinsäure-bindenden Kernrezeptors *RARB*. Verschiedene Studien zeigten bereits, dass die Expression der *RARs* und auch der *RXRs* durch Retinsäure reguliert wird (Begemann et al., 2001; Feng et al., 2010; Kashyap et al., 2013). Proteine, die eine Funktion in Speicher- und Abbauprozessen von Retinsäure innehaben, wie *CRABP2* und *CYP26A1* zeigten ebenfalls einen Anstieg in der Abundanz. Dahingegen sanken die mRNA-Mengen von *ALDH1A2*, welches an der Produktion von Retinsäure beteiligt ist (Abbildung 5.1). Die genannten Proteine sind Teil eines Rückkopplungsmechanismus der Retinsäure-Signaltransduktion (D'Aniello, Rydeen, Anderson, Mandal, & Waxman, 2013; D'Aniello & Waxman, 2015). Die Balance zwischen Synthese und Abbau ermöglicht eine strenge Kontrolle der Retinsäuremengen in Zellen und Geweben. Die von D'Aniello et al. beschriebenen Rückkopplungsmechanismen sind eine Erklärung dafür, warum die Signaltransduktion außerordentlichen Retinsäureschwankungen standhalten kann (Schilling, Nie, & Lander, 2012; White, Nie, Lander, & Schilling, 2007). Ein Vergleich zu den Transkriptomdaten zeigte, dass die Veränderungen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene detektiert werden konnten. Entgegenläufige Mengen, mit einer signifikanten Veränderung auf Protein- und Genebene, wurden nur bei dem Rezeptor *STRA6* detektiert. *STRA6* dient zwar der Aufnahme von Retinol in die Zelle, ist jedoch wichtig für die Homöostase der abgeleiteten Derivate, wie z. B. der Retinsäure (Isken et al., 2008). Einhergehend mit dem hier gezeigten Anstieg der *STRA6*-Proteinabundanz, wurde auch in einer Studie an embryonalen Karzinomzellen ein durch Retinsäure hervorgerufener Anstieg der *STRA6*-RNA nach 120 Std. Behandlung verzeichnet (Bouillet et al., 1997).

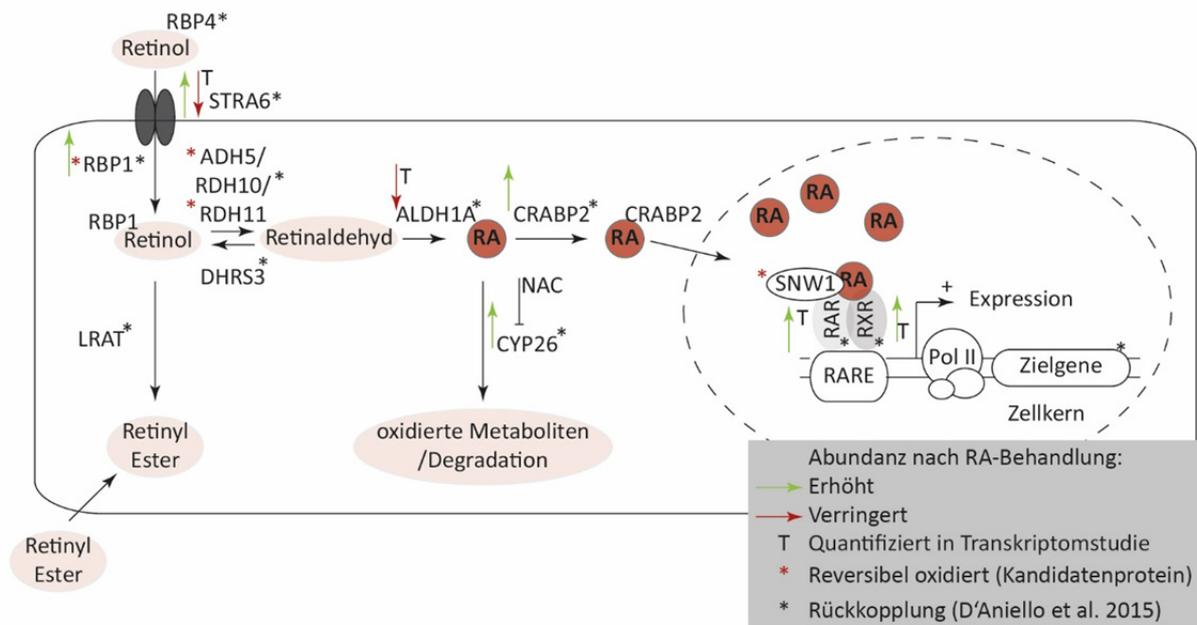


Abbildung 5.1 Übersicht des Retinsäure-Signalweges.

Die quantifizierten Komponenten sind durch einen Pfeil markiert, dieser zeigt an, ob das Protein eine erhöhte (Grün) oder verringerte (Rot) Abundanz nach Retinsäurebehandlung aufwies (120 Std. RA vs. 120 Std. EtOH). T vermerkt, dass die Identifizierung auf den mRNA-Daten basiert. Kandidaten der redox-spezifischen Studie sind mit einem roten Stern markiert und das durch den Wirkstoff NAC beeinflusste Protein ist gekennzeichnet (5.3.1). In der schematischen Darstellung wurden Proteine mit einem beschriebenen transkriptionelle Rückkopplungsmechanismus, basierend auf einer Arbeit von D'Aniello & Waxman, 2015, markiert (Stern, Schwarz). Die Darstellung beinhaltet nicht alle der quantifizierten Komponenten. RBP4: retinol binding protein-4; STR6: stimulated as retinoic acid gene-6; CRBP: cellular retinol binding protein; LRAT: lecithine retinol acetyltransferase; RDH: retinol dehydrogenase; ADH5: alcohol dehydrogenase-5; RALDH: retinaldehyde dehydrogenase; SDR: microsomal short-chain dehydrogenases/reductases; ALDH1A: aldehyde dehydrogenase family 1 member A1; CRABP: cellular retinoic acid binding protein; RARE: retinoic acid response elements; RAR: retinoic acid receptor; RXR: retinoic X receptor; SNW1: SNW domain-containing protein 1; BHA: Butylhydroxy-anisol; NAC: N-Acetylcystein.

Die Proteomanalyse 120Std.-Proteom ergab quantitative Daten für 2771 Proteine, von denen 80 Proteine (2,9%) eine signifikant veränderte Abundanz im Vergleich zu der 120 Std. kultivierten Kontrolle aufwiesen. Darunter Proteine, die als Indiz für eine erfolgreiche Ansteuerung der Retinsäure-abhängigen neuronalen Differenzierungsprozesse herangezogen werden und die in der vorliegenden Arbeit bereits nach 48Std. eine differenzielle Abundanz aufwiesen (Abbildung 4.5 und Abbildung 4.10): CRABP2, RET, EMILIN-1 und NCAM1 (Angrisano et al., 2011; Cheung et al., 2009; Jimmy Rodriguez Murillo, 2017; Oppenheimer et al., 2007; Patrone et al., 1997; Singh & Bhat, 2012). Ergänzt durch die Transkriptomdaten konnten signifikante Veränderungen weiterer Gene bestätigt werden, die bereits in diesem Modellsystem beschrieben wurden (Abbildung 4.7). Beispielsweise wurde die Abundanz von *N-myc proto-oncogene protein* (MYCN), einem positiven Regulator des S-Phase Re-Eintritts in Neuronen, signifikant verringert (Korecka et al., 2013; Wartiovaara et al., 2002). Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei umfassende Proteomstudien publiziert, welche die molekularen und zeitabhängigen Ereignisse in Retinsäure- und *nerve growth factor* (NGF)- bzw. *brain*

derived neurotrophic factor (BDNF)-induzierten neuronalen Differenzierungsprozessen beleuchteten (Emdal et al., 2015; Jimmy Rodriguez Murillo, 2017). Die umfassende Studie von Emdal, Pedersen et al. adressierte die Signalkaskaden von Retinsäure und NGF sowie der *tropomyosin-related kinase A* (TRK). Verwendet wurde jedoch ein Tetracyclin-induzierbares Modell in SH-SY5Y-Zellen, weshalb diese Studie nachfolgend nicht für einen Vergleich mit dem hier genutzten Wildtyp herangezogen wurde. In der Studie von J.R. Murillo et al. wurden innerhalb einer 15-tägigen neuronalen Differenzierung mit Retinsäure und BDNF 5326 Proteine identifiziert und 366 als differenziell abundant bezeichnet (mittlere Ratio $\geq 1,5$ oder $\leq 0,67$, zweiseitiger t-Test p-Wert $< 0,05$, keine Korrektur für multiple Testprobleme). Von diesen Proteinen zeigten 207 eine erhöhte und 159 eine verringerte Abundanz nach der Retinsäurebehandlung. Die wesentlich höhere Anzahl quantifizierter Proteine, im Vergleich zu der hier durchgeführten Studie, kann dadurch erklärt werden, dass Murillo et al. unter anderem eine Fraktionierung der Proben durchführten (26 Fraktionen wurden jeweils separat analysiert). Zudem wurden weniger stringente Filterkriterien angewandt, z. B. wurden 1776 Proteine mit weniger als zwei Peptiden für die Quantifizierung zugelassen. Ein Vergleich des über iTRAQ quantifizierten Proteoms mit der Studie 120 Std.-Proteom bestätigte die Präsenz von 2265 der 2771 quantifizierten Proteine (82%). Die, unter anderem, von Murillo et al. angeführten neuronalen Markerproteine MAP2 und TUBB3 wurden in den Proteomstudien dieser Arbeit zwar quantifiziert, zeigten jedoch keine Retinsäure-abhängigen Abundanzunterschiede. Die Abweichung in der Expression der Markerproteine kann mit unterschiedlichen Kultivierungszeiten, in diesem Fall fünf gegen 15 Tage, und der zusätzlichen Verwendung des Neurotrophins BDNF erklärt werden. Durch Verwendung von BDNF wird die Ausbildung eines reiferen neuronalen Phänotyps erreicht (Chiocchetti et al., 2016; Goldie, Barnett, & Cairns, 2014). Für die hier untersuchte Fragestellung war die Ausbildung eines unreifen Phänotyps ausreichend.

Die Analyse der temporären Profile der Proteinabundanzen (4.2.3) gibt schließlich einen weiteren Hinweis darauf, dass die Zellen nicht mehr proliferieren, sondern anfangen zu differenzieren. Dies kann auf Proteinebene bereits in den ersten 48 Std. beobachtet werden. Die Beobachtung, dass die größten morphologischen Veränderungen innerhalb der ersten 48 Std. erfolgten geht einher mit den Ergebnissen anderer Studien, welche unter anderem erhöhte Neuritenlängen nach 24 Std., aber nicht mehr nach 96 Std. beschrieben (Lopes et al., 2010).

5.1.4 Hinweise auf einen ROS-Anstieg nach zweistündiger Retinsäurebehandlung

Ausgehend von der Hypothese, dass ROS als frühes Signalmolekül während der neuronalen Differenzierung dient, wurde überprüft, ob es bereits in den ersten Stunden zu Veränderungen des zellulären Redoxzustandes oder gar zu einem H_2O_2 -Anstieg kommt. Dabei wiesen die Messungen mit den Sensorproteinen bereits früher auf Veränderungen hin, als die mittels CellROX Green

durchgeführten Experimente. Dies scheint zunächst widersprüchlich, kann jedoch mit der unterschiedlichen Reaktivität und Spezifität der Proben sowie dem gewählten experimentellen Ansatz erklärt werden. CellROX Green ist durch eine Vielzahl von ROS oxidierbar und dient daher als globaler Detektor für ROS und oxidativen Stress. Dahingegen weisen RoGFP2-ORP1 und NCF1-RoGFP2 eine hohe Spezifität für H_2O_2 auf (Meyer & Dick, 2010; Pal et al., 2013). Durch CellROX Green werden zunächst oxidative Signale des Kerns und der Mitochondrien detektiert, wohingegen die Sensoren im gesamten Zytosol bzw. an der Plasmamembran lokalisiert sind und damit dessen oxidative Signale widerspiegeln können (Meyer & Dick, 2010; Pal et al., 2013). Aufgrund des gewählten experimentellen Ansatzes, die Signale zu distinkten Zeitpunkten zu detektieren, können geringe Unterschiede in der Reaktivität der Proben zu einem zeitlichen Unterschied von einer Stunde führen. Experimente mit kontinuierlich aufgenommenen Signalen würden dies gegebenenfalls umgehen.

Der Befund, dass es in dem Modellsystem zu Veränderungen der zellulären ROS kommt (Lopes et al., 2017; Silvis et al., 2016), konnte für den Zeitabschnitt 2-3 Std. nach Retinsäurezugabe bestätigt werden (4.3). In der Literatur existieren bislang nur Messungen zu späteren Zeitpunkten und die Ergebnisse variieren hinsichtlich eines Anstiegs oder einer Verringerung der detektierten ROS-Mengen (Lopes et al., 2017; Silvis et al., 2016). Silvis et al. wiesen nach vier Tagen sowohl vermehrt Superoxidanionen als auch H_2O_2 nach, Lopes et al. zeigten, dass es nach sieben Tagen zu verringerten H_2O_2 -Mengen kommt. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in anderen Modellsystemen gemacht, die Retinsäure zur neuronalen Differenzierung verwenden, z.B. in F9-Zellen (Dickson et al., 2017; Wen et al., 2012). Letztlich weist dies darauf hin, dass die ROS-Mengen dynamischen Veränderungen unterliegen und von dem Differenzierungszustand der Zellen abhängen.

Der Anstieg in der Fluoreszenz-Ratio von RoGFP2-Orp1 wurde durch Zugabe des NOX-Inhibitors DPI unterbunden, was eine Oxidation des Sensors durch NOX-generierte ROS nahelegt. Bei der Verwendung der Inhibitoren sollte beachtet werden, dass weder DPI noch Apocynin exklusiv auf die NOX-Enzyme wirken und die Quelle der ROS damit nicht vollständig auf diese Enzyme zurückgeführt werden kann (Heumüller et al., 2008; Li & Trush, 1998; Majander, Finel, & Wikström, 1994; Riganti et al., 2004; Touyz, 2008). Um eine Beteiligung der NOX-Komplexe zu prüfen, wurde darüber hinaus der Sensor NCF1-RoGFP2 eingesetzt, welcher die subzelluläre Positionierung des Rezeptorproteins direkt an den NOX-Komplex ermöglicht (Pal et al., 2013). Obwohl das primäre Produkt der NOX-Komplexe Superoxidanionen sind, ist davon auszugehen, dass der eingesetzte Sensor maßgeblich durch H_2O_2 oxidiert wird (Gasimli et al., 2013; Pal et al., 2013; Pal et al., 2014). Die funktionale NCF1-Komponente, und damit das NCF1-RoGFP2-Konstrukt, befinden sich intrazellulär. Die NOX-Enzyme transferieren die Elektronen über die Plasmamembran aus der Zelle heraus, womit sich die Superoxidanionen extrazellulär befinden. Superoxidanion dismutiert schnell zu H_2O_2 und

wird in die Zelle zurückgebracht, wo es zu einer Oxidation des Sensors führen kann (Pal et al., 2013; Pal et al., 2014). Der detektierte Signalanstieg des Sensors NCF1-RoGFP2, als Hinweis auf entstehendes H_2O_2 , ist vermutlich auf die Aktivität der NOX2-Enzyme zurückzuführen. NCF1 ist hauptsächlich für die Aktivierung von NOX2-3 verantwortlich. In heterologen Expressionssystemen kann es auch zu einer NCF1-abhängigen Aktivierung von NOX1 kommen (Banfi, Clark, Steger, & Krause, 2003; Pal et al., 2013). NOX3-mRNA wurde in verschiedenen Geweben nachgewiesen, darunter in der Leber, Niere, Lunge und Milz, die Expression des Proteins wird jedoch exklusiv den Bereichen des Innenohrs zugeschrieben (Cheng, Cao, Xu, van Meir, & Lambeth, 2001; Kikuchi, Hikage, Miyashita, & Fukumoto, 2000; Paffenholz et al., 2004). Über den Nachweis von exprimierten NOX3-Komplexen in SH-SY5Y-Zellen existieren zu dem Zeitpunkt dieser Arbeit keine Angaben. Hinweise auf eine Beteiligung der NOX-Komplexe während der Retinsäure-induzierten neuronalen Differenzierung, werden in der Literatur beschrieben. Beispielsweise zeigten differenzierende Zellen eine erhöhte Expression der zytosolischen NOX-Untereinheit NCF1 und der regulatorischen Untereinheit p67^{phox} (NCF2) (Beske & Jackson, 2012; Nitti et al., 2007). Zudem wurde bereits gezeigt, dass eine Blockierung des NOX-Komplexes, durch Zugabe von DPI, die Retinsäure-induzierte Verlängerung der Neuriten nach zwei bis sieben Tagen unterbindet (Nitti et al., 2010). In der Annahme, dass entstehendes H_2O_2 als Signalmolekül während der frühen Prozesse der neuronalen Differenzierung dient und es während der Signaltransduktion zu oxidativen Veränderungen an Proteinen kommt, erfolgte die Proteomanalyse der reversibel oxidierten Proteine (Redox-Proteom) nach zweistündiger Retinsäurebehandlung.

5.1.5 Die differenzielle Proteomanalyse weist nicht auf Abundanzänderungen von Proteinen hin, die an der Kontrolle des Redoxzustandes beteiligt sind

Nachfolgend stellten sich die Fragen, ob der postulierte Anstieg der zellulären H_2O_2 nach 2 Std. schädlich für die Zelle sein kann und ob es zu Veränderungen im Proteom kommt, die auf die Ansteuerung entsprechender Kontrollmechanismen hinweisen. Verglichen zu den Kontrollzellen, zeigten die retinsäurebehandelten Zellen keine erhöhte Sterblichkeit (Abbildung 4.2). Die Proteomdaten der RA-Zeitreihe wiesen zwischen 1-3 Std. nicht auf behandlungsabhängige Veränderungen von Proteinen hin, die mit der Redox-Homöostase, oxidativem Stress oder oxidativen Schäden an Lipiden sowie DNA assoziiert sind (Tabelle 4.2). Differenzierten SH-SY5Y-Zellen wird in der Literatur eine höhere antioxidative Kapazität zugesprochen, welche unter anderem auf die vermehrte Aktivität antioxidativ wirkender Enzyme wie der Katalase, Glutathion-S-Transferase oder der Glutathion-Reduktase zurückgeführt werden kann (Garcia-Garcia, Zavala-Flores, Rodriguez-Rocha, & Franco, 2012; Lopert, Day, & Patel, 2012; Lopes et al., 2017; Schneider et al., 2011). Dies geht bei einer mehrtägigen Differenzierung (fünf bis sieben Tage) mit einem behandlungsabhängigen Anstieg von

antioxidativ wirkenden Proteinen einher (de Bittencourt Pasquali et al., 2016; Lopes et al., 2017; Schneider et al., 2011). Für die Zelle ist es von Vorteil einen Großteil dieser Proteine bereitzustellen, um eine Regulation des dynamisch agierenden Signalmoleküls H_2O_2 zu gewährleisten (Lopes et al., 2017).

Die SH-SY5Y-Zellen reagieren mit den bekannten Änderungen der Zellmorphologie sowie der Expression von bekannten Markerproteinen auf das neuronale Differenzierungsprotokoll. Wird der zelluläre Redoxzustand zu Beginn der neuronalen Differenzierung manipuliert, unterbindet dies die Extension der Neuriten. Die durchgeführten Experimente weisen zudem auf einen durch Retinsäure induzierten Anstieg von zytosolischen H_2O_2 nach zweistündiger Behandlung hin. Dies unterstützt die Hypothese, dass es zeitgleich zu oxidativen Modifizierungen an den Cysteinen von Proteinen kommen kann. Damit eignet sich das Modellsystem zur Studie von redox-spezifischen Änderungen der Proteine während der neuronalen Differenzierung. Wobei die frühen Zeitpunkte, zwischen 0-48 Std., in dem hier untersuchten Kontext von größerem Interesse sind als die späten (120 Std.).

5.2 Methodische Aspekte der redox-spezifischen Proteomanalyse

5.2.1 Die Abundanz im Redox-Proteom ist unabhängig von der Proteinmenge und der Anzahl der Cysteine pro Protein

Um ein Bild des differentiellen Redox-Proteoms zu erlangen, wurde die Matrix-assistierte Aufarbeitung reversibel oxidiertes Proteine etabliert (J. Guo et al., 2014; Paulech et al., 2013). Mit dieser Methode wurden 275 Proteine quantifiziert die, infolge der Retinsäurebehandlung, eine differentielle Abundanz in dem Redox-Proteom aufwiesen. Die Abundanzunterschiede in dem Redox-Proteom wurden nach Zugabe des Reduktionsmittels DTT, mit einer Ausnahme, nicht mehr detektiert (Thiol-TPS, 4.4.2). Zudem zeigte die unabhängige Proteomanalyse (RA-Zeitreihe), dass es zwischen 1-3 Std. nicht zu einer veränderten Abundanz der Proteine gekommen ist (4.2.3). Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die gefundenen Differenzen in dem Redox-Proteom auf einen differentiellen Oxidationszustand der Proteine zurückgeführt werden können und nicht aufgrund einer erhöhten Menge der Proteine zustande gekommen sind.

Da eine erhöhte Abundanz in dem Redox-Proteom theoretisch aus einer vermehrten Bindung an die TPS-Matrix resultierte, stellte sich die Frage, ob die Anzahl der Cysteine pro Protein hierfür ausschlaggebend war. Die Betrachtung der Proteinsequenzen der Kandidatenproteine zeigte, dass die Anzahl der Cysteine pro Protein zwischen eins und 16 liegt. Überdies wurden quantitative Daten von Proteinen mit bis zu 126 Cysteinen erhoben. Im Median weisen die Kandidatenproteine vier Cysteine in ihrer Sequenz auf und damit signifikant weniger als die nicht-differentiellen Proteine, welche im Median neun Cysteine beinhalten (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p=2,2 \times 10^{-16}$, Abbildung 5.2). Der

Vergleich weist darauf hin, dass eine erhöhte Proteinabundanz in dem Redox-Proteom nicht von der Anzahl der Cysteine in der Primärsequenz abhängig ist. Um die Effizienz der Umsetzung an die TPS-Matrix zu überprüfen, kann zudem die Bindung der Proteine kontrolliert werden, indem die Freisetzung der Schutzgruppe 2-thiopyridine bei 343 nm detektiert wird (Paulech et al., 2013).

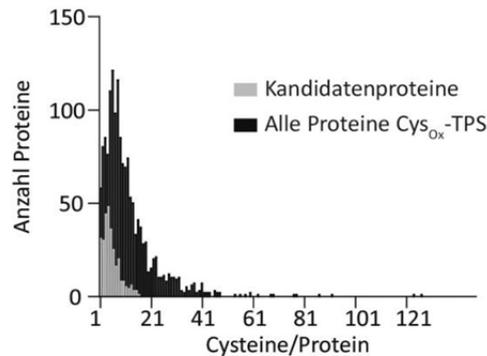


Abbildung 5.2 Redox-Proteom: Anzahl der Cysteine pro Protein.

Im Median weisen die Kandidatenproteine statistisch signifikant weniger Cysteine in ihrer Sequenz auf, als die nicht-differenziellen Proteine ($p=2,2 \times 10^{-16}$). Dies weist darauf hin, dass eine erhöhte Proteinabundanz in dem Redox-Proteom nicht von der Anzahl der Cysteine in der Primärsequenz abhängig ist.

5.2.2 Diamid und Retinsäure zeigen einen unterschiedlichen Einfluss auf das Redox-Proteom

In dieser Arbeit wurde die Annahme getroffen, dass es durch Retinsäure-induzierte ROS zu reversiblen Oxidationen an Proteinen kommt. Hier stellte sich die Frage, ob mithilfe der Redox-Proteomanalyse spezifische Unterschiede detektiert werden können. Durch einen Vergleich des Redox-Proteoms nach Zugabe von Retinsäure mit dem Redox-Proteom nach Behandlung mit dem Oxidationsmittel Diamid wird deutlich, dass beide Reagenzien auf verschiedene Proteingruppen einwirkten. Ein Vergleich der Proteine mit signifikant veränderter Abundanz, jeweils gegen die EtOH-Kontrolle, zeigte, dass nur 37% der Proteingruppen von beiden Behandlungen beeinflusst wurden. Dies unterstreicht den Unterschied zwischen einem Oxidationsmittel und einem physiologischen Stimulus. Beispielfähig können bereits bekannte redox-sensitive Proteine angeführt werden: GAPDH trägt zwei in UniProt annotierte redox-sensitive Cysteine: Cys152 und Cys247. Beide Cysteine können nitrosyliert werden, funktionell relevant ist zudem die Sulfydrierung an Cys152, da sie die katalytische Aktivität des Proteins anregt (Hara et al., 2005; Kornberg et al., 2010; Mohr, Stamler, & Brune, 1996; Molina y Vedia et al., 1992). Die Behandlung mit Diamid führte, im Gegensatz zu der Behandlung mit Retinsäure, zu einer erhöhten Abundanz in dem Redox-Proteom ($p=0,005$, Abbildung 4.17), was auf eine vermehrte Oxidation von GAPDH schließen lässt. Auch auf Ebene der Peptide, mit den entsprechenden Carbamidomethylierungen als Hinweis auf das potenziell reversibel oxidierte Cystein, spiegelt sich dieses Ergebnis wider (z.B. Diamid: Cys152 $p=0,03$; Abbildung 4.17). Umgekehrt führte nur die Retinsäurebehandlung zu einer signifikant erhöhten Abundanz und damit

potenziell reversiblen Oxidation des katalytisch-aktiven Cys100 von PRDX5 (Proteinebene: $p = 0,007$, Peptidebene: $p = 0,014$, Abbildung 4.20). Die erhöhte Abundanz des 2-Cys PRDX6 hingegen, wies nach beiden Behandlungen auf eine vermehrte reversible Oxidation hin. Die gesonderte Betrachtung der carbamidomethylierten Peptide zeigte, dass das Cys91-beinhaltende Peptid vermehrt in der carbamidomethylierten Form vorlag, wohingegen dies bei Cys47 nicht der Fall war (Abbildung 4.20). Übereinstimmend wurde in anderen Studien gezeigt, dass sowohl die Stimulation mit H_2O_2 als auch mit EGF lediglich zu einer reversiblen Oxidation an Cys91, nicht jedoch an Cys47 von PRDX6 führt (J. Yang et al., 2014). Zwei-Cys Peroxiredoxine werden als primäre Redoxsensoren beschrieben, welche bereits bei geringen H_2O_2 -Konzentrationen (0,05 mM) überoxidieren und damit der Pufferung von H_2O_2 dienen können (L. Fu et al., 2017; Woo et al., 2003; Z. A. Wood, Poole, & Karplus, 2003). Eine Überoxidation (z.B. zu Sulfin- oder Sulfonsäure) von Cys47 in dem aktiven Zentrum von PRDX6 kann eine Erklärung dafür sein, weshalb es in dem hier durchgeführten Ansatz nicht detektiert wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass es mithilfe der Matrix-assistierten Aufarbeitung möglich ist, eine differenzielle Analyse von reversibel oxidierten Proteinen durchzuführen und spezifische Unterschiede zu detektieren.

5.2.3 Identifizierung von potenziell redox-sensitiven Proteinen

In der durchgeführten Redox-Proteomanalyse konnten 1769 cysteinhaltige Proteine quantifiziert werden. Von diesen Proteinen sind 275 Kandidaten für eine differenzielle reversible Oxidation infolge des physiologischen Stimulus Retinsäure (Kandidatenproteine, 4.4.2). Eine Arbeitsgruppe, die aktivierte Thiol-Sepharose für die Analyse von reversiblen Oxidationen an *E. Coli* Proteinen nutzte, konnte 180 Proteine in der Kontrolle und 126 Proteine in den oxidativ gestressten Zellen identifizieren (Hu, Tedesco, McDonagh, & Sheehan, 2010). Für 98 Proteine wurde eine behandlungsspezifische Oxidation suggeriert, verwendet wurde Menadion, welches die Entstehung freier Radikale induziert. Ein Vergleich der Methoden zeigt, dass Hu, Tedesco, McDonagh und Sheehan ebenfalls eine Aufarbeitung auf Proteinebene durchführten, jedoch die zehnfache Proteinmenge mit der Thiol-Sepharose inkubierten. Anders als in dieser Arbeit, erfolgte die Inkubation ohne Blockierungsschritt und ohne Reduktion der Thiole. Durch diese Vorgehensweise wurden die vormals oxidierten Thiole nicht gebunden. Dies kann eine Erklärung für die vergleichsweise geringere Anzahl aufgearbeiteter Proteine sein.

Obwohl die Aufarbeitung der hier durchgeführten Redox-Proteomstudie auf Proteinebene erfolgte, konnten insgesamt für 1332 carbamidomethylierte Peptide quantitative Daten erhoben werden, welche einen Hinweis auf die Position der redox-sensitiven Cysteine geben. Unter diesen befanden sich 72 Peptide der Kandidatenproteine die einen signifikanten Unterschied zu der Kontrolle aufwiesen (4.4.3). Im Jahr 2013 erschien eine Studie, in der die reversible Oxidation von Proteinen des

Rattenmyokards untersucht wurde (Paulech et al., 2013). Dabei verwendete die Arbeitsgruppe ebenfalls einen TPS-Matrix-assistierten Ansatz, jedoch mit einer Aufarbeitung auf Peptidebene. Unter den angewandten Filterkriterien für die Identifizierung konnten 6 559 cysteinhaltige, einzigartige Peptide an 2 694 Proteinen nachgewiesen werden. In der Arbeit von Paulech et al. wurden weit mehr Peptide mit potenziellen Cys-PTMs identifiziert. Dies kann sowohl auf die Aufarbeitung auf Peptidebene als auch die optimierte Chromatographie-Technik zurückgeführt werden. Im Gegensatz zu den hier angelegten Filterkriterien, bei denen nur Proteinidentifizierungen zugelassen wurden, die in mindestens vier von fünf Replikaten erfolgten, wurde jedoch ohne Replikate gearbeitet (n=1). Die Identifizierungen wurden hingegen nur bei einer FDR<2% zugelassen, in dieser Arbeit wurde eine FDR<5% zugelassen. Die von Paulech et al. angegebene Liste beinhaltet zwar nur spezifische Peptide, darunter aber auch identische Cysteine auf verschiedenen tryptischen Peptiden. Eine Angabe über die eingesetzte Materialmenge existiert nicht. In der globalen Studie von Paulech et al. wurde, anderes als in der hier vorliegenden Arbeit, kein physiologischer oder oxidativer Stimulus verwendet. Daher ist eine Aussage über potenziell redox-regulierte Proteine bzw. deren Cysteine problematisch. Aufgrund der verschiedenen Techniken, biologischen Materialien bzw. Organismen und Behandlungen ist ein direkter Vergleich zu den genannten Studien schwierig. Bislang existieren jedoch keine veröffentlichten Studien mit vergleichbareren Parametern, weshalb die angegebenen Zahlen als vergleichbare Größenordnung herangezogen wurden.

Für 23 der potenziell reversibel oxidierten Proteine wurde in dem durchgeführten Folgeexperiment erneut eine erhöhte Abundanz nach der Retinsäurebehandlung festgestellt (Tabelle 4.4). Nachfolgende Experimente können durchgeführt werden, um die Abundanzunterschiede mit einer Massenspektrometrie-unabhängigen Methode zu validieren, z.B. über den Immunoblotting basierten Redox-Switch-Assay (Burgoyne, Oviolu, & Eaton, 2013).

5.2.4 Analyse der carbamidomethylierten Peptide als Hinweis auf das redox-sensitive Cystein

Für 57 der 275 Kandidatenproteine konnte die differenzielle Analyse der carbamidomethylierten Peptide einen Hinweis auf das potenziell reversibel oxidierte Cystein geben (Tabelle 5.1). Von den 73 carbamidomethylierten Peptiden mit differenzieller Abundanz, wiesen 72 eine erhöhte Abundanz nach Retinsäure-Zugabe auf. Dies spiegelt den Befund auf Proteinebene wider und lässt darauf schließen, dass es 2Std. nach Beginn der Retinsäure-induzierten neuronalen Differenzierung vermehrt zu reversiblen Oxidationen an Proteinen kommt. Dabei wies nicht jedes Cystein eines Kandidatenproteins eine differenzielle Carbamidomethylierung auf, was auf das Vorhandensein spezifischer redox-sensitiver Cysteine zurückgeführt werden kann. So können Modifizierungen verschiedener Cysteine eines Proteins unterschiedliche Funktionen erfüllen, in dem nachfolgenden Abschnitt 5.3.3 an *cofilin-1* dargestellt. Darüber hinaus können auch die verschiedenen Modifizierungen unterschiedliche

Funktionen vermitteln. Ein Beispiel ist die in dem späteren Abschnitt 5.3.3 beschriebene Glutathionylierung des Cys18 von RAC1, welche ebenfalls vermuten lässt, dass die Zugänglichkeit der Thiole mitentscheidend für die Art der Oxidation ist.

Für einige der in dieser Arbeit quantifizierten Cysteinpositionen wurden bereits redox-sensitive Mechanismen beschrieben oder diese wurden in globalen Redox-Proteomstudien anderer Arbeitsgruppen identifiziert. Die Angabe der Cysteinposition bezieht sich im Folgenden immer auf die Position in der Primärsequenz des Proteins. Für einen Vergleich der Cysteinpositionen wurden zwei quantitative und differenzielle LC-MS/MS-Redox-Proteomstudien herangezogen (Tabelle 5.1). (1) Eine Arbeit die das Redox-Proteom von H₂O₂-stimulierten A431-Zellen (humanes epidermoides Karzinom) untersuchte und in diesem Zusammenhang eine Liste mit 3 529 Peptiden veröffentlichte (L. Fu et al., 2017). Der Vergleich zu den Kandidatenproteinen zeigte, dass 16 identische Cysteinpositionen, an 16 Proteinen, identifiziert wurden (z.B. Cys24 an dem *chloride intracellular channel protein-1/CLIC1*). (2) Wurde eine Redox-Proteomstudie betrachtet, in der ebenfalls ein physiologischer Stimulus verwendet wurde. In dem Fall wurde die EGF-induzierte Sulfenylierung von A431-Zellen untersucht und eine Liste mit 215 Peptiden veröffentlicht (J. Yang et al., 2014). Eine Sulfensäure ist das initiale Oxidationsprodukt zwischen H₂O₂ und den Cysteinen eines Proteins, weshalb diese Cys-PTM in dem hier untersuchten Kontext von Interesse ist. Vergleichsweise wurden fünf identische Cysteinpositionen, an fünf Proteinen, identifiziert (z.B. Cys100 an PRDX5). Eine Auflistung der quantifizierten und potenziell redox-sensitiven Cysteinpositionen der Kandidatenproteine beinhaltet die Tabelle 5.1. Zudem wurde überprüft, ob zu den angegebenen Cysteinpositionen bereits annotierte (UniProt) Cys-PTMs vorliegen.

Tabelle 5.1 Potenziell redox-sensitive Cysteine der Kandidatenproteine.

Die Angabe der Cysteinposition, bezogen auf die Primärsequenz des Proteins, resultiert aus der differenziellen Analyse der carbamidomethylierten Peptide. Der Vergleich umfasst neben den Diamid-behandelten Zellen ebenfalls zwei Redox-Proteomstudien anderer Arbeitsgruppen, die Angabe der in UniProt annotierten Cys-PTMs und die jeweilige Quelle. Proteine die mit einem Stern (*) versehen sind, wurden zudem über das in dieser Arbeit durchgeführte Folgeexperiment validiert.

Kandidatenprotein (a)	Cysteinposition				UniProt (e)
	Retinsäure	Diamid (b)	H ₂ O ₂ (c)	EGF (d)	
AHCY*	195	195	167, 393		
AKR1B1	81	81, 187, 304			
ANP32A	123				
ANP32B	123	123			
APEX1	65,93,296	93			Disulfid Cys65-93, SNO Cys65, Cys93, Cys310 (Qu, Liu, Huang, & Chen, 2007)
ARF4	62				
BLVRA	281				
CAPZA2	111				
CAPZB	62	8	147, 206	206, 211	
CDK6	83	83			

Fortsetzung Tabelle 5.1

CENPV	219				
CISD2	92		92	92	
CLIC1	24,191		24	24	Disulfid Cys24-59, redox-sensitiv (Littler et al., 2004)
CS	101		211	211	
CSNK2B	109				
EIF2S1	70				
EIF3E	345				
ELAVL3	68				
GNA13	329	329	148, 204		
GNAI3*	66				
GNB2	25,204				
GNB2L1*	138, 153, 182, 240	182, 240	138, 182, 168		
HNRNPA2B1*	50		38		
LDHB	294	132			
LMAN2	239	239			Disulfid Cys202-239
MTCH2	49	49	79, 296, 297		
NAPA	84				
NDUFS2	347		347		
OTUB1	91	91	91		
PCNA	162		81, 162		
PDXP	91				
PGAM1	153			153	
PPP1CB	61		61, 126, 171		
PRDX5	100	100	100	100	Disulfid Cys100-204, redox-aktiv (Seo et al., 2000)
PRDX6*	91	91		47	Cys47 Sulfin-/Sulfonsäure inaktivierend (E. Wagner et al., 2002)
PRKRA	54	54			
PRMT1	350, 354	109, 350, 354	101, 250	101	
PSAT1	98, 224				
PSMD6	188				
PTRH2	86	86	36		
RAVER1	297		272		
RPL18A	22, 64	109	16, 22		
RPL22	25	25			
RPLP0;	27, 119	27, 119			
RPLP0P6*					
RPS2	229		182, 188, 229		
RPS3	97		113, 135, 150	113, 150	
SRPRB	73	100	73, 179, 246		
TMED7	48				
TMEM33	232		204		
TXNDC5*	121, 128, 247, 254	254	217, 350		
UQCRC2	125, 192		192		
VDAC1*	232		232		
VDAC2	47		47, 76, 210	47, 76	
VDAC3	65		36, 65, 229	36, 66	
WDR82	287	287			
YWHAQ*	94, 134		134		
YWHAZ*	94	94			

a Kandidatenprotein für eine reversible Oxidation nach Retinsäurebehandlung (Cys_{ox}-TPS)

b Potenziell reversibel oxidiert nach Diamidbehandlung (signifikant)

c Nachgewiesene Cystein-Oxidation in A431-Zellen nach H₂O₂-Behandlung. Redox-Proteom (L. Fu et al., 2017)

d Nachgewiesene Sulfenylierung in A431-Zellen nach EGF-Behandlung. Redox-Proteom (J. Yang et al., 2014)

Der Vergleich zu den Studien weist darauf hin, dass sowohl die Auswahl des Stimulus als auch die verwendete Aufarbeitungsmethode große Unterschiede hervorrufen. Dabei lässt sich zusammenfassend sagen, dass nach einer harschen Oxidation, hervorgerufen durch Diamid oder H_2O_2 , unter Umständen wesentlich mehr oxidativ modifizierte Proteine bzw. Cysteine ermittelt werden können, als durch Retinsäure oder EGF. Auch die Analyse aller reversibel oxidierten Proteine kann dazu führen, dass mehr Proteine bzw. Cysteinpositionen identifiziert werden, als bei einer Analyse spezifischer Cys-PTM. Dennoch erhärtet der Vergleich zu anderen Redox-Proteomstudien den Verdacht auf ein redox-sensitives Protein und liefert einen guten Hinweis auf die entsprechende Cysteinposition. Zudem kann der Vergleich zu anderen Studien ein Indiz für das potenzielle Cys-PTM geben und so nachfolgende Experimente erleichtern. Neben den übereinstimmenden Positionen, umfasst das hier aufgeführte Redox-Proteom der SH-SY5Y-Zellen 47 bisher nicht beschriebene potenziell redox-sensitive Cysteine an 39 Proteinen, welche interessante Kandidaten für eine Validierung sind. In diesem Zusammenhang ist eine spezifische Markierung der Cys-PTM erstrebenswert. Für den angestrebten Sulfensäurenachweis wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits ein Sulfensäure-spezifischer Antikörper entwickelt, der sowohl in der Analyse einzelner Kandidatenproteine als auch in einem proteomanalytischen Ansatz Verwendung finden soll.

Zusammenfassend konnte mittels redox-spezifischer Proteomanalyse gezeigt werden, dass es 2 Std. nach der Retinsäurebehandlung zu veränderten Abundanzen von Proteinen im Redox-Proteom kommt, die auf eine reversible Oxidation an den Cysteinen hinweisen. Es wurden 275 Proteine identifiziert, die Kandidaten für eine reversible Oxidation sind. Für 57 Proteine ergab die Proteomanalytik zudem einen Hinweis auf die Position des modifizierten Cysteins.

5.3 Die Retinsäurebehandlung führt zu globalen Veränderungen des Redox-Proteoms

Obwohl der Einfluss von Retinsäure auf den oxidativen bzw. reduktiven Zustand von Proteinen Gegenstand der aktuellen Forschung ist, wurde in diesem Zusammenhang bislang keine globale Studie für oxidativ modifizierte Proteine beschrieben. Durch Anwendung einer redox-spezifischen Probenaufarbeitung für die Proteomanalyse, wurde in dieser Arbeit der Effekt der Retinsäure induzierten ROS auf die reversible Oxidation von Proteinen *in vivo* untersucht. Mit dem Ziel Proteine zu identifizieren, die Kandidaten für eine physiologisch relevante Cys-PTM sind. Im Gegensatz zu der globalen Proteomanalyse, welche zwischen 0-3 Std. Retinsäurebehandlung nur geringfügige Veränderungen aufzeigte (<0,5%; 4.2.3), konnten große Änderungen des Redox-Proteoms nachgewiesen werden (15%; 4.4.2). Dabei zeigte die quantitative Analyse potenziell reversibel oxidierten Proteine, dass der physiologische Stimulus eine Vielzahl verschiedener Proteingruppen beeinflusste. Diese sind unter anderem an dem Retinsäure-Signalweg beteiligt, mit energetischen Prozessen verknüpft oder tragen zu der Dynamik des Zytoskeletts bei (Tabelle 4.3). Ergänzt durch die Daten der Wirkstoff-

Studie (4.5) konnten so mithilfe der Proteomanalyse verschiedene redox-sensitive Aspekte der Retinsäure-induzierten neuronalen Differenzierung beleuchtet werden.

5.3.1 Retinsäure-Signalweg

Die redox-spezifischen Analysen wiesen darauf hin, dass verschiedene Proteine des Retinsäure-Signalweges direkt oder indirekt durch RS beeinflusst werden (Abbildung 5.1). Darunter SNW1 welches Teil des Transkriptionskomplexes ist, der durch die Zugabe von Retinsäure aktiviert wird (C. Zhang et al., 2001). SNW1 zeigte infolge der Retinsäurebehandlung eine verringerte Abundanz in dem Redox-Proteom, die detektierten Protein- und DNA-Mengen wurden jedoch nicht signifikant verändert (Abbildung 4.18 und Abbildung 6.3). In dem hier untersuchten Kontext ist SNW1 ein interessantes Kandidatenprotein für eine reversible Oxidation, da bereits in verschiedenen Studien gezeigt wurde, dass die durch Retinsäure angesteuerte transkriptionelle Aktivität redox-sensitiv ist (Casadevall & Sarkar, 1998; Demary et al., 2001; U. H. Park et al., 2009). Der molekulare Mechanismus ist jedoch nicht vollständig aufgeklärt. SNW1 ist ein Regulator von Polymerase-II-Promotoren (Baudino et al., 1998; Kang et al., 2010; Leong et al., 2004), bindet aber ebenfalls an die Retinsäure-Kernrezeptoren, moduliert dessen Aktivität und beeinflusst dadurch die Retinsäure-abhängige Gentranskription (Kang et al., 2010; Leong et al., 2004; C. Zhang et al., 2001). Studien an retinsäure-behandelten P19-Zellen zeigten, dass durch ein Zusammenspiel zwischen SNW1 und der redox-sensitiven Deacetylase *sirtuin-1* (SIRT1), die Aktivität des Rezeptors RAR wechselseitig reguliert werden kann (Kang et al., 2010). Dabei zeigte die Studie von Kang et al., dass SNW1 einen Komplex mit Retinsäure-gebundenem RAR α und SIRT1 bilden kann. Wobei ein kompetitiver Mechanismus vorgeschlagen wurde, bei dem SNW1 einen verstärkenden und SIRT1 einen vermindernden Effekt auf die RAR-vermittelte Gentranskription ausübt (Kang et al., 2010). Unklar ist, wie das molekulare Zusammenspiel der Proteine verläuft. Die SNW1-RAR α -Interaktion und die SIRT1-RAR α -Interaktion finden an der gleichen RAR α -Domäne statt, innerhalb dieses Interaktionsbereiches befindet sich das einzige in der Primärsequenz von SNW1 enthaltene Cystein (Cys250) und Cys160 von SIRT1 (Baudino et al., 1998; Kang et al., 2010). Ein redox-sensitives Cystein an SNW1 kann einen Teil der beschriebenen redox-sensitiven Transkriptionsaktivität ausmachen und dazu beitragen, das molekulare Zusammenspiel zwischen SNW1, SIRT1 und dem RAR-RXR-Heterodimer zu erklären.

Die Abundanz von CYP26A1 wurde in retinsäurebehandelten Zellen durch die Co-Behandlung mit dem Reduktionsmittel NAC auf den Zustand der Kontrolle zurückgebracht (Abbildung 4.23). NAC greift so in einen zentralen Kontrollpunkt der Retinsäure-Signaltransduktion ein. Denn, die Aktivität von CYP26A1 ist entscheidend für den Abbau von Retinsäure und damit der Instandhaltung der zellulären Retinsäurekonzentration (Abu-Abed et al., 2001; A. C. Ross & Zolfaghari, 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass Retinsäure den oxidativen Zustand der

Zelle erhöht. Dadurch könnte die redox-abhängige Transkriptionsmaschinerie moduliert werden (Abbildung 5.3). Weiter legen die durchgeführten Experimente nahe, dass durch die Co-Behandlung mit NAC der durch Retinsäure induzierte oxidative Zustand der Zelle verringert und ebenfalls die Transkription von Retinsäure-Zielgenen verändert wird. Dies könnte in den zuvor angeführten verringerten CYP26A1-Mengen resultieren (direkter Wirkstoff-Effekt). Eine Hypothese für die Wirkungsweise von NAC ist, dass durch den veränderten Redoxzustand der Zelle in das redox-sensitive Zusammenspiel zwischen SNW1, *sirtuin-1* und den Kernrezeptoren eingegriffen wird. Eine kürzlich erschienene Studie weist unterstützend darauf hin, dass NAC die Aktivität und Expression von SIRT1 verändern kann (L. Yang, Duan, Liu, & Yuan, 2018; Zhao et al., 2018). Dies kann möglicherweise auf die durch NAC veränderten GSH-Mengen zurückgeführt werden. SIRT1 ist hochsensitiv für Cys-PTMs, insbesondere Glutathionylierungen beeinflussen die Expression sowie Aktivität der Deacetylase und wurden bereits mit deren Einfluss auf die zelluläre Entwicklung in Verbindung gebracht (Bräutigam et al., 2013; Caito et al., 2010; Fratelli et al., 2005; Kornberg et al., 2010; Prozorovski et al., 2008; Zee et al., 2010). Die Retinsäure-abhängige CYP26A1-Expression benötigt zudem die Aktivierung von RAR α (Idres, Marill, & Chabot, 2005; Pozzi, Rossetti, Bistulfi, & Sacchi, 2006). Die verringerte Transkription von CYP26A1 resultiert schließlich darin, dass weniger CYP26A1 exprimiert wird. Liegt folglich weniger CYP26A1 in der Zelle vor führt dies dazu, dass weniger Retinsäure abgebaut wird (Abu-Abed et al., 2001). Warum dies zu einer Verringerung der Neuritenlängen führt ist unklar. Verschiedene Studien zeigen, dass entartete Retinsäure-Mengen zu Entwicklungsstörungen, bis hin zu neurologischen Erkrankungen führen können (D'Aniello & Waxman, 2015). RS bzw. ROS und die damit verbundene putative reversible Oxidation an SNW1, könnten damit Teil des zellulären Retinsäure-Autoregulationsmechanismus sein und dazu beitragen, die Retinsäure-Homöostase aufrechtzuerhalten. Ergänzende Experimente, die (1) die Interaktion von SIRT1 und SNW1 mit Rücksicht auf den Oxidationszustand der Cysteine betrachten, (2) die funktionellen Auswirkungen von redox-insensitiven Proteinvarianten adressieren und (3) den Einfluss des Redoxzustandes näher beleuchten, sind nötig um den vorgeschlagenen Mechanismus zu validieren.

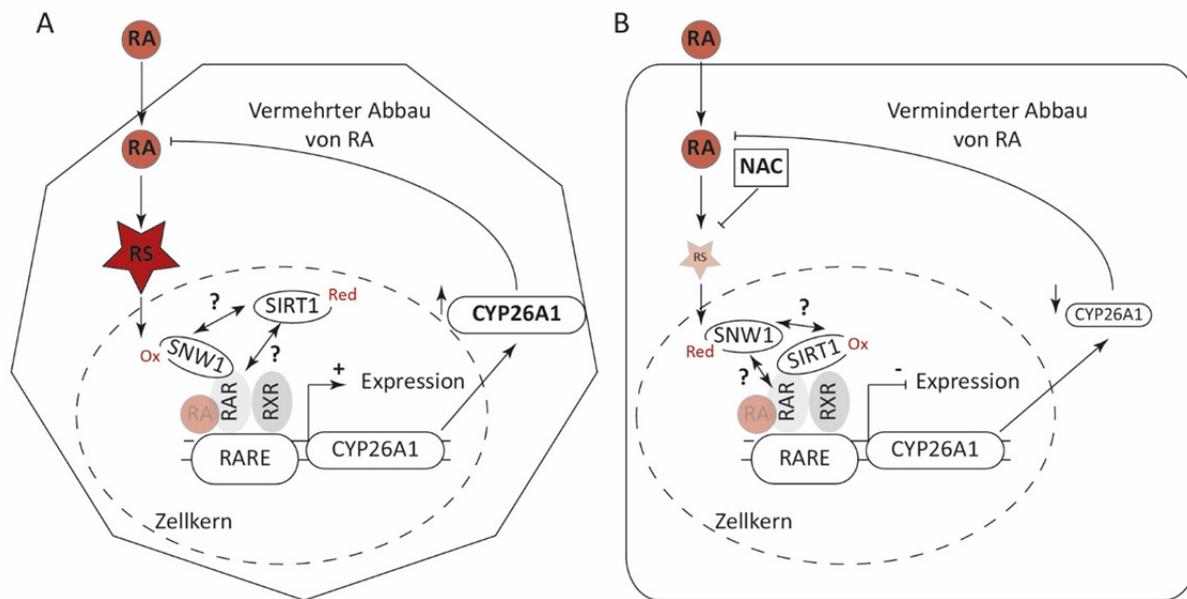


Abbildung 5.3 Modell für einen redox-sensitiven Rückkopplungsmechanismus, um die Retinsäure-Homöostase zu erhalten.

(A) Extension der Neuriten. Durch Retinsäurezugabe (RA) werden die intrazellulären Mengen von reaktiven Spezies (RS) erhöht. Dies könnte zu einer reversiblen Oxidation von SNW1 und damit vermehrter Bindung an RAR α führen, wodurch die Transkription des RA-Zielgens CYP26A1 verstärkt wird. Erhöhte CYP26A1-Mengen führen dazu, dass RA abgebaut wird. (B) Keine Extension der Neuriten. Erfolgt eine Co-Behandlung mit dem Reduktionsmittel NAC, verringert dies die intrazellulären RS-Mengen und es wird weniger CYP26A1 exprimiert. Dies führt folglich dazu, dass der Abbau von RA vermindert wird. Möglicherweise spielt eine reversible Oxidation an SNW1 oder ein Thiol-Switch zwischen SNW1 und SIRT1 eine Rolle bei der Interaktion. SNW1: *SNW domain-containing protein-1*; RAR: Retinsäure-Rezeptor; RXR: Retinoid-X-Rezeptor; RARE: *retinoic acid response element*; CYP26A1: *cytochrome P450 26A1*; SIRT1: *sirtuin-1*; NAC: N-Acetylcystein; Ox: oxidiert; Red: reduziert

5.3.2 Energiehaushalt

Die Anreicherungsanalysen zeigten, dass ein signifikanter Anteil der potenziell reversibel oxidierten Proteine in retinsäurebehandelten Zellen an dem Substrat-spezifischen Transmembrantransport beteiligt ist. Zu diesen zählen verschiedene, größtenteils mitochondriale Proteine, die mit energetischen Prozessen assoziiert sind (Tabelle 4.3). Beispielsweise zeigten die α - und β 1-Untereinheiten der F_1F_0 -ATP-Synthase (ATP5A1 und ATP5F1) eine erhöhte Abundanz in dem Redox-Proteom (Abbildung 4.18). Dabei wies ATP5F1 einen signifikanten Unterschied zu der Kontrolle auf. Die F_1F_0 -ATP-Synthase stellt zusammen mit der Elektronentransportkette den wesentlichen Teil des zellulären ATPs zur Verfügung und wurde bereits in Studien anderer Arbeitsgruppen in einen Zusammenhang mit redox-sensitiven Prozessen gestellt (Boyer, 1997; Garcia et al., 2010; J. Sun, Morgan, Shen, Steenbergen, & Murphy, 2007). In verschiedenen Geweben wurden z.B. physiologisch relevante oxidative Modifizierungen an Cysteinen der α -Untereinheit nachgewiesen (Garcia et al., 2010; Kane & Van Eyk, 2009; J. Sun et al., 2007; J. Sun & Murphy, 2010; Wang, Murray, Chung, & Van Eyk, 2013; West, Hill, Xuan, & Bhatnagar, 2006). In dopaminergen Neuronen wurde zudem gezeigt, dass durch die Interaktion zwischen *sirtuin-3* und der β -Untereinheit der F_1F_0 -ATP-Synthase sowie der

mitochondrialen SOD2 die Akkumulation von ROS und die ATP-Auszeehrung verhindert wird (X. Zhang et al., 2016). Ein weiteres Beispiel für Proteine des Transmembrantransports, bei denen anhand der Ergebnisse eine differenzielle reversible Oxidation vermutet werden kann, sind die spannungsabhängigen Ionenkanäle 1-3 (*voltage-dependent anion-selective channel protein 1-3/VDAC1-3*). Die multifunktionalen Proteine sind an der äußeren Membran der Mitochondrien, aber auch an der Plasmamembran lokalisiert. In Neuronen weisen VDAC2 und VDAC3 allerdings nur geringere Expressionsmengen auf (Shoshan-Barmatz, Nahon-Crystal, Shteinifer-Kuzmine, & Gupta, 2018). Sie vermitteln unter anderem den Ein- und Ausstrom von NAD^+/NADH und ADP/ATP . Zudem dient VDAC1 als Transporter für Ca^{2+} und RS, wodurch die Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktion zwischen Mitochondrien und dem ER reguliert und der Redoxstatus der Zelle beeinflusst wird (Ahmad et al., 2002; Gincel, Zaid, & Shoshan-Barmatz, 2001; Han, Antunes, Canali, Rettori, & Cadenas, 2003; L. Sun, Shukair, Naik, Moazed, & Ardehali, 2008). Die Ergebnisse weisen damit auf reversible Oxidationen an Proteinen hin, die maßgeblich zu dem Energiehaushalt der Zelle beitragen. Durch die beginnenden neuronalen Differenzierungsprozesse wird der Energiebedarf der Zelle verändert und damit der Bedarf an mitochondrialem ATP (Schneider et al., 2011). Es erfolgen Veränderungen in der Regulation von oxidativen Phosphorylierungsprozessen und der Glykolyse (Masia et al., 2007; Schneider et al., 2011). Die Änderungen der energetischen Funktionen in Retinsäure-differenzierten SH-SY5Y-Zellen resultieren unter anderem in einer erhöhten mitochondrialen Aktivität, bei unveränderter Anzahl der Mitochondrien und einer erhöhten Reservekapazität (Schneider et al., 2011). Damit ist es naheliegend, dass es auch in den Mitochondrien, als einer der Hauptquellen von ROS, zu oxidativen Modifizierungen an Proteinen kommt. In Mitochondrien kann zudem die Aktivität von Komponenten der Elektronentransportkette, des F_1F_0 -ATP-Synthase-Komplexes und anderer Enzyme durch Redox-Modifizierungen moduliert werden (Wang et al., 2013). Durch die Übertragung des oxidativen Signals auf bestimmte Proteine, könnte der postulierte H_2O_2 -Anstieg während der frühen neuronalen Differenzierung in einer angemessenen ATP-Bereitstellung resultieren. Neben einer aktiven Funktion kann eine vermehrte reversible Oxidation mitochondrialer Proteine auch einen indirekten Nutzen haben, nämlich dem als Puffer und Schutz vor Überoxidation bzw. oxidativem Stress.

5.3.3 Zytoskelett-Dynamik

Bei der Ausbildung der Dendriten spielt die Regulation des Zytoskeletts eine wesentliche Rolle. Hierbei verlaufen wichtige Regulationspunkte über die drei Hauptfilamente (Mikrotubuli, Mikrofilamente, Neurofilamente), deren assoziierte Proteine und die kleinen GTPasen der Rho-Familie. Von jedem dieser Bereiche wurden in der durchgeführten Redox-Proteomanalyse beteiligte Proteine gefunden, die abhängig von der Behandlung eine erhöhte Abundanz aufwiesen (Abbildung 5.4).

Die Redox-Proteomanalyse deutete darauf hin, dass es durch die Behandlung mit Retinsäure zu einer vermehrten reversiblen Oxidation an zytoplasmatischen ACTB und TUBB6 kommt. Die Neuron-spezifischen Tubuline der Klasse III und IV wurden in der redox-spezifischen Studie quantifiziert, zeigten jedoch keinen behandlungsabhängigen Unterschied. Aktin unterliegt einer Vielzahl von posttranslationalen Modifizierungen. Neben Methylierungen, Acetylierungen und Phosphorylierungen wurden bereits an allen Cysteinen, bis auf einem in α -Aktin, Cys-PTMs nachgewiesen (Terman & Kashina, 2013). Insbesondere Glutathionylierungen spielen eine Rolle in der Aktin-polymerisation und F-Aktindynamik (Carsten Berndt, Poschmann, Stühler, Holmgren, & Bräutigam, 2014; Dalle-Donne, Giustarini, Rossi, Colombo, & Milzani, 2003; Sakai et al., 2012). Beispielsweise ist die Aktivität von GLRX2, und die damit vermittelte Glutathionylierung von Aktin, wichtig für die Entwicklung der Neuralleiste des Herzens im Zebrafisch (Carsten Berndt et al., 2014). α -Tubulin und β -Tubulin besitzen zwölf bzw. acht Cysteinreste, welche alle für exogene oder endogene Oxidationsmittel zugänglich sind (Landino et al., 2002; Landino, Moynihan, Todd, & Kennett, 2004; Lowe, Li, Downing, & Nogales, 2001; Luduena & Roach, 1991; Wilson & Gonzalez-Billault, 2015). Tubulin-Disulfide sind Substrate für das Thioredoxin-Reduktase-System und das Glutaredoxin-Reduktase-System (Landino, Moynihan, et al., 2004). Die Funktionen der Cysteine werden unter anderem mit der Bindung von Guanosintriphosphat und der Polymerisation der Mikrotubuli in Verbindung gebracht (Luduena, Roach, Jordan, & Murphy, 1985; Mellon & Rebhun, 1976; Wilson & Gonzalez-Billault, 2015).

Eine weitere Ebene der Zytoskelettregulation wird durch Proteine vermittelt, welche mit den drei Filamenten des neuronalen Zytoskeletts assoziiert sind. Unter den Kandidaten für eine vermehrte reversible Oxidation befinden sich das Mikrotubuli assoziierte Protein MAP2, das *neurofilament light polypeptide* (NEFL) und das Mikrofilament-assoziierte *profilin-1* (PFN1). MAP2, NEFL und PFN1 sind klassische Proteine des Nervensystems und werden als neuronale Marker verwendet (Kirkpatrick LL, 1999). Studien anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass das hauptsächlich in den Dendriten lokalisierte MAP2 *in vitro* durch H_2O_2 und Peroxynitrit (ONOO $^-$) oxidiert wird und Disulfid-verbundene Spezies bildet, welche Substrate des Thioredoxin-Reduktase-Systems sind. Durch die reversible Oxidation und Reduktion der Cysteine wird die Polymerisation der Mikrotubuli signifikant beeinflusst (Landino,

Moynihan, et al., 2004; Landino, Skreslet, & Alston, 2004). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass dynamische Veränderungen des Redoxzustandes die Mikrotubuli-Polymerisation regulieren, welche letztlich wichtig für die neuronale Plastizität ist (Landino, Hagedorn, Kim, & Hogan, 2011). Die Bildung des Aktin-Profilin-Komplexes *in vitro* ist abhängig von dem Thiolstatus des Cys374 an Aktin. Eine Mutation zu Serin verhindert die Bindung und die Aktinpolymerisation (Aspenstrom, Schutt, Lindberg, & Karlsson, 1993). Infolge dessen lässt sich auf einen direkten Zusammenhang zwischen den Cysteinen und der Aktinpolymerisation schließen.

Eine Reihe von Proteinen die eine Guaninnukleotid-bindende Eigenschaft aufweist zeigten ebenfalls eine erhöhte Abundanz in dem Redox-Proteom (Tabelle 4.3). Darunter befinden sich die Mitglieder der Rho-GTPase-Familie: RAC1 und CDC42, mit einem signifikanten Unterschied, sowie *ras homolog gene family, member-A* (RHOA), welches ebenfalls vermehrt oxidiert in den retinsäurebehandelten Zellen vorzuliegen scheint (nicht korrigierter p-Wert 0,03). Die kleinen GTPasen der Rho-Familie spielen als molekulare Schalter eine zentrale Rolle in der Modulation der Aktindynamik und zeigen eindeutige Effekte auf die Zellmorphologie, wenn sie in der Zelle aktiviert werden: RAC1 führt zu der Ausbildung von Lamellipodien, CDC42 von Filopodien und RHOA zu einer vermehrten Bildung von F-Aktin und den sogenannten Stressfasern (Hall, 1998). Die kleinen GTPasen RAC spielen zudem eine zentrale Rolle bei der Entstehung von ROS, da sie die Zusammensetzung und Aktivierung der NOX-Komplexe regulieren. Insbesondere RAC1 und RAC2 sind für die Aktivierung von NOX1, NOX2 und NOX3 verantwortlich (Hordijk, 2006; Leto, Morand, Hurt, & Ueyama, 2009; Ueyama, Geiszt, & Leto, 2006). Darüber hinaus interagiert RAC1 mit der SOD1, diese Interaktion ist sowohl von dem Redoxzustand des RAC1 als auch der Guaninnukleotidbindung abhängig (Harrasz et al., 2008). Die RAC vermittelte Entstehung von ROS resultiert in einer veränderten Aktivität von RHOA, wodurch Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts direkt beeinflusst werden (Nimnual, Taylor, & Bar-Sagi, 2003). Munnamalai et al. zeigten in einer Arbeit an Seehasen (*Aplysia*), dass durch eine Stimulierung der Wachstumskegel die NOX2-Untereinheiten RAC1, NCF1 und NCF2 zu der Plasmamembran translokalisieren und zu einer Aktivierung von NOX2 führen. Durch Herabsenken der zytosmatischen ROS-Mengen und der Blockierung der NADPH-Oxidasen oder Lipoxygenasen als spezifischer ROS-Quelle, wurde der F-Aktin-Gehalt in den Wachstumskegeln reduziert (Munnamalai et al., 2014). Diese Arbeiten gaben wichtige Hinweise darauf, dass der zelluläre Redoxstatus mit den dynamischen Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts und der Aktivität der Rho-GTPasen zusammenhängt.

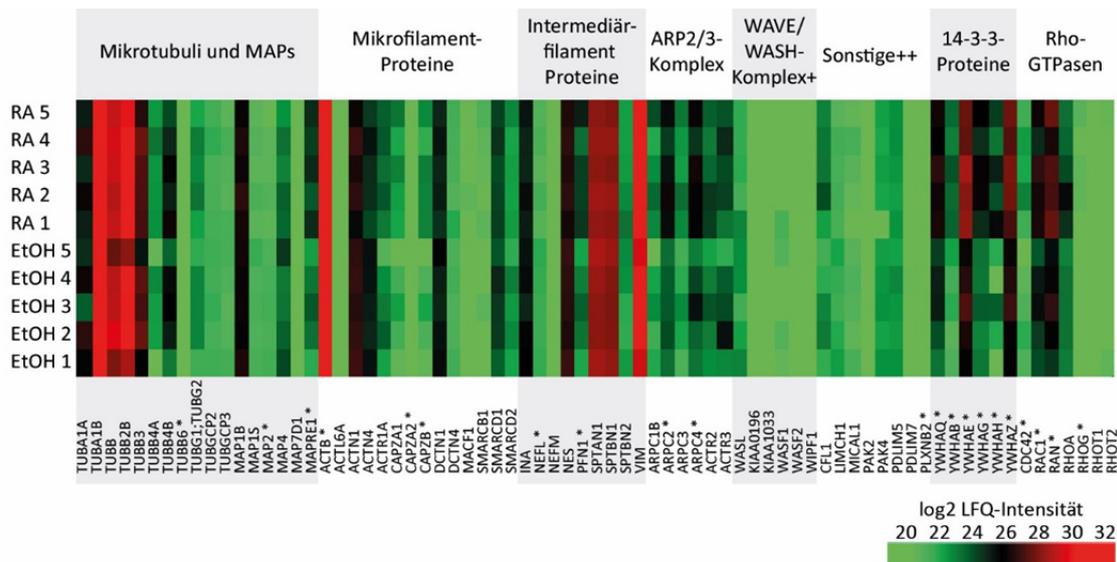


Abbildung 5.4 Strukturproteine und Rho-GTPasen der redox-spezifischen Proteomanalyse.

Dargestellt sind die log₂ LFQ-Intensitäten aller Replikate der Retinsäure (RA)-Behandlung und Kontrolle (EtOH). *Signifikant basierend auf der SAM-Methode. + (...) und assoziierte Proteine. ++ (...) Proteine der beschriebenen Signalkaskaden.

5.3.3.1 Redox-sensitive Signalkaskaden: RAC1 als Beispiel

Aufgrund der dualen Funktion als Regulator der Aktindynamik und Komponente des NOX-Komplexes, besitzt RAC1 eine besondere Relevanz in dem hier untersuchten Kontext und wird daher beispielhaft hervorgehoben. Es können zwei Wege beschrieben werden in denen RAC1 auf die Modulierung des Aktin-Zytoskeletts einwirkt, (1) über die Aktivierung der *p21-activated kinase/LIM kinase/cofilin-1* (PAK/LIMK/CFL1)-Signalkaskade und (2) über die Interaktion mit den Proteinen des *wiskott-aldrich syndrome proteine (WASP) family verprolin-homologous (WAVE) complex*. Über diese Signaltransduktionen wird RAC1 eine wesentliche Kontrolle bei der Formierung der Lamellipodien zugesprochen (Delorme et al., 2007; Miki, Yamaguchi, Suetsugu, & Takenawa, 2000). Unter den potenziell reversibel oxidierten Proteinen in retinsäurebehandelten Zellen befinden sich Komponenten beider RAC1-Signalkaskaden, welche zu einem Teil einen differenziellen Status aufwiesen (z.B. YWHAZ, ARPC2-4 und WASF2, Abbildung 5.4).

RAC1 bindet die Kinase PAK, welche folgend eine Umstrukturierung des Zytoskeletts über LIMK-Phosphorylierung herbeiführt (Gorovoy et al., 2005). Nachfolgend wird das redox-aktive CFL1 von den LIMKs phosphoryliert, woraufhin sich CFL1 von den Aktinfilamenten löst und so die Aktinpolymerisation fördert (Arber et al., 1998). CFL1 wird zudem über verschiedene Redoxkaskaden reguliert die die Aktinpolymerisation beeinflussen. Unter den Proteinen, die eine solche Kaskade vermitteln gehört auch das Kandidatenprotein *14-3-3 protein ζ* (YWHAZ, 4.4.4 und Abbildung 5.4). YWHAZ bildet einen Komplex mit der selektiven CFL1-Phosphatase *slingshot-protein phosphatase-1L* (SSH-1L). Dieser Komplex wird durch NOX-generierte H₂O₂-Spezies getrennt und CFL1 durch das

freigesetzte SSH-1L phosphoryliert und aktiviert, was letztlich zu der Bildung von Aktinfilamenten führt (Kim, Huang, & Bokoch, 2009). CFL1 zeigte in der vorliegenden Arbeit infolge der Retinsäurebehandlung eine erhöhte Abundanz in dem Redox-Proteom, der Unterschied lag jedoch knapp unter der Signifikanzgrenze ($p=0,07$). Die Analyse der carbamidomethylierten Peptide, welche die reversibel oxidierten Peptide repräsentieren, gab einen Hinweis darauf, dass die reversible Oxidation an dem Cys39 von CFL1 stattgefunden hat. CFL1 besitzt vier Cysteinreste, wobei die Reste Cys139 und Cys147 an der Proteinoberfläche und Cys39 und Cys80 innerhalb des Proteins liegen (Pope, Zierler-Gould, Kuhne, Weeds, & Ball, 2004). Verschiedene Studien zeigten oxidative Veränderungen an den vier Cysteinen welche die Aktindynamik beeinflussen (Chua et al., 2003; Klamt et al., 2009; Klemke et al., 2008; Schulte et al., 2013). Beispielsweise führt ein intramolekulares Disulfid zwischen Cys39 und Cys80 zu einer erhöhten Aktindepolymerisation (Klemke et al., 2008). Ein intermolekulares Disulfid des CFL1-Dimers zwischen Cys39 und Cys147 hingegen bewirkt eine Bildung von CFL1-Aktin-Oligomeren, welche in der Regel neuroprotektiv und reversibel sind. Diese Oligomere bilden einen weiteren Mechanismus, um die Aktindynamik zu regulieren (Bernstein, Shaw, Minamide, Pak, & Bamburg, 2012).

Das Zusammenspiel von RAC1 mit den WAVE-Proteinen wird über die Bindung zwischen RAC1 und dem *insulin-receptor-substrate-p53* (IRSp53) initiiert (Miki et al., 2000). Folgend können die WAVE-Proteine den *actin-nucleating protein, actin-related protein 2/3 complex* (ARP2/3-Komplex) binden und aktivieren, was das Wachstum neuer Filamente anregt (Mullins, Heuser, & Pollard, 1998). Der ARP2/3-Komplex besteht aus sieben Untereinheiten und ist einer der Hauptregulatoren des Aktin-Zytoskeletts (Goley & Welch, 2006). Die Untereinheiten ARP2 (ARPC2) und ARP3 (ARPC3) interagieren direkt mit Aktin und sind an der Aktinfilamentnukleation beteiligt (Aguda, Burtnick, & Robinson, 2005; Goley & Welch, 2006). Studien an Melanomzellen wiesen auf ein redox-abhängiges Zusammenspiel zwischen RAC1 und dem WAVE-Komplex hin (S. J. Park, Kim, & Jeon, 2012). Die in der vorliegenden Arbeit quantifizierten Proteine der Familie der Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteine (WASFs und das neuronale WASL) zeigten nach Retinsäurebehandlung tendenziell eine erhöhte Abundanz in dem Redox-Proteom, wiesen jedoch keinen signifikanten Unterschied auf. Verschiedene Studien zeigten, dass die Filopodiumbildung über ein Wechselspiel zwischen WASFs und WASL mit CDC42 verläuft (Miki, Sasaki, Takai, & Takenawa, 1998; Symons et al., 1996). Weitere Einflussbereiche von RAC1 in der Aktindynamik sind unter anderem bei der Interaktion zwischen der Zelle und der extrazellulären Matrix, der Zellmobilität, Zellpolarisierung und Zell-Zelladhäsion (Acevedo & Gonzalez-Billault, 2018; Campanale, Sun, & Montell, 2017; Lawson & Burridge, 2014; Ridley, 2015; Stramer & Mayor, 2016).

5.3.3.2 RAC1 vermittelte Signaltransduktion über RET

Die RAC-Signaltransduktion wird über eine Vielzahl von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen vermittelt, in SH-SY5Y-Zellen z.B. über RET (Fukuda et al., 2002). Bei der *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF)-induzierten neuronalen Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen wurde gezeigt, dass die Bildung der Lamellipodien abhängig von der RET-Aktivierung und darauffolgenden RAC1-Induktion ist (Fukuda et al., 2002). Bei der Antwort handelt es sich um einen äußerst schnellen Mechanismus, bei dem die Bildung der Lamellipodien bereits nach fünf bis 30 Min. GDNF-Behandlung beobachtet wird (Fukuda et al., 2002). In den hier durchgeführten Proteomstudien wurde nach 3 Std. ein Retinsäure-abhängiger Anstieg der RET-Abundanz quantifiziert (4.2). Eine starke Induktion der RET-Abundanz wurde bereits in verschiedenen Zelllinien, darunter auch Neuroblastom-Linien, während der frühen Prozesse der neuronalen Differenzierung beschrieben (Angrisano et al., 2011; Bunone et al., 1995; Oppenheimer et al., 2007; Patrone et al., 1997). Die Kinase RET ist ein Rezeptor für die extrazellulären Liganden der GDNF-Familie (GFL), deren Aktivierung durch Co-Rezeptoren der GFR α -Familie vermittelt wird. Bindet GFR α an GFL führt dies zu einer Dimerisierung und Autophosphorylierung innerhalb der Kinasedomäne von RET (Kawamoto et al., 2004). Aktiviertes RET ist unter anderem an der Induktion der für die neuronalen Differenzierungsprozesse wichtigen RAS/ERK- und PI3K/AKT-Signalwege involviert (Besset, Scott, & Ibanez, 2000; Hayashi et al., 2000; Segouffin-Cariou & Billaud, 2000). Mutationen in dem Protoonkogen *RET* sind maßgeblich an der Entwicklung der Hirschsprung-Krankheit und der multiplen endokrinen Neoplasie (MEN2A und MEN2B) beteiligt. Zudem spielt RET eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems (Schaller et al., 2005). Mäusen, denen eine Komponente der GDNF-GFR α -RET-Triade fehlt, zeigten eine gestörte Entwicklung der Leber und des enterischen Nervensystems (Craig, Mantell, Ekeroma, Stewart, & Mitchell, 2004). In *Drosophila* führt eine Deletion von RET zu verschiedenen Defekten der Dendriten aufgrund einer fehlenden Adhäsion der extrazellulären Matrix und einem damit verbundenen verschlechterten Wachstum (Soba et al., 2015). In SH-SY5Y-Zellen wurde zudem gezeigt, dass eine Inhibierung von RET zu einer verringerten Neuritenlänge führt (Yamada et al., 2007). Eine Studie welche die Funktionalität des Rezeptors in einen direkten Zusammenhang mit redox-getriebenen Prozessen setzt wurde 2014 veröffentlicht (S. Qiao et al., 2014). Infolge einer RAC1-induzierten NOX-Aktivierung, mit gleichzeitiger Verringerung der SOD-Aktivität, kommt es zu erhöhten endogenen ROS-Mengen und einer vermehrten Autophosphorylierung von RET (S. Qiao et al., 2014). Das Wechselspiel zwischen RET und RAC1 wurde auch in *Drosophila* beschrieben (Soba et al., 2015). RET interagiert mit Integrinen und reguliert die Adhäsion von Dendriten über RAC1, damit wird RET in einen direkten Zusammenhang mit der morphologischen Ausbildung der Dendriten gebracht. Darüber hinaus ist die Aktivität von RET wichtig für die zelluläre Verteilung von F-Aktin (Soba et al., 2015). In diesem Modellsystem wurde weder eine reversible Oxidation des Rezeptors, noch eine Veränderung von

dessen Abundanz infolge der Wirkstoffbehandlung detektiert. RET ist damit kein direktes Kandidatenprotein für eine oxidative Modifizierung der Cysteine. Die durch Retinsäure angetriebenen neuronalen Differenzierungsprozesse könnten jedoch durch ein Zusammenspiel aus NOX-generierten H_2O_2 -Mengen, dem Thiolstatus von RAC1 und der daraus resultierenden RET-Autophosphorylierung beeinflusst werden. Um diese Aspekte näher zu beleuchten, kann in nachfolgenden Experimenten zunächst die Aktivität und die Lokalisierung der GTPase in Abhängigkeit von deren Oxidationsstatus und der Retinsäure-Zugabe gemessen werden. Zu berücksichtigen sind dabei sowohl die Assoziationsrate an den NOX2-Komplex und somit die H_2O_2 -Entstehung als auch die Nukleotid-Austauschrate. Nachfolgend kann überprüft werden, wie der Redoxzustand von RAC1 und die zellulären H_2O_2 -Mengen mit der Membranständigkeit und Autophosphorylierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase RET im Zusammenhang stehen.

5.3.3.3 RAC1 als oxidativ modifiziertes Zielprotein

Neben den beschriebenen redox-sensitiven Signalkaskaden in die RAC1 involviert ist, wird es darüber hinaus als direktes Zielprotein für Cys-PTMs in Betracht gezogen. Beispielsweise wurde in primären Chondrozyten eine Glutathionylierung an Cys18 beschrieben, welche die Guaninnukleotid-Austauschrate beeinflusst (Hobbs et al., 2015). Dabei wird die Kapazität des Guaninnukleotid-Austausches durch Glutathionylierung *in vitro* um das 200-fache erhöht, eine Peroxidzugabe *in vivo* hingegen resultiert nur in einer 10-fachen Erhöhung (Heo & Campbell, 2005; Hobbs et al., 2015; Lepetos & Papavassiliou, 2016). In Swiss-3T3-Zellen werden Veränderungen in der Bildung von Lamellipodien auf eine Thioloxydation an RAC1 zurückgeführt (Hobbs et al., 2015).

Posttranslationale Modifizierungen an dem carboxyterminalen CAAX-Motiv sind entscheidend für die Assoziation der Proteine an die Plasmamembran oder interne Membranen (Roberts et al., 2008). Modifizierungen an diesem Motiv beeinflussen den Zyklus der GTPasen und damit deren biologische Aktivität (Hobbs, Zhou, Cox, & Campbell, 2014). Die entsprechenden cysteinetragenden Peptide wurden in der redox-spezifischen Studie zwar identifiziert, konnten aber aufgrund der Sequenzhomologien (in Zusammenhang mit den identifizierten tryptischen Peptiden) keiner spezifischen GTPase zugeordnet werden. Die Cysteine, des als redox-sensitiv beschriebenen GXXXXGK(S/T)C-Motivs, liegen in einem distinkten und über verschiedene Rho-GTPasen hoch konserviertem Sequenzbereich (Heo & Campbell, 2005). In dem Fall von CDC42 liegen die Cysteine Cys18 und Cys81 auf spezifischen tryptischen Peptiden und konnten somit quantifiziert werden. An Cys18 wurden nach Retinsäurebehandlung vermehrt Carbamidomethylierungen detektiert, der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0,06$). Durch die Oxidation mit Diamid hingegen wurde ein signifikanter Anstieg der Carbamidomethylierung an Cys18 detektiert ($p=0,02$). Das als redox-sensitiv beschriebene Cys18

von CDC42 befindet sich in räumlicher Nähe zu der Phosphoryl-Bindungsstelle (*p-loop*) und steht in direktem Kontakt zu den gebundenen Nukleotiden (Hobbs et al., 2015).

Um eine detaillierte Aussage über das Wechselspiel zwischen den ROS, der Zytoskelett-Dynamik und der Aktivität der GTPasen machen zu können sind weitere Experimente nötig. Diese sollten insbesondere die Aktivität und Lokalisierung der GTPasen betrachten und den lokalen Effekt der durch Retinsäure-induzierten ROS weiter eingrenzen.

5.3.3.4 Netzwerkanalyse der redox-sensitiven Kandidatenproteine und durch NAC und BHA beeinflussten Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteine identifiziert die Kandidaten für eine direkte reversible Oxidation durch ROS sind oder deren Abundanz vermutlich durch den Redoxzustand, aufgrund der BHA bzw. NAC Co-Behandlung, beeinflusst wurde. Mithilfe einer Proteinnetzwerkanalyse sollen diese zwei Proteingruppen miteinander in Verbindung gebracht werden (3.9.9). Da sich infolge der Co-Behandlung mit BHA bzw. NAC eine signifikante Reduktion der Neuritenlänge im Vergleich zu den retinsäurebehandelten Zellen zeigte, wurde dieses Proteinnetzwerk mit Hinblick auf potenziell redox-sensitive Strukturproteine erstellt (Abbildung 5.5). Neben den Proteinen die durch BHA (59 Proteine) oder NAC (17 Proteine) beeinflusst wurden, wurden daher die Strukturproteine und Rho-GTPasen der Redox-Proteomanalyse (21 der Kandidatenproteine) für die Darstellung verwendet. Darüber hinaus wurden die NOX-Untereinheiten NCF1 und NCF2 hinzugefügt, um einen weiteren Verknüpfungspunkt zu redox-getriebenen Prozessen zu setzen.

Beide Netzwerke zeigen, dass viele der Proteine um RAC1 und CDC42 angeordnet sind und spiegeln damit die zentrale Rolle der Rho-GTPasen wider. Innerhalb dieser dichten Regionen befinden sich auch die NCF1- und NCF2-Untereinheiten, was den Zusammenhang zu redox-getriebenen Prozessen visualisiert. Nicht alle der durch die Wirkstoffe beeinflussten Proteine sind direkt an dem Aufbau des Zytoskeletts beteiligt und somit mit den eingetragenen Kandidatenproteinen vernetzt, z. B. der neuronale Marker VGF. Letztlich zeigt die Netzwerkanalyse, dass verschiedene interagierende Proteine durch Redoxprozesse beeinflusst werden und kann auf vorhandene Redoxkaskaden hinweisen. Cys-PTMs können die Funktion einzelner Proteine regulieren. Der Einfluss ist jedoch wesentlich weitreichender und umfasst verschiedene zelluläre Signale, z. B. die Ca²⁺-Signaltransduktion. Durch Redoxregulation werden aber auch andere PTMs beeinflusst, oftmals dadurch, dass PTM-generierende Enzyme modifiziert werden. Phosphatasen oder Kinasen gehören beispielsweise zu den redox-sensitiven Proteinen, wodurch der Phosphorylierungsstatus der Zelle ebenfalls durch Redoxprozesse moduliert wird (Burgoyne et al., 2007; L. B. Poole, 2015).

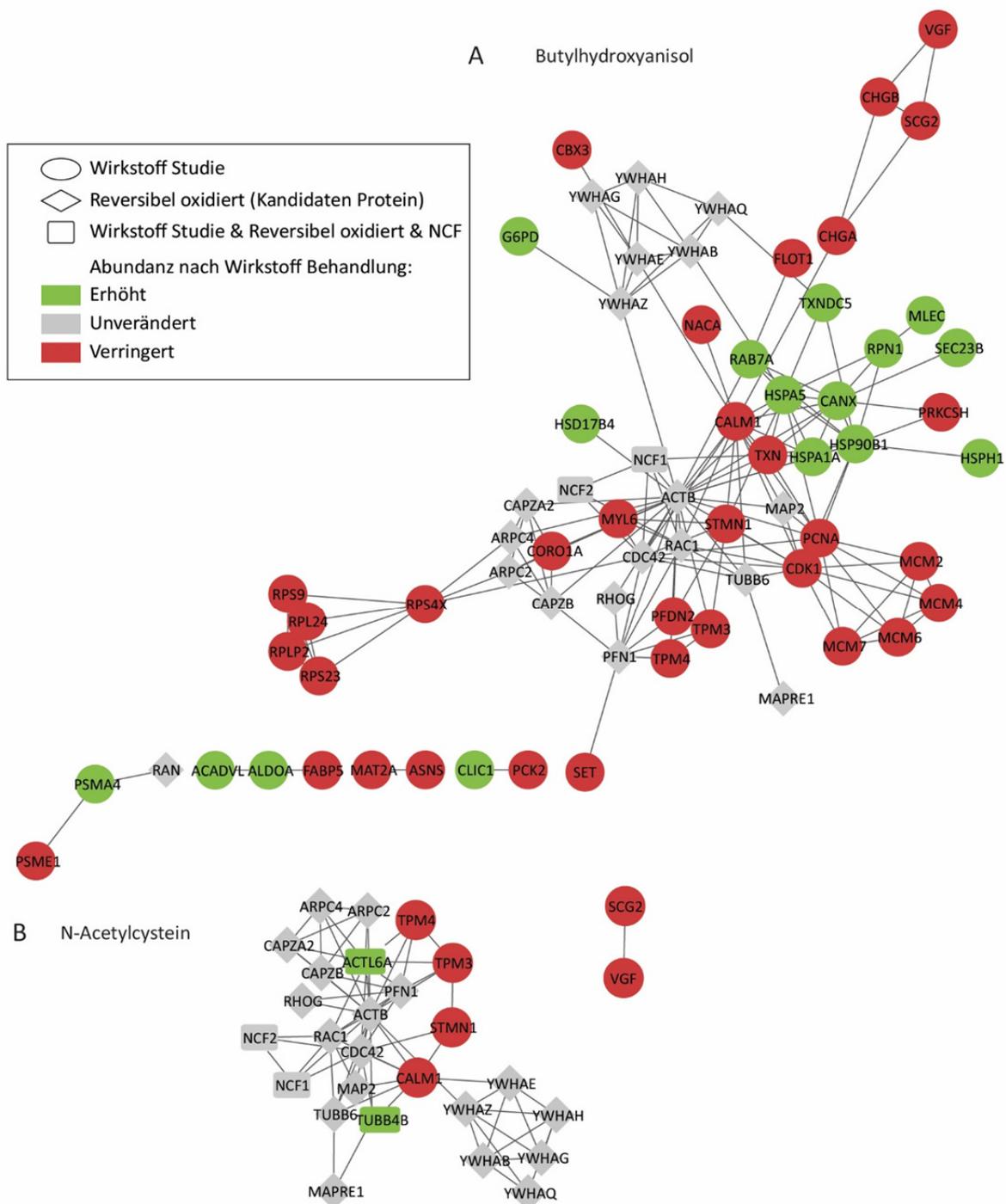


Abbildung 5.5 Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk.

Die Netzwerkanalyse wurde mit dem online Programm String durchgeführt und mit Cytoscape visualisiert. In die Analyse gingen die signifikanten Proteine der Redox-Proteomstudie mit ein, die mit dem Zytoskelett assoziiert sind und jeweils alle Proteine deren Abundanz durch die Co-Behandlung mit (A) dem Radikalfänger Butylhydroxyanisol oder (B) dem Reduktionsmittel N-Acetylcystein beeinflusst wurde. Darüber hinaus wurden die NADPH-Oxidase-Untereinheiten NCF1 und NCF2 mit aufgenommen. Dargestellt sind Proteine mit mindestens einer Verknüpfung zu einem weiteren Protein.

5.3.4 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass es 2-3Std. nach Beginn der Retinsäure-induzierten neuronalen Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen zu dynamischen Veränderungen des Redoxzustandes kommt. Die biologische Relevanz dieser Veränderungen wurde dadurch bestätigt, dass eine Manipulation des zellulären Redoxzustandes zu einer verringerten Expression von Retinsäure-Zielproteinen und einer verringerten Neuritenextension führt. Mittels redox-spezifischer Proteomanalyse konnte gezeigt werden, dass es nach zweistündiger Retinsäurebehandlung zu veränderten Abundanzen von Proteinen im Redox-Proteom kommt, die auf eine reversible Oxidation an den Cysteinen hinweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Modelle vorgeschlagen, die die molekularen Auswirkungen veränderter RS-Mengen während der Retinsäure-induzierten neuronalen Differenzierung erklären (Abbildung 5.6). (1) RS sind Teil eines Autoregulationsmechanismus mit dem die zelluläre RA-Homöostase kontrolliert werden kann. (2) Ein früher RS-Anstieg kann zu gezielten oxidativen Modifizierungen an Proteinen *downstream* des klassischen Retinsäure-Signalweges führen. Potenziell redox-sensitive Proteine sind dabei Teile von Signalkaskaden, die z.B. auf veränderte energetische Bedürfnisse der neuronal differenzierenden Zelle reagieren und zu der Ausbildung phänotypischer Merkmale beitragen können

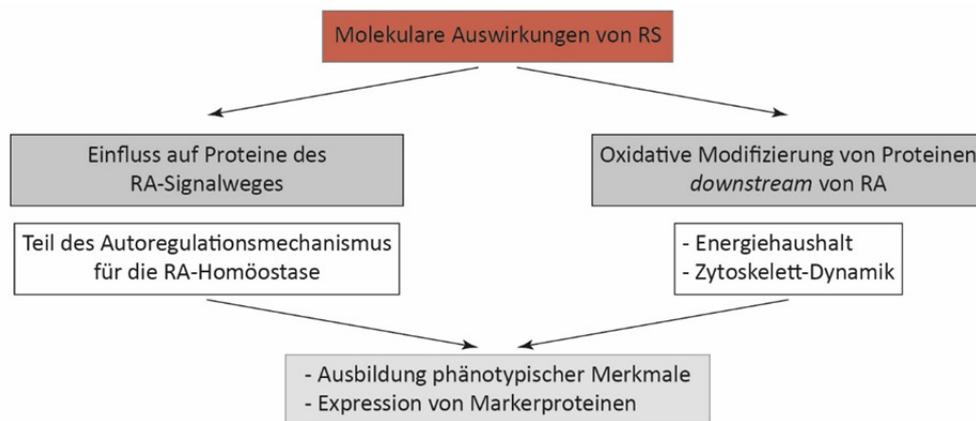


Abbildung 5.6 Mögliche molekulare Auswirkungen von RS während der Retinsäure-induzierten neuronalen Differenzierung.

Die redox-sensitiven Proteomanalysen lassen die Vermutung zu, dass reaktive Spezies (RS), wie z.B. H_2O_2 , (1) Proteine des Retinsäure (RA)-Signalweges beeinflussen und damit an der Modulation der RA-Homöostase beteiligt sein können und (2) zu reversiblen Oxidationen an Proteinen führen können, die in Signalkaskaden *downstream* von RA vorkommen.

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Prozessen (Abschnitt 5.3) handelt es sich um Redoxkaskaden und es ist davon auszugehen, dass nicht alle oxidativen Modifizierungen direkt auf die Reaktion mit H_2O_2 oder anderen RS zurückzuführen sind. Vielmehr wird, ähnlich wie bei der Vermittlung anderer posttranslationaler Modifizierungen, auch eine Kontrolle durch Enzyme stattfinden die bestimmte

Oxidations- und/oder Reduktionsschritte katalysieren. Eine Redoxreaktion ist prinzipiell durch die Interaktion zweier Proteine möglich oder durch die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten, wie TXN und GSH, welche wiederum durch NAD(P)H regeneriert werden.

Der proteomanalytische Ansatz bietet einen globalen Überblick über involvierte Prozesse. Eine funktionale Analyse, die diese Teilprozesse miteinander in Verbindung bringt, kann Gegenstand nachfolgender Arbeiten sein. Hierbei ist es von besonderem Interesse zu überprüfen, ob ein Zusammenspiel zwischen dem Redoxstatus einzelner Kandidatenproteine und der neuronalen Differenzierung besteht und wie dieses verläuft. Zu diesem Zweck können redox-insensitive Proteinvarianten in das Modellsystem eingebracht und die Ausbildung des neuronalen Phänotyps erneut überprüft werden.

Da H_2O_2 und andere RS als globale Signalmoleküle dienen, ist es von Interesse zu überprüfen ob gewebespezifische Zielproteine identifiziert werden können. Somit ist die Übertragung auf humane Zellen anderer Gewebe erstrebenswert. Zudem sollte überprüft werden, ob die Zusammenhänge auch in komplexeren Modellen gefunden werden, z.B. in primären Zellen oder dem Zebrafisch. Die Identifizierung von redox-sensitiven Proteinen ist besonders unter dem Aspekt der klinischen Anwendung interessant, da oxidativer Stress und veränderte ROS-Mengen mit der Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. der Parkinson-Krankheit, Alzheimer-Krankheit und Huntington-Krankheit, assoziiert sind (Manoharan et al., 2016). Der Einsatz eines geeigneten redox-sensitiven Proteins, als Biomarker für die Diagnose der Erkrankungen bzw. Target für eine Therapie, wäre in diesem Zusammenhang denkbar.

6. Anhang

Abbildungen

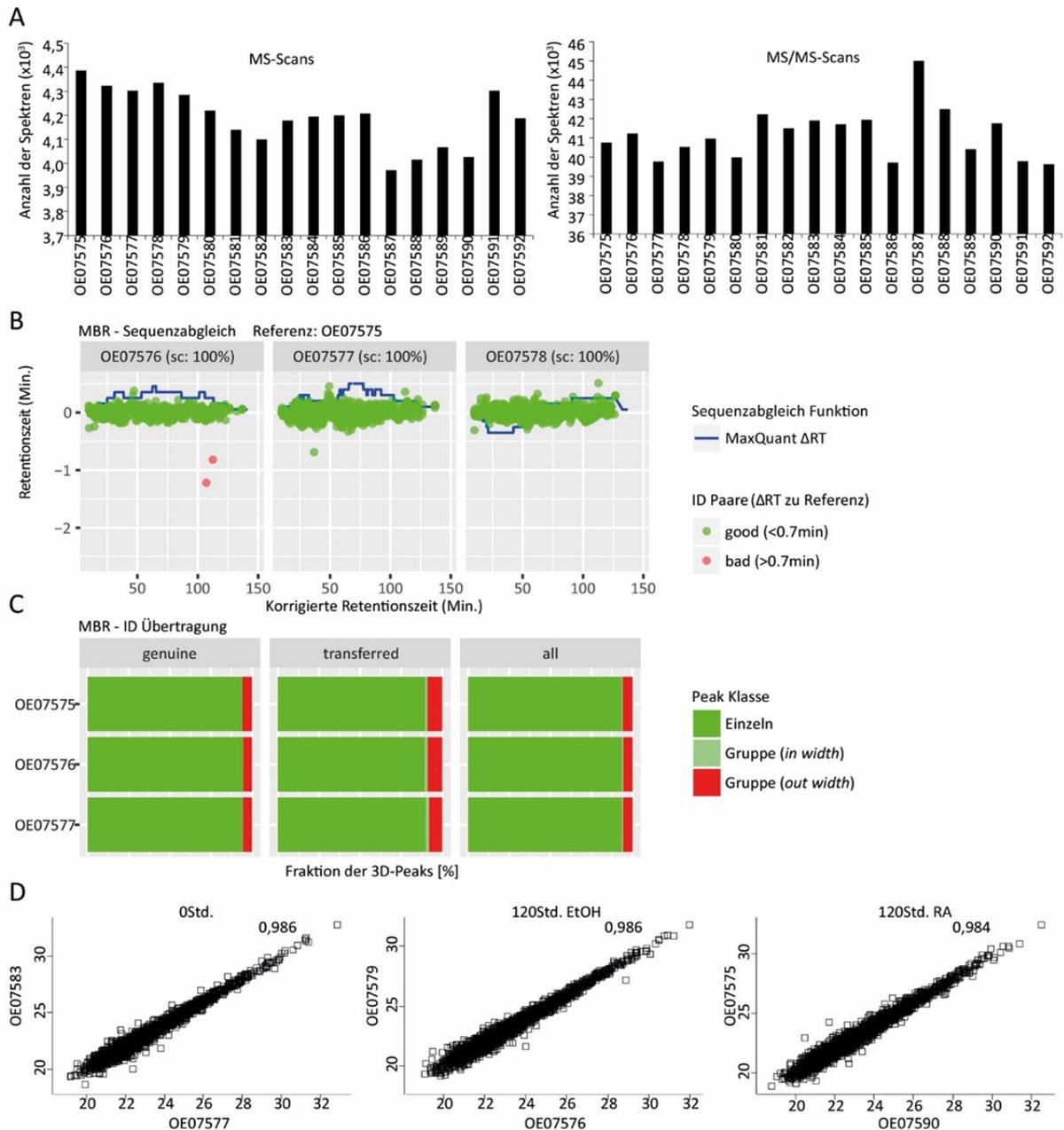


Abbildung 6.1 Beispielhafte Darstellung der Qualitätskontrolle für die Proteomanalysen.

Dargestellt anhand der differentiellen Studie 120 Std.-Proteom. Die Anzahl der aufgenommenen MS- (A) und MS/MS- (B) Spektren innerhalb einer Studie, sollen maximal eine Abweichung von 10% des jeweiligen Mittelwertes über alle Läufe zeigen. Die Güte der *match between runs* (MBR)-Funktion wurde mithilfe des R-Paketes PTXQC v.0.92.1 (Bielow et al., 2016) überprüft. Beispielhaft dargestellt an drei Läufen ist der Sequenzabgleich (B) und die ID-Übertragung (C). (D) Mithilfe einer Korrelationsanalyse nach Pearson (Perseus) wurde die Güte der Replikate überprüft. Beispielhaft dargestellt an je zwei Replikaten nach 0 Std. (links), 120 Std. EtOH- (mitte) und 120 Std. Retinsäurebehandlung (rechts).

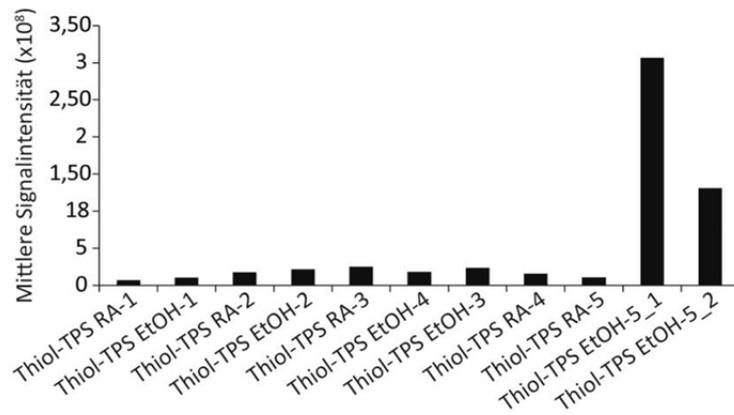


Abbildung 6.2 Mittlere MS-Signalintensitäten des Thiol-TPS-Datensatzes.

Die LC-MS/MS-Messungen der Replikate ($n=5$) zeigten, dass auch nach wiederholter Messung das Replikat EtOH-5 eine 13-fach erhöhte Intensität, verglichen zu den anderen Proben, aufwies. Daher wurde EtOH-5 aus der nachfolgenden Analyse ausgeschlossen.

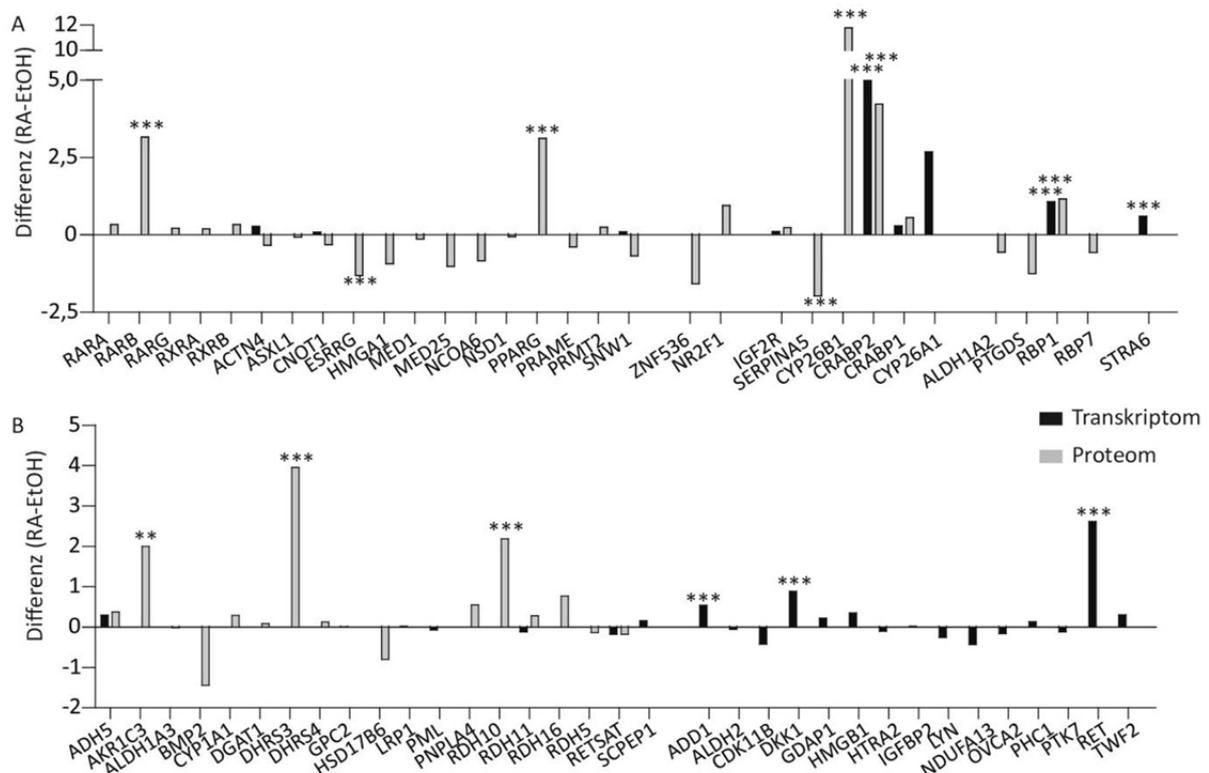


Abbildung 6.3 Relative Abundanzänderung der Komponenten des klassischen Retinsäure-Signalweges im Proteom und Transkriptom.

Zusätzlich zu den bereits quantifizierten Komponenten in dem Proteom von Retinsäure (RA)- und EtOH (Kontrolle)- behandelten SH-SY5Y-Zellen (120 Std.), wurden weitere Komponenten in dem Transkriptom identisch behandelter Zellen quantifiziert. (A) Darunter Retinsäure- und Retinoid-X-Rezeptoren sowie deren assoziierte Komponenten. Einträge für Gene/Proteine welche an die *retinoic acid responsive elements* (RARE) der DNA binden, Retinol-/Retinal-/Retinsäure-Bindung aufweisen oder den Transport von Retinol vermitteln. (B) Relative Veränderung der Abundanz weiterer Gene/Proteine, welche dem Retinol/Retinsäure-Metabolismus bzw. Retinsäure-Signalwegen zugesprochen werden. Die SAM-Methode wurde auf \log_2 transformierte Werte angewandt, mit einem konstanten $S_0=0,1$ und einer FDR-Korrektur von 0,05. Die Sterne markieren einen signifikanten Unterschied zwischen retinsäurebehandelten und Kontrollzellen $**p \leq 0,01$ und $***p \leq 0,001$.

Tabellen

Die Listen beinhalten alle Proteine (UniProt, *majority protein ID*), die eine differenzielle Abundanz (wenn nicht anders angegeben $p \leq 0,05$) in dem untersuchten Kontext aufwiesen. Bei den angegebenen p-Werten handelt es sich um korrigierte p-Werte (3.9). Die Ratios berechnen sich aus den gemittelten LFQ-Intensitäten und erlauben eine Aussage über die Zu- oder Abnahme der Abundanz des Proteins. Die in den Proteinlisten angegebene Anzahl der Peptide und die Sequenzabdeckung beziehen sich auf alle zur Quantifizierung genutzten Peptide (*razor* und *unique*). Abweichungen von den oben genannten Kriterien sind stets angegeben.

Tabelle 6.1 120 Std.-Proteom: Liste der 80 differenziellen Proteine.

Proteine mit einer statistisch signifikanten Änderung der Abundanz nach 120 Std. Retinsäurebehandlung (RA) im Vergleich zu der 120 Std. Kontrolle (EtOH).

Protein ID	Gen-name	Ratio			p-Wert			Peptide	Sequenz-abdeckung (%)	Score	MS/MS-Count
		120Std. EtOH/OStd.	120Std. RA/OStd.	120Std. RA/120Std. EtOH	120Std. EtOH vs. OStd.	120Std. RA vs. OStd.	120Std. RA vs. 120Std. EtOH				
P29373	CRABP2	1,08	24,89	23,14	1	$1,9 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-6}$	6	50,0	44,2	31
O15394	NCAM2	0,95	7,13	7,51	$9,8 \times 10^{-1}$	$1,8 \times 10^{-4}$	$6,5 \times 10^{-4}$	8	15,9	22,2	40
Q04656	ATP7A	1,41	9,42	6,66	$1,2 \times 10^{-1}$	$1,3 \times 10^{-7}$	$2,8 \times 10^{-6}$	12	9,9	20,5	49
P07949	RET	3,56	21,12	5,93	$5,8 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-6}$	$1,9 \times 10^{-3}$	27	33,2	120,5	139
O43174	CYP26A1	0,78	4,30	5,55	$9,4 \times 10^{-1}$	$1,3 \times 10^{-2}$	$3,3 \times 10^{-2}$	5	12,5	7,7	15
Q8IV48	ERI1	1,07	5,33	5,00	1	$7,0 \times 10^{-6}$	$9,1 \times 10^{-5}$	3	9,7	5,7	18
P22466	GAL	0,60	2,89	4,85	$3,1 \times 10^{-1}$	$4,2 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-2}$	2	13,0	3,5	24
P13521	SCG2	0,90	4,22	4,68	$8,3 \times 10^{-1}$	$9,7 \times 10^{-6}$	$3,4 \times 10^{-5}$	17	41,8	96,5	142
Q99439	CNN2	0,56	2,04	3,65	$2,1 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-2}$	$5,6 \times 10^{-4}$	5	23,0	13,7	36
Q68CZ2	TNS3	0,64	2,11	3,30	$8,6 \times 10^{-2}$	$7,1 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$	4	6,6	15,0	18
P07858	CTSB	1,25	4,04	3,24	$1,2 \times 10^{-1}$	$7,2 \times 10^{-8}$	$1,3 \times 10^{-6}$	13	51,6	117,3	167
Q9UK56	PACSIN3	1,28	3,87	3,02	1	$1,7 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^{-2}$	3	10,8	6,0	24
Q8IUD2	ERC1	0,96	2,74	2,87	1	$3,4 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-2}$	3	3,7	5,3	20
O15240	VGF	0,74	1,92	2,59	$1,1 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-6}$	45	69,9	323,3	1071
P09543	CNP	1,84	4,64	2,51	$2,4 \times 10^{-3}$	$6,1 \times 10^{-7}$	$5,9 \times 10^{-4}$	20	55,6	75,3	130
Q9Y6C2	EMILIN1	1,73	4,02	2,33	$4,2 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-6}$	$9,7 \times 10^{-4}$	7	12,8	25,5	37
O75369	FLNB	1,04	2,30	2,22	$8,9 \times 10^{-1}$	$6,8 \times 10^{-8}$	$3,0 \times 10^{-7}$	93	54,6	323,3	775
Q9UEY8	ADD3	2,37	5,18	2,19	$1,8 \times 10^{-3}$	$4,5 \times 10^{-6}$	$2,4 \times 10^{-2}$	19	33,1	63,9	119
P09455	RBP1	0,66	1,40	2,13	$6,7 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-2}$	15	80,0	114,2	233
Q04726	TLE3	0,70	1,46	2,09	$3,3 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-3}$	10	20,7	27,1	81
P56199	ITGA1	2,04	4,01	1,96	$5,8 \times 10^{-3}$	$9,7 \times 10^{-6}$	$2,2 \times 10^{-2}$	11	11,9	31,5	44
Q9NPH2	ISYNA1	0,87	1,66	1,92	$6,3 \times 10^{-1}$	$3,1 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^{-3}$	15	37,5	65,6	153
Q99541	PLIN2	0,82	1,42	1,73	$8,5 \times 10^{-2}$	$3,2 \times 10^{-3}$	$6,1 \times 10^{-4}$	11	39,6	24,6	68
Q13232	NME3	2,11	3,59	1,70	$4,5 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-6}$	$3,3 \times 10^{-2}$	2	20,1	6,9	29
Q15274	QPRT	0,97	1,65	1,70	1	$6,4 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^{-2}$	8	35,7	29,1	67
P08183	ABCB1	1,30	2,13	1,65	$1,1 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-4}$	25	24,7	78,8	224
P42785	PRCP	1,49	2,37	1,59	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-6}$	$2,9 \times 10^{-3}$	13	33,7	20,8	83

Q9UMS6	SYNPO2	1,01	1,60	1,57	1	$5,8 \times 10^{-4}$	$6,2 \times 10^{-3}$	21	37,1	81,6	195
P36871	PGM1	0,99	1,53	1,55	1	$1,3 \times 10^{-3}$	$6,2 \times 10^{-3}$	27	55,9	204,8	251
Q15417	CNN3	0,68	1,05	1,55	$1,8 \times 10^{-3}$	$8,7 \times 10^{-1}$	$3,5 \times 10^{-3}$	16	58,7	91,8	186
Q9BX79	STRA6	1,74	2,64	1,52	$2,0 \times 10^{-4}$	$7,7 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-2}$	8	21,0	39,9	76
Q14195	DPYSL3	0,80	1,19	1,49	$7,5 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-1}$	$1,8 \times 10^{-2}$	30	75,3	323,3	798
P35611	ADD1	1,42	2,08	1,46	$1,2 \times 10^{-4}$	9,6x108	$3,8 \times 10^{-4}$	18	31,8	51,7	167
P49748	ACADVL	1,41	2,01	1,43	$2,1 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-7}$	$9,7 \times 10^{-4}$	29	53,9	163,5	381
Q9HC35	EML4	0,92	1,26	1,37	$3,3 \times 10^{-1}$	$2,6 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-3}$	29	36,1	146,7	321
Q9UJU6	DBNL	0,73	0,98	1,34	$4,7 \times 10^{-4}$	1	$4,1 \times 10^{-3}$	14	41,2	168,2	148
P09172	DBH	1,16	1,56	1,34	$7,2 \times 10^{-2}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-2}$	29	59,0	240,8	463
Q01813	PFKP	1,00	1,32	1,33	1	$8,9 \times 10^{-4}$	$6,2 \times 10^{-3}$	28	41,5	102,0	258
P13591	NCAM1	2,42	3,21	1,33	$2,6 \times 10^{-7}$	3,8x109	$9,5 \times 10^{-3}$	26	40,0	302,1	295
P26378	ELAVL4	0,81	1,07	1,32	$2,9 \times 10^{-2}$	$7,5 \times 10^{-1}$	$3,7 \times 10^{-2}$	12	34,2	82,2	160
P00367;P4 9448	GLUD1;GL UD2	1,28	1,68	1,31	$1,0 \times 10^{-3}$	$9,6 \times 10^{-7}$	$3,0 \times 10^{-3}$	24	53,2	63,8	251
Q15436	SEC23A	0,87	1,14	1,31	$1,7 \times 10^{-1}$	$2,0 \times 10^{-1}$	$3,7 \times 10^{-2}$	12	27,7	41,4	113
P09104	ENO2	0,92	1,19	1,29	$5,0 \times 10^{-1}$	$5,2 \times 10^{-2}$	$3,7 \times 10^{-2}$	17	54,1	228,0	299
P46821	MAP1B	1,07	1,38	1,28	$2,3 \times 10^{-1}$	$6,6 \times 10^{-6}$	$5,6 \times 10^{-4}$	94	49,4	323,3	1072
Q9UHB6	LIMA1	0,77	0,98	1,27	$4,6 \times 10^{-3}$	1	$5,0 \times 10^{-2}$	17	31,8	77,3	130
P63010	AP2B1	1,16	1,43	1,24	$2,8 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-2}$	36	44,3	144,2	279
Q01082	SPTBN1	1,07	1,31	1,23	$4,9 \times 10^{-1}$	$4,8 \times 10^{-4}$	$3,1 \times 10^{-2}$	119	60,2	323,3	1434
P55786	NPEPPS	0,93	1,11	1,19	$2,5 \times 10^{-1}$	$7,2 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-2}$	36	52,3	160,3	383
Q9P2J5	LARS	0,84	0,68	0,81	$2,2 \times 10^{-2}$	$3,6 \times 10^{-5}$	$3,7 \times 10^{-2}$	36	36,6	205,8	265
P40926	MDH2	1,50	1,19	0,79	$9,9 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-2}$	$3,5 \times 10^{-2}$	26	69,2	214,2	644
P42704	LRPPRC	1,53	1,21	0,79	$5,2 \times 10^{-6}$	$3,2 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^{-3}$	80	65,8	323,3	935
P26640	VARS	1,10	0,86	0,78	$2,5 \times 10^{-1}$	$5,1 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-2}$	34	39,4	115,8	235
Q15149	PLEC	1,40	1,06	0,76	$1,5 \times 10^{-4}$	$5,6 \times 10^{-1}$	$4,0 \times 10^{-3}$	114	32,8	282,9	737
P29401	TKT	0,70	0,53	0,76	$1,9 \times 10^{-4}$	$6,9 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-2}$	33	71,6	189,3	449
P11498	PC	1,14	0,86	0,75	$2,0 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-1}$	$3,3 \times 10^{-2}$	17	23,5	63,1	118
Q9HD20	ATP13A1	1,19	0,87	0,73	$7,4 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-1}$	$1,4 \times 10^{-2}$	15	16,3	36,4	124
O75439	PMPCB	1,24	0,90	0,72	$1,0 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-1}$	$2,6 \times 10^{-3}$	14	37,4	51,2	127
Q9NSD9	FARSB	0,73	0,53	0,72	$2,8 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-6}$	$1,8 \times 10^{-2}$	17	35,8	39,0	141
O75964	ATP5L	1,64	1,18	0,72	$4,0 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-1}$	$4,1 \times 10^{-2}$	6	53,4	13,9	51
P0DMV9;P ODMV8	HSPA1B;H SPA1A	1,05	0,76	0,72	$9,6 \times 10^{-1}$	$9,2 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-2}$	35	65,5	323,3	585
P08670	VIM	0,89	0,63	0,71	$3,4 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-2}$	70	89,7	323,3	2548
P23921	RRM1	0,56	0,39	0,70	$1,8 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-6}$	$4,7 \times 10^{-2}$	17	35,1	65,3	157
Q8TEX9	IPO4	0,77	0,54	0,70	$4,1 \times 10^{-2}$	$6,8 \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^{-2}$	17	23,7	84,6	118
P22087	FBL	1,19	0,83	0,69	$1,9 \times 10^{-1}$	$9,3 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-2}$	9	34,9	44,8	119
Q9P015	MRPL15	1,10	0,76	0,69	$7,2 \times 10^{-1}$	$3,3 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^{-2}$	6	26,0	15,8	27
Q9Y2S7	POLDIP2	1,61	1,10	0,68	$1,6 \times 10^{-3}$	$6,8 \times 10^{-1}$	$4,9 \times 10^{-2}$	4	14,9	8,1	29
P62993	GRB2	1,07	0,72	0,67	$8,0 \times 10^{-1}$	$1,4 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^{-3}$	7	41,0	48,5	73
Q12931	TRAP1	1,27	0,83	0,65	$2,9 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-4}$	21	38,8	91,4	234
Q9Y5J1	UTP18	1,10	0,71	0,65	$6,1 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-2}$	5	13,3	9,9	20
P17252	PRKCA	1,36	0,88	0,65	$4,8 \times 10^{-4}$	$9,3 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-4}$	12	25,9	39,3	81
Q12788	TBL3	1,18	0,74	0,63	$3,0 \times 10^{-1}$	$2,9 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-2}$	23	44,3	86,5	194
P07355;A 6NMY6	ANXA2;A NXA2P2	1,08	0,64	0,60	$9,4 \times 10^{-1}$	$1,4 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^{-3}$	33	76,4	323,3	528
Q15758	SLC1A5	1,15	0,67	0,58	$5,0 \times 10^{-1}$	$4,8 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^{-3}$	7	17,9	46,9	76

Q9H6R4	NOL6	1,22	0,66	0,54	$2,9 \times 10^{-1}$	$6,7 \times 10^{-3}$	$3,3 \times 10^{-3}$	9	13,9	24,8	68
Q8WWM9	CYGB	1,00	0,54	0,53	1	$7,2 \times 10^{-4}$	$5,2 \times 10^{-3}$	7	50,5	11,6	28
Q03701	CEBPZ	3,31	1,70	0,51	$2,7 \times 10^{-5}$	$9,3 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-2}$	10	14,2	27,0	50
Q9NZW5	MPP6	1,54	0,75	0,48	$8,8 \times 10^{-3}$	$6,3 \times 10^{-2}$	$9,7 \times 10^{-4}$	10	23,0	32,0	36
P50150	GNG4	2,82	0,87	0,31	$3,9 \times 10^{-3}$	$9,3 \times 10^{-1}$	$9,5 \times 10^{-3}$	2	44,0	4,3	9
P10645	CHGA	2,59	0,80	0,31	$2,0 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-1}$	$1,1 \times 10^{-4}$	13	43,3	78,2	128
Q12860	CNTN1	3,71	0,90	0,24	$3,7 \times 10^{-5}$	$9,4 \times 10^{-1}$	$9,8 \times 10^{-5}$	11	15,2	17,7	39

Tabelle 6.2 RA-Zeitreihe: Liste der 177 differentiellen Proteine.

Proteine mit einer statistisch signifikanten Änderung der Abundanz ($p \leq 0,05$) nach 1, 3, 8 oder 48 Std. Retinsäurebehandlung (RA) im Vergleich zu der Kontrolle (EtOH), zu dem gleichen Zeitpunkt. Dargestellt sind auch die korrigierten p-Werte der zweifaktoriellen ANOVA. Diff.: Zeitpunkt zu dem signifikante Abundanzänderungen detektiert wurden. Bhdl.: Behandlung; Pep: Anzahl der Peptide.

Protein ID	Genname	p-Wert ANOVA (korrigiert)			p-Wert RA vs. EtOH				Diff.	Pe p	Sequenz- abdeckun g (%)
		Bhdl.	Zeit	Bhdl. *Zeit	1Std.	3Std.	8Std.	48Std.			
P35611-2	ADD1	$1,2 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-6}$	$2,7 \times 10^{-3}$	$6,3 \times 10^{-1}$	$3,7 \times 10^{-1}$	1	$1,9 \times 10^{-7}$	48	13	33,1
A6NKG5	RTL1	$6,4 \times 10^{-11}$	$6,0 \times 10^{-5}$	$< 1 \times 10^{-12}$	1	1	$4,6 \times 10^{-2}$	$< 1 \times 10^{-12}$	8/48	53	53,8
P47756-2	CAPZB	$2,8 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-1}$	$9,5 \times 10^{-1}$	1	$9,8 \times 10^{-1}$	$1,2 \times 10^{-2}$	48	17	64
B4DDF4	CNN2	$2,9 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-1}$	$3,6 \times 10^{-2}$	1	1	$8,9 \times 10^{-1}$	$2,3 \times 10^{-4}$	48	5	30,2
B7Z6M1	PLS3	$7,1 \times 10^{-1}$	$4,8 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-2}$	1	$8,0 \times 10^{-1}$	1	$4,2 \times 10^{-3}$	48	15	37,3
B4DLN1	SLC25A10	$9,4 \times 10^{-1}$	$3,2 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-2}$	1	1	$9,0 \times 10^{-1}$	$4,1 \times 10^{-3}$	48	11	36
B5AK60	ABC1	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,7 \times 10^{-10}$	$7,1 \times 10^{-6}$	$4,7 \times 10^{-1}$	1	1	$3,3 \times 10^{-10}$	48	18	21,1
B7Z9L0	CCT4	$3,7 \times 10^{-1}$	$1,4 \times 10^{-1}$	$3,6 \times 10^{-1}$	1	1	1	$2,1 \times 10^{-2}$	48	31	46,4
B8ZZG1	MPP6	$1,0 \times 10^{-1}$	$4,1 \times 10^{-2}$	$7,7 \times 10^{-4}$	1	$3,4 \times 10^{-1}$	$3,6 \times 10^{-1}$	$2,9 \times 10^{-5}$	48	7	18,5
C9JIX6	ARVCF	$1,1 \times 10^{-1}$	$5,5 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-1}$	1	1	$9,7 \times 10^{-1}$	$2,2 \times 10^{-2}$	48	6	9,9
O60716-24	CTNND1	$4,2 \times 10^{-1}$	$2,5 \times 10^{-2}$	$2,4 \times 10^{-1}$	1	1	1	$2,5 \times 10^{-2}$	48	15	30
O95757	HSPA4L	$4,8 \times 10^{-2}$	$2,8 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-2}$	$7,7 \times 10^{-1}$	$9,7 \times 10^{-1}$	1	$1,3 \times 10^{-4}$	48	22	36,9
E9PAU2	RAVER1	$2,0 \times 10^{-1}$	$6,4 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-1}$	1	1	1	$2,6 \times 10^{-2}$	48	14	36,6
Q86V81	ALYREF	$8,5 \times 10^{-1}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$6,1 \times 10^{-3}$	1	$2,7 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-1}$	1	3	7	45,5
Q14141-2	SEPT6; ARHGEF9	$5,2 \times 10^{-1}$	$5,2 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-1}$	$9,6 \times 10^{-1}$	1	1	$2,0 \times 10^{-2}$	48	18	58,5
F5H2F3	NUMA1	$5,1 \times 10^{-1}$	$3,8 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$	1	1	$9,8 \times 10^{-1}$	$2,4 \times 10^{-5}$	48	33	37
F5H7D6	TLE3	$4,2 \times 10^{-9}$	$3,6 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-4}$	$9,9 \times 10^{-1}$	$1,9 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-10}$	8/48	10	22,9
F5H896	ZNF711;EPS 8;URI1	$8,6 \times 10^{-3}$	$3,9 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^{-2}$	$9,1 \times 10^{-1}$	1	1	$2,9 \times 10^{-5}$	48	24	24,3
Q16630-3	CPSF6	$2,0 \times 10^{-1}$	$3,3 \times 10^{-1}$	$2,6 \times 10^{-1}$	$2,8 \times 10^{-2}$	1	1	$8,6 \times 10^{-1}$	1	8	24,1
G3V0E4	PMPCB	$1,8 \times 10^{-1}$	$7,1 \times 10^{-2}$	$5,3 \times 10^{-2}$	$7,4 \times 10^{-1}$	1	$9,7 \times 10^{-1}$	$4,4 \times 10^{-3}$	48	31	32,3
G3V1V0	MYL6	$3,2 \times 10^{-1}$	$1,2 \times 10^{-9}$	$2,5 \times 10^{-1}$	1	$9,9 \times 10^{-1}$	$6,1 \times 10^{-1}$	$1,6 \times 10^{-2}$	48	9	3,7
G5E9L0	ARFGAP2	$1,3 \times 10^{-1}$	$8,6 \times 10^{-2}$	$4,4 \times 10^{-1}$	$9,8 \times 10^{-1}$	1	$2,2 \times 10^{-2}$	1	8	10	3,2
P62158	CALM1;CAL M2;CALM3	$2,6 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-1}$	1	1	$2,1 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-1}$	8	7	55,7
J3QSV6	RSL1D1	$7,3 \times 10^{-1}$	$1,9 \times 10^{-2}$	$2,4 \times 10^{-1}$	1	1	1	$1,9 \times 10^{-2}$	48	5	17
K7EIG1	CLUH	$4,6 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-6}$	$8,0 \times 10^{-4}$	1	1	1	$2,0 \times 10^{-6}$	48	10	11,9
O00442	RTCA	$4,6 \times 10^{-1}$	$3,3 \times 10^{-1}$	$2,4 \times 10^{-1}$	1	$3,5 \times 10^{-2}$	1	1	3	8	30,9
O14744	PRMT5	$6,8 \times 10^{-3}$	$8,6 \times 10^{-2}$	$3,1 \times 10^{-1}$	1	$9,9 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,4 \times 10^{-2}$	48	15	41
O14813	PHOX2A	$1,5 \times 10^{-6}$	$4,0 \times 10^{-2}$	$6,2 \times 10^{-3}$	1	$1,5 \times 10^{-1}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^{-5}$	8/48	8	43,3
O15018-2	-	$6,1 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-2}$	$3,7 \times 10^{-2}$	$3,2 \times 10^{-1}$	1	$9,3 \times 10^{-1}$	$8,1 \times 10^{-5}$	48	12	4,9

O15240	VGF	4,1x10 ⁻⁰⁷	4,3x10 ⁻¹⁵	3,4x10 ⁻¹²	1	1	8,6x10 ⁻¹	< 1 x 10 ⁻¹²	48	42	70,7
O15394	NCAM2	6,1x10 ⁻³	1,9x10 ⁻⁵	2,1x10 ⁻³	1	8,6x10 ⁻¹	7,8x10 ⁻¹	1,7x10 ⁻⁶	48	7	12,1
O43174-2	CYP26A1	1,5x10 ⁻⁶	1,1x10 ⁻⁰⁸	9,6x10 ⁻⁶	1	8,8x10 ⁻¹	9,0x10 ⁻¹	1,3x10 ⁻¹⁰	48	11	34,3
O43252	PAPSS1	6,1x10 ⁻²	2,3x10 ⁻¹	3,2x10 ⁻¹	1	1	1	9,7x10 ⁻³	48	12	30,3
O43301	HSPA12A	2,4x10 ⁻¹	6,2x10 ⁻¹	2,5x10 ⁻¹	1	1	1	1,1x10 ⁻²	48	7	14,5
O43815	STRN	8,6x10 ⁻³	3,0x10 ⁻¹	2,5x10 ⁻¹	1	9,8x10 ⁻¹	5,9x10 ⁻¹	2,7x10 ⁻³	48	8	17,2
O75369-2	FLNB	1,0x10 ⁻⁰⁸	7,7x10 ⁻¹¹	3,4x10 ⁻¹²	1	1	1	< 1 x 10 ⁻¹²	48	89	54,4
O75643	SNRNP200	1,3x10 ⁻¹	2,0x10 ⁻⁰⁸	1,1x10 ⁻¹	1	1	4,0x10 ⁻¹	6,0x10 ⁻³	48	81	52,7
O75976	CPD	3,1x10 ⁻¹	6,9x10 ⁻⁵	1,7x10 ⁻¹	8,3x10 ⁻¹	1	9,8x10 ⁻¹	3,1x10 ⁻²	48	15	16,7
O94923	GLCE	1,3x10 ⁻¹	3,1x10 ⁻¹	4,2x10 ⁻¹	7,9x10 ⁻¹	1	1	4,5x10 ⁻²	48	14	19
O95201	ZNF205	2,6x10 ⁻²	2,2x10 ⁻²	5,4x10 ⁻²	1	9,9x10 ⁻¹	1	6,6x10 ⁻⁴	48	18	11,7
O95336	PGLS	1,1x10 ⁻²	1,8x10 ⁻¹	6,9x10 ⁻¹	9,9x10 ⁻¹	3,0x10 ⁻²	6,2x10 ⁻¹	8,2x10 ⁻¹	3	13	73,3
O95573	ACSL3	2,1x10 ⁻³	1,8x10 ⁻⁰⁸	2,2x10 ⁻¹	8,0x10 ⁻¹	9,9x10 ⁻¹	1	1,1x10 ⁻³	48	16	34,2
O95864-3	MSH5; DENND6B	2,5x10 ⁻¹	3,3x10 ⁻¹	2,0x10 ⁻¹	9,5x10 ⁻¹	3,6x10 ⁻¹	9,9x10 ⁻¹	4,4x10 ⁻²	48	11	20,2
P00352	ALDH1A1; GLUD1	2,5x10 ⁻¹	1,2x10 ⁻¹	5,3x10 ⁻²	9,9x10 ⁻¹	1	1	1,2x10 ⁻³	48	27	30,2
P00491	PNP	2,3x10 ⁻¹	1,5x10 ⁻¹	1,6x10 ⁻²	1	9,9x10 ⁻¹	9,7x10 ⁻¹	3,2x10 ⁻⁴	48	8	41,5
P00558	PGK1	2,2x10 ⁻¹	2,7x10 ⁻¹	3,5x10 ⁻²	1	4,6x10 ⁻¹	9,8x10 ⁻¹	1,9x10 ⁻³	48	34	83
P04424-2	ASL	1,3x10 ⁻¹	1,7x10 ⁻⁶	2,0x10 ⁻⁶	7,3x10 ⁻¹	4,8x10 ⁻¹	1	3,2x10 ⁻⁸	48	5	14,4
P05141	SLC25A5	1,3x10 ⁻¹	2,2x10 ⁻²	1,7x10 ⁻¹	1	1	1	5,4x10 ⁻³	48	7	19,5
P05556	ITGB1	4,9x10 ⁻²	3,3x10 ⁻¹	7,9x10 ⁻³	1	1	1	1,2x10 ⁻⁵	48	19	37,2
P07237	P4HB	9,5x10 ⁻¹	2,4x10 ⁻³	1,5x10 ⁻³	4,5x10 ⁻¹	9,9x10 ⁻¹	9,9x10 ⁻¹	3,2x10 ⁻⁴	48	38	70,7
P07858	CTSB	5,6x10 ⁻¹⁰	1,2x10 ⁻¹⁰	2,5x10 ⁻¹⁶	6,3x10 ⁻¹	9,7x10 ⁻¹	1,9x10 ⁻¹	< 1 x 10 ⁻¹²	48	11	41,9
P07949-2	RET	3,5x10 ⁻²²	2,9x10 ⁻²²	5,0x10 ⁻¹⁸	1	6,6x10 ⁻³	0,0x10+00	< 1 x 10 ⁻¹²	3/8 /48	13	19
P08107	HSPA1A	2,8x10 ⁻³	1,2x10 ⁻¹²	4,5x10 ⁻⁵	1	1	9,9x10 ⁻¹	2,3x10 ⁻⁸	48	33	60,1
P09104	ENO2	1,4x10 ⁻¹	1,5x10 ⁻²	4,4x10 ⁻¹	1	9,2x10 ⁻¹	1	2,1x10 ⁻²	48	17	54,6
P09382	LGALS1	5,3x10 ⁻¹	4,4x10 ⁻⁰⁷	2,5x10 ⁻¹	1	1	1	1,5x10 ⁻²	48	10	86,7
P09455	RBP1	3,1x10 ⁻²	1,7x10 ⁻⁶	1,5x10 ⁻³	9,1x10 ⁻¹	1	8,6x10 ⁻¹	1,2x10 ⁻⁵	48	13	80
P09529	INHBB	7,3x10 ⁻³	4,4x10 ⁻⁰⁷	1,7x10 ⁻⁵	9,9x10 ⁻¹	1	1	9,2x10 ⁻⁹	48	16	27
P10643	C7	8,6x10 ⁻¹	1,4x10 ⁻²	1,2x10 ⁻¹	1	4,7x10 ⁻²	1	7,0x10 ⁻¹	3	6	12,1
P10645	CHGA; AP1S3	6,1x10 ⁻⁶	2,1x10 ⁻⁰⁷	1,8x10 ⁻⁶	4,3x10 ⁻¹	1	1	1,4x10 ⁻¹⁰	48	10	37,9
P11142	HSPA8	3,0x10 ⁻²	1,1x10 ⁻⁰⁸	8,1x10 ⁻⁵	9,9x10 ⁻¹	4,6x10 ⁻¹	5,4x10 ⁻¹	2,1x10 ⁻⁶	48	49	83,3
P11413	G6PD	7,9x10 ⁻²	2,7x10 ⁻³	7,6x10 ⁻³	6,6x10 ⁻¹	1	4,3x10 ⁻¹	2,8x10 ⁻⁴	48	28	63,3
P11908	PRPS2	1,5x10 ⁻¹	4,4x10 ⁻¹	5,6x10 ⁻¹	1	3,6x10 ⁻²	1	9,9x10 ⁻¹	3	12	53,8
P12004	PCNA	2,6x10 ⁻¹	4,4x10 ⁻¹	4,3x10 ⁻¹	1	1	1	4,9x10 ⁻²	48	14	82,8
P12270	TPR	1,3x10 ⁻¹	3,6x10 ⁻⁴	3,5x10 ⁻¹	1	1	8,8x10 ⁻¹	1,6x10 ⁻²	48	42	24
P13521	SCG2	4,3x10 ⁻⁴	2,2x10 ⁻⁵	1,8x10 ⁻⁶	1	1	1	5,9x10 ⁻¹¹	48	12	30,8
P13591-1	NCAM1	8,6x10 ⁻¹	2,3x10 ⁻⁴	4,4x10 ⁻²	1	4,5x10 ⁻²	1	1,9x10 ⁻¹	3	20	36
P13667	PDIA4	1,8x10 ⁻¹	1,1x10 ⁻²	1,8x10 ⁻²	4,0x10 ⁻²	7,7x10 ⁻¹	9,8x10 ⁻¹	9,4x10 ⁻²	1	43	58,1
P20618	PSMB1	8,6x10 ⁻³	3,5x10 ⁻²	6,1x10 ⁻¹	8,1x10 ⁻¹	9,2x10 ⁻¹	9,9x10 ⁻¹	1,7x10 ⁻²	48	12	58,5
P22087	FBL	4,0x10 ⁻¹	3,8x10 ⁻⁵	7,8x10 ⁻³	1	7,8x10 ⁻¹	1	2,9x10 ⁻⁴	48	9	15,7
P22102	GART	8,8x10 ⁻¹	4,3x10 ⁻⁴	1,7x10 ⁻²	1	9,6x10 ⁻¹	9,9x10 ⁻¹	1,9x10 ⁻³	48	38	55
P23921	RRM1	4,5x10 ⁻²	1,0x10 ⁻⁶	1,4x10 ⁻³	1	1	1	2,1x10 ⁻⁶	48	26	46,2
P26196	DDX6	1,1x10 ⁻²	6,5x10 ⁻³	3,3x10 ⁻¹	1	3,2x10 ⁻¹	1,3x10 ⁻²	1	8	16	51,6
P26640	VARS	1,9x10 ⁻¹	6,0x10 ⁻¹	3,1x10 ⁻²	1	8,6x10 ⁻¹	6,9x10 ⁻¹	1,5x10 ⁻³	48	38	40,5
P27708	CAD	4,3x10 ⁻¹	1,2x10 ⁻⁴	1,4x10 ⁻¹	1	1	9,9x10 ⁻¹	3,3x10 ⁻³	48	47	31,5
P28838-2	LAP3	1,9x10 ⁻¹	5,5x10 ⁻⁵	2,5x10 ⁻¹	9,5x10 ⁻¹	1	9,9x10 ⁻¹	2,5x10 ⁻²	48	19	52,3
P29373	CRABP2	1,3x10 ⁻⁴	1,4x10 ⁻⁰⁸	1,8x10 ⁻⁶	1	1	7,7x10 ⁻¹	3,2x10 ⁻¹⁰	48	8	57,2
P31689	DNAJA1	2,8x10 ⁻¹	4,6x10 ⁻¹⁰	1,3x10 ⁻¹	1	1	1	9,5x10 ⁻³	48	17	57,4
P31939	ATIC	1,8x10 ⁻¹	6,6x10 ⁻¹	2,0x10 ⁻¹	1	1	1	5,0x10 ⁻³	48	37	81,1

P36871	PGM1	1,5x10 ⁻³	2,1x10 ⁻³	1,1x10 ⁻⁴	1	1	8,4x10 ⁻¹	1,9x10 ⁻⁸	48	25	57,5
P37802	TAGLN2	2,2x10 ⁻¹	6,1x10 ⁻¹	2,5x10 ⁻¹	1	1	1	1,3x10 ⁻²	48	16	84,9
P41250	GARS	6,3x10 ⁻¹	4,7x10 ⁻¹	2,5x10 ⁻¹	1	1	1	2,7x10 ⁻²	48	64	41,7
P42081-6	DCI;NAE1	2,6x10 ⁻¹	1,0x10 ⁻³	1,8x10 ⁻¹	1	1	1	7,0x10 ⁻³	48	6	19,5
P42702	LIFR	9,0x10 ⁻²	1,4x10 ⁻¹	3,6x10 ⁻¹	1	1	5,8x10 ⁻¹	4,9x10 ⁻²	48	100	39,1
P46063	RECQL	2,6x10 ⁻¹	4,2x10 ⁻²	2,6x10 ⁻¹	1	9,8x10 ⁻¹	1	4,3x10 ⁻²	48	12	26,7
P47755	CAPZA2	4,5x10 ⁻²	4,6x10 ⁻²	2,6x10 ⁻¹	1	1	8,1x10 ⁻¹	1,4x10 ⁻²	48	14	70,3
P48681	NES	8,9x10 ⁻¹	8,0x10 ⁻⁴	4,4x10 ⁻²	9,8x10 ⁻¹	6,7x10 ⁻¹	6,8x10 ⁻¹	3,9x10 ⁻²	48	52	41,8
P49327	FASN	5,9x10 ⁻¹	7,5x10 ⁻⁰⁸	2,0x10 ⁻¹	1	1	9,9x10 ⁻¹	5,9x10 ⁻³	48	112	52,7
P49747	COMP	1,4x10 ⁻¹	3,4x10 ⁻²	5,6x10 ⁻⁴	1	1	9,9x10 ⁻¹	1,5x10 ⁻⁶	48	20	28,1
P50406	HTR6	2,2x10 ⁻¹	7,5x10 ⁻¹	2,9x10 ⁻¹	1	1	1	1,1x10 ⁻²	48	15	9,5
P52789	HK2	1,4x10 ⁻¹	1,3x10 ⁻²	4,3x10 ⁻¹	9,8x10 ⁻¹	1	1	4,7x10 ⁻²	48	13	22,5
P52907	CAPZA1	6,5x10 ⁻¹	1,5x10 ⁻²	2,0x10 ⁻¹	1	1	1	2,4x10 ⁻²	48	11	58
P53367-2	ARFIP1	2,4x10 ⁻¹	1,8x10 ⁻²	3,6x10 ⁻¹	3,8x10 ⁻²	1	1	1	1	5	22
P53396-2	ACLY	2,5x10 ⁻¹	3,5x10 ⁻⁴	2,5x10 ⁻¹	1	9,2x10 ⁻¹	9,6x10 ⁻¹	4,7x10 ⁻²	48	48	53,5
P55884	EIF3B	3,7x10 ⁻¹	7,1x10 ⁻⁵	2,9x10 ⁻¹	1	1	1	2,8x10 ⁻²	48	32	51,2
P56182	RRP1; ZDHHHC19	6,6x10 ⁻¹	1,1x10 ⁻¹	1,8x10 ⁻¹	9,9x10 ⁻¹	1	8,6x10 ⁻¹	4,2x10 ⁻²	48	28	32,1
P56199	ITGA1	2,7x10 ⁻¹	3,1x10 ⁻⁵	8,0x10 ⁻⁴	9,8x10 ⁻¹	8,8x10 ⁻¹	1	1,9x10 ⁻⁵	48	11	11,5
P56730	PRSS12	1,1x10 ⁻⁶	2,3x10 ⁻¹¹	3,4x10 ⁻¹²	1	1,1x10 ⁻¹	9,0x10 ⁻¹	< 1 x 10 ⁻¹²	48	13	21,9
P57081-2	WDR4	6,1x10 ⁻¹	3,4x10 ⁻⁵	9,9x10 ⁻²	1	1	1	6,3x10 ⁻³	48	4	18
P62333	PSMC6	1,5x10 ⁻¹	6,8x10 ⁻²	2,0x10 ⁻¹	9,7x10 ⁻¹	9,0x10 ⁻¹	9,7x10 ⁻¹	1,7x10 ⁻²	48	20	59,1
P62993	GRB2	4,9x10 ⁻³	2,9x10 ⁻¹²	1,6x10 ⁻⁶	8,2x10 ⁻¹	9,7x10 ⁻¹	9,7x10 ⁻¹	1,4x10 ⁻⁹	48	6	38,7
Q01650	SLC7A5	9,2x10 ⁻¹	2,3x10 ⁻³	6,0x10 ⁻²	7,4x10 ⁻³	9,4x10 ⁻¹	1	1	1	2	6,7
Q03701	CEBPZ	2,0x10 ⁻¹	1,3x10 ⁻⁴	3,6x10 ⁻²	1	1	1	2,3x10 ⁻⁴	48	12	17,2
Q04656-5	ATP7A	2,3x10 ⁻⁴	1,8x10 ⁻⁸	3,0x10 ⁻⁸	9,8x10 ⁻¹	1	1	5,0x10 ⁻¹²	48	8	8,4
Q08752	PPID	9,6x10 ⁻¹	6,0x10 ⁻⁴	1,9x10 ⁻²	1	5,1x10 ⁻¹	8,8x10 ⁻¹	9,5x10 ⁻³	48	11	37,3
Q12765	SCRN1	6,4x10 ⁻¹	1,6x10 ⁻¹	1,9x10 ⁻²	9,6x10 ⁻¹	4,7x10 ⁻¹	4,0x10 ⁻¹	3,1x10 ⁻²	48	21	68,4
Q12788	TBL3	2,2x10 ⁻¹	3,3x10 ⁻³	4,2x10 ⁻⁴	9,1x10 ⁻¹	9,9x10 ⁻¹	1	5,0x10 ⁻⁶	48	21	42,2
Q12860-2	CNTN1	3,1x10 ⁻²	2,9x10 ⁻³	7,0x10 ⁻³	9,9x10 ⁻¹	1	1	1,0x10 ⁻⁵	48	12	18,1
Q13009	TIAM1; HNRNPUL1	2,1x10 ⁻²	2,4x10 ⁻¹	2,6x10 ⁻¹	1	1	3,1x10 ⁻¹	5,7x10 ⁻³	48	10	8
Q13895	BYSL	1,3x10 ⁻¹	7,1x10 ⁻²	3,6x10 ⁻²	9,5x10 ⁻¹	1	6,0x10 ⁻¹	1,4x10 ⁻³	48	7	20,6
Q14195-2	-	5,7x10 ⁻⁴	1,5x10 ⁻⁶	1,8x10 ⁻⁶	7,9x10 ⁻¹	8,6x10 ⁻¹	9,9x10 ⁻¹	6,1x10 ⁻¹⁰	48	35	51,4
Q14894	CRYM	1,9x10 ⁻³	4,0x10 ⁻³	1,2x10 ⁻²	1	6,0x10 ⁻¹	1	4,2x10 ⁻⁶	48	3	1,3
Q15019	SEPT2	4,1x10 ⁻²	1,7x10 ⁻²	4,2x10 ⁻¹	9,9x10 ⁻¹	6,4x10 ⁻¹	1	6,8x10 ⁻³	48	14	63,4
Q15113	PCOLCE	3,1x10 ⁻²	3,4x10 ⁻⁴	2,0x10 ⁻¹	1	2,0x10 ⁻¹	9,8x10 ⁻¹	2,8x10 ⁻³	48	10	31
Q15149-7	PLEC	3,4x10 ⁻²	7,1x10 ⁻⁸	2,4x10 ⁻¹	1	1	9,2x10 ⁻¹	4,6x10 ⁻³	48	88	27,2
Q15274	QPRT	2,1x10 ⁻¹	6,1x10 ⁻⁴	2,7x10 ⁻²	1	1	1	4,3x10 ⁻⁴	48	8	45,8
Q15393	SF3B3	1,1x10 ⁻¹	6,7x10 ⁻³	2,5x10 ⁻¹	9,1x10 ⁻¹	1	1	1,8x10 ⁻²	48	41	51,5
Q15942	ZYX	1,8x10 ⁻¹	1,2x10 ⁻¹²	1,5x10 ⁻¹	1	8,0x10 ⁻¹	1,5x10 ⁻¹	1,2x10 ⁻³	48	14	43
Q16658	FSCN1	8,2x10 ⁻¹	1,6x10 ⁻¹	3,1x10 ⁻³	1	1	8,5x10 ⁻¹	2,0x10 ⁻⁴	48	40	85,2
Q9Y2H5	PLEKHA6	4,3x10 ⁻¹	1,2x10 ⁻²	3,6x10 ⁻²	1	1	9,4x10 ⁻¹	1,4x10 ⁻³	48	4	6,2
Q6P2Q9	PRPF8	1,0x10 ⁻²	6,2x10 ⁻⁴	4,3x10 ⁻¹	9,6x10 ⁻¹	1	3,4x10 ⁻¹	4,3x10 ⁻³	48	58	34,1
Q70J99	UNC13D	2,0x10 ⁻²	1,8x10 ⁻¹	2,4x10 ⁻¹	1	9,7x10 ⁻¹	8,1x10 ⁻¹	1,4x10 ⁻³	48	20	28,1
Q7Z3E5	ARMC9	5,2x10 ⁻¹	1,1x10 ⁻²	2,0x10 ⁻¹	1	1	1	4,4x10 ⁻²	48	7	14,7
Q7Z5L9-2	IRF2BP2	3,7x10 ⁻¹	4,3x10 ⁻³	4,6x10 ⁻²	1	9,9x10 ⁻¹	1	2,2x10 ⁻³	48	6	20,3
Q8NBS9-2	TXNDC5	1,7x10 ⁻¹	7,4x10 ⁻³	4,1x10 ⁻¹	1	1	1	3,3x10 ⁻²	48	13	46
Q8IV08	PLD3	1,3x10 ⁻¹	5,8x10 ⁻²	1,5x10 ⁻²	9,9x10 ⁻¹	1	8,8x10 ⁻¹	9,9x10 ⁻⁵	48	12	36,3
Q8IV48	ERI1	7,7x10 ⁻⁵	7,8x10 ⁻⁷	2,2x10 ⁻⁵	1	1	9,9x10 ⁻¹	2,5x10 ⁻⁹	48	4	14,6
Q8IX12-2	CCAR1	2,1x10 ⁻¹	3,9x10 ⁻¹	3,2x10 ⁻¹	1,9x10 ⁻²	1	1	9,9x10 ⁻¹	1	5	6,4
Q8IZJ1-2	UNC5B	2,5x10 ⁻²	7,2x10 ⁻⁴	5,1x10 ⁻¹	1	1	4,2x10 ⁻¹	4,2x10 ⁻²	48	4	7,5
Q8NFW8	CMAS	7,7x10 ⁻¹	2,0x10 ⁻²	1,1x10 ⁻¹	2,7x10 ⁻²	8,2x10 ⁻¹	1	1	1	4	13,4

Q8NI08-7	NCOA7	2,7x10 ⁻¹	3,2x10 ⁻¹	3,6x10 ⁻¹	1	1	1	3,7x10 ⁻²	48	4	10,5
Q8NI36	WDR36	7,8x10 ⁻²	3,0x10 ⁻¹	5,1x10 ⁻¹	1	1	9,4x10 ⁻¹	4,3x10 ⁻²	48	10	13,6
Q8TEM1	NUP210	9,6x10 ⁻¹	2,0x10 ⁻²	3,9x10 ⁻²	8,9x10 ⁻¹	6,7x10 ⁻¹	1	2,2x10 ⁻²	48	20	15,5
Q8WUA4	GTF3C2	4,2x10 ⁻¹	4,0x10 ⁻¹	1,5x10 ⁻¹	9,7x10 ⁻¹	1	7,4x10 ⁻¹	4,3x10 ⁻²	48	5	9,3
Q92598-2	HSPH1;KIA A0319L	5,1x10 ⁻¹	8,1x10 ⁻⁶	5,8x10 ⁻⁴	9,1x10 ⁻¹	8,4x10 ⁻¹	1	1,9x10 ⁻⁵	48	39	58,8
Q92616	GCN1L1	3,8x10 ⁻¹	4,4x10 ⁻³	3,2x10 ⁻¹	1	1	9,9x10 ⁻¹	4,0x10 ⁻²	48	61	32
Q92786	PROX1	2,5x10 ⁻²	9,8x10 ⁻³	2,4x10 ⁻¹	8,6x10 ⁻²	1	1	6,0x10 ⁻³	48	6	11,4
Q96CN7	ISOC1	1,4x10 ⁻¹	1,7x10 ⁻⁵	1,4x10 ⁻³	1	1	1	2,4x10 ⁻⁵	48	19	85,6
Q96EE3	SEH1L	2,9x10 ⁻¹	6,1x10 ⁻²	2,4x10 ⁻¹	1	1	1	1,1x10 ⁻²	48	9	35,6
Q96IJ6	GMPPA	4,6x10 ⁻¹	1,0x10 ⁻¹	2,2x10 ⁻¹	1	1	1	1,6x10 ⁻²	48	5	16,7
Q96SB3	PPP1R9B	4,3x10 ⁻¹	2,7x10 ⁻³	1,1x10 ⁻¹	2,3x10 ⁻²	7,4x10 ⁻¹	1	9,9x10 ⁻¹	1	5	10,4
Q96ST3	SIN3A	4,9x10 ⁻¹	1,7x10 ⁻¹	3,1x10 ⁻¹	1	1	4,6x10 ⁻²	1	8	7	9,2
Q99536	VAT1	1,5x10 ⁻¹	3,6x10 ⁻⁴	2,6x10 ⁻¹	1	1	1	1,1x10 ⁻²	48	14	52,9
Q9BQ04	RBM4B	7,8x10 ⁻¹	1,8x10 ⁻¹	1,0x10 ⁻¹	1	1,5x10 ⁻²	1	1	3	2	8,9
Q9BRF8	CPPED1	4,0x10 ⁻¹	5,3x10 ⁻¹	1,4x10 ⁻¹	1	1	1	1,0x10 ⁻²	48	5	24,5
Q9BTW9	TBCD	6,7x10 ⁻¹	4,9x10 ⁻⁵	4,1x10 ⁻¹	1	1	1	3,6x10 ⁻²	48	27	33,6
Q9BWU0	SLC4A1AP	1,8x10 ⁻¹	4,4x10 ⁻³	3,5x10 ⁻¹	2,0x10 ⁻²	9,9x10 ⁻¹	1	1	1	4	10,2
Q9BXI3	NT5C1A	2,8x10 ⁻¹	7,8x10 ⁻⁴	2,7x10 ⁻³	1	9,7x10 ⁻¹	1	6,0x10 ⁻⁵	48	7	26,1
Q9BXY0	MAK16	4,0x10 ⁻¹	1,1x10 ⁻¹	3,5x10 ⁻¹	1	1	1	4,1x10 ⁻²	48	4	17,7
Q9BYB4-2	-	5,5x10 ⁻¹	3,9x10 ⁻³	3,2x10 ⁻¹	1	1	4,5x10 ⁻²	1	8	8	2,9
Q9BZF1-3	OSBPL8	2,5x10 ⁻²	5,0x10 ⁻⁵	5,3x10 ⁻¹	1	9,5x10 ⁻¹	7,5x10 ⁻¹	1,1x10 ⁻²	48	12	22,1
Q9GZL7	WDR12	1,3x10 ⁻¹	1,5x10 ⁻³	1,1x10 ⁻¹	1	1	9,8x10 ⁻¹	8,1x10 ⁻⁴	48	11	38,5
Q9H0S4-2	DDX47	6,8x10 ⁻³	4,3x10 ⁻⁴	5,1x10 ⁻¹	5,6x10 ⁻¹	1	8,8x10 ⁻¹	1,0x10 ⁻²	48	6	21,4
Q9H2J4	PDCL3	5,5x10 ⁻²	6,5x10 ⁻⁷	2,9x10 ⁻¹	1,1x10 ⁻²	9,1x10 ⁻¹	1	9,2x10 ⁻¹	1	8	49,4
Q9H4A4	RNPEP	1,5x10 ⁻³	6,2x10 ⁻⁵	1,3x10 ⁻⁴	1	9,9x10 ⁻¹	9,8x10 ⁻¹	2,9x10 ⁻⁸	48	26	59,7
Q9H5Q3	-	1,2x10 ⁻¹	2,1x10 ⁻²	2,6x10 ⁻¹	1	6,5x10 ⁻³	1	1	3	4	4,1
Q9H6R4-4	NOL6	1,3x10 ⁻¹	1,4x10 ⁻¹	3,6x10 ⁻²	1	1	1	5,8x10 ⁻⁴	48	6	8,1
Q9H8H0	NOL11	4,0x10 ⁻³	1,3x10 ⁻³	9,2x10 ⁻²	1	1	4,9x10 ⁻¹	3,7x10 ⁻⁴	48	7	14,7
Q9HB71	CACYBP	9,4x10 ⁻¹	8,3x10 ⁻³	4,5x10 ⁻²	1	4,6x10 ⁻¹	1	1,7x10 ⁻²	48	17	76,8
Q9NPH2	ISYNA1	4,5x10 ⁻²	4,7x10 ⁻⁵	8,0x10 ⁻⁴	1	1	1	8,8x10 ⁻⁷	48	13	38,7
Q9NQ74	EXOSC5	1,7x10 ⁻¹	8,9x10 ⁻²	3,2x10 ⁻¹	1	9,1x10 ⁻¹	1	1,1x10 ⁻²	48	6	35,3
Q9NQW7-3	XPNPEP1	1,4x10 ⁻²	2,0x10 ⁻⁴	5,9x10 ⁻¹	7,5x10 ⁻¹	9,9x10 ⁻¹	9,2x10 ⁻¹	1,4x10 ⁻²	48	16	42,5
Q9NR30	DDX21	8,8x10 ⁻²	1,4x10 ⁻⁵	1,5x10 ⁻¹	1	1	3,6x10 ⁻¹	7,9x10 ⁻³	48	16	28,9
Q9NR63	CYP26B1	2,6x10 ⁻³	6,3x10 ⁻⁷	1,0x10 ⁻⁷	1	1	1	2,9x10 ⁻¹¹	48	9	26,2
Q9NVP1	DDX18	5,9x10 ⁻¹	1,3x10 ⁻²	1,1x10 ⁻¹	1	7,5x10 ⁻¹	1	2,1x10 ⁻²	48	10	21,6
Q9NZZ3	CHMP5	1,1x10 ⁻¹	1,2x10 ⁻⁹	3,6x10 ⁻¹	1	8,3x10 ⁻¹	1,3x10 ⁻²	1	8	5	28,3
Q9P2I0	CPSF2	6,2x10 ⁻¹	5,5x10 ⁻⁴	1,6x10 ⁻¹	1	2,0x10 ⁻¹	1	2,7x10 ⁻²	48	10	20,1
Q9UEY8-2	ADD3	4,8x10 ⁻¹	2,1x10 ⁻⁴	3,2x10 ⁻²	1	7,4x10 ⁻¹	1	3,1x10 ⁻³	48	12	26,6
Q9UHD1	CHORDC1	4,8x10 ⁻¹	7,1x10 ⁻⁷	1,0x10 ⁻¹	1	1	8,6x10 ⁻¹	1,5x10 ⁻²	48	13	53,3
Q9UI36-4	DACH1	9,3x10 ⁻²	8,7x10 ⁻⁴	1,6x10 ⁻¹	9,4x10 ⁻¹	1	9,5x10 ⁻¹	1,5x10 ⁻²	48	4	12,5
Q9UQ35	SRRM2	4,8x10 ⁻¹	1,1x10 ⁻⁴	8,1x10 ⁻²	1	8,9x10 ⁻¹	6,5x10 ⁻¹	3,8x10 ⁻²	48	20	11
Q9Y262	EIF3L	4,3x10 ⁻¹	1,2x10 ⁻⁵	1,8x10 ⁻¹	1	9,8x10 ⁻¹	1	2,2x10 ⁻²	48	24	53,9
Q9Y285	FARSA	1,0x10 ⁻¹	6,3x10 ⁻²	4,7x10 ⁻¹	1	1	1	3,5x10 ⁻²	48	8	17,5
U3KQJ1	POLDIP2	4,3x10 ⁻¹	3,7x10 ⁻¹	4,4x10 ⁻²	1	7,3x10 ⁻¹	9,8x10 ⁻¹	6,1x10 ⁻³	48	8	33,8
Q9Y371	SH3GLB1	6,8x10 ⁻¹	5,0x10 ⁻¹	1,8x10 ⁻¹	1	9,8x10 ⁻¹	1	3,5x10 ⁻²	48	5	16,2
Q9Y5M8	SRPRB	8,2x10 ⁻¹	2,2x10 ⁻²	1,1x10 ⁻¹	1	4,3x10 ⁻²	1	5,8x10 ⁻¹	3	12	52
Q9Y617	PSAT1	2,4x10 ⁻¹	2,7x10 ⁻³	3,0x10 ⁻¹	9,6x10 ⁻¹	1	1	1,5x10 ⁻²	48	17	65,7
Q9Y6C2	EMILIN1	2,2x10 ⁻¹	2,0x10 ⁻¹	1,1x10 ⁻³	8,3x10 ⁻¹	1	1	1,6x10 ⁻⁵	48	7	12,1

Tabelle 6.3 RA-Zeitreihe: Anreicherungsanalyse der Cluster4 und 7.

Signifikant ab- (Anreicherungsfaktor <1) und angereicherte (>1) biologische Prozesse. Durchgeführt wurde ein exakter Test nach Fisher, vor dem Hintergrund aller 2 303 Proteine des Datensatzes, Benjamini-Hochberg korrigierter p-Wert $\leq 0,05$.

GOBP-Kategorie	Anreicherungsfaktor	p-Wert	Assoziierte Proteine gesamt	Assoziierte Proteine im Cluster
Cluster4, Kategoriegröße: 278				
cytoplasmic translation	6,63	$1,52 \times 10^{-2}$	5	4
ribosome biogenesis	5,52	$6,97 \times 10^{-4}$	12	8
rRNA processing	2,93	$1,39 \times 10^{-4}$	65	23
translational elongation	2,46	$8,28 \times 10^{-4}$	74	22
translational initiation	2,13	$1,30 \times 10^{-3}$	105	27
translation	2,04	$7,48 \times 10^{-4}$	130	32
RNA catabolic process	1,86	$8,18 \times 10^{-3}$	120	27
DNA repair	1,86	$1,96 \times 10^{-2}$	98	22
cellular component disassembly	1,71	$8,88 \times 10^{-3}$	160	33
RNA processing	1,69	$6,33 \times 10^{-4}$	285	58
mRNA metabolic process	1,65	$6,08 \times 10^{-4}$	291	58
RNA metabolic process	1,44	$2,31 \times 10^{-4}$	609	106
nucleobase-containing compound metabolic process	1,32	$7,31 \times 10^{-4}$	825	131
cellular nitrogen compound metabolic process	1,22	$6,00 \times 10^{-3}$	928	137
nitrogen compound metabolic process	1,21	$8,97 \times 10^{-3}$	947	138
response to chemical stimulus	0,67	$3,46 \times 10^{-3}$	560	45
organelle organization	0,65	$2,64 \times 10^{-3}$	547	43
membrane organization	0,51	$1,50 \times 10^{-2}$	226	14
vesicle-mediated transport	0,41	$1,29 \times 10^{-3}$	242	12
Cluster7, Kategoriegröße: 262				
extracellular matrix organization	3,63	$3,53 \times 10^{-5}$	46	19
extracellular structure organization	3,63	$1,77 \times 10^{-5}$	46	19
hormone metabolic process	3,38	$3,60 \times 10^{-3}$	26	10
neurological system process	2,33	$3,75 \times 10^{-3}$	68	18
biological adhesion	2,04	$9,17 \times 10^{-3}$	86	20
cell adhesion	2,04	$8,75 \times 10^{-3}$	86	20
cellular lipid metabolic process	2,01	$2,42 \times 10^{-3}$	118	27
lipid metabolic process	1,90	$2,32 \times 10^{-3}$	148	32
cellular ketone metabolic process	1,83	$2,47 \times 10^{-3}$	163	34
organic acid metabolic process	1,81	$2,72 \times 10^{-3}$	165	34
response to external stimulus	1,56	$1,60 \times 10^{-2}$	209	37
macromolecule metabolic process	0,82	$3,41 \times 10^{-3}$	1215	113
nitrogen compound metabolic process	0,77	$3,69 \times 10^{-3}$	947	83
cellular nitrogen compound metabolic process	0,77	$3,59 \times 10^{-3}$	928	81
nucleobase-containing compound metabolic process	0,66	$1,82 \times 10^{-4}$	825	62
RNA metabolic process	0,59	$2,33 \times 10^{-4}$	609	41
viral reproduction	0,55	$1,09 \times 10^{-2}$	274	17
RNA processing	0,46	$2,60 \times 10^{-3}$	285	15
mRNA metabolic process	0,45	$1,84 \times 10^{-3}$	291	15
chromosome organization	0,43	$1,65 \times 10^{-2}$	165	8

cellular macromolecular complex assembly	0,29	1,96 x10 ⁻³	179	6
ribonucleoprotein complex assembly	0,20	1,77 x10 ⁻²	86	2
translation	0,20	2,39 x10 ⁻³	130	3
RNA catabolic process	0,15	2,09 x10 ⁻³	120	2

Tabelle 6.4 Cys_{ox}-TPS: Liste der 275 differentiellen Proteine innerhalb des Redox-Proteoms.

Zusammenfassung der redox-sensitiven Proteomanalyse nach Retinsäurebehandlung. Die statistische Auswertung basiert auf der SAM-Methode. Die angegebene Cysteinposition bezieht sich auf die Primärsequenz, resultiert aus der Quantifizierung der carbamidomethylierten Peptide und beinhaltet nur solche mit einer differentiellen Abundanz. Die SILAC-Quantifizierung wurde zur unabhängigen Überprüfung der Redox-Proteomstudie Cys_{ox}-TPS verwendet und beinhaltet die in Tabelle 4.4 gezeigten Daten.

Protein ID	Genname	-log p-Wert	Differenz	Peptide	Sequenz-abdeckung (%)	Score	MS/MS-Count	Cysteinposition	SILAC-Quantifizierung : Ratio (RA/EtOH)
Retinsäure									
O00154	ACOT7	1,61	0,99	16	47,4	323,3	204		
O00299	CLIC1	2,22	0,95	13	62,2	323,3	118	Cys24, Cys191	
O00743	PPP6C	1,81	1,65	8	34,4	50,1	60		
O00746	NME4	1,52	0,96	4	23	37,5	33		
O14818	PSMA7	1,69	0,88	13	56	262,9	156		
O15144	ARPC2	3,17	1,11	16	58,3	323,3	202		
O15498	YKT6	2,58	1,21	9	60,6	323,3	150		
O43681	ASNA1	1,55	1,93	11	44,8	151,6	61		
O43813	LANCL1	2,38	1,06	9	28,6	56,5	66		
O43837	IDH3B	2,11	1,31	8	24,2	30,8	55		
O75306	NDUFS2	2,67	0,59	12	29,6	54,1	95	Cys347	
O75352	MPDU1	2,24	0,60	3	13,8	14,5	44		
O75390	CS	1,86	0,88	15	42,7	323,3	148	Cys101	
O75436	VPS26A	1,85	1,59	10	46,5	109,7	61		
O75489	NDUFS3	1,56	1,05	9	42,8	82,6	73		
O75569	PRKRA	1,61	1,09	6	25,9	70,7	41	Cys54	
O94905	ERLIN2	1,64	1,76	8	28,9	22,6	39		
O95433	AHSA1	1,63	2,59	11	41,4	247,7	54		
O95456	PSMG1	2,30	0,82	2	10,4	7,1	20		
O95716	RAB3D	2,64	1,22	5	29,7	39,3	56		
P00338	LDHA	2,52	0,98	29	77,1	323,3	383		1,04
P00387	CYB5R3	1,91	0,90	7	25,6	104,4	93		
P00491	PNP	1,69	1,63	8	39,8	135,0	70		
P05141	SLC25A5	2,09	1,25	5	24,2	27,0	47		2,28
P05198	EIF2S1	2,30	1,33	22	75,9	261,8	147	Cys70	
P05388	RPLP0	2,64	0,95	16	59,3	323,3	238	Cys119, Cys27	1,01
P06132	UROD	1,77	0,64	8	36,8	177,7	42		
P06493	CDK1	2,22	1,11	18	76,4	160,1	168		
P07195	LDHB	2,64	1,11	22	66,2	323,3	334	Cys294	
P07339	CTSD	2,71	0,65	10	29,4	200,0	91		
P07737	PFN1	2,12	0,97	11	84,3	323,3	116		1,32
P07910	HNRNPC	2,11	1,04	11	37,6	195,0	193		
P08754	GNAI3	2,27	1,09	17	57,9	323,3	165	Cys66	2,40
P08758	ANXA5	2,81	1,11	19	68,1	323,3	214		

P09001	MRPL3	2,12	0,88	3	8	6,1	23		
P09455	RBP1	1,51	1,00	13	80	323,3	184		
P09651	HNRNPA1	2,07	0,87	17	45,4	323,3	316		1,07
P11766	ADH5	2,97	1,13	11	37,4	96,6	83		
P12004	PCNA	1,91	1,03	11	61,3	323,3	112	Cys162	
P12235	SLC25A4	2,39	0,79	6	19,1	41,8	75		
P12236	SLC25A6	2,40	1,02	17	63,1	323,3	250		5,58
P14324	FDP5	1,61	0,80	10	37,7	141,2	72		
P15121	AKR1B1	2,33	1,15	16	67,1	323,3	145	Cys81	
P15880	RPS2	2,51	0,83	12	43,7	166,0	209	Cys229	
P17174	GOT1	1,89	0,98	16	51,8	233,7	181		
P18077	RPL35A	2,02	1,10	5	22,7	12,2	74		
P18085	ARF4	2,87	1,72	7	43,9	41,6	58	Cys62	
P18669	PGAM1	1,98	0,82	16	74	323,3	218	Cys153	
P20042	EIF2S2	1,67	1,64	8	26,4	58,3	59		
P20338	RAB4A	1,59	1,54	5	30,7	17,4	47		
P20339	RAB5A	1,73	1,49	3	25,6	103,0	65		
P20340	RAB6A	1,88	1,18	4	23,1	181,4	36		
P21796	VDAC1	1,56	0,87	18	79,5	323,3	258	Cys232	R _{lys} RA: 0,59
P22087	FBL	2,42	1,55	14	53,6	268,4	140		
P22626	HNRNPA2B 1	2,72	1,09	22	62,3	323,3	508	Cys50	1,12
P22695	UQCRC2	1,50	0,96	13	44,8	323,3	144	Cys125, Cys192	
P23396	RPS3	2,39	1,18	22	76,5	323,3	301	Cys97	
P23526	AHCY	1,60	0,84	20	36,8	323,3	270	Cys195	1,43
P24539	ATP5F1	1,99	0,73	9	43	142,0	79		
P25788	PSMA3	2,41	1,48	10	49,4	187,0	80		
P26378	ELAVL4	1,49	0,94	13	34,5	208,5	159		
P27348	YWHAQ	3,01	1,27	17	66,1	323,3	185	Cys94, Cys134	1,35
P27695	APEX1	1,79	0,87	17	67,3	323,3	156	Cys93, Cys65, Cys296	
P28072	PSMB6	2,19	1,10	3	22,6	35,9	23		
P28074	PSMB5	2,11	1,14	11	46	323,3	123		
P29218	IMPA1	2,16	1,34	10	37,2	95,8	63		
P29992	GNA11	2,84	1,08	12	38,2	116,3	118		
P30041	PRDX6	1,64	0,84	17	77,2	311,4	190	Cys91	1,10
P30044	PRDX5	2,16	1,26	10	44,9	181,5	53	Cys100	
P31350	RRM2	2,29	0,90	16	52,4	278,2	167		
P31946	YWHAH	3,99	1,30	12	58,5	323,3	161		
P35250	RFC2	1,56	1,15	10	43,8	186,2	81		
P35268	RPL22	1,62	1,00	7	67,2	300,1	61	Cys25	
P36542	ATP5C1	1,78	0,91	10	41,9	194,4	115		
P37108	SRP14	2,00	0,73	5	34,6	267,4	79		
P37837	TALDO1	1,48	1,20	12	39,2	55,0	64		
P38919	EIF4A3	1,65	1,05	19	44	281,7	223		
P39687	ANP32A	1,37	1,76	9	43,8	290,4	46	Cys123	
P40429	RPL13A	2,11	0,97	10	36,5	323,3	90		1,53
P40616	ARL1	2,55	0,88	6	49,7	31,2	50		
P40925	MDH1	1,90	0,74	16	53	323,3	101		
P45880	VDAC2	2,22	0,93	13	52,4	323,3	178	Cys47	
P46926	GNPDA1	2,41	2,06	7	33,9	97,5	47		
P47755	CAPZA2	1,85	1,18	5	28,7	146,8	52	Cys111	
P47756	CAPZB	1,37	1,49	15	56	247,8	100	Cys62	
P47985;P	UQCRCF1;U	1,87	1,19	5	29,9	25,0	23		

0C7P4	QCRFS1P1								
P48729	CSNK1A1	1,37	1,39	8	27,3	19,1	32		
P48739	PITPNB	1,32	1,58	12	53,1	117,8	61		
P49755	TMED10	1,97	1,55	6	34,2	71,9	65		
P50402	EMD	1,82	0,80	9	55,1	210,0	105		
P51148	RAB5C	2,58	1,22	8	59,7	323,3	164		
P51149	RAB7A	2,05	0,97	14	75,4	288,4	135		
P51153	RAB13	2,69	1,50	3	21,7	13,9	25		
P51398	DAP3	1,51	1,42	10	30,7	51,8	79		
P51571	SSR4	1,62	1,22	4	30,6	191,7	69		
P51572	BCAP31	1,60	2,53	6	26,4	41,2	31		
P51965	UBE2E1	2,16	1,26	2	9,8	5,2	24		
P52565	ARHGDI A	2,98	1,32	10	61,8	323,3	159		
P53004	BLVRA	2,15	1,05	16	54,1	323,3	119		Cys281
P54920	NAPA	2,34	1,39	12	52,5	130,6	42		Cys84
P56537	EIF6	1,37	2,02	7	46,1	323,3	47		
P57088	TMEM33	2,37	1,25	7	26,7	140,2	56		Cys232
P57772	EEFSEC	1,95	1,68	7	12,9	14,9	31		
P59998	ARPC4	2,13	1,20	7	53	323,3	101		
P60228	EIF3E	1,65	1,03	22	54,2	222,9	156		Cys345
P60709	ACTB	2,24	1,18	30	88,5	323,3	1004		
P60842	EIF4A1	1,70	0,90	32	78,8	323,3	652		2,37
P60900	PSMA6	1,96	1,05	10	51,6	126,3	94		
P60953	CDC42	1,72	0,71	8	67,5	323,3	82		
P61006	RAB8A	2,86	0,76	5	29,5	45,7	45		
P61019	RAB2A	2,38	1,14	12	64,6	144,2	114		
P61020	RAB5B	2,13	0,88	2	15,3	16,9	26		
P61026	RAB10	1,98	2,39	5	31,5	104,0	52		
P61086	UBE2K	1,58	0,94	9	55,5	105,5	73		1,05
P61106	RAB14	1,42	1,27	8	47,9	33,8	36		
P61224	RAP1B	2,25	0,96	9	53,8	98,5	111		
P61923	COPZ1	1,93	1,35	5	27,1	72,3	56		
P61981	YWHAG	3,85	1,43	9	51,8	323,3	106		
P62136	PPP1CA	2,88	0,80	20	60,9	323,3	236		
P62140	PPP1CB	1,76	0,70	8	31,2	197,1	82		Cys61
P62249	RPS16	2,34	1,25	10	54,1	120,2	179		
P62258	YWHAE	3,14	1,46	26	85,5	323,3	377		1,43
P62263	RPS14	1,59	0,97	9	41,7	219,6	138		
P62280	RPS11	1,53	0,95	11	51,3	229,3	54		
P62826	RAN	2,06	1,17	11	56	235,3	117		
P62879	GNB2	1,44	1,57	10	40,3	323,3	54		Cys25, Cys204
P63000	RAC1	1,91	1,00	11	68,8	195,6	97		
P63092	GNAS	1,62	0,75	19	59,4	323,3	281		
P63104	YWHAZ	3,09	1,18	17	76,7	323,3	250		Cys94 13,54
P63173	RPL38	1,42	1,12	5	50	74,6	55		
P63241	EIF5A	1,53	0,96	10	77,3	323,3	84		
P63244	GNB2L1	2,28	1,30	20	87,4	323,3	231		Cys138,Cys153,Cys182, Cys240 1,09
P67775	PPP2CA	3,71	1,01	11	49,2	323,3	76		
P67870	CSNK2B	1,33	1,85	6	34,4	257,7	23		Cys109
P84077;P 61204	ARF1;ARF3	2,71	0,90	14	82,3	323,3	204		
P84095	RHOG	1,46	1,88	4	31,9	51,1	23		

Q00325	SLC25A3	2,02	0,58	9	30,4	171,8	113	
Q00534	CDK6	1,47	1,20	13	45,1	157,1	83	Cys83
Q00535	CDK5	3,58	1,05	12	40,1	77,1	77	
Q00796	SORD	2,73	0,89	11	39,5	175,9	110	
Q02543	RPL18A	1,54	1,02	7	39,2	258,5	90	Cys22, Cys64
Q02978	SLC25A11	1,78	1,08	12	44,6	323,3	101	
Q04917	YWHAH	1,83	2,42	11	52,8	323,3	63	
Q06830	PRDX1	2,31	1,07	15	59,8	105,8	167	
Q08257	CRYZ	2,48	1,03	10	47,7	121,4	79	
Q12907	LMAN2	2,45	1,01	12	38,5	140,1	103	Cys239
Q13151	HNRNPA0	2,16	0,93	9	42,6	323,3	139	
Q13232	NME3	2,21	1,07	4	27,8	16,0	23	
Q13257	MAD2L1	1,81	2,21	4	30,7	81,4	32	
Q13347	EIF3I	1,65	1,41	10	49,8	274,1	68	
Q13505	MTX1	1,72	1,13	6	19,1	66,8	31	
Q13637	RAB32	1,63	1,27	4	22,7	20,5	24	
Q14165	MLEC	1,60	1,20	7	31,8	79,5	71	
Q14232	EIF2B1	1,74	1,09	10	36,4	31,3	39	
Q14240	EIF4A2	1,60	0,94	9	28,5	52,5	59	
Q14344	GNA13	1,87	1,48	10	29,7	123,2	44	Cys329
Q14576	ELAVL3	2,00	1,68	6	24	33,1	40	Cys68
Q15005	SPCS2	1,87	2,73	5	15,9	12,9	20	
Q15008	PSMD6	2,05	1,15	26	70,7	323,3	201	Cys188
Q15286	RAB35	3,03	1,86	7	46,3	51,2	37	
Q15382	RHEB	1,74	2,11	5	22,3	23,9	38	
Q15526	SURF1	1,82	0,91	3	16	32,1	24	
Q15631	TSN	1,70	0,79	15	66,2	278,4	127	
Q15691	MAPRE1	2,38	1,05	16	70,1	323,3	149	
Q15717	ELAVL1	1,43	1,10	8	30,4	288,1	131	
Q15819	UBE2V2	1,73	0,91	6	52,4	73,8	36	
Q15907;P 62491	RAB11B;RA B11A	2,38	1,16	11	54,1	300,7	158	
Q16629	SRSF7	1,96	0,55	7	24,4	110,7	92	
Q5T6V5	C9orf64	1,65	1,02	11	38,1	84,3	87	
Q63HM9	PLCXD3	1,56	1,00	4	21,5	32,9	46	
Q6PJ69	TRIM65	1,67	1,10	4	10,8	12,6	17	
Q6UXN9	WDR82	2,51	1,31	8	29,4	100,1	25	Cys287
Q7Z7K6	CENPV	2,75	1,13	7	37,1	114,0	69	Cys219
Q86X76	NIT1	2,29	1,28	5	19,9	17,8	30	
Q8IWA0	WDR75	2,10	1,72	8	12,2	15,2	21	
Q8N5K1	CISD2	2,95	1,79	5	31,1	24,6	23	Cys92
Q8NBQ5	HSD17B11	2,52	1,01	9	44	302,0	126	
Q8NBS9	TXNDC5	1,65	1,57	11	28,9	74,8	47	Cys121, Cys128, Cys247, Cys254
Q8NBU5	ATAD1	2,59	0,75	10	31	60,8	67	1,89
Q8TB36	GDAP1	3,46	1,35	9	27,1	149,4	80	
Q8TC12	RDH11	1,65	1,12	5	21,7	71,8	79	
Q8TDN6	BRIX1	1,80	0,88	6	20,7	26,0	28	
Q8WUD1	RAB2B	1,54	1,14	2	14,8	61,3	36	
Q92688	ANP32B	3,77	2,16	5	22,7	58,5	32	Cys123
Q969P0	IGSF8	2,30	0,76	6	11,7	10,4	16	
Q969X5	ERGIC1	1,47	1,04	6	25,5	50,9	68	
Q96A72	MAGOHB	1,74	1,33	8	63,5	62,4	54	

Q96BM9	ARL8A	1,95	1,46	8	51,6	20,6	36	
Q96CN7	ISOC1	2,62	1,19	14	55,4	323,3	169	
Q96DG6	CMBL	1,58	1,50	5	22,9	22,4	20	
Q96ER9	CCDC51	2,09	1,47	5	15,3	105,8	24	
Q96FW1	OTUB1	2,84	1,29	13	61,6	194,2	139	Cys91
Q96GD0	PDXP	1,65	0,94	11	42,9	84,9	94	Cys91
Q99536	VAT1	1,88	0,78	15	48,3	323,3	195	
Q99873	PRMT1	2,34	0,91	20	54,8	323,3	211	Cys350, Cys354
Q9BPW8	NIPSNAP1	1,74	0,96	9	34,2	141,9	104	
Q9BTV4	TMEM43	2,44	0,72	9	30,5	48,8	90	
Q9BUF5	TUBB6	1,44	1,14	9	34,5	132,3	49	
Q9BV20	MRI1	2,24	2,37	6	26,6	31,5	32	
Q9BV38	WDR18	2,23	1,04	8	23,1	48,8	36	
Q9BWM7	SFXN3	1,80	0,87	10	41,8	113,5	114	
Q9BXW7	CECR5	1,41	1,72	8	25,8	51,8	48	
Q9BYD2	MRPL9	1,59	0,98	4	19,5	6,8	16	
Q9BZE1	MRPL37	1,91	1,05	9	31,9	102,5	76	
Q9GZT8	NIF3L1	1,74	1,10	6	22	22,2	49	
Q9H0U4	RAB1B	2,34	1,09	9	57,7	207,8	171	
Q9H6V9	C2orf43	1,62	1,06	6	15,1	29,5	41	
Q9H936	SLC25A22	2,49	1,29	11	35,6	85,0	49	
Q9H9B4	SFXN1	1,99	1,01	11	45,7	193,7	98	
Q9NP72	RAB18	2,01	1,42	7	42,7	58,4	76	
Q9NQT4	EXOSC5	2,24	0,65	2	8,9	6,3	14	
Q9NR31	SAR1A	1,82	0,98	8	57,1	57,7	54	
Q9NRW1	RAB6B	1,36	2,35	9	45,2	152,0	92	
Q9NUQ9	FAM49B	3,37	1,33	12	45,4	270,6	121	
Q9NUU7	DDX19A	3,51	0,72	13	32	139,3	88	
Q9NWU5	MRPL22	1,67	0,82	3	18	21,3	16	
Q9NX20	MRPL16	1,98	1,74	4	19,1	12,0	10	
Q9NY12	GAR1	1,50	0,93	4	12,9	7,2	17	
Q9P035	HACD3	2,36	0,58	8	18,2	180,9	108	
Q9P2K5	MYEF2	3,70	1,93	11	20,7	109,1	31	
Q9UBE0	SAE1	1,93	1,08	13	44,5	305,2	113	
Q9UGI8	TES	1,50	1,88	11	31,1	200,9	40	
Q9UI12	ATP6V1H	1,65	0,86	11	31,3	50,5	69	
Q9UKD2	MRTO4	1,96	2,07	10	32,6	127,8	59	
Q9UKM9	RALY	1,59	0,90	13	51,3	323,3	158	
Q9UL46	PSME2	1,80	0,89	10	49,8	323,3	101	
Q9Y266	NUDC	2,38	2,45	12	42,6	64,6	47	
Q9Y277	VDAC3	1,92	1,13	13	54,4	251,3	116	Cys65
Q9Y2P8	RCL1	1,52	0,93	7	20,9	13,5	41	
Q9Y2Q3	GSTK1	1,46	1,46	4	25,2	25,0	30	
Q9Y316	MEMO1	2,98	1,12	4	15,2	26,4	26	
Q9Y394	DHRS7	2,18	0,61	11	33,3	132,2	93	
Q9Y3B3	TMED7	2,02	2,45	4	23,7	20,9	31	Cys48
Q9Y3E5	PTRH2	1,81	0,92	4	39,7	52,2	59	Cys86
Q9Y3F4	STRAP	1,63	1,35	12	47,7	123,4	96	
Q9Y3L5	RAP2C	2,70	2,88	3	16,4	6,0	22	
Q9Y5M8	SRPRB	1,84	0,90	15	65,3	211,1	106	Cys73
Q9Y617	PSAT1	2,83	1,18	15	51,1	208,8	120	Cys98, Cys224
Q9Y6C9	MTCH2	2,82	0,82	10	47,5	320,7	94	Cys49
Q9Y6E2	BZW2	2,15	0,66	13	31,5	136,3	102	

EtOH									
A1L020	MEX3A	2,59	-0,50	5	14,6	70,1	76		0,86
O14776	TCERG1	1,96	-0,93	32	25,6	195,7	271		
O15031	PLXNB2	2,43	-0,76	4	2,9	6,7	18		
P05060	CHGB	1,47	-1,03	18	37,7	323,3	85		
P07196	NEFL	3,11	-0,38	10	28	65,4	56		
PODMV9	HSPA1B	3,39	-0,53	29	64,3	323,3	261		
P11137	MAP2	2,79	-0,42	17	13,5	192,7	91		
P23246	SFPQ	2,50	-0,83	20	35,1	323,3	289		0,78
P38646	HSPA9	2,08	-0,58	27	46,4	323,3	310		0,98
P42166	TMPO	1,63	-1,19	9	18,6	31,6	29		
P48449	LSS	2,73	-0,41	15	23,8	48,1	91		
P49790	NUP153	2,57	-0,65	18	17,4	95,6	117		
Q07065	CKAP4	3,13	-0,65	29	56,6	323,3	323		
Q13435	SF3B2	3,64	-0,78	20	29,2	323,3	204		0,88
Q13492	PICALM	4,01	-0,34	7	17,6	139,8	88		
Q13573	SNW1	2,74	-0,55	10	23,3	162,3	66		
Q14166	TLL12	2,27	-0,52	7	15,7	39,4	86		
Q14974	KPNB1	3,13	-0,35	39	61,9	323,3	571		
Q15459	SF3A1	2,57	-0,45	22	34,9	321,0	175		
Q6NUQ4	TMEM214	3,86	-0,59	7	12,5	27,3	37		
Q6P9B9	INT55	2,70	-0,57	6	7,9	8,9	18		
Q8IY67	RAVER1	2,81	-0,77	10	25,7	43,5	80	Cys297	
Q8N1G4	LRRC47	3,17	-0,76	23	48	323,3	290		
Q8ND24	RNF214	1,92	-1,44	7	13,9	22,8	45		
Q92615	LARP4B	1,97	-1,41	9	15	19,2	33		
Q96124	FUBP3	2,34	-0,59	15	43	136,1	61		
Q96T88	UHRF1	3,89	-0,42	11	20,2	53,0	72		
Q99459	CDC5L	2,29	-0,46	23	36	323,3	215		
Q99798	ACO2	4,11	-0,38	18	28,1	160,9	142		
Q9H307	PNN	1,58	-1,79	7	11,7	18,0	33		
Q9H6W3	NO66	2,68	-0,44	10	21,1	29,8	50		
Q9NVP1	DDX18	2,02	-0,60	14	30,1	124,0	97		
Q9NZB2	FAM120A	2,84	-0,54	12	13,8	52,7	72		
Q9Y223	GNE	1,48	-1,01	7	12,6	52,2	35		

Tabelle 6.5 Liste der 73 differentiellen carbamidomethylierten Peptide.

Carbamidomethylierte Peptide die infolge der Retinsäure (RA)- oder EtOH-Behandlung eine erhöhte Abundanz in dem Redox-Proteom aufwiesen (SAM-Methode). LW: Lokalisierungswahrscheinlichkeit. Bhdl.: Behandlung

Genname	Modifizierte Sequenz	L W	Delta Score	Score Lokalisier- ung	Masse- fehler [ppm]	Bhdl	La- dung	-log p- Wert	Differenz (RA- EtOH)
CLIC1 Cys24	ELFVKAGSDGAKIGNCPFSQRLFMVLWLKGV	1	64,5	43,3	-0,6	RA	2	3,74	0,14
CLIC1 Cys191	ADCNLLPKLHIVQVVCCKYRGFTIPEAFRGV	1	79,5	43,8	0,2	RA	3	1,87	0,10
NDUFS2 Cys347	CRVEEMRQSLRIIAQCLNKMPPEIKVDDAK	1	39,5	77,1	-0,7	RA	2	1,80	0,13

CS Cys101	DPDEGIRFRGFSIPECQKLLPKAKGGEEPLP	1	75,2	65,4	-0,7	RA	2	1,39	0,16
PRKRA Cys54	LHEYGMKTKNIPVYECERSDVQIHVPTFTFR	1	37,7	42,7	-1,5	RA	2	2,87	0,19
EIF2S1 Cys70	RIRSINKLIRIGRNECVVIRVDKEKGYIDL	1	61,4	58,6	-1,1	RA	2	0,95	0,15
RPLP0; RPLP0P6 Cys119; Cys119	ANKVPAAARAGAIAPCEVTVPAQNTGLGPEK	1	138,0	46,4	-0,1	RA	2	1,15	0,16
RPLP0; RPLP0P6 Cys27; Cys27	NYFLKIIQLDDYPKCFIVGADNVGSKQMQQ	1	92,3	95,4	-1,7	RA	2	1,94	0,15
LDHB Cys294	KGMYGIENEVFLSLPCILNARGLTSVINQKL	1	146,7	47,6	-0,8	RA	3	1,95	0,10
GNAI3 Cys66	KQMKIHHEDGYSEDECKQYKVVVYSNTIQSI	1	73,5	51,8	0,1	RA	3	2,86	0,09
PCNA Cys162	ICRDLSHIGDAVVISCAKDGVKFSASGELGN	1	89,2	50,0	-0,2	RA	3	1,33	0,14
AKR1B1 Cys81	QVVKREELFIVSKLWCTYHEKGLVKGACQKT	1	86,8	41,9	-0,7	RA	3	2,76	0,09
RPS2 Cys229	LMMAGIDDCYTSARGCTATLGNFAKATFDAI	1	96,2	66,6	0,3	RA	2	1,74	0,23
ARF4 Cys62	PTIGFNVETVEYKNICFTVWDVGGQDRIRPL	1	58,0	59,7	-0,7	RA	2	2,19	0,13
PGAM1 Cys153	KDRRYADLTEDQLPSCESLKDTIARALPFWN	1	93,9	41,6	-0,9	RA	3	1,70	0,17
VDAC1 Cys232	TRFGIAAKYQIDPDACFSKVNNSLIGLGY	1	67,3	59,2	-0,9	RA	2	1,53	0,16
HNRNPA2 B1 Cys50	ESLRNYEQWGKLTDCVVMRDPASKRSRGFG	1	81,7	56,4	-0,1	RA	2	2,82	0,08
UQCRC2 Cys125	LSVTATRENMAYTVECLRGDVIDLMEFLLN	1	148,5	58,2	0,1	RA	2	1,91	0,10
UQCRC2 Cys192	LHAAAYRNALANPLYCPDYRIGKVTSEELHY	1	77,7	83,2	-1,1	RA	2	2,23	0,14
RPS3 Cys97	GSVELYAEKVATRGLCAIAQAESLRYKLLGG	1	139,2	111,5	-1,3	RA	2	1,28	0,18
AHCY Cys195	VNDSVTKSKFDNLYGCRESLIDGIKRATDVM	1	142,7	99,3	-0,8	RA	2	2,44	0,09
YWHAQ Cys94	IKDYREKVESELRSICTTVLELLDKYLIANA	1	129,2	68,4	0,7	RA	3	2,46	0,23
YWHAQ Cys134	LKMKGDYFRYLAEVACGDDRKQTTIDNSQGAY	1	162,6	137,0	0,4	RA	2	4,33	0,13
APEX1 Cys93	KKGLDWVKEEAPDILCLQETKCSENKLPAL	1	50,3	52,2	1,2	RA	3	1,60	0,08

APEX1 Cys65	DQKTSPSGKPATLKICSWNVDDLRAWIKKKKG	1	113,7	93,1	-1,0	RA	2	1,69	0,13
APEX1 Cys296	RLDYFLLSHSLPALCDSKIRSKALGSDHCP	1	97,2	83,4	1,6	RA	3	1,29	0,11
PRDX6 Cys91	VEDHLAWSKDINAYNCEEPTKLPFIIDDR	1	97,8	45,9	-0,8	RA	3	1,93	0,13
PRDX5 Cys100	KKGVLFVPGAFTPGCSKTHLPGFVEQAEAL	1	44,9	51,0	1,0	RA	2	1,85	0,10
RPL22 Cys25	KGGKKKKQVLKFTLDCTHPVEDGIMDAANFE	1	108,0	72,9	-0,2	RA	3	1,88	0,08
ANP32A Cys123	PLKKLENLKSLLDFNCEVTNLNDYRENVFKL	1	147,9	43,2	-1,5	RA	3	1,86	0,13
VDAC2 Cys47	GFGFGLVKLDVKTSCSGVEFSTSGSSNTDT	1	223,0	42,8	0,6	RA	3	2,66	0,15
CAPZA2 Cys111	FKFDHLRKEATDPRPCEVENAVESWRVSVET	1	53,2	43,2	-0,1	RA	3	2,37	0,12
CAPZB Cys62	LKIARDKVVGKDYLLCDYNRDGDSYRSPWSN	1	84,3	43,6	-1,1	RA	3	2,85	0,18
BLVRA Cys281	FSEKELAAEKKRILHCLGLAAEIQKYCCSRK	1	74,5	80,2	1,1	RA	3	1,17	0,10
NAPA Cys84	AQLHLQLQSKHDAATCFVDAGNAFKKADPQE	1	63,4	61,4	0,4	RA	3	5,22	0,12
TMEM33 Cys232	HIIMKPACPLFVRRRLCQSI AFISRLAPTVP	1	67,7	66,3	0,8	RA	2	2,02	0,11
EIF3E Cys345	EDFIENARLFIFETF CRIHQICISINMLADKL	1	34,8	62,5	-0,7	RA	2	1,76	0,09
PPP1CB Cys61	LSQPILLELEAPLKICGDIHQYTDLLRLFEE	1	55,3	68,3	0,1	RA	3	2,61	0,17
GNB2 Cys25	EAEQLRNQIRDARKACGDSTLTQITAGLDPV	1	85,6	98,4	-0,4	RA	3	1,37	0,18
GNB2 Cys204	SLSLAPDGRFTVSGACDASIKLWDVRDSMCR	1	51,6	51,7	1,6	RA	2	2,40	0,20
YWHAZ Cys94	AREYREKIETELRDICNDVLSLEKFLIPNA	1	69,0	42,6	-0,2	RA	3	1,85	0,20
GNB2L1 Cys240	KHLYTLDDGGDIINALCFSPNRYWLCAATGPS	1	198,5	113,3	-0,2	RA	3	1,52	0,10
GNB2L1 Cys138	GSRDKTIKLWNTLGVCKYTVQDESHSEWVSC	1	60,1	71,6	0,0	RA	2	2,58	0,11
GNB2L1 Cys182	SCGWDKLVKVVNLANCKLKTNHIGHTGYLNT	1	78,6	87,8	-0,9	RA	2	3,43	0,12
GNB2L1 Cys153	CKYTVQDESHSEWVSCVRFSPNSSNPIIVSC	1	146,3	92,4	0,7	RA	2	2,36	0,20
CSNK2B Cys109	IAQMLEKYQQGDFGYCPRVYCENQPMPIGL	1	135,3	112,1	-0,3	RA	2	2,59	0,22
CDK6 Cys83	LETFEHPNVVRLFDVCTVSRDRETCLTLVF	1	57,9	51,3	0,6	RA	2	3,41	0,15
RPL18A	LREYKVVGRCLPTPKCHTPPLYRMRIFAPNH	1	55,3	67,0	0,2	RA	2	1,72	0,09

Cys22										
RPL18A Cys64	SQLKKMKKSSGEIVYCGQVFEKSPLRVKNFG	1	115,3	67,1	0,4	RA	2	2,06	0,14	
LMAN2 Cys239	LTVMTDLEDKNEWKNCIDITGVRLPTGYFYFG	1	65,7	89,0	-0,7	RA	2	3,44	0,12	
GNA13 Cys329	GDPHCLRDVQKFLVECFRNKRDRDQQKPLYH	1	50,0	68,9	-1,3	RA	2	2,04	0,13	
ELAVL3 Cys68	DEFKSLFGSIGDIESCKLVRDKITGQSLGYG	1	56,6	40,9	-0,9	RA	2	1,15	0,13	
PSMD6 Cys188	DWDRRNRLKVYQGLYCAIRDFKQAAELFLD	1	55,1	49,3	0,1	RA	2	1,95	0,10	
WDR82 Cys287	IKVAVLDGKHTGPITCLQFNPKFMTFASACS	1	87,7	61,5	0,2	RA	3	2,24	0,13	
CENPV Cys219	YTFNTHKAQHTFCRKGVSFYTPRNPGGF	1	99,7	72,2	0,1	RA	2	1,17	0,10	
RAVER1 Cys297	ADGLSLGGSHLRVSCAPGPPGRSMLAALIA	1	55,8	64,8	0,1	EtO H	2	1,45	-0,12	
CISD2 Cys92	KENPKVVNEINIEDLCLTKAAYCRCWRSKTF	1	47,9	53,3	1,0	RA	2	1,55	0,10	
ANP32B Cys123	PLKKLECLKSLDLFNCEVTNLNDYRESVFKL	1	147,9	91,6	-1,0	RA	3	2,94	0,17	
OTUB1 Cys91	HKKYSYIRKTRPDGNCFYRAFGFHLEALLD	1	63,4	68,7	-0,9	RA	2	2,80	0,11	
PDXP Cys91	GFGGLRAEQLFSSALCAARLLRQLPGPPDA	1	55,0	57,4	-2,8	RA	2	1,28	0,10	
VDAC3 Cys65	DTGKASGNLETKYKVCNYGLTFTQKWNTDNT	1	86,7	64,6	2,4	RA	2	1,38	0,11	
TMED7 Cys48	GASEITFELPDNAKQCFYEDIAQGTKCTLEF	1	86,2	43,0	0,0	RA	2	3,06	0,17	
PTRH2 Cys86	VRNDLKMKGKGVAAQCASHAAVSAYKIQRRN	1	68,1	66,2	1,1	RA	2	1,29	0,11	
SRPRB Cys73	RSRRSSQRAVLLVGLCDSGKTLFVRLLTGL	1	49,5	61,1	1,7	RA	2	2,50	0,14	
PSAT1 Cys98	FSAVPLNLIGLKAGRCADYVVTGAWSAKAAE	1	57,2	62,3	-1,2	RA	2	2,86	0,10	
PSAT1 Cys224	VVIVRDDLLGFALRECPVLEIKVQAGNSSL	1	50,6	63,1	-0,7	RA	2	1,14	0,13	
MTCH2 Cys49	PLPPTIGRNIFGRQVCQLPGLFSYAQHIASI	1	80,9	48,6	-1,0	RA	3	2,38	0,13	
TXNDC5 Cys121	YNSMEDAKVYVAKVDCTAHSVCSAQGVGRGY	1	87,0	94,5	-1,1	RA	3	1,66	0,08	
TXNDC5 Cys128	KVYVAKVDCTAHSVCSAQGVGRGYPTLKLFK	1	87,0	94,5	-1,1	RA	3	1,65	0,08	
TXNDC5 Cys247	LGLEHSETVKIGKVDCTQHYELCSGNQVRGY	1	56,5	61,3	-0,4	RA	3	1,98	0,12	
TXNDC5 Cys254	TVKIGKVDCTQHYELCSGNQVRGYPTLLWFR	1	56,5	61,3	-0,4	RA	3	1,87	0,13	

PRMT1 Cys350	RDLDFITLDLDFKGLCELSCTDYRMR_____	1	95,2	66,0	-0,9	RA	2	2,86	0,13
PRMT1 Cys354	FTIDLDFKGLCELSCTDYRMR_____	1	95,2	66,0	-0,9	RA	2	2,63	0,14

Tabelle 6.6 Wirkstoff-Studie: Liste der 68 Proteine mit Wirkstoff-Effekt.

Proteine mit einem direkten (D) oder indirekten (I) Wirkstoff-Effekt (WE) durch Zugabe von N-Acetylcystein (NAC) oder Butylhydroxyanisol (BHA). a Angabe der Ratios. RA: (RA/EtOH); BHA: (RA+BHA)/RA; NAC: (RA+NAC)/RA

Protein ID	Genname	p-Wert			Peptide	Sequenz- abdeckung (%)	MS/MS -Count	WE	Ratio (a)		
		RA vs. EtOH	(RA+EtOH) vs. (RA+BHA)	(RA+NAC) vs. (RA+EtOH)					RA	BHA	NAC
P49748	ACADVL	0,03	0,02	0,99	22	46	388	D; BHA	1,26	1,28	0,96
O96019	ACTL6A	0,04	0,83	0,03	8	308	67	D; NAC	0,65	1,16	1,59
P04075	ALDOA	0,79	0,01	0,55	26	701	775	I; BHA	0,91	1,31	1,13
Q13510	ASAH1	0,01	0,03	0,87	3	84	36	D; BHA	1,88	0,59	0,81
P08243	ASNS	0,97	0,00	0,66	16	39	147	I; BHA	0,86	0,36	1,34
P62158	CALM1	0,81	0,00	0,00	6	544	164	I; BHA, NAC	1,13	0,49	0,43
P27824	CANX	0,00	0,00	0,90	15	242	348	D; BHA	1,20	1,20	0,96
Q13185	CBX3	0,92	0,05	0,09	7	525	161	I; BHA	1,10	0,74	0,75
P06493	CDK1	0,98	0,02	0,99	9	374	130	I; BHA	0,80	0,42	1,19
P10645	CHGA	0,12	0,00	0,11	11	411	190	I; BHA	0,51	0,16	0,52
P05060	CHGB	1,00	0,00	0,35	10	229	105	I; BHA	1,07	0,30	0,61
O00299	CLIC1	0,89	0,04	0,93	13	647	405	I; BHA	0,91	1,35	1,09
Q12860	CNTN1	0,98	0,95	0,05	11	168	100	I; NAC	0,78	1,36	0,46
P31146	CORO1A	0,44	0,04	0,97	6	258	45	I; BHA	1,59	0,49	0,85
O43174	CYP26A1	0,00	0,91	0,00	7	205	42	D; NAC	3,03	1,23	0,41
P61803	DAD1	1,00	0,83	0,00	3	283	65	I; NAC	1,01	1,28	0,39
Q01469	FABP5	0,58	0,03	0,84	6	541	103	I; BHA	0,75	0,60	1,22
Q96AC1	FERMT2	0,73	0,01	0,70	18	368	186	I; BHA	0,86	1,55	1,19
O75955	FLOT1	0,04	0,01	0,99	16	515	237	D; BHA	1,27	0,75	0,96
P11413	G6PD	0,75	0,02	1,00	15	383	260	I; BHA	0,92	1,24	1,03
Q16777; Q6F113	HIST2H2AC; HIST2H2AA 3	0,96	0,13	0,03	8	581	487	I; NAC	0,90	0,74	0,70
P51659	HSD17B4	0,09	0,00	0,98	20	409	339	I; BHA	1,14	1,21	0,97
P14625	HSP90B1	0,00	0,00	1,00	50	608	1410	D; BHA	1,20	1,25	1,00
P08107	HSPA1A	0,01	0,00	0,59	30	573	865	D; BHA	0,80	1,29	1,10
P11021	HSPA5	0,10	0,00	1,00	40	555	1434	I; BHA	1,21	1,34	1,00
Q92598	HSPH1	0,00	0,00	0,58	32	464	542	D; BHA	0,78	1,31	1,09
P18065	IGFBP2	1,00	0,00	1,00	5	225	99	I; BHA	1,07	0,52	0,93
P31153	MAT2A	0,48	0,03	1,00	5	154	90	I; BHA	0,70	0,61	1,12
P49736	MCM2	0,37	0,01	0,90	17	273	273	I; BHA	0,85	0,75	1,09
P33991	MCM4	1,00	0,01	0,89	19	337	219	I; BHA	0,92	0,44	1,24
Q14566	MCM6	0,97	0,03	1,00	24	40	354	I; BHA	0,94	0,74	1,04

P33993	MCM7	0,70	0,02	0,77	26	478	284	I; BHA	0,88	0,73	1,13
Q14165	MLEC	0,99	0,04	0,96	6	288	142	I; BHA	1,04	1,36	0,93
Q13724	MOGS	0,08	1,00	0,00	11	182	141	I; NAC	1,36	0,99	0,63
P60660	MYL6	0,94	0,01	0,17	10	589	208	I; BHA	1,08	0,71	0,80
Q13765; E9PAV3	NACA	0,89	0,00	0,52	5	256	139	I; BHA	0,89	0,65	0,85
P19404	NDUFV2	1,00	0,05	0,60	3	173	61	I; BHA	1,04	0,45	0,68
Q9BPW8	NIPSNAP1	0,68	0,05	0,41	10	391	104	I; BHA	0,77	1,77	1,38
Q16822	PCK2	0,86	0,01	0,99	15	356	142	I; BHA	1,17	0,58	0,91
P12004	PCNA	0,89	0,00	0,57	12	651	312	I; BHA	0,94	0,58	1,11
Q15113	PCOLCE	1,00	0,04	1,00	9	31	112	I; BHA	1,02	0,77	0,97
Q9UHV9	PFDN2	0,80	0,00	0,62	2	169	62	I; BHA	0,84	0,57	0,85
O60568	PLOD3	1,00	0,05	0,68	13	245	140	I; BHA	0,97	1,38	0,87
P13861	PRKAR2A	0,87	1,00	0,01	6	252	67	I; NAC	1,33	0,98	0,37
P14314	PRKCSH	0,25	0,03	0,82	11	227	182	I; BHA	1,26	0,73	0,88
Q99873	PRMT1	0,14	0,00	0,99	19	651	281	I; BHA	0,82	0,66	1,05
P07602	PSAP	0,95	0,83	0,01	2	5	57	I; NAC	1,16	0,79	0,46
P25789	PSMA4	0,91	0,04	0,73	11	544	199	I; BHA	0,93	1,25	1,11
Q06323	PSME1	1,00	0,05	0,28	13	502	201	I; BHA	1,03	0,79	0,85
P51149	RAB7A	0,97	0,04	1,00	14	778	342	I; BHA	0,95	1,23	1,01
P83731	RPL24	0,99	0,05	0,65	5	306	43	I; BHA	1,15	0,45	0,66
P05387	RPLP2	0,99	0,00	0,00	4	696	82	I; BHA, NAC	0,91	0,35	0,34
P04843	RPN1	0,95	0,00	1,00	27	582	618	I; BHA	1,05	1,32	1,01
P62266	RPS23	1,00	0,05	1,00	5	406	72	I; BHA	0,93	0,55	1,09
P62701	RPS4X	1,00	0,04	0,57	18	593	305	I; BHA	0,97	0,73	0,84
P46781	RPS9	0,71	0,05	1,00	8	304	129	I; BHA	0,75	0,52	0,87
Q14108	SCARB2	0,31	1,00	0,00	7	184	83	I; NAC	1,72	1,08	0,34
P13521	SCG2	0,00	0,00	0,00	13	323	194	D; BHA, NAC	3,93	0,35	0,38
Q15437	SEC23B	0,77	0,00	0,96	20	379	227	I; BHA	0,93	1,27	1,05
Q01105; PODME0	SET	0,96	0,00	0,08	8	331	142	I; BHA	0,91	0,64	0,74
Q8IZP2; P50502; Q8NFI4	ST13P4; ST13; ST13P5	0,96	0,03	0,43	5	254	107	I; BHA	0,93	0,76	0,86
P16949	STMN1	0,30	0,00	0,00	8	389	188	I; BHA, NAC	0,78	0,51	0,58
P06753	TPM3	1,00	0,02	0,00	8	20	111	I; BHA, NAC	1,15	0,28	0,19
P67936	TPM4	1,00	0,00	0,00	19	565	193	I; BHA, NAC	1,04	0,29	0,19
P10599	TXN	0,55	0,05	0,88	6	60	95	I; BHA	0,67	0,57	0,82
Q8NBS9	TXNDC5	0,99	0,04	0,98	12	292	196	I; BHA	0,96	1,26	0,95
P61088; Q5JXB2	UBE2N; UBE2NL	0,95	0,03	0,98	11	776	211	I; BHA	0,91	0,72	0,92
Q15240	VGF	0,00	0,00	0,00	35	616	1025	D; BHA, NAC	2,71	0,51	0,56

Tabelle 6.7 Zusammengefasste GO-Kategorien für die Beschreibung der BHA- und NAC-sensitiven Proteine.

Verwendete Bezeichnung	GO-Kategorie	Anzahl assoziierter Proteine
Entwicklung anatomischer Strukturen	anatomical structure arrangement	1
	anatomical structure development	19
	anatomical structure formation involved in morphogenesis	1
	anatomical structure homeostasis	4
	anatomical structure morphogenesis	6
Entwicklung des Axons	axon guidance	4
	axonogenesis	2
Entwicklung des Nervensystems	nerve development	1
	nervous system development	2
	neurological system process	1
	neuron projection development	3
	neuron projection morphogenesis	2

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
Å	Ångström
A	Ampere
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Wachstumsfaktor (<i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
BHA	Butylhydroxyanisol
bp	Basenpaar
BST	<i>biotin switch technique</i>
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
CH	Schweiz
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu ⁺	Kupferion
Cys	Cystein
Cys-PTM	Posttranslationale Modifizierung am Cystein
Da	Dalton
DE	Deutschland
Dimedon	5,5-Dimethylcyclohexan-1,3-dion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPI	Diphenyleneiodonium
DTNB	5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), Ellman's Reagenz
DTT	Dithiothreitol
DUOX	Duale-NADPH-Oxidase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
em.	Emission
ETC	Elektronentransportkette (<i>electron transport chain</i>)
EtOH	Ethanol
ex.	Extinktion
FADH ₂ /FAD	Flavin-Adenindinukleotid (reduziert/oxidiert)
FDR	<i>false discovery rate</i>
Fe ²⁺	Zweiwertiges Eisenion
FMNH ₂ /FMN	Flavin-Mononukleotid (reduziert/oxidiert)
fw	<i>forward</i> , Angabe bei Primern (5'-3')
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
ggf.	gegebenenfalls
GO	Gen-Ontologie
GR	Glutathion-Reduktase
GSH/GSSG	Glutathion (reduziert/oxidiert)
GTL	Genomics & Transcriptomics Labor
h	hour
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOCl	Hypochlorid
IAM	Iodacetamid
ICAT	Isotopen-codierte Affinitätsmarkierung (<i>isotope coded affinity tag</i>)
ID	Identifikator
iTRAQ	<i>isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation</i>
KCl	Kaliumchlorid
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i> , Kopplung von HPLC und Tandemmassenspektrometrie
LFQ	Markierungsfreie Quantifizierung (<i>label-free quantification</i>)
log	Logarithmus
M	Molar
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MEM	Minimum Essential Medium
MFZ	Biologisch Medizinisches Forschungszentrum
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Min.	Minute
ml	Milliliter
ms	Millisekunde
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
n	Nano
N	Stickstoff
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte/oxidierte Form)
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte/oxidierte Form)
NCF1-RoGFP2	Sensorprotein RoGFP2 fusioniert mit dem <i>neutrophil cytosol factor-1</i> (NCF1, p47 ^{phox})
NEM	N-Ethylmaleimid
nm	Nanometer
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumbicarbonat
NO	Stickstoffmonoxid
NO ⁺	Nitrosonium
NOX	NADPH Oxidase-Komplex
O ₂	Molekularer Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OD	Optische Dichte
OH ⁻	Hydroxylradikal
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PCVDF	Polyvinylidenfluorid
PDGF	Wachstumsfaktor, <i>platelet-derived growth factor</i>
PEG	Polyethyleneglycol
pKa	logarithmische Größe der Säurekonstante
RAR	Retinsäure-Rezeptor (<i>retinoic acid receptor</i>)
RARE	<i>retinoic acid response element</i>
Retinsäure	all- <i>trans</i> -Retinsäure
R _{L/S}	SILAC-Ratios von leicht zu schwer markierten Proteinen

RNS	Reaktive Stickstoff Spezies (<i>reactive nitrogen species</i>)
RO [·]	Alkoxyradikal
RoGFP2	redox-sensitive Variante des GFPs
RoGFP2-Orp1	Sensorprotein RoGFP2 fusioniert mit der Hefe Thiolperoxidase ORP1
ROO [·]	Peroxyradikal
ROOH	Hydroperoxid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RPKM	<i>reads per kilobase million</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RSS	Reaktive Schwefelspezies (<i>reactive sulfur species</i>)
R-SSO ₃ ⁻	Thiosulfate
rv	<i>reverse</i> , Angabe bei Primern (5'-3')
RXR	Retinoid-X-Rezeptor (<i>retinoid X receptor</i>)
S	Schwefel
SAM	<i>significance analysis of microarrays</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sek.	Sekunde
SILAC	<i>stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture</i>
SOE-PCR	<i>splicing by overlap extension-polymerase chain reaction</i>
Std.	Stunde
T _{1/2}	Halbwertszeit
TBS	Tris-gepufferter Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TIC	<i>total ion current</i>
TMT	<i>tandem mass tag</i>
TNB	5-thio-2-nitrobenzoate
TPS-Matrix	Thiopropyl-Sepharose 6B-Matrix
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan hydrochlorid
TXN	Thioredoxin
TXN _{red} /TXN _{ox}	Thioredoxin, ausführlich: TXN(SH) ₂ /TXNSS (reduziert/oxidiert)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent (<i>volume/volume</i>)
VAD	Vitamin A defiziente Diät (<i>vitamin a deficiency</i>)
w/v	Gewichtsprozent (<i>weight/volume</i>)
z. B.	zum Beispiel

Proteinnamen

Bei den angegebenen Protein- und Gennamen handelt es sich um die UniProt Empfehlungen.

Literatur

- Abo, M., & Weerapana, E. (2015). A Caged Electrophilic Probe for Global Analysis of Cysteine Reactivity in Living Cells. *J Am Chem Soc*, *137*(22), 7087-7090. doi: 10.1021/jacs.5b04350
- Abu-Abed, S., Dolle, P., Metzger, D., Beckett, B., Chambon, P., & Petkovich, M. (2001). The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev*, *15*(2), 226-240.
- Acevedo, A., & Gonzalez-Billault, C. (2018). Crosstalk between Rac1-mediated actin regulation and ROS production. *Free Radic Biol Med*, *116*, 101-113. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.008
- Aguda, A. H., Burtnick, L. D., & Robinson, R. C. (2005). The state of the filament. *EMBO Rep*, *6*(3), 220-226. doi: 10.1038/sj.embor.7400363
- Ahmad, A., Ahmad, S., Schneider, B. K., Allen, C. B., Chang, L. Y., & White, C. W. (2002). Elevated expression of hexokinase II protects human lung epithelial-like A549 cells against oxidative injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *283*(3), L573-584. doi: 10.1152/ajplung.00410.2001
- Akter, S., Huang, J., Bodra, N., De Smet, B., Wahni, K., Rombaut, D., . . . Messens, J. (2015). DYn-2 Based Identification of Arabidopsis Sulfenomes. *Mol Cell Proteomics*, *14*(5), 1183-1200. doi: 10.1074/mcp.M114.046896
- Allison, W. S., Benitez, L. V., & Johnson, C. L. (1973). The formation of a protein sulfenamide during the inactivation of the acyl phosphatase activity of oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by benzylamine. *Biochem Biophys Res Commun*, *52*(4), 1403-1409.
- Ameziane-El-Hassani, R., Morand, S., Boucher, J. L., Frapart, Y. M., Apostolou, D., Agnandji, D., . . . Dupuy, C. (2005). Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca²⁺-dependent H₂O₂-generating activity. *J Biol Chem*, *280*(34), 30046-30054. doi: 10.1074/jbc.M500516200
- Anastasiou, D., Pouligiannis, G., Asara, J. M., Boxer, M. B., Jiang, J. K., Shen, M., . . . Cantley, L. C. (2011). Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science*, *334*(6060), 1278-1283. doi: 10.1126/science.1211485
- Andersen, J. K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med*, *10 Suppl*, S18-25. doi: 10.1038/nrn1434
- Angrisano, T., Sacchetti, S., Natale, F., Cerrato, A., Pero, R., Keller, S., . . . Chiariotti, L. (2011). Chromatin and DNA methylation dynamics during retinoic acid-induced RET gene transcriptional activation in neuroblastoma cells. *Nucleic Acids Res*, *39*(6), 1993-2006. doi: 10.1093/nar/gkq864
- Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O., & Caroni, P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*, *393*(6687), 805-809. doi: 10.1038/31729
- Aspenstrom, P., Schutt, C. E., Lindberg, U., & Karlsson, R. (1993). Mutations in beta-actin: influence on polymer formation and on interactions with myosin and profilin. *FEBS Lett*, *329*(1-2), 163-170.
- Bae, Y. S., Kang, S. W., Seo, M. S., Baines, I. C., Tekle, E., Chock, P. B., & Rhee, S. G. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, *272*(1), 217-221.
- Balmer, J. E., & Blomhoff, R. (2002). Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res*, *43*(11), 1773-1808.
- Banfi, B., Clark, R. A., Steger, K., & Krause, K. H. (2003). Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem*, *278*(6), 3510-3513. doi: 10.1074/jbc.C200613200
- Barranco-Medina, S., Lazaro, J. J., & Dietz, K. J. (2009). The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function. *FEBS Lett*, *583*(12), 1809-1816. doi: 10.1016/j.febslet.2009.05.029
- Bastien, J., & Rochette-Egly, C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene*, *328*, 1-16. doi: 10.1016/j.gene.2003.12.005
- Basuroy, S., Bhattacharya, S., Leffler, C. W., & Parfenova, H. (2009). Nox4 NADPH oxidase mediates oxidative stress and apoptosis caused by TNF-alpha in cerebral vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, *296*(3), C422-432. doi: 10.1152/ajpcell.00381.2008

- Baudino, T. A., Kraichely, D. M., Jefcoat, S. C., Jr., Winchester, S. K., Partridge, N. C., & MacDonald, P. N. (1998). Isolation and characterization of a novel coactivator protein, NCoA-62, involved in vitamin D-mediated transcription. *J Biol Chem*, 273(26), 16434-16441.
- Bauer, G. (2014). Targeting extracellular ROS signaling of tumor cells. *Anticancer Res*, 34(4), 1467-1482.
- Bedard, K., & Krause, K.-H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87(1), 245-313.
- Begemann, G., Schilling, T. F., Rauch, G. J., Geisler, R., & Ingham, P. W. (2001). The zebrafish neckless mutation reveals a requirement for raldh2 in mesodermal signals that pattern the hindbrain. *Development*, 128(16), 3081-3094.
- Benitez, L. V., & Allison, W. S. (1974). The inactivation of the acyl phosphatase activity catalyzed by the sulfenic acid form of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by dimedone and olefins. *J Biol Chem*, 249(19), 6234-6243.
- Bernardi, P., Petronilli, V., Di Lisa, F., & Forte, M. (2001). A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci*, 26(2), 112-117.
- Berndt, C., & Lillig, C. H. (2015). Redox regulation of differentiation and de-differentiation. *Biochim Biophys Acta*, 1850(8), 1467-1468. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.03.004
- Berndt, C., Lillig, C. H., & Holmgren, A. (2007). Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(3), H1227-1236. doi: 10.1152/ajpheart.01162.2006
- Berndt, C., Poschmann, G., Stühler, K., Holmgren, A., & Bräutigam, L. (2014). Zebrafish heart development is regulated via glutaredoxin 2 dependent migration and survival of neural crest cells. *Redox Biol*, 2, 673-678.
- Bernstein, B. W., Shaw, A. E., Minamide, L. S., Pak, C. W., & Bamburg, J. R. (2012). Incorporation of cofilin into rods depends on disulfide intermolecular bonds: implications for actin regulation and neurodegenerative disease. *J Neurosci*, 32(19), 6670-6681. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6020-11.2012
- Berry, D. C., & Noy, N. (2007). Is PPARbeta/delta a Retinoid Receptor? *PPAR Res*, 2007, 73256. doi: 10.1155/2007/73256
- Berti, P. J., & Storer, A. C. (1995). Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *J Mol Biol*, 246(2), 273-283. doi: 10.1006/jmbi.1994.0083
- Beske, P. H., & Jackson, D. A. (2012). NADPH oxidase mediates the oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced increase in the tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR2A subunit in retinoic acid differentiated SH-SY5Y Cells. *J Mol Signal*, 7(1), 15. doi: 10.1186/1750-2187-7-15
- Besset, V., Scott, R. P., & Ibanez, C. F. (2000). Signaling complexes and protein-protein interactions involved in the activation of the Ras and phosphatidylinositol 3-kinase pathways by the c-Ret receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 275(50), 39159-39166. doi: 10.1074/jbc.M006908200
- Biedler, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., & Freedman, L. S. (1978). Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*, 38(11 Pt 1), 3751-3757.
- Bielow, C., Mastrobuoni, G., & Kempa, S. (2016). Proteomics Quality Control: Quality Control Software for MaxQuant Results. *J Proteome Res*, 15(3), 777-787. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00780
- Boersema, P. J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S., & Heck, A. J. (2009). Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat Protoc*, 4(4), 484-494. doi: 10.1038/nprot.2009.21
- Bologa, L., Sharma, J., Dahl, D., & Roberts, E. (1987). Buffers and H₂O₂ reduce neuronal death and/or enhance differentiation of neurons and astrocytes in dissociated mouse brain cultures. *Brain Res*, 411(2), 282-290.
- Bondarenko, P. V., Chelius, D., & Shaler, T. A. (2002). Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 74(18), 4741-4749.

- Bouillet, P., Sapin, V., Chazaud, C., Messaddeq, N., Decimo, D., Dolle, P., & Chambon, P. (1997). Developmental expression pattern of Stra6, a retinoic acid-responsive gene encoding a new type of membrane protein. *Mech Dev*, 63(2), 173-186.
- Boyer, P. D. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem*, 66, 717-749. doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.717
- Brandes, N., Reichmann, D., Tienson, H., Leichert, L. I., & Jakob, U. (2011). Using quantitative redox proteomics to dissect the yeast redoxome. *J Biol Chem*, 286(48), 41893-41903. doi: 10.1074/jbc.M111.296236
- Bräutigam, L., Jensen, L. D., Poschmann, G., Nystrom, S., Bannenberg, S., Dreij, K., . . . Berndt, C. (2013). Glutaredoxin regulates vascular development by reversible glutathionylation of sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(50), 20057-20062. doi: 10.1073/pnas.1313753110
- Bräutigam, L., Schutte, L. D., Godoy, J. R., Prozorovski, T., Gellert, M., Hauptmann, G., . . . Berndt, C. (2011). Vertebrate-specific glutaredoxin is essential for brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(51), 20532-20537. doi: 10.1073/pnas.1110085108
- Brennan, J. P., Miller, J. I., Fuller, W., Wait, R., Begum, S., Dunn, M. J., & Eaton, P. (2006). The utility of N,N-biotinyl glutathione disulfide in the study of protein S-glutathiolation. *Mol Cell Proteomics*, 5(2), 215-225. doi: 10.1074/mcp.M500212-MCP200
- Brennan, J. P., Wait, R., Begum, S., Bell, J. R., Dunn, M. J., & Eaton, P. (2004). Detection and mapping of widespread intermolecular protein disulfide formation during cardiac oxidative stress using proteomics with diagonal electrophoresis. *J Biol Chem*, 279(40), 41352-41360. doi: 10.1074/jbc.M403827200
- Bunone, G., Borrello, M. G., Picetti, R., Bongarzone, I., Peverali, F. A., de Franciscis, V., . . . Pierotti, M. A. (1995). Induction of RET proto-oncogene expression in neuroblastoma cells precedes neuronal differentiation and is not mediated by protein synthesis. *Exp Cell Res*, 217(1), 92-99.
- Burgoyne, J. R., Madhani, M., Cuello, F., Charles, R. L., Brennan, J. P., Schroder, E., . . . Eaton, P. (2007). Cysteine redox sensor in PKGIa enables oxidant-induced activation. *Science*, 317(5843), 1393-1397. doi: 10.1126/science.1144318
- Burgoyne, J. R., Oviolu, O., & Eaton, P. (2013). The PEG-switch assay: a fast semi-quantitative method to determine protein reversible cysteine oxidation. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 68(3), 297-301. doi: 10.1016/j.vascn.2013.07.001
- Cai, A. Q., Radtke, K., Linville, A., Lander, A. D., Nie, Q., & Schilling, T. F. (2012). Cellular retinoic acid-binding proteins are essential for hindbrain patterning and signal robustness in zebrafish. *Development*, 139(12), 2150-2155. doi: 10.1242/dev.077065
- Caito, S., Rajendrasozhan, S., Cook, S., Chung, S., Yao, H., Friedman, A. E., . . . Rahman, I. (2010). SIRT1 is a redox-sensitive deacetylase that is post-translationally modified by oxidants and carbonyl stress. *FASEB J*, 24(9), 3145-3159. doi: 10.1096/fj.09-151308
- Campanale, J. P., Sun, T. Y., & Montell, D. J. (2017). Development and dynamics of cell polarity at a glance. *J Cell Sci*, 130(7), 1201-1207. doi: 10.1242/jcs.188599
- Casadevall, M., & Sarkar, B. (1998). Effect of redox conditions on the DNA-binding efficiency of the retinoic acid receptor zinc-finger. *J Inorg Biochem*, 71(3-4), 147-152.
- Chae, H. Z., Robison, K., Poole, L. B., Church, G., Storz, G., & Rhee, S. G. (1994). Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(15), 7017-7021.
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59(3), 527-605.
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*, 61(2), 192-208. doi: 10.1007/s00018-003-3206-5
- Chen, K., Craige, S. E., & Keane, J. F., Jr. (2009). Downstream targets and intracellular compartmentalization in Nox signaling. *Antioxid Redox Signal*, 11(10), 2467-2480. doi: 10.1089/ARS.2009.2594

- Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E. G., & Lambeth, J. D. (2001). Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene*, 269(1-2), 131-140.
- Cheung, Y. T., Lau, W. K., Yu, M. S., Lai, C. S., Yeung, S. C., So, K. F., & Chang, R. C. (2009). Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*, 30(1), 127-135. doi: 10.1016/j.neuro.2008.11.001
- Chiang, B. Y., Chou, C. C., Hsieh, F. T., Gao, S., Lin, J. C., Lin, S. H., . . . Lin, C. H. (2012). In vivo tagging and characterization of S-glutathionylated proteins by a chemoenzymatic method. *Angew Chem Int Ed Engl*, 51(24), 5871-5875. doi: 10.1002/anie.201200321
- Chiocchetti, A. G., Haslinger, D., Stein, J. L., de la Torre-Ubieta, L., Cocchi, E., Rothamel, T., . . . Freitag, C. M. (2016). Transcriptomic signatures of neuronal differentiation and their association with risk genes for autism spectrum and related neuropsychiatric disorders. *Transl Psychiatry*, 6(8), e864. doi: 10.1038/tp.2016.119
- Chouchani, E. T., James, A. M., Methner, C., Pell, V. R., Prime, T. A., Erickson, B. K., . . . Murphy, M. P. (2017). Identification and quantification of protein S-nitrosation by nitrite in the mouse heart during ischemia. *J Biol Chem*, 292(35), 14486-14495. doi: 10.1074/jbc.M117.798744
- Chua, B. T., Volbracht, C., Tan, K. O., Li, R., Yu, V. C., & Li, P. (2003). Mitochondrial translocation of cofilin is an early step in apoptosis induction. *Nat Cell Biol*, 5(12), 1083-1089. doi: 10.1038/ncb1070
- Cimmino, F., Spano, D., Capasso, M., Zambrano, N., Russo, R., Zollo, M., & Iolascon, A. (2007). Comparative proteomic expression profile in all-trans retinoic acid differentiated neuroblastoma cell line. *J Proteome Res*, 6(7), 2550-2564. doi: 10.1021/pr060701g
- Cleland, W. W. (1964). Dithiothreitol, a New Protective Reagent for Sh Groups. *Biochemistry*, 3, 480-482.
- Conrad, M., Jakupoglu, C., Moreno, S. G., Lippl, S., Banjac, A., Schneider, M., . . . Brielmeier, M. (2004). Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Mol Cell Biol*, 24(21), 9414-9423. doi: 10.1128/MCB.24.21.9414-9423.2004
- Constantinescu, R., Constantinescu, A. T., Reichmann, H., & Janetzky, B. (2007). Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. *J Neural Transm Suppl*(72), 17-28.
- Copeland, P. R. (2005). Making sense of nonsense: the evolution of selenocysteine usage in proteins. *Genome Biol*, 6(6), 221. doi: 10.1186/gb-2005-6-6-221
- Cox, J., Hein, M. Y., Luber, C. A., Paron, I., Nagaraj, N., & Mann, M. (2014). Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics*, 13(9), 2513-2526. doi: 10.1074/mcp.M113.031591
- Cox, J., & Mann, M. (2012). 1D and 2D annotation enrichment: a statistical method integrating quantitative proteomics with complementary high-throughput data. *BMC Bioinformatics*, 13 Suppl 16, S12. doi: 10.1186/1471-2105-13-S16-S12
- Craig, E. D., Mantell, C. D., Ekeroma, A. J., Stewart, A. W., & Mitchell, E. A. (2004). Ethnicity and birth outcome: New Zealand trends 1980-2001. Part 1. Introduction, methods, results and overview. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 44(6), 530-536. doi: 10.1111/j.1479-828X.2004.00309.x
- Crane, E. J., 3rd, Parsonage, D., Poole, L. B., & Claiborne, A. (1995). Analysis of the kinetic mechanism of enterococcal NADH peroxidase reveals catalytic roles for NADH complexes with both oxidized and two-electron-reduced enzyme forms. *Biochemistry*, 34(43), 14114-14124.
- Cross, A. R. (1987). The inhibitory effects of some iodonium compounds on the superoxide generating system of neutrophils and their failure to inhibit diaphorase activity. *Biochem Pharmacol*, 36(4), 489-493.
- Cross, A. R., & Jones, O. T. (1986). The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem J*, 237(1), 111-116.
- Cross, A. R., & Jones, O. T. (1991). Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta*, 1057(3), 281-298.

- Cumming, R. C. (2008). Analysis of global and specific changes in the disulfide proteome using redox two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 476, 165-179.
- Cummings, S. W., & Prough, R. A. (1983). Butylated hydroxyanisole-stimulated NADPH oxidase activity in rat liver microsomal fractions. *J Biol Chem*, 258(20), 12315-12319.
- D'Aniello, E., Rydeen, A. B., Anderson, J. L., Mandal, A., & Waxman, J. S. (2013). Depletion of retinoic acid receptors initiates a novel positive feedback mechanism that promotes teratogenic increases in retinoic acid. *PLoS Genet*, 9(8), e1003689. doi: 10.1371/journal.pgen.1003689
- D'Aniello, E., & Waxman, J. S. (2015). Input overload: Contributions of retinoic acid signaling feedback mechanisms to heart development and teratogenesis. *Dev Dyn*, 244(3), 513-523. doi: 10.1002/dvdy.24232
- da Frota Junior, M. L., Pires, A. S., Zeidan-Chulia, F., Bristot, I. J., Lopes, F. M., de Bittencourt Pasquali, M. A., . . . Moreira, J. C. (2011). In vitro optimization of retinoic acid-induced neuritogenesis and TH endogenous expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by the antioxidant Trolox. *Mol Cell Biochem*, 358(1-2), 325-334. doi: 10.1007/s11010-011-0983-2
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Rossi, R., Colombo, R., & Milzani, A. (2003). Reversible S-glutathionylation of Cys 374 regulates actin filament formation by inducing structural changes in the actin molecule. *Free Radic Biol Med*, 34(1), 23-32.
- de Bittencourt Pasquali, M. A., de Ramos, V. M., Albanus, R. D. O., Kunzler, A., de Souza, L. H. T., Dalmolin, R. J. S., . . . Moreira, J. C. F. (2016). Gene Expression Profile of NF-kappaB, Nrf2, Glycolytic, and p53 Pathways During the SH-SY5Y Neuronal Differentiation Mediated by Retinoic Acid. *Mol Neurobiol*, 53(1), 423-435. doi: 10.1007/s12035-014-8998-9
- de Groot, H., & Littauer, A. (1989). Hypoxia, reactive oxygen, and cell injury. *Free Radic Biol Med*, 6(5), 541-551.
- de Moura, M. B., dos Santos, L. S., & Van Houten, B. (2010). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and cancer. *Environ Mol Mutagen*, 51(5), 391-405. doi: 10.1002/em.20575
- Delorme, V., Machacek, M., DerMardirossian, C., Anderson, K. L., Wittmann, T., Hanein, D., . . . Bokoch, G. M. (2007). Cofilin activity downstream of Pak1 regulates cell protrusion efficiency by organizing lamellipodium and lamella actin networks. *Dev Cell*, 13(5), 646-662. doi: 10.1016/j.devcel.2007.08.011
- Demary, K., Wong, L., Liou, J. S., Faller, D. V., & Spanjaard, R. A. (2001). Redox control of retinoic acid receptor activity: a novel mechanism for retinoic acid resistance in melanoma cells. *Endocrinology*, 142(6), 2600-2605. doi: 10.1210/endo.142.6.8201
- Deng, X., Weerapana, E., Ulanovskaya, O., Sun, F., Liang, H., Ji, Q., . . . He, C. (2013). Proteome-wide quantification and characterization of oxidation-sensitive cysteines in pathogenic bacteria. *Cell Host Microbe*, 13(3), 358-370. doi: 10.1016/j.chom.2013.02.004
- Di-Poi, N., Tan, N. S., Michalik, L., Wahli, W., & Desvergne, B. (2002). Antiapoptotic role of PPARbeta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. *Mol Cell*, 10(4), 721-733.
- Di, A., Gao, X. P., Qian, F., Kawamura, T., Han, J., Hecquet, C., . . . Malik, A. B. (2012). The redox-sensitive cation channel TRPM2 modulates phagocyte ROS production and inflammation. *Nat Immunol*, 13(1), 29-34. doi: 10.1038/ni.2171
- Dickinson, B. C., Peltier, J., Stone, D., Schaffer, D. V., & Chang, C. J. (2011). Nox2 redox signaling maintains essential cell populations in the brain. *Nat Chem Biol*, 7(2), 106-112. doi: 10.1038/nchembio.497
- Dickson, B. J., Gatie, M. I., Spice, D. M., & Kelly, G. M. (2017). NOX1 and NOX4 are required for the differentiation of mouse F9 cells into extraembryonic endoderm. *PLoS One*, 12(2), e0170812. doi: 10.1371/journal.pone.0170812
- Dolle, P., Ruberte, E., Leroy, P., Morriss-Kay, G., & Chambon, P. (1990). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development*, 110(4), 1133-1151.

- Doussiere, J., & Vignais, P. V. (1992). Diphenylene iodonium as an inhibitor of the NADPH oxidase complex of bovine neutrophils. Factors controlling the inhibitory potency of diphenylene iodonium in a cell-free system of oxidase activation. *Eur J Biochem*, *208*(1), 61-71.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, *82*(1), 47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001
- Durand, B., Saunders, M., Leroy, P., Leid, M., & Chambon, P. (1992). All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs. *Cell*, *71*(1), 73-85.
- Dwane, S., Durack, E., & Kiely, P. A. (2013). Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell migration. *BMC Res Notes*, *6*, 366. doi: 10.1186/1756-0500-6-366
- Emdal, K. B., Pedersen, A. K., Bekker-Jensen, D. B., Tsafou, K. P., Horn, H., Lindner, S., . . . Olsen, J. V. (2015). Temporal proteomics of NGF-TrkA signaling identifies an inhibitory role for the E3 ligase Cbl-b in neuroblastoma cell differentiation. *Sci Signal*, *8*(374), ra40. doi: 10.1126/scisignal.2005769
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Ceña, V., . . . Comella, J. X. (2000). Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem*, *75*(3), 991-1003.
- Feng, L., Hernandez, R. E., Waxman, J. S., Yelon, D., & Moens, C. B. (2010). Dhrr3a regulates retinoic acid biosynthesis through a feedback inhibition mechanism. *Dev Biol*, *338*(1), 1-14. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.10.029
- Fernandes, A. P., & Holmgren, A. (2004). Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal*, *6*(1), 63-74. doi: 10.1089/152308604771978354
- Fernandes, T. G., Diogo, M. M., Fernandes-Platzgummer, A., da Silva, C. L., & Cabral, J. M. (2010). Different stages of pluripotency determine distinct patterns of proliferation, metabolism, and lineage commitment of embryonic stem cells under hypoxia. *Stem Cell Res*, *5*(1), 76-89. doi: 10.1016/j.scr.2010.04.003
- Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol*, *10*(2), 248-253.
- Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol*, *15*(2), 247-254.
- Forrester, M. T., Thompson, J. W., Foster, M. W., Nogueira, L., Moseley, M. A., & Stamler, J. S. (2009). Proteomic analysis of S-nitrosylation and denitrosylation by resin-assisted capture. *Nat Biotechnol*, *27*(6), 557-559. doi: 10.1038/nbt.1545
- Forsberg, K., & Di Giovanni, S. (2014). Cross Talk between Cellular Redox Status, Metabolism, and p53 in Neural Stem Cell Biology. *Neuroscientist*, *20*(4), 326-342. doi: 10.1177/1073858413514634
- Forsberg, K., Wuttke, A., Quadrato, G., Chumakov, P. M., Wizenmann, A., & Di Giovanni, S. (2013). The tumor suppressor p53 fine-tunes reactive oxygen species levels and neurogenesis via PI3 kinase signaling. *J Neurosci*, *33*(36), 14318-14330. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1056-13.2013
- Forster, J. I., Koglsberger, S., Trefois, C., Boyd, O., Baumuratov, A. S., Buck, L., . . . Antony, P. M. (2016). Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability. *J Biomol Screen*, *21*(5), 496-509. doi: 10.1177/1087057115625190
- Fratelli, M., Goodwin, L. O., Orom, U. A., Lombardi, S., Tonelli, R., Mengozzi, M., & Ghezzi, P. (2005). Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(39), 13998-14003. doi: 10.1073/pnas.0504398102
- Frese, K. S., Meder, B., Keller, A., Just, S., Haas, J., Vogel, B., . . . Rottbauer, W. (2015). RNA splicing regulated by RBFOX1 is essential for cardiac function in zebrafish. *J Cell Sci*, *128*(16), 3030-3040. doi: 10.1242/jcs.166850
- Fricker, M. D. (2016). Quantitative Redox Imaging Software. *Antioxid Redox Signal*, *24*(13), 752-762. doi: 10.1089/ars.2015.6390

- Fu, C., Hu, J., Liu, T., Ago, T., Sadoshima, J., & Li, H. (2008). Quantitative analysis of redox-sensitive proteome with DIGE and ICAT. *J Proteome Res*, 7(9), 3789-3802. doi: 10.1021/pr800233r
- Fu, L., Liu, K., Sun, M., Tian, C., Sun, R., Morales Betanzos, C., . . . Yang, J. (2017). Systematic and Quantitative Assessment of Hydrogen Peroxide Reactivity With Cysteines Across Human Proteomes. *Mol Cell Proteomics*, 16(10), 1815-1828. doi: 10.1074/mcp.RA117.000108
- Fukuda, T., Kiuchi, K., & Takahashi, M. (2002). Novel mechanism of regulation of Rac activity and lamellipodia formation by RET tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 277(21), 19114-19121. doi: 10.1074/jbc.M200643200
- G., J. C. W. P. (2009). Introduction in Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine. Wiley-VCH: Weinheim, Germany,, 1-12.
- Garcia-Garcia, A., Zavala-Flores, L., Rodriguez-Rocha, H., & Franco, R. (2012). Thiol-redox signaling, dopaminergic cell death, and Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 17(12), 1764-1784. doi: 10.1089/ars.2011.4501
- Garcia, J., Han, D., Sancheti, H., Yap, L. P., Kaplowitz, N., & Cadenas, E. (2010). Regulation of mitochondrial glutathione redox status and protein glutathionylation by respiratory substrates. *J Biol Chem*, 285(51), 39646-39654. doi: 10.1074/jbc.M110.164160
- Gardner, P. R., Raineri, I., Epstein, L. B., & White, C. W. (1995). Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J Biol Chem*, 270(22), 13399-13405.
- Gasimli, L., Stansfield, H. E., Nairn, A. V., Liu, H., Paluh, J. L., Yang, B., . . . Linhardt, R. J. (2013). Structural remodeling of proteoglycans upon retinoic acid-induced differentiation of NCCIT cells. *Glycoconj J*, 30(5), 497-510. doi: 10.1007/s10719-012-9450-x
- Gerald Karp, N. L. P. (2004). *Cell and Molecular Biology* (Vol. 4): New York: J. Wiley & Sons.
- Getz, E. B., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R., & Selvin, P. R. (1999). A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. *Anal Biochem*, 273(1), 73-80. doi: 10.1006/abio.1999.4203
- Gilany, K., Van Elzen, R., Mous, K., Coen, E., Van Dongen, W., Vandamme, S., . . . Moens, L. (2008). The proteome of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y: an enlarged proteome. *Biochim Biophys Acta*, 1784(7-8), 983-985. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.03.003
- Gilbert, H. F. (1990). Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 63, 69-172.
- Giles, N. M., Giles, G. I., & Jacob, C. (2003). Multiple roles of cysteine in biocatalysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 300(1), 1-4.
- Gincel, D., Zaid, H., & Shoshan-Barmatz, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J*, 358(Pt 1), 147-155.
- Giorgio, M., Migliaccio, E., Orsini, F., Paolucci, D., Moroni, M., Contursi, C., . . . Pelicci, P. G. (2005). Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell*, 122(2), 221-233. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.011
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., & Pelicci, P. G. (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(9), 722-728. doi: 10.1038/nrm2240
- Gleason, F. K., & Holmgren, A. (1988). Thioredoxin and related proteins in procaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 4(4), 271-297.
- Goldie, B. J., Barnett, M. M., & Cairns, M. J. (2014). BDNF and the maturation of posttranscriptional regulatory networks in human SH-SY5Y neuroblast differentiation. *Front Cell Neurosci*, 8, 325. doi: 10.3389/fncel.2014.00325
- Goley, E. D., & Welch, M. D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(10), 713-726. doi: 10.1038/nrm2026
- Gorovoy, M., Niu, J., Bernard, O., Profirovic, J., Minshall, R., Neamu, R., & Voyno-Yasenetskaya, T. (2005). LIM kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerization in human endothelial cells. *J Biol Chem*, 280(28), 26533-26542. doi: 10.1074/jbc.M502921200

- Granier, S., Kim, S., Shafer, A. M., Ratnala, V. R., Fung, J. J., Zare, R. N., & Kobilka, B. (2007). Structure and conformational changes in the C-terminal domain of the beta2-adrenoceptor: insights from fluorescence resonance energy transfer studies. *J Biol Chem*, 282(18), 13895-13905. doi: 10.1074/jbc.M611904200
- Guo, J., Gaffrey, M. J., Su, D., Liu, T., Camp, D. G., 2nd, Smith, R. D., & Qian, W. J. (2014). Resin-assisted enrichment of thiols as a general strategy for proteomic profiling of cysteine-based reversible modifications. *Nat Protoc*, 9(1), 64-75. doi: 10.1038/nprot.2013.161
- Guo, Z., Kozlov, S., Lavin, M. F., Person, M. D., & Paull, T. T. (2010). ATM activation by oxidative stress. *Science*, 330(6003), 517-521. doi: 10.1126/science.1192912
- Gupta, V., & Carroll, K. S. (2014). Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. *Biochim Biophys Acta*, 1840(2), 847-875. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.05.040
- Gutscher, M., Sobotta, M. C., Wabnitz, G. H., Ballikaya, S., Meyer, A. J., Samstag, Y., & Dick, T. P. (2009). Proximity-based protein thiol oxidation by H₂O₂-scavenging peroxidases. *J Biol Chem*, 284(46), 31532-31540. doi: 10.1074/jbc.M109.059246
- Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., & Aebersold, R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*, 17(10), 994-999. doi: 10.1038/13690
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franz, B. R., & Aebersold, R. (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, 19(3), 1720-1730.
- Hackam, D. J., Rotstein, O. D., Zhang, W. J., Demaurex, N., Woodside, M., Tsai, O., & Grinstein, S. (1997). Regulation of phagosomal acidification. Differential targeting of Na⁺/H⁺ exchangers, Na⁺/K⁺-ATPases, and vacuolar-type H⁺-atpases. *J Biol Chem*, 272(47), 29810-29820.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279(5350), 509-514.
- Hammerle, B., Yanez, Y., Palanca, S., Canete, A., Burks, D. J., Castel, V., & Font de Mora, J. (2013). Targeting neuroblastoma stem cells with retinoic acid and proteasome inhibitor. *PLoS One*, 8(10), e76761. doi: 10.1371/journal.pone.0076761
- Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D., & Cadenas, E. (2003). Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem*, 278(8), 5557-5563. doi: 10.1074/jbc.M210269200
- Hansen, R. E., Roth, D., & Winther, J. R. (2009). Quantifying the global cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(2), 422-427. doi: 10.1073/pnas.0812149106
- Hansen, R. E., & Winther, J. R. (2009). An introduction to methods for analyzing thiols and disulfides: Reactions, reagents, and practical considerations. *Anal Biochem*, 394(2), 147-158. doi: 10.1016/j.ab.2009.07.051
- Hara, M. R., Agrawal, N., Kim, S. F., Cascio, M. B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., . . . Sawa, A. (2005). S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol*, 7(7), 665-674. doi: 10.1038/ncb1268
- Harrasz, M. M., Marden, J. J., Zhou, W., Zhang, Y., Williams, A., Sharov, V. S., . . . Engelhardt, J. F. (2008). SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J Clin Invest*, 118(2), 659-670. doi: 10.1172/JCI34060
- Hayashi, H., Ichihara, M., Iwashita, T., Murakami, H., Shimono, Y., Kawai, K., . . . Takahashi, M. (2000). Characterization of intracellular signals via tyrosine 1062 in RET activated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Oncogene*, 19(39), 4469-4475. doi: 10.1038/sj.onc.1203799
- Heo, J., & Campbell, S. L. (2005). Mechanism of redox-mediated guanine nucleotide exchange on redox-active Rho GTPases. *J Biol Chem*, 280(35), 31003-31010. doi: 10.1074/jbc.M504768200
- Heumuller, S., Wind, S., Barbosa-Sicard, E., Schmidt, H. H., Busse, R., Schroder, K., & Brandes, R. P. (2008). Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension*, 51(2), 211-217. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.100214
- Hillion, M., Bernhardt, J., Busche, T., Rossius, M., Maass, S., Becher, D., . . . Antelmann, H. (2017). Monitoring global protein thiol-oxidation and protein S-mycothiolation in *Mycobacterium smegmatis* under hypochlorite stress. *Sci Rep*, 7(1), 1195. doi: 10.1038/s41598-017-01179-4

- Hobbs, G. A., Mitchell, L. E., Arrington, M. E., Gunawardena, H. P., DeCristo, M. J., Loeser, R. F., . . . Campbell, S. L. (2015). Redox regulation of Rac1 by thiol oxidation. *Free Radic Biol Med*, 79, 237-250. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.027
- Hobbs, G. A., Zhou, B., Cox, A. D., & Campbell, S. L. (2014). Rho GTPases, oxidation, and cell redox control. *Small GTPases*, 5, e28579. doi: 10.4161/sgtp.28579
- Hochgrafe, F., Mostertz, J., Albrecht, D., & Hecker, M. (2005). Fluorescence thiol modification assay: oxidatively modified proteins in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 58(2), 409-425. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04845.x
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annu Rev Biochem*, 54, 237-271. doi: 10.1146/annurev.bi.54.070185.001321
- Holmgren, A. (1988). Thioredoxin and glutaredoxin: small multi-functional redox proteins with active-site disulphide bonds. *Biochem Soc Trans*, 16(2), 95-96.
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem*, 264(24), 13963-13966.
- Hordijk, P. L. (2006). Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ Res*, 98(4), 453-462. doi: 10.1161/01.RES.0000204727.46710.5e
- Hsu, J. L., Hsieh, Y., Tu, C., O'Connor, D., Nick, H. S., & Silverman, D. N. (1996). Catalytic properties of human manganese superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 271(30), 17687-17691.
- Hu, W., Tedesco, S., McDonagh, B., & Sheehan, D. (2010). Shotgun redox proteomics in sub-proteomes trapped on functionalised beads: Identification of proteins targeted by oxidative stress. *Mar Environ Res*, 69 Suppl, S25-27. doi: 10.1016/j.marenvres.2009.11.005
- Huber, W., Carey, V. J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B. S., . . . Morgan, M. (2015). Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods*, 12(2), 115-121. doi: 10.1038/nmeth.3252
- Idres, N., Marill, J., & Chabot, G. G. (2005). Regulation of CYP26A1 expression by selective RAR and RXR agonists in human NB4 promyelocytic leukemia cells. *Biochem Pharmacol*, 69(11), 1595-1601. doi: 10.1016/j.bcp.2005.02.024
- Ingold, I., Berndt, C., Schmitt, S., Doll, S., Poschmann, G., Buday, K., . . . Conrad, M. (2018). Selenium Utilization by GPX4 Is Required to Prevent Hydroperoxide-Induced Ferroptosis. *Cell*, 172(3), 409-422 e421. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.048
- Iqbalsyah, T. M., Moutevelis, E., Warwicker, J., Errington, N., & Doig, A. J. (2006). The CXXC motif at the N terminus of an alpha-helical peptide. *Protein Sci*, 15(8), 1945-1950. doi: 10.1110/ps.062271506
- Ishikawa, Y., Cho, G., Yuan, Z., Inoue, N., & Nakae, Y. (2006). Aquaporin-5 water channel in lipid rafts of rat parotid glands. *Biochim Biophys Acta*, 1758(8), 1053-1060. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.03.026
- Isken, A., Golczak, M., Oberhauser, V., Hunzelmann, S., Driever, W., Imanishi, Y., . . . von Lintig, J. (2008). RBP4 disrupts vitamin A uptake homeostasis in a STRA6-deficient animal model for Matthew-Wood syndrome. *Cell Metab*, 7(3), 258-268. doi: 10.1016/j.cmet.2008.01.009
- J, H. B. G. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*.
- Jaffrey, S. R., & Snyder, S. H. (2001). The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE*, 2001(86), pl1. doi: 10.1126/stke.2001.86.pl1
- Jaiswal, A. K. (1994). Jun and Fos regulation of NAD(P)H: quinone oxidoreductase gene expression. *Pharmacogenetics*, 4(1), 1-10.
- Jakubowski, H. (2008). CHAPTER 8: OXIDATIVE-PHOSPHORYLATION, THE CHEMISTRY OF DIOXYGEN *Biochemistry Online*: Saint John's University.
- Jakupoglu, C., Przemek, G. K., Schneider, M., Moreno, S. G., Mayr, N., Hatzopoulos, A. K., . . . Conrad, M. (2005). Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Mol Cell Biol*, 25(5), 1980-1988. doi: 10.1128/MCB.25.5.1980-1988.2005
- Jimmy Rodriguez Murillo, L.-S., Aniel Sánchez, Fábio C.S. Nogueira, Gilberto B. Domont, Magno Junqueira. (2017). Quantitative proteomic analysis identifies proteins and pathways related to

- neuronal development in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells. *EuPA Open Proteomics*, 16, 1-11.
- John A. Burns, J. C. B., John Moran, George M. Whitesides. (1991). Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine. *J. Org. Chem*, 56(8), 2648-2650.
- Jones-Villeneuve, E. M., McBurney, M. W., Rogers, K. A., & Kalnins, V. I. (1982). Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol*, 94(2), 253-262.
- Kamata, H., & Hirata, H. (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*, 11(1), 1-14.
- Kane, L. A., & Van Eyk, J. E. (2009). Post-translational modifications of ATP synthase in the heart: biology and function. *J Bioenerg Biomembr*, 41(2), 145-150. doi: 10.1007/s10863-009-9218-6
- Kang, M. R., Lee, S. W., Um, E., Kang, H. T., Hwang, E. S., Kim, E. J., & Um, S. J. (2010). Reciprocal roles of SIRT1 and SKIP in the regulation of RAR activity: implication in the retinoic acid-induced neuronal differentiation of P19 cells. *Nucleic Acids Res*, 38(3), 822-831. doi: 10.1093/nar/gkp1056
- Kashyap, V., Laursen, K. B., Brenet, F., Viale, A. J., Scandura, J. M., & Gudas, L. J. (2013). RARgamma is essential for retinoic acid induced chromatin remodeling and transcriptional activation in embryonic stem cells. *J Cell Sci*, 126(Pt 4), 999-1008. doi: 10.1242/jcs.119701
- Katsetos, C. D., Legido, A., Perentes, E., & Mork, S. J. (2003). Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *J Child Neurol*, 18(12), 851-866; discussion 867. doi: 10.1177/088307380301801205
- Kawamoto, Y., Takeda, K., Okuno, Y., Yamakawa, Y., Ito, Y., Taguchi, R., . . . Nakashima, I. (2004). Identification of RET autophosphorylation sites by mass spectrometry. *J Biol Chem*, 279(14), 14213-14224. doi: 10.1074/jbc.M312600200
- Kehrer, J. P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43-50.
- Kemp, K., Gray, E., Mallam, E., Scolding, N., & Wilkins, A. (2010). Inflammatory cytokine induced regulation of superoxide dismutase 3 expression by human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev*, 6(4), 548-559. doi: 10.1007/s12015-010-9178-6
- Kennedy, K. A., Sandiford, S. D., Skerjanc, I. S., & Li, S. S. (2012). Reactive oxygen species and the neuronal fate. *Cell Mol Life Sci*, 69(2), 215-221. doi: 10.1007/s00018-011-0807-2
- Kettenbach, A. N., Rush, J., & Gerber, S. A. (2011). Absolute quantification of protein and post-translational modification abundance with stable isotope-labeled synthetic peptides. *Nat Protoc*, 6(2), 175-186. doi: 10.1038/nprot.2010.196
- Kharitonov, V. G., Sundquist, A. R., & Sharma, V. S. (1995). Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen. *J Biol Chem*, 270(47), 28158-28164.
- Kikuchi, H., Hikage, M., Miyashita, H., & Fukumoto, M. (2000). NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene*, 254(1-2), 237-243.
- Kim, J. S., Huang, T. Y., & Bokoch, G. M. (2009). Reactive oxygen species regulate a slingshot-cofilin activation pathway. *Mol Biol Cell*, 20(11), 2650-2660. doi: 10.1091/mbc.E09-02-0131
- Kirkinezos, I. G., & Moraes, C. T. (2001). Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol*, 12(6), 449-457. doi: 10.1006/scdb.2001.0282
- Kirkpatrick LL, B. S. (1999). Molecular Components of the Neuronal Cytoskeleton. In A. B. Siegel GJ, Albers RW, et al., editors. (Ed.), *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition*. (Vol. 6th edition). Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999.
- Kishida, K. T., Hoeffler, C. A., Hu, D., Pao, M., Holland, S. M., & Klann, E. (2006). Synaptic plasticity deficits and mild memory impairments in mouse models of chronic granulomatous disease. *Mol Cell Biol*, 26(15), 5908-5920. doi: 10.1128/MCB.00269-06
- Klamt, F., Zdanov, S., Levine, R. L., Pariser, A., Zhang, Y., Zhang, B., . . . Shacter, E. (2009). Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nat Cell Biol*, 11(10), 1241-1246. doi: 10.1038/ncb1968
- Klaunig, J. E., & Kamendulis, L. M. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 239-267. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121851

- Klebanoff, S. J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*, 77(5), 598-625. doi: 10.1189/jlb.1204697
- Klemke, M., Wabnitz, G. H., Funke, F., Funk, B., Kirchgessner, H., & Samstag, Y. (2008). Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions. *Immunity*, 29(3), 404-413. doi: 10.1016/j.immuni.2008.06.016
- Klose, J., & Kobalz, U. (1995). Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*, 16(6), 1034-1059.
- Knoefler, D., Thamsen, M., Koniczek, M., Niemuth, N. J., Diederich, A. K., & Jakob, U. (2012). Quantitative in vivo redox sensors uncover oxidative stress as an early event in life. *Mol Cell*, 47(5), 767-776. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.016
- Knoops, B., Goemaere, J., Van der Eecken, V., & Declercq, J. P. (2011). Peroxiredoxin 5: structure, mechanism, and function of the mammalian atypical 2-Cys peroxiredoxin. *Antioxid Redox Signal*, 15(3), 817-829. doi: 10.1089/ars.2010.3584
- Knut H. Dahl, J. S. M.-M. (1981). The reactivity of affinity labels: A kinetic study of the reaction of alkyl halides with thiolate anions—a model reaction for protein alkylation. *Bioorganic Chemistry*, 10(3), 329-341. doi: 10.1016/0045-2068(81)90012-2
- Korecka, J. A., van Kesteren, R. E., Blaas, E., Spitzer, S. O., Kamstra, J. H., Smit, A. B., . . . Bossers, K. (2013). Phenotypic characterization of retinoic acid differentiated SH-SY5Y cells by transcriptional profiling. *PLoS One*, 8(5), e63862. doi: 10.1371/journal.pone.0063862
- Kornberg, M. D., Sen, N., Hara, M. R., Juluri, K. R., Nguyen, J. V., Snowman, A. M., . . . Snyder, S. H. (2010). GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins. *Nat Cell Biol*, 12(11), 1094-1100. doi: 10.1038/ncb2114
- Kosower, N. S., & Kosower, E. M. (1995). Diamide: an oxidant probe for thiols. *Methods Enzymol*, 251, 123-133.
- Kosower, N. S., Kosower, E. M., Wertheim, B., & Correa, W. S. (1969). Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem Biophys Res Commun*, 37(4), 593-596.
- Kovalevich, J., & Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol*, 1078, 9-21. doi: 10.1007/978-1-62703-640-5_2
- Krishna, A., Biryukov, M., Trefois, C., Antony, P. M., Hussong, R., Lin, J., . . . May, P. (2014). Systems genomics evaluation of the SH-SY5Y neuroblastoma cell line as a model for Parkinson's disease. *BMC Genomics*, 15, 1154. doi: 10.1186/1471-2164-15-1154
- Kulathu, Y., Garcia, F. J., Mevissen, T. E., Busch, M., Arnaudo, N., Carroll, K. S., . . . Komander, D. (2013). Regulation of A20 and other OTU deubiquitinases by reversible oxidation. *Nat Commun*, 4, 1569. doi: 10.1038/ncomms2567
- Kumar, L., & E Futschik, M. (2007). Mfuzz: a software package for soft clustering of microarray data. *Bioinformatics*, 2(1), 5-7.
- Landino, L. M., Hagedorn, T. D., Kim, S. B., & Hogan, K. M. (2011). Inhibition of tubulin polymerization by hypochlorous acid and chloramines. *Free Radic Biol Med*, 50(8), 1000-1008. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.018
- Landino, L. M., Hasan, R., McGaw, A., Cooley, S., Smith, A. W., Masselam, K., & Kim, G. (2002). Peroxynitrite oxidation of tubulin sulfhydryls inhibits microtubule polymerization. *Arch Biochem Biophys*, 398(2), 213-220. doi: 10.1006/abbi.2001.2729
- Landino, L. M., Moynihan, K. L., Todd, J. V., & Kennett, K. L. (2004). Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system. *Biochem Biophys Res Commun*, 314(2), 555-560.
- Landino, L. M., Skreslet, T. E., & Alston, J. A. (2004). Cysteine oxidation of tau and microtubule-associated protein-2 by peroxynitrite: modulation of microtubule assembly kinetics by the thioredoxin reductase system. *J Biol Chem*, 279(33), 35101-35105. doi: 10.1074/jbc.M405471200
- Lang, S., Spratt, D. E., Guillemette, J. G., & Palmer, M. (2005). Dual-targeted labeling of proteins using cysteine and selenomethionine residues. *Anal Biochem*, 342(2), 271-279. doi: 10.1016/j.ab.2005.04.036

- Lawson, C. D., & Burridge, K. (2014). The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. *Small GTPases*, 5, e27958. doi: 10.4161/sgtp.27958
- Le Moan, N., Clement, G., Le Maout, S., Tacnet, F., & Toledano, M. B. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *J Biol Chem*, 281(15), 10420-10430. doi: 10.1074/jbc.M513346200
- Lee, J. G., Baek, K., Soetandyo, N., & Ye, Y. (2013). Reversible inactivation of deubiquitinases by reactive oxygen species in vitro and in cells. *Nat Commun*, 4, 1568. doi: 10.1038/ncomms2532
- Leichert, L. I., Gehrke, F., Gudiseva, H. V., Blackwell, T., Ilbert, M., Walker, A. K., . . . Jakob, U. (2008). Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(24), 8197-8202. doi: 10.1073/pnas.0707723105
- Leichert, L. I., & Jakob, U. (2004). Protein thiol modifications visualized in vivo. *PLoS Biol*, 2(11), e333. doi: 10.1371/journal.pbio.0020333
- Leong, G. M., Subramaniam, N., Issa, L. L., Barry, J. B., Kino, T., Driggers, P. H., . . . Gardiner, E. M. (2004). Ski-interacting protein, a bifunctional nuclear receptor coregulator that interacts with N-CoR/SMRT and p300. *Biochem Biophys Res Commun*, 315(4), 1070-1076. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.02.004
- Lepetsos, P., & Papavassiliou, A. G. (2016). ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta*, 1862(4), 576-591. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.01.003
- Leto, T. L., Morand, S., Hurt, D., & Ueyama, T. (2009). Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases. *Antioxid Redox Signal*, 11(10), 2607-2619. doi: 10.1089/ARS.2009.2637
- Li, Y., & Trush, M. A. (1998). Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochem Biophys Res Commun*, 253(2), 295-299. doi: 10.1006/bbrc.1998.9729
- Lide, D. R. (2010). CRC handbook of chemistry and physics. Electronic.
- Limon-Pacheco, J., & Gonshebbatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res*, 674(1-2), 137-147. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.09.015
- Lin, D., Saleh, S., & Liebler, D. C. (2008). Reversibility of covalent electrophile-protein adducts and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol*, 21(12), 2361-2369.
- Lin, H. C., Zhang, F. L., Geng, Q., Yu, T., Cui, Y. Q., Liu, X. H., . . . Yao, M. (2013). Quantitative proteomic analysis identifies CPNE3 as a novel metastasis-promoting gene in NSCLC. *J Proteome Res*, 12(7), 3423-3433. doi: 10.1021/pr400273z
- Littler, D. R., Harrop, S. J., Fairlie, W. D., Brown, L. J., Pankhurst, G. J., Pankhurst, S., . . . Curmi, P. M. (2004). The intracellular chloride ion channel protein CLIC1 undergoes a redox-controlled structural transition. *J Biol Chem*, 279(10), 9298-9305. doi: 10.1074/jbc.M308444200
- Liu, H., Sadygov, R. G., & Yates, J. R., 3rd. (2004). A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem*, 76(14), 4193-4201. doi: 10.1021/ac0498563
- Liu, N. Q., Dekker, L. J., Stingl, C., Guzel, C., De Marchi, T., Martens, J. W., . . . Umar, A. (2013). Quantitative proteomic analysis of microdissected breast cancer tissues: comparison of label-free and SILAC-based quantification with shotgun, directed, and targeted MS approaches. *J Proteome Res*, 12(10), 4627-4641. doi: 10.1021/pr4005794
- Lopert, P., Day, B. J., & Patel, M. (2012). Thioredoxin reductase deficiency potentiates oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cell death in dopaminergic cells. *PLoS One*, 7(11), e50683. doi: 10.1371/journal.pone.0050683
- Lopes, F. M., da Motta, L. L., De Bastiani, M. A., Pfaffenseller, B., Aguiar, B. W., de Souza, L. F., . . . Klamt, F. (2017). RA Differentiation Enhances Dopaminergic Features, Changes Redox Parameters, and Increases Dopamine Transporter Dependency in 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. *Neurotox Res*, 31(4), 545-559. doi: 10.1007/s12640-016-9699-0

- Lopes, F. M., Schroder, R., da Frota, M. L., Jr., Zanotto-Filho, A., Muller, C. B., Pires, A. S., . . . Klamt, F. (2010). Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Res*, 1337, 85-94. doi: 10.1016/j.brainres.2010.03.102
- Lotan, R. (1996). Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J*, 10(9), 1031-1039.
- Lowe, J., Li, H., Downing, K. H., & Nogales, E. (2001). Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J Mol Biol*, 313(5), 1045-1057. doi: 10.1006/jmbi.2001.5077
- Lubos, E., Loscalzo, J., & Handy, D. E. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 15(7), 1957-1997. doi: 10.1089/ars.2010.3586
- Ludueno, R. F., & Roach, M. C. (1991). Tubulin sulfhydryl groups as probes and targets for antimitotic and antimicrotubule agents. *Pharmacol Ther*, 49(1-2), 133-152.
- Ludueno, R. F., Roach, M. C., Jordan, M. A., & Murphy, D. B. (1985). Different reactivities of brain and erythrocyte tubulins toward a sulfhydryl group-directed reagent that inhibits microtubule assembly. *J Biol Chem*, 260(2), 1257-1264.
- Lukacs, G. L., Rotstein, O. D., & Grinstein, S. (1990). Phagosomal acidification is mediated by a vacuolar-type H(+)-ATPase in murine macrophages. *J Biol Chem*, 265(34), 21099-21107.
- Lutolf, M. P., Tirelli, N., Cerritelli, S., Cavalli, L., & Hubbell, J. A. (2001). Systematic modulation of Michael-type reactivity of thiols through the use of charged amino acids. *Bioconjug Chem*, 12(6), 1051-1056.
- Majander, A., Finel, M., & Wikstrom, M. (1994). Diphenylethylidonium inhibits reduction of iron-sulfur clusters in the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *J Biol Chem*, 269(33), 21037-21042.
- Majmudar, J. D., Konopko, A. M., Labby, K. J., Tom, C. T., Crellin, J. E., Prakash, A., & Martin, B. R. (2016). Harnessing Redox Cross-Reactivity To Profile Distinct Cysteine Modifications. *J Am Chem Soc*, 138(6), 1852-1859. doi: 10.1021/jacs.5b06806
- Malhotra, J. D., & Kaufman, R. J. (2007). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal*, 9(12), 2277-2293. doi: 10.1089/ars.2007.1782
- Manoharan, S., Guillemin, G. J., Abiramasundari, R. S., Essa, M. M., Akbar, M., & Akbar, M. D. (2016). The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 8590578. doi: 10.1155/2016/8590578
- Marino, S. M., & Gladyshev, V. N. (2010). Cysteine function governs its conservation and degeneration and restricts its utilization on protein surfaces. *J Mol Biol*, 404(5), 902-916. doi: 10.1016/j.jmb.2010.09.027
- Masia, S., Alvarez, S., de Lera, A. R., & Baretino, D. (2007). Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol Endocrinol*, 21(10), 2391-2402. doi: 10.1210/me.2007-0062
- Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J., & Taketo, M. M. (1996). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol*, 178(1), 179-185. doi: 10.1006/dbio.1996.0208
- Mavridou, D. A., Stevens, J. M., Ferguson, S. J., & Redfield, C. (2007). Active-site properties of the oxidized and reduced C-terminal domain of DsbD obtained by NMR spectroscopy. *J Mol Biol*, 370(4), 643-658. doi: 10.1016/j.jmb.2007.04.038
- Meischl, C., Krijnen, P. A., Sipkens, J. A., Cillessen, S. A., Munoz, I. G., Okroj, M., . . . Niessen, H. W. (2006). Ischemia induces nuclear NOX2 expression in cardiomyocytes and subsequently activates apoptosis. *Apoptosis*, 11(6), 913-921. doi: 10.1007/s10495-006-6304-7
- Melino, G., Thiele, C. J., Knight, R. A., & Piacentini, M. (1997). Retinoids and the control of growth/death decisions in human neuroblastoma cell lines. *J Neurooncol*, 31(1-2), 65-83.
- Mellon, M. G., & Rebhun, L. I. (1976). Sulfhydryls and the in vitro polymerization of tubulin. *J Cell Biol*, 70(1), 226-238.

- Menger, K. E., James, A. M., Cocheme, H. M., Harbour, M. E., Chouchani, E. T., Ding, S., . . . Murphy, M. P. (2015). Fasting, but Not Aging, Dramatically Alters the Redox Status of Cysteine Residues on Proteins in *Drosophila melanogaster*. *Cell Rep*, *11*(12), 1856-1865. doi: 10.1016/j.celrep.2015.05.033
- Meyer, A. J., & Dick, T. P. (2010). Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid Redox Signal*, *13*(5), 621-650.
- Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y., & Takenawa, T. (1998). Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature*, *391*(6662), 93-96. doi: 10.1038/34208
- Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., & Takenawa, T. (2000). IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature*, *408*(6813), 732-735. doi: 10.1038/35047107
- Miller, E. W., & Chang, C. J. (2007). Fluorescent probes for nitric oxide and hydrogen peroxide in cell signaling. *Curr Opin Chem Biol*, *11*(6), 620-625. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.09.018
- Missler, M., & Sudhof, T. C. (1998). Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends Genet*, *14*(1), 20-26. doi: 10.1016/S0168-9525(97)01324-3
- Mohr, S., Stamler, J. S., & Brune, B. (1996). Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment. *J Biol Chem*, *271*(8), 4209-4214.
- Molina y Vedia, L., McDonald, B., Reep, B., Brune, B., Di Silvio, M., Billiar, T. R., & Lapetina, E. G. (1992). Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation. *J Biol Chem*, *267*(35), 24929-24932.
- Morinaka, A., Yamada, M., Itofusa, R., Funato, Y., Yoshimura, Y., Nakamura, F., . . . Miki, H. (2011). Thioredoxin mediates oxidation-dependent phosphorylation of CRMP2 and growth cone collapse. *Sci Signal*, *4*(170), ra26. doi: 10.1126/scisignal.2001127
- Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A., & Van Remmen, H. (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med*, *43*(4), 477-503. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.034
- Mullins, R. D., Heuser, J. A., & Pollard, T. D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(11), 6181-6186.
- Munnamalai, V., & Suter, D. M. (2009). Reactive oxygen species regulate F-actin dynamics in neuronal growth cones and neurite outgrowth. *J Neurochem*, *108*(3), 644-661. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05787.x
- Munnamalai, V., Weaver, C. J., Weisheit, C. E., Venkatraman, P., Agim, Z. S., Quinn, M. T., & Suter, D. M. (2014). Bidirectional interactions between NOX2-type NADPH oxidase and the F-actin cytoskeleton in neuronal growth cones. *J Neurochem*, *130*(4), 526-540. doi: 10.1111/jnc.12734
- Nelson, J. W., & Creighton, T. E. (1994). Reactivity and ionization of the active site cysteine residues of DsbA, a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Biochemistry*, *33*(19), 5974-5983.
- Nightingale, H., Kemp, K., Gray, E., Hares, K., Mallam, E., Scolding, N., & Wilkins, A. (2012). Changes in expression of the antioxidant enzyme SOD3 occur upon differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells Dev*, *21*(11), 2026-2035. doi: 10.1089/scd.2011.0516
- Niimura, Y., Poole, L. B., & Massey, V. (1995). Amphibacillus xylanus NADH oxidase and Salmonella typhimurium alkyl-hydroperoxide reductase flavoprotein components show extremely high scavenging activity for both alkyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in the presence of S. typhimurium alkyl-hydroperoxide reductase 22-kDa protein component. *J Biol Chem*, *270*(43), 25645-25650.
- Nimnual, A. S., Taylor, L. J., & Bar-Sagi, D. (2003). Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat Cell Biol*, *5*(3), 236-241. doi: 10.1038/ncb938
- Nishida, Y., Adati, N., Ozawa, R., Maeda, A., Sakaki, Y., & Takeda, T. (2008). Identification and classification of genes regulated by phosphatidylinositol 3-kinase- and TRKB-mediated

- signalling pathways during neuronal differentiation in two subtypes of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *BMC Res Notes*, 1, 95. doi: 10.1186/1756-0500-1-95
- Nitti, M., Furfaro, A. L., Cevasco, C., Traverso, N., Marinari, U. M., Pronzato, M. A., & Domenicotti, C. (2010). PKC delta and NADPH oxidase in retinoic acid-induced neuroblastoma cell differentiation. *Cell Signal*, 22(5), 828-835. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.01.007
- Nitti, M., Furfaro, A. L., Traverso, N., Odetti, P., Storace, D., Cottalasso, D., . . . Domenicotti, C. (2007). PKC delta and NADPH oxidase in AGE-induced neuronal death. *Neurosci Lett*, 416(3), 261-265. doi: 10.1016/j.neulet.2007.02.013
- Nonn, L., Williams, R. R., Erickson, R. P., & Powis, G. (2003). The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol Cell Biol*, 23(3), 916-922.
- Nunez, M. T., Urrutia, P., Mena, N., Aguirre, P., Tapia, V., & Salazar, J. (2012). Iron toxicity in neurodegeneration. *Biometals*, 25(4), 761-776. doi: 10.1007/s10534-012-9523-0
- Oger, E., Marino, D., Guignonis, J. M., Pauly, N., & Puppo, A. (2012). Sulfenylated proteins in the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *J Proteomics*, 75(13), 4102-4113. doi: 10.1016/j.jprot.2012.05.024
- Olguin-Albuerno, M., & Moran, J. (2015). ROS produced by NOX2 control in vitro development of cerebellar granule neurons development. *ASN Neuro*, 7(2). doi: 10.1177/1759091415578712
- Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., 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*, 1(5), 376-386.
- Ono, M., Shitashige, M., Honda, K., Isobe, T., Kuwabara, H., Matsuzuki, H., . . . Yamada, T. (2006). Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 5(7), 1338-1347. doi: 10.1074/mcp.T500039-MCP200
- Oppenheimer, O., Cheung, N. K., & Gerald, W. L. (2007). The RET oncogene is a critical component of transcriptional programs associated with retinoic acid-induced differentiation in neuroblastoma. *Mol Cancer Ther*, 6(4), 1300-1309. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0587
- Ornoy, A., Rand, S. B., & Bischitz, N. (2010). Hyperglycemia and hypoxia are interrelated in their teratogenic mechanism: studies on cultured rat embryos. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 89(2), 106-115. doi: 10.1002/bdrb.20230
- Orsini, F., Migliaccio, E., Moroni, M., Contursi, C., Raker, V. A., Piccini, D., . . . Pelicci, P. G. (2004). The life span determinant p66Shc localizes to mitochondria where it associates with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates trans-membrane potential. *J Biol Chem*, 279(24), 25689-25695. doi: 10.1074/jbc.M401844200
- Oshikawa, J., Urao, N., Kim, H. W., Kaplan, N., Razvi, M., McKinney, R., . . . Ushio-Fukai, M. (2010). Extracellular SOD-derived H₂O₂ promotes VEGF signaling in caveolae/lipid rafts and post-ischemic angiogenesis in mice. *PLoS One*, 5(4), e10189. doi: 10.1371/journal.pone.0010189
- Ostrakhovitch, E. A., & Semenukhin, O. A. (2013). The role of redox environment in neurogenic development. *Arch Biochem Biophys*, 534(1-2), 44-54. doi: 10.1016/j.abb.2012.08.002
- Pace, N. J., & Weerapana, E. (2013). Diverse functional roles of reactive cysteines. *ACS Chem Biol*, 8(2), 283-296. doi: 10.1021/cb3005269
- Paffenholz, R., Bergstrom, R. A., Pasutto, F., Wabnitz, P., Munroe, R. J., Jagla, W., . . . Bergstrom, D. E. (2004). Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev*, 18(5), 486-491. doi: 10.1101/gad.1172504
- Pak, E. J., Son, G. D., & Yoo, B. S. (2014). Cadmium inhibits neurite outgrowth in differentiating human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Int J Toxicol*, 33(5), 412-418. doi: 10.1177/1091581814550338
- Pal, R., Basu Thakur, P., Li, S., Minard, C., & Rodney, G. G. (2013). Real-time imaging of NADPH oxidase activity in living cells using a novel fluorescent protein reporter. *PLoS One*, 8(5), e63989. doi: 10.1371/journal.pone.0063989

- Pal, R., Monroe, T. O., Palmieri, M., Sardiello, M., & Rodney, G. G. (2014). Rotenone induces neurotoxicity through Rac1-dependent activation of NADPH oxidase in SHSY-5Y cells. *FEBS Lett*, 588(3), 472-481. doi: 10.1016/j.febslet.2013.12.011
- Park, C. M., Macinkovic, I., Filipovic, M. R., & Xian, M. (2015). Use of the "tag-switch" method for the detection of protein S-sulfhydration. *Methods Enzymol*, 555, 39-56. doi: 10.1016/bs.mie.2014.11.033
- Park, S. J., Kim, Y. T., & Jeon, Y. J. (2012). Antioxidant dieckol downregulates the Rac1/ROS signaling pathway and inhibits Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-family verprolin-homologous protein 2 (WAVE2)-mediated invasive migration of B16 mouse melanoma cells. *Mol Cells*, 33(4), 363-369. doi: 10.1007/s10059-012-2285-2
- Park, U. H., Han, H. S., Um, E., An, X. H., Kim, E. J., & Um, S. J. (2009). Redox regulation of transcriptional activity of retinoic acid receptor by thioredoxin glutathione reductase (TGR). *Biochem Biophys Res Commun*, 390(2), 241-246. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.09.097
- Pasquali, M. A., Gelain, D. P., Zanotto-Filho, A., de Souza, L. F., de Oliveira, R. B., Klamt, F., & Moreira, J. C. (2008). Retinol and retinoic acid modulate catalase activity in Sertoli cells by distinct and gene expression-independent mechanisms. *Toxicol In Vitro*, 22(5), 1177-1183. doi: 10.1016/j.tiv.2008.03.007
- Patrone, G., Puliti, A., Bocciardi, R., Ravazzolo, R., & Romeo, G. (1997). Sequence and characterisation of the RET proto-oncogene 5' flanking region: analysis of retinoic acid responsiveness at the transcriptional level. *FEBS Lett*, 419(1), 76-82.
- Paulech, J., Solis, N., Edwards, A. V., Puckeridge, M., White, M. Y., & Cordwell, S. J. (2013). Large-scale capture of peptides containing reversibly oxidized cysteines by thiol-disulfide exchange applied to the myocardial redox proteome. *Anal Chem*, 85(7), 3774-3780. doi: 10.1021/ac400166e
- Paulsen, C. E., & Carroll, K. S. (2013). Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chem Rev*, 113(7), 4633-4679. doi: 10.1021/cr300163e
- Paulsen, C. E., Truong, T. H., Garcia, F. J., Homann, A., Gupta, V., Leonard, S. E., & Carroll, K. S. (2012). Peroxide-dependent sulfenylation of the EGFR catalytic site enhances kinase activity. *Nat Chem Biol*, 8(1), 57-64. doi: 10.1038/nchembio.736
- Peng, X., Qin, Z., Zhang, G., Guo, Y., & Huang, J. (2015). Integration of the proteome and transcriptome reveals multiple levels of gene regulation in the rice dl2 mutant. *Front Plant Sci*, 6, 351. doi: 10.3389/fpls.2015.00351
- Perez Estrada, C., Covacu, R., Sankavaram, S. R., Svensson, M., & Brundin, L. (2014). Oxidative stress increases neurogenesis and oligodendrogenesis in adult neural progenitor cells. *Stem Cells Dev*, 23(19), 2311-2327. doi: 10.1089/scd.2013.0452
- Peskin, A. V., Low, F. M., Paton, L. N., Maghzal, G. J., Hampton, M. B., & Winterbourn, C. C. (2007). The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. *J Biol Chem*, 282(16), 11885-11892. doi: 10.1074/jbc.M700339200
- Pinkus, R., Weiner, L. M., & Daniel, V. (1996). Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression. *J Biol Chem*, 271(23), 13422-13429.
- Pitt, A., Mayorga, L. S., Stahl, P. D., & Schwartz, A. L. (1992). Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J Clin Invest*, 90(5), 1978-1983. doi: 10.1172/JCI116077
- Poole, L. B. (2005). Bacterial defenses against oxidants: mechanistic features of cysteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases. *Arch Biochem Biophys*, 433(1), 240-254. doi: 10.1016/j.abb.2004.09.006
- Poole, L. B. (2015). The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radic Biol Med*, 80, 148-157. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.013
- Poole, L. B., Klomsiri, C., Knaggs, S. A., Furdui, C. M., Nelson, K. J., Thomas, M. J., . . . King, S. B. (2007). Fluorescent and affinity-based tools to detect cysteine sulfenic acid formation in proteins. *Bioconjug Chem*, 18(6), 2004-2017.

- Poole, L. B., Reynolds, C. M., Wood, Z. A., Karplus, P. A., Ellis, H. R., & Li Calzi, M. (2000). AhpF and other NADH:peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low Mr thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*, 267(20), 6126-6133.
- Pope, B. J., Zierler-Gould, K. M., Kuhne, R., Weeds, A. G., & Ball, L. J. (2004). Solution structure of human cofilin: actin binding, pH sensitivity, and relationship to actin-depolymerizing factor. *J Biol Chem*, 279(6), 4840-4848. doi: 10.1074/jbc.M310148200
- Pozzi, S., Rossetti, S., Bistulfi, G., & Sacchi, N. (2006). RAR-mediated epigenetic control of the cytochrome P450 Cyp26a1 in embryocarcinoma cells. *Oncogene*, 25(9), 1400-1407. doi: 10.1038/sj.onc.1209173
- Prosser, B. L., Ward, C. W., & Lederer, W. J. (2011). X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science*, 333(6048), 1440-1445. doi: 10.1126/science.1202768
- Prozorovski, T., Schulze-Topphoff, U., Glumm, R., Baumgart, J., Schroter, F., Ninnemann, O., . . . Aktas, O. (2008). Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors. *Nat Cell Biol*, 10(4), 385-394. doi: 10.1038/ncb1700
- Qiao, J., Paul, P., Lee, S., Qiao, L., Josifi, E., Tiao, J. R., & Chung, D. H. (2012). PI3K/AKT and ERK regulate retinoic acid-induced neuroblastoma cellular differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 424(3), 421-426. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.125
- Qiao, S., Fan, K., Iwashita, T., Ichihara, M., Yoshino, M., & Takahashi, M. (2014). The involvement of reactive oxygen species derived from NADPH oxidase-1 activation on the constitutive tyrosine auto-phosphorylation of RET proteins. *Free Radic Res*, 48(4), 427-434. doi: 10.3109/10715762.2014.884278
- Qu, J., Liu, G. H., Huang, B., & Chen, C. (2007). Nitric oxide controls nuclear export of APE1/Ref-1 through S-nitrosation of cysteines 93 and 310. *Nucleic Acids Res*, 35(8), 2522-2532. doi: 10.1093/nar/gkl1163
- Quadrato, G., & Di Giovanni, S. (2013). Waking up the sleepers: shared transcriptional pathways in axonal regeneration and neurogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 70(6), 993-1007. doi: 10.1007/s00018-012-1099-x
- Quinta, H. R., Wilson, C., Blidner, A. G., Gonzalez-Billault, C., Pasquini, L. A., Rabinovich, G. A., & Pasquini, J. M. (2016). Ligand-mediated Galectin-1 endocytosis prevents intraneural H2O2 production promoting F-actin dynamics reactivation and axonal re-growth. *Exp Neurol*, 283(Pt A), 165-178. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.06.009
- Rhee, S. G. (2006). Cell signaling. H2O2, a necessary evil for cell signaling. *Science*, 312(5782), 1882-1883. doi: 10.1126/science.1130481
- Rhee, S. G., Kang, S. W., Chang, T. S., Jeong, W., & Kim, K. (2001). Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life*, 52(1-2), 35-41. doi: 10.1080/15216540252774748
- Rhee, S. S., & Burke, D. H. (2004). Tris(2-carboxyethyl)phosphine stabilization of RNA: comparison with dithiothreitol for use with nucleic acid and thiophosphoryl chemistry. *Anal Biochem*, 325(1), 137-143.
- Ridley, A. J. (2015). Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 36, 103-112. doi: 10.1016/j.ceb.2015.08.005
- Rieger, S., & Sagasti, A. (2011). Hydrogen peroxide promotes injury-induced peripheral sensory axon regeneration in the zebrafish skin. *PLoS Biol*, 9(5), e1000621. doi: 10.1371/journal.pbio.1000621
- Riganti, C., Gazzano, E., Polimeni, M., Costamagna, C., Bosia, A., & Ghigo, D. (2004). Diphenyleneiodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress. *J Biol Chem*, 279(46), 47726-47731. doi: 10.1074/jbc.M406314200
- Roberts, P. J., Mitin, N., Keller, P. J., Chenette, E. J., Madigan, J. P., Currin, R. O., . . . Der, C. J. (2008). Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *J Biol Chem*, 283(37), 25150-25163. doi: 10.1074/jbc.M800882200
- Romand, R., Sapin, V., Ghyselinck, N. B., Avan, P., Le Calvez, S., Dolle, P., . . . Mark, M. (2000). Spatio-temporal distribution of cellular retinoid binding protein gene transcripts in the developing and the adult cochlea. Morphological and functional consequences in CRABP- and CRBPI-null mutant mice. *Eur J Neurosci*, 12(8), 2793-2804.

- Ross, A. C., & Zolfaghari, R. (2011). Cytochrome P450s in the regulation of cellular retinoic acid metabolism. *Annu Rev Nutr*, 31, 65-87. doi: 10.1146/annurev-nutr-072610-145127
- Ross, R. A., Spengler, B. A., & Biedler, J. L. (1983). Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst*, 71(4), 741-747.
- Ruberte, E., Dolle, P., Chambon, P., & Morriss-Kay, G. (1991). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. II. Their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos. *Development*, 111(1), 45-60.
- Sadowska, A. M. (2012). N-Acetylcysteine mucolysis in the management of chronic obstructive pulmonary disease. *Ther Adv Respir Dis*, 6(3), 127-135. doi: 10.1177/1753465812437563
- Sakai, J., Li, J., Subramanian, K. K., Mondal, S., Bajrami, B., Hattori, H., . . . Luo, H. R. (2012). Reactive oxygen species-induced actin glutathionylation controls actin dynamics in neutrophils. *Immunity*, 37(6), 1037-1049. doi: 10.1016/j.immuni.2012.08.017
- Salsbury, F. R., Jr., Knutson, S. T., Poole, L. B., & Fetrow, J. S. (2008). Functional site profiling and electrostatic analysis of cysteines modifiable to cysteine sulfenic acid. *Protein Sci*, 17(2), 299-312. doi: 10.1110/ps.073096508
- Samarut, E., & Rochette-Egly, C. (2012). Nuclear retinoic acid receptors: conductors of the retinoic acid symphony during development. *Mol Cell Endocrinol*, 348(2), 348-360. doi: 10.1016/j.mce.2011.03.025
- Schaller, B., Andres, R. H., Huber, A. W., Meyer, M., Perez-Bouza, A., Ducray, A. D., . . . Widmer, H. R. (2005). Effect of GDNF on differentiation of cultured ventral mesencephalic dopaminergic and non-dopaminergic calretinin-expressing neurons. *Brain Res*, 1036(1-2), 163-172. doi: 10.1016/j.brainres.2004.12.054
- Schilling, T. F., Nie, Q., & Lander, A. D. (2012). Dynamics and precision in retinoic acid morphogen gradients. *Curr Opin Genet Dev*, 22(6), 562-569. doi: 10.1016/j.gde.2012.11.012
- Schneider, L., Giordano, S., Zelickson, B. R., M, S. J., G, A. B., Ouyang, X., . . . Zhang, J. (2011). Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 51(11), 2007-2017. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.030
- Schulte, B., John, I., Simon, B., Brockmann, C., Oelmeier, S. A., Jahraus, B., . . . Samstag, Y. (2013). A reducing milieu renders cofilin insensitive to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) inhibition. *J Biol Chem*, 288(41), 29430-29439. doi: 10.1074/jbc.M113.479766
- Schuppe, I., Moldeus, P., & Cotgreave, I. A. (1992). Protein-specific S-thiolation in human endothelial cells during oxidative stress. *Biochem Pharmacol*, 44(9), 1757-1764.
- Segouffin-Cariou, C., & Billaud, M. (2000). Transforming ability of MEN2A-RET requires activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway. *J Biol Chem*, 275(5), 3568-3576.
- Seo, M. S., Kang, S. W., Kim, K., Baines, I. C., Lee, T. H., & Rhee, S. G. (2000). Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem*, 275(27), 20346-20354. doi: 10.1074/jbc.M001943200
- Serrander, L., Cartier, L., Bedard, K., Banfi, B., Lardy, B., Plastre, O., . . . Krause, K. H. (2007). NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem J*, 406(1), 105-114. doi: 10.1042/BJ20061903
- Shaw, N., Elholm, M., & Noy, N. (2003). Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Biol Chem*, 278(43), 41589-41592. doi: 10.1074/jbc.C300368200
- Shoshan-Barmatz, V., Nahon-Crystal, E., Shteinfein-Kuzmine, A., & Gupta, R. (2018). VDAC1, Mitochondrial Dysfunction, and Alzheimer's disease. *Pharmacol Res*. doi: 10.1016/j.phrs.2018.03.010
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol*, 11, 613-619. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035
- Silva, J. C., Denny, R., Dorschel, C. A., Gorenstein, M., Kass, I. J., Li, G. Z., . . . Geromanos, S. (2005). Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Anal Chem*, 77(7), 2187-2200. doi: 10.1021/ac048455k

- Silvis, A. M., McCormick, M. L., Spitz, D. R., & Kiningham, K. K. (2016). Redox balance influences differentiation status of neuroblastoma in the presence of all-trans retinoic acid. *Redox Biol*, 7, 88-96. doi: 10.1016/j.redox.2015.11.012
- Singh, B., & Bhat, H. K. (2012). Superoxide dismutase 3 is induced by antioxidants, inhibits oxidative DNA damage and is associated with inhibition of estrogen-induced breast cancer. *Carcinogenesis*, 33(12), 2601-2610. doi: 10.1093/carcin/bgs300
- Sitek, B., Apostolov, O., Stuhler, K., Pfeiffer, K., Meyer, H. E., Eggert, A., & Schramm, A. (2005). Identification of dynamic proteome changes upon ligand activation of Trk-receptors using two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 4(3), 291-299. doi: 10.1074/mcp.M400188-MCP200
- Snel, B., Lehmann, G., Bork, P., & Huynen, M. A. (2000). STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Res*, 28(18), 3442-3444.
- Soba, P., Han, C., Zheng, Y., Perea, D., Miguel-Aliaga, I., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2015). The Ret receptor regulates sensory neuron dendrite growth and integrin mediated adhesion. *Elife*, 4. doi: 10.7554/eLife.05491
- Sobotta, M. C., Liou, W., Stocker, S., Talwar, D., Oehler, M., Ruppert, T., . . . Dick, T. P. (2015). Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. *Nat Chem Biol*, 11(1), 64-70. doi: 10.1038/nchembio.1695
- Sommer, A., & Traut, R. R. (1974). Diagonal polyacrylamide-dodecyl sulfate gel electrophoresis for the identification of ribosomal proteins crosslinked with methyl-4-mercaptobutyrimidate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(10), 3946-3950.
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roeback, S. J., & Brand, M. D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*, 277(47), 44784-44790. doi: 10.1074/jbc.M207217200
- Stramer, B., & Mayor, R. (2016). Mechanisms and in vivo functions of contact inhibition of locomotion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. doi: 10.1038/nrm.2016.118
- Sun, B., & Fukuhara, M. (1997). Effects of co-administration of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole and flavonoids on the activation of mutagens and drug-metabolizing enzymes in mice. *Toxicology*, 122(1-2), 61-72.
- Sun, J., Morgan, M., Shen, R. F., Steenbergen, C., & Murphy, E. (2007). Preconditioning results in S-nitrosylation of proteins involved in regulation of mitochondrial energetics and calcium transport. *Circ Res*, 101(11), 1155-1163. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.155879
- Sun, J., & Murphy, E. (2010). Protein S-nitrosylation and cardioprotection. *Circ Res*, 106(2), 285-296. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.209452
- Sun, L., Shukair, S., Naik, T. J., Moazed, F., & Ardehali, H. (2008). Glucose phosphorylation and mitochondrial binding are required for the protective effects of hexokinases I and II. *Mol Cell Biol*, 28(3), 1007-1017. doi: 10.1128/MCB.00224-07
- Sundaresan, M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Irani, K., & Finkel, T. (1995). Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, 270(5234), 296-299.
- Symons, M., Derry, J. M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., . . . Abo, A. (1996). Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell*, 84(5), 723-734.
- t Hart, B. A., Simons, J. M., Knaan-Shanzer, S., Bakker, N. P., & Labadie, R. P. (1990). Antiarthritic activity of the newly developed neutrophil oxidative burst antagonist apocynin. *Free Radic Biol Med*, 9(2), 127-131.
- Tan, N. S., Michalik, L., Desvergne, B., & Wahli, W. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor-beta as a target for wound healing drugs. *Expert Opin Ther Targets*, 8(1), 39-48. doi: 10.1517/14728222.8.1.39
- Teppola, H., Sarkanen, J. R., Jalonen, T. O., & Linne, M. L. (2016). Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol. *Neurochem Res*, 41(4), 731-747. doi: 10.1007/s11064-015-1743-6

- Terman, J. R., & Kashina, A. (2013). Post-translational modification and regulation of actin. *Curr Opin Cell Biol*, 25(1), 30-38. doi: 10.1016/j.ceb.2012.10.009
- Thompson, A., Schafer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., . . . Hamon, C. (2003). Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem*, 75(8), 1895-1904.
- Touyz, R. M. (2008). Apocynin, NADPH oxidase, and vascular cells: a complex matter. *Hypertension*, 51(2), 172-174. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.103200
- Townsend, D. M., Manevich, Y., He, L., Xiong, Y., Bowers, R. R., Jr., Hutchens, S., & Tew, K. D. (2009). Nitrosative stress-induced s-glutathionylation of protein disulfide isomerase leads to activation of the unfolded protein response. *Cancer Res*, 69(19), 7626-7634. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0493
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Nilsa, R. D., & Huang, P. (2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*, 10(8), 1343-1374. doi: 10.1089/ars.2007.1957
- Tu, B. P., Ho-Schleyer, S. C., Travers, K. J., & Weissman, J. S. (2000). Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science*, 290(5496), 1571-1574.
- Tyler, D. D. (1975). Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem J*, 147(3), 493-504.
- Ueyama, T., Geiszt, M., & Leto, T. L. (2006). Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Mol Cell Biol*, 26(6), 2160-2174. doi: 10.1128/MCB.26.6.2160-2174.2006
- Varjosalo, M., Sacco, R., Stukalov, A., van Droogen, A., Planyavsky, M., Hauri, S., . . . Superti-Furga, G. (2013). Interlaboratory reproducibility of large-scale human protein-complex analysis by standardized AP-MS. *Nat Methods*, 10(4), 307-314. doi: 10.1038/nmeth.2400
- Victor, V. M., Rocha, M., Banuls, C., Bellod, L., & Hernandez-Mijares, A. (2011). Mitochondrial dysfunction and targeted drugs: a focus on diabetes. *Curr Pharm Des*, 17(20), 1986-2001.
- Vieira, H. L., Alves, P. M., & Vercelli, A. (2011). Modulation of neuronal stem cell differentiation by hypoxia and reactive oxygen species. *Prog Neurobiol*, 93(3), 444-455. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.01.007
- Wagner, B. A., Venkataraman, S., & Buettner, G. R. (2011). The rate of oxygen utilization by cells. *Free Radic Biol Med*, 51(3), 700-712. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.024
- Wagner, E., Luche, S., Penna, L., Chevallet, M., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., & Rabilloud, T. (2002). A method for detection of overoxidation of cysteines: peroxiredoxins are oxidized in vivo at the active-site cysteine during oxidative stress. *Biochem J*, 366(Pt 3), 777-785. doi: 10.1042/BJ20020525
- Wall, S. B., Oh, J. Y., Diers, A. R., & Landar, A. (2012). Oxidative modification of proteins: an emerging mechanism of cell signaling. *Front Physiol*, 3, 369. doi: 10.3389/fphys.2012.00369
- Wang, S. B., Murray, C. I., Chung, H. S., & Van Eyk, J. E. (2013). Redox regulation of mitochondrial ATP synthase. *Trends Cardiovasc Med*, 23(1), 14-18. doi: 10.1016/j.tcm.2012.08.005
- Wani, R., Qian, J., Yin, L., Bechtold, E., King, S. B., Poole, L. B., . . . Furdui, C. M. (2011). Isoform-specific regulation of Akt by PDGF-induced reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(26), 10550-10555.
- Warburg, O. (1910). Über die Oxydationen in lebenden Zellen nach Versuchen am Seeigeelei. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 66(4-6), 305-340.
- Wartiovaara, K., Barnabe-Heider, F., Miller, F. D., & Kaplan, D. R. (2002). N-myc promotes survival and induces S-phase entry of postmitotic sympathetic neurons. *J Neurosci*, 22(3), 815-824.
- Weerapana, E., Wang, C., Simon, G. M., Richter, F., Khare, S., Dillon, M. B., . . . Cravatt, B. F. (2010). Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature*, 468(7325), 790-795. doi: 10.1038/nature09472
- Wefers, H., Komai, T., Talalay, P., & Sies, H. (1984). Protection against reactive oxygen species by NAD(P)H: quinone reductase induced by the dietary antioxidant butylated hydroxyanisole (BHA). Decreased hepatic low-level chemiluminescence during quinone redox cycling. *FEBS Lett*, 169(1), 63-66.

- Weiss, H. M. (2008). Appreciating Oxygen. *Journal of Chemical Education*, 85(9), 1218. doi: 10.1021/ed085p1218
- Wen, J. W., Hwang, J. T., & Kelly, G. M. (2012). Reactive oxygen species and Wnt signalling crosstalk patterns mouse extraembryonic endoderm. *Cell Signal*, 24(12), 2337-2348. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.07.024
- West, M. B., Hill, B. G., Xuan, Y. T., & Bhatnagar, A. (2006). Protein glutathiolation by nitric oxide: an intracellular mechanism regulating redox protein modification. *FASEB J*, 20(10), 1715-1717. doi: 10.1096/fj.06-5843fje
- Weyemi, U., Lagente-Chevallier, O., Boufraquech, M., Prenois, F., Courtin, F., Caillou, B., . . . Dupuy, C. (2012). ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence. *Oncogene*, 31(9), 1117-1129. doi: 10.1038/onc.2011.327
- White, R. J., Nie, Q., Lander, A. D., & Schilling, T. F. (2007). Complex regulation of cyp26a1 creates a robust retinoic acid gradient in the zebrafish embryo. *PLoS Biol*, 5(11), e304. doi: 10.1371/journal.pbio.0050304
- Wiederschain, G. Y. (2011). The Molecular Probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies. *Biochemistry Moscow*, 76(11), 1276. doi: <https://doi.org/10.1134/S0006297911110101>
- Williams, C. H., Arcsott, L. D., Muller, S., Lennon, B. W., Ludwig, M. L., Wang, P. F., . . . Schirmer, R. H. (2000). Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *Eur J Biochem*, 267(20), 6110-6117.
- Williams, C. H. J. (1992). *Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase, and mercuric ion reductase – a family of flavoenzyme transhydrogenases* (F. Müller Ed.): Boca Raton : CRC Press.
- Wilson, C., & Gonzalez-Billault, C. (2015). Regulation of cytoskeletal dynamics by redox signaling and oxidative stress: implications for neuronal development and trafficking. *Front Cell Neurosci*, 9, 381. doi: 10.3389/fncel.2015.00381
- Wilson, C., Munoz-Palma, E., & Gonzalez-Billault, C. (2018). From birth to death: A role for reactive oxygen species in neuronal development. *Semin Cell Dev Biol*, 80, 43-49. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.09.012
- Wilson, C., Munoz-Palma, E., Henriquez, D. R., Palmisano, I., Nunez, M. T., Di Giovanni, S., & Gonzalez-Billault, C. (2016). A Feed-Forward Mechanism Involving the NOX Complex and RyR-Mediated Ca²⁺ Release During Axonal Specification. *J Neurosci*, 36(43), 11107-11119. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1455-16.2016
- Wilson, C., Nunez, M. T., & Gonzalez-Billault, C. (2015). Contribution of NADPH oxidase to the establishment of hippocampal neuronal polarity in culture. *J Cell Sci*, 128(16), 2989-2995. doi: 10.1242/jcs.168567
- Winterbourn, C. C., & Hampton, M. B. (2008). Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med*, 45(5), 549-561. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004
- Winterbourn, C. C., Hampton, M. B., Livesey, J. H., & Kettle, A. J. (2006). Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *J Biol Chem*, 281(52), 39860-39869. doi: 10.1074/jbc.M605898200
- Winterbourn, C. C., & Kettle, A. J. (2013). Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal*, 18(6), 642-660. doi: 10.1089/ars.2012.4827
- Winterbourn, C. C., & Metodiewa, D. (1999). Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*, 27(3-4), 322-328.
- Woo, H. A., Chae, H. Z., Hwang, S. C., Yang, K. S., Kang, S. W., Kim, K., & Rhee, S. G. (2003). Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science*, 300(5619), 653-656. doi: 10.1126/science.1080273
- Wood, S. T., Long, D. L., Reisz, J. A., Yammani, R. R., Burke, E. A., Klomsiri, C., . . . Loeser, R. F. (2016). Cysteine-Mediated Redox Regulation of Cell Signaling in Chondrocytes Stimulated With Fibronectin Fragments. *Arthritis Rheumatol*, 68(1), 117-126. doi: 10.1002/art.39326

- Wood, Z. A., Poole, L. B., & Karplus, P. A. (2003). Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*, *300*(5619), 650-653. doi: 10.1126/science.1080405
- Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J., & Poole, L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*, *28*(1), 32-40.
- Wu, R. F., Xu, Y. C., Ma, Z., Nwariaku, F. E., Sarosi, G. A., Jr., & Terada, L. S. (2005). Subcellular targeting of oxidants during endothelial cell migration. *J Cell Biol*, *171*(5), 893-904. doi: 10.1083/jcb.200507004
- Yamada, S., Uchimura, E., Ueda, T., Nomura, T., Fujita, S., Matsumoto, K., . . . Miyake, J. (2007). Identification of twinfilin-2 as a factor involved in neurite outgrowth by RNAi-based screen. *Biochem Biophys Res Commun*, *363*(4), 926-930. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.09.069
- Yang, J., Gupta, V., Carroll, K. S., & Liebler, D. C. (2014). Site-specific mapping and quantification of protein S-sulphenylation in cells. *Nat Commun*, *5*, 4776. doi: 10.1038/ncomms5776
- Yang, J., Gupta, V., Tallman, K. A., Porter, N. A., Carroll, K. S., & Liebler, D. C. (2015). Global, in situ, site-specific analysis of protein S-sulphenylation. *Nat Protoc*, *10*(7), 1022-1037.
- Yang, L., Duan, Z., Liu, X., & Yuan, Y. (2018). N-acetyl-L-cysteine ameliorates the PM2.5-induced oxidative stress by regulating SIRT-1 in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*, *57*, 70-75. doi: 10.1016/j.etap.2017.11.011
- Yang, W. S., SriRamaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., . . . Stockwell, B. R. (2014). Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, *156*(1-2), 317-331. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.010
- Yang, Z., & Attygalle, A. B. (2007). LC/MS characterization of undesired products formed during iodoacetamide derivatization of sulfhydryl groups of peptides. *J Mass Spectrom*, *42*(2), 233-243. doi: 10.1002/jms.1157
- Yano, H., Wong, J. H., Lee, Y. M., Cho, M. J., & Buchanan, B. B. (2001). A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(8), 4794-4799. doi: 10.1073/pnas.071041998
- Yao, X., Freas, A., Ramirez, J., Demirev, P. A., & Fenselau, C. (2001). Proteolytic 18O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus. *Anal Chem*, *73*(13), 2836-2842.
- Ye, Z. W., Zhang, J., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2015). Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochim Biophys Acta*, *1850*(8), 1607-1621. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.11.010
- Zander, T., Phadke, N. D., & Bardwell, J. C. (1998). Disulfide bond catalysts in Escherichia coli. *Methods Enzymol*, *290*, 59-74.
- Zanotto-Filho, A., Cammarota, M., Gelain, D. P., Oliveira, R. B., Delgado-Canedo, A., Dalmolin, R. J., . . . Moreira, J. C. (2008). Retinoic acid induces apoptosis by a non-classical mechanism of ERK1/2 activation. *Toxicol In Vitro*, *22*(5), 1205-1212. doi: 10.1016/j.tiv.2008.04.001
- Zee, R. S., Yoo, C. B., Pimentel, D. R., Perlman, D. H., Burgoyne, J. R., Hou, X., . . . Bachschmid, M. M. (2010). Redox regulation of sirtuin-1 by S-glutathiolation. *Antioxid Redox Signal*, *13*(7), 1023-1032. doi: 10.1089/ars.2010.3251
- Zhang, C., Baudino, T. A., Dowd, D. R., Tokumaru, H., Wang, W., & MacDonald, P. N. (2001). Ternary complexes and cooperative interplay between NCoA-62/Ski-interacting protein and steroid receptor coactivators in vitamin D receptor-mediated transcription. *J Biol Chem*, *276*(44), 40614-40620. doi: 10.1074/jbc.M106263200
- Zhang, D., Macinkovic, I., Devarie-Baez, N. O., Pan, J., Park, C. M., Carroll, K. S., . . . Xian, M. (2014). Detection of protein S-sulphydration by a tag-switch technique. *Angew Chem Int Ed Engl*, *53*(2), 575-581. doi: 10.1002/anie.201305876
- Zhang, X., Ren, X., Zhang, Q., Li, Z., Ma, S., Bao, J., . . . Ji, J. (2016). PGC-1alpha/ERRalpha-Sirt3 Pathway Regulates DAergic Neuronal Death by Directly Deacetylating SOD2 and ATP Synthase beta. *Antioxid Redox Signal*, *24*(6), 312-328. doi: 10.1089/ars.2015.6403
- Zhang, Y., Du, Y., Le, W., Wang, K., Kieffer, N., & Zhang, J. (2011). Redox control of the survival of healthy and diseased cells. *Antioxid Redox Signal*, *15*(11), 2867-2908. doi: 10.1089/ars.2010.3685

- Zhao, X., Jin, Y., Yang, L., Hou, Z., Liu, Y., Sun, T., . . . Chen, G. (2018). Promotion of SIRT1 protein degradation and lower SIRT1 gene expression via reactive oxygen species is involved in Sb-induced apoptosis in BEAS-2b cells. *Toxicol Lett*, 296, 73-81. doi: 10.1016/j.toxlet.2018.07.047
- Zhu, S., Guleria, R. S., Thomas, C. M., Roth, A., Gerilechaogetu, F., Kumar, R., . . . Pan, J. (2016). Loss of myocardial retinoic acid receptor alpha induces diastolic dysfunction by promoting intracellular oxidative stress and calcium mishandling in adult mice. *J Mol Cell Cardiol*, 99, 100-112. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.08.009

Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Kai Stühler für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die hilfreichen Diskussionen.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Dieter Willbold für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit.

Besonderer Dank gilt Dr. Gereon Poschmann, für die zahl- und lehrreichen Diskussionen, die wertvollen Ratschlägen, die Gelassenheit während diverser Wutausbrüche und das unermessliche Verständnis in schwierigen Situationen.

Eva Bruns gilt ein tausendfaches Dankeschön, für ihre Unterstützung im Labor und ihre gute Seele. Anja Stefanski für ihre hilfreichen Ratschläge, die nicht nur wissenschaftlicher Natur waren, Leonie Grube, Nina Schmidt, und Marion Gehrke für die tolle und selbstlose technische Hilfe. Ein besonderer Dank geht natürlich auch an meine anderen Kollegen des Molecular Proteomics Laboratory Daniel Waldera-Lupa, Mareike Brocksieper, Nina Overbeck, Jessica Schira, Maike Langini, Omid Etemad-Parishanzadeh, Christin Hafermann und Falk Baberg. Die Zusammenarbeit mit euch hat mir großen Spaß gemacht.

Lieben Dank an meinen großartigen Bruder Philipp, der mich immer unterstützt und motiviert hat!

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Schwiegereltern Gisela und Heinz-Willi sowie meinen lieben Freundinnen, insbesondere bei Agnes, Nora, Sarah und Lisa. Ihr seid klasse und hellt meine Stimmung auf.

Mein besonders herzliches Dankeschön gilt Julian Brenig, für seine liebevolle und grenzenlose Unterstützung. Dafür, dass du dich um das wichtigste gekümmert hast, wenn ich arbeiten musste. Ich liebe Dich.

Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Arbeit wurde bei keiner anderen Institution vorgelegt. Außerdem habe ich bisher keine erfolglosen oder erfolgreichen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf,