

Charakterisierung des Redox-Proteoms der murinen C2C12 Skelettmuskelzelllinie

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Leonie Nora Grube
aus Velbert

Düsseldorf, Juni 2019

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

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Kai Stühler
2. Prof. Dr. Mathias Beller

Tag der mündlichen Prüfung: 10. September 2019

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Leonie Grube, Rafael Dellen, Fabian Kruse, Holger Schwender, Kai Stühler, Gereon Poschmann:
Mining the Secretome of C2C12 Muscle Cells: Data Dependent Experimental Approach To Analyze Protein Secretion Using Label-Free Quantification and Peptide Based Analysis. J Proteome Res, 2018. **17**(2): p. 879-890.

Für meine Familie

*„Man braucht nichts im Leben zu fürchten,
man muss nur alles verstehen.“*

Marie Curie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Summary	iii
1. Einleitung	1
1.1 Die Bedeutung von zellulären Redoxprozessen	1
1.2 Entstehung und Funktion von reaktiven Sauerstoffspezies	2
1.3 Redox-induzierte oxidative posttranslationale Cysteinmodifikationen	4
1.4 Die Skelettmuskulatur als redox-aktives metabolisches Organ.....	6
1.5 Die Funktion des Skelettmuskels als aktiv endokrines Organ.....	9
1.6 Murine Skelettmuskelzellen als Modellsystem für die Untersuchung redox-abhängiger Prozesse	14
1.7 Charakterisierung von Skelettmuskelzellen mittels Proteomanalyse	15
1.7.1 Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie.....	16
1.7.2 Analyse von oxidativen Cysteinmodifikationen im zellulären Proteom via Massenspektrometrie	19
1.7.3 Analyse von Zellkulturüberständen via Massenspektrometrie	20
2. Zielsetzung der Arbeit	22
3. Material und Methoden	23
3.1 Materialien.....	23
3.1.1 Geräteliste	23
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	24
3.1.3 Chemikalien	25
3.1.4 Größenstandards.....	27
3.1.5 Antikörper	27
3.1.6 Plasmide und Vektoren	28
3.1.7 Primer.....	28
3.1.8 Puffer, Lösungen und Kulturmedien.....	29
3.1.9 Software	32
3.2 Methoden	32
3.2.1 Molekularbiologische Methoden	32
3.2.1.1 Bakterienstämme	32
3.2.1.2 Herstellung chemokompetenter Zellen.....	33
3.2.1.3 Retransformation	33
3.2.1.4 Transformation	34
3.2.1.5 Vorkultur.....	34

3.2.1.6	Hauptkultur	34
3.2.1.7	Plasmid-DNA-Präparation.....	34
3.2.1.8	DNA-Konzentrationsbestimmung	34
3.2.1.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
3.2.1.10	DNA Restriktionsverdau.....	35
3.2.1.11	DNA Ligation	36
3.2.1.12	Agarose-Gelelektrophorese	37
3.2.1.13	Sequenzierung von DNA	37
3.2.1.14	Mutagenese	37
3.2.1.15	Bakterielle Expression und Aufreinigung des Zielproteins Mif.....	39
3.2.2	Zellbiologische Methoden.....	40
3.2.2.1	Zellkultur	40
3.2.2.2	Zellkultivierung	41
3.2.2.3	Stabile Zelltransfektion.....	42
3.2.2.4	Kryokonservierung	42
3.2.2.5	Palmitatbehandlung der Zellen	42
3.2.2.6	Bestimmung der Zellviabilität, der Zellzahl und der Transfektionseffizienz	43
3.2.2.7	Bestimmung der zellulären Glukoseaufnahme	43
3.2.2.8	Detektion von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	43
3.2.3	Proteinbiochemische und immunologische Methoden	44
3.2.3.1	Probenvorbereitung für die Proteomanalyse.....	44
3.2.3.2	Probenvorbereitung für die Analyse von reversiblen Cysteinmodifikationen.....	44
3.2.3.3	Probenvorbereitung für die kombinierte Sekretom- und Proteomanalyse.....	45
3.2.3.4	Immunpräzipitation von GFP und GFP-Fusionsproteinen	46
3.2.3.5	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	46
3.2.3.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
3.2.3.7	Silberfärbung	47
3.2.3.8	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen	48
3.2.3.9	<i>Semidry</i> Western Blot und Immunodetektion.....	48
3.2.3.10	India Ink Färbung	49
3.2.3.11	Immunozytochemische Färbung.....	49
3.2.3.12	Mikroskopie.....	50
3.2.3.13	Konfokal Mikroskopie.....	50
3.2.4	LC-MS/MS Analysen	50
3.2.4.1	Probenvorbereitung für die LC-MS/MS Analyse.....	50
3.2.4.2	Reduzieren und alkylieren	50
3.2.4.3	<i>In-Gel</i> Verdau	51

3.2.4.4	Peptidextraktion.....	51
3.2.4.5	Massenspektrometrie.....	51
3.2.4.6	Flüssigkeitschromatographie.....	52
3.2.4.7	Massenspektrometrische Analyse.....	53
3.2.4.8	Bioinformatrische Datenanalyse.....	54
4.	Ergebnisse.....	58
4.1	Palmitat-induzierte Insulinresistenz: Murine Skelettmuskelzellen als Modellsystem für die Untersuchung physiologischer ROS-Effekte.....	58
4.2	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in palmitatbehandelten Myotuben.....	60
4.3	Einfluss der Palmitatbehandlung auf das zelluläre Proteom von C2C12 Skelettmuskelzellen.....	61
4.4	Analyse von redox-induzierten reversiblen Cysteinoxidationen im Proteom von C2C12 Muskelzellen.....	63
4.5	Charakterisierung des sekretorischen Phänotyps von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben.....	67
4.5.1	Weiterführende Sekretomanalyse der palmitatbehandelten C2C12 Myotuben.....	69
4.5.2	Charakterisierung des palmitatinduzierten Sekretoms von C2C12 Myotuben.....	76
4.6	Redox-abhängige Proteinsekretion von C2C12 Myotuben.....	77
4.7	Die Rolle des potentiell redox-sensitiven Proteins Mif in C2C12 Skelettmuskelzellen.....	79
4.7.1	Nachweis von dem Protein Mif in murinen und humanen Zelllinien sowie Geweben der Skelettmuskulatur.....	79
4.7.2	Untersuchung reversibler oxidativer Cysteinmodifikation des Proteins Mif.....	80
4.7.3	Funktionelle Untersuchung der Sekretion von Mif in Abhängigkeit einer Cysteinmutation.....	83
4.7.3.1	Untersuchung der subzelluläre Lokalisation von dem Protein Mif.....	84
4.7.3.2	Der Einfluss der Cysteinreste auf die redox-abhängige Sekretion von Mif.....	85
4.7.4	Interaktionsstudien des GFP-gekoppelten Mif nach Durchführung einer Immunpräzipitation.....	87
5.	Diskussion.....	91
5.1	Methodische Diskussion.....	91
5.1.1	Der Skelettmuskel als Modellsystem zur Analyse des Redox-Proteoms.....	91
5.1.2	Proteomanalyse der Redoxprozesse in C2C12 Myotuben.....	92
5.1.2.1	Proteomanalyse von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben.....	93
5.1.2.2	Identifizierung von redox-sensitiven Proteinen mittels Proteomanalyse.....	93
5.1.3	Untersuchung des sekretorischen Phänotyps von C2C12 Myotuben.....	94
5.2	Biologische Diskussion.....	96
5.2.1	Untersuchung des zellulären Proteoms von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben.....	96

5.2.2	Untersuchung des C2C12 Redox-Proteoms	98
5.2.3	Untersuchung des sekretorischen Phänotyps von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben	99
5.2.4	Untersuchung der Sekretionsmechanismen	101
5.2.4.1	Signalpeptid-vermittelte klassische Proteinsekretion	101
5.2.4.2	Unkonventionelle Proteinsekretion.....	101
5.2.4.3	Proteolytische Abspaltung der Ektodomäne (Ektodomain-Shedding)	102
5.2.5	Identifizierung potentiell redox-abhängig sekretierter Proteine.....	104
5.2.5.1	Validierung des unkonventionell sekretierten redox-sensitiven Proteins Mif.....	106
5.2.5.2	Nachweis von reversiblen oxidativen Cysteinmodifikationen.....	106
5.2.5.3	Untersuchung der redox-abhängigen Sekretion von Mif.....	108
5.2.5.4	Die Rolle der Cysteinreste bei der Sekretion von Mif.....	109
5.2.5.5	Identifizierung potentieller Interaktionspartner von Mif	110
6.	Fazit	112
7.	Literaturverzeichnis	113
8.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	131
9.	Abkürzungsverzeichnis	134
10.	Anhang.....	137
	Abbildungen.....	137
	Tabellen.....	143
	Veröffentlichung	194
	Danksagung.....	195
	Eidesstaatliche Erklärung.....	196

Zusammenfassung

Redoxprozesse spielen bei einer Vielzahl von zellulären Signalwegen eine wichtige Rolle und ermöglichen den Zellen auf unterschiedliche Stimuli zu reagieren. Dabei können reaktive Sauerstoffspezies (ROS) innerhalb der Zelle als Signalmoleküle fungieren, die redox-sensitive Proteine über oxidative posttranslationale Modifikationen (oxPTM) verändern. Da oxPTM regulierend auf die Struktur, Aktivität, Lokalisation und Funktion von Proteinen wirken können, rückte die Untersuchung der oxPTM, insbesondere von reaktiven Cysteinthiolen in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Redox-Proteoms von Skelettmuskelzellen. Dafür wurde das Modellsystem der Palmitatbehandlung von murinen C2C12 Skelettmuskelzellen zur verstärkten Generierung von ROS verwendet.

- Die Untersuchung des Modellsystems bestätigte, dass nach Palmitatbehandlung verstärkt ROS gebildet wurden und die Glukoseaufnahme der Zellen signifikant verringert war.
- Auf Ebene des zellulären Proteoms zeigte eine markierungsfreie massenspektrometrische Analyse, dass von den quantifizierten 2.371 Proteinen 830 nach Palmitatbehandlung einen signifikanten Abundanzunterschied aufwiesen, wobei erhöht abundante Proteine verstärkt mit dem biologischen Prozess der Signaltransduktion assoziiert waren.
- Im Rahmen der Arbeit konnte zudem erfolgreich ein Protokoll zur spezifischen Analyse von reversibel modifizierten Cysteinthiolen im Redox-Proteom von C2C12 Myotuben für die Anreicherung über eine Thiopropyl Sepharose Matrix auf Proteinebene etabliert werden. Über die Charakterisierung des Redox-Proteoms konnten 2.750 Proteine quantifiziert werden, von denen sich 378 als potentiell redox-sensitiv zeigten. Nach Palmitatbehandlung erhöht abundante Proteine können verstärkt mit Proteintransportprozessen, wie etwa der Proteinsekretion, in Zusammenhang gebracht werden.
- Anschließend wurde ergänzend der sekretorische Phänotyp von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben untersucht. Dafür wurde erfolgreich ein Analyseansatz etabliert, mit dem 858 *bona fide* sekretierte Proteine identifiziert wurden, von denen 401 nach Palmitatbehandlung verändert abundant im Sekretom vorlagen. Die bioinformatische Analyse ergab, dass ein Großteil der nach Palmitatbehandlung im Sekretom erhöht abundanten Proteine vermutlich über den Mechanismus der unkonventionellen Proteinsekretion freigesetzt wird, wohingegen klassisch sekretierte Proteine verringert abundant detektiert wurden.
- Die Kombination der Daten des sekretorischen Phänotyps und des Redox-Proteoms führte zur Identifizierung von 28 Proteinen, die potentiell redox-abhängig von C2C12 Skelettmuskelzellen sekretiert werden. Zu dieser Gruppe gehört das Protein Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktor (Mif), das anschließend exemplarisch als Kandidatenprotein für ein redox-abhängig sekretiertes Protein mittels gezielter Cysteinmutation und nachfolgender Sekretions- und Interaktionsanalyse detailliert untersucht wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals mittels proteomanalytischer Methoden redox-sensitive Proteine im Proteom von C2C12 Skelettmuskelzellen erfolgreich identifiziert werden, die Rückschlüsse auf potentiell redox-vermittelte extra- und intrazelluläre Prozesse liefern und möglicherweise dazu beitragen können, die Bedeutung von reversiblen Cysteinoxidationen im Zusammenhang mit fettsäureinduzierten Signalkaskaden und Proteinsekretionsprozessen besser zu verstehen.

Summary

Redox processes are involved in a multitude of cellular signaling pathways and enable cells to respond to different external and internal stimuli. Within the cell reactive oxygen species (ROS) can act as signaling molecules by altering redox-sensitive proteins via oxidative posttranslational modifications (oxPTM). Since oxPTM effect the structure, activity, localization and function of proteins, the investigation of oxPTM at reactive cysteine thiols moved into the focus of research. The aim of this study was to characterize the redox proteome of skeletal muscle cells. For this purpose, the model system of palmitate treated C2C12 skeletal muscle cells was used to increase the generation of ROS.

- Investigation of the model system confirmed a significantly increased ROS level and a decreased glucose uptake of skeletal muscle cells after palmitate treatment.
- Labelfree mass spectrometric analysis of the cellular proteome yielded the quantification of 2.371 proteins whereof 830 showed a significant change in abundance after palmitate treatment. Proteins increased in their abundance are associated with the biological process of signal transduction.
- In addition, a protocol for the specific analysis of reversibly modified cysteine thiols in the redox proteome of C2C12 was successfully established. This protocol is based on enrichment of reversible oxidized cysteines on protein level using a thiopropyl sepharose matrix. This led to the quantification of 2.750 proteins containing 378 potentially redox-sensitive proteins. After palmitate treatment increased abundant proteins are primarily associated with protein transport processes such as protein secretion.
- Subsequently, the secretory phenotype of palmitate treated C2C12 myotubes was analyzed. Therefore, an analytical approach was successfully established and 858 bona fide secreted proteins were identified. 401 of these bona fide secreted proteins showed a significant change in abundance after palmitate treatment. Furthermore, bioinformatic analysis of those bona fide secreted proteins revealed that presumably high abundant proteins are released via the unconventional protein secretion mechanism and low abundant proteins by the classical protein secretion pathway.
- Combining secretory phenotype and redox proteome data revealed the identification of 28 potential redox-dependent secreted proteins. This group includes the protein macrophage migration inhibition factor (Mif). Subsequently, Mif was investigated as an exemplary candidate protein for redox-dependent secretion, using targeted cysteine mutation followed by secretion and interaction analysis.

This work extensively contributes to the identification of redox-sensitive proteins in the proteome of C2C12 skeletal muscle cells using proteome analytical methods. These findings provide information on potentially redox-mediated extra- and intracellular processes and may contribute to a better

understanding of the significance of reversible cysteine oxidations in the context of fatty acid-induced signal cascades and protein secretion processes.

1. Einleitung

1.1 Die Bedeutung von zellulären Redoxprozessen

Im Laufe der vergangenen Jahre hat sich das Bild der reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) als ausschließlich schädliche Substanzen grundlegend verändert, denn sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Konditionen zeigten ROS eine essentielle Funktion für die Homöostase von Zellen und als spezifische zelluläre Signalmoleküle (Finkel und Holbrook, 2000; Shadel und Horvath, 2015). Redoxprozesse spielen eine wichtige Rolle bei unterschiedlichen zellulären Prozessen, denn sie ermöglichen der Zelle, auf endogene und exogene Stimuli zu reagieren (Dawane und Pandit, 2012). Insbesondere die redoxvermittelte Signalweiterleitung ist in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung gerückt. Redoxprozesse, die während des Zellmetabolismus ablaufen, führen zur Bildung von reaktiven Spezies, die wiederum mit einer Vielzahl von Biomolekülen reagieren können, wodurch deren biologische Funktionen oder physikalisch-chemische Eigenschaften verändert werden (Danielson und Andersen, 2008; Jones und Sies, 2015; Ryan *et al.*, 2014). Der Begriff „oxidativer Stress“ wurde erstmals 1985 von H. Sies als ein Zustand definiert, bei dem die Balance zwischen der Bildung und dem Abbau von ROS gestört ist, wodurch das ROS-Level ansteigt (Sies, 1985). Oxidativer Stress kann massive molekulare Zellschäden zur Folge haben. In den vergangenen Jahren veränderte sich die Sichtweise auf ROS, sodass die aktuelle Definition oxidativen Stress eher als eine Störung der ROS-vermittelten Signalweiterleitung und der Zell-Homöostase beschreibt (Sies und Jones, 2007).

Damit keine unerwünschten Veränderungen der Funktion von Biomolekülen durch Oxidation oder Reduktion auftreten, sind streng regulierte Kontrollmechanismen von Redoxprozessen in der Zelle vorhanden. Hierbei beschreibt die Redoxhomöostase das Gleichgewicht zwischen der Bildung und der Eliminierung von reaktiven Spezies (Dawane und Pandit, 2012). Zu den reaktiven Spezies zählen Sauerstoff- (ROS), Stickstoff- (RNS) und Schwefelspezies (RSS). Lange Zeit wurden reaktive Spezies in erster Linie mit der Induktion von zellschädigenden Effekten und der damit einhergehenden Ausbildung von Krankheiten wie Diabetes, Krebs, Arthritis, kardiovaskuläre Erkrankungen und neurodegenerative Erkrankungen assoziiert (Asmat *et al.*, 2016; Bajpai *et al.*, 2016; Dikalov, 2011; Madamanchii *et al.*, 2005). Heute weiß man jedoch, dass reaktive Spezies in Abhängigkeit von ihrer lokalen Konzentration ebenfalls eine wichtige Aufgabe als intrazelluläre Signalmoleküle an zellulären Prozessen, wie der Regulation des Zellwachstums, der Proliferation, der Differenzierung, der Migration und der Apoptose, beteiligt sind und somit möglicherweise eine zusätzliche Rolle bei der Pathogenese der oben genannten Erkrankungen spielen (Covarrubias *et al.*, 2008; Steven *et al.*, 2017).

1.2 Entstehung und Funktion von reaktiven Sauerstoffspezies

Der Begriff reaktive Sauerstoffspezies (ROS) umfasst eine Gruppe bioaktiver Sauerstoffmoleküle, die über ein oder mehrere ungepaarte Elektronen verfügen. Zu der Gruppe der ROS zählen eine Vielzahl freier Radikale wie das hoch reaktive Hydroxyl-Radikal ($\cdot\text{OH}$) und das Superoxid-Anion (O_2^-) sowie molekulare Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$). Einige ROS wie etwa das $^1\text{O}_2$ oder das OH sind extrem reaktiv und haben eine kurze Halbwertszeit (10^{-5} s, 10^{-9} s), wohingegen das H_2O_2 diffusionsfähig ist, eine relativ lange Halbwertszeit von 1 ms aufweist und als Signalmolekül fungiert (Bienert *et al.*, 2006; Sies, 1993). Zu den Stimuli für die ROS-Bildung zählen Ultraviolette- (UV) und ionisierende-Strahlung, Chemotherapeutika, inflammatorische Zytokine und Umwelttoxine (Saccà und Izzotti, 2014). Zudem werden ROS von der Zelle in Mitochondrien, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), in Peroxisomen, im Zytosol, an der Plasmamembran und im Extrazellularraum gebildet (Brown und Borutaite, 2012; Schrader und Fahimi, 2006). Dabei kann zwischen der Bildung von ROS als Nebenprodukt und der Generierung von ROS als Endprodukt unterschieden werden. Für die Entstehung von ROS als Nebenprodukt gelten die Mitochondrien als die Hauptquelle, denn hier werden ROS in der zellulären Atmungskette gebildet (Le Bras *et al.*, 2005). In der Atmungskette wird 1–3 % des gesamten Sauerstoffs nur unvollständig bis zum Superoxidanion-Radikal reduziert, und es entsteht O_2^- . ROS entstehen ebenfalls als Nebenprodukt bei enzymatischen Reaktionen, an denen u.a. Peroxidasen, Xanthin- und Aldehydoxidasen, Cytochrom C Oxidasen, NO-Synthasen, Lipooxygenasen und Cyclooxygenasen beteiligt sind (Dröge, 2002; Paulsen und Carroll, 2013). Zu den Enzymen, die ROS als Endprodukt herstellen, zählen die membrangebundenen NADPH-Oxidase-Komplexe (NOX), die O_2^- generieren, welches spontan oder enzymatisch zu H_2O_2 dismutiert und als Signalmolekül in der Zelle fungiert (Ferreira und Laitano, 2016).

ROS können innerhalb der Zelle mit DNA, Lipiden und Proteinen reagieren und die Funktion dieser Biomoleküle verändern (Stadtman, 2006). ROS werden nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen oder Hormonen induziert und sind an der Transkription von Genen, der De- und Phosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen, dem Schutz der Zelle vor exogenen Stressfaktoren und der Apoptose sowie dem Zellmetabolismus beteiligt (Aljehni *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2010; Circu und Aw, 2010; Natarajan *et al.*, 1998).

Zellen verfügen für die Regulation von ROS und den Erhalt der Redoxhomöostase über unterschiedliche physiologische anti-oxidative Mechanismen (Abbildung 1). Zu der Klasse der enzymatischen Antioxidantien zählen die drei Isoformen der Superoxid-Dismutase (SOD): Kupfer-Zink-SOD, Mangan-SOD und extrazelluläre SOD, die das hoch reaktive $\cdot\text{O}_2$ in H_2O_2 und $^1\text{O}_2$ umwandeln (Alscher *et al.*, 2002). Das Enzym Katalase (CAT) ist in den Peroxisomen lokalisiert und wandelt die H_2O_2 in H_2O und $^1\text{O}_2$ um (Kalyanaraman, 2013; Storr *et al.*, 2013). Eine weitere Klasse bilden Thiol-basierte anti-oxidative Mechanismen. Dazu zählen: Peroxiredoxine (Prdx), Glutaredoxine (Grx) und Thioredoxine (Trx). Trx und Grx werden als generelle Disulfidreduktasen angesehen, die

für den Erhalt der Thiol-Redoxhomöostase eine wichtige Rolle spielen. Prdx und Glutathion Peroxidasen (GPx) sind ubiquitäre Peroxidasen, die hauptsächlich H_2O_2 , Peroxynitrit und Hydroperoxid (ROOH) in der Zelle umsetzen. Prdx sind in der Zelle hoch abundant, besitzen ein redox-sensitives, cysteininhaltiges reaktives Zentrum und sind u.a. im Zytosol, an Membranen und in Mitochondrien lokalisiert (Rhee *et al.*, 2005b). Es sind sechs Isoformen beschrieben (Prdx1-6) (Go und Jones, 2010). Trx sind multifunktionelle Proteine, die das redox-aktive cysteininhaltige Sequenzmotiv CXXC (Cystein-X-X-Cystein) enthalten (Bourdon und Blache 2001). Bei der Reduktion von H_2O_2 zu H_2O wird das redox-aktive Sequenzmotiv selbst oxidiert. Das Enzym Thioredoxinreduktase (TrxR) ermöglicht die Rückgewinnung von oxidiertem Trx durch dessen Reduktion unter Beteiligung von NADPH als Elektronendonator. Neben seiner antioxidativen Wirkung in Zellen und Geweben können Trx an unterschiedliche Proteine binden und dadurch deren Aktivität beeinflussen (Harper *et al.*, 2001; Liu und Min, 2002; Mitchell und Marletta, 2005). Des Weiteren nimmt das antioxidative Tripeptid Glutathion (GSH) eine Schlüsselrolle für die Redoxhomöostase in der Zelle ein. Das reduzierte GSH besitzt eine freie Thiolgruppe und kann somit Elektronen auf ROS übertragen und diese unschädlich machen. In Anwesenheit der GPx wird über die Oxidation von GSH die Disulfidform gebildet (GSSG). Aus dem GSSG-Dimer können über die Glutathion-Reduktase (GR) unter Verbrauch von NADPH wieder zwei reduzierte GSH entstehen (Abbildung 1). Oxidoreduktasen wie Grx reduzieren Proteine über ihr reaktives cysteininhaltiges Zentrum, wodurch die Redoxreaktion des 2GSH/GSSH mit Cysteinresten der Zielproteine katalysiert wird (Holmgren, 2000). Das 2GSH/GSSG-System wird auch als wichtiger Redoxpuffer der Zelle bezeichnet und kann H_2O_2 in $^1\text{O}_2$ konvertieren (Forman *et al.*, 2007).

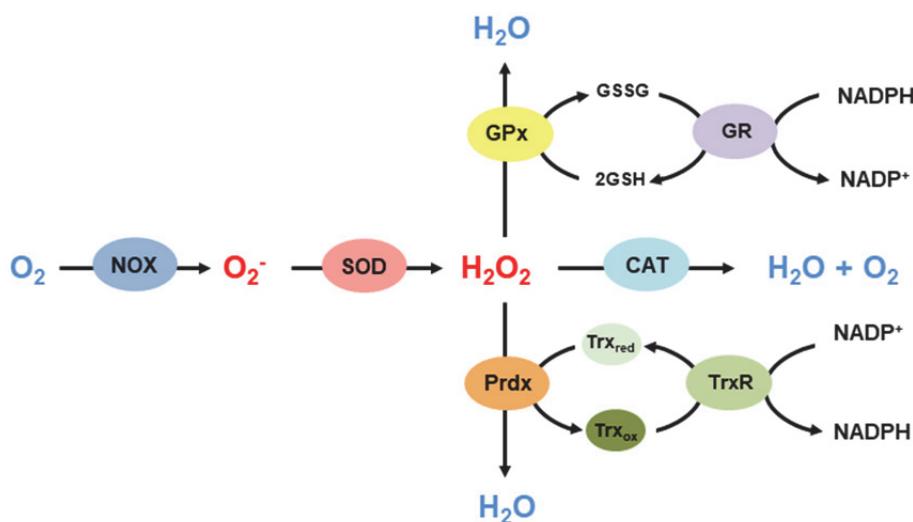


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Oxidoreduktasen für die Regulation der intrazellulären Wasserstoffperoxidkonzentration. NADPH-Oxidase-Komplexe katalysieren die Entstehung von O_2^- . Das Hydroxid-Anion (O_2^-) kann über das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) konvertiert werden. H_2O_2 kann wiederum über Glutathionperoxidasen (GPx), Catalase (CAT) oder Peroxisredoxine (Prdx) zu Wasser (H_2O) und Sauerstoff (O_2) umgewandelt werden (modifiziert nach (Hamada *et al.*, 2014)). GR = Glutathion-Reduktase; GSSG = oxidiertes Glutathion; GSH = reduziertes Glutathion; NADPH/NADP = reduziertes-/ Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat; Trx (red/ox) = Thioredoxin (reduziert/oxidiert); TrxR = Thioredoxin-Reduktasen (modifiziert nach (Hamada *et al.*, 2014)).

Neben den enzymatischen Antioxidantien sind Vitamine (z.B. A, C, E), Spurenelemente (Selen, Zink) und sekundäre Pflanzenstoffe (Polyphenole, Carotinoide) für den Erhalt der Redoxhomöostase ebenfalls von Bedeutung (Asensi-Fabado und Munné-Bosch; Bajpai *et al.*, 2016; Virgili und Marino, 2008).

Eine entscheidende Rolle für die Wirkung von ROS spielt die lokale Konzentration. Geringe und intermediäre Konzentrationen können oxidative Modifikationen von redox-sensitiven Proteinen induzieren und der Signalgebung dienen, während hohe Konzentrationen in Form von oxidativem Stress zur Apoptose oder Nekrose führen. Krankheiten wie Diabetes, Krebs, Arthritis, kardiovaskuläre Erkrankungen und neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Alzheimersche Demenz stehen im direkten Zusammenhang mit einer gestörten Redoxhomöostase in Zellen oder Geweben (Asmat *et al.*, 2016; Bajpai *et al.*, 2016; Dikalov, 2011; Madamanchii *et al.*, 2005). Allerdings sind die bei der Pathogenese beteiligten Proteine und Prozesse bisher weitestgehend unbekannt.

In den letzten Jahren rückte vor allem die Bedeutung von ROS als spezifische intrazelluläre sekundäre Botenstoffe mit regulatorischen Funktionen, z.B. über die Induktion von posttranslationalen Modifikationen (PTMs) an Proteinen, in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen immer mehr in den Fokus. Oxidative Modifikation können die Proteinabundanz, -aktivität, -lokalisation und -Protein-Interaktion beeinflussen (Wang *et al.*, 2012b). Allerdings sind bislang nur wenige involvierte Proteine und Prozesse bekannt.

1.3 Redox-induzierte oxidative posttranslationale Cystein-modifikationen

Die spezifische und kovalente Modifizierung der Aminosäurereste von Proteinen stellt einen wichtigen molekularen Mechanismus für die Übersetzung eines oxidativen Signals in eine biologische Antwort dar (Paulsen und Carroll, 2013). Das Konzept der regulierten Proteinfunktion über einen Redoxschalter wurde bereits im Jahr 1967 für die Fructose-1,6-bisphosphatase beschrieben (Buchanan *et al.*, 1967).

ROS wirken innerhalb der Zelle als Signalmoleküle und interagieren mit verschiedenen Signalwegen, indem sie redox-sensitive Proteine über reversible und irreversible oxidative-Modifikationen posttranslational verändern. Neben den Aminosäuren Histidin, Methionin, Tryptophan und Tyrosin ist die Aminosäure Cystein das prominenteste Ziel für oxidative Modifikationen. Aufgrund seines elektronenreichen Schwefelatoms ist das Cystein in der Lage, sich an einer Vielzahl von unterschiedlichen Redoxreaktionen zu beteiligen (Davies, 2005) (Abbildung 2). Die funktionelle Thiolgruppe (-SH) liegt bei einem physiologischen pH-Wert (pH 7,4) deprotoniert vor, wodurch ihre Reaktivität erhöht ist. Sie wird als eine der

wichtigsten Ziele für ROS-vermittelte posttranslationale Modifikationen (PTM) und Signalgebung angesehen (Akter *et al.*, 2015). Oxidative posttranslationale Modifikationen (oxPTM) des Cysteinthiols sind wichtig für die Regulation von Struktur, Aktivität, Lokalisation und Funktionen von Proteinen (Chung *et al.*, 2013). Nicht alle Cysteinreste eines Proteins sind empfänglich für ROS-induzierte Modifikationen, und auch die Reaktivität von unterschiedlichen redox-sensitiven Proteinen mit ROS können variieren (Marinho *et al.*, 2014). Das Auftreten einer oxPTM der Cysteinthiole und dessen Sensitivität auf ROS ist abhängig von mehreren Faktoren, wie etwa dem lokalen Umfeld des Cysteinrestes, dessen Zugänglichkeit zu ROS, der Säurekonstante (pK_a -Wert) des Cysteinrestes, dem umgebenden Lösemittel sowie der subzellulären Lokalisation (D'Autreaux und Toledano, 2007; Ghezzi *et al.*, 2005; Leonard *et al.*, 2009; Poole und Nelson, 2008; Roos *et al.*, 2013).

Es existiert ein breites Spektrum an unterschiedlichen oxPTM des Cysteinthiols, wobei jede dieser Modifikationen eine spezifische Reaktivität hat. Es wird zwischen reversiblen oxPTM und irreversiblen oxPTM unterschieden. Zu den reversiblen oxPTM zählen die durch ROS induzierte S-Glutathionylierung (RS-GSH), intramolekulare Disulfidbindung ('RS-SR'), intermolekulare Disulfidbindung ('RS-SR') und die Bildung einer hoch reaktiven Sulfensäure (SOH). Auch die Reaktion mit der reaktiven Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species*, RNS) Nitrodonium (NO^+), welche zu einer S-Nitrosylierung (SNO) führt, zählt zu den reversiblen Thiolmodifikationen. Wenn besonders hohe Konzentrationen von H_2O_2 auftreten, kann es zu irreversiblen oxPTM kommen. Dazu zählt die Überoxidation der Sulfensäure (SOH), weiter zu Sulfinsäure (SO_2H) oder zu Sulfonsäure (SO_3H). Die Überoxidation der Sulfensäure (SOH) wird unter zellulären Bedingungen weitgehend als eine irreversible Reaktion angesehen und ist ein Kennzeichen für oxidativem Stress und Krankheiten (Andersen, 2004; Klaunig und Kamendulis, 2004).

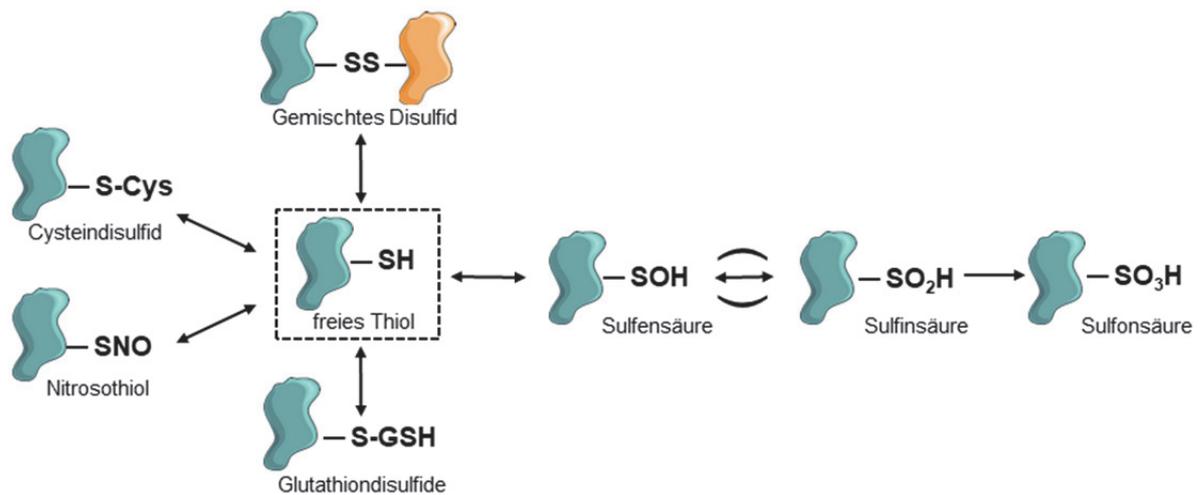


Abbildung 2: Oxidative Cysteinthiol-Modifikationen. Zu den reversiblen oxidativen Modifikationen zählen die S-Nitrosylierung (SNO), die S-Glutathionylierung (RS-GSH), die Disulfidbindung ('RS-SR'), die gemischte Disulfidbindung ('RS-SR') und die Ausbildung einer Sulfensäure (SOH). Die Sulfensäure (SOH) kann weiter zu Sulfinsäure (SO₂H) oder zu Sulfonsäure (SO₃H) oxidiert werden. Die höher oxidierten Produkte Sulfin- und Sulfonsäure gelten unter zellulären Bedingungen als irreversibel oxidiert (modifiziert nach (Poschmann und Stühler, 2012)).

Die Rolle der oxPTM von Cysteinthiolen als potenzielle Redoxschalter wird dadurch bekräftigt, dass der Großteil der Cysteinoxidationen *in vivo* reversibel ist, sich also durch ROS aktivieren und anschließend wieder z.B. über die Oxidoreduktasen Thioredoxin (Trx) und Glutathion (GSH) inaktivieren lässt (Benhar *et al.*, 2009; Lillig und Holmgren, 2007). Die reversiblen oxPTM spielen für den Erhalt der zellulären Redoxhomöostase durch redox-Regulationssysteme wie Grx oder Trx eine wichtige Rolle (Fernandes und Holmgren, 2004; Marchand *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2013). Des Weiteren kommen redox-regulierte Proteine in vielen biologischen Prozessen vor. Dazu zählen u.a. Zellproliferation und Differenzierung, Apoptose, Regulation von Transkriptionsfaktoren und Tyrosinphosphatase-Aktivität, zellulärer Metabolismus sowie die T-Zell-Aktivierung während der Immunantwort (Michalek *et al.*, 2007; Na und Surh, 2006; Rhee *et al.*, 2005a; Spickett und Pitt, 2012).

1.4 Die Skelettmuskulatur als redox-aktives metabolisches Organ

Insbesondere für die Skelettmuskulatur, die rund 40 % des gesamten menschlichen Körpergewichts ausmacht, spielt die ROS-induzierte reversible Signalgebung bei einer ganzen Reihe von physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle (Kim *et al.*, 2016). Zu diesen Prozessen zählt u.a. die Regulation des Glukosemetabolismus, die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, Immunantwort und Veränderungen in der Genexpression (Jackson, 2008; Zuo und Pannell, 2015). Insbesondere für die Aufrechterhaltung der systemischen Homöostase des Energiemetabolismus ist die Skelettmuskulatur entscheidend. Die Skelettmuskulatur ist ein metabolisch flexibles Organ, welches sowohl Glukose als auch Fettsäuren als primäre Energiequelle nutzen kann. Des Weiteren ist sie das primäre Gewebe für die Insulin-induzierte Glukoseaufnahme (Klip und Paquet, 1990), denn etwa 70–80 % der mit der Nahrung aufgenommenen Glukose wird im Skelettmuskel zur

Energiegewinnung oxidiert oder als Glykogen gespeichert. Bei diesem Prozess spielt das Polypeptidhormon Insulin eine zentrale Rolle. Insulin wird im ER von beta-Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas gebildet, und das Muskel- und Fettgewebe sowie die Leber zählen zu den primären Zielgeweben von Insulin.

In der Skelettmuskulatur wird für die Energiegewinnung die aufgenommene Glukose während der Glykolyse schrittweise abgebaut. Pro Glukose-Molekül entstehen zwei Moleküle Adenosintriphosphat (ATP). Über die Hydrolyse von ATP in Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat wird die für die Skelettmuskel-Kontraktionsarbeit benötigte Energie gewonnen. Die Aufnahme von Glukose ist allerdings abhängig von der Anzahl der Glukosetransporter 4 (GLUT4)-Moleküle in der Plasmamembran. In Skelettmuskelzellen reguliert Insulin die Glukosehomöostase über die Translokation von GLUT4 von einem intrazellulären Pool zur Plasmamembran (dos Santos *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014). Die Glukoseaufnahme wird über die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor (IR) initiiert. In der Folge kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, und eine Kaskade von nachfolgenden Phosphorylierungen wird induziert (Abbildung 3). Die intrazellulären Tyrosinreste des IR werden über die Insulinbindung autophosphoryliert. Der nun aktivierte IR katalysiert die Phosphorylierung der verschiedenen Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS) 1-4 durch Insulinrezeptor-Tyrosin-Kinasen. IRS sind in der Lage, unterschiedliche intrazelluläre Prozesse, wie den Glukosemetabolismus und die Mitogenese, zu aktivieren. Die Proteine IRS1 und IRS2 nehmen bei der Insulin-stimulierten GLUT4-vermittelten Glukoseaufnahme in der Skelettmuskulatur eine Schlüsselfunktion ein (Knowler *et al.*, 2002). Das durch Phosphorylierung aktivierte IRS interagiert mit der regulatorischen Untereinheit (p85) der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), wodurch der sekundäre Botenstoff PIP3 aus PIP2 gebildet wird. PIP3 aktiviert eine Serin/Threonin Phosphorylierungskaskade der PH-Domäne von Serin/Threonin-Kinasen. Hierzu gehören PDK1, die Serin/Threonin Proteinkinase B (PKB/AKT) und die atypischen Protein-Kinase-C (PKC). AKT wiederum aktiviert u.a. die Translokation von GLUT4-enthaltenen Vesikeln vom intrazellulären Pool zur Plasmamembran. Dort wird GLUT4 eingebaut und ermöglicht die Aufnahme von Glukose aus dem Plasma in die Muskelzelle.

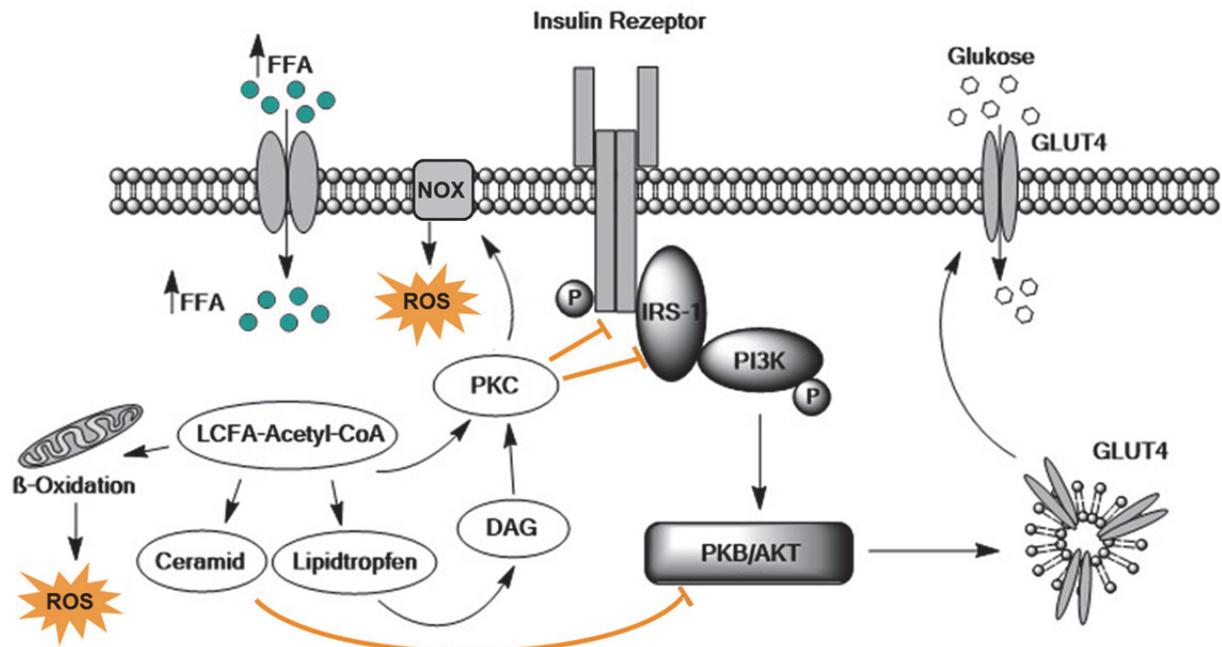


Abbildung 3: Insulin-Rezeptor-Signalkaskade. Insulin bindet an den Insulinrezeptor (IR) und bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch eine Reihe von nachfolgenden Phosphorylierungen ausgelöst werden. Der IR wird über eine Autophosphorylierung aktiviert und das intrazelluläre Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1) bindet an den IR, wird phosphoryliert und aktiviert die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). Dadurch wird die Proteinkinase B (PKB) aktiv und bewirkt die Translokation von Glukose-Transporter 4 (GLUT4) enthaltenden Vesikeln zur Plasmamembran. GLUT4 wird in die Membran eingebaut und ermöglicht die Aufnahme von Glukose in die Zelle. Des Weiteren kann der Skelettmuskel freie Fettsäuren (FFA) aufnehmen. Hohe intrazelluläre Konzentrationen von FFA können zur Ausbildung einer Insulinresistenz und der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) u.a. über den NADPH-Oxidase-Komplex (NOX) oder die β -Oxidation in den Mitochondrien führen (modifiziert nach (Bayol *et al.*, 2014)).

Neben Glukose kann der Skelettmuskel auch Fettsäuren als Energiequelle nutzen. Dafür werden freie Fettsäuren (FFA) von Muskelzellen aufgenommen und über Lipidoxidation zur Energiegewinnung genutzt. Unter normalen Bedingungen werden Fettsäuren aus dem Blut vom Fettgewebe des Körpers aufgenommen, als Triglyzeride in intrazellulären Depots eingelagert und bei Bedarf wieder über Lipasen zu Glycerin und Fettsäuren umgewandelt. Die FFA aus dem Fettgewebe gelangen in das Blutplasma, und von dort aus können sie von spezifischen Transportermolekülen in die Muskelzellen aufgenommen und über beta-Oxidation schrittweise abgebaut werden. Die FFA werden jedoch auch resynthetisiert und als *lipid droplets* im Zytosol gespeichert. Eine konstante Überernährung kann zur Ausbildung von Adipositas führen, wobei im Fettgewebe eine verstärkte Lipolyse bewirkt und die FFA-Konzentration im Blutplasma systemisch erhöht wird. Als Folge werden FFA verstärkt von Muskelzellen aufgenommen und als langkettige Fettsäuren (LCFA)-Acetyl-CoA gespeichert (Bayol *et al.*, 2014).

Eine dauerhaft hohe Konzentration von FFA im Plasma kann zu der verstärkten Akkumulation von Lipiden führen (Lipotoxizität), ein Vorgang der stark mit der Ausbildung einer Insulinresistenz assoziiert wird (Samuel, 2011). Der Begriff Insulinresistenz beschreibt die fehlende Wirkung von Insulin auf den Rezeptor und tritt bereits in der frühen Pathogenese des Typ 2 Diabetes (T2D) auf. Der

genaue Mechanismus der FFA-induzierten Insulinresistenz ist jedoch bisher nicht bekannt. Lange wurde angenommen, dass FFA mit Glukose um die Substratoxidation konkurrieren und FFA somit die Glukoseaufnahme kompetitiv inhibieren (Randle-Zyklus) (Randle *et al.*, 1963). Jedoch zeigen neuere Arbeiten, dass vor allem Fettsäuremetaboliten wie Diacylglycerin (DAG), Ceramide und LCFA-Acetyl-CoA bei der verstärkten Bildung von ROS und der Entstehung einer Insulinresistenz eine entscheidende Rolle spielen (Abbildung 3) (Martins *et al.*, 2012). Es wird angenommen, dass die Entstehung einer Insulinresistenz ein multifaktorieller Prozess ist, in den eine Vielzahl von Signalwegen involviert sind (Rains und Jain, 2011).

Der Anstieg von intrazellulären Fettsäuremetaboliten wie etwa Diacylglycerin (DAG) und Ceramid induziert ER-Stress, wodurch verstärkt ROS entstehen und die Aktivierung des Nuklearen Faktors (NF)- κ B Signalwegs (Eizirik *et al.*, 2008). Es wird angenommen, dass FFA über die Proteinkinase C (PKC) die IRS-1 vermittelte Aktivierung des PI3K-AKT-Signalweges inhibieren (Dey *et al.*, 2006) (Abbildung 3). In Mitochondrien können FFA über beta-Oxidation zur Energiegewinnung verwendet werden (Henique *et al.*, 2015). Unter pathophysiologischen Bedingungen beeinträchtigen chronisch erhöhte FFA-Konzentrationen die oxidative Kapazität der Mitochondrien, und es werden verstärkt ROS gebildet (Martins *et al.*, 2012). Jedoch gilt in der Skelettmuskulatur der NADPH-Oxidase-Komplex (NOX) als die Hauptquelle für die Generierung der für die Signalgebung relevanten ROS H_2O_2 . In der Skelettmuskulatur sind die drei Isoformen NOX1, NOX2 und NOX4 beschrieben, die eine bedeutende Funktion für den Erhalt der Redoxhomöostase innehaben. Das Auftreten von erhöhten Fettsäurekonzentrationen kann zu einer Überproduktion von ROS durch NOX2 und NOX4 führen, ein Zustand, der inhibierend auf den Insulinsignalweg und den Glukosetransport wirkt und mit der Pathogenese des T2D assoziiert wird (Ferreira und Laitano, 2016; Zuo und Pannell, 2015). Aufgrund der Bedeutung und der Vielzahl bereits in der Literatur beschriebener redox-assoziiierter Mechanismen bietet das Modellsystem der Skelettmuskulatur die Möglichkeit, zelluläre Redoxprozesse zu untersuchen.

1.5 Die Funktion des Skelettmuskels als aktiv endokrines Organ

Eine Vielzahl der reaktiven Cysteinthiolen von sekretierten Proteinen werden im ER modifiziert, wobei insbesondere der oxPTM der Disulfidbrücke eine bedeutende Rolle für die Stabilität von sekretierten Proteinen zugeschrieben wird (Bechtel und Weerapana, 2017). OxPTM können die 3D-Struktur und Funktion von Proteinen beeinflussen und als Folge eine veränderte Sekretion der Proteine z.B. über extrazelluläre Vesikel bewirken (Benedikter *et al.*, 2018). Folglich besteht eine Abhängigkeit von Redoxprozessen und der Sekretion von Proteinen (Mullen *et al.*, 2015). Als Beispiele sind hier die Peroxiredoxine 1 und 2 (Prdx1 und Prdx2) zu nennen, die als Antwort auf einen inflammatorischen Stimulus oder ein Oxidanz redox-abhängig sekretiert werden (Mullen *et al.*, 2015).

In den letzten Jahren rückte der Skelettmuskel als ein wichtiges aktiv endokrines Organ in den Fokus der Forschung. Die vom Skelettmuskel sekretierten Proteine und Peptide werden Myokine genannt. Da der Muskel eines der größten Organe im menschlichen Körper ist, ermöglicht die Analyse der sekretierten Proteine ein erweitertes Verständnis für die Interaktion von Muskelgewebe mit anderen Organen wie dem Fettgewebe, der Leber, dem Pankreas, den Knochen und dem Gehirn. Von besonderem Interesse ist hierbei die Untersuchung von Myokinen in Bezug auf die metabolische Zellhomöostase, unterschiedliche inflammatorische Prozesse und ihre potentielle Schutzfunktion vor Schäden, ausgelöst durch metabolische Krankheiten. Es wurde bereits gezeigt, dass Proteine, die von dem aktiven, kontrahierenden Skelettmuskel sekretiert werden, anti-inflammatorische Eigenschaften zeigen und den menschlichen Körper vor chronischen metabolischen Krankheiten wie T2D schützen (Pedersen, 2009). In den vergangenen Jahren wurden bereits viele neue potentielle Myokine von unterschiedlichen Spezies identifiziert, jedoch ist deren physiologische Bedeutung bisher noch weitestgehend unbekannt. Beispielsweise führte die Untersuchung von L6 Myotuben aus der Ratte zu der Identifizierung von 189 (Yoon *et al.*, 2009), von humanen Myotuben zu 635 (Henningsen *et al.*, 2010) und von murinen C2C12 Myotuben zu 1.073 (Deshmukh *et al.*, 2015) potentiellen Myokinen. Zu den bereits gut beschriebenen Myokinen zählen Interleukin 6 (IL6), Irisin und der Fibroblasten Wachstumsfaktor 21 (FGF21). Einige der Myokine beeinflussen primär den Skelettmuskel selbst wie etwa Myostatin (MSTN) und der leukämiehemmende Faktor (LIF), IL4, IL7, IL8 und IL13 (Fiuza-Luces *et al.*, 2013; Kurek *et al.*, 1997; Steensberg *et al.*, 2002), wohingegen beispielsweise IL6 eine Vielzahl von Effekten auf unterschiedliche Organe ausübt (Munoz-Canoves *et al.*, 2013; Nielsen und Pedersen, 2007; Pedersen, 2012). Die Sekretion von Myokinen kann von unterschiedlichen Pathologien beeinflusst werden. Ein Beispiel dafür ist das Myokin Metalloprotease-2, das sowohl im insulin-resistenten Modellsystem (Yoon *et al.*, 2009) als auch im Plasma von T2D Patienten verstärkt detektiert wurde (Derosa *et al.*, 2007).

Der Begriff „Sekretom“ wurde erstmals im Jahr 2000 von Tjalsma *et al.* verwendet, um Proteine zu beschreiben, die von einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus zu einem festgelegten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen freigesetzt werden (Hathout, 2007; Tjalsma *et al.*, 2000). Sekretierte Proteine nehmen eine Schlüsselrolle für die Zell-Zell Kommunikation, Migration und Proliferation ein, indem sie autokrin, parakrin oder endokrin als Signalmoleküle wirken (Mukherjee und Mani, 2013; Stastna und Van Eyk, 2012b; Wang *et al.*, 2015; Weng *et al.*, 2016). Beispiele für sekretorische Proteine sind etwa Hormone, Enzyme für den Verdau, Zytokine, Chemokine, Interferone, Kolonie-stimulierende Faktoren, Wachstumsfaktoren und Tumornekrosefaktoren (Mukherjee und Mani, 2013). Das Sekretom ist in seiner Zusammensetzung hoch dynamisch und kann durch äußere Einflüsse sowie durch unterschiedliche Pathologien verändert werden (Caccia *et al.*, 2013b).

In eukaryotischen Zellen ist die sogenannte „klassische Sekretion“ der primäre Sekretionsweg für Proteine (Lee *et al.*, 2004). Die klassische Sekretion beschreibt den Transport von

Transmembranproteinen und sekretierten Proteinen zur Plasmamembran bzw. in den Extrazellularraum (Abbildung 4). Klassisch sekretierte Proteine besitzen in der Regel eine spezifische Signalsequenz an ihrem N-Terminus, das sogenannte Signalpeptid. Das Signalpeptid besteht aus 16–45 Aminosäuren mit spezifischen Eigenschaften. Es besitzt einen zentralen hydrophoben Kern, der N-terminal von positiv geladenen Aminosäuren und C-terminal von polaren Aminosäuren flankiert ist (Mukherjee und Mani, 2013). Über das Signalpeptid werden die Proteine während der Translation in das ER transloziert, wo die Proteine gefaltet und posttranslational modifiziert (z.B. Glykosylierung, Hydroxylierung, Bildung von Disulfidbrücken) werden. Das Signalpeptid wird in den meisten Fällen während der Translation von der Signalpeptidase abgespalten. Vom ER gelangen die Proteine über einen anterograden Transport via *coat protein complex II* (COPII)-beschichteter Vesikel in den Golgi Apparat, wo sie für den weiteren Transport sortiert und anschließend über das *trans*-Golgi-Netzwerk ausgeschleust werden (Ferro-Novick und Brose, 2013; Palade, 1975). Ein spezifisches Signal für den retrograden Transport des Proteins in das ER ist die Aminosäuresequenz KDEL am C-Terminus der Proteine. Physiologische proteolytische Prozessierungen (Trunkierungen) am C-Terminus sind häufig bei sekretierten Proteinen zu finden (Ngounou Wetie *et al.*, 2013). Besitzen die Proteine kein spezifisches Signal für den Verbleib im ER, Golgi Apparat oder einem anderen Zellkompartiment, werden sie zur Plasmamembran transportiert. Dort werden die Transmembranproteine in die Plasmamembran eingebaut und die sekretorischen Proteine entweder ohne ein spezifisches zelluläres Signal (konstitutive Sekretion) oder über die regulierte Sekretion, als Antwort auf einen Stimulus, über Exozytose freigesetzt. Bei der regulierten Sekretion akkumulieren die Proteine zunächst in Speichervesikeln und werden erst als Antwort auf ein spezifisches zelluläres Signal sekretiert. Da hierbei häufig die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht auftritt, wird diese Sekretion auch Ca^{2+} -abhängige Sekretion genannt und spielt bei der Sezernierung von Hormonen und Neurotransmittern eine wichtige Rolle (Sudhof, 2012).

Neben der klassischen Proteinsekretion existiert eine Vielzahl von Mechanismen der nicht-klassischen (unkonventionellen) Proteinsekretion (Rabouille, 2017; Rabouille *et al.*, 2012) (Abbildung 4). Weiterhin sind zwei Kategorien von Proteinen beschrieben, die unkonventionell sekretiert werden. Zu der ersten Kategorie zählen zytoplasmatische „führungslose“ Proteine, welche die Plasmamembran ohne Signalpeptid durchqueren können. Diese „führungslosen“ Proteine werden über drei unterschiedliche Sekretionsmechanismen freigesetzt: Typ I (über die Ausbildung einer Membranpore); Typ II (über den *ATP-binding cassette* (ABC) Transporter) und Typ III (über membrangebundene Organellen: Autophagosom/Endosom). Zu der zweiten Kategorie der unkonventionell sekretierten Proteine zählen Proteine, die ein Signalpeptid besitzen, aber den Golgi Apparat umgehen und direkt zur Plasmamembran transportiert werden (Typ IV, *Golgi-Bypass*) (Rabouille, 2017).

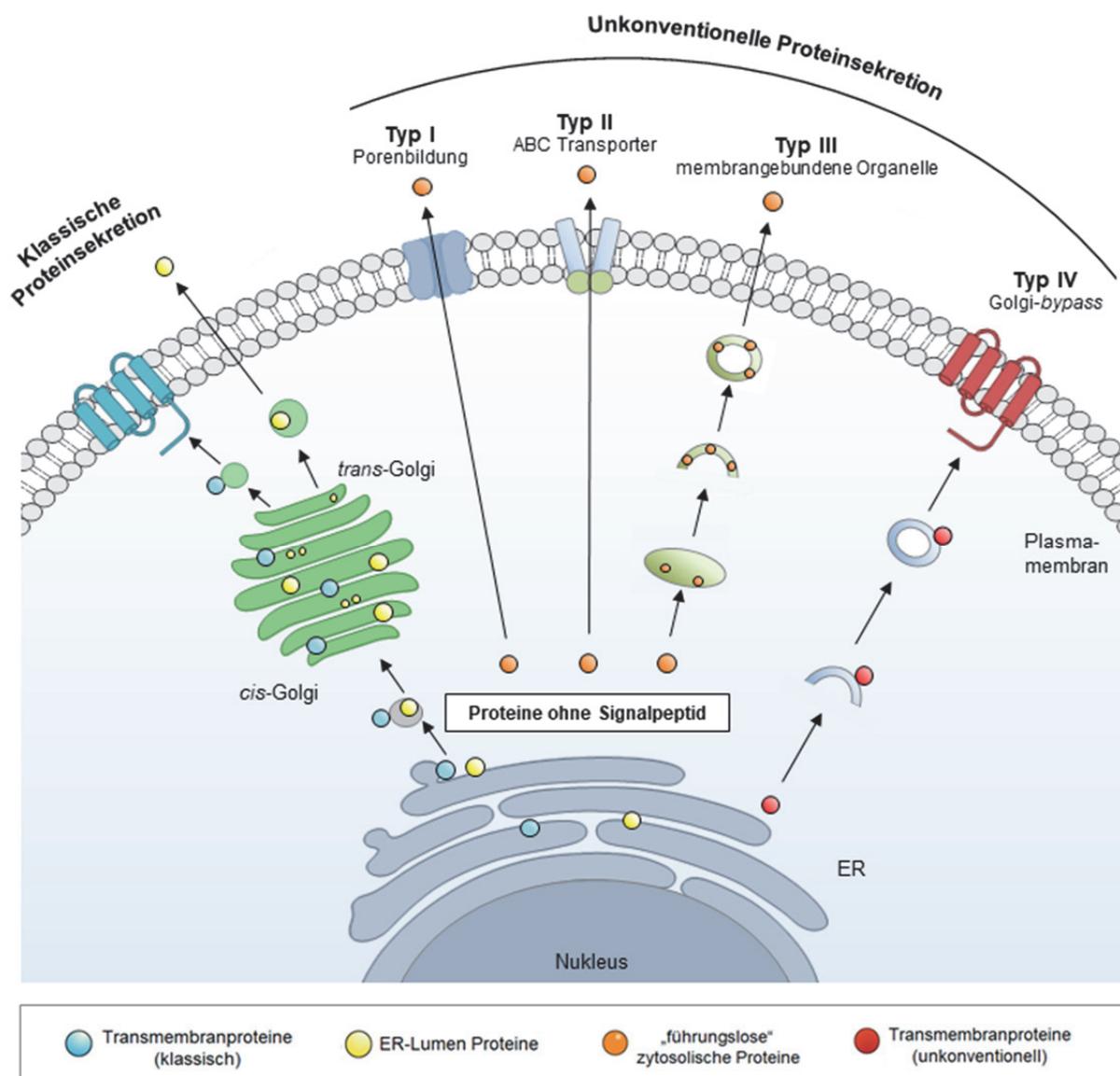


Abbildung 4: Mechanismen der Proteinsekretion (modifiziert nach (Kim *et al.*, 2018)). Die klassische Proteinsekretion beschreibt den ER-Golgi-Transport von Proteinen in COPII-beschichteten Vesikeln zur Plasmamembran (blaue und gelbe Kreise). Jedoch ist eine Vielzahl von Proteinen beschrieben, die über unkonventionelle Sekretionsmechanismen sezerniert werden. Proteine ohne ein Signalpeptid oder eine Transmembrandomäne (Orange Kreise) können über die Ausbildung einer Membranpore (Typ I), über den ABC-Transporter (Typ II), oder über eine membrangebundene Organelle (Typ III) sekretiert werden. Ein weiterer Mechanismus der unkonventionellen Sekretion beschreibt die Sekretion von Proteinen die eine Transmembrandomäne enthalten, aber den Golgi Apparat umgehen und direkt zur Plasmamembran transportiert werden (Typ IV, Golgi-bypass) (Rote Kreise).

Viele dieser unkonventionellen Sekretionswege werden über Stress induziert (Giuliani *et al.*, 2011), der den klassischen Sekretionsmechanismus der Zelle beeinträchtigt und effiziente alternative Sekretionswege notwendig macht. Es wird ein direkter Zusammenhang von redox-induzierten oxPTM und der unkonventionellen Proteinsekretion als Antwort auf eine veränderte Redoxhomöostase postuliert (Benedikter *et al.*, 2018).

Jedoch gibt es auch Proteine wie z.B. *Fibroblast growth factor 2* (FGF2) und *HIV Transactivator of transcription* (TAT), die kontinuierlich unkonventionell sekretiert werden (Debaisieux *et al.*, 2012;

Steringer *et al.*, 2015). Diese Proteine werden direkt über Membranporen der Plasmamembran in den Extrazellulärraum transloziert (Typ I) (Dimou und Nickel, 2018). Bekannte Proteine, die als Reaktion auf Stress über den Typ I sekretiert werden, sind das Interleukin-1 β (IL-1 β) sowie das FGF1 (Monteleone *et al.*, 2015; Prudovsky *et al.*, 2013).

Die Typ II Sekretion über den ABC-Transporter dient der Translokation von acylierten und lipidierten Proteinen und Peptiden und scheint für die Proteinsekretion von eukaryotischen Zellen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen (Dimou und Nickel, 2018; Rabouille, 2017; Rabouille *et al.*, 2012).

Die Stress-induzierte Typ III Sekretion basiert auf membrangebundenen Organellen und ist u.a. für die Proteine IL-1 β und *acyl-CoA binding protein* (AcbA) beschrieben (Cabral *et al.*, 2010; Rubartelli *et al.*, 1990). Zu dem Typ III Sekretionsmechanismus zählt auch die Sekretion von extrazellulären Vesikeln (EV), kleinen von einer Membran umgebenen Vesikeln, die von nahezu jedem Zelltyp sekretiert werden und Lipide, Nukleotide sowie Proteine transportieren (Choi *et al.*, 2013). Zu den EV zählen u.a. Mikrovesikel und Exosomen, die sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Konditionen freigesetzt werden (Yanez-Mo *et al.*, 2015). Bekannte Zielmoleküle für redox-induzierte Thiolmodifikationen, die im Zusammenhang mit einer veränderten Sekretion von EV stehen, sind u.a. redox-sensitive Calciumkanäle und Phospholipidflippasen, Aktinfilamente und Proteindisulfidisomerasen (Benedikter *et al.*, 2018).

Der Sekretionsmechanismus Typ IV kann über ER-Stress induziert werden. Ein Beispiel für diesen Sekretionsmechanismus ist das Protein *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) (Kim *et al.*, 2018).

Obwohl in den vergangenen Jahren ein enormer Fortschritt in der Sekretomanalyse zu verzeichnen war, ist für eine ganze Reihe von sekretierten Proteinen mit und ohne Signalpeptid der Sekretionsmechanismus noch nicht eindeutig geklärt. Dazu zählten auch die von Skelettmuskelzellen kontinuierlich sekretierten redox-sensitiven Proteine Thioredoxin 1 (Trx1) (Manabe *et al.*, 2014) sowie der Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktor (Mif) (Miyatake *et al.*, 2014), die beide keine Signalpeptidsequenz enthalten. Es wird angenommen, dass bei Entzündungsprozessen sekretierte Proteine und deren Cystein-Redoxstatus als Zytokine fungieren (Butterfield und Perluigi, 2017).

Die Identifizierung und Charakterisierung von redox-sensitiven Myokinen könnte somit zu einem verbesserten Verständnis der Skelettmuskulatur als aktiv endokrines Organ beitragen. Somit ließe sich ebenfalls dessen Einfluss auf die physiologische Funktion einzelner Zielgewebe sowie auf den gesamten Organismus weiter aufklären.

1.6 Murine Skelettmuskelzellen als Modellsystem für die Untersuchung redox-abhängiger Prozesse

Für die Untersuchung von Redoxprozessen bietet sich der Skelettmuskel als Modellsystem an, da hier die redox-vermittelte Signalgebung bei einer Vielzahl von Prozessen eine wichtige Rolle einnimmt (Ji, 2015; Zuo und Pannell, 2015). Für die Analyse stehen eine ganze Reihe verschiedener Zelllinien aus unterschiedlichen Organismen zur Verfügung. Im Vergleich zu primären Zellen ist die Kultivierung von Zelllinien in der Regel einfach, und es können kostengünstig große Mengen Zellmaterial in kurzer Zeit generiert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete murine Zelllinie C2C12 ist eine immortalisierte Myoblastenzelllinie, die von den Forschern Yaffe und Saxel entwickelt wurde (Yaffe und Saxel, 1977). Die C2C12 Zelllinie wurde aus einem Subklon einer Myoblastenzelllinie generiert, die wiederum aus dem Oberschenkelmuskel einer adulten C3H-Maus stammt. *In vitro* proliferieren die C2C12 Myoblasten unter hohen Serumkonditionen (20 %) und unter niedrigen (2 %) differenzieren sie innerhalb von drei bis fünf Tagen zu vielkernigen kontraktile Myotuben aus. Dieser Vorgang ist irreversibel. Da die C2C12 Myotuben Skelettmuskel-spezifische Proteine bilden, werden sie häufig verwendet, um die Entwicklung, Differenzierung, Regeneration sowie den Metabolismus von Skelettmuskelzellen zu untersuchen (Bolus *et al.*, 2018; Schoneich *et al.*, 2014). Zudem sind C2C12 Myotuben als Modellsystem für die Untersuchung von redox-induzierten Prozessen wie z.B. Alterungsprozesse oder der Pathogenese von T2D beschrieben (Dimauro *et al.*, 2012; Nieuwoudt *et al.*, 2017). Für die Analyse von redox-abhängigen Prozessen in Skelettmuskelzellen bietet sich das etablierte Modellsystem der palmitatinduzierten Insulinresistenz in der murinen Zelllinie C2C12 an. Um eine Insulinresistenz in C2C12 Myotuben zu induzieren, werden die Zellen üblicherweise für 16 h mit 500 μM Palmitatlösung behandelt (Coll *et al.*, 2008; Deshmukh *et al.*, 2015; Jove *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu der ungesättigten Fettsäure Oleat (C18:1) (Chavez und Summers, 2003) zeigte die gesättigte Fettsäure Palmitat (C16:0) bereits in verschiedenen Studien den Effekt ER-Stress, die verstärkte Sekretion von Myokinen und eine Insulinresistenz in Skelettmuskelzellen auszulösen (Borradaile *et al.*, 2006; Kausch *et al.*, 2003; Weigert *et al.*, 2004). Yuzefovych *et al.* zeigten, dass eine Behandlung von Skelettmuskelzellen mit Palmitat zu der Ausbildung einer Insulinresistenz und einer verstärkten Bildung von ROS führen (Yuzefovych *et al.*, 2010). Eine stark erhöhte Bildung von ROS wird mit unterschiedlichen biologischen Signalwegen von pathophysiologischen Prozessen assoziiert (Martins *et al.*, 2012). Die Aufklärung des molekularen Mechanismus der palmitatinduzierten Insulinresistenz und der verstärkten Bildung von ROS birgt das Potential, das Verständnis für die Entstehung von metabolischen Erkrankungen wie T2D zu vertiefen. Neben der Behandlung der C2C12 Myotuben mit Palmitat besteht ebenfalls die Möglichkeit, Redoxprozesse über die Induktion einer Insulinresistenz z.B. über die direkte Zugabe von H_2O_2 zu untersuchen. Hierbei wird angenommen, dass H_2O_2 die Phosphorylierung von Akt reguliert und die Glukoseaufnahme inhibiert (Abbildung 3) (Souto Padron de Figueiredo *et al.*, 2015). Dieses Modell ist

jedoch stark vereinfacht, und fettsäureinduzierte Signalkaskaden können mit diesem Versuchsansatz nicht untersucht werden.

Ein weiteres Charakteristikum der verwendeten Myoblastenzelllinie ist, dass die C2C12 Zellen aktiv Myokine sekretieren. Dadurch besteht die Möglichkeit, sowohl auf Ebene des zellulären Proteoms als auch auf Ebene des Sekretoms Redoxprozesse zu untersuchen, wodurch ein erweitertes Verständnis für involvierte biologische Prozesse gewonnen werden kann.

1.7 Charakterisierung von Skelettmuskelzellen mittels Proteomanalyse

Der Begriff Proteom beschreibt die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt eines definierten Zustands in einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus vorhanden sind (Wilkins *et al.*, 1996). Das Proteom verändert sich kontinuierlich und wird in seiner Zusammensetzung von einer Reihe endo- und exogener Faktoren beeinflusst. Somit ist das Proteom im Vergleich zum Genom hoch dynamisch (Anderson und Anderson, 1996; Muller *et al.*, 2007). In einer eukaryotischen Zelle sind schätzungsweise 10.000–20.000 verschiedene Proteinspezies gleichzeitig präsent, wobei die Proteinabundanz innerhalb einer Zelle um etwa sieben Größenordnungen variieren können (Beck *et al.*, 2011; Zuo *et al.*, 2001). Die Komplexität des zellulären Proteoms wird zusätzlich durch posttranslationale Modifikationen (PTM) wie oxidative Thiolmodifikationen, Phosphorylierungen, Glykosylierungen, Acetylierungen, etc., aber auch durch proteolytische Prozessierung erhöht (Lottspeich, 2009; Tilleman *et al.*, 2005), wodurch die Proteinfunktion, -aktivität, -lokalisation und -struktur beeinflusst wird (Karve und Cheema, 2011). Des Weiteren bietet die Proteomanalyse die Möglichkeit, Proteinisoformen, die z.B. durch alternatives Spleißen entstehen, oder posttranslationale Modifikationen, zu detektieren (Stastna und Van Eyk, 2012a; Yang und Li, 2015). Das Forschungsgebiet der Proteomik umfasst die Untersuchung des Proteoms mit dem Ziel, Proteine zu identifizieren und quantifizieren, um sie im Kontext komplexer biologischer Systeme detailliert zu untersuchen (Jungblut *et al.*, 1999). Des Weiteren bietet die gezielte Untersuchung von so genannten „Subproteomen“ die Möglichkeit, Hinweise auf potentielle Lokalisations- und Funktionsveränderungen, involvierte Signalkaskaden und Protein-Protein-Interaktionspartner zu erhalten. Zur Analyse der Subproteome zählen beispielsweise die Untersuchung einzelner Organellen und Membranen sowie die Analyse des Sekretoms oder einzelner posttranslationaler Modifikationen wie Phosphorylierungen oder Oxidationen. Weiterhin dient die Proteomanalyse der Aufklärung von Protein-Protein-Interaktionen, komplexer zellulärer Netzwerke und Signalkaskaden. Die Erfassung der Veränderungen auf Ebene der Proteinabundanz, z.B. zwischen unterschiedlichen Zuständen oder Zelllinien, ist die Grundlage der differentiellen Proteomanalyse. Die differentielle Proteomanalyse birgt das Potential, neue Erkenntnisse über physiologische und pathophysiologische Vorgänge zu erhalten.

Die Massenspektrometrie (MS) ist ein zentraler Bestandteil für die Proteomanalyse und die Identifizierung differenziell veränderter Proteine (Paul *et al.*, 2013). Häufig wird die MS-basierte Analyse mit einer weiterführenden bioinformatischen Datenauswertung zur Aufklärung spezifischer Proteincharakteristika, Protein-Protein-Interaktionen und involvierter Signalwege und biologischer Komponenten kombiniert (Schmidt *et al.*, 2014).

1.7.1 Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie

In den letzten Jahren wurde eine ganze Reihe von Methoden entwickelt, die eine Untersuchung von hochkomplexen Proteingemischen ermöglicht und Einblicke in die Zusammensetzung, Regulation und Funktion von Signalwegen gewährt. Zu den klassischen Untersuchungsansätzen der Proteomik zählen unter anderem die zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese (Klose und Kobalz, 1995) und zum anderen Massenspektrometrie (MS)-basierte Quantifizierungstechniken. Die MS-basierte Quantifizierung erfolgt markierungsfrei (Silva *et al.*, 2005) oder alternativ durch eine chemische oder metabolische Markierung unter Verwendung stabiler „schwerer“ Isotope (Ong *et al.*, 2002). Das Prinzip der Proteomanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese besteht in der Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt und der Molekülgröße. Ein differenzieller Vergleich der Proteome ist anhand des auftretenden Spotmusters möglich. Weiterhin können die Proteinspots aus dem Gel ausgeschnitten und mittels MS analysiert werden. Die MS stellt eine Analysetechnik zur Bestimmung des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) von Ionen im Hochvakuum dar. Die technische Entwicklung der quantitativen Massenspektrometrie ermöglicht die parallele Identifizierung und Quantifizierung hoch komplexer biologischer Proben, die mehrere tausend Proteine enthalten. Weiterhin zeichnet sich die MS-basierte Analyse durch eine hohe Sensitivität und hohe Genauigkeit der Massenbestimmung aus (Aebersold und Mann, 2003) und ist somit oftmals die Methode der Wahl. Es werden zwei Ansätze der MS-Analyse unterschieden: die *bottom-up* und die *top-down* Methode (Catherman *et al.*, 2014). Mit Hilfe der *top-down* Methode können intakte Proteine analysiert werden. Bei dieser Methode besitzen die Proteine hohe Ladungszustände, wodurch ein besonders hochauflösendes Massenspektrometer benötigt wird (Michalski *et al.*, 2012). Die *top-down* Methode eignet sich für den Nachweis von Proteinisofomen, integralen Membranproteinen und posttranslational modifizierten Proteinen (Schey *et al.*, 2013; Taverna *et al.*, 2007; Whitelegge *et al.*, 2006), jedoch ist für die Untersuchung komplexer Proben eine zusätzliche mehrstufige Fraktionierung der Proben notwendig (Catherman *et al.*, 2014). Besser geeignet für komplexe Proben ist der *bottom-up* Ansatz, bei dem Proteine zunächst proteolytisch verdaut und die dabei entstehenden Peptide anschließend via MS untersucht werden. Mit diesem Ansatz können unbekannte Proteinproben, basierend auf den exakten Peptidfragmentmassen, über einen Abgleich mit einer Sequenzdatenbank identifiziert werden. Die *bottom-up* Methode findet Anwendung bei der

Untersuchung von komplexen Peptidgemischen, z.B. von Sekretomen oder zellulären Proteomen sowie von subzellulären Fraktionen. Die Proben werden hierbei zunächst mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) aufgetrennt und die Eluate anschließend im Massenspektrometer analysiert. Ein Massenspektrometer besteht aus den drei Komponenten: Ionenquelle, für die Generierung geladener Ionen; Massenanalysator, für die Auftrennung der Ionen nach ihrem m/z -Verhältnis; Detektor, für die Bestimmung der Ionenanzahl zu jedem m/z -Verhältnis (Aebersold und Mann, 2003). Für die Ionisierung stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Gängig ist die sanfte Ionisierungsmethode der Elektrosprayionisation (ESI), bei der die eluierten Proteine oder Peptide von der Flüssig- in die Gasphase gebracht und anschließend das Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) bestimmt wird (Catherman *et al.*, 2014; Fenn *et al.*, 1989). Eine weitere sanfte Ionisierungsmethode ist die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI). Da die ESI Ionisierungsmethode eine vorherige Auftrennung der Proben über HPLC direkt *online* ermöglicht, wird sie für die Analyse von komplexen Peptidgemischen häufig bevorzugt eingesetzt. Auch für die zweite Komponente des Massenspektrometers, dem Massenanalysator, stehen je nach Analyseansatz unterschiedliche Typen zur Verfügung: Orbitrap (Hu *et al.*, 2005), Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz (FT-ICR), TripleQuadropol, Ionenfalle, Flugzeitanalysator. In der biologischen MS werden aktuell häufig Hybridgeräte verwendet, die mehrere Massenanalysatoren miteinander kombinieren, wobei im ersten Schritt die Massenanalyse der Vorläuferionen durchgeführt wird und im zweiten ausgewählte Molekülonen im Massenspektrometer fragmentiert und deren Zerfallsprodukte analysiert werden können (Tandem-MS, MS/MS). Zudem wird unterschieden, ob eine ungerichtete Analyse oder eine gerichtete wie die *selected reaction monitoring* (SRM) Analyse durchgeführt werden soll. Eine SRM-Analyse ermöglicht den hoch sensitiven Nachweis eines bekannten Proteins oder Peptids in einer komplexen Probe.

Weiterhin wird die quantitative MS-basierte Analyse für die Untersuchung von Proteinabundanzunterschieden zwischen Probengruppen eingesetzt. Jedoch muss dabei beachtet werden, dass die Effizienz der Ionisation der Analytmoleküle von den spezifischen biophysikalischen Charakteristika sowie der Probenzusammensetzung abhängt und deshalb in erster Linie für den Vergleich eines identischen Moleküls in zwei sehr ähnlichen Proben zulässig ist (Lottspeich *et al.*, 2012). Dies erfolgt wahlweise anhand der absoluten oder der relativen Quantifizierung (Bantscheff *et al.*, 2007). Für eine absolute Quantifizierung werden Standards bekannter Konzentrationen verwendet (interner Standard). Die relative Quantifizierung vergleicht die detektierten Proteinabundanzen im Verhältnis zueinander und erfordert sehr gut reproduzierbare Probenvorbereitungen und MS-Analysen. Die relative quantitative Analyse kann über eine ganze Reihe unterschiedlicher technischer Strategien erfolgen (Abbildung 5). Dazu zählt u.a. die Quantifizierung anhand von stabiler Isotopenmarkierung. Die früheste Möglichkeit, eine stabile Isotopenmarkierung in Proteine einzubringen, ist die metabolische Markierung z.B. mittels SILAC (isotopenmarkierte Aminosäuren in

Zellkulturmedium), die *in vivo* während des Wachstums und der Proliferation in die Zellen eingebracht wird. Die Proben können hierbei bereits bei der Probenaufarbeitung vereint werden (Abbildung 5). Alternativ stehen chemische Markierungen wie *isotope-coded affinity tag* (ICAT), *isobaric tags for relative and absolute quantitation* (iTRAQ), *tandem mass tag* (TMT) oder Dimethyl zur Verfügung, die *in vitro* während der Probenaufarbeitung für die Markierung auf Protein- bzw. Peptidebene verwendet werden (Abbildung 5) (Bruce *et al.*, 2013; Lau *et al.*, 2014). Im Anschluss an die chemische Markierung können die Proben ebenfalls vereint und mittels MS analysiert werden. Die Quantifizierung von isotypenmarkierten Proteinen erfolgt hierbei über das Verhältnis der Signalintensitäten der unterschiedlichen isotypenmarkierten Varianten.

Neben der markierungsbasierten Quantifizierung kann eine markierungsfreie Quantifizierung (*label-free quantification, LFQ*) einer ungerichteten Analyse über zwei unterschiedliche Ansätze durchgeführt werden. Die Proteinmenge kann über die Anzahl der aufgenommenen Fragmentspektren pro Protein (*spectral counting*) oder alternativ über die Signalintensität von einem oder mehreren seiner Peptide (*area under the curve*) bestimmt werden (Bruce *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2004). Die Proben müssen für die markierungsfreie Quantifizierung einzeln analysiert werden (Abbildung 5). Ein Vorteil der markierungsfreien Quantifizierung ist, dass diese Methode ohne weitere Manipulation der Proteine direkt eingesetzt werden kann (Bruce *et al.*, 2013).

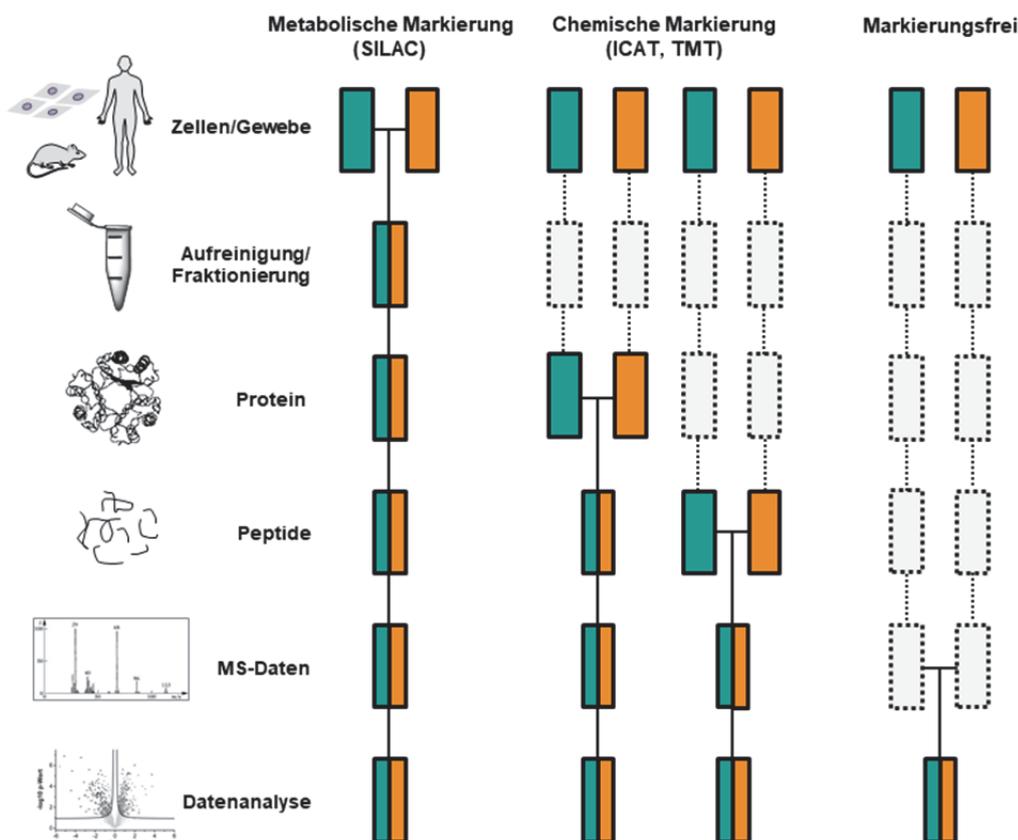


Abbildung 5: Unterschiedliche Strategien für die MS-basierte Quantifizierung von Proteinen (modifiziert nach (Bantscheff *et al.*, 2007)). In Orange und Grün sind die beiden Proben dargestellt, die miteinander verglichen werden sollen. Die horizontalen Linien zeigen, wann die Proben für die Quantifizierung vereint werden. SILAC = *stable isotope labeling by amino acids in cell culture*, ICAT = *isotope coded affinity tag*, TMT = *tandem mass tag*

1.7.2 Analyse von oxidativen Cysteinmodifikationen im zellulären Proteom via Massenspektrometrie

Innerhalb der letzten Jahre wurde intensiv an der Entwicklung unterschiedlicher Detektionsmethoden für den Nachweis und die Analyse von oxidierten Proteinen und Thiolmodifikationen geforscht. Wie bereits zuvor in Abschnitt 1.3 beschrieben, existiert eine Vielzahl von unterschiedlichen oxidativen Cysteinmodifikationen, die zu einer Veränderung der Masse führen und mittels MS-basierter Analyse bestimmt werden können. Heutzutage ist eine Vielzahl von thiolreaktiven Chemikalien für die gezielte Analyse oxidativ modifizierter Cysteinresten verfügbar. Über die Kombination dieser Reagenzien und der MS-basierten Analyse können globale Veränderungen der oxPTM an Cysteinresten im Proteom (Redox-Proteom) detektiert werden. Mit diesem Ansatz kann die Oxidation von Proteinen in Anhängigkeit von unterschiedlichen Stimuli untersucht werden, um potentielle Funktionszusammenhänge und Signalkaskaden aufzuklären.

Eine der ersten Strategien für die Untersuchung von oxidativen Cysteinmodifikationen auf Ebene einer Proteomstudie ist die Biotin-Switch-Technik (BST), die 2001 von Jaffrey *et al.* für die Analyse der S-Nitrosylierung als oxidative Cysteinmodifikation beschrieben wurde (Jaffrey *et al.*, 2001). Diese Strategie besteht aus drei Schritten: I. Alkylierung (Blockierung) freier Thiole, II. Reduktion der reversible modifizierten Cysteinreste und III. Markierung der nun freien Thiole mit spezifischen thiolreaktiven Reagenzien (Abbildung 6).

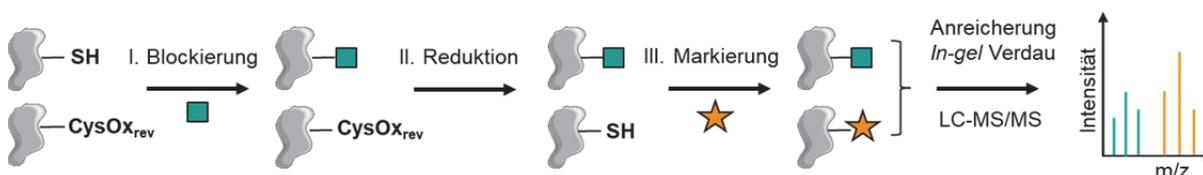


Abbildung 6: MS-basierte Analyse der reversibel oxidierten Cysteinreste. Die Biotin-Switch-Technik (BST) beinhaltet die differenzielle Markierung von oxidierten und reduzierten Cysteinthiolen. Freie Cysteinthiole werden im ersten Schritt mit einem thiolreaktiven Reagenz wie Iodoacetamid (IAM) oder *N*-Ethylmaleinimide (NEM) blockiert und anschließend werden reversibel oxidierte Thiolreste reduziert und mit einem weiteren thiolreaktiven Agenz markiert. Es folgt eine Anreicherung über eine Affinitätsaufreinigung oder alternativ eine matrixbasierte Anreicherung. Danach werden die Proben mittels LC-MS/MS Analyse untersucht (modifiziert nach (Yang *et al.*, 2016)).

Eine Markierung der oxidativ modifizierten Thiole kann mit einer Anreicherung über Biotin-Moleküle kombiniert werden. Dafür wird biotinyliertes Iodoacetamid (BIAM) verwendet, um redox-modifizierte Proteine über eine Affinitätsaufreinigung anzureichern (Paulsen und Carroll, 2013). Neben der Anreicherung von reversibel oxidierten Proteinen über BST kann alternativ auch die Methode der matrixbasierten Probenaufarbeitung angewandt werden (Forrester *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2014). Vorteile der matrixbasierten Aufreinigung gegenüber der BST sind zum einen, dass der kovalente Aufreinigungsprozess eine erhöhte Anreicherungsspezifität verspricht und zum anderen, dass kein weiterer Aufreinigungsschritt zur Abtrennung von Biotin vor der MS-Analyse benötigt wird (Guo *et al.*, 2014).

Weiterhin können die Anreicherungsstrategien mit quantitativen MS-basierten Techniken kombiniert werden, wie etwa absolute und relative Quantifizierung sowie markierungsfreie und isotopenbasierte Quantifizierung (z.B. SILAC), um den Redoxstatus von Proben unter verschiedenen Konditionen zu vergleichen. Der OxICAT-Ansatz (*Isotope-Coded Affinity Tag*, ICAT) verbindet die Isotopenmarkierung der freien Cysteinthiole mit „leichtem“ ICAT-Reagenz und der reversibel oxidierten mit der „schweren“ Form des Reagenz und mit der MS-basierten Analyse. So kann das Verhältnis von schweren zu leichten Isotopen gebildet werden, was einen Rückschluss auf den Redoxstatus ermöglicht (Leichert *et al.*, 2008; Leonard und Carroll, 2011). Jedoch kann die chemische Struktur der Markierung ein sterisches Hindernis für die Markierungseffizienz darstellen (Gygi *et al.*, 1999). Um dieses Problem zu lösen, wurden thiolreaktive Chemikalien mit einfacheren Strukturen entwickelt (Weerapana *et al.*, 2008). Dazu zählen *N*-Ethylmaleinimid (NEM), Methanthiosulfonat (MMTS) und Iodacetamid (IAM), die mit den Thiolresten stabile Thioether bilden. Auch diese thiolreaktiven Chemikalien zeigen verschiedene Vor- und Nachteile. IAM kann beispielsweise neben Cysteinresten auch mit Histidin-, Methionin- oder Tyrosinresten reagieren. In einem pH-Wert Bereich zwischen 6,5–7,5 ist die Reaktion von NEM spezifisch für Thiolgruppen. Außerhalb dieses pH-Bereiches können jedoch Nebenreaktionen z.B. mit Aminogruppen auftreten. Weiterhin ist NEM im Vergleich mit IAM weniger stabil. Sowohl NEM als auch IAM sind membranpermeabel. Die Reaktion von NEM ist jedoch schneller und weniger abhängig von dem pH-Wert (Rogers *et al.*, 2006; Wong und Liebler, 2008). Des Weiteren wird in der Literatur 5,5-Dimethylcyclohexan-1,3-dion (Dimedon) für die spezifische Alkylierung von Sulfensäuren beschrieben (Furdui und Poole, 2014). Jedoch deuten die Ergebnisse einer aktuellen Studie darauf hin, dass hier ebenfalls Nebenreaktionen auftreten können und die Reaktion nicht ausschließlich spezifisch für Sulfensäuren ist (Forman *et al.*, 2017).

Zudem kann das zelluläre Proteom im Hinblick auf die Identifizierung von redox-sensitiven Proteinen über einen kombinierten Versuchsansatz von thiolreaktiven fluoreszierenden Farbstoffen, 2D-Gelelektrophorese und anschließender Analyse einzelner Spots mittels MS untersucht werden. Der Versuchsansatz der redox-Differenz-Gelelektrophorese (redoxDIGE) kombiniert die Differenz-Gelelektrophorese mit der Markierung über Maleinimide-gekoppelten cyaninbasierten Farbstoffen (Cy3 und Cy5) (Baraibar und Friguet, 2013). Diese Methode ermöglicht es, eine hohe Auflösung zu erzielen und mehrere Proben parallel miteinander zu vergleichen (Butterfield *et al.*, 2014). Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass häufig niedrig abundante Proteine nicht detektiert werden. Eine vorherige Anreicherung der oxidierten Proteine scheint somit unerlässlich.

1.7.3 Analyse von Zellkulturüberständen via Massenspektrometrie

Sekretierte Proteine machen etwa 13–20 % der gesamten Proteine im humanen Proteom aus und beeinflussen u.a. den Metabolismus, die Proliferation, Differenzierung, Viabilität und Migration von Zellen (Mukherjee und Mani, 2013). Die systematische und detaillierte Untersuchung des zellulären

Sekretoms kann die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapeutika, der Identifizierung von Biomarkern für Krankheiten sowie für die Erforschung der auto-, endo- und parakrinen Signalweiterleitung im Organismus schaffen.

Die Zellen sollten vor der Sekretomernte in serumfreiem Kultivierungsmedium inkubiert werden, um Kontaminanten aus dem Serum zu vermeiden. Sogar für Zelllinien, die nicht unter serumfreien Bedingungen kultiviert werden können, wurden erfolgreich alternative Methoden der Sekretomanalyse entwickelt. Dazu kombinierten Eichelbaum *et al.* (Eichelbaum und Krijgsveld, 2014; Eichelbaum *et al.*, 2012; Schwanhauser *et al.*, 2009) die Methode der metabolischen Pulsmarkierung (*pulsed stable isotope labelling of amino acids in cell culture*, pSILAC) (Schwanhauser *et al.*, 2009) mit der synthetischen Aminosäure Azidohomoalanin (AHA) (Dieterich *et al.*, 2006). Diese Strategie ermöglicht die Kombination der Anreicherung von neu synthetisierten, niedrig abundanten Proteinen über die AHA-Markierung und „Click-Chemie“ sowie den direkten Vergleich von zwei unterschiedlichen Zellzuständen mittels SILAC-Markierung.

Die grundsätzliche Herausforderung der Sekretomanalyse besteht darin, potentielle Kontaminanten zu identifizieren und diese als sogenannte „falsch positive Proteinkandidaten“ aus den Sekretomdaten auszuschließen. Ein möglicher methodischer Ansatz ist der direkte Vergleich von zellulären Proteomen mit den zugehörigen Sekretomen. Sekretierte Proteine sollten hierbei im Sekretom im Vergleich mit dem zellulären Proteom eine höhere relative Abundanz zeigen (Grube *et al.*, 2018).

Im Hinblick auf die weiterführende Analyse von MS-basierten Sekretomdaten stehen eine ganze Reihe unterschiedlicher Programme zur Verfügung (Caccia *et al.*, 2013a). Ziel ist es hierbei, *bona fide* sekretierte Proteine von potentiellen Kontaminanten zu unterscheiden und einen Hinweis auf den involvierten Proteinsekretionsmechanismus zu erhalten. Die Zuordnung von sekretierten Proteinen erfolgt oftmals über die Vorhersage von einem Signalpeptid (Bortoluzzi *et al.*, 2006). Für die Vorhersage der Proteinsekretion wird oftmals das Programm SignalP für die Vorhersage von klassisch sekretierten Proteinen verwendet (Petersen *et al.*, 2011). Des Weiteren können für die Sekretomanalyse Informationen aus Datenbanken wie UniProt für die Annotationen von Signalpeptiden, Transmembrandomänen oder der Proteinlokalisierung genutzt werden. Ein weiterer Aspekt der Sekretomanalyse ist die Untersuchung auf potentielle proteolytische Prozessierung (Trunkierung) von sekretierten Proteinen. Über den Mechanismus der proteolytischen Prozessierung können extrazelluläre Proteindomänen als gelöste Proteine freigesetzt werden. Dieser Mechanismus der proteolytischen Prozessierung wird *Ectodomain-Shedding* genannt (Hayashida *et al.*, 2010). Das Programm *Lysate and Secretome Peptide Feature Plotter* (LSPFP) ermöglicht die Identifizierung von potentiell proteolytisch prozessierten Proteinen auf Peptidebene anhand von MS-basierten Daten, die automatisch mit Proteininformationen der UniProt Datenbank verbunden werden (Grube *et al.*, 2018).

2. Zielsetzung der Arbeit

Redoxprozesse sind in eine Vielzahl von zellulären Signalwegen involviert, streng reguliert und ermöglichen den Zellen, auf endogene und exogene Stimuli zu reagieren. Eine besondere Rolle spielen dabei reaktive Sauerstoffspezies, die innerhalb der Zelle als Signalmoleküle wirken, indem sie redox-sensitive Proteine über oxidative Modifikationen posttranslational verändern. Insbesondere die Modifikationen von Cysteinthiolen sind wichtig für die Regulation von Struktur, Aktivität, Lokalisation und Funktionen von Proteinen (Chung *et al.*, 2013). Im Rahmen der Arbeit sollten redox-abhängige Prozesse in einem Modellsystem mithilfe der Proteomanalyse charakterisiert werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde ein *in vitro* Modellsystem der palmitatinduzierten Insulinresistenz von murinen C2C12 Skelettmuskelzellen verwendet und folgende Arbeiten durchgeführt:

- Etablierung und Evaluierung eines geeigneten Modellsystems für die Untersuchung von physiologischen Redoxprozessen am Beispiel der palmitatinduzierten Insulinresistenz von Skelettmuskelzellen.
- Detaillierte Charakterisierung der Veränderungen im Proteomprofil von C2C12 Skelettmuskelzellen in Anhängigkeit einer Palmitatbehandlung unter Verwendung der massenspektrometrie-basierten Proteomanalyse.
- Identifizierung von redox-induzierten reversiblen oxidativen Cysteinmodifikationen im Proteom von palmitatbehandelten C2C12 Skelettmuskelzellen nach einer matrixbasierten Aufarbeitung der Zellysate und nachfolgender massenspektrometrischen Proteomanalyse.
- Charakterisierung des sekretorischen Phänotyps von C2C12 Skelettmuskelzellen nach Palmitatbehandlung und Identifizierung von redox-abhängig sekretierten Proteinen mittels massenspektrometrischer Untersuchung.
- Funktionelle Validierung von einem Kandidatenprotein am Beispiel des Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktors (Mif) als potentiell redox-abhängig sekretiertes Protein mittels gezielter Mutation und Analyse des Sekretoms und des Interaktoms.

Mithilfe der durchgeführten Arbeiten sollen redox-sensitive Proteine identifiziert werden, die im Modellsystem in C2C12 Myotuben verändert vorliegen. Diese Proteine können Rückschlüsse auf redox-vermittelte Prozesse von Skelettmuskelzellen liefern und dabei helfen, die Pathogenese des T2D besser zu verstehen. Zudem erlaubt die Sekretomanalyse, Hinweise auf die Rolle von reversiblen Cysteinoxidationen im Zusammenhang mit Proteinsekretionsprozessen zu erhalten.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräteliste

Name und Typ	Hersteller
Brutschrank	Bode Hartmann, Hamburg
DNA <i>Engine Tetrad</i> ® 2 <i>Thermocycler</i>	Bio-Rad, München
Durchlichtscanner, ViewPix 700	Biostep, Burkhardtsdorf
Feinwaage, Entris	Sartorius, Göttingen
Folienschweißgerät	Severin, Sundern
Heiz- & Magnetrührer, RCT basic IKA	Sigma-Aldrich, München
Geldokumentationssystem	Intas Science Imaging, Göttingen
Heiz- & Magnetrührer, MR-Hei	Heidolph, Schwalbach
Heizschüttler, MKR 13	Hettich Benelux, Geldermalsen, Niederlande
Laser Scanner, Typhoon 9400	GE Healthcare, München
Massenspektrometer, QExactive Plus	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Mikroskop, Axioplan	Carl Zeiss Microscopy, Jena
Mikroskop, Axiovert25	Carl Zeiss Microscopy, Jena
Mikroskop (konfokal) TCS SP8 STED 3X	Leica Microsystems, Wetzlar
Milli-Q® Integral Wasseraufbereitungssystem	Merck Millipore, Darmstadt
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific, Bremen
PAGE-Kammer, 1D-PAGE	Thermo Fisher Scientific, Bremen
pH-Meter	Mettler Toledo, Gießen
Pipetten Research Plus	Eppendorf, Hamburg
Pipetus	Hirschmann, Eberfeld
Plattenlesegerät, Multimode Detektor 880	DTX Beckman Coulter, Krefeld
Plattformschüttler, KS250 basic	Ika, Staufen
Plattformschüttler, Unimax 1010	Heidolph, Schwabach
Präzisionswaage, PCB	Kern, Balingen-Frommern
Präzisionswaage, 822	Kern, Balingen-Frommern
Probenschüttler, <i>HulaMixer</i>	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Revco Ultima CO ₂ Inkubator	Kendro Laboratory Products, Langenselbold
Semi-Dry Blotter, <i>Multiphor II</i>	Amersham Pharmacia Biotech
Spannungsgerät, Consort E815	Sigma-Aldrich, München
Spannungsgerät, EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech
Sterilbank, <i>clean air</i>	Thermo Fisher Scientific, Bremen

Tischzentrifuge, Mikro 20	Hettich, Mülheim an der Ruhr
Tischzentrifuge, Mikro 220R	Hettich, Mülheim an der Ruhr
<i>Tissue Lyser</i> LT	Qiagen, Hilden
Ultraschallbad	Bandelin, Berlin
Vakuumkonzentrator, 5301	Eppendorf, Hamburg
Zellzähler, <i>Countess II FL Automated Cell Counter</i>	Thermo Scientific, Bremen
Zentrifuge, Rotina 46 R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge, 5430 R	Eppendorf, Hamburg

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Name und Typ	Hersteller
Acrodisc MS syringe filter, 0,2 µm	Pall, Dreieich
Amicon Ultra 0,5 mL 10K	Merck, Darmstadt
Deckgläschen	Assistent, Sondheim/Rhön
Dispenser-Spitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5, 2 µL	Eppendorf, Hamburg
ESI-Emitter	New Objective, Woburn, USA
Reaktionsgefäße 15, 50 mL	Greiner, Frickenhausen
Kapillarsäule Acclaim PepMap100	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Analytische Säule Acclaim PepMapRSLC	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Kryogefäße	VWR, Darmstadt
<i>Low Bind</i> Reaktionsgefäße 0,5, 1,5, 2 µL	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10, 200, 1000 µL	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filtereinsatz 10, 200, 1000 µL	StarLab, Hamburg
PVDF-Membran Immobilon®-FL	Merck Millipore, Darmstadt
Stripetten 2, 5, 10, 25 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Ultraviolett (UV)-Transilluminator	Vilber, Eberhardzell
Zellkulturflaschen und Schalen	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.3 Chemikalien

Name	Hersteller
Aceton	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Acetonitril	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Agar	Fluka, München
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Ammoniumbicarbonat (NH ₄ HCO ₃)	Fluka, München
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
<i>Aqua Resist</i>	VWR, Darmstadt
Amplex® Red	Thermo Fisher Scientific, Bremen
BDP-FL-NHS-Ester	Lumiprobe, Hannover
Bio-Gel P6	Biorad, München
Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (Bis-Tris)	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Brefeldin A	VWR, Darmstadt
Bromphenolblau Na-Salz	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid, dehydriert	Fluka, München
<i>Complete Ultra EDTA free Mini</i> Tablette	Roche, Grenzach-Wyhlen
Coomassie Brilliant Blau G250	VWR, Darmstadt
2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat (H ₂ DCFDA)	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM), D5796, D6046, D8437	Sigma-Aldrich, Darmstadt
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM), no glucose, A1443001	Thermo Fisher Scientific, Bremen
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Sigma-Aldrich, Darmstadt
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Merck, Darmstadt
Ethanol 99,5%, vergällt	VWR, Darmstadt
Ethanol, absolut	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FBS)	Pan Biotech, Aidenbac
Formaldehydlösung 10-15% Methanol	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Magnetische Agarosepartikel GFP-Trap®_MA	Chromotek, Planegg-Martinsried
Glibenclamid (Glyburid)	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Glycerol	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES (4-2 Hydroxyethylpiperazine-1-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Darmstadt

HIS-Select® Nickel Affinity Gel	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Hygromycin B Lösung 50 mg/mL	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Roth, Karlsruhe
India Ink	Pelikan Holding, Hannover
Insulin	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Iodoacetamid	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Thermo Fisher Scientific, Bremen
IS Mountig Media DAPI	Dinova, Hamburg
Kaliumhexacyanoferrat III K3 [Fe(CN)6]	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Kupfer(II)-sulfat	Sigma-Aldrich, Darmstadt
LB Broth	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Lys-C	Promega, Mannheim
Magermilchpulver	Fluka, München
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Fluka, München
<i>Minimum Essential Medium Eagle</i> (MEM), M4526	Sigma-Aldrich, Darmstadt
MOPS	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Natriumthiosulfat Pentahydrat	Fluka, München
2-NBDG (2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-amino)-2-deoxyglucose	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
N-Ethylmaleinimid D5	Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, USA
N-Ethylmaleinimid	Fluka, München
N-Lauroylsarcosin	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Nu PAGE 4-12 % Bis-Tris Gel	Thermo Fisher Scientific
Nu PAGE 12 % Bis-Tris Gel	Thermo Fisher Scientific
Palmitat	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Paraformaldehyd extra rein	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Penicillin Streptomycin	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe
Pierce® 660 nm Protein Assay	Thermo Fisher Scientific
Pferdeserum (HS)	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Darmstadt

Probenecid	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Protein Standard Micro 1 mg BSA/mL	Sigma-Aldrich, Darmstadt
<i>Roti®-Load DNASTain</i>	Roth, Karlsruhe
Rinderalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Serva <i>Blue G</i> Lösung 1%	Serva, Heidelberg
Serva Gel N 3-12, <i>Vertical Native Gel</i> 4-16%	Serva, Heidelberg
Silbernitrat	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Thiopropyl Sepharose 6B	GE Healthcare, München
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Tricin	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Triton X 100	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Trizma base	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Trypsin	Serva, Heidelberg
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Darmstadt
ViomerRED	Biozym, Hessisch Oldendorf

3.1.4 Größenstandards

Größenstandard	Hersteller
<i>1 kb DNA Ladder</i>	Roth, Karlsruhe
<i>Page Ruler PreStained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific, Bremen

3.1.5 Antikörper

Primäre Antikörper

Spezifität	Hersteller (Bestellnr.)	Spezies	Verdünnung (Verwendung)
anti-Mif	Abcam (ab7207)	Hase (polyklonal)	1:1000 (WB) 1:100 (IF)
anti-Mif	Sigma-Aldrich (HPA003868)	Hase (polyklonal)	1:500 (WB) 1:100 (IF)
anti-Plexin B2	antibodies-online (ABIN1982763)	Schaaf (polyklonal)	1:250 (WB)
anti-LDLR	Bioss (bs-0705R)	Hase (polyklonal)	1:50 (WB)
anti-GFP	Chromotek (3h9-100)	Ratte (monoklonal)	1:1000 (WB) 1:100 (IF)

Sekundäre Antikörper

Spezifität	Hersteller (Bestellnr.)	Spezies	Verdünnung (Verwendung)
anti-rabbit IgG Alexa Fluor 555	Invitrogen (A21429)	Ziege (polyklonal)	1:5000 (WB) 1:200 (IF)
Anti-rabbit IgG Abberior STAR 635P	Abberior (2-0012-007-2)	Ziege (polyclonal)	1:200 (IF)
anti-sheep IgG Alexa Fluor 555	Invitrogen (A21436)	Esel (polyklonal)	1:5000 (WB)
Anti-rat IgG Alexa Fluor 488	Invitrogen (A21208)	Esel (polyklonal)	1:200 (IF)
Anti-rat IgG HRP- linked	Dianova (712-035-150)	Esel (polyklonal)	1:1000 (WB)

3.1.6 Plasmide und Vektoren

Plasmid	Hersteller	Verwendung
pCMV3- <i>mMif</i> (als Vorlage)	Sino Biological	Bakterielle Expression
pCMV3- <i>mMif-C-GFPSpark</i>	Sino Biological	Transfektion
pCMV3- <i>C-GFPSpark-CV</i>	Sino Biological	
pQE31	Qiagen	Bakterielle Expression

3.1.7 Primer

Die verwendeten *forward* (fw) und *reverse* (rv) Primer wurden über die Firma biomers.net bestellt.

Primer	Sequenz	Verwendung
mMif-GFP C57 rv	5'-cagagggcggaggatcgttcgtgccg-3'	Mutagenese
mMif-GFP C57 fw	5'-cggcacgaacgatccctccgccctctg-3'	
mMif-GFP C60 rv	5'-ctgtgcaggctggagagggcgcagg-3'	
mMif-GFP C60 fw	5'-cctgcgccctctccagcctgcacag-3'	
mMif-GFP C81 rv	5'-acagcaggccagacagcagcttactgtagttgc-3'	
mMif-GFP C81 fw	5'-gcaactacagtaagctgctgtctggcctgctg-3'	
mMif pQE rv	5'-attaagcttcaagcgaagtggaac-3'	Bakterielle Expression
mMif pQE fw	5'-aggatccaatcgagggaaggcctatgttcctga-3'	

3.1.8 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Puffer	Zusammensetzung
Anodenpuffer	126 g Harnstoff 35 mL Phosphorsäure (85 %) dH ₂ O (Gesamtvolumen 700 mL)
Bindungspuffer	1 M Glykolsäure 80 % Acetonitril 5 % TFA
Blockierlösung	2 % BSA 3 % <i>Skim Milk Powder</i> in 50 mL TBST
Coomassie Färbelösung	40 % EtOH 10 % Essigsäure 250 mg Coomassie in dH ₂ O
Coomassie Entfärbelösung	10 % Essigsäure in dH ₂ O
DTT	1,4 M in 100 mM NH ₄ HCO ₃
DTT für In-Gel-Verdau	7,14 µL 1,4 M DTT 995 µL 50 mM NH ₄ HCO ₃
Elutionspuffer	5 % Ammoniumhydroxid
Elutionspuffer (Nickel-NTA)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl 250 mM Imidazol 0,5 mM DTT pH 8,0
Entfärbelösung 1	30 mM Natriumthiosulfat
Entfärbelösung 2	100 mM Kaliumhexacyanoferrat
Extraktionslösung (Gelbande)	50 % TFA (aus 0,1 %iger Lösung) 50 % Acetonitril
Formaldehydlösung	2,5 % Formaldehyd in PBS
Größenstandard	<i>Page Ruler PreStained Protein Ladder</i> , Thermo Fisher Scientific, Bremen
Hinterkolbenspülung	10 % Isopropanol
IAM für In-Gel-Verdau	55 mM Iodacetamid in 50 mM NH ₄ HCO ₃
Kathodenpuffer	300 mM Aminocaprinsäure 30 mM Tris
LB-Medium	10 g/L Pepton 10 g/L NaCl 5 g/L Hefeextrakt
LC-MS Lösemittel A	0,1 % TFA
LC-MS Lösemittel B	0,1 % FA 84 % ACN
Lysepuffer	30 mM Tris Base 2 M Thioharnstoff 7 M Harnstoff 4 % CHAPS

Lysepuffer (für Bakterien)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol 0,5 mM DTT pH 8,0
MES Puffer, 20-fach konzentriert	1 M MES 1 M Tris Base 2 % SDS 20 mM EDTA pH 7,3
MOPS Puffer, 20-Fach konzentriert	1 M MOPS 1 M Tris Base 2 % SDS 20 mM EDTA pH 7,7
Probenpuffer CN, 2-fach konzentriert	100 mM NaCl 100 mM Imidazol 4 mM 6-Aminocaprinsäure 2 mM EDTA 0,02 % Ponceau S 20 % Glycerin
RIPA Puffer	50 mM Tris HCL 150 mM NaCl 0,5mM EDTA 1% NP 40 Auf 10 mL Puffer 1 Tablette <i>Complete Ultra Tablet mini</i> ohne EDTA
SDS-Probenpuffer, 4-Fach konzentriert	600 mM DTT (wurde bei Bedarf verwendet) 30 % Glycerin 12 % SDS 150 mM Tris/HCl pH 7,0 wenig Bromphenolblau
Silberfärbung Lösung A	50 % EtOH 10 % Essigsäure
Silberfärbung Lösung B	30 % EtOH 500 mM Natriumacetat 8 mM Natriumthiosulfat
Silberfärbung Lösung C	6 mM Silbernitrat
Silberfärbung Lösung D	236 mM Natriumcarbonat
Silberfärbung Lösung E	236 mM Natriumcarbonat 0,01 % Formaldehyd
Silberfärbung Lösung F	50 mM EDTA
SOB-Medium	20 g/L Pepton 5 g/L Hefeextrakt 0,5 g/L NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgSO ₄ 10 mM MgCl ₂ pH 7,0
TAE-Puffer, 50-fach konzentriert	2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA

TB-Puffer	0,75 g/L Pipes 15 mM CaCl ₂ 250 mM KCl 10,88 g/L MnCl ₂ pH 6,7
TBS, 10-fach konzentriert	100 mM Tris Base 1,5 M NaCl pH 8
TBS-T	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20
TPS-Anreicherungspuffer	50 mM HEPES 1 mM EDTA pH 7,5
TPS-Lysepuffer	8 M Urea 1 % SDS 250 mM HEPES 100 mM NEM pH 7,5
TPS-Resuspensionspuffer	8 M Urea 0,1 % SDS 250 mM HEPES pH 7,7
Trypsin Lösung	0,033 µg/µL Trypsin in 50 mM NH ₄ HCO ₃
Waschlösung A	10 mM Ammoniumhydrogencarbonat
Waschlösung B	50 % 5 mM Ammoniumhydrogencarbonat 50 % Acetonitril (v/v)
Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol 0,5 mM DTT pH 8,0

3.1.9 Software

Name	Hersteller
Image Studio Lite	LI-COR Biotechnology, Bad Homburg
ImageLab	Bio-Rad, München
LAS X	Leica Microsystems, Wetzlar
LSPFP	Molecular Proteomics Laboratory, Düsseldorf
MaxQuant	Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried
OriginPro 9.0	OriginLab, Northampton, USA
Perseus	Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried
PyMOL 1.74	Schrödinger, USA
RStudio	RStudio, USA
Tune/X-Calibur	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Zen 2011	Carl Zeiss Mikroskopie, Jena

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

Alle verwendeten Medien und das Wasser wurden vor dem Gebrauch im Autoklaven sterilisiert. Die Retransformation, Transformation, das Anfertigen der Vor- und Hauptkultur sowie die Herstellung chemokompetenter Zellen erfolgten vollständig an der Bunsenbrennerflamme unter sterilen Bedingungen. Des Weiteren wurden für die molekularbiologischen Experimente ausschließlich sterile Einwegmaterialien verwendet oder das verwendete Material vorab im Autoklaven sterilisiert. Die für die molekularbiologischen Arbeiten verwendeten Plasmide wurden über Sino Biological und Qiagen bezogen (3.1.6). Die verwendeten Enzyme und zugehörigen Puffer wurden über Thermo Fisher Scientific bezogen. Für die Selektion wurden Antibiotika Ampicillin und Kanamycin verwendet. Diese wurden zunächst als 1000-fache Stocklösungen in Wasser angesetzt (Ampicillin: 100 mg/mL, Kanamycin: 50 mg/mL).

3.2.1.1 Bakterienstämme

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden zwei unterschiedliche *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterienstämme der Firma Agilent (ehemals Stratagene) verwendet.

XL1 blue

Für die in der Arbeit durchgeführte Transformation und Amplifikation von Plasmid DNA wurde der kompetente *E. coli* Stamm XL1 *blue* verwendet. Dieser Bakterienstamm besitzt eine

Tetrazyklinresistenz und eine Mutation im EcoK-Endonukleasesystem, welche die klonierte DNA vor dem Abbau schützt.

Genotyp:

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tetr)]

BL21

Für die bakterielle Expression des Proteins Mif wurden der kompetente *E. coli* Stamm BL21 eingesetzt.

Genotyp: *fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS*

3.2.1.2 Herstellung chemokompetenter Zellen

Die Herstellung chemokompetenter Zellen wurde mit dem *E. coli* Stämmen BL21 und XL1 *blue* durchgeführt. Hierfür wurden zunächst Vorkulturen angefertigt (3.2.1.5). Anschließend wurden 100 mL SOB-Medium mit 800 µL der jeweiligen Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 200 Umdrehungen pro Minute (rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 inkubiert. Für die Bestimmung der OD wurden jeweils 200 µL der Bakteriensuspension eingesetzt. Die Messung erfolgte am Multimode Detektor (Beckman Coulter) bei 600 nm. Anschließend wurde die Bakteriensuspension vollständig in 50 mL Falkons überführt und die Zellen für 10 min bei 4 °C und 1280 x g pelletiert. Jedes Zellpellet wurde in 20 mL kaltem TB-Puffer aufgenommen, für 10 min auf Eis inkubiert und noch einmal zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 5 mL kaltem TB-aufgenommen und alle Zellen vereint. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 750 µL DMSO versetzt, um Zellschäden durch den Einfrierprozess zu verhindern. Die Zellen wurden erneut für 10 min auf Eis inkubiert und jeweils 100 µL der Bakteriensuspension in sterile, vorgekühlte 1,5 mL Reaktionsgefäße pipettiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff (– 196 °C) eingefroren und bei – 80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.1.3 Retransformation

Die Plasmide (3.1.6) wurden zunächst in sterilem Wasser nach Herstellerangaben resuspendiert und anschließend in chemokompetente XL1 *blue* transformiert, um genügend Ausgangsmaterial der Plasmide für weitere nachfolgende Versuche herzustellen. Dafür wurden 0,5 µL der Plasmid-DNA in ein steriles 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und mit 30 µL der langsam auf Eis aufgetauten XL1 *blue* Zellen auf Eis für 10 min inkubiert. Die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen erfolgte über einen Hitzeschock für 1,5 min bei 42 °C (Hanahan, 1983). Anschließend wurden die Zellen erst 5 min auf Eis inkubiert und dann auf eine LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.1.4 Transformation

Für die Transformation von Plasmiden in chemokompetente Zellen wurden Aliquots von je 100 µL chemokompetenter Zellen (XL1 *blue* oder BL21) auf Eis aufgetaut und 1 µL Plasmid-DNA hinzugefügt. Für die Transformation der PCR-Mutagenese Produkte (3.2.1.14) in chemokompetente Bakterien wurden 3 µL DNA auf 50 µL Bakteriensuspension gegeben. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte der Hitzeschock für 1,5 min bei 42 °C und eine Abkühlphase für 1–2 min auf Eis. Für die nachfolgende phänische Expression wurde der Ansatz mit 700 µL LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Dann wurden die Zellen für 2 min bei 5000 x g abzentrifugiert, erneut in 100 µL LB-Medium aufgenommen und auf selektive Agarplatten ausplattiert. Die Zellen wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.2.1.5 Vorkultur

Für die Anfertigung einer Bakterien-Vorkultur wurde zunächst pro Ansatz 3 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (1:1000) versetzt. Pro Ansatz wurden 2–3 einzelne Bakterienkolonien von der selektiven Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und im LB-Medium bei 37 °C und 200 rpm über Nacht im Heizschüttler inkubiert.

3.2.1.6 Hauptkultur

Die Hauptkultur wurde aus der Vorkultur angefertigt (3.2.1.5). Hierfür wurde die über Nacht hergestellte Vorkultur vollständig in einen Kolben mit 250 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

3.2.1.7 Plasmid-DNA-Präparation

Aus der Bakteriensuspension der Vor- bzw. Hauptkultur wurde anschließend die Plasmid-DNA unter Verwendung der kommerziell erhältlichen Kits *QIAprep Spin Miniprep* (Vorkultur) bzw. *QIAprep Spin Maxiprep* (Hauptkultur) von Qiagen nach Herstellerangaben isoliert. Die DNA wurde in 50 µL (Vorkultur) bzw. 400 µL (Hauptkultur) autoklaviertem Wasser eluiert.

3.2.1.8 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der DNA in wässriger Lösung wurde am Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) am Biologisch Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ), Genomics & Transcriptomics Labor (GTL) durchgeführt. DNA absorbiert Licht bei 260 nm. Zur Bestimmung der DNA-Reinheit wurde der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 280 nm bestimmt. Ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 steht hierbei für eine hohe Reinheit. Aus der ermittelten Absorption wurde über das Lambert-Beersche Gesetz die Konzentration der DNA-Lösung berechnet, wobei für doppelsträngige DNA ein Wert von 1 einer Konzentration von 50 mg/mL entspricht. Als Referenzmessung wurde der jeweils verwendete Elutionspuffer eingesetzt. Die Konzentration wurde

über eine Doppelbestimmung ermittelt, und es wurden jeweils 1,5 µL des Eluats für die Messung aufgetragen.

3.2.1.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung und Amplifikation eines genau definierten Bereichs eines DNA-Strangs mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase. Die ausgewählten Primer (3.1.7) legen die DNA-Sequenz fest, die vervielfältigt werden soll. Die Durchführung der PCR erfolgte in einem DNA *Engine Tetrad*® 2 *Thermocycler* (BioRad). Die zusammengeführten Komponenten für den PCR-Ansatz sind in Tabelle 1 und der Ablauf des verwendeten PCR-Programms in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 1: Komponenten der PCR Reaktion

Komponente	Volumen [µL]
5x <i>Phusion</i> HF Puffer	10
10 mM dNTPs	1
Primer mMif pQE fw (10 pmol/µL)	1,25
Primer mMif pQE rv (10 pmol/µL)	1,25
<i>Template</i> Plasmid DNA: pCMV3-mMif (50 ng)	5
<i>Phusion</i> DNA Polymerase (2 U/µL)	0,5
H ₂ O	26

Tabelle 2: PCR-Program

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98	30 s	1
Denaturierung	98	10 s	32
Primer Anlagerung	66	15 s	
Elongation	72	30 s	
Finale Extension	72	7 min	1
Abkühlen	4	∞	

5 µL des PCR-Produktes wurden als Kontrolle, zur Überprüfung der richtigen Größe über ein 2 %-iges Agarosegel aufgetrennt (3.2.1.12).

3.2.1.10 DNA Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen DNA-Basensequenzen, den Erkennungssequenzen. Der Restriktionsverdau wurde unter den vom Hersteller (Thermo Fisher Scientific) angegebenen Reaktionsbedingungen (Puffer- und Temperaturwahl) durchgeführt. Die

einzelnen Komponenten des Restriktionsverdau I und II sind in der nachfolgenden Tabelle 3 und Tabelle 4 zusammengefasst. Der Verdau erfolgte bei 37 °C für 2 h.

Tabelle 3: Komponenten des Restriktionsverdau I

Komponente	Volumen [μL]
PCR Produkt (3.2.1.9)	45
Puffer BamHI 10x	6
Enzym HindIII (10 U/ μL)	3
Enzym BamHI (10 U/ μL)	3
H ₂ O	3

Tabelle 4: Komponenten des Restriktionsverdau II

Komponente	Volumen [μL]
pQE31 (1 μg)	10
Puffer BamHI 10x	8
Enzym HindIII (10 U/ μL)	4
Enzym BamHI (10 U/ μL)	4
H ₂ O	54

Im Anschluss wurde der Restriktionsverdau gestoppt. Dafür wurden die Proben für 20 min bei 80 °C inkubiert. Der geschnittene Vektor pQE31 wurde unter Verwendung der thermosensitiven alkalischen Phosphatase FastAP für 10 min bei 37 °C nach Herstellerangaben dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung verhindert die Religierung des Vektors nach Zugabe der Ligase und des *Inserts* (*mMif*) im nachfolgenden Ligationsschritt.

Die Restriktion der DNA führt zu einem für die jeweilige DNA-Sequenz und das verwendete Enzym charakteristischen Schnittmuster, dass anschließend durch die Auftrennung der Restriktionsprodukte im Agarosegel sichtbar wird. Die gewünschte Bande wurde aus dem Agarosegel unter UV-Licht ausgeschnitten und eine Gelextraktion durchgeführt (3.2.1.12).

3.2.1.11 DNA Ligation

Die Vektor-DNA (pQE31) wurde mit der doppelten Menge der *Insert*-DNA (*mMif*) ligiert. Die einzelnen Komponenten der Ligation sind in der Tabelle 5 aufgeführt. Die Ligation erfolgte bei 4 °C über Nacht. Das Enzym wurde im Anschluss für 10 min bei 65 °C inaktiviert und der Ansatz in kompetente XL1 *blue* Bakterienzellen transformiert (3.2.1.4).

Tabelle 5: Ligation

Komponente	Volumen [μL]
Insert DNA (mMif)	8
Vektor DNA (pQE31)	4
Puffer T4 Ligase	1,5
T4 DNA Ligase (5 U/ μL)	1,5

3.2.1.12 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Analyse der DNA-Präparationen, des Restriktionsverdaus (analytisch) und zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten (präparativ) wurde die DNA in Agarosegelen, in Abhängigkeit ihrer Fragmentgröße, aufgetrennt. Hierfür wurde Agarose (0,8 %, und 2 %, (w/v)) in 1-fachem TAE-Puffer unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, wobei die Konzentration des Agarosegels von der Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente bestimmt wurde. Kleinere DNA Fragmente (< 500 bp) wurden in 0,8 %-igen und größere Fragmente (< 500 bp) in 2 %-igen Agarosegelen aufgetrennt. Nach dem Abkühlen der Agarose auf ca. 60 °C wurde die Agaroselösung in Gelkammern gegossen und für ca. 40 min bei RT polymerisiert. Anschließend wurden die Gelkammern in Laufkammern gesetzt. Als Laufpuffer wurde 1-facher TAE-Puffer verwendet. Die DNA-Proben wurden mit der entsprechenden Menge 6x Ladepuffer *Roti® Load DNastain* (Roth) für eine finale 1-fache Konzentration versetzt. Dieser Ladepuffer enthält einen Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA-Doppelhelix interkaliert und durch UV-Licht bei 525 nm emittiert. Neben den Proben wurde zusätzlich der DNA-Marker *Ikb DNA Ladder* (Roth), der mit *Roti® Load DNastain* (Roth) versetzt wurde, aufgetragen. Anschließend wurden die DNA-Proben für 40 min bei 100 V im Agarosegel aufgetrennt und anschließend mit einem Geldokumentationssystem (Intas) aufgenommen, wobei durch die Bestrahlung mit UV-Licht die aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar gemacht wurden. Die analytischen Gele wurden im Anschluss verworfen. Aus den präparativen Gelen wurden die gewünschten DNA-Banden mit einem Skalpell auf einem UV-Transilluminator (Vilber) ausgeschnitten und mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel gelöst und aufgereinigt. Die DNA wurde in 100 μL autoklaviertem Wasser eluiert.

3.2.1.13 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach der Sanger-Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Für die Sequenzierung wurden die aufgereinigten PCR-Produkte zuvor auf Konzentrationen zwischen 150 bis 600 ng/ μL verdünnt und 2 μg für die Sequenzierung eingesetzt. Die Sequenzierung wurde von Mitarbeitern des GTL, BMFZs der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

3.2.1.14 Mutagenese

Bei der gerichteten DNA-Mutagenese werden gezielt Veränderungen in eine DNA-Sequenz eingebracht, um die Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Protein Struktur und Funktion zu

untersuchen. Dafür wurde in den Versuchen die murine *Mif* (*mMif*) DNA-Sequenz als Vorlage verwendet und gezielt im Basentriplet der drei in *mMif* enthaltenen Cysteine die Nucleotidbasen Guanin zu Cytosin mutiert, wodurch in jeder Mutante anstatt des jeweiligen Cysteins (Position: C57, C60, C81) ein Serin entsteht. Die für die Mutagenese verwendeten synthetischen Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma biomers.net erworben.

Bei der durchgeführten gerichteten DNA-Mutagenese handelte es sich um eine *Single-Primer Reactions IN Parallel* (SPRINP) Mutagenese (Edelheit *et al.*, 2009). Hierbei werden zunächst für jede *mMif-GFP*-Mutante zwei einzelne Primer (*forward* und *reverse*) (3.1.7) in zwei parallelen PCR-Reaktionen verwendet. Die PCR-Reaktionskomponenten und das verwendete PCR-Programm sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 6: Komponenten der PCR-Mutagenese-Reaktionen

Komponente	Volumen für PCR 1 [μ L]	Volumen für PCR 2 [μ L]
Template Plasmid DNA: pCMV3- <i>mMif</i> -C- <i>GFPSpark</i> (~ 500 ng)	0,84	0,84
Forward Primer <i>mMif-GFP</i> (100 pm)	0,5	-
Reverse Primer <i>mMif-GFP</i> (50 pm)	-	0,5
DMSO (100 %)	1	1
dNTPs (2 mM)	2,5	2,5
<i>Phusion</i> HF DNA Polymerase (2 U/ μ L)	0,5	0,5
5x <i>Phusion</i> HF Puffer	5	5
H ₂ O	14,66	14,66

Tabelle 7: PCR-Programm für die Mutagenese

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98	2 min	1
Denaturierung	98	30 s	30
Primer Anlagerung	60	60 s	
Elongation	72	4,5 min	
Finale Extension	72	8 min	1
Abkühlen	4	∞	1

Im Anschluss wurden die beiden PCR-Produkte miteinander kombiniert und bei 95 °C denaturiert. Das nachfolgende langsame Abkühlen der PCR-Produkte ermöglichte die zufällige Anlagerung der parentalen und der neu synthetisierten DNA-Stränge (Tabelle 8).

Tabelle 8: Denaturierung und langsames Abkühlen für die Anlagerung der PCR-Produkte

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1	95	5
2	90	1
3	80	1
4	70	0,5
5	60	0,5
6	50	0,5
7	40	0,5
8	37	∞

Danach folgte der Verdau mit der TypIIM Restriktionsendonuklease DpnI, die spezifisch methylierte nicht-mutierte parentale Plasmid-DNA (Ausgangsplasmid) zerschneidet (Lacks und Greenberg, 1975). Im letzten Schritt wird das mutierte Plasmid in XL1 *blue* transformiert, auf Selektionsplatten ausgestrichen (3.2.1.4) und am nächsten Tag Bakterienkolonien gepickt für eine Vorkultur (3.2.1.5). Die aus den Bakterien der Vorkultur isolierte DNA wurde über eine Sequenzierung (3.2.1.13) analysiert und die erfolgreiche Mutagenese bestätigt.

3.2.1.15 Bakterielle Expression und Aufreinigung des Zielproteins Mif

Für die bakterielle Expression des Zielproteins Mif wurde die Bakterienzelllinie BL21 verwendet. Mittels PCR wurde *mMif* in den Vektor pQE31 eingebacht und vervielfältigt (3.2.1.9). Danach folgte der Restriktionsverdau (3.2.1.10) und die Auftrennung im Agarosegel (3.2.1.12). Die Zielbande wurde ausgeschnitten und die DNA extrahiert. Als nächster Schritt wurde eine Ligation (3.2.1.11) und anschließend eine Transformation des Konstrukts in BL21 Bakterien (3.2.1.4) durchgeführt. Die transformierten Bakterien wurden auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von der Selektionsplatte wurden einzelne Bakterienkolonien gepickt, Vorkulturen angefertigt und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert (3.2.1.5).

Am darauf folgenden Tag wurde die Vorkultur (3 mL) vollständig in einen 250 mL Kolben überführt und mit 100 mL LB-Medium vermischt. Die Bakterienkultur wurde bei 37 °C und 220 rpm inkubiert bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2. Für die Bestimmung der OD wurden jeweils 200 µL der Bakteriensuspension verwendet. Die Messung erfolgte am Multimode Detektor (Beckman Coulter) bei 600 nm. Anschließend wurde die Expression von *mMif* durch die Zugabe von 0,15 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Direkt nach der Induktion wurde eine Probe entnommen (Nullprobe) und eine weitere nach 1 h. 2 h nach der Induktion wurde eine weitere Probe entnommen und die Bakterienkultur vollständig abgeerntet. Dafür wurde die Zellsuspension in 50 mL Falkons überführt und für 20 min bei 7.197 x g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 1,2 mL Lysepuffer resuspendiert. Nach der Zugabe einer Spatelspitze Lysozym wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgten zwei Durchläufe der

Ultraschallbehandlung, wobei die Zellen auf Eis je 6 x für 10 s mit 130 W und 20 s Pause zwischen den Pulsen aufgeschlossen wurden. Danach wurde die Zellsuspension bei 10.000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde weiter verwendet. Als nächstes folgte die Aufreinigung des Zielproteins mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC). Das Prinzip der IMAC basiert auf der Affinität von zweiwertigen Metallionen zu den Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Histidin auf der Proteinoberfläche, in wässriger Lösung (Cheung *et al.*, 2012). Das Zielprotein Mif enthält in seiner Sequenz einen Polyhistidin-Schwanz (His-Markierung), der an das für die IMAC verwendete Säulenmaterial *HIS-Select® Nickel Affinity Gel* (Sigma-Aldrich) bindet. Dafür wurden 100 µL der Säulenmatrix in ein steriles Eppi überführt und mit Lysepuffer eingewaschen. Der Überstand des Zelllysates wurde auf die gewaschenen Matrix pipettiert und für 1 h bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Im Anschluss folgten zwei Waschschrte mit 400 µL Waschpuffer und vier Elutionsschritte mit jeweils 100 µL Elutionspuffer, wobei die Probe zwischen jedem Schritt für 1 min bei 1000 x g zentrifugiert wurde. Eluat 1 und 2 sowie 3 und 4 wurden jeweils vereint. Zur Überprüfung der Produktreinheit wurden die Proben über eine SDS-PAGE (3.2.3.6) aufgetrennt und das Gel anschließend mit Silbernitrat gefärbt (3.2.3.7). Außerdem wurden die Eluate 1 und 2 mittels LC-MS/MS analysiert.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

Sämtliche zellbiologische Arbeiten wurden nach entsprechenden Sicherheitsrichtlinien im Zellkulturlabor der Sicherheitsstufe S1 unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle für die Zellkultur verwendeten Verbrauchsmaterialien waren steril verpackte Einwegartikel oder wurden vor der Verwendung in einem Autoklaven (120 °C, 1 bar für 20 min) mit Wasserdampf sterilisiert. Alle verwendeten Zelllinien wurden regelmäßig auf den Befall von Mykoplasmen getestet.

3.2.2.1 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Skelettmuskelzellen verwendet. Zum einen die murine Myoblasten-Zelllinie C2C12 (*European collection of Cell Cultures*) und zum anderen primäre humane Skelettmuskelzellen (SkMC) (*European collection of Cell Cultures*).

C2C12

Die C2C12 Zelllinie ist eine adhärent wachsende immortalisierte Zelllinie, die aus einem Subklon von Myoblasten im Jahre 1977 von den Wissenschaftlern Saxel und Yaffe isoliert wurde (Yaffe und Saxel, 1977). Die murine Myoblastenzelllinie C2C12 C3H wurde von der Firma Sigma-Aldrich erworben (Bestellnummer: 91031101-1VL, Chargennummer: 12F005; Passage: 14). Die C2C12 Myoblasten wurden in *high glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich) versetzt mit 20 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert und das Medium alle 2–3 Tage gewechselt. Unter hohen Serumkonditionen (20 % FCS) proliferieren die C2C12

Muskelzellen und unter niedrigen Serumbedingungen (2 % Pferdeserum) differenzieren sie innerhalb von fünf Tagen von Myoblasten zu mehrkernigen Myotuben aus (Abbildung 7).

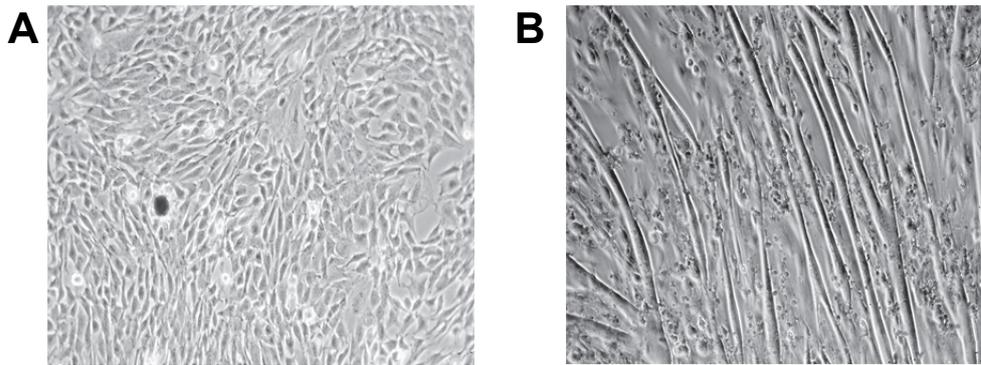


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Aufnahmen von C2C12 Skelettmuskelzellen. Unter hohen Serumbedingungen (20 % Serum) proliferieren die Myoblasten (A) und unter niedrigen Serumbedingungen (2 % Serum) differenzieren sie innerhalb von fünf Tagen zu Myotuben aus (B).

SkMC

Die primären humanen Skelettmuskelzellen (SkMC) wachsen adhärent und wurden ursprünglich aus dem Wadenmuskel (*Musculus gastrocnemius*) eines 26-jährigen männlichen europäischen Spenders mit einem *Body mass index* (BMI) von 22 isoliert. Die humanen SkMC wurden von der Firma PromoCell erworben (Bestellnummer: C-12530; Chargennummer: 403Z033.8; Passage: 2, Verdopplungszeit: 47,4 h). Als Kultivierungsmedium wurde α -modifiziertes *Minimum Essential Eagle Medium* (MEM) und DMEM F-12 Medium (1:1) mit einem Supplement-Mix (PromoCell) versetzt mit 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Das Medium wurde alle 2–3 Tage erneuert. Wie die C2C12 Zellen lassen sich die SkMC unter niedrigen Serumbedingungen (2 % Pferdeserum) innerhalb von fünf Tagen zu Myotuben ausdifferenzieren.

3.2.2.2 Zellkultivierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Muskelzellen wurden alle 2–3 Tage bei einer Konfluenz zwischen 50–60 % passagiert. Hierzu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit *Phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen und mit einer 0,25 %-igen Trypsin-EDTA-Lösung für 10 min im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen von dem Kulturgefäßboden ablösten. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von vorgewärmtem Kultivierungsmedium gestoppt und die Zellsuspension bei 800 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in frischem Kulturmedium aufgenommen und die Zellen neu in einer Verdünnung von 1:10 ausgesät. Das Passagieren der humanen SkMC erfolgte ohne Abzentrifugieren. Für die Ausdifferenzierung von Myoblasten zu vielkernigen Myotuben wurden die Skelettmuskelzellen zunächst bis zu einer Konfluenz von 80–90 % kultiviert. Über den Medienwechsel von DMEM mit 20 % FCS zu DMEM versetzt mit 2 % Pferdeserum (HS) erfolgte die Induktion der Ausdifferenzierung. Das Differenzierungsmedium wurde

über alle 2–3 Tage ersetzt, bis die Myotuben vollständig zu Myoblasten ausdifferenziert waren. Die humanen SkMC wurden in α -modifiziertem MEM mit 2 % HS ausdifferenziert.

3.2.2.3 Stabile Zelltransfektion

Für die Transfektion von C2C12 Zellen wurde der Vektor pcDNA3-EGFP (MPL) als Kontrollvektor für die Transfektionseffizienz verwendet. Des Weiteren wurden die Konstrukte pCMV3-C-GFPspark, pCMV3-mMif-C-GFPspark (Sino Biological) und daraus erstellte Konstrukt-Cysteinmutanten pCMV3-mMif-C-GFPspark-C57, -C60 und -C81 (3.2.1.14) über Transfektion in die Zellen eingebracht. Dafür wurden 1×10^5 C2C12 Zellen pro 6-Well ausgesät (Konfluenz: 20–30 %). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit dem ViomerRED Reagenz (Biozym) nach Herstellerangaben transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurde das Kultivierungsmedium der transfizierten Zellen gewechselt und mit 0,5 mg/mL Hygromycin B Lösung versetzt (= Selektionsmedium). Nach einer 2–3-wöchigen Selektion wurden die transient transfizierten Zellen mittels Durchflusszytometrie an der Core Flow Cytometry Facility (CFCF) der Uniklinik Düsseldorf des Instituts für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) mit freundlicher Unterstützung von Frau Katharina Raba sortiert.

3.2.2.4 Kryokonservierung

Die langfristige Lagerung von Zelllinien über mehrere Jahre erfolgt in flüssigem Stickstoff bei -196°C . Die Zugabe von der Schutzsubstanz Dimethylsulfoxid (DMSO) verhindert die Bildung von Eiskristallen im Zellinneren beim Einfrierprozess. Die Zellen wurden, wie im Abschnitt 3.2.2.2 beschrieben, vom Kulturgefäß abgelöst und bei $800 \times g$ für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 1 mL Kulturmedium versetzt mit 10 % DMSO resuspendiert und in ein 2 mL Kryogefäß überführt. Die Kryogefäße wurden über Nacht bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff (-196°C) bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Für das erneute in Kultur nehmen der Zellen wurden diese zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und mit frischem vorgewärmtem Kultivierungsmedium vermischt. Anschließend wurde das toxische DMSO durch einmaliges Abzentrifugieren der Zellen für 5 min bei $800 \times g$ abgetrennt. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und in eine T-175 Zellkulturflasche ausgesät. Die humanen SkMC wurden ohne vorherige Zentrifugation direkt mit frischem SkMC-Kulturmedium versetzt und in eine T-75 Flasche ausgesät.

3.2.2.5 Palmitatbehandlung der Zellen

Für die Palmitatbehandlung wurde zunächst eine 100 mM Palmitat-Stocklösung angefertigt. Dafür wurde das Palmitat in 80 % Ethanol bei 56°C für 30 min unter ständigem Schütteln gelöst. Die Stocklösung wurde anschließend direkt weiter verwendet oder bei -20°C weggefroren. Für die Behandlung wurde das Differenzierungsmedium (2 % HS mit 2 % BSA versetzt) auf 37°C erhitzt und die Palmitat-Stocklösung hinzugegeben und für 3 h unter ständigem Schütteln im Medium gelöst. Die

finale Palmitat-Konzentration im Medium lag somit bei 500 μM . Als Kontrolle wurden die Zellen mit der gleichen Menge des Lösungsmittels Ethanol behandelt.

3.2.2.6 Bestimmung der Zellviabilität, der Zellzahl und der Transfektionseffizienz

Trypanblau ist ein acider Farbstoff, der durch defekte Zellmembranen in das Zytosol toter Zellen eindringen kann, wo dessen Anion an Zellproteine bindet und die Zellen dunkelblau färbt. Von vitalen Zellen wird der Farbstoff nicht aufgenommen und sie erscheinen im mikroskopischen Bild hell. Bei langer Einwirkzeit ist ein Anstieg von toten Zellen zu beobachten, da Trypanblau zytotoxisch wirkt. Mit diesem Test kann die Zellvitalität bestimmt und gleichzeitig die Gesamtzellzahl ermittelt werden. Anhand der ermittelten Gesamtzellzahl konnte eine definierte Zelldichte durch die Zugabe von Kultivierungsmedium eingestellt und die Zellen entsprechend ausgesät werden. Hierzu wurden gleiche Volumina (10 μL) Zellsuspension und 10 μL der 0,25 % Trypanblau-Lösung gemischt und mit dem Zellzähl-Gerät *Countess II FL* (Thermo Fisher Scientific) die Zellzahl und Vitalität der Zellen bestimmt. Des Weiteren wurde die *Countess II FL* für die Bestimmung der Transfektionseffizienz von C2C12 Zellen, die mit einem GFP-Expressionskonstrukt transfiziert wurden, verwendet (3.2.2.3).

3.2.2.7 Bestimmung der zellulären Glukoseaufnahme

Für die Analyse der zellulären Glukoseaufnahme wurde das fluoreszenzmarkierte Desoxyglukose-Analog 2-NBDG (Cayman) verwendet. Die auf 96-*Well* Platten ausgesäten konfluenten Skelettmuskelzellen wurden für 5 Tage ausdifferenziert und anschließend für 16 h mit 500 μM Palmitat oder als Kontrolle mit der gleichen Menge des Lösungsmittels Ethanol behandelt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 1 h in glukosefreiem DMEM ohne Zusätze wie FCS oder Penicillin/Streptomycin inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Teil der Zellen anschließend bei 37 °C für 30 min mit 100 nM Insulin behandelt. Im Anschluss wurde 50 μM 2-NBDG gelöst in PBS für 20 min bei 37 °C auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um das freie, nicht aufgenommene 2-NBDG zu entfernen. Es wurden pro *Well* 100 μL PBS auf die Zellen gegeben und die Fluoreszenzintensität von zellulärem 2-NBDG bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emmissionswellenlänge von 535 nm mit einem Multimode Detektor DTX 880 (Beckman Coulter) gemessen.

3.2.2.8 Detektion von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Für den Nachweis der verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), induziert durch die Palmitatbehandlung, wurden zwei unterschiedliche Assays verwendet. Dafür wurden 1×10^4 Zellen pro *Well* auf Greiner 96-*Well*-Platten ausgesät und am Folgetag die Differenzierung zu Myotuben induziert. Nach fünf Tagen Ausdifferenzierung wurden die Zellen entweder für 16 h mit 500 μM Palmitatlösung oder als Kontrolle mit der gleichen Menge von dem Lösungsmittel Ethanol behandelt. Extrazelluläres H_2O_2 wurde unter Verwendung des N-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex[®] Red) Assays (Thermo Fisher Scientific) nachgewiesen. Die

Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Amplex[®] Red ist ein farbloses Substrat, das mit H₂O₂ in einer 1:1-Stöchiometrie reagiert und stark fluoreszierendes Resorufin bildet.

Für den Nachweis von intrazellulärem ROS wurde 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat (H₂DCFDA) (Thermo Fisher Scientific) verwendet und der Assay nach Herstellerangaben durchgeführt. Das H₂DCFDA wird intrazellulär aufgenommen, und die Acetat-Gruppen werden durch intrazelluläre Esterasen abgespalten. Durch die Produktion von ROS in der Zelle wird das nicht-fluoreszierende H₂DCFDA oxidiert, sodass das stark fluoreszierende 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) entsteht.

Die Fluoreszenzdetektion wurde bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 535 nm mit einem Multimode Detektor DTX 880 (Beckman Coulter) bestimmt.

3.2.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

3.2.3.1 Probenvorbereitung für die Proteomanalyse

Für die Untersuchung des zellulären Proteoms wurde das Standardprotokoll des Molecular Proteomics Laboratory (MPL), Düsseldorf verwendet. Die Zellkulturschalen wurden auf Eis gestellt und das Kultivierungsmedium abgenommen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 4 °C-kaltem PBS gewaschen. Das PBS wurde vollständig entfernt und die Zellen in 1 mL PBS von der Kulturschale mit einem Gummischaber abgelöst. Dann wurde die Zellsuspension vollständig in ein zuvor ausgewogenes 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Pelletierung der Zellen erfolgte über einen Zentrifugationsschritt für 5 min bei 800 x g und 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen, das Gewicht des Zellpellets bestimmt und dieses weiter aufgearbeitet oder bei – 80 °C gelagert. Für den Aufschluss der Zellen wurde pro mg Pelletgewicht 3 µL Lysepuffer hinzugegeben, die Proben wurden mit einer 5 mm Stahlkugel versetzt und für 1 min bei 40 Hz mit einem *Tissue Lyser* aufgeschlossen. Es folgte die Behandlung der Proben im Ultraschallbad 6 x 10 Sek und anschließend eine 15 minütige Zentrifugation bei 4 °C und 16.000 x g. Das gewonnene Zelllysate wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, der Aufschluss mit 2 µL Lysepuffer pro mg Pelletgewicht wiederholt und das so gewonnene Zelllysate mit dem bereits gewonnenen vereint.

3.2.3.2 Probenvorbereitung für die Analyse von reversiblen Cysteinmodifikationen

Die Analyse von redox-abhängigen reversiblen Cysteinmodifikationen erfolgte nach dem Protokoll von Guo *et al* (Guo *et al.*, 2014). Dafür wurden die Myoblasten zunächst für fünf Tage zu Myotuben ausdifferenziert.

Um eine palmitatinduzierte Insulinresistenz zu erzeugen, wurden die Zellen dreimal mit frischem Differenzierungsmedium gewaschen und anschließend mit 500 µM Palmitatlösung für 16 h über Nacht behandelt.

Am nächsten Tag wurden die Myotuben zweimal mit 4 °C kaltem entgasten PBS gewaschen und auf jede Zellschale wurde 1 mL kalte entgaste 20 %-ige Tichloressigsäure (TCA) in Wasser (vol/vol) gegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeerntet und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde mit 10 % und dann mit 5 % TCA in Wasser (vol/vol) gewaschen. Das Zellpellet wurde im Anschluss in 400 µL entgastem TPS-Zellysepuffer, in dem 100 mM *N*-Ethylmaleinimid (NEM) enthalten war, resuspendiert und die Zellen für 1,5 h bei 37 °C und ständigem Schütteln im Dunkeln lysiert. Nach der Zellyse wurden die Proben mit 1,6 mL 100 %-igem Aceton (– 20 °C) versetzt, vermischt und bei – 20 °C über Nacht weggefroren. Am darauf folgenden Tag wurden die Proben zunächst für 10 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 500 µL 70 %-iger wässriger Acetonlösung gewaschen, vermischt und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Nach erneuter Abnahme des Überstands wurden die Proben für ca. 5 min offen an der Luft getrocknet, um das Aceton vollständig zu entfernen. Danach wurden die Proben in TPS-Resuspensionspuffer gelöst. Anschließend wurden die Proben über die Zugabe von 2,86 µL der 1,4 M DTT-Stammlösung (final: 10 mM) für 1 h bei 37 °C unter ständigem Schütteln reduziert. Die Abtrennung von überschüssigem DTT aus den Proben erfolgte über Ultrafiltration (Amicon-Filter, 10 kDa Ausschluss), bei 14.000 x g und 14 °C für ca. 30 min mit 8 M Harnstoff gelöst in Wasser und anschließend mit kaltem Wasser. Die Proben wurden bei 1000 x g für 5 min von den Filtern eluiert und mit 50 µL TPS-Bindungspuffer versetzt. Es folgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung anhand des Pierce 660 nm Protein Assays (3.2.3.5). Es wurden 100 µg Protein für die nachfolgende Anreicherung und Reduktion eingesetzt. Nach der Zugabe von 1,7 µL der 1,4 M DTT-Stammlösung (final: 20 mM DTT) und 1,2 µL der 10 %-igen SDS-Stammlösung (final: 0,1 % SDS) wurden die Proben auf die nach Herstellerangaben vorbereitete Thiopropyl Sepharose 6B Matrix (GE Healthcare) gegeben. Die Proben wurden für 2 h unter ständigem Schütteln mit der Sepharose inkubiert, und anschließend folgten jeweils fünf Waschschrte mit den vier in Wasser gelösten Waschpuffern: I. 8 M Harnstoff, II. 2 M Natriumchlorid, III. 80 % Acetonitril mit 0,1 % TFA und IV. 25 mM HEPES. Anschließend wurden 50 µL SDS-Probenpuffer hinzugefügt und die Proben 20 min unter ständigem Schütteln bei 42 °C inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Proben über einen Zentrifugationsschritt für 1 min bei 1000 x g in ein frisches Reaktionsgefäß von der Thiopropyl Sepharose eluiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei – 20 °C eingefroren.

3.2.3.3 Probenvorbereitung für die kombinierte Sekretom- und Proteomanalyse

Für die Analyse der Sekretom- und Proteomproben wurden die C2C12 Myotube für fünf Tage zu Myotuben ausdifferenziert.

Die Behandlung mit der Fettsäure Palmitat erfolgte für die globale Sekretom- und Proteomanalyse wie zuvor in Abschnitt 3.2.2.5 beschrieben. Nach der 16-stündigen Behandlung mit 500 µM Palmitat oder als Kontrolle mit dem Lösungsmittels Ethanol über Nacht wurden die Zellen am nächsten Tag fünfmal

mit serumfreiem Medium gewaschen, um die Menge von potenziellen Kontaminanten aus dem Serum zu reduzieren und für weitere 5 h in serumfreiem Medium bei 37 °C inkubiert.

Des Weiteren wurden die C2C12 Zellen im Rahmen der Arbeit mit verschiedenen Inhibitoren von unterschiedlichen Sekretionsmechanismen behandelt. Für die Behandlung der Zellen mit Brefeldin A wurde zunächst eine Stocklösung angefertigt. Dafür wurden 5 mg Brefeldin A in 1 mL Ethanol (100 %) gelöst und bei –20 °C bis zur Verwendung gelagert. Für den Versuch wurden C2C12 Myotube fünfmal mit serumfreiem Medium gewaschen und anschließend mit 1 µg/mL Brefeldin A in serumfreiem Medium für 5 h inkubiert. Die Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren der nicht klassischen Proteinsekretion Glyburid und Probenecid erfolgte nach dem gleichen Prinzip. Hier wurden die Zellen entweder mit 2,5 µM Glyburid oder 2 µM Probenecid für 5 h in serumfreiem Medium inkubiert.

Für die Analyse wurde das konditionierte Medium (Sekretom) abgenommen, für 5 min bei 4 °C und 1000 x g zentrifugiert und anschließend sterilfiltriert (Porengröße: 0,2 µm, *Acrodisc MS syringe filter*), um mögliche Zelltrümmer und tote Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Proteine im konditionierten Medium über die Zugabe von 50 % (w/v) TCA und 0,1 % *N*-Lauroylsarcosin in Wasser (¼ Volumen der Sekretomprobe) für 1 h bei 4 °C gefällt. Die gefällten Proteine wurden dann über einen Zentrifugationsschritt bei 7.100 x g, für 10 min bei 4 °C sedimentiert und anschließend mit eiskaltem Aceton gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Proteinpellet für ca. 5 min bei Raumtemperatur (RT) luftgetrocknet und in 50 µL Lysepuffer resuspendiert. Die Zellernte und der Zellaufschluss erfolgten anschließend wie in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben.

3.2.3.4 Immunpräzipitation von GFP und GFP-Fusionsproteinen

Für die Untersuchung des Mif-GFP Fusionsproteins und den drei daraus generierten Cysteinmutanten (C57, C60, C81) wurde ein Protokoll für die Immunpräzipitation (IP) etabliert. Die Zellernte erfolgte wie bereits zuvor beschrieben (3.2.3.1). Anstelle des Standard-Lysepuffers wurde hier RIPA-Lysepuffer, der mit NEM versetzt war (final: 100 mM NEM), für den Aufschluss verwendet. Für die Analyse des Mif-GFP-Fusionsproteins und potentiellen Interaktionspartnern wurde die IP von GFP-Fusionsproteinen unter Verwendung von GFP-Trap®_MA (Chromotek) durchgeführt. GFP-Trap®_MA verwendet Alpaca-Antikörperfragmente, die kovalent an die Oberfläche von magnetischen Agarose-Partikeln gekoppelt sind. Die IP wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die Elution erfolgte mit 100 µL SDS-Probenpuffer. Anschließend wurden die Eluatproben bei –20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.3.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe wurde der Pierce™ 660 nm Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Dieser Assay basiert auf der Bindung eines Farbstoff-Metall-Komplexes an Proteine unter sauren Bedingungen, die zu einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums führt. Der gut sichtbare Farbumschlag basiert auf einer

Deprotonierung des Farbstoffes im niedrigen pH-Bereich, was durch die Interaktion mit positiv geladenen Seitenketten der Aminosäuren begünstigt wird. Der PierceTM 660 nm Protein Assay deckt den Konzentrationsbereich von 50 µg/mL bis 2,0 mg/mL ab. Die Messung wurde für jede Probe in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Hierzu wurden zunächst jeweils 10 µL der BSA-Standardreihe (0 ng/µL bis 2000 ng/µL) sowie 10 µL der Probe in eine *non-binding* 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurde sowohl zur Standardreihe als auch zu den Proben 150 µL des Pierce-Assay-Reagenz hinzugegeben und die Platte für 5 min bei RT inkubiert. Die Messung wurde mit einem Multimode Detektor DTX 880 (Beckman Coulter) bei einer Wellenlänge von 660 nm durchgeführt und die Proteinkonzentration anhand der BSA-Standardkurve bestimmt.

3.2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine analytische Methode zur Auftrennung von ionischen Molekülen in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe (Laemmli, 1970; Raymond und Weintraub, 1959; Weber und Osborn, 1969). Das Gel wirkt dabei wie ein Molekularsieb. Das in den Versuchen zugegebene anionische Detergenz Sodiumdodecylsulfat (SDS) überlagert die Eigenladung der Proteine, wodurch sie eine negative Ladung erhalten und eine Auftrennung im Gel nach ihrer Molekülgröße möglich wird (Shapiro *et al.*, 1967). Für die SDS-PAGE wurden 10- und 12-Well Bis-Tris-Fertiggele (4–12 % und 12 %) von Invitrogen verwendet. Es wurden je nach Versuch 1–30 µg Protein mit SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend bei 40 °C für 10 min denaturiert. Als Nächstes wurden die Proben auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt, zentrifugiert und die Probe vollständig in die Geltaschen pipettiert. Als Proteinstandard diente der *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific). Der 20-fach konzentrierte Laufpuffer (MOPS oder MES) wurde 1:20 mit Wasser verdünnt, und die Proben wurden für 15 min bei 50 V und anschließend bei 200 V für ca. 60 min im Gel aufgetrennt. Alternativ wurde die Auftrennung nach dem vollständigen Einlaufen der Proben in das Sammelgel (ca. 10 min, 50 V) abgebrochen und die Proteine mittels Silbernitrat gefärbt.

3.2.3.7 Silberfärbung

Im Rahmen der Arbeit wurde die Silberfärbung für die sensitive Detektion von Proteinen in Polyacrylamid-Gel genutzt (Heukeshoven und Dernick, 1988). Der Ablauf der Silberfärbung ist in Tabelle 9 zusammengefasst. Pro Lösung wurden 50 mL angesetzt. Anschließend wurden die Gele eingescannt und je nach Fragestellung weiter verwendet.

Tabelle 9: Der Ablauf der Silberfärbung, Lösungen und Inkubationszeiten.

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

3.2.3.8 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Um quantitative Aussagen über die auf das Gel geladene Proteinmenge von Sekretom- und Proteomproben treffen zu können, wurde im Rahmen der Validierung der Trunkierungsanalyse je 20 µg Protein mit 5 pM BDP-FL-NHS-Ester-Lösung (Lumiprobe) markiert. BDP-FL-Ester ist ein aminreaktiver Fluoreszenzfarbstoff, der kovalent an die ε-Aminogruppe von Lysin bindet und so die Markierung von Proteinen ermöglicht. Der Farbstoff ist neutral und besitzt eine geringe Molekülmasse. Zunächst wurden die Proben mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, und anschließend wurden die Proben wie unter 3.2.3.6 beschrieben per Gelelektrophorese aufgetrennt und eine Western Blot Analyse (3.2.3.9) durchgeführt. Anschließend wurde die Proteinmarkierung mit einem Laserscanner (Typhoon 9400) bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und einer Emissionswellenlänge von 520 nm detektiert.

3.2.3.9 *Semidry* Western Blot und Immunodetektion

Für den spezifischen Nachweis und die Quantifizierung einzelner Proteine wurde *Semidry* Western Blotting in Verbindung mit Immunodetektion durchgeführt. Dafür wurden im Anschluss an die Auftrennung in der SDS-Gelelektrophorese (3.2.3.6) Proteine auf eine Trägermembran transferiert und anschließend gezielt mit einem Antikörper nachgewiesen und ggf. unter Verwendung der Software Image Studio Lite (Licor) bzw. ImageLab (BioRad) quantifiziert.

Der Western Blot ist eine Methode zur Übertragung von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran (z.B. Nitrozellulose oder Polyvinylidenfluorid). Auf der Membran kann das Protein anhand einer Immunodetektion identifiziert und charakterisiert werden (Mahmood und Yang, 2012). Die Adsorption der Proteine auf die Membran erfolgt über ionische und polare Wechselwirkungen, wobei das Auftrennungsmuster aus der SDS-Gelelektrophorese erhalten bleibt und die Proteine für die Immunodetektion zugänglich werden.

Die Übertragung der Proteine erfolgte mittels Elektrotransfer für 1 h bei 2 mA pro cm² Gelfläche. Dafür wurden zwei Filterpapiere in Anodenpuffer eingeweicht und auf die Anodenplatte gelegt. Auf die Filterpapiere wurde die mit 100 % Isopropanol aktivierte PVDF-Membran platziert und darauf das Polyacrylamidgel. Auf das Gel wurden zwei weitere Filterpapiere eingeweicht in Kathodenpuffer platziert. Mögliche Luftblasen wurden entfernt und im Anschluss an den einstündigen Transfer wurde die Membran für 30 min in Blockierlösung auf einem Schüttler inkubiert, um die verbliebenen freien unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Im nächsten Schritt wurde die Blockierlösung entfernt und 1 mL des Primärantikörpers (3.1.5) verdünnt in Blockierlösung hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal für 5 min mit TBS-T gewaschen und die Membran wurde für 1,5 h mit dem zugehörigen Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper (3.1.5) verdünnt in Blockierlösung im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte von je 5 min mit TBS-T und zwei mit TBS. Die Membran wurde für ca. 40 min im Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet und anschließend mit einem Laserscanner (Typhoon 9400) bei einer entsprechenden Wellenlänge angeregt und detektiert.

3.2.3.10 India Ink Färbung

Das Anfärben von Proteinen auf Membranen erfolgte über India Ink (Pelikan Holding) Färbung. Hierbei wurden die getrockneten PVDF Membranen für eine Stunde in einer 1:1000 Lösung aus India Ink und PBS-T inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran dreimal mit PBS-T gewaschen und eingescannt.

3.2.3.11 Immunozytochemische Färbung

Um eine immunozytochemische Färbung der Skelettmuskelzellen durchzuführen, wurden diese auf Deckgläsern in 24-Well Platten ausgesät und anschließend für fünf Tage ausdifferenziert. Dafür wurde zunächst die in Wasser gelöste 0,1 %ige Poly-L-Lysinlösung 1:10 mit PBS verdünnt und die Deckgläser mit je 250 µL der Lösung für 2 h bei RT beschichtet. Danach wurde das Poly-L-Lysin abgenommen und die Deckgläser für 20 min mit UV-Licht behandelt. Es folgten drei Waschschrte mit PBS, bevor 1 x 10⁵ Zellen pro Well ausgesät wurden. Am nächsten Tag wurde die Differenzierung der Zellen für fünf Tage über den Wechsel von Kultivierungsmedium zu Differenzierungsmedium induziert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µM Palmitatlösung oder als Kontrolle mit dem Lösungsmittel Ethanol behandelt. Ab hier konnte die weitere Vorbereitung der Zellen für die immunozytochemische Färbung außerhalb der Sterilbank erfolgen. Es folgte ein Waschschrte mit PBS, und die Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) gelöst in PBS für 15 min bei RT fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, und es folgte ein Blockierungsschrte, bei dem die Zellen in einer Lösung aus 10 % FCS, 0,6 % Triton X-100 und PBS für 20 min bei RT unter ständigem Schütteln inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen mit dem Primärantikörper (1:100 verdünnt in PBS) über Nacht bei 4 °C inkubiert (3.1.5 Primärantikörper). Am darauf folgenden Tag wurde der Primärantikörper abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen für 1 h im Dunkeln bei RT mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (1:500 verdünnt in PBS) (3.1.5 Sekundärantikörper) und DAPI (1:50) inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte mit PBS, um überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen. Zuletzt wurden die Zellen mit dem Eindeckelmedium *ProlongDiamond Antifade Mountant* (Life Technologies) auf einen Objektträger aufgebracht und dunkel bei RT gelagert.

3.2.3.12 Mikroskopie

Die Bilder wurden am Mikroskop Axioplan (Zeiss) mit einem 40x Objektiv aufgenommen. Das Mikroskop ist mit einer Quecksilberdampflampe und einer Digitalkamera ausgestattet. Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm AxioVision (Zeiss) und ZEN 2012 (Zeiss).

3.2.3.13 Konfokal Mikroskopie

Des Weiteren wurden Aufnahmen der immunozytochemisch gefärbten Skelettmuskellzellen am konfokalen hochauflösenden System Leica TCS SP8STED 3X mit einem 40x Objektiv am *Center for Advanced Imaging* (CAi) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Sebastian Hänsch angefertigt. Die hohe Auflösung der Bilder wird hierbei über *Stimulated Emission Depletion* (STED) erzielt. Die Bildbearbeitung wurde mittels der Software LAS X (Leica) durchgeführt.

3.2.4 LC-MS/MS Analysen

3.2.4.1 Probenvorbereitung für die LC-MS/MS Analyse

Für die LC-MS/MS Analyse der Proben wurden, wenn nicht anders angegeben, eine Aufreinigung über SDS-PAGE im Bereich des Sammelgels durchgeführt und die Proteine anschließend mit Silbernitrat gefärbt (3.2.3.7). Die gefärbten Proteinbanden wurden dann mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Verdauröhrchen überführt. Wenn jedoch einzelne Proteine einer bestimmten Größe gezielt analysiert werden sollten, wurden eine Auftrennung der Proben über den gesamten Bereich des Gels (1 h, 200 V) durchgeführt, dieses anschließend mit Silbernitrat gefärbt und nur die Bande auf der gewünschten Höhe mit einem Skalpell ausgeschnitten und weiter prozessiert. Für die nachfolgende Entfärbung der Gelbanden wurden die Entfärbelösungen A und B im Verhältnis 1:1 für ca. 1 min auf die Gelbanden gegeben. Anschließend wurde die Bande je dreimal mit Waschlösung A und B im Wechsel für 5 min inkubiert. Als nächstes wurden die Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge bei 30 °C für ca. 30 min getrocknet.

3.2.4.2 Reduzieren und alkylieren

Im nächsten Schritt der Probenvorbereitung für die LC-MS/MS Analyse wurden die eingetrockneten Gelstücke mit 50 µL 10 mM DTT in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat bei 56 °C für 45 min reduziert. Anschließend wurde die überschüssige Lösung abgenommen, zügig 55 mM Iodacetamid

(IAM) in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat hinzugegeben und die Proben für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Es folgten zwei weitere alternierende Waschschrte mit Waschlösung A und B. Dann wurden die Banden erneut in der Vakuumzentrifuge bei 30 °C für ca. 30 min eingetrocknet. Die eingetrockneten Gelstücke konnten bei – 20 °C gelagert oder direkt verdaut werden.

Für die durchgeführten markierungsbasierten Experimente wurde anstatt mit IAA mit NEM-D5 alkyliert. Wenn NEM-D5 als Alkylierreagenz verwendet wurde, mussten die Banden zunächst zweimal mit je 50 µL 10 mM Tris (pH 7,0) gewaschen werden. Die Alkylierung folgte dann mit 50 µL 50 mM NEM-D5 in 20 mM Tris für 30 min im Dunkeln bei RT.

3.2.4.3 In-Gel Verdau

Für den Verdau von Proteinen wurde eine 0,033 µg/µL konzentrierte Trypsinlösung erstellt, wovon 4 µL und 4 µL Waschlösung A pro Bande verwendet wurden. Für eine detaillierte Analyse des potentiell redox-sensitiven Proteins Mif wurde ein Kombinationsverdau mit je 4 µL Lys-C und 4 µL Trypsin pro Bande, beide 0,033 µg/µL konzentriert, durchgeführt. Nach Zugabe der Verdauenzyme wurden die Verdauröhrchen verschlossen und für ca. 16 h über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert.

3.2.4.4 Peptidextraktion

An nächsten Tag wurden die Peptide aus der Gelbande extrahiert. Dafür wurden die Gelstücke mit 30 µL Extraktionslösung (Acetonitril und 0,1 %ige TFA gelöst in Wasser, 1:1) versetzt und 15 min mit Ultraschall behandelt. Der Überstand wurde abgenommen und in ein HPLC-Probengefäß überführt. Daraufhin wurde erneut 20 µL Extraktionslösung auf die Gelbande gegeben und diese im Ultraschallbad für 15 min sonifiziert. Der Überstand wurde mit dem vorherigen vereint. Anschließend wurde die Probe in der Vakuumzentrifuge bei 30 °C für ca. 4 h eingetrocknet, um das für die LC-MS/MS Analyse störende Acetonitril zu entfernen. Die trockene Probe konnte entweder direkt für die LC-MS/MS-Analyse in 0,1 % TFA gelöst in Wasser aufgenommen oder bei – 20 °C gelagert werden.

3.2.4.5 Massenspektrometrie

Die zuvor aufgearbeiteten Peptidgemische wurden mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert. Hierbei wurde die Methode des *bottom-up* Ansatzes verwendet, bei dem zunächst Peptide über einen Datenbankabgleich identifiziert und im Anschluss Proteinen zugeordnet werden. Da im Rahmen der Arbeit komplexe Peptidgemische untersucht wurden, ist dem Massenspektrometer eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) vorgeschaltet. Auf die LC-MS/MS-Analyse folgte eine detaillierte bioinformatische Datenanalyse der gemessenen Proben.

3.2.4.6 Flüssigkeitschromatographie

Für die massenspektrometrische Analyse der Probe wurde das komplexe Peptidgemisch zunächst über eine HPLC aufgetrennt. Hier wurde ein Ultimate 3000 HPLC-System (Dionex/Thermo Fisher Scientific) verwendet. Es wurden zunächst 15 µL der Probe bei einer Flussrate von 6 µL/min unter Verwendung von 0,1 % TFA als mobile Phase über den *Autosampler* auf eine Vorsäule geladen (Acclaim PepMap C18, 100 µm Innendurchmesser, 3 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße, 2 cm Länge). Anschließend wurde die Probe auf einer analytischen Säule (Acclaim PepMap C18, 75 µm Innendurchmesser, 2 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße, 25 cm Länge) bei einer Flussrate von 300 nL/min und einem Gradienten von 4–40 % Lösemittel B aufgetrennt. Die gewählte Gradientenlänge ist abhängig von der Komplexität der analysierten Probe. Eine Gradientenlänge von 60 min wurde für weniger komplexe Proben verwendet. Hierzu zählten Proben der Interaktionspartnerstudie von Mif, Proben in denen aufgereinigtes Protein identifiziert werden sollte sowie Proben der einzelnen Gelbandenfraktionen für den Nachweis von proteolytischen Proteintrunkierungen. Standardmäßig wurde jedoch für hoch komplexe Peptidgemische eine Gradientenlänge von 120 min (Lösemittel A: 0,1 % TFA, Lösemittel B: 84 % ACN, 0,1 % FA) verwendet. Im Anschluss an den Gradienten folgten ein Spül- und dann ein Equilibrierungsschritt von 60 min. Die Teilschritte der verwendeten Gradienten sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 dargestellt. Im Anschluss wurden die Proben über eine Nanoelektrospray-Ionisationsquelle in das Massenspektrometer eingebracht.

Tabelle 10: Teilschritte des HPLC-Programms (60-minütige Probenauftrennung).

Zeit [min]	Anteil an B [%]	Flussrate [µl/min]	Schritt
0–10	4	0,3	Beladen der Vorsäule
10–12	4–10	0,3	Beladen der analytischen Säule
12–65	10–40	0,3	Linearer Gradient
65–69	95	0,3	Spülen und equilibrieren
69,5–70	4	0,3	
71–75	95	0,4	
75,5–80	4	0,4	
81–85	50	0,4	
85,5–90	96	0,4	
95,5–120	4	0,4	

Tabelle 11: Teilschritte des HPLC-Programms (120-minütige Probenaufftrennung).

Zeit [min]	Anteil an B [%]	Flussrate [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Schritt
0–15	4	0,3	Beladen der Vorsäule
15–78	10–20	0,3	Beladen der analytischen Säule
78–130	20–40	0,3	Linearer Gradient
130–137	95	0,3	Spülen und equilibrieren
141–145	50	0,4	
145,5–150	96	0,4	
150,5–153	4	0,4	
153–158	96	0,4	
158,5–180	4	0,4	

3.2.4.7 Massenspektrometrische Analyse

Für die massenspektrometrische Analyse wurde das Hybridgerät QExactive plus (Thermo Fisher Scientific) verwendet, das einen Quadrupol als Massenfilter und eine Orbitalfalle als Analysator verwendet. Das Gerät ist mit einer nano-ESI-Quelle ausgestattet (+ 1.400 Volt Sprühspannung, Silica Tip Emitter) und *online* mit einem nano HPLC-System gekoppelt.

Für die Aufzeichnung von Vorläuferionenspektren wurden Vorläuferionen in der Orbitalfalle gesammelt und analysiert. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Massenspektrometrische Parameter für die LC-MS/MS Analysen mit der QExactive Plus.

Parameter	Wert
Spray Spannung (+)	1,4 kV
Temperatur des <i>ion transfer tube</i>	250 °C
Polarität	positiv
Kollisionsgas	Stickstoff
Normalisierte Kollisionsenergie	30 %
Fragmentierungsmethode	HCD
MS Auflösung	70.000
Automatic Gain Control (MS)	3.000.000
MS/MS Scan Bereich	200–2.000 m/z
MS/MS Auflösung	17.500
Automatic Gain Control (MS/MS)	100.000

Parameter	120-minütiger HPLC-Gradient	60-minütiger HPLC-Gradient
TopN	10	20
MS Scan Bereich	350–2.000 m/z	200–2.000 m/z
Maximale Ionenzeit MS	80 ms	50 ms
Maximale Ionenzeit MS/MS	60 ms	50 ms
Breite des Ionenfensters für MS/MS	2 m/z	4 m/z
Ausschlusszeit eines Ions nach Aufnahme eines MS/MS-Spektrums	100 s	10 s
Ladeausschluss	1, > 3	1, > 5

3.2.4.8 Bioinformatrische Datenanalyse

3.2.4.8.1 Ratiometrische Auswertung der Fluoreszenzanalyse

Für die Analyse der Glukoseaufnahme und der Bildung von ROS wurde die Fluoreszenzintensität über einen DTX 880 Multimode Detektor ermittelt. Die detektierten Signalintensitäten der Western Blot Experimente wurden über die Software Image Studio Lite bzw. ImageLab bestimmt. Die weiterführende Datenauswertung der Analysen erfolgte unter Verwendung von Excel 2010 bzw. mittels RStudio anhand eines R-Skriptes (MPL) zur Bestimmung der statistischen Signifikanz über eine *significance analysis of microarrays* (SAM) auf T-Test Basis (Tusher *et al.*, 2001) und für eine Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) mit anschließendem multiplen Vergleichstest nach Tukey. Als Signifikanzgrenze wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ verwendet.

3.2.4.8.2 Massenspektrometrische Proteinidentifizierung

Je nach Herkunft der Proben, Aufarbeitung und Komplexität wurden unterschiedliche Strategien der bioinformatrischen Datenanalyse angewandt.

Die Identifizierung und Quantifizierung von Peptiden und Proteinen, wurde anhand der MaxQuant Software (Max Planck Institut für Biochemie, Planegg) und dem implementierten Such-Algorithmus Andromeda soweit nicht anders angegeben unter Verwendung der Standardparameter durchgeführt. Die verwendete Programmversion sowie die verwendeten Proteom-Datenbanken aus der *UniProt Knowledgebase* (KB) für die untersuchten murinen Zellen (*mus musculus*) sind in der Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Zusammenfassung der verwendeten MaxQuant- und Perseus-Versionen sowie der UniProt KB Proteindatenbanken.

Studie	MaxQuant	Datenbank	Perseus
Zelluläres Proteom C2C12	1.6.1.0	02.11.2016 (49.838 entries)	1.5.5.3
C2C12 Redox-Proteom	1.5.3.8	26.01.2016 (16.754 entries)	1.5.2.6
Proteom/Sekretom-Vergleich, Brefeldin A-Sekretomstudie C2C12	1.5.5.1	02.11.2016 (49.838 entries)	1.5.5.3
Sekretomstudie C2C12 (+Palmitat)	1.6.1.0	02.11.2016 (49.838 entries)	1.5.5.3
Sekretomstudie C2C12 (+Glyburid/+Probenecid)	1.6.1.0	18.01.2018 (52.548 entries)	1.5.5.3
Mif-Interaktionsstudie C2C12	1.6.1.0	18.01.2018 (52.548 entries); GFP-fasta	1.5.5.3

Für die Untersuchung der Gesamtproteome und Sekretome wurden folgende Parameter bei der Suche berücksichtigt: Protease für den Proteinverdau: Trypsin (Schnittstelle hinter den Aminosäuren Arginin und Lysin) und maximal zwei überlesene Schnittstellen. Für die Analyse der Sekretome wurde zusätzlich die Option der semitryptischen Schnittstellenspezifität ausgewählt. Des Weiteren wurde für die Suchen die Carbamidomethylierung an Cysteinen ($m/z = 57,021$) als feste Modifikation und die Oxidation am Methionin ($m/z = 15,9949$) sowie die Acetylierung am Protein N-Terminus ($m/z = 42,0106$) als variable Modifikation verwendet.

Für die Untersuchung von differenziellen oxidativen Cysteinmodifikationen wurden die Standardparameter von MaxQuant verwendet, jedoch wurden hier als variable Modifikation an Cysteinen Carbamidomethyl und NEM ($m/z = 125,0467$) ausgewählt. Die Datensätze der untersuchten Behandlungszustände (+ Palmitat/Lösungsmittelkontrolle) wurden getrennt voneinander auf die Mittelwerte der LFQ Intensitäten der zellulären Proteome der jeweiligen Gruppe ($n = 5$, Gruppe: + Palmitat/Kontrolle) normalisiert, die nicht über die TPS-Matrix aufgearbeitet wurden.

Für die markierungsbasierte Studie mit NEM/NEM-D5 wurde als Suchparameter neben der variablen Modifikation NEM am Cystein zusätzlich noch NEM-D5 ($m/z = 130,079$) ausgewählt. Weiterhin wurde für die markierungsbasierte Studie sowie für die Untersuchung der potentiellen Interaktionspartner neben Trypsin das Enzym Lys-C für die Suchen berücksichtigt. Im Gegensatz zu Trypsin kann Lys-C auch Lysine spalten, denen ein Prolin folgt.

Weiterhin wurde für die erste Suche eine Vorläuferion-Massentoleranz von 20 ppm gewählt und die identifizierten Peptide wurden dann für die Rekalibrierung mittels der in MaxQuant integrierten *software lock mass* verwendet (Cox *et al.*, 2011). Für die nachfolgende Hauptsuche wurde eine Vorläuferion-Massentoleranz von 4,5 ppm und eine Fragmentspektren-Massentoleranz von 20 ppm gewählt. Die *false discovery rate* (FDR) wurde für Proteine und Peptide auf 1 % gesetzt. Die Quantifizierung erfolgte über die in MaxQuant implementierte markierungsfreie Quantifizierung

(*label free quantification*, LFQ) basierend auf *uniquen* und *razor* Peptiden. Dafür wurde die Einstellung *match between runs* ausgewählt. Ein weiteres Kriterium war, dass nur Proteine zugelassen wurden, für die mindestens zwei spezifische Peptide zugeordnet wurden.

3.2.4.8.3 Quantitative Auswertung MS-basierter Daten

Nach der Datenbank basierten MaxQuant-Suche und Quantifizierung erfolgte die weiterführende Datenanalyse anhand der Perseus Software (Tabelle 13). Die Proben wurden nach ihrer Zugehörigkeit gruppiert und die Proteinliste nach folgenden Kriterien gefiltert: potenzielle Kontaminante (Maxquant Kontaminantenliste), *reverse*-Einträge, Identifizierung *by site*, mindestens zwei identifizierte Peptide und in mindestens vier von fünf Replikaten innerhalb einer Gruppe identifiziert.

Die LFQ-Intensitäten wurden logarithmisch (Basis: 2) transformiert. Fehlende Werte wurden vor der weiteren statistischen Analyse basierend auf den Werten der Normalverteilung (*width* = 0,3; *down shift* = 1,8) imputiert (Cox *et al.*, 2014). Um potentielle Veränderungen der detektierten Proteinabundanzen zu untersuchen, wurde eine *significance analysis of microarrays* (SAM) auf Basis eines zweiseitigen T-Tests durchgeführt (FDR = 0,05; $S_0 = 0,1$). Hierbei beschreibt der *fold change* die Differenz der Mittelwerte der logarithmierten Intensitäten.

3.2.4.8.4 Anreicherungsanalysen

Um weiterführend involvierte Signalwege und Zellkompartimente zu ermitteln, wurden die identifizierten Proteine weitergehend annotiert und folgende kategoriale Informationen hinzugefügt: *Gene Ontology* (GO) *Biological Process* (GOCC), *Cellular Compartment* (GOCC), *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) und *Simple Modular Architecture Research Tool* (SMART). Basierend auf den Protein-assoziierten Annotationen wurde eine eindimensionale (1D) Anreicherungsanalyse durchgeführt (Cox und Mann, 2012). Die Anreicherungs-assoziierten p-Werte wurden mit Hilfe der Methode von Benjamini und Hochberg korrigiert und die angepassten p-Werte angegeben (Benjamini, 1995).

Die zweidimensionale (2D) Anreicherungsanalyse der Annotationen wurde basierend auf den Differenzen der mittleren Intensitäten mittels Perseus berechnet (angepasster p-Wert < 0,01). Sowohl die 1D als auch die 2D Anreicherungsanalyse erfolgte über die ermittelten Proteinabundanzen der kategorieassoziierten Proteine.

Alternativ wurde eine Anreicherungsanalyse nach dem exakten Fisher-Test durchgeführt, die sich auf die Anzahl der kategorieassoziierten Proteine bezieht, die sich zwischen den untersuchten Gruppen unterscheiden.

3.2.4.8.5 Datenbank-basierte Sekretomanalyse

Für die weiterführende Sekretomanalyse wurden die identifizierten Proteine mit Informationen aus der UniProt KB Datenbank über Signalpeptide und Transmembrandomänen annotiert. Des Weiteren wurde das Vorkommen von Signalpeptiden über das Vorhersageprogramm SignalP 4.1 (Petersen *et*

al., 2011) unter Verwendung der Standardparameter für Eukaryoten untersucht. Die Analyse wurde sowohl anhand des ersten Eintrags jeder Proteingruppe sowie weiterführend auch für alle Einträge pro Proteingruppe durchgeführt.

3.2.4.8.6 Untersuchung proteolytischer Prozessierung von sekretierten Proteinen

Um das Vorkommen von proteolytischer Prozessierung der sekretierten Proteine zu untersuchen, wurde das R-Paket *Lysate and Secretome Peptide Feature Plotter* (LSPFP) Version 1.0.0, kostenlos verfügbar über das *Comprehensive R Archive Network* (CRAN) innerhalb der R-Umgebung (Version 1.0.143, *The R Foundation for statistical computing*) verwendet (Grube *et al.*, 2018). LSPFP wurde entwickelt, um die Analyse von Daten auf Peptid-Ebene für die Identifizierung von potentiell proteolytisch veränderten Proteinen zu erleichtern. Dafür verwendet es die von MaxQuant ausgegebene Peptid-Datei und plottet die Position der identifizierten Peptide innerhalb der gesamten Proteinsequenz des jeweiligen Proteins für jede analysierte Probe. Die Peptid-Diagramme beinhalten Informationen über: Peptidsignalintensität (Farbcodierung), Position der Peptide in der Aminosäuresequenz, mögliche Schnittstellen, Proteinummer, Gencode, Proteinname, Anzahl der identifizierten Peptide pro Protein. Des Weiteren werden semitryptische Schnittstellen angezeigt, um potenzielle proteolytische Schnittstellen zu detektieren. Zudem verbindet das LSPFP Programm die Peptiddaten mit assoziierten Protein-Informationen aus der UniProt KB Datenbank. Dazu gehören Informationen über die Sekundärstruktur, die Proteintopologie (extrazellulär, zytoplasmatisch, transmembran) und das Vorhandensein von Signalpeptiden.

4. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von redox-abhängigen Prozessen unter physiologischen Bedingungen mithilfe der Proteomanalyse. Aus diesem Grund wurde auf ein etabliertes Zellmodellsystem der Insulinresistenz von murinen C2C12 Skelettmuskelzellen zurückgegriffen. Bei diesem Modellsystem ist bekannt, dass die Behandlung ausdifferenzierter Myotuben mit der Fettsäure Palmitat (C16:0) zur Bildung physiologischer Mengen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt.

4.1 Palmitatinduzierte Insulinresistenz: Murine Skelettmuskelzellen als Modellsystem für die Untersuchung physiologischer ROS-Effekte

ROS entstehen bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse. Beispielsweise konnte über die Induktion einer Insulinresistenz von Skelettmuskelzellen eine chronisch-erhöhte Bildung von ROS beobachtet werden (Tangvarasittichai, 2015). Der Skelettmuskel ist das primäre Gewebe für die insulininduzierte Glukoseaufnahme. Folglich spielen hier Veränderungen des Metabolismus wie die Ausbildung einer Insulinresistenz, ausgelöst durch Erkrankungen oder physikalische Stressoren, für den gesamten Organismus eine wichtige Rolle.

Im Rahmen der Arbeit wurden für die Etablierung eines Modellsystems zur Untersuchung physiologischer Redoxprozesse die murine C2C12 Skelettmuskelzelllinie sowie primäre humane Skelettmuskelzellen (SkMC) von einem männlichen europäischen Spender mit einem *Body-Mass-Index* (BMI) von 22 verwendet. Für die Versuche wurden die Skelettmuskelzellen, sogenannte Myoblasten, innerhalb von fünf Tagen zu Myotuben ausdifferenziert. Um einen möglichen negativen Einfluss der Palmitatbehandlung auf die Viabilität der Zellen auszuschließen, wurde anschließend die Zellviabilität über eine Trypanblau-Färbung untersucht.

Die Zellviabilität der palmitatbehandelten C2C12 Myotuben lag bei $99,3 \pm 0,8 \%$ ($n = 5$) und der Lösungsmittelkontrolle Ethanol bei $99 \pm 1,3 \%$ ($n = 5$). Es wurde keine signifikante Veränderung der Zellviabilität nach Palmitatbehandlung detektiert (Anhang: Abbildung 37). Auch für die primären humanen SkMC zeigte die Untersuchung, dass die Palmitatbehandlung die Zellviabilität nicht signifikant beeinflusste, denn diese lag für die Lösungsmittelkontrolle bei $98,2 \pm 2,4 \%$ ($n = 4$) und nach Palmitatbehandlung bei $97,2 \pm 2,2 \%$ ($n = 4$) (Anhang: Abbildung 38).

Um den physiologischen Effekt der Palmitatbehandlung hinsichtlich der Insulinresistenz und der damit verbundenen verringerten Glukoseaufnahme zu untersuchen, wurden die verwendeten Skelettmuskelzellen mit Hilfe eines fluoreszierenden Glukoseanalogons 2-NBDG untersucht (Abbildung 8).

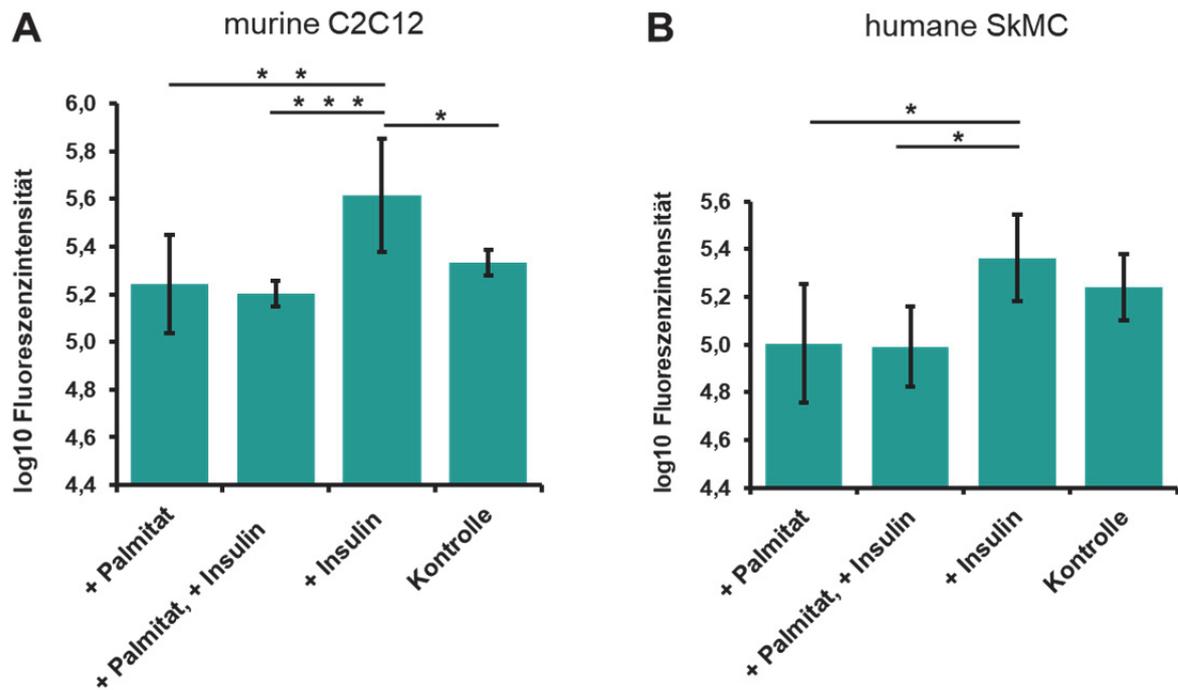


Abbildung 8: Messung der Glukoseaufnahme von murinen und humanen Myotuben anhand des fluoreszierenden Glukoseanalogons 2-NBDG. Die ausdifferenzierten Skelettmuskelzellen wurden mit 500 μ M Palmitat (+ Palmitat), mit 100 nM Insulin (+ Insulin) und erst mit Palmitat und anschließend mit Insulin (+ Palmitat, + Insulin) behandelt (n=6). Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem Lösungsmittel Ethanol inkubiert wurden. A) Die Glukoseaufnahme der murinen C2C12 Myotuben wird durch die Zugabe von Insulin im Vergleich mit den Kontrollen signifikant erhöht (p-Wert = 0,014). Die Behandlung der Zellen mit Palmitat führt im Vergleich zu insulinbehandelten Kontrollzellen zu einer deutlichen Reduktion der Glukoseaufnahme (p-Wert = 0,003). Weiterhin lässt sich die reduzierte Glukoseaufnahme nach der Palmitatbehandlung auch durch die Zugabe von Insulin nicht wieder erhöhen (p-Wert = 0,001). B) Die Untersuchung primären humanen SkMC zeigt, dass palmitatbehandelten Zellen im Vergleich zu den insulinbehandelten Kontrollen signifikant um den Faktor 0,5 verringert ist (p-Wert = 0,017). Weiterhin lässt sich die reduzierte Glukoseaufnahme durch die Zugabe von Insulin nicht wieder erhöhen (p-Wert = 0,013), was auf eine reduzierte Insulinsensitivität hindeutet. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der logarithmierten Fluoreszenzintensitäten und die Fehlerbalken die Standardabweichung der logarithmierten Intensitäten. Die Sterne markieren einen p-Wert * \leq 0,05; ** \leq 0,01; *** \leq 0,001.

Die Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) zeigte für die murinen Myotuben einen signifikanten Unterschied zwischen den vier untersuchten Zuständen (+ Palmitat; + Palmitat/+ Insulin; + Insulin; Kontrolle) (p-Wert = 0,0008). Weiterhin konnte anhand eines Signifikanztests (Post-Hoc-Test nach Tukey) gezeigt werden, dass die Behandlung der Zellen mit 100 nM Insulin in einem signifikanten Anstieg der Glukoseaufnahme um den Faktor 2 im Vergleich zu der Kontrolle (p-Wert = 0,014) resultierte und die Behandlung mit Palmitat im Vergleich zu den mit insulinbehandelten Kontrollzellen in einer um den Faktor 0,5 verringerten Aufnahme (p-Wert = 0,003). Die reduzierte Glukoseaufnahme lässt sich auch über die Zugabe von Insulin nicht wieder herstellen (p-Wert = 0,001) (Abbildung 8 A).

Für die primären humanen SkMC konnte ebenfalls bestätigt werden, dass sich die vier untersuchten Zustände voneinander unterschieden (p-Wert = 0,0056). Eine Signifikanzanalyse (Post-hoc-Test nach Tukey) zeigte, dass die Glukoseaufnahme von palmitatbehandelten SkMC Myotuben im Vergleich zu den insulinbehandelten Kontrollen signifikant um den Faktor 0,5 reduziert war (p-Wert = 0,017). Es

zeigte sich keine signifikant veränderte Glukoseaufnahme zwischen der Kontrolle und den insulinbehandelten Zellen. Die nach der Palmitatbehandlung um den Faktor 0,4 reduzierte Glukoseaufnahme ließ sich auch durch die Zugabe von Insulin nicht wieder herstellen (p-Wert = 0,013) (Abbildung 8 B).

Die Ergebnisse der zellulären Glukoseaufnahme bestätigen für beide Modellsysteme, dass durch die Behandlung mit Palmitat eine verringerte Glukoseaufnahme der Zellen induziert wird und die Sensitivität der Skelettmuskelzellen gegenüber Insulin deutlich reduziert ist. Der Effekt von Insulin im Vergleich zu den Kontrollen scheint jedoch in den SkMC geringer zu sein als in den C2C12 Skelettmuskelzellen (Vgl. Abbildung 8 A, B).

4.2 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in palmitatbehandelten Myotuben

Das Modellsystem der palmitatinduzierten Insulinresistenz bietet die Möglichkeit, den Einfluss von ROS unter physiologischen Bedingungen zu studieren und nicht wie üblich über eine Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu simulieren. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob auch in den verwendeten murinen und humanen Myotuben die Palmitatbehandlung, wie in vergleichbaren Modellsystemen beschrieben (Kwak *et al.*, 2017; Lambertucci *et al.*, 2008; Nakamura *et al.*, 2009), eine vermehrte Bildung von ROS bewirkt. Hierfür wurden farbstoffbasierte Methoden für den ROS-Nachweis verwendet. Für die humanen und die murinen Zellen wurde der AmplexRed Assay für die Detektion von extrazellulären H_2O_2 , durchgeführt und für die murinen C2C12 zusätzlich der H_2DCFDA -Assay für den Nachweis von intrazellulären ROS.

Für die murinen C2C12 Myotuben detektieren beide Assays einen signifikanten Anstieg der ROS-Menge anhand der Zunahme der Fluoreszenz nach der Palmitatbehandlung, wodurch eine verstärkte ROS-Bildung nach Palmitatbehandlung bestätigt wird (Abbildung 9 A, B; p-Wert = 0,0008; p-Wert = 0,01). Dahingegen konnte über den AmplexRed Assay für die primären humanen SkMC nach Palmitatbehandlung kein signifikanter Anstieg der ROS-Menge gezeigt werden (Abbildung 9 C).

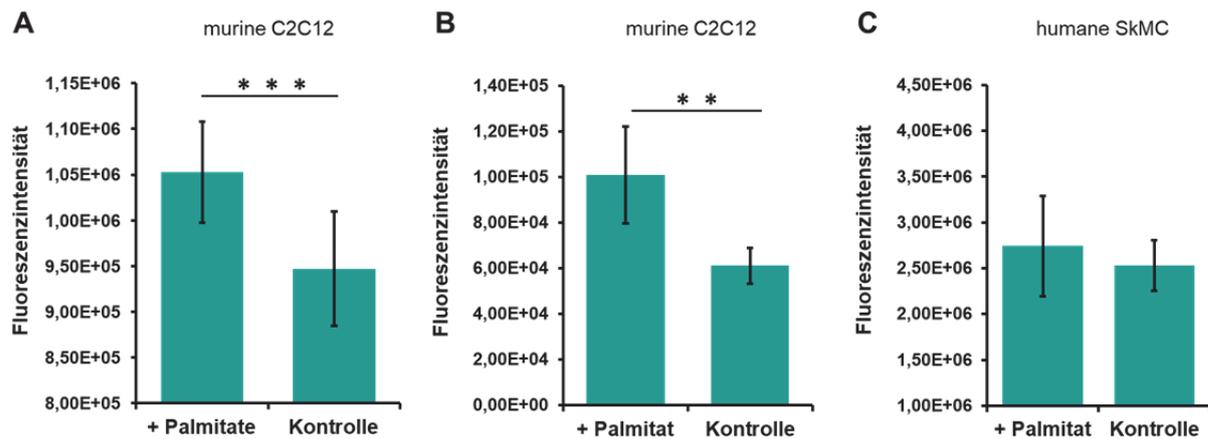


Abbildung 9: Nachweis für die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies. Der AmplexRed Assay detektiert extrazelluläres H₂O₂. A) Nach der Behandlung der murinen C2C12 Myotuben mit 500 µM Palmitat war ein signifikanter Anstieg von H₂O₂ detektierbar (p-Wert = 0,0008 ***). B) Der H₂DCFDA Assay detektiert unspezifisch intrazelluläre ROS. Auch hier zeigte sich für die C2C12 Myotuben ein signifikanter Anstieg von ROS nach Palmitatbehandlung (p-Wert = 0,01 **). C) Der AmplexRed Assay detektiert für primäre humane SkMC nach Palmitatbehandlung keinen signifikanten Anstieg von H₂O₂. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten und die Fehlerbalken die Standardabweichung der Intensitäten.

Somit zeigen die Ergebnisse, dass der palmitatinduzierte Effekt im Hinblick auf die vermehrte Bildung von ROS im Modellsystem der murinen C2C12 Myotuben im direkten Vergleich mit den primären humanen SkMC stärker ist. Folglich wurde die murine C2C12 Zelllinie für weitere Studien als Modellsystem verwendet.

4.3 Einfluss der Palmitatbehandlung auf das zelluläre Proteom von C2C12 Skelettmuskelzellen

Vor der gezielten Untersuchung ROS-induzierter Veränderungen, wurde eine globale Proteomstudie der Gesamtzelllysate (hier: zelluläre Proteome) durchgeführt. Hierzu wurden C2C12 Myotuben nach Palmitatbehandlung mithilfe der markierungsfreien Quantifizierung via LC-MS/MS untersucht (n = 5). Die Analyse der zellulären Proteome führte zur Identifizierung und Quantifizierung von 3.300 bzw. 2.371 Proteingruppen. Eine auf den detektierten Proteinabundanz basierende hierarchische Clusteranalyse, zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Kontrollen und den palmitatbehandelten Proben (Anhang: Abbildung 39). Um potentielle Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen zu detektieren, wurde eine Signifikanzanalyse auf T-Test Basis durchgeführt. Die Analyse zeigte eine palmitatinduzierte signifikante Veränderung der Proteinabundanz von 830 Proteinen, wobei 330 Proteine nach Palmitatbehandlung höher und 500 niedriger abundant waren (Abbildung 10 A, Anhang: Tabelle 21).

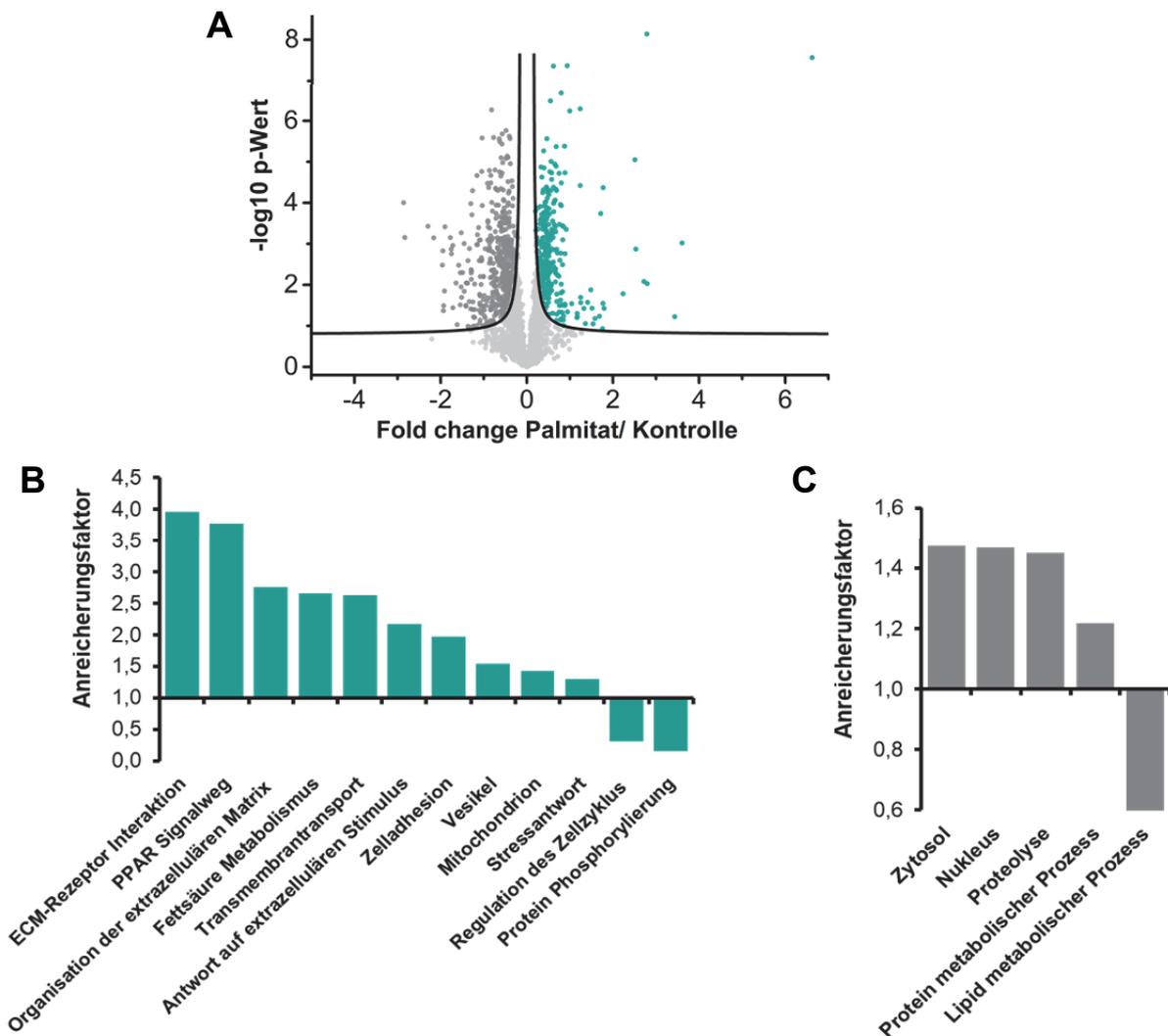


Abbildung 10: Untersuchung des Proteoms von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben. A) Differenzielle Analyse von palmitatbehandelten Zellen und der Lösungsmittelkontrolle. In Grün sind Proteine markiert, die nach Palmitatbehandlung im Proteom signifikant erhöhte Abundanzen zeigten und in Dunkelgrau Proteine, deren Abundanzen in den Kontrollproben erhöht waren. Der *Fold change* ist die Differenz der Mittelwerte der \log_2 *LFQ* Intensitäten. B) Kategoriale Anreicherungsanalyse (Fischer-Test) der GOBP und GOCC Kategorien von den 330 im Proteom nach Palmitatbehandlung signifikant erhöht abundanten (B) und der 500 im Proteom der Kontrollen erhöht abundanten Proteinen C).

Eine Anreicherungsanalyse (exakter Fischer-Test) der Protein-assoziierten *Gene Ontology* (GO) Kategorien *biological process* (GOBP) und *cellular compartment* (GOCC) zeigte, dass nach Palmitatbehandlung signifikant erhöht abundante Proteine vermehrt mit folgenden Kategorien assoziiert waren: ECM-Rezeptor-Interaktion (Anreicherungsfaktor(AF)) = 3,96; p-Wert = $3,65 \times 10^{-5}$), Vesikel (AF = 1,54; p-Wert = 0,0132), Fettsäuremetabolismus (AF = 2,66; p-Wert = 0,0216), PPAR-Signalweg (AF = 3,78; p-Wert = 0,0021) und Antwort auf extrazellulären Stimulus (AF = 2,17; p-Wert = 0,0116). Dahingegen waren Kategorien der Zellzyklusregulation (AF = 0,32; p-Wert = 0,0222) und der Proteinphosphorylierung (AF = 0,16; p-Wert = 0,0470) abgereichert (Anhang: Tabelle 18 A). In den Kontrollen konnten u.a. die assoziierten Kategorien Nukleus (AF = 1,47; p-Wert = $8,06 \times 10^{-8}$), Zytoplasma (AF = 1,75; p-Wert = $1,59 \times 10^{-17}$) und Proteolyse

(AF = 1,45; p-Wert = 0,0382) angereichert und als eine unterrepräsentierte Kategorie der Lipid metabolischer Prozess (AF = 0,52; p-Wert = 0,0398) gefunden werden (Anhang: Tabelle 18 B).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Palmitatbehandlung einen deutlichen Einfluss auf die Zusammensetzung des zellulären Proteoms von C2C12 Myotuben hat.

4.4 Analyse von redox-induzierten reversiblen Cysteinoxidationen im Proteom von C2C12 Muskelzellen

Die Analyse des *in vitro* Modellsystems der Insulinresistenz hat gezeigt, dass die Behandlung der C2C12 Myotuben mit der Fettsäure Palmitat zu einer erhöhten Bildung von ROS führt (4.2). Die mögliche Bildung reversibler oxidativer Cysteinmodifikationen, die u.a. eine wichtige Rolle für die zelluläre Signalgebung spielen, soll hier untersucht werden. Dafür wurde eine Methode zur Detektion von reversiblen Cysteinmodifikationen etabliert und auf das Modellsystem der Insulinresistenz von C2C12 Muskelzellen angewendet. Die Grundlage dieses Versuches bildete das Protokoll für die Analyse von reversibel-oxidierten Cysteinen von Guo *et al.* (Guo *et al.*, 2014). Dieses Protokoll wurde im Rahmen der Arbeit für die Aufarbeitung der Proben auf Proteinebene über eine Thiopropyl Sepharose (TPS) Matrix angepasst. Die Studie wird im Folgenden „C2C12 Redox-Proteom“ genannt. Eine schematische Darstellung der Probenaufarbeitung für die Analyse von redox-sensitiven Cysteinen ist in Abbildung 11 zusammengefasst.

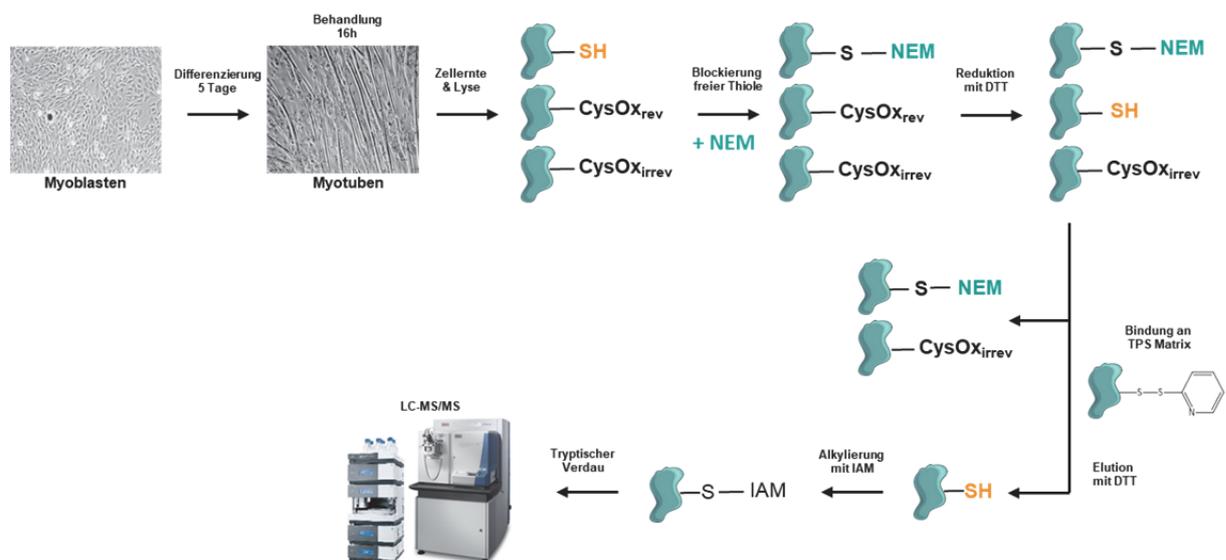


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung für die differenzielle Analyse der C2C12 Proteome im Hinblick auf die Identifizierung von redox-sensitiven Proteinen („C2C12 Redox-Proteom“). Konfluent gewachsene C2C12 Myoblasten wurden für fünf Tage zu Myotuben ausdifferenziert und anschließend über Nacht für 16 h mit 500 μ M Palmitatlösung oder als Kontrolle mit dem Lösungsmittel Ethanol (EtOH) behandelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen über ein spezielles Protokoll geerntet und in einem Lysepuffer aufgeschlossen in den *N*-Ethymaleinimid (NEM) zugegeben wurde, wodurch die freien Thiolgruppen blockiert wurden. Im nächsten Schritt wurden reversibel oxidierte Cysteine über die Zugabe von DTT reduziert, wodurch wieder freie Thiolgruppen entstehen, welche an die Thiopropyl Sepharose (TPS) Matrix binden können. Über mehrere Waschschrte werden die zuvor mit NEM blockierten Proteine entfernt, die keine zusätzliche reduzierbaren Cysteingruppe enthielten. Anschließend wurden die freien Thiolgruppen von der Matrix eluiert. Es folgt eine Alkylierung der Cysteinreste mit Iodacetamid (IAM) und der tryptische Verdau der Proteine *in-gel*. Die aufgearbeiteten Peptide wurden anschließend über markierungsfreie Quantifizierung mittels LC-MS/MS untersucht. SH = freies Cysteinthiol, CysOx_{rev} = reversible oxidative Cysteinmodifikation, CysOx_{irrev} = irreversible oxidative Cysteinmodifikation.

Mit dem gewählten Versuchsansatz konnten 3.765 Proteingruppen identifiziert werden, von denen 2.750 quantifiziert wurden. Aufgrund der Vielzahl von differenziell veränderten Proteinen in den zuvor analysierten zellulären Proteomen nach Palmitatbehandlung (siehe 4.3) wurde eine Normalisierung unter Berücksichtigung der zellulären Proteome durchgeführt (Vergleich: Abbildung 12 B; Anhang: Abbildung 40). Von den quantifizierten 2.750 Proteinen konnten 1.880 Proteine normalisiert werden (Abbildung 12 A). Der Vergleich der analysierten Proben ergab, dass 378 Proteine eine signifikant veränderte Proteinabundanz nach Palmitatbehandlung und Aufarbeitung über die TPS-Matrix zeigten. Man kann davon ausgehen, dass es sich bei diesen 378 Proteinen um Proteine mit reversibel oxidierbaren Cysteinen (hier: redox-sensitive Proteine) handelt. Von diesen Proteinen lagen nach Palmitatbehandlung und ROS-Anstieg 233 signifikant erhöht und 145 verringert abundant vor, wobei die Erhöhung der Abundanz für eine vermehrte reversible Cysteinoxidation der Proteine in der Probe steht (Abbildung 12 B; Anhang: Tabelle 22). Zu den 233 nach Palmitatbehandlung und ROS-Anstieg verstärkt reversibel oxidierten Proteinen zählen u.a. auch die bereits in der Literatur beschriebenen redox-sensitiven Proteine Peroxiredoxin 1 und 2 (Prdx1, Prdx2) sowie die Thioredoxinreduktase 1 (Txnrd1) und das Protein Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktor (Mif) (Abbildung 12 B; Anhang: Tabelle 22).

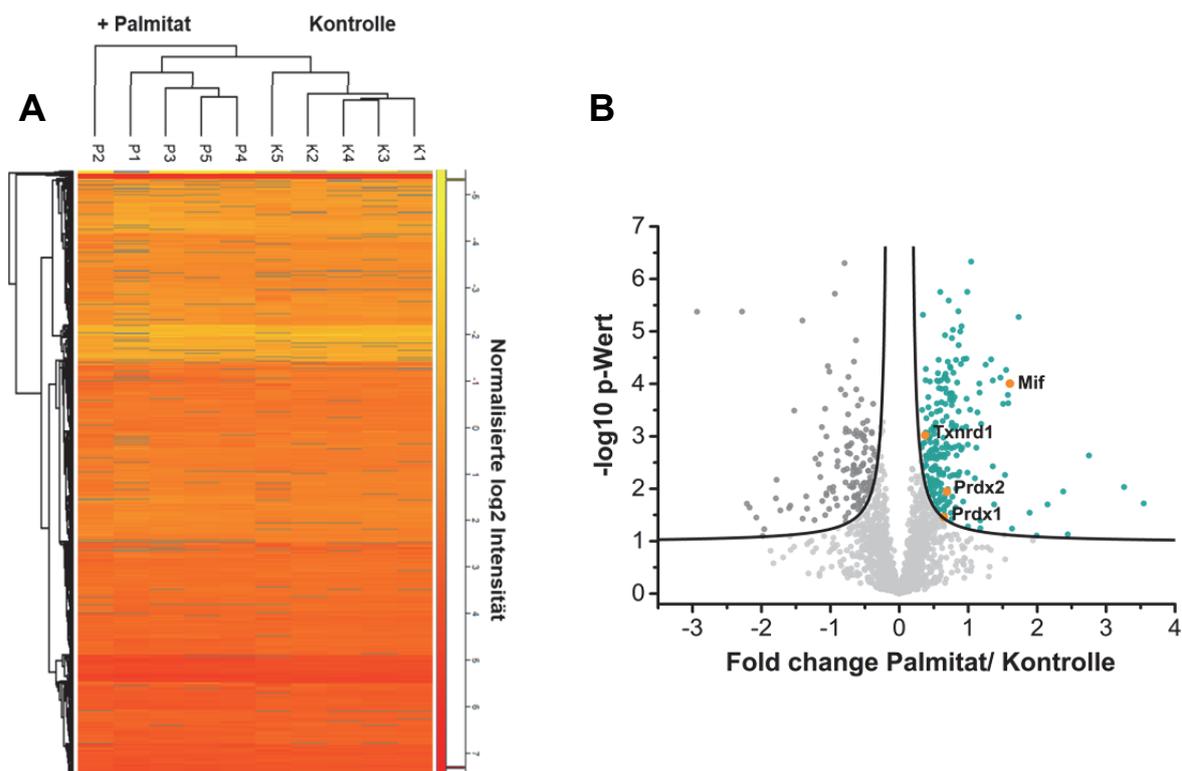


Abbildung 12: Differenzielle Analyse von reversiblen oxidativen Cysteinmodifikationen im zellulären Proteomen von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben. Die untersuchten Zellen wurden für 16 h mit 500 μ M Palmitat (P) oder als Kontrolle mit dem Lösungsmittel Ethanol (K) inkubiert (n=5) und anschließend über eine Thiopropyl Sepharose Matrix aufgearbeitet. A) Hierarchische Clusteranalyse der 1.880 Proteine quantifizierten Proteine. Die Proteomproben gruppieren in Abhängigkeit von der Behandlung (P/K). Die Farbkodierung repräsentiert die detektierte normalisierte Intensität jedes Proteins. B) *Volcano Plot* basierend auf den normalisierten Daten der quantifizierten Proteine von palmitatbehandelten C2C12 Zellen und lösemittelbehandelten Kontrollzellen. In Grün sind Proteine markiert, die nach Palmitatbehandlung erhöhte Proteinabundanz zeigten. Der *Fold change* ist die Differenz der Mittelwerte der \log_2 LFQ Intensitäten.

Um weiterführende Informationen über die quantifizierten Proteine hinsichtlich potentiell involvierter biologischer Prozesse und Zellkompartimente zu erhalten, wurde im Anschluss eine Anreicherungsanalyse (exakter Fischer-Test) auf Basis der zugeordneten GOCC und GOBP Kategorien durchgeführt. Nach palmitatinduziertem ROS-Anstieg und TPS-Anreicherung wurden vermehrt redox-sensitive Proteine gefunden, die mit den folgenden Kategorien assoziiert sind: nukleäre Pore (AF = 4,371; p-Wert = $8,69 \times 10^{-5}$), Zytoplasma (AF = 1,006; p-Wert = 0,0019) und Proteintransport (AF = 1,783; p-Wert = 0,0123) (Abbildung 13 A; Anhang: Tabelle 19 A). Demgegenüber sind in den Kontrollproben Proteine, die eine signifikant erhöhte Proteinabundanz aufweisen, mit den GOCC Kategorien Proton-Transport 2-Sektor ATPase Komplex (AF = 6,483; p-Wert = 0,040), Rezeptorkomplex (AF = 5,186; p-Wert = 0,0182) und Membran (AF = 1,402; p-Wert = 0,0156) assoziiert. Die GOCC Kategorien Zytoplasma (AF = 0,384; p-Wert = 0,0019) und Nukleolus (AF = 0,093; p-Wert = 0,017) sowie die GOBP Kategorie RNA Prozessierung (AF = 0,093; p-Wert = 0,0308) sind in der Kontrollgruppe signifikant unterrepräsentiert (Abbildung 13 B; Anhang: Tabelle 19 B).

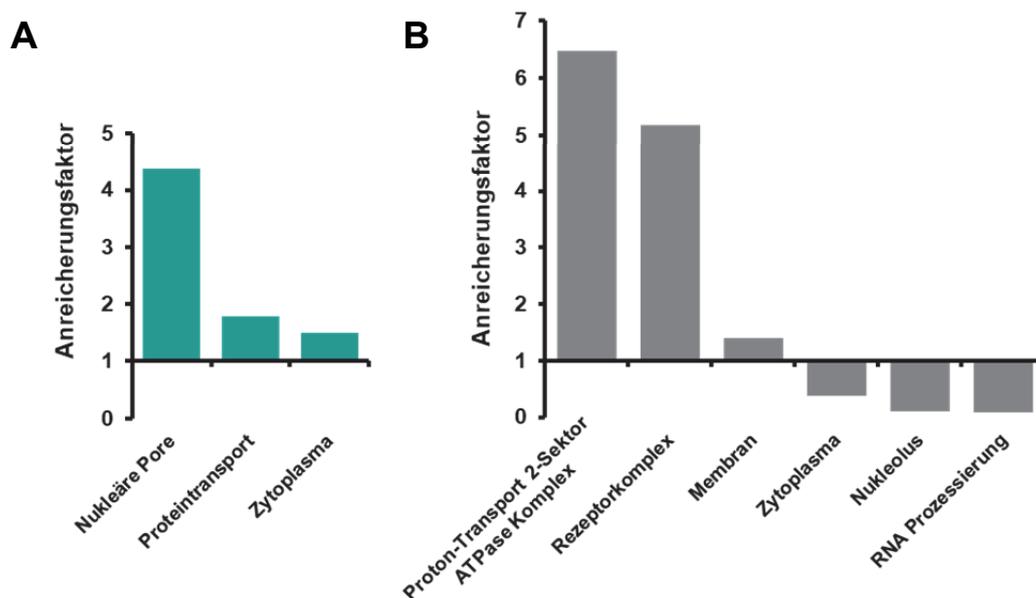


Abbildung 13: Anreicherungsanalyse basierend auf den Annotation der Proteine zu den jeweiligen GOCC und GOBP Kategorien. Eine Anreicherungsanalyse von GOBP und GOCC Kategorien der 233 Proteine, die nach Palmitatbehandlung eine signifikant erhöhte Proteinabundanz zeigten (A) und der 145 Proteine, für die in der Lösungsmittelkontrolle Ethanol signifikant erhöhte Proteinabundanzen detektiert wurden (B).

Neben der Datenanalyse auf Proteinebene wurde der Datensatz auf Peptidebene untersucht. Im Rahmen der Prozessierung der TPS-Matrix-Eluatproben für die LC-MS/MS Analyse wurden die Proteine mit 2-Iodacetamid (IAM) alkyliert. Die zuvor an die TPS-Matrix gebundenen, reversibel oxidierten Proteine wurden mit IAM markiert und konnten über die MS-basierte Analyse als carbamidomethylierte Peptide detektiert werden. Es konnten insgesamt 6.512 carbamidomethylierte Peptide identifiziert und 4.543 quantifiziert werden, wovon 2.124 anhand der zuvor untersuchten

zellulären Proteome nach Palmitatbehandlung normalisiert werden konnten. Diese 2.124 carbamidomethylierten Peptide konnten wiederum 892 Proteinen zugeordnet werden, von denen 186 zuvor als differenzielle, redox-sensitive Proteine identifiziert wurden. Auch das Protein Mif zählt zu diesen 186 verstärkt reversibel oxidierten Proteinen, für die mindestens ein carbamidomethyliertes Peptid gefunden wurde (Abbildung 14).

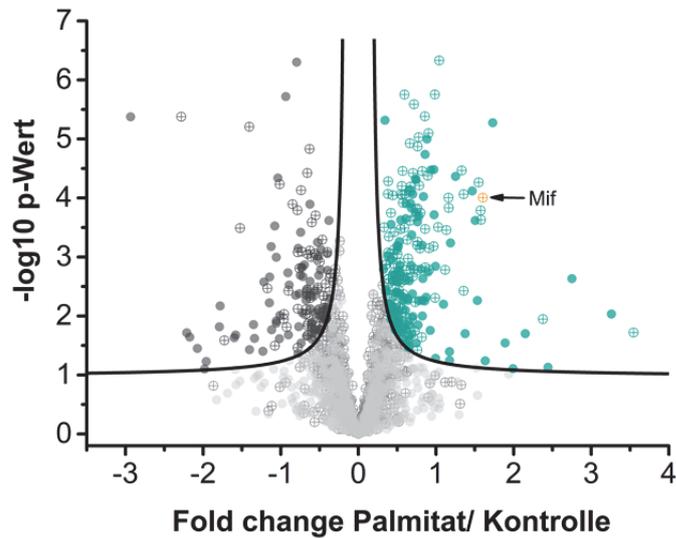


Abbildung 14: Palmitatinduziertes Redox-Proteom von C2C12 Myotuben. *Volcano Plot* basierend auf den normalisierten Daten der 1.880 quantifizierten Proteine. In Grün sind Proteine dargestellt, die nach Palmitatbehandlung signifikant erhöhte Proteinabundanzen zeigten. Dazu zählt u.a. das Protein Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktor (Mif), welches in Orange dargestellt ist. Für 892 der quantifizierten Proteine wurden Peptide mit mindestens einem carbamidomethylierten Cystein identifiziert und quantifiziert. Diese Proteine sind mit einem Kreuz markiert. Der *Fold change* ist die Differenz der Mittelwerte der \log_2 *LFQ* Intensitäten.

4.5 Charakterisierung des sekretorischen Phänotyps von palmitat-behandelten C2C12 Myotuben

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse des zellulären Proteoms von C2C12 Myotuben nach Palmitatbehandlung, die eine verstärkte Veränderung von Proteinen des Extrazellulärraumes zeigten, sowie der Tatsache, dass Skelettmuskelzellen aktiv endokrin Myokine sekretieren, wurde als nächstes eine Charakterisierung des sekretorischen Phänotyps von C2C12 Myotuben nach Palmitatbehandlung angestrebt. Über diesen Ansatz sollte die Möglichkeit genutzt werden, die Abhängigkeit der Proteinsekretion von Redoxprozessen zu untersuchen.

Für die Identifizierung von sekretierten Proteinen aus dem Skelettmuskel wurde die etablierte murine Myoblastenzelllinie C2C12 als Modellsystem verwendet. Die C2C12 Myoblasten wurden zu Myotuben ausdifferenziert und das konditionierte Medium (hier: Sekretom) sowie das zugehörige Zellysate (hier: zelluläres Proteom) anhand von markierungsfreier Quantifizierung via LC-MS/MS analysiert (Abbildung 15).



Abbildung 15: Übersicht der Charakterisierung des sekretorischen Phänotyps der C2C12 Myotuben nach Palmitatbehandlung. Im Rahmen der Arbeit wurde ein mehrstufiger Ansatz für die Identifizierung von palmitatinduziert sekretierten Proteinen von C2C12 Myotuben gewählt.

Für eine Sekretomanalyse müssen die C2C12 Myotuben serumfrei gesetzt werden, wodurch die Zellen potentiell gestresst werden und intrazelluläre Proteine in das Sekretom freisetzen, die eine Kontamination der Sekretomproben darstellen. Aus diesem Grund muss eine möglichst hohe Viabilität der Zellen sichergestellt und der Einfluss von serumfreiem Medium auf die Viabilität der C2C12 Myotuben untersucht werden. Da nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen in serumfreiem Medium die Zellviabilität auf $94,3 \pm 2,7\%$ ($n=6$) sank, wurde eine relativ kurze Inkubationsdauer von 5 h für die Versuche gewählt (Viabilität = $98,7 \pm 1,8\%$ ($n=6$)) (Anhang: Abbildung 37).

Im Anschluss wurden die C2C12 Sekretome mit und ohne Palmitatbehandlung vergleichend via LC-MS/MS Analyse untersucht, um potentiell palmitatinduzierte Veränderungen im Sekretom zu detektieren. Mit diesem Versuchsansatz konnten in den Sekretomen insgesamt 2.048 Proteine identifiziert und 1.487 quantifiziert werden. Eine hierarchische Clusteranalyse zeigte eine klare Abgrenzung der beiden untersuchten Gruppen (Abbildung 16 A). Eine differenzielle Analyse ergab,

dass 529 Proteine, etwa 36 % aller quantifizierten Proteine, palmitatinduziert signifikant veränderte Proteinabundanz im Sekretom zeigten, wovon 281 Proteine nach Palmitatbehandlung verstärkt und 248 verringert sekretiert wurden (Abbildung 16 B).

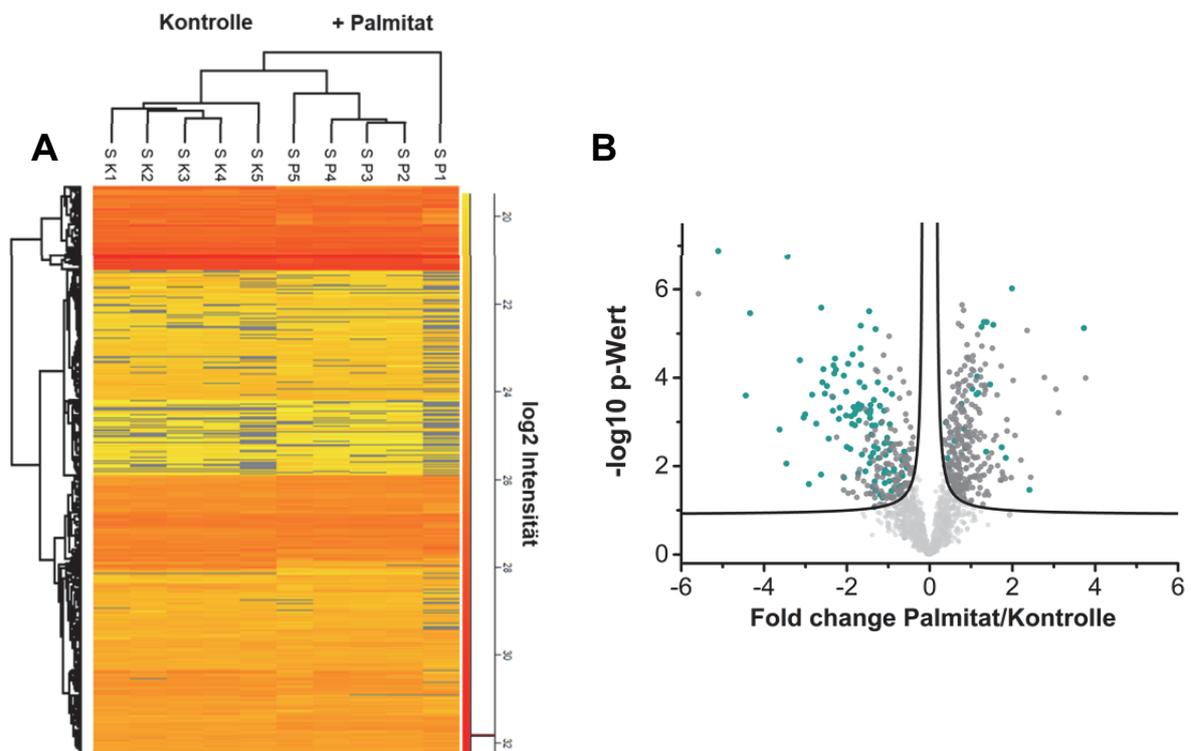


Abbildung 16: Analyse des palmitatinduzierten sekretorischen Phänotyps von C2C12 Myotuben. A) Hierarchische Clusteranalyse basierend auf den detektierten log₂ LFQ Intensitäten der 1.487 quantifizierten Proteine. Für den Versuch wurden die C2C12 Myotuben für 16 h mit 500 µM Palmitat (S P1–S P5) oder als Kontrolle mit dem Lösungsmittel Ethanol (S K1–S K5) behandelt und anschließend für 5 h in serumfreiem Medium inkubiert (n=5). Die Analyse zeigt eine deutliche Abgrenzung zwischen den palmitatbehandelten und den Kontrollproben. B) *Volcano Plot* basierend auf den normalisierten Daten der 1.487 im Sekretom quantifizierten Proteine. In Grün sind Proteine dargestellt für die über SignalP ein Signalpeptid vorhergesagt wird. Der *Fold change* ist die Differenz der Mittelwerte der log₂ LFQ Intensitäten.

4.5.1 Weiterführende Sekretomanalyse der palmitatbehandelten C2C12 Myotuben

Eine der größten Herausforderungen für die Sekretomanalyse ist die Unterscheidung zwischen *bona fide* sekretierten Proteinen und potentiellen Proteinkontaminanten, die von sterbenden Zellen freigesetzt werden. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der Arbeit ein weiterführender Ansatz zur Identifizierung von palmitatinduziert sekretierten Proteinen in mehreren Stufen durchgeführt, der aus folgenden Schritten bestand:

- I. Vergleich von Sekretom mit dem korrespondierenden zellulären Proteom zur Bestimmung der im Sekretom überrepräsentierten Proteine.
- II. Bestimmung klassisch sekretierter Proteine mittels bioinformatischer Datenauswertung unter Verwendung von SignalP sowie über einen datenbasierten Ansatz über die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor der klassischen Proteinsekretion Brefeldin A.
- III. Analyse der unkonventionellen Typ II Proteinsekretion (ABC-Transporter)
- IV. Untersuchung potentiell proteolytisch prozessierter Proteine (*Ectodomain Shedding*).

I. Differenzieller Sekretom-/Proteom-Vergleich von C2C12 Myotuben

Da trotz hoher Zellviabilität davon ausgegangen werden muss, dass Kontaminanten im Sekretom enthalten sind, wurde für die Identifizierung von sekretierten Proteinen in der Arbeit ein Ansatz verfolgt, der die quantitativen Proteindaten des Sekretoms mit den zugehörigen zellulären Proteom vergleicht. Hierbei wird angenommen, dass trotz Freisetzung von intrazellulären Proteinen, sekretierte Proteine eine erhöhte Abundanz im Sekretom im direkten Vergleich zu dem korrespondierenden zellulären Proteom aufzeigen. Diese Studie wird im Folgenden „Sekretom-/Proteom-Vergleich“ genannt.

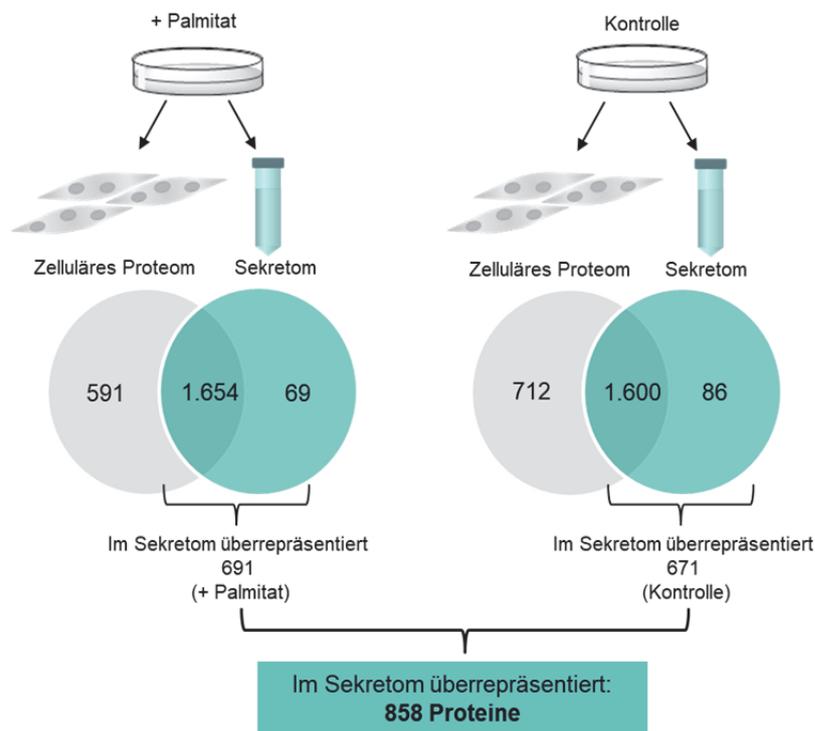


Abbildung 17: Differenzielle Sekretom- und Proteomanalyse von C2C12 Myotuben. Ergebnisse der quantifizierten Proteine des Sekretom-/Proteom-Vergleichs von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben und den Kontrollen. Nach Palmitatbehandlung waren 691 Proteine im Sekretom im Vergleich mit dem zellulären Proteom überrepräsentiert und in den Kontrollproben 671 Proteine. 858 Proteine bilden die gemeinsame Schnittmenge der im Sekretom überrepräsentierten Proteine nach Palmitatbehandlung und in der Kontrolle. Diese 858 Proteine werden als sekretierte Proteine deklariert.

Mit dem gewählten Versuchsansatz konnten über markierungsfreie Quantifizierung via LC-MS/MS in der differenziellen Proteom/Sekretom-Studie von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben 2.314 Proteine quantifiziert werden. Davon wurden 69 exklusiv nur im Sekretom und 591 nur im zellulären Proteom gefunden (Abbildung 17). Somit wurden 1.654 Proteine, 71,5 % aller quantifizierten Proteine sowohl im Sekretom als auch im zellulären Proteom detektiert. Von den 2.314 quantifizierten Proteinen sind 691 signifikant im Sekretom von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben überrepräsentiert (Abbildung 17).

In den Lösungsmittelkontrollen konnten 2.432 Proteine quantifiziert werden, wovon 86 Proteine exklusiv nur im Sekretom und 712 nur im zellulären Proteom identifiziert wurden (Abbildung 17). Hier konnten 671 Proteine als im Sekretom überrepräsentierte Proteine gefunden werden.

Insgesamt konnten somit über den Sekretom-/Proteom-Vergleich 858 „im Sekretom überrepräsentierte Proteine“ identifiziert werden, die im Folgenden als *bona fide* sekretierte Proteine von C2C12 Myotuben deklariert werden (Abbildung 17, Anhang: Tabelle 22).

II. Bestimmung der potentiell klassisch sekretierten Proteine:

Die bioinformatische Datenanalyse unter Verwendung von SignalP ergab, dass von den 1.487 im Sekretom nach Palmitatbehandlung quantifizierten Proteinen für 216 ein Signalpeptid vorhergesagt

wurde und diese somit der klassischen Proteinsekretion zugeordnet werden können. Von den 216 Proteinen mit einem Signalpeptid wurden 115 Proteine nach Palmitatbehandlung verringert abundant im Sekretom detektiert (Abbildung 16 B).

Eine weitere, in der Literatur beschriebene Möglichkeit klassisch sekretierte Proteine von unkonventionell sekretierten Proteinen zu unterscheiden, besteht darin, die klassische Proteinsekretion der Zellen über eine Behandlung mit Brefeldin A zu inhibieren (Grieve und Rabouille, 2011). Um das Sekretom der C2C12 Myotuben weiterführend zu untersuchen wurde der Einfluss einer Brefeldin A Behandlung auf den sekretorischen Phänotyp der C2C12 Myotuben untersucht.

Dafür wurde zunächst ein Viabilitätstest mittels Trypanblau-Färbung durchgeführt, um einen potentiell negativen Einfluss der Brefeldin A Behandlung auf die Zellviabilität auszuschließen. Die Analyse ergab, dass die fünfständige Behandlung der Zellen mit Brefeldin A keinen deutlichen Einfluss auf die Zellviabilität hat (Kontrolle: 98,7 %; SD: 1,8; und + Brefeldin: 99,2 %; SD: 0,98; n = 6) (Anhang: Abbildung 37).

Die MS-basierte Analyse ergab, dass über die Behandlung der Zellen mit Brefeldin A die Abundanz von 165 Proteinen im Sekretom verringert. Somit stellen diese 165 Proteine potentiell klassisch sekretierte Proteine dar. Für 154 (93 %) dieser 165 Proteine wurde über SignalP ein Signalpeptid vorhergesagt, womit gezeigt werden konnte, dass die Spezifität von SignalP für die Vorhersage der klassischen Sekretion bei > 90 % liegt. Wenn man davon ausgeht, dass Brefeldin A die klassische Sekretion von Proteinen vollständig inhibiert, können 566 der 671 im Sekretom der Kontrollen überrepräsentierten Proteine (84 %) als nicht klassisch sekretiert identifiziert werden und 641 der 691 im Sekretom nach Palmitatbehandlung überrepräsentierten Proteine (92,7 %). Aus diesem Grund wird angenommen, dass der Großteil der nach Palmitatbehandlung sekretierten Proteine nicht über die klassische Sekretion freigesetzt wird.

III. Analyse der unkonventionellen Typ II Proteinsekretion

Um weiterführend potentiell unkonventionell sekretierte Proteine im verwendeten Modellsystem zu untersuchen, wurde der Einfluss der Inhibitoren Glyburid und Probenecid auf den sekretorischen Phänotyp von C2C12 Myotuben analysiert. Beide Chemikalien sind bereits in der Literatur als Inhibitoren der unkonventionellen Proteinsekretion über den ABC-Transporter (Typ II Sekretion) beschrieben (Chapman *et al.*, 2003; Wein *et al.*, 2004). Weiterhin wurde der hemmende Effekt von Glyburid und Probenecid auf die Sekretion von dem unkonventionell sekretierten Protein Mif bereits in der Arbeit von Flieger *et al.* in einer humanen monozytären THP-1 Zelllinie beschrieben (Flieger *et al.*, 2003).

Die Untersuchung der Zellviabilität mittels Trypanblau-Färbung zeigte, dass auch nach der Behandlung mit Probenecid oder Glyburid die Zellviabilität von C2C12 Myotuben bei 99,6 % \pm 0,5 (n = 5) bzw. 99,8 % \pm 0,45 (n = 5) lag (Anhang: Abbildung 37).

Die Behandlung der Zellen mit Probenecid oder Glyburid zeigten entgegen den Erwartungen keinen deutlichen Einfluss auf Abundanz von Mif im Sekretom. Weiterhin zeigte die Behandlung ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die Sekretion von anderen Proteinen im Sekretom von C2C12 Myotuben.

IV. Identifizierung proteolytisch prozessierter Proteine im Sekretom von C2C12 Muskelzellen

Die proteolytische Abspaltung der Ektodomäne von Membranproteinen stellt eine weitere Möglichkeit der unkonventionellen Proteinsekretion dar, die jedoch häufig als Kontamination betrachtet und daher nicht in den Sekretomdaten berücksichtigt wird. Deshalb sollte als nächstes die Möglichkeit des *Ectodomain-Shedding* bei der Auswertung der Sekretomdaten untersucht werden. Der Vergleich der Sekretom- und Proteomanalysen anhand des Tools LSPFP bietet hier die Möglichkeit, anhand der MS-Daten und identifizierten Peptide Aussagen über mögliche Prozessierung von Membranproteinen zu machen. Die Verwendung des LSPFP führte zur Identifizierung der Proteine Plexin-B2 (Plxnb2) und *low density lipoprotein receptor* (Ldlr), als potentiell proteolytisch prozessierte Proteine (Abbildung 18). In den Sekretomproben sind für Plxnb2 und Ldlr im zytoplasmatischen Teil des Proteins keine Peptide detektiert worden, jedoch Peptide der extrazellulären Region. Im Hinblick auf die potentielle proteolytische Prozessierung zeigte sich kein Unterschied zwischen der Palmitatbehandlung und der Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 18).

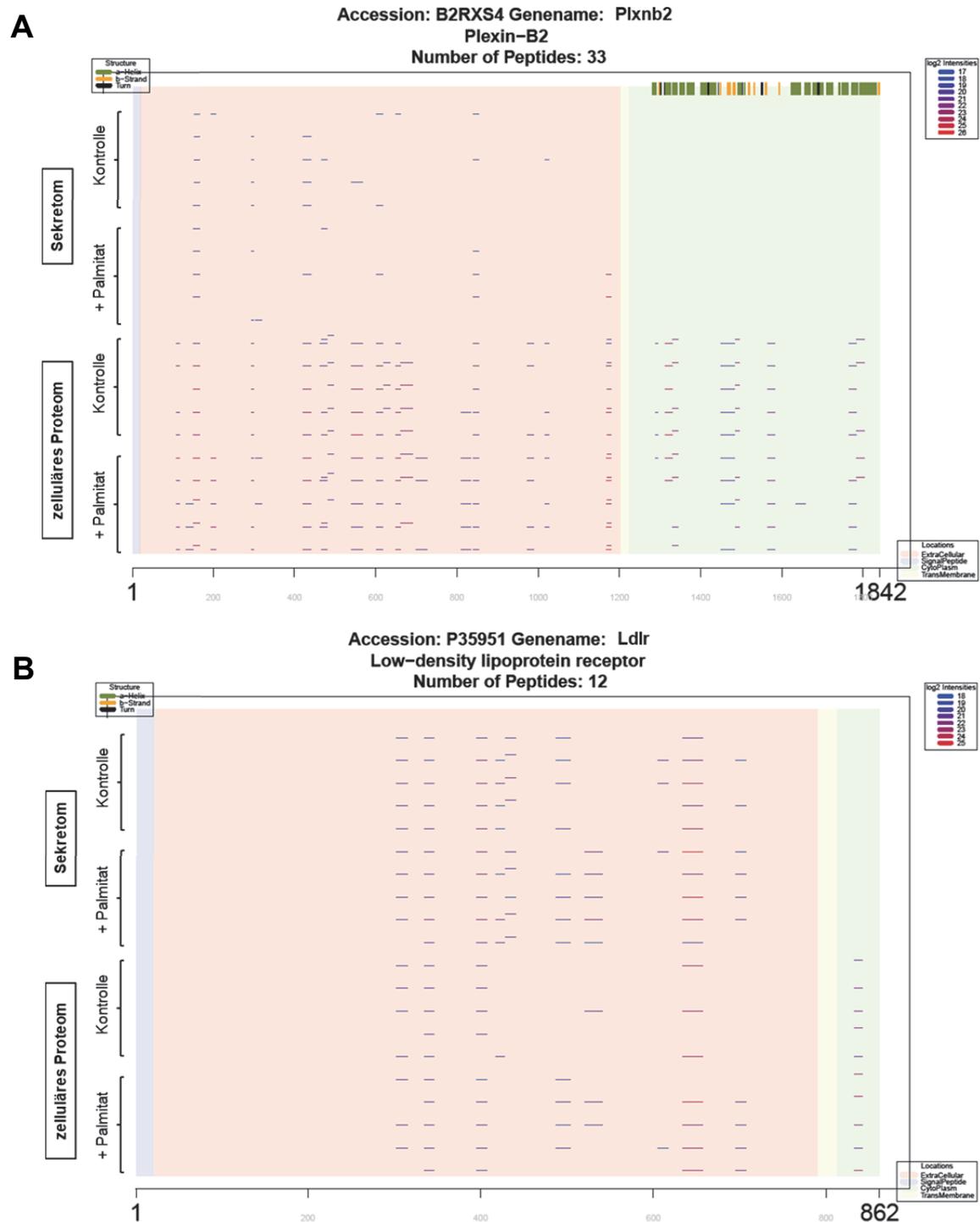


Abbildung 18: Graphische Ausgabe von dem Tool „Lysate and Secretome Peptide Feature Plotter“ (LSPFP). Die Peptiddaten der vergleichenden Sekretom/Proteomstudie von Kontrollen und Palmitatbehandlung wurden mit dem Tool LSPFP analysiert. In den fünf Replikaten der Sekretome (S1–S5) und zellulären Proteome (L1–L5) (y-Achse) wurden von dem Protein Plexin-B2 insgesamt 33 Peptide (A) und für das Protein *low density lipid protein receptor* (Ldlr) 12 Peptide (B) identifiziert und quantifiziert. Die über MS detektierte Intensität der Peptide ist farblich kodiert, wobei Blau für eine geringe Intensität und Rot für eine hohe Intensität steht. Die Positionen der identifizierten Peptide sind als waagerechte Linien dargestellt. Des Weiteren werden in der Graphik die Akzessionsnummer, der Gen- und Proteinname sowie die Anzahl der identifizierten Peptide abgebildet. Wenn Informationen bezüglich der Topologie in der UniProt KB Datenbank hinterlegt sind, werden diese wie folgt in der Graphik dargestellt: extrazellulär (Rot), Signalpeptid (Hellblau), Zytoplasma (Hellgrün) oder Transmembranregion (Hellgelb). Zudem liefert die UniProt KB Datenbank für viele Proteine Informationen über die Sekundärstruktur, die im oberen Teil der Graphik dargestellt werden (Grün: α -Helix, Gelb: β -Faltblatt, Dunkelblau: Schleife).

Die Identifizierung der Proteine Plxnb2 und Ldlr als potentiell proteolytisch prozessierte Proteine wurde im Folgenden mit unabhängigen Proben in je drei Replikaten pro Gruppe über Immunfärbungen gegen Plxnb2 bzw. Ldlr validiert. Für den Nachweis von Plxnb2 wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch die extrazelluläre Region des Proteins detektiert. So konnte eine weitere Proteinisoform mit einer niedrigeren Molekularmasse nachgewiesen werden, die hauptsächlich in den Sekretomproben zu finden war und die trunkierte Variante des Proteins Plxnb2 darstellt (p-Wert = 0,0049; Abbildung 19 A, B).

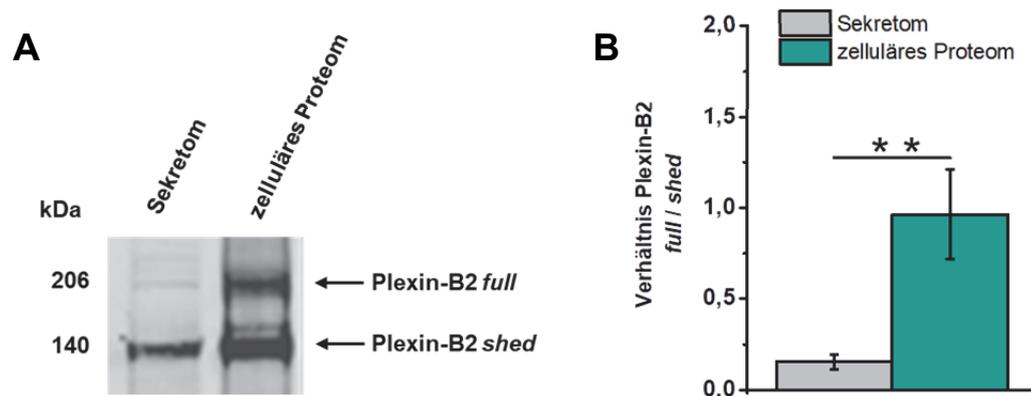


Abbildung 19: Immunfärbung gegen Plexin-B2 Proteinisoformen (*full*, *shed*) in Sekretom- und zellulären Proteomproben von C2C12 Myotuben. A) Die Proteinvariante von Plexin-B2 mit einer geringeren Molekularmasse wird überwiegend in der Sekretomprobe detektiert (*shed*). B) Die quantitative Analyse der in A) mit Pfeilen markierten Signale zeigt eine signifikant erhöhte Abundanz von der kleineren trunkierten Plexin-B2 Proteinvariante (140 kDa) im Vergleich mit der größeren (206 kDa) Variante in den Sekretomproben (p-Wert = 0,0049 **, n=3/Gruppe). Die Balken repräsentieren die Mittelwerte des Verhältnisses von oberer zu unterer Bande und die Fehlerbalken die zugehörige Standardabweichung.

Für die Validierung des Proteins Ldlr über Immunfärbung war ein Antikörper gegen den im Zytoplasma lokalisierten Proteinpart verfügbar. Der verwendete Antikörper detektierte ein schwächeres Signal in den Sekretomproben im Vergleich zu den Proben des zellulären Proteoms (p-Wert= 0,03; Anhang: Abbildung 41 A, B).

Validierung der potentiell proteolytisch prozessierten Proteine Plxb2 und Ldlr

Um eine höhere Proteinsequenzabdeckung zu erzielen und die Ergebnisse der proteolytischen Proteinprozessierung mit einem unabhängigen Versuchsansatz weiterführend zu validieren, wurde eine Sekretomprobe und eine zelluläre Proteomprobe von C2C12 Muskelzellen in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Diese Strategie ermöglicht es, eine größere Proteinmenge in einer nachfolgenden MS-basierten Analyse zu untersuchen. Jede Gelspur (Sekretom/zelluläres Proteom) wurde in 15 einzelne Gelfractionen zerschnitten und anschließend individuell via LC-MS/MS analysiert (Anhang: Abbildung 42). Die Peptiddaten wurden anschließend via LSPFP weiterführend untersucht und für jede Sekretom- und zelluläre Proteom-Fraktion ausgewertet. Mit diesem Versuchsansatz konnten die Ergebnisse der Immunfärbungen, der proteolytische Prozessierung von

Plxnb2 (Abbildung 20) und Ldlr (Anhang: Abbildung 43) in den Sekretomen der C2C12 Myotuben bestätigt werden.

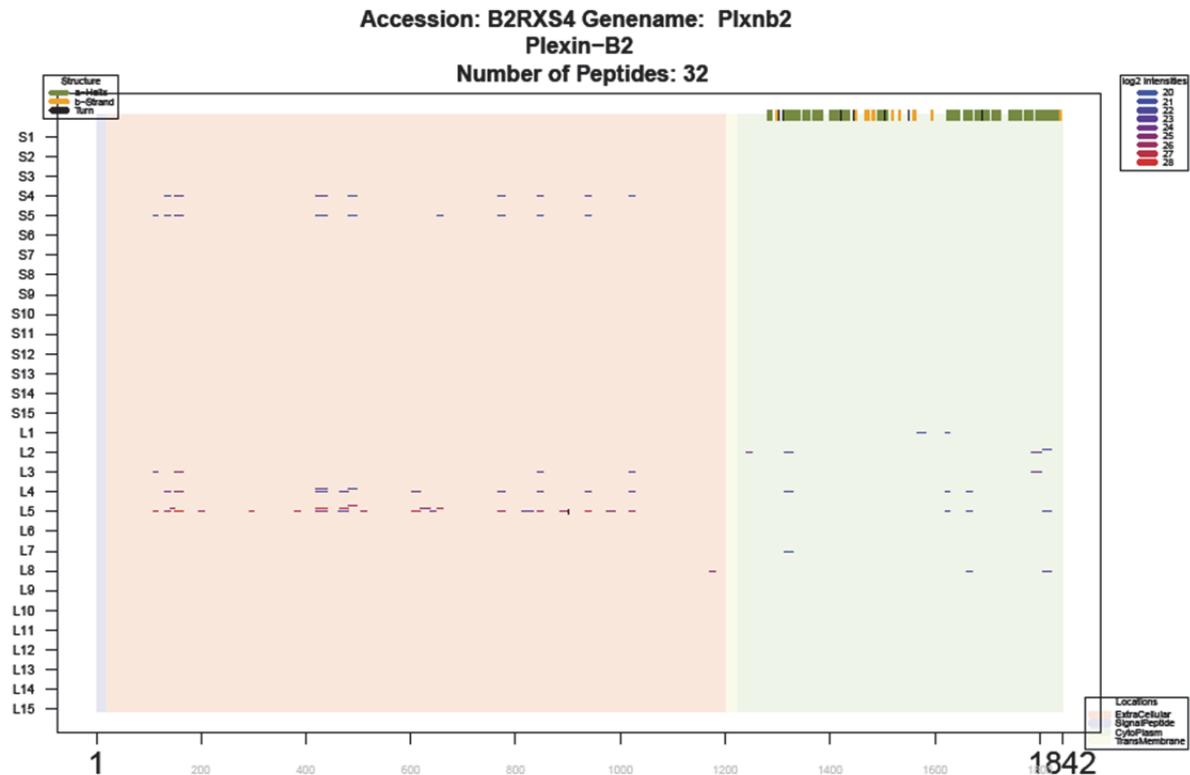


Abbildung 20: Graphische Ausgabe von LSPFP für die identifizierten Peptide des potentiell proteolytisch prozessierten Proteins Plxnb2. Für den Versuch wurden jeweils 20 µg einer C2C12 Sekretomprobe und einer zugehörigen zellulären Proteomprobe in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und jede Gelspur in 15 Fraktionen zerteilt (Sekretom: S1–S15; zelluläres Proteom: L1–L15). Die Fraktionen wurden anschließend via quantitativer MS einzeln analysiert. Die identifizierten Peptide pro Fraktionen wurden unter Verwendung des Tools LSPFP visualisiert. Dieser Versuchsansatz ermöglicht eine höhere Proteinsequenzabdeckung.

Ausschließlich in den Proben des zellulären Proteoms konnten sowohl Peptide des extra-, als auch des intrazellulären Proteinteils der beiden Kandidatenproteine Plxnb2 und Ldlr detektiert werden. Dahingegen fehlten die zytoplasmatischen Regionen in den Sekretomproben vollständig. Somit konnte auch über den MS-basierten Ansatz bestätigt werden, dass die Peptide des zytoplasmatischen Proteinteils der beiden Proteine Plxnb2 und Ldlr in den Sekretomproben sehr wahrscheinlich fehlen. Es kann somit angenommen werden, dass die vornehmlich im Sekretom detektierte kleinere Proteinform von Plxnb2 und Ldlr jeweils eine trunkierte Proteinvariante repräsentiert.

4.5.2 Charakterisierung des palmitatinduzierten Sekretoms von C2C12 Myotuben

Die Sekretomdaten der palmitatbehandelten C2C12 Myotuben und der Kontrollen wurden anhand der erhobenen Daten von dem Sekretom-/Proteom-Vergleich nach den 858 im Sekretom überrepräsentierten Proteinen gefiltert. Alle Proteine, die nicht im Sekretom überrepräsentiert waren, wurden aus der nachfolgenden Analyse ausgeschlossen.

Anschließend wurden die Informationen von SignalP und den Sekretomdaten nach Brefeldin A Behandlung ergänzt (Abbildung 21 A). Über SignalP wurde für 152 (17,7 %) der 858 im Sekretom überrepräsentierten Proteine ein Signalpeptid vorhergesagt (klassisch sekretiert) und über die Behandlung mit Brefeldin A wurden 103 (12 %) Proteine in ihrer Sekretion verringert sekretiert (potentiell klassisch sekretierte Proteine) (Abbildung 21 A).

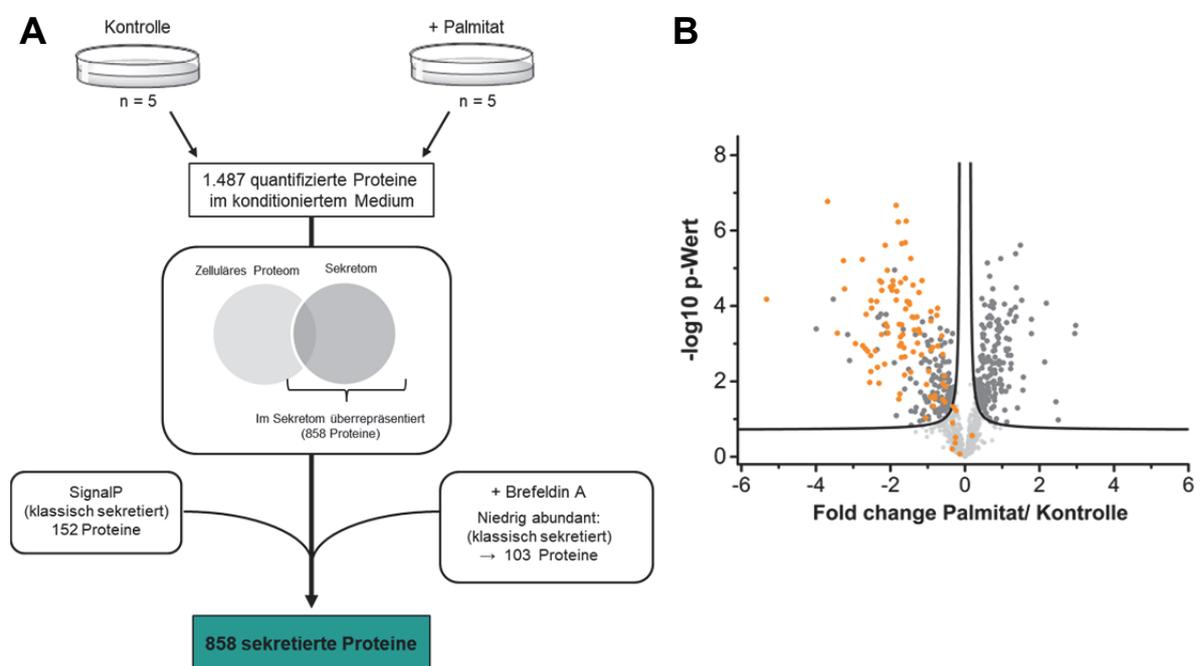


Abbildung 21: Versuchsansatz zur Identifizierung von *bona fide* sekretierten Proteinen von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben. A) Im Sekretom von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben wurden 1.487 Proteine quantifiziert. Dieser Datensatz wurde weiterführend gefiltert. Als sekretiert galten ausschließlich Proteine die im Sekretom im Vergleich mit dem zellulären Proteom überrepräsentiert waren (858 Proteine). Zudem wurde ein Großteil der über SignalP identifizierten klassisch sekretierten Proteine ebenfalls über die Behandlung mit Brefeldin A bestätigt. B) *Volcano Plot* der 858 *bona fide* sekretierten Proteine. In Orange sind Proteine markiert, die nach Brefeldin A Behandlung im Sekretom verringert abundant waren (potentiell klassisch sekretierte Proteine). Der *Fold change* beschreibt die Differenz der Mittelwerte der \log_2 *LFQ* Intensitäten.

Eine differenzielle Analyse der 858 *bona fide* sekretierten Proteine ergab, dass 401 Proteine eine palmitatinduziert signifikant veränderte Proteinabundanz zeigten, wovon 170 Proteine signifikant verstärkt und 231 verringert sekretiert wurden (Abbildung 21 B, Anhang: Tabelle 22). Von den 231 verringert sekretierten Proteinen wurden über SignalP 129 (55,8 %) als klassisch sekretierte Proteine identifiziert, was ebenfalls für 95 (41,1 %) mittels Brefeldin A bestätigt werden konnte (Abbildung 21 B; Anhang: Tabelle 23).

4.6 Redox-abhängige Proteinsekretion von C2C12 Myotuben

Oxidative posttranslationale Modifikationen (oxPTM) zählen zu den redox-regulierten Prozessen in der Zelle, deren Bedeutung für die Proteinsekretion noch weitestgehend unbekannt ist. Um den Zusammenhang zwischen Proteinsekretion und Redoxprozessen zu untersuchen, wurden die Ergebnisse des palmitatinduzierten sekretorischen Phänotyps der 858 *bona fide* sekretierten Proteine (4.5.2) mit den 378 potentiell redox-sensitiven Proteinen aus der C2C12 Redox-Proteom-Studie (4.4) verglichen (Abbildung 22).

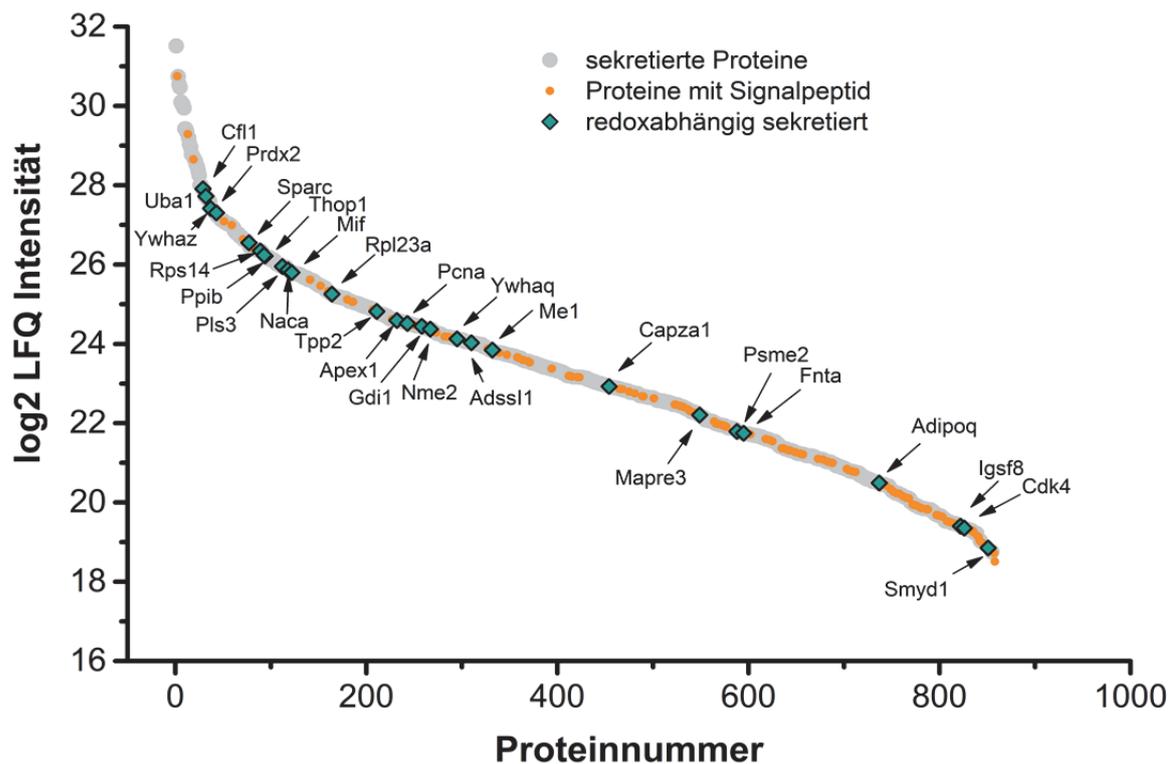


Abbildung 22: Proteinintensitäten der im Sekretom von C2C12 Myotuben quantifizierten Proteine. Die 858 im Sekretom nach Palmitatbehandlung identifizierte Proteine wurden nach ihren absteigenden logarithmierten Intensitäten nummeriert und Proteine die laut SignalP ein Signalpeptid enthalten in Orange markiert. Proteine, die in der C2C12 Redox-Proteom-Studie als redox-sensitiv identifiziert wurden und deren Sekretion nach Palmitatbehandlung verändert vorlag sind potentielle Kandidaten für redoxabhängig sekretierte Proteine und sind in Grünen Rauten dargestellt.

Die Auswertung zeigte, dass 28 redox-sensitive Proteine über die Palmitatbehandlung in ihrer Sekretion signifikant beeinflusst wurden. Diese Proteine werden im Folgenden „redox-abhängig sekretierte Proteine“ genannt.

Von diesen 28 potentiell redox-abhängig sekretierten Proteinen zeigen 14 eine Regulation der Sekretion und der Oxidation in die gleiche Richtung (10 verstärkt sekretiert & oxidiert und 4 verringert sekretiert & oxidiert). Zu diesen gleich regulierten Proteinen zählen u.a. auch die verringerte Sekretion und Oxidation der signalpeptidhaltigen Proteine Sparc, Adipoq und Igsf8. Lediglich für das signalpeptidhaltige Protein Ppib wurde eine erhöhte Sekretion und Oxidation nach Palmitatbehandlung detektiert (Tabelle 14).

Die restlichen 14 Proteine zeigen eine gegenläufige Regulation, wobei 13 Proteine verringert sekretiert & verstärkt oxidiert gefunden wurden und das Protein *Microtubule-associated protein RP/EB family member 3* (Mapre3) als erhöht sekretiert & verringert oxidiert nach Palmitatbehandlung (Tabelle 14).

Tabelle 14: Potentiell redox-abhängig sekretierte Proteine. Schnittmenge der in der C2C12 Redox-Proteom-Studie identifizierten redox-aktiven Proteine und der palmitatinduziert verändert sekretierten Proteinen von C2C12 Myotuben.

Proteinnamen	Gencode	Sekretom (+Palmitat)	Redox-Proteom	Angereichert im Sekretom	SP (SignalP)	TM (SignalP)
SPARC	Sparc	↓	↓	+	+	
Adiponectin	Adipoq	↓	↓	+	+	
Immunoglobulin superfamily member 8	Igsf8	↓	↓	+	+	+
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	Ppib	↑	↑	+	+	
Thimet oligopeptidase	Thop1	↑	↑	+		
60S ribosomal protein L23a	Rpl23a	↑	↑	+		
Nucleoside diphosphate kinase	Nme2	↓	↑	+		
NADP-dependent malic enzyme	Me1	↓	↑	+		
Proliferating cell nuclear antigen	Pcna	↓	↑	+		
Cofilin-1	Cfl1	↓	↑	+		
DNA- lyase;DNA- lyase, mitochondrial	Apex1	↓	↑	+		
Macrophage migration inhibitory factor	Mif	↓	↑	+		
F-actin-capping protein subunit alpha-1	Capza1	↓	↓	+		
Rab GDP dissociation inhibitor alpha	Gdi1	↓	↑	+		
40S ribosomal protein S14	Rps14	↑	↑	+		
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	Uba1	↑	↑	+		
Peroxiredoxin-2	Prdx2	↑	↑	+		
Tripeptidyl-peptidase 2	Tpp2	↑	↑	+		
Microtubule-associated protein RP/EB family member 3	Mapre3	↑	↓	+		
Plastin-3	Pls3	↓	↑	+		
Cyclin-dependent kinase 4	Cdk4	↓	↑	+		
Proteasome activator complex subunit 2	Psme2	↓	↑	+		
14-3-3 protein zeta/delta	Ywhaz	↓	↑	+		
14-3-3 protein theta	Ywhaq	↓	↑	+		
Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	Fnta	↓	↑	+		
Adenylosuccinate synthetase isozyme 1	Adss1	↑	↑	+		
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	Naca	↑	↑	+		
Histone-lysine N-methyltransferase Smyd1	Smyd1	↑	↑	+		

4.7 Die Rolle des potentiell redox-sensitiven Proteins Mif in C2C12 Skelettmuskelzellen

Über den Abgleich der Redox-Proteom-Studie mit den Sekretomdaten der palmitatbehandelten C2C12 Myotuben konnte für eine kleine Gruppe möglicherweise eine redox-abhängige Sekretion detektiert werden. Diese Beobachtung soll im Folgenden an dem Kandidatenprotein exemplarisch validiert werden.

Im Rahmen der Arbeit konnte das Protein Mif über die C2C12 Redox-Proteom-Studie als redox-aktives Protein detektiert werden (*Fold change* = 1,76; p-Wert = $9,88 \times 10^{-5}$) (4.4; Tabelle 15). Das Protein Mif wird bereits in der Literatur als ein Protein aus der Familie der Thioredoxine (Trx) beschrieben, das ein redoxaktives -C-X-X-C- Sequenzmotif enthält (Kleemann *et al.*, 1998). Weiterhin wird Mif als ein Myokin beschrieben, das kontinuierlich von C2C12 Skelettmuskelzellen über einen unkonventionellen Sekretionsmechanismus freigesetzt wird (Miyatake *et al.*, 2014). Die Sekretion von Mif konnte ebenfalls in dem verwendeten Modellsystem über den Sekretom/Proteom-Vergleich bestätigt werden (4.5.1). Des Weiteren wurde für Mif über SignalP kein Signalpeptid vorhergesagt, und es konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass die Sekretion von Mif nicht von dem Inhibitor der klassischen Sekretion, Brefeldin A beeinträchtigt wird (Tabelle 15). Folglich wird angenommen, dass Mif von den murinen C2C12 Myotuben vermutlich unkonventionell sekretiert wird. Die Sekretion von Mif wurde über die Behandlung der C2C12 Myotuben mit Palmitat signifikant verringert (4.6; Tabelle 15).

Tabelle 15: Das Protein Mif als potentiell redox-sensitiv sekretiertes Protein.

Studie	Protein Mif
Redox-Proteom (+Palmitat)	Verstärkt oxidiert (↑)
Sekretom /Proteom-Vergleich	Im Sekretom überrepräsentiert (↑)
Sekretom (+Palmitat)	Verringert sekretiert (↓)
Sekretom (+Brefeldin A)	nicht signifikant beeinflusst (-)

4.7.1 Nachweis von dem Protein Mif in murinen und humanen Zelllinien sowie Geweben der Skelettmuskulatur

Um auszuschließen, dass es sich bei den in der Arbeit erzielten Beobachtungen bezüglich Mif um Zellkulturartefakte handelt, wurde zunächst überprüft, ob das potentiell redox-sensitive und sekretierte Protein Mif auch in primären Skelettmuskelgeweben detektierbar ist. Dafür wurden Zelllysate von murinen und humanen Skelettmuskelgewebe untersucht (Abbildung 23).

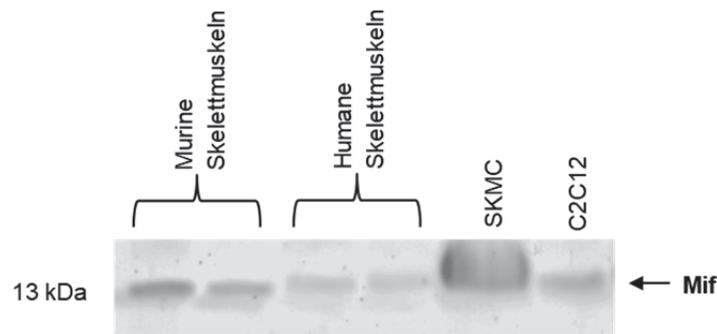


Abbildung 23: Immunfärbung gegen das potentiell redox-aktive Protein Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktor (Mif). Die Expression von Mif (13 kDa) wurde in Lysaten von murinen und humanen Skelettmuskelgewebeproben sowie in Lysaten von murinen C2C12 und primären humanen SkMC Myotuben nachgewiesen.

In den analysierten Skelettmuskelzellen (C2C12 und SkMC) und Geweben (murin und human) konnte das Protein Mif über eine Immunfärbung nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass Mif nicht nur in den murinen und humanen Zelllinien zu finden ist, sondern ebenfalls in murinem und humanem Skelettmuskelgewebe vorkommt.

4.7.2 Untersuchung reversibler oxidativer Cysteinmodifikation des Proteins Mif

Um mögliche palmitatinduzierte Veränderungen des Redoxstatus von dem Protein Mif auf der Cysteinebene näher zu untersuchen, wurden im folgenden Experimente mit der isotonenmarkierten thiolreaktiven Substanz NEM-D5 durchgeführt. Bei diesem Versuchsansatz wurde das zuvor verwendete IAM durch NEM-D5 ersetzt, wodurch es möglich wird, von NEM-D5 markierten Peptiden auf eine reversible oxidative Cysteinmodifikation rückzuschließen. Die Stöchiometrie der Oxidation wird für jedes Peptid einzeln aus dem Verhältnis von NEM-D5 und NEM ermittelt. Eine schematische Darstellung der Probenaufarbeitungsstrategie für die Analyse von redox-sensitiven Cysteinen ist in Abbildung 24 zusammengefasst.

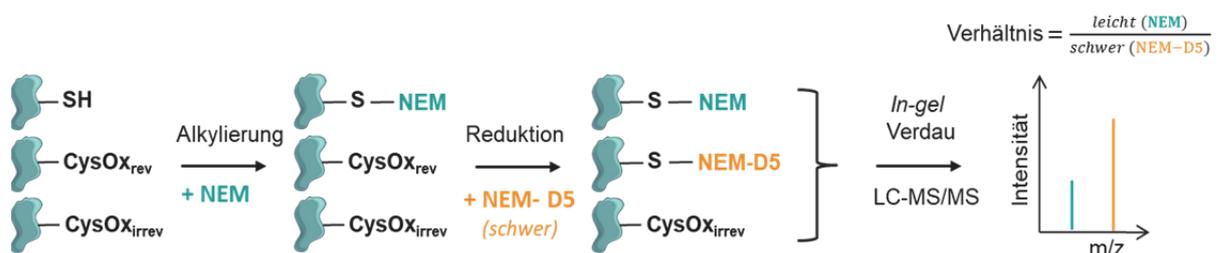


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung für die differenzielle Analyse von redox-sensitiven Cysteinen, unter Verwendung von „leichtem“ *N*-Ethylmaleinimid (NEM) und isotonenmarkiertem „schwerem“ NEM-D5. Im ersten Schritt werden die nicht modifizierten, freien Thiolgruppen mit leichtem *N*-Ethylmaleinimid (NEM) markiert und anschließend reversibel oxidierte Cysteinreste über die Zugabe von DTT reduziert. Die entstandenen Thiolgruppen werden anschließend mit „schwerem“ NEM-D5 markiert. Die Proteine werden in-gel verdaut und für die Analyse via LC-MS/MS prozessiert. Die Stöchiometrie der Oxidation kann für jedes detektierte Peptid einzeln aus dem Verhältnis von NEM-D5 und NEM ermittelt werden.

In Vorexperimenten konnten die beiden Cysteine C57 und C60 nicht detektiert werden. Zudem ermöglichten die Daten keine quantitative Auswertung und auch die potentielle oxidative Modifikation am Cystein C81 konnte auf Peptidebene nicht quantitativ gezeigt werden. Aus diesem Grund wurde in der Arbeit ein alternativer Ansatz der gezielten Analyse gewählt. Dafür wurde eine größere Menge des Zielproteins benötigt.

Hierzu wurde zum einen die rekombinante Herstellung in *E. coli* und anschließende Aufreinigung des Proteins Mif im Rahmen der Arbeit etabliert und mittels LC-MS/MS Analyse validiert (Anhang: Abbildung 45). Die bakterielle Expression ermöglicht die Herstellung einer ausreichenden Menge des Proteins Mif, um potentiell eine Intaktproteinmessung durchführen und somit Hinweise auf potentielle oxidative Cysteinmodifikationen erhalten zu können.

Ein weiterer Ansatz der Arbeit bestand darin, ein Überexpressionskonstrukt aus *Mif* (murin) und *GFP* (*Mif-GFP*) über Transfektion in die C2C12 Zellen einzubringen und ein Protokoll für die Anreicherung über antikörperbasierte Immunpräzipitation (IP) des Fusionsproteins zu etablieren. Ein pcMV3-*GFP*-Kontrollvektor dient hierbei der Identifizierung von GFP-spezifischen Interaktionspartnern. Der Vektor pcMV3 *Mif-GFP* WT sowie der Kontrollvektor pcMV3-*GFP* wurden in die C2C12 Muskelzellen über Transfektion eingebracht, die Zellen drei Wochen in Selektionsmedium und anschließend via FACS (*fluorescence activated cell sorting*) selektioniert. Die im Rahmen der Arbeit generierten Zelllinien, die das wildtypische *Mif-GFP* Konstrukt enthalten, werden im Folgenden „Mif-GFP WT“ genannt.

Für die IP wurden C2C12 Myotuben mit einem NEM-haltigen Lysepuffer aufgeschlossen, um die freien Thiolgruppen, die keine reversible Oxidation tragen, zu markieren. Aus dem Zelllysat wurde über eine antikörperbasierte IP das Zielprotein Mif-GFP aufgereinigt. Die IP wurde mit einem anti-GFP Antikörper durchgeführt. Um die Aufreinigung des Fusionsproteins Mif-GFP zu überprüfen, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und die Proteine mittels Silberfärbung visualisiert. In der Gelspur der Eluatprobe wurde die entsprechende Bande auf der Höhe des Fusionsproteins Mif-GFP (ca. 40 kDa) ausgeschnitten und die beiden Proteine Mif und GFP via LC-MS/MS verifiziert (Abbildung 25). Mit diesem Versuchsansatz konnte bestätigt werden, dass über die etablierte IP spezifisch Mif-GFP angereichert wurde.

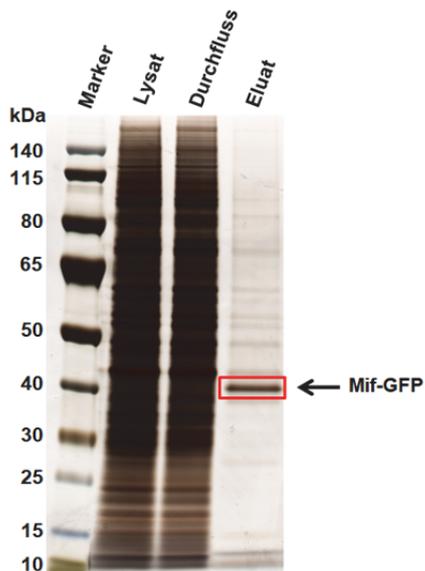


Abbildung 25: SDS-PAGE des Zelllysates, des Durchflusses und des IP-Eluats von pCMV3 *Mif-gfp* transfizierten C2C12 Myotuben. Die Proben wurden im Gel aufgetrennt und mit Silber angefärbt. In der Gelspur des Eluats wurde die Bande auf Höhe des Fusionsproteins Mif-GFP (ca. 40 kDa) ausgeschnitten, prozessiert und Mif-GFP via LC-MS/MS verifiziert.

Für die nachfolgenden Versuche wurden die Proteine der Eluatproben über eine SDS-PAGE im Bereich des Sammelgels vereint, um weiterführend potentielle Interaktionspartner vom Mif zu untersuchen.

Um die Sequenzabdeckung von dem Protein Mif zu erhöhen, wurde ein kombinatorischer *In-Gel* Verdau mit der Endoproteinase Lys-C und Trypsin in der Arbeit entwickelt. Im Gegensatz zu Trypsin kann Lys-C auch Lysine spalten, denen ein Prolin folgt. Dadurch werden cysteinhaltige Peptide von dem Mif generiert, die über LC-MS/MS detektierbar sind. Über den kombinatorischen Verdau konnte in diesem Versuchsansatz eine Sequenzabdeckung von insgesamt 96,5 % erzielt werden (Abbildung 26).

MPMFIVNTNVPR | ASVPEGFLSELTQQLAQATGK | PAQYIAVHVVPDQLMTFSGTNDP⁵⁷CAL⁶⁰CSLH
SIGK | IGGAQNR | NYSK | LL⁸¹CGLLSDR | LHI SPDR | VYINYYDMNAANVGWNGSTFA |

Abbildung 26: Sequenzabdeckung von dem Protein Mif. Die detektierten acht Peptide der Mif-Sequenz sind in Grün markiert. Cysteine (C) wurden in Rot kenntlich gemacht und eine Zahl markiert ihre Position in der Aminosäuresequenz.

Für die Identifizierung von reversiblen oxidativen Cysteinmodifikationen wurden IP-Eluate mit und ohne Palmitatbehandlung untersucht (n = 5). Die etablierte Methode ermöglichte es, alle in der Mif-Sequenz enthaltenen Cysteine via LC-MS/MS zu detektieren (Abbildung 26).

Weiterhin konnten an den beiden cysteinhaltigen Peptiden NEM und/oder NEM-D5 Markierungen nachgewiesen werden:

C57/C60: PAQYIAVHVVPDQLMTFSGTNDPC(NEM-D5)ALC(NEM-D5)SLHSIGK
C81: LLC(NEM-D5)GLLSDR sowie auch LLC(NEM)GLLSDR

Abbildung 27 zeigt ein Spektrum des in der Arbeit detektierten Peptides LLCGLLSDR, das ein Cystein an Position C81 enthält und mit NEM-D5 markiert gefunden wurde.

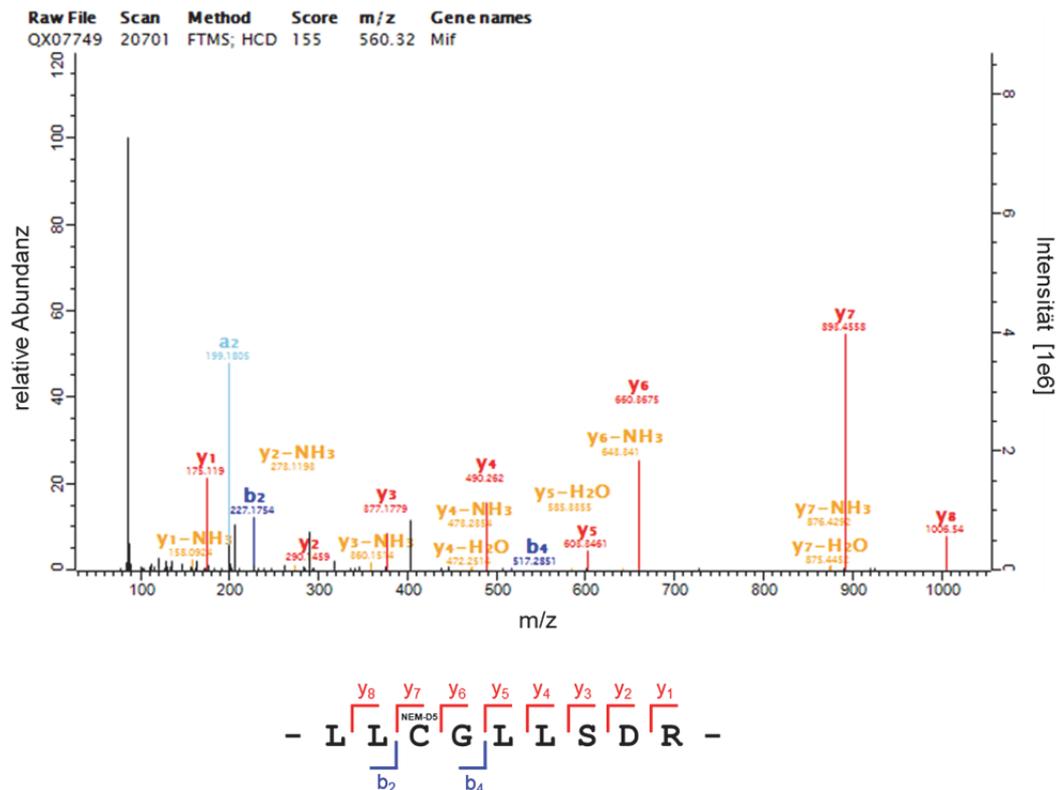


Abbildung 27: MS-Spektrum des NEM-D5 markierten Peptides LLCGLLSDR. Auf der x-Achse wurde m/z gegen die relative Intensität (y-Achse) aufgetragen. In Rot ist die y-Ionenserie aufgetragen und in Blau die b-Ionenserie. Unterhalb des Spektrums ist die entsprechende Peptidsequenz abgebildet und die detektierte Modifikation NEM-D5 (NEM = *N*-Ethylmaleinimid).

Allerdings ergab die Analyse, dass die Anzahl der identifizierten und quantifizierten NEM/NEM-D5 markierten Peptide über die angefertigten Replikate zu gering war, um eine statistisch valide Aussage über den Oxidationsstatus des Proteins Mif treffen zu können.

Eine weiterführende Optimierung des Versuchsprotokolls scheint somit notwendig, um die Identifizierung und Quantifizierung der cysteinhaltigen Peptide von Mif zu verbessern und die reversible oxidative Cysteinmodifikation von Mif über einen markierungsbasierten Ansatz auch statistisch zu belegen.

4.7.3 Funktionelle Untersuchung der Sekretion von Mif in Abhängigkeit einer Cysteinmutation

Da in dem verwendeten Modellsystem der murinen C2C12 Myotuben nach Palmitatbehandlung das Protein Mif sowohl eine Redoxaktivität sowie eine verringerte Sekretion gezeigt wurde, sollte im Folgenden überprüft werden, ob die drei in der Mif-Aminosäuresequenz enthaltenen Cysteine für die nach Palmitatbehandlung verringerte Sekretion eine Rolle spielen. Dafür wurden die in der Arbeit

erstellten C2C12 Zelllinien verwendet, in die über Transfektion eines der Überexpressionskonstrukte (pcMV3 *mMif-GFP WT*, *-C57*, *-C60*, *-C81*) eingebracht wurde. Diese generierten C2C12 Zelllinien werden im Folgenden „Mif-GFP WT“, „Mif-GFP C57“, „Mif-GFP C60“ und „Mif-GFP C81“, genannt.

4.7.3.1 Untersuchung der subzelluläre Lokalisation von dem Protein Mif

Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von dem Zielprotein Mif mittels Fluoreszenzfärbungen bietet das Potential, Hinweise auf den möglichen Sekretionsmechanismus von Mif zu erhalten. Dafür wurden C2C12 Myotuben verwendet, die Zellkerne mit DAPI gefärbt und das Protein Mif mit einem Antikörper der Firma Sigma detektiert.

Sowohl in den Kontrollen als auch in den palmitatbehandelten Zellen war ein deutliches Signal für das Protein Mif in Zytoplasma und im Nukleus erkennbar (Abbildung 28).

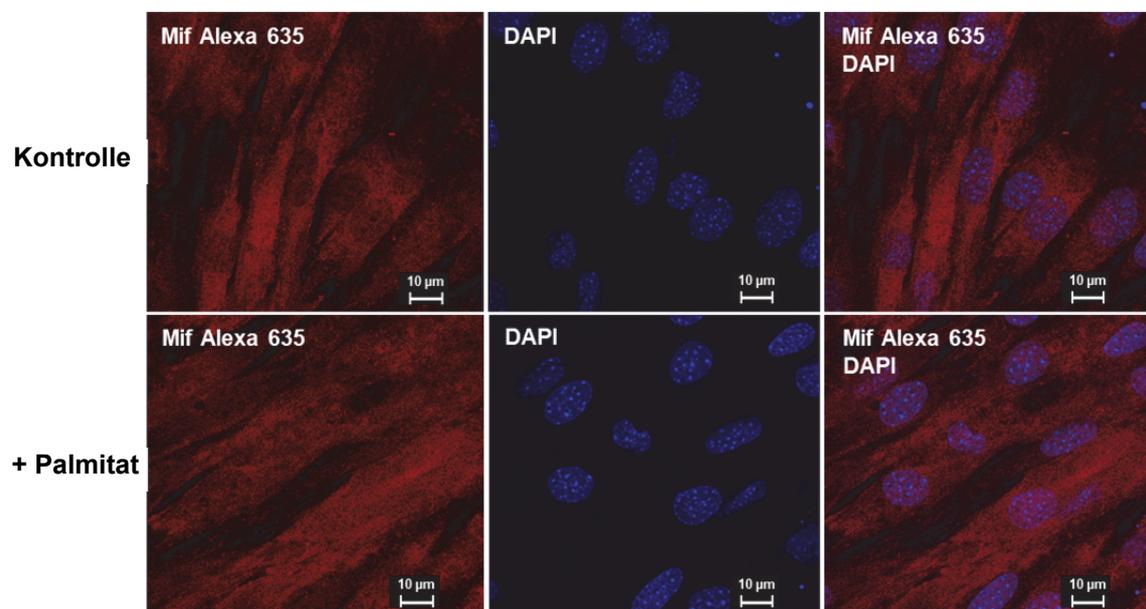


Abbildung 28: Immunocytochemische Färbungen gegen das Protein Mif in C2C12 Myotuben. Für die Färbung wurde ein spezifischer Antikörper gegen Mif verwendet (Sigma). In Rot ist das Protein Mif gefärbt und in Blau mit DAPI der Zellkern. Die Aufnahmen wurden am konfokalen hochauflösenden System Leica TCS SP8STED 3X aufgenommen und zeigen, dass Mif sowohl in den Kontrollen als auch in den palmitatbehandelten Zellen gleichmäßig im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert ist.

Des Weiteren ist bisher nicht bekannt, welche Rolle die in der Aminosäuresequenz enthaltenen Cysteine für die subzelluläre Lokalisation vom Mif spielen. Dafür wurden die in der Arbeit erstellten C2C12 Zelllinien Mif-GFP WT, *-C57*, *-C60* und *-C81* sowie die wildtypische Zelllinie verwendet und immunocytochemische Färbungen mit einem weiteren Antikörper gegen Mif der Firma Abcam angefertigt.

Die immunocytochemischen Färbungen zeigten den Erwartungen entsprechend, dass die C2C12 WT Zelllinie sowie die transfizierten Zelllinien sich nicht deutlich voneinander unterscheiden (Abbildung

29). Die moderate Überexpression von Mif-GFP führte nicht zu einer Akkumulation des Zielproteins in der Zelle. Für die C60 Zelllinie hat die Färbung für Mif nicht funktioniert.

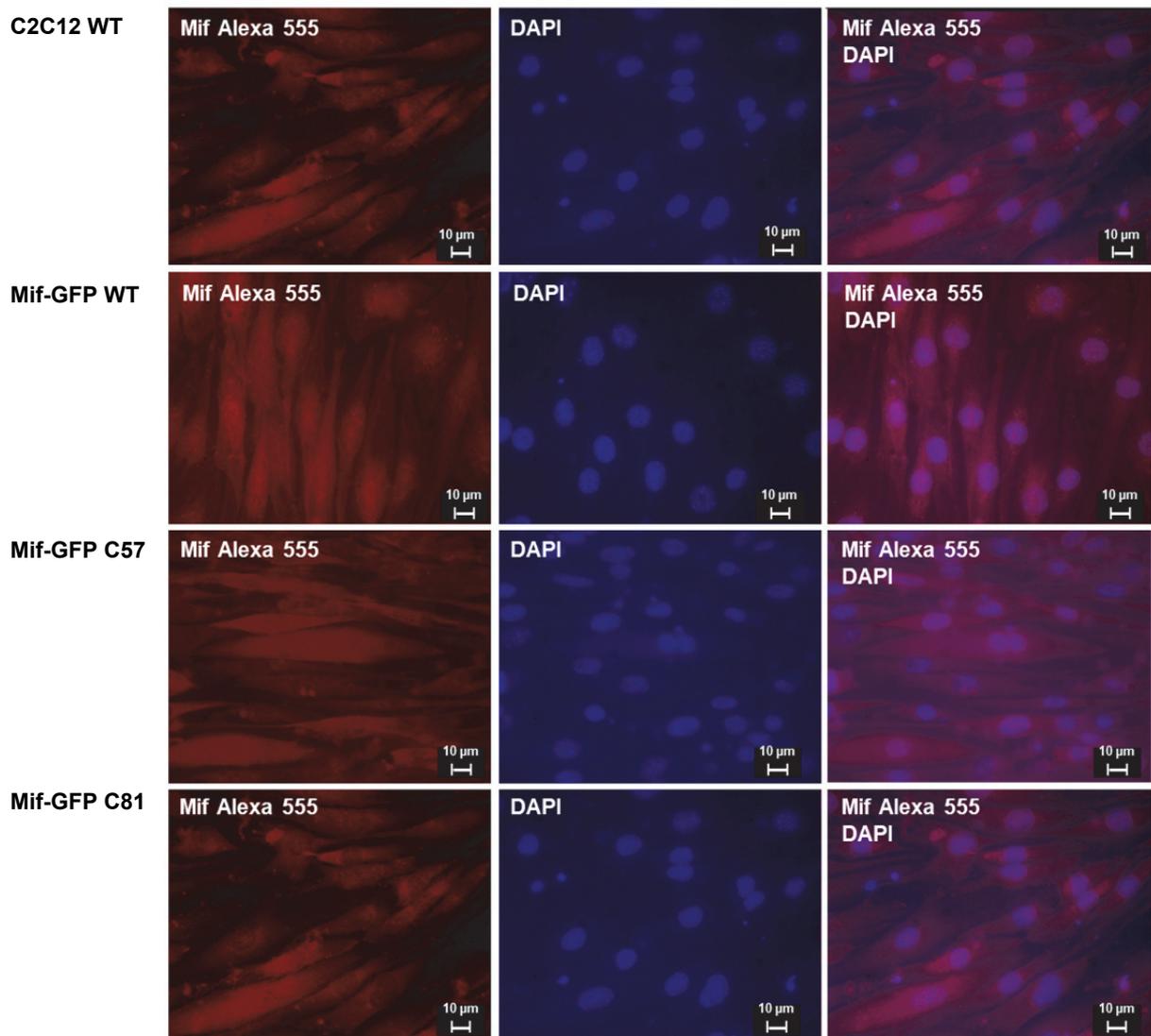


Abbildung 29: Immunfärbungen gegen Mif und GFP in C2C12 Myotuben. Für die Färbung wurde ein spezifischer Antikörper gegen Mif von der Firma Abcam verwendet. In Rot ist das Protein Mif markiert (endogenes Mif und Fusionsprotein Mif-GFP). In Blau sind über eine Färbung mit DAPI die Zellkerne eingefärbt. Es wurden folgende Zelllinien für die Färbungen verwendet: Wildtyp = WT; Mif-GFP WT; Mif-GFP C57 und Mif-GFP C81.

4.7.3.2 Der Einfluss der Cysteinreste auf die redox-abhängige Sekretion von Mif

Um die Bedeutung der Cysteinreste für die potentiell redox-abhängige Sekretion von dem Kandidatenprotein Mif zu untersuchen, wurden die transfizierten Zellen mit Palmitat behandelt und die Sekretome und zugehörigen zellulären Proteome anhand von Immunfärbungen gegen GFP vergleichend analysiert ($n = 4$) (Abbildung 30 A). Es konnte in allen analysierten Proben der generierten *Mif-GFP* überexprimierenden Zelllinien das Fusionsprotein Mif-GFP (ca. 40 kDa) über eine Immunfärbung gegen GFP detektiert werden (Abbildung 30 A).

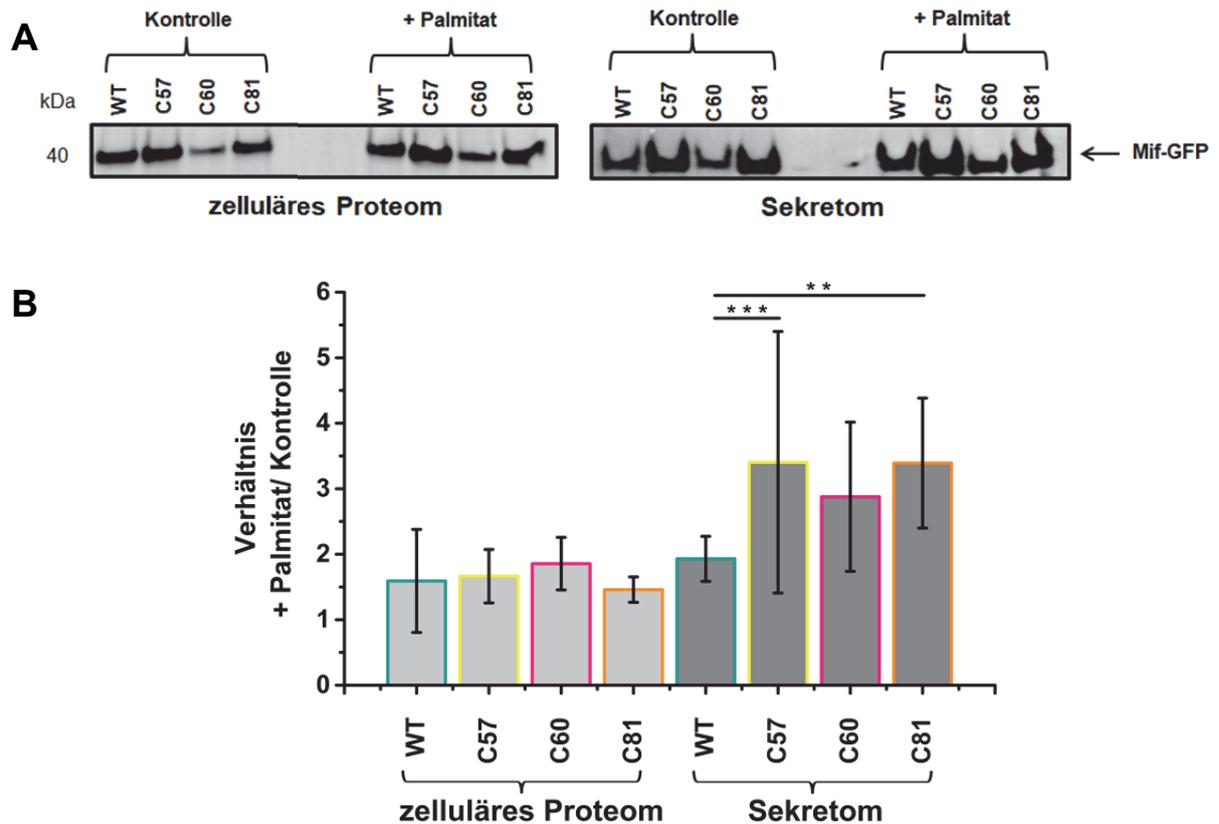


Abbildung 30: Western Blot Analyse von Mif-GFP Überexpressionsvarianten im zellulären Proteom und Sekretom von C2C12 Myotuben. Für die Analyse wurden jeweils 5 µg Protein pro Sekretom- und Proteomprobe geladen. A) Exemplarische Ergebnisse der Western Blot Analysen von Proteom- und Sekretomproben. B) Quantitative Analyse der in A) mit Pfeilen markierten Signale zeigt in allen Proteom- und Sekretomproben nach Palmitatbehandlung eine erhöhte GFP-Signalintensität (n=4/Gruppe). Die Balken repräsentieren die Mittelwerte des Signalverhältnisses von Palmitatbehandlung und Kontrollen und die Fehlerbalken die Standardabweichung. Die Sterne markieren einen p-Wert $** \leq 0,01$ und $*** \leq 0,001$.

Da die *Mif-GFP* Expression in den untersuchten Zelllinien gegebenenfalls leicht variiert, wurde eine Normalisierung der Daten über das Verhältnis der Fluoreszenzintensität der palmitatbehandelten Proben (+P) zu den Kontrollen (K) durchgeführt. Die Varianzanalyse auf Basis der normalisierten Daten zeigte, dass im Sekretom signifikant mehr Mif-GFP pro µg Gesamtprotein im direkten Vergleich mit dem zellulären Proteom detektiert wurde (p-Wert = 0,006). Des Weiteren konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Genotypen (WT, C57, C60, C81) (p-Wert = 0,002) sowie ein Interaktions-Effekt zwischen den Genotypen und der Gruppe (Sekretom oder zelluläres Proteom) (p-Wert = 0,002) gefunden werden. Anschließend wurde eine Signifikanzanalyse durchgeführt, bei der im zellulären Proteom kein Unterschied zwischen den untersuchten Genotypen detektiert wurde. Hingegen konnte in den Sekretomproben ein signifikanter Effekt der Cysteinmutation über den Anstieg des Verhältnisses (+P/K) der beiden Mutanten C57 und C81 im Vergleich zum WT (WT/C57: p-Wert = 0,0003 und WT/C81: p-Wert = 0,004) gefunden werden (Abbildung 30 B).

Das Experiment zeigte, dass stets das Verhältnis (+P/K) im Sekretom erhöht war (Abbildung 30 B). In den vorausgegangenen LC-MS/MS-basierten Proteom- und Sekretomstudien wurde nach Palmitatbehandlung die Proteinabundanz von dem Protein Mif im Proteom erhöht und im Sekretom signifikant verringert detektiert (4.3 und 4.5.2). Im Vergleich dazu zeigen die *Mif-GFP* überexprimierenden Zelllinien nach Palmitatbehandlung, entgegen den Erwartungen, eine erhöhte Proteinabundanz von Mif-GFP im Sekretom, was auf eine verstärkte Sekretion von Mif hindeutet (Abbildung 30 B).

4.7.4 Interaktionsstudien des GFP-gekoppelten Mif nach Durchführung einer Immunpräzipitation

Um den Sekretionsmechanismus von Mif weiterführend zu untersuchen und mögliche an der Sekretion von Mif beteiligte Proteine zu identifizieren, wurde das Interaktom des GFP-gekoppelten Mif Proteins analysiert. Mit diesem Versuchsansatz soll die Rolle von dem Protein Mif im Kontext des Modellsystems der palmitatinduziert insulinresistenten Skelettmuskelzellen untersucht werden. Für die Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern wurde der zuvor etablierte Ansatz verwendet, bei dem nach der Ernte und Lyse der C2C12 Myotuben eine IP unter Verwendung eines Antikörpers gegen das an Mif gekoppelte Protein GFP durchgeführt wurde. Als Negativkontrolle und zur Identifizierung von unspezifischen Interaktionspartnern wurden C2C12 Myotuben verwendet, in die ein GFP-Kontrollvektor ohne *Mif* über Transfektion eingebracht wurde. Die Proben wurden anschließend mittels LC-MS/MS Analyse untersucht.

Im Rahmen der Auswertung wurden potentielle Kontaminanten anhand der von Varjosalo *et al.* erstellten Kontaminantenliste aus dem Datensatz entfernt (Varjosalo *et al.*, 2013). Mit diesem Versuchsansatz konnten insgesamt 1.977 Proteine identifiziert und davon 938 quantifiziert werden. Um spezifische Interaktionspartner von dem Protein Mif zu detektieren, wurden potentielle Veränderungen der Proteinabundanzen zwischen den beiden Gruppen GFP-Leervektorkontrolle und Mif-GFP anhand einer differenziellen Analyse untersucht. Die Untersuchung führte zu der Identifizierung von 47 potentiellen Interaktionspartnern von Mif (Abbildung 31, Anhang: Tabelle 20). Um involvierte Signalwege und biologische Prozesse zu untersuchen, wurde im Folgenden eine 1D Anreicherungsanalyse auf Basis der Protein-assoziierten KEGG Kategorien durchgeführt. Die Analyse zeigte, dass die potentielle Interaktionspartner vermehrt mit der KEGG-Kategorie *Tight Junction* assoziiert werden (AF = 0,69; p-Wert = 0,039), zu der auch die beiden am stärksten verändert abundanten Proteine *Band 4.1-like protein 2* (Epb4) und das *Tight junction protein ZO-1* (Tjp2) zählen.

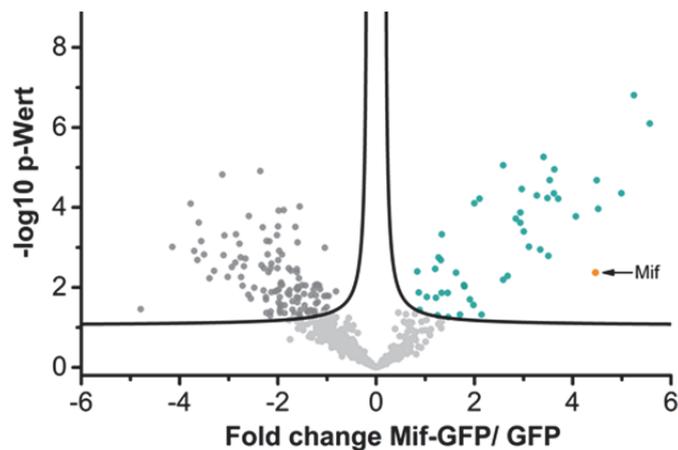


Abbildung 31: Potentielle Interaktionspartner des Mif. Es wurden C2C12 Myotuben verwendet, in die entweder das Konstrukt *Mif-gfp* oder als Kontrolle den GFP-Leervektor über Transfektion eingebracht wurde. Nach der Zellernte und Lyse wurde eine IP gegen GFP durchgeführt, die Eluate prozessiert und via LC-MS/MS analysiert. In Grün sind Proteine markiert, die in den Proben der Mif-GFP überexpemierenden C2C12 Myotuben signifikant erhöhte Abundanzen zeigen und somit potentielle Interaktionspartner des Mif darstellen. Der Fold change ist die Differenz der Mittelwerte der log₂ LFQ Intensitäten.

Des Weiteren ist bisher nicht bekannt, ob die in der Aminosäuresequenz enthaltenen Cysteine eine Rolle für potentielle Protein-Protein-Interaktion von Protein Mif spielen. Für die Analyse potentiell redox-vermittelter Proteininteraktionspartner wurden die in der Arbeit erstellten C2C12 Zelllinien Mif-GFP C57, -C60 und -C81 verwendet.

Über die MS-basierte Analyse der Interaktome (Mif-GFP C57, C60 und C81) wurden 25 Proteine detektiert, die im Vergleich mit der Zelllinie der GFP-Leervektorkontrolle signifikant erhöhte Abundanzen zeigten (Anhang: Abbildung 46). Diese 25 Proteine sind potentielle Interaktionspartner von Mif, die möglicherweise unabhängig von den Cysteinresten C57, C60 und C81 mit dem Protein Mif interagieren (Tabelle 16).

Tabelle 16: Gegenüber der GFP-Leervektorkontrolle durch Mif-GFP angereicherten Proteine.

Protein	Gen	p-Wert Mif- GFP/GFP	p-Wert Mif-GFP C57 mut/GFP	p-Wert Mif-GFP C60 mut/GFP	p-Wert Mif-GFP C81 mut/GFP
Band 4.1-like protein 2	Epb41l2	7,94E-07	2,88E-07	7,76E-07	2,95E-06
Caprin-1	Caprin1	5,89E-05	1,95E-05	1,95E-07	2,19E-05
Tight junction protein ZO-1	Tjp1	1,55E-07	7,24E-05	0,0018	3,24E-05
Bcl-2-associated transcription factor 1	Bclaf1	0,0002	0,0002	0,0112	0,0023
Brain acid soluble protein 1	Basp1	3,47E-07	0,0002	0,0123	0,0024
Serine/arginine-rich splicing factor 2	Srsf2	3,80E-05	2,69E-04	5,50E-05	0,0004
Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2	Zranb2	0,0004	1,23E-08	1,55E-05	0,0004
Thyroid hormone receptor-associated protein 3	Thrap3	4,47E-05	6,03E-05	5,37E-05	0,0019
Serine/arginine-rich splicing factor 6	Srsf6	5,75E-05	0,0001	2,04E-06	0,0011
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	Glud1	5,50E-06	6,17E-05	6,17E-07	0,0032
Aspartyl aminopeptidase	Dnpep	0,0009	0,0011	7,08E-06	0,0008
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Marcks	0,0001	0,0001	0,0006	0,0003
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	Sfpq	5,01E-05	1,86E-05	1,20E-08	5,50E-06
Hepatoma-derived growth factor-related protein 2	Hdgfrp2	0,0002	5,25E-06	0,0021	0,0002
AHNAK nucleoprotein	Ahnak	0,0010	0,0089	0,0043	0,0117
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	Ybx1	0,0004	9,55E-07	2,34E-06	8,51E-06
RNA-binding protein FUS	Fus	0,0002	0,0214	0,0008	0,0019
Y-box-binding protein 3	Ybx3	0,0013	0,0072	1,78E-07	0,0001
AP-3 complex subunit beta-1	Ap3b1	0,0013	0,0001	0,0145	0,0977
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	Eif3c	8,71E-06	0,0020	0,0002	0,0219
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3bp1	0,0107	0,0019	0,0004	0,0002
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	Eif3b	6,03E-05	0,0018	0,0010	0,0145
Ribosome-binding protein 1	Rrbp1	0,0025	3,02E-07	5,25E-05	0,0006
Nucleolin	Ncl	0,0135	1,86E-05	2,51E-06	7,76E-06
Treacle protein	Tcof1	0,0138	0,0309	0,0302	0,0204

Zudem zeigte jede der drei untersuchten Mif-GFP Cysteinmutanten Zelllinien (C57, C60 und C81) im Vergleich zu der wildtypischen Mif-GFP Zelllinie differenziell verändert abundante Proteine (Anhang: Abbildung 46). Deshalb wurden anschließend die drei Zelllinien der Mif-GFP Cysteinmutanten mit der wildtypischen Mif-GFP Zelllinie über eine differenzielle Analyse miteinander verglichen und gezeigt, dass insbesondere die Mutationen C57 und C60 potentiell einen Einfluss auf die Zusammensetzung des Interaktoms von dem Protein Mif zu haben scheinen (Abbildung 32, Anhang: Tabelle 20).

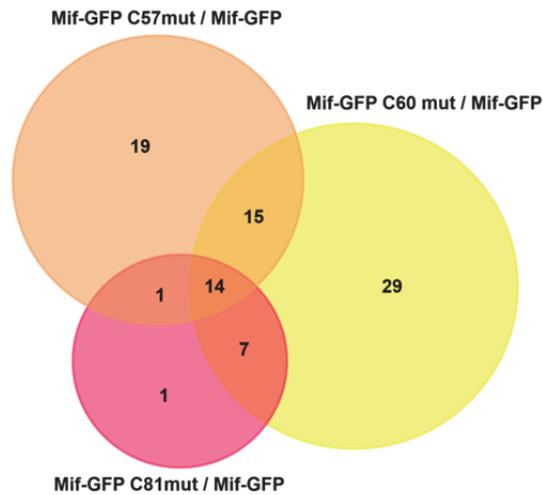


Abbildung 32: Identifizierte Interaktionspartner von Mif: Unterschiede und Gemeinsamkeiten der untersuchten Cysteinvarianten. Für die Analyse wurden ausschließlich die Proteindaten verwendet, die im Vergleich mit Proben der GFP-Leervektorkontrolle signifikant erhöhte Abundanzen zeigten. Anschließend wurde der Datensatz auf differenzielle Unterschiede der Proteinabundanzen der drei Zelllinien der Mif-GFP überexprimierenden Cysteinmutanten im Vergleich zu der Zelllinie die das wildtypische Mif-GFP überexprimiert untersucht. Ziel war die Identifizierung von potentiell Cystein-spezifischen Interaktionspartnern von dem Protein Mif.

5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von redox-abhängigen Prozessen in einem etablierten Zellkulturmodell der Insulinresistenz. Redox-induzierte reversible Cysteinmodifikationen spielen bei der zellulären Signalvermittlung und Regulation der Proteinaktivität eine bedeutende Rolle. Allerdings ist bisher wenig über die beteiligten Prozesse und Zielproteine bekannt. Aus diesem Grund wurde in der Arbeit das Modellsystem der Palmitatbehandlung von Skelettmuskelzellen gewählt. Das Modellsystem zeichnet sich dadurch aus, dass mit der Palmitatbehandlung eine verstärkte Bildung von ROS induziert und ein funktioneller Phänotyp der Insulinresistenz ausgebildet wird (Chavez *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2009; Kwak *et al.*, 2017; Lambertucci *et al.*, 2008; Nakamura *et al.*, 2009; Pu *et al.*, 2011). Zudem ermöglicht der Skelettmuskel als aktiv endokrines Organ die palmitatinduzierten Veränderungen auch außerhalb der Zelle über die Analyse des Sekretoms zu verfolgen. Um potentiell redox-regulierte Prozesse zu identifizieren, wurde in dieser Arbeit ein proteomanalytischer Ansatz gewählt und das Modellsystem auf Ebene des zellulären Proteoms, des Redox-Proteoms und des Sekretoms detailliert analysiert.

5.1 Methodische Diskussion

5.1.1 Der Skelettmuskel als Modellsystem zur Analyse des Redox-Proteoms

In der Arbeit wurde die gesättigte Fettsäure Palmitat (C16:0) verwendet, um die verstärkte Bildung reaktiver Spezies in Skelettmuskelzellen zu induzieren. Die Verwendung der Fettsäure Palmitat als physiologischer Stimulus für die Induktion von reaktiven Spezies wird dadurch begründet, dass es sowohl im Plasma von Tieren als auch im Plasma von adipösen Patienten signifikant erhöht gefunden wurde, im menschlichen Körper etwa 21–30 % des Depotfetts ausmacht und mit einer verstärkten ROS Bildung assoziiert wird (Coll *et al.*, 2010; Kingsbury *et al.*, 1961; Ly *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2008). Zudem ist die Verwendung von Palmitat für die Untersuchung von Redoxprozessen in Skelettmuskelzellen ein bereits gut beschriebenes und etabliertes Modellsystem. Die in der Arbeit verwendete Palmitatkonzentration von 500 μM und eine Behandlungsdauer von 16 h wurden basierend auf den Angaben von vergleichbaren Studien gewählt, in denen der Einfluss von Palmitat auf die Zellviabilität, die Ausbildung einer Insulinresistenz und die Entstehung von ROS untersucht wurde (Deshmukh *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2012; Jove *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2013).

Im Rahmen der Arbeit wurden murine C2C12 sowie primäre humane Skelettmuskelzellen auf ihre Eignung als Modellsystem zur Analyse von Redoxprozessen untersucht. Um den physiologischen Effekt der palmitatinduzierten Insulinresistenz sicher zu stellen, wurde sowohl die charakteristische verringerte zelluläre Glukoseaufnahme überprüft als auch die verstärkte Bildung von ROS. Die Glukoseaufnahme nach Palmitatbehandlung wurde anhand des Glukoseanalogons 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglukose (2-NBDG) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl für die murinen C2C12 als auch für die primären humanen SkMC die Glukoseaufnahme nach

Palmitatbehandlung signifikant verringert war. Neben der Glukoseaufnahme kann die palmitatinduzierte Insulinresistenz ebenfalls über die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) Aktivität, die *Glut4* Expression oder die Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt) am Serin 473 nachgewiesen werden (Powell *et al.*, 2004; Schmitz-Peiffer *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2013).

Um eine palmitatinduziert verstärkte Bildung von ROS zu zeigen, wurde in der Arbeit stellvertretend die Bildung von unspezifischen extrazellulären ROS unter Verwendung des AmplexRed-Assays und für intrazellulären H_2O_2 die C2C12 Zellen zusätzlich die Bildung von über den Farbstoff H_2DCFDA untersucht. In der Arbeit konnte für die murinen C2C12 Myotuben ein signifikanter Anstieg von ROS nach Palmitatbehandlung bestätigt werden, dahingegen für die primären humanen SkMC nicht. In anderen Studien wurde ebenfalls beschrieben, dass sich die Ergebnisse von Skelettmuskelzelllinien durchaus von denen der primären Zellen unterscheiden können (Owens *et al.*, 2013; Skrobuk *et al.*, 2012). Mäkinen *et al.* zeigten beispielsweise, dass in primären humanen Skelettmuskelzellen von einem gesunden männlichen Spender nach 12 h Behandlung mit 0,4 mM Palmitat eine Inhibierung der insulinstimulierten Akt-Ser⁴⁷³ Phosphorylierung detektiert wurde, was als ein Indikator für eine Insulinresistenz gilt, aber es wurde ebenfalls keine verstärkte Bildung von ROS detektiert (Mäkinen *et al.*, 2017).

Aufgrund der in der Arbeit erzielten Ergebnisse der zellulären Glukoseaufnahme und der erhöhten H_2O_2 Bildung wurde für die nachfolgenden Experimente ausschließlich das Modellsystem der murinen C2C12 Myoblastenzelllinie verwendet, um potentiell redox-abhängige Prozesse im Kontext der Insulinresistenz zu untersuchen.

5.1.2 Proteomanalyse der Redoxprozesse in C2C12 Myotuben

Die vorausgegangenen Untersuchungen haben für das Modellsystem der palmitatbehandelten C2C12 Myotuben eine verstärkte ROS-Bildung bestätigt und sollen hier als Grundlage für die weiterführende Analyse von physiologischen Redoxprozessen dienen.

Hier bietet die Proteomanalyse mit ihrer Kernmethode der Massenspektrometrie die Möglichkeit, Proteine und ihre posttranslationalen Modifikationen zeitgleich zu identifizieren und zu quantifizieren. Aus diesem Grund wurde in der Arbeit ein MS-basierter Analyseansatz gewählt. Hierbei wird hauptsächlich der peptidbasierte Ansatz (*bottom up*) für komplexe Zellysatproben (Megger *et al.*, 2014).

Um ein möglichst umfassendes Bild der palmitatinduzierten Veränderungen und letztendlich der potentiell redox-vermittelten Effekte zu erhalten, wurde neben dem zellulären Proteom auch das Redox-Proteom und das Sekretom massenspektrometrisch untersucht. Dazu mussten zunächst geeignete Methoden entwickelt und etabliert werden, die im Folgenden hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit diskutiert werden.

5.1.2.1 Proteomanalyse von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben

Als Grundlage für die nachfolgende Redox-Proteom-Studie wurden zunächst palmitatinduzierte Veränderungen auf Ebene des zellulären Proteoms unter Verwendung von markierungsfreier Quantifizierung mittels Massenspektrometrie analysiert. Die Methodik der markierungsfreien Quantifizierung ist vorteilhaft, da die Kultivierung der Zellen nicht angepasst werden müssen wie etwa für metabolische Markierungsstrategien und auch keine weitere chemische Modifikation der Proteine durchgeführt werden muss.

In dieser Arbeit konnten im zellulären Proteom von C2C12 Myoblasten 2.371 Proteine quantifiziert werden. Die quantitative Studie zeigte, dass der physiologische Stimulus der Palmitatbehandlung die Abundanz von 830 (35 %) der quantifizierten Proteine im Proteom beeinflusst. Im Vergleich dazu quantifizierten Chen *et al.* über einen SILAC-basierten Ansatz 3.437 Proteine im Proteom von nicht ausdifferenzierten C2C12 Myoblasten, wobei die Abundanz von 244 Proteine (7,1 %) über die Palmitatbehandlung beeinflusst wurde (Chen *et al.*, 2016). Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass in der Studie von Chen *et al.* die Proteomproben fraktioniert wurden (30 Fraktionen), wodurch die unterschiedliche Anzahl von quantifizierten Proteinen erklärt werden könnte. Weiterhin wurden von Chen *et al.* nicht ausdifferenzierte Myoblasten anstatt Myotuben untersucht (Chen *et al.*, 2016). Myoblasten und Myotuben zeigen mitunter starke Unterschiede in der Zusammensetzung des zellulären Proteoms, was die Vergleichbarkeit der Studien erschwert und die unterschiedliche Anzahl der nach Palmitatbehandlung verändert abundanten Proteine erklären könnte (Kislinger *et al.*, 2005).

5.1.2.2 Identifizierung von redox-sensitiven Proteinen mittels Proteomanalyse

Da oxPTM häufig substöchiometrisch und somit in geringen Mengen vorliegen, ist für die Analyse einer komplexen Lysatprobe eine Anreicherung der oxidativ modifizierten Proteine erforderlich. Dafür wurde im Rahmen der Arbeit eine Methode der Probenaufarbeitung über eine Thiopropyl Sepharose Matrix auf Proteinebene, für die MS-basierte Analyse von redox-sensitiven Proteinen verwendet (Guo *et al.*, 2014). Mit diesem Ansatz konnten insgesamt 2.750 Proteine quantifiziert und 378 potentiell redox-sensitive Proteine identifiziert werden. Zudem führte die nachfolgende Auswertung der Daten auf Peptidebene zur Quantifizierung von 4.543 carbamidomethylierten Peptiden, die reversibel oxidativ modifizierte Peptide darstellen. Diese 4.543 Peptide konnten wiederum 892 Proteinen zugeordnet werden, wovon 186 nach Palmitatbehandlung verändert vorlagen.

Alternativ zu der Anreicherung auf Proteinebene kann eine Anreicherung auf Peptidebene durchgeführt werden, bei der die Proteine zunächst verdaut und erst anschließend über die Matrix aufgearbeitet werden. Die Analyse auf Peptidebene ermöglicht es, positionsgenaue Informationen der potentiell redox-aktiven Cysteine für jedes identifizierte Protein zu erhalten. Über die Anreicherung auf Peptidebene kann die Sensitivität für cysteinhaltige Peptide erhöht werden, jedoch stehen hierbei weniger Peptide eines Proteins für die Identifizierung und Quantifizierung zur Verfügung. Folglich ist die Sequenzabdeckung für die Identifizierung von Proteinen verringert, wodurch weniger stringente

Filterkriterien für die Datenauswertung angewandt werden. Zudem können über den enzymatischen Verdau z.B. sehr kurze Peptide generiert werden, die mittels LC-MS/MS Analyse nicht detektierbar sind.

Die Anreicherung auf Proteinebene bietet hier einen klaren Vorteil, da Proteine mit mehr als nur einem Peptid identifiziert werden. Mit diesem Analyseansatz auf Proteinebene können ebenfalls Proteine gefunden werden, deren cysteinhaltige Peptide sich nicht via LC-MS/MS analysieren lassen. Viele der in der Arbeit quantifizierten Proteine enthalten mehr als nur ein Cystein in ihrer Aminosäuresequenz. Deshalb können potentiell auch mehrere Cysteine eines Proteins an der TPS-Matrixbindung beteiligt sein, was ebenfalls die Identifizierung von 339 NEM-markierten Peptiden (nicht modifizierte freie Cysteinthiole) trotz Aufreinigung über die TPS-Matrix erklären kann.

Da im Rahmen der Arbeit der Fokus auf der Identifizierung von redox-sensitiven Proteinen lag, ist die Probenaufarbeitung auf Proteinebene für die globale Untersuchung des Proteoms von Vorteil. Weiterführend zu dem in der Arbeit gewählten Ansatz auf Proteinebene könnte über die Wahl des Reduktionsmittels die Cysteinoxidation spezifiziert werden (Yang *et al.*, 2016).

5.1.3 Untersuchung des sekretorischen Phänotyps von C2C12 Myotuben

Eine der größten Herausforderungen der zelllinienbasierten Sekretomanalyse ist die Unterscheidung zwischen *bona fide* sekretierten Proteinen und potentiellen Protein-kontaminanten, die durch tote Zellen oder durch im Kultivierungsmedium enthaltenes Serum in das konditionierte Medium gelangen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit ein mehrstufiger Ansatz gewählt, bei dem die quantitativen Daten von Sekretomen mit dem korrespondierenden zellulären Proteomen verglichen wurden. Hierbei wurde angenommen, dass sekretierte Proteine im Sekretom eine höhere Abundanz aufweisen als im zellulären Proteom. Mit diesem Ansatz konnten 858 *bona fide* sekretierte Proteine identifiziert werden, von denen 17,7 % über SignalP als klassisch sekretiert annotiert wurden. Ein ähnlicher Ansatz für den Vergleich von zellulären Proteomen und Sekretomen für die Identifizierung von sekretierten Proteinen mittels LC-MS/MS Analyse wurde von Luo *et al.* publiziert (Luo *et al.*, 2011). Diese Studie zeigt die Identifizierung sekretierter Proteine von A549 Lungenkrebszellen über den Vergleich der Spektrenanzahl von Sekretomen und zellulären Proteomen. In diesem Ansatz konnten 382 potentiell sekretierte Proteine identifiziert werden, von denen mehr als 76 % als klassisch sekretiert annotiert werden (Luo *et al.*, 2011). Der Unterschied in der Annotation der Proteine könnte damit begründet werden, dass unterschiedliche Zelltypen und Stimulationen für die Analysen verwendet wurden sowie unterschiedliche Programme für die Vorhersage der Proteinsekretion. Luo *et al.* verwendeten eine Kombination aus SignalP (Vorhersage für klassische Proteinsekretion) und SecretomeP (Vorhersage für unkonventionelle Proteinsekretion), wohingegen in der vorliegenden Arbeit ausschließlich SignalP für die Annotation der Proteinsekretion eingesetzt wurde. Im Hinblick auf die Vergleichbarkeit von Sekretomanalysen ist ebenfalls zu berücksichtigen,

dass die Menge von sekretierten Proteinen direkt abhängig von der spezifischen Sekretionsrate der untersuchten Zellen, der Inkubationslänge in serumfreiem Medium sowie von der jeweiligen Proteindegradationsrate ist.

Das Sekretom von C2C12 Skelettmuskelzellen wurde bereits von anderen Forschungsgruppen analysiert. Beispielsweise detektierten Deshmukh *et al.* 1.073 potentiell sekretierte Proteine (Deshmukh *et al.*, 2015) und Henningsen *et al.* 635 (Henningsen *et al.*, 2010). Der Vergleich dieser Proteinlisten mit den eigenen Daten zeigte, dass trotz einer Identifizierung von mehr als 600 potentiell sekretierten Proteinen pro Studie die Schnittmenge bei lediglich 147 Proteinen lag (Abbildung 33). Diese relativ niedrige Anzahl von detektierten sekretierten Proteinen in der gemeinsamen Schnittmenge könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Versuchsansätze von Deshmukh *et al.* und Henningsen *et al.* für die Identifizierung von sekretierten Proteinen Informationen aus Vorhersagen (SignalP) sowie Datenbanken (UniProt KB) als Filterkriterien verwenden und in dieser Arbeit ausschließlich die Daten des quantitativen Sekretom- und zellulären Proteom-Vergleichs. Eine weitere Erklärung für die geringe Proteinschnittmenge könnten auch die unterschiedlichen Filterkriterien der Daten sowie die verschiedenen Inkubationszeiten der Zellen in serumfreiem Medium liefern (5 h vs. 12 h in der Literatur). Dieses Ergebnis zeigt, den großen Einfluss unterschiedlicher Auswertestrategien auf die detektierte Zusammensetzung des Sekretoms.

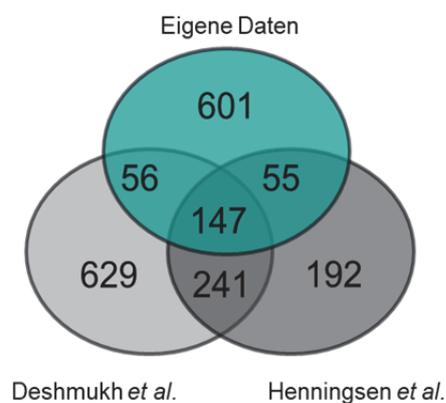


Abbildung 33: Vergleich der eigenen Ergebnisse potentiell sekretierter Proteine mit den Studien von Deshmukh *et al.* und Henningsen *et al.*

5.2 Biologische Diskussion

Die MS-basierte Untersuchung des zellulären Proteoms, des Redox-Proteoms und des sekretorischen Phänotyps haben die Grundlagen gelegt, das gewählte Modellsystem der palmitatbehandelten C2C12 Myotuben umfassend zu charakterisieren. Die Ergebnisse sollen im Folgenden hinsichtlich ihrer biologischen Relevanz diskutiert werden.

5.2.1 Untersuchung des zellulären Proteoms von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass charakteristische Proteine des verwendeten Modellsystems nach Palmitatbehandlung in ihrer Abundanz verändert vorlagen. Dazu zählt u.a. das Protein Prostaglandin G/H Synthase 2 (Ptgs2), häufig ebenfalls als Cox-2 bezeichnet, ein Protein, das nach Palmitatbehandlung stark erhöht abundant gefunden wurde (Chen *et al.*, 2016). In der Literatur wird Ptgs2 bereits als Protein beschrieben, das die Insulinsensitivität von Muskelzellen beeinflusst, indem es die Glukoseaufnahme über GLUT-Vesikel inhibiert (Hsieh *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2017). Ptgs2 gehört zu den 11 Proteinen, die exklusiv nur im Proteom nach Palmitatbehandlung detektiert wurden (Tabelle 17). Zu ihnen gehört u.a. auch das Protein Perilipin-2 (Plin2), das zu der Familie der *cytoplasmic lipid droplet binding proteins* gezählt wird. Es wird angenommen, dass Plin2 eine essentielle Schutzfunktion für die Muskelzellen vor hohen FFA-Konzentrationen einnimmt, indem es die intrazelluläre Einlagerung von Lipiden in Form von Triacylglycerol (TAG) fördert (Bosma *et al.*, 2012). Plin2 ist essentiell für Skelettmuskelzellen, um eine unkontrollierte Hydrolyse von TAG zu verhindern und das Gleichgewicht des Energiemetabolismus zu gewährleisten (Feng *et al.*, 2017). Die in der Arbeit detektierte erhöhte Abundanz von Plin2 nach Palmitatbehandlung könnte der Zelle dazu dienen, TAG in *lipid droplets* einzulagern und so die Konzentration von intramuskulären FFA zu verringern und die Zellen vor einer palmitatinduzierten Lipotoxizität zu schützen (Feng *et al.*, 2017). Dafür spricht zudem, dass Plin2 bereits in anderen Studien als differenziell erhöht nach Palmitatbehandlung detektiert wurde (Chen *et al.*, 2016; Cho und Kang, 2015).

Weiterhin wurde das *Angiopoietin-related protein 4* (Angptl4) detektiert, das direkt mit der Regulation der Glukosehomöostase, der Insulinsensitivität und dem Lipidmetabolismus in Zusammenhang gebracht wird (Xu *et al.*, 2005) und ebenfalls nach Palmitatbehandlung erhöht abundant in der Studie von Grabiec *et al.* gefunden wurde (Grabiec *et al.*, 2016). Das Angptl4 ist zudem als ein Myokin beschrieben, das in Abhängigkeit von einer FFA-induzierten Aktivierung des Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptorer δ (PPAR δ) induziert und sekretiert wird (Demontis *et al.*, 2013).

Tabelle 17: Proteine, die exklusiv nur im zellulären Proteom von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben gefunden wurden.

Proteinname	Genname	GOCC Kategorie
CCAAT/enhancer-binding protein zeta	Cebpz	intrazelluläre membrangebundene Organelle
ATP synthase subunit gamma	Atp5c1	Membran
Trafficking protein particle complex subunit 11	Trappc11	intrazelluläre membrangebundene Organelle
Pleckstrin homology-like domain family B member 2	Phldb2	Membran
Perilipin-2	Plin2	intrazelluläre membrangebundene Organelle
Prostaglandin G/H synthase 2	Ptgs2	Membran
Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 1 protein	Herpud1	Membran
Probable lysosomal cobalamin transporter	Lmbrd1	Membran
Mitochondrial antiviral-signaling protein	Mavs	intrazelluläre membrangebundene Organelle
ATP synthase subunit delta, mitochondrial	Atp5d	Protonentransport 2-Sektor ATPase Komplex
Angiopoietin-related protein 4	Angptl4	Extrazellularraum

Über den in der Arbeit gewählten Versuchsansatz konnten Proteine identifiziert werden, die charakteristisch für die Ausbildung einer palmitatinduzierten Insulinresistenz von Skelettmuskelzellen sind. Auf Ebene der zellulären Proteome konnte gezeigt werden, dass nach Palmitatbehandlung erhöht abundante Proteine vermehrt mit GOCC und GOBP Kategorien der Signaltransduktion und des Fettsäuremetabolismus assoziiert waren. Eine Anreicherung der GOBP Kategorien der Signaltransduktion von Hormonen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren konnte ebenfalls im Rahmen der Genexpressionsanalyse von palmitatbehandelten C2C12 Myoblasten von Grabiec *et al.* gezeigt werden (Grabiec *et al.*, 2016).

Zudem wurden nach Palmitatbehandlung Proteine detektiert, die mit dem PPAR Signalweg assoziiert sind. In der Literatur wird die Bedeutung des PPAR Signalwegs für den Erhalt der zellulären Redoxhomöostase über die Induktion von posttranslationalen Modifikationen postuliert (Kim und Yang, 2013). Weiterhin wurde in der Arbeit das Protein Superoxid Dismutase [Mn] mito (Sod2) nach Palmitatbehandlung erhöht abundant gefunden. Sod2 katalysiert die Umsetzung von O_2^- zu H_2O_2 . H_2O_2 kann als Signalmolekül wirken und spielt insbesondere im Insulinsignalweg eine wichtige Rolle als sekundärer Botenstoff (May und de Haen, 1979; Sies, 2014). Weiterhin wurde das redox-assoziierte Protein Catalase (Cat) nach Palmitatbehandlung ebenfalls erhöht abundant detektiert. Cat katalysiert die Umsetzung von H_2O_2 zu H_2O , was für den Erhalt der Redoxhomöostase in Zellen unerlässlich ist.

Das Protein Peroxidredoxin 2 (Prdx2) wird in der Literatur als Redox-Sensor beschrieben und wurde in der Arbeit signifikant verändert abundant nach Palmitatbehandlung detektiert (Le Moal *et al.*, 2017). Prdx2 ist eine thioispezifische Peroxidase, die ebenfalls die Reduktion von H_2O_2 zu H_2O

katalysiert. Auch das Protein Thioredoxin (Txn) wurde nach Palmitatbehandlung als ein signifikant verändert abundantes Protein detektiert. Txn zählt wie auch Prdx2 zu den Proteinen, die ein konserviertes Cysteinmotiv, das CXXC-Motiv, beinhalten und an dem Erhalt der zellulären Redoxhomöostase beteiligt sind.

Die Ergebnisse liefern somit einen Hinweis auf ein erhöhtes Vorkommen von redox-assoziierten Prozessen nach Palmitatbehandlung im gewählten Modellsystem der C2C12 Myotuben.

5.2.2 Untersuchung des C2C12 Redox-Proteoms

Bisher gibt es noch keine globale Untersuchung der redox-spezifischen Veränderungen des Proteoms von C2C12 Myotuben nach Palmitatbehandlung. Die Untersuchung des C2C12 Redox-Proteoms führte zu der Identifizierung von 378 potentiell redox-sensitiven Proteinen, von denen einige bereits als redox-sensitive Proteine in der Literatur beschrieben sind. Dazu zählen u.a. Peroxiredoxin 1 und 2 (Prdx1, 2) (Song *et al.*, 2016). Prdx2 wurde zuvor in der Proteomstudie nach Palmitatbehandlung verändert abundant gefunden. Prdx katalysiert die Reduktion von H_2O_2 zu H_2O , wobei es selber oxidiert wird. Dabei wird das redox-sensitive Cystein über H_2O_2 zu einer Sulfensäure oxidiert, wodurch die Bildung einer Disulfidbrücke über das zweite Cystein induziert werden kann (Chae *et al.*, 1994). In der Arbeit wurden alle in der Sequenz enthaltenen Cysteine gefunden sowie u.a. eine Carbamidomethylierung an den bekannten redox-sensitiven Cysteinen der Positionen C52 und C173, was eine Oxidation selbiger Cysteinreste nahelegt (Mullen *et al.*, 2015). Das redox-sensitive Protein Thioredoxinreduktase (Txnrd1) wurde nach Palmitatbehandlung verstärkt reversibel oxidiert gefunden. Zudem wurde das redox-sensitive Protein Cofilin-1 (Cfl1) ebenfalls nach Palmitatbehandlung verstärkt oxidiert detektiert. Cfl1 ist ein aktinbindendes Protein, das am Proteintransport beteiligt ist und eine Schlüsselrolle in der Regulation der Aktindynamik einnimmt (Samstag *et al.*, 2013). Es enthält drei bereits beschriebene redox-regulierte Cysteine an den Positionen C39, C80 und C139 (Samstag *et al.*, 2013). In der Arbeit konnten die Cysteine C39 und C139 ebenfalls als carbamidomethyliert gefunden werden, was auf eine reversible oxidative Modifikation hindeutet.

Interessant ist zudem, dass das Protein Pyruvatkinase PKM (Pkm) nach Palmitatbehandlung als signifikant erhöht reversibel oxidiert gefunden wurde. Pkm ist ein redox-sensitives Protein, das zu den sogenannten Stresskinasen gehört. Pkm katalysiert die Umsetzung von Glukose zu Pyruvat und ist in seiner oxidierten Form inaktiv.

Das Protein Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktor (Mif) wurde ebenfalls verstärkt oxidiert nach Palmitatbehandlung detektiert und ist bereits als ein redox-aktives Protein aus der Familie der Thioredoxine (Trx) beschrieben (Kleemann *et al.*, 1998). In der Arbeit konnte das Cystein an der Position C81 als carbamidomethyliert gefunden werden, was auf eine bereits in der Literatur beschriebene reversible oxidative Modifikation hinweist (Schinagl *et al.*, 2018).

Eine Anreicherungsanalyse zeigte, dass Proteine, deren Abundanz nach Palmitatbehandlung in der C2C12 Redox-Proteom-Studie erhöht war, vermehrt mit der GOBP Kategorie „nukleäre Pore“ sowie der GOCC Kategorie „Proteintransport“ assoziiert sind. Über den Komplex der nukleären Pore erfolgt der nukleozytoplasmatische Transport von Proteinen, der essentiell ist für den Erhalt der zellulären Homöostase und für die Signalweiterleitung zwischen Nukleus und Zytoplasma. Zum Komplex der nukleären Pore werden u.a. redox-sensitive Nucleoporine gezählt (Yoshimura *et al.*, 2013). Der Komplex ermöglicht den Transport z.B. von Kinasen und Phosphatasen, worüber die Signaltransduktion, Genexpression, der Zellzyklus und die Apoptose als Antwort auf oxidativen Stress reguliert werden können (Kodiha und Stochaj, 2012). Kinasen und Phosphatasen zählen auch zu den redox-sensitiven Proteinen und generieren ihrerseits ebenfalls PTM an Proteinen, weshalb folglich Redoxprozesse auch den Phosphorylierungsstatus der Zelle verändert werden können (Burgoyne *et al.*, 2007; Poole, 2015).

Im Kontext der Skelettmuskulatur ist der Komplex der nukleären Pore für eine Reihe von Prozessen wie dem Wachstum der Muskeln, der Differenzierung, der Zellviabilität sowie der Genregulation beschrieben (D'Angelo, 2018; Raices *et al.*, 2017).

Zu der zweiten angereicherten Kategorie „Proteintransport“ zählen Mechanismen wie die Sekretion von Proteinen und die Exozytose z.B. von Hormonen (Rothman, 1994). Der Kategorie des Proteintransportes werden u.a. die redox-sensitiven Proteine Cfl1, *Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha* (Naca) und der *ER lumen protein-retaining receptor 2* (Kdelr2) zugeordnet. Kdelr2 enthält sieben Transmembrandomänen und wird mit der Retention von Chaperonen im ER, dem vesikulären Transport zum Golgi Apparat und der Regulation des anterograden Proteintransportes über den Golgi Apparat in Zusammenhang gebracht (Cancino *et al.*, 2014).

Die Untersuchung der zellulären Proteome und des C2C12 Redox-Proteoms hat gezeigt, dass die nach Palmitatbehandlung hoch abundanten bzw. erhöht oxidierten Proteine verstärkt mit Kategorien des Extrazellulärraumes bzw. des Proteintransportes assoziiert waren. Zudem sind einige der identifizierten redox-sensitiven Proteine wie beispielsweise Mif, Prdx1 oder Kdelr2 entweder als sekretierte oder als in Sekretionsprozesse involvierte Proteine beschrieben. Die Untersuchung des sekretorischen Phänotyps der C2C12 Myotuben als aktiv endokrine Zellen bietet das Potential, die Abhängigkeit der Proteinsekretion von Redoxprozessen zu untersuchen.

5.2.3 Untersuchung des sekretorischen Phänotyps von palmitat-behandelten C2C12 Myotuben

Die Untersuchung des sekretorischen Phänotyps nach Palmitatbehandlung zeigte, dass von den 858 *bona fide* sekretierten Proteinen 401 (46,7 %) nach Palmitatbehandlung signifikant verändert vorlagen. Ein ähnliches Ergebnis hinsichtlich der hohen Anzahl der veränderten Proteine erzielten bereits Deshmukh *et al.*, die eine palmitatinduzierte Regulation von 378 der 1.073 (35,2 %) der sekretierten Proteine detektierten (Deshmukh *et al.*, 2015).

Weiterhin konnten Deshmukh *et al.* über ihren Ansatz von den 1,073 sekretierten Proteinen 779 (72,6 %) der klassischen und 294 (27,4 %) der unkonventionellen Proteinsekretion zuordnen (Deshmukh *et al.*, 2015). In dieser Arbeit konnten über den datenbasierten Ansatz von den 858 *bona fide* sekretierten Proteinen 152 (17,7 %) der klassischen Proteinsekretion zugeordnet werden, wobei die restlichen 706 Proteine (82,3 %) vermutlich unkonventionell sekretiert werden. Mögliche Erklärungsansätze für die unterschiedliche Anzahl von quantifizierten Proteinen und die Zuordnung zu den unterschiedlichen Proteinsekretionsmechanismen liefern die unterschiedlichen Inkubationszeiten in serumfreiem Medium, gewählte Analysemethoden und die weiterführende bioinformatische Datenanalyse, die bereits in der methodischen Diskussion genannt wurden.

In der Arbeit wurde gezeigt, dass potentiell klassisch sekretierte Proteine nach Palmitatbehandlung im Sekretom eine verringerte Abundanz aufwiesen, wohingegen eine Vielzahl von potentiell unkonventionell sekretierten Proteinen erhöht abundant vorlag. Eine mögliche Erklärung für die verringerte Abundanz von klassisch sekretierten Proteinen kann die aktuelle von Kraher *et al.* publizierte Studie liefern. Kraher *et al.* zeigten, dass die Behandlung von Leberzellen mit Fettsäuren wie z.B. Palmitat zu einer verstärkten Einlagerung in sogenannte *lipid droplets* (LD) führt (Kraher *et al.*, 2018). LD sind Organellen, die über die Ausbildung von Membranbrücken mit dem ER und der Interaktion mit Mitochondrien eine Vielzahl von metabolischen Prozessen bewirken (Gao und Goodman, 2015; Wilfling *et al.*, 2013). LD können ER-Stress und mitochondriale Dysfunktionen induzieren (Biddinger *et al.*, 2008). Kraher *et al.* postulieren eine LD-induzierte Beeinträchtigung des ER-Golgi Proteintransports, wodurch die Sekretion von Proteinen inhibiert werden kann (Kraher *et al.*, 2018) (Abbildung 34).

Die unkonventionelle Proteinsekretion wird in der Literatur oftmals als ein Stress-assoziiertes Sekretionstyp beschrieben (Dimou und Nickel, 2018). Ein Hinweis auf potentiellen Stress der Zellen kann u.a. die Untersuchung der Zellviabilität liefern. In der Arbeit wurde über die Trypanblau Färbung der Zellen in serumfreiem Medium mit und ohne Palmitatbehandlung kein negativer Einfluss auf die Zellviabilität detektiert, der auf stressinduzierten Zelltod und intrazelluläre Proteinkontaminanten hindeuten würde.

Der Vergleich der Datensätze von Deshmukh *et al.* und dieser Arbeit zeigte, dass ebenfalls das insulinähnliche Wachstumsfaktorbindende Protein 7 (*insulin-like growth factor binding protein*, (Igfbp7)) im Sekretom nach Palmitatbehandlung verringert abundant gefunden wurde. Eine niedrige Konzentrationen des Proteins Igfbp7 im Plasma von Menschen wurde bereits im Zusammenhang mit dem Auftreten eines T2D gebracht (Gu *et al.*, 2013). Hierbei ist bekannt, dass Igfbp7 sekretiert wird und mit hoher Affinität an Insulin binden kann, wodurch der Insulinsignalweg inhibiert wird (Ruan *et al.*, 2016). Der genaue Mechanismus ist bisher jedoch noch nicht bekannt.

In der Literatur wird das Myokinin Il6 als verstärkt sekretiertes Protein nach Palmitatbehandlung beschrieben (Coll *et al.*, 2008). Über den in der Arbeit gewählten Analyseansatz wurde Il6 nicht detektiert. Dahingegen konnten die Proteine Igfbp-2, -5 und -6 als signifikant verringert abundant nach

Palmitatbehandlung bestätigt werden (Deshmukh *et al.*, 2015). Auch sie stehen im Zusammenhang mit der Ausbildung eines T2D (Rajpathak *et al.*, 2009). Anders als Igfbp7 zeigen sie eine hohe Affinität zur Bindung mit dem *insulin-like growth factor 1* (Igf1), einem Polypeptidhormon, das strukturelle Homologien und Signalkaskaden mit Insulin teilt und ebenfalls die Aufnahme von Glukose und freien Fettsäuren stimuliert (LeRoith und Yakar, 2007). Niedrige Level von Igf1 werden ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für die Ausbildung eines T2D in Verbindung gebracht (Dunger *et al.*, 2003).

Das *angiopoietin-related protein* (Angptl4) ist bereits in der Literatur als ein Myokin beschrieben, das verstärkt von humanen Myotuben nach Palmitatbehandlung sekretiert wird (Staiger *et al.*, 2009), was ebenfalls in dem murinen Modellsystem der C2C12 Myotuben gezeigt werden konnte. Im Serum von T2D Patienten werden erhöhte Konzentrationen von Angptl4 detektiert (Cinkajzlova *et al.*, 2018). Angptl4 ist in die Regulation des Lipid- und Glukosemetabolismus involviert (Mattijssen und Kersten, 2012; Sukonina *et al.*, 2006).

5.2.4 Untersuchung der Sekretionsmechanismen

5.2.4.1 Signalpeptid-vermittelte klassische Proteinsekretion

Über die in der Arbeit durchgeführte Sekretomstudie konnten 165 Proteine detektiert werden, die nach der Behandlung mit Brefeldin A im Sekretom verringert abundant waren (potentiell klassisch sekretierte Proteine). Von diesen 165 Proteinen wurde über SignalP für 154 (93 %) Proteine ein Signalpeptid vorhergesagt. Somit kann angenommen werden, dass die Sensitivität der Versuchsansätze, die sekretierte Proteine basierend auf Signalpeptidvorhersagen identifizieren, klassisch sekretierte Proteine mit einer Sensitivität von 93 % detektieren. Jedoch können Proteine, die ein Signalpeptid enthalten, auch durch Umgehung des Golgi Apparates, über den sogenannten Golgi-*Bypass* Sekretionsmechanismus sezerniert werden (Grieve und Rabouille, 2011; Tveit *et al.*, 2009). Des Weiteren wurde bereits in unterschiedlichen Arbeiten gezeigt, dass sich die Anzahl an Proteinen, die potentiell ein Signalpeptid enthalten, zwischen den verschiedenen Vorhersageprogrammen und Datenbanken unterscheiden kann (Choo *et al.*, 2009; Petersen *et al.*, 2011). Deshalb wird oftmals eine Kombination aus mehreren Vorhersageprogrammen gewählt. Demgegenüber kann der in der Arbeit gewählte Ansatz für die Identifizierung von sekretierten Proteinen vorteilhaft sein, da er auf experimentellen Daten basiert.

5.2.4.2 Unkonventionelle Proteinsekretion

Unter dem Begriff der unkonventionellen Proteinsekretion werden verschiedene Proteinsekretionswege über unterschiedliche Mechanismen zusammengefasst. Aus diesem Grund kann es für die unkonventionelle Proteinsekretion keine globalen Sekretionsinhibitoren geben. Es ist allerdings in der Literatur beschrieben, dass der ABC-Transporter (Typ II Sekretion) an diesen Prozessen beteiligt ist. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der Arbeit über die Behandlung der

C2C12 Myotuben mit den Chemikalien Glyburid und Probenecid die unkonventionelle Sekretion über den ABC-Transporter untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten jedoch, dass kein Protein verändert abundant im Sekretom nach der Behandlung gefunden wurde. Somit liefern die Ergebnisse keinen Hinweis auf die Freisetzung von Proteinen über diesen Sekretionsmechanismus (Abbildung 34). Grund hierfür könnte möglicherweise eine zu geringe Konzentration der Inhibitoren sein, die basierend auf der Studie von Flieger *et al.* gewählt wurde (Flieger *et al.*, 2003). Dafür könnte weiterführend eine Dosis-Wirkungsstudie über einen größeren Konzentrationsbereich durchgeführt werden.

5.2.4.3 Proteolytische Abspaltung der Ektodomäne (Ektodomain-*Shedding*)

Neben der Freisetzung von Proteinen über den klassischen oder unkonventionellen Sekretionsmechanismus können Proteine über die proteolytische Abspaltung der Ektodomäne freigesetzt werden (Koppenol-Raab *et al.*, 2017). Beispielsweise ist in der Literatur beschrieben, dass Membranproteine über diesen Mechanismus der posttranslationalen Modifikation als Reaktion auf unterschiedliche Stimuli sekretiert werden (Tien *et al.*, 2017). Das *Shedding* erfolgt über membrangebundene Proteasen, die Sheddasen genannt werden (Lichtenthaler *et al.*, 2018). Um potentiell palmitatinduziertes *Shedding* von Proteinen zu detektieren, wurde das Tool LSPFP verwendet (Grube *et al.*, 2018).

In der Arbeit konnte das Protein Dystroglycan (Dag) als potentiell proteolytisch prozessiertes Protein detektiert werden. Das *Shedding* seiner extrazellulären Domäne wurde bereits in Keratinozyten und Fibroblasten der Haut gezeigt und wird vermutlich von Metalloproteasen vermittelt (Herzog *et al.*, 2004). Plexin-B2 wurde ebenfalls als potentiell proteolytisch prozessiertes Protein gefunden. In der Literatur ist die proteolytische Prozessierung von Plexin-B2 bereits in unterschiedlichen Zelllinien beschrieben und es wird angenommen, dass sie über Subtilisin-ähnlichen Proproteinkonvertasen erfolgt (Artigiani *et al.*, 2003). Das Protein Ldlr wurde ebenfalls als potentiell proteolytisch prozessiertes Protein gefunden. Für Ldlr konnte *Shedding* bereits in Endothelzellen des Gehirns nachgewiesen werden und das *Shedding* wird vermutlich über das Protein Adam10 vermittelt (Shackleton *et al.*, 2016). Adam10 zählt wie auch Adam17 und Bace1 zu den Sheddasen, die in das *Shedding* von Membranproteinen involviert sind (Lichtenthaler *et al.*, 2018). Wang *et al.* zeigten, dass die Behandlung mit H₂O₂ von Neutrophilen die enzymatische Aktivität von Adam17, über zu der Induktion von Redoxmodifikationen am CXXC Motiv beeinflusst (Wang *et al.*, 2009). Auch das Protein Adam10 beinhaltet ein konserviertes CXXC Motiv (Atapattu *et al.*, 2016), worüber es potentiell in seiner Funktion ähnlich wie Adam17 redox-reguliert werden könnte. Bestärkt wird diese Annahme dadurch, dass Adam10 ebenfalls in der Arbeit im zellulären Proteom von C2C12 Myotuben identifiziert wurde. In der Arbeit wurden erhöhte extrazelluläre ROS-Mengen nach Palmitatbehandlung gemessen, wodurch ein ROS-induziertes *Shedding* denkbar wäre.

Die Auswertung mittels LSPFP zeigte, dass im Sekretom von C2C12 Myotuben potentiell proteolytisch prozessierte Proteine zu finden sind. Jedoch lieferten die Ergebnisse keinen Hinweis darauf, dass über die Palmitatbehandlung verstärkt proteolytische Prozessierung induziert wird (Abbildung 34).

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Palmitatbehandlung einen Anstieg von ROS sowie einen veränderten sekretorischen Phänotyp bewirkt, wobei insbesondere die Freisetzung über die unkonventionelle Proteinsekretion induziert wird.

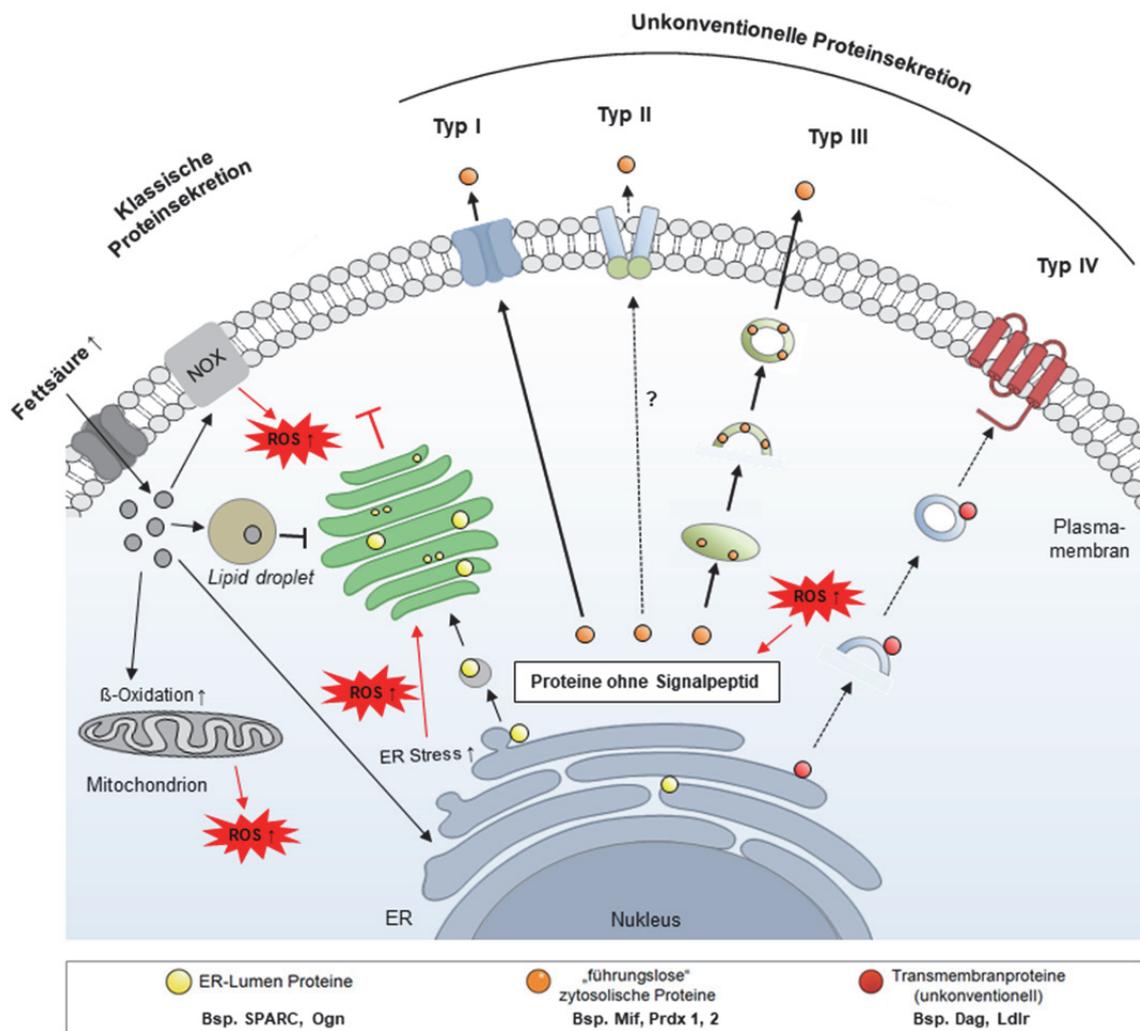


Abbildung 34: Palmitatinduzierte Proteinsekretion von C2C12 Myotuben. Die Palmitatbehandlung führt zu einer erhöhten Bildung von ROS. In Skelettmuskelzellen werden ROS u.a. von NOX, Mitochondrien oder im ER gebildet. In der Arbeit wurde gezeigt, dass die Palmitatbehandlung die Sekretion von klassisch sekretierten Proteinen wie dem Protein SPARC inhibieren und die Sekretion von unkonventionell sekretierten Proteinen wie Prdx 1 und 2 sowie Mif über eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen verstärken kann. In der Arbeit wurden die Proteine Dag und Ldlr als potentiell proteolytisch prozessierte Proteine gefunden, die möglicherweise über den Sekretionsmechanismus des Golgi Bypass freigesetzt werden. ROS = reaktive Sauerstoffspezies, ER = Endoplasmatisches Retikulum, NOX = NADPH Oxidase.

5.2.5 Identifizierung potentiell redox-abhängig sekretierter Proteine

Viele der Cysteinthiole von sekretierten Proteinen werden im ER modifiziert, wobei überwiegend intra- und intermolekulare Disulfidbrücken zwischen Polypeptiden ausgebildet werden (Ellgaard *et al.*, 2018). In der Literatur ist die bedeutende Rolle von Disulfidbrücken für die Stabilität von Plasmamembranproteinen und sekretierten Proteinen beschrieben (Bechtel und Weerapana, 2017; Bulleid, 2012; Feige und Hendershot, 2011). Weiterhin wird in der Literatur ein Zusammenhang zwischen einem veränderten Glukosemetabolismus und der Ausbildung von Disulfiden in sekretierten Proteinen postuliert (Ellgaard *et al.*, 2018). Somit ist eine Abhängigkeit von Redoxprozessen und der Proteinsekretion möglich. In der Literatur gibt es bereits viele Hinweise, die einen Zusammenhang zwischen oxidativen Cysteinmodifikationen, der Sekretion von Proteinen über unterschiedliche Sekretionsmechanismen und einer Proteinfunktionsveränderung nahelegen (Ellgaard *et al.*, 2018; Svoboda *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012a; Wang und Sevier, 2016).

Beispielsweise wurde der Zusammenhang von redox-induzierten Thiolmodifikationen und der Freisetzung von unkonventionell über extrazelluläre Vesikel sezernierte Proteine als Antwort auf die veränderte Redoxhomöostase von Benedikter *et al.* postuliert (Benedikter *et al.*, 2018). Als Mediatoren werden hier redox-sensitive Kalziumkanäle, *N*-Ethylmaleinimid sensitive Faktoren, Proteindisulfidisomerasen, Phospholipidflippasen, Aktinfilamente, Calpaine und Zelloberflächenthiole genannt (Benedikter *et al.*, 2018). Beispielsweise wurden in der Arbeit in der Redox-Proteom-Studie verschiedene Proteindisulfidisomerasen sowie das Protein *Alpha-soluble NSF attachment protein* (Napa) detektiert, das zu den *N*-Ethylmaleinimid sensitiven Faktoren zählt. Weiterhin wurden Aktinfilamente wie Cofilin-1 (Cfl1) und Cofilin-2 (Cfl2) sowie auch die Calpaine Calpain-1 (Capn1) und 2 (Capn2) in der Redox-Proteom-Studie gefunden.

Im Rahmen der Arbeit wurden die Ergebnisse der Studie des C2C12 Redox-Proteoms und des sekretorischen Phänotyps nach Palmitatbehandlung kombiniert, um potentiell redox-abhängig sekretierte Proteine zu identifizieren. Mit dem in der Arbeit gewählten kombinatorischen Ansatz von Redox-Proteom- und Sekretomanalysen konnten 28 redox-sensitive Proteine auch im Sekretom identifiziert werden, was eine Beteiligung von Redoxprozessen bei der Proteinsekretion nahelegt. Die weiterführende Datenanalyse zeigte, dass von den 28 Kandidatenproteinen vier Proteine dem klassischen und 24 dem unkonventionellen Sekretionsmechanismus zugeordnet werden können. 15 der 28 Kandidatenproteine für redox-abhängige Sekretion werden mit der GOCC Kategorie „membrangebundenes Vesikel“ assoziiert (Abbildung 35).

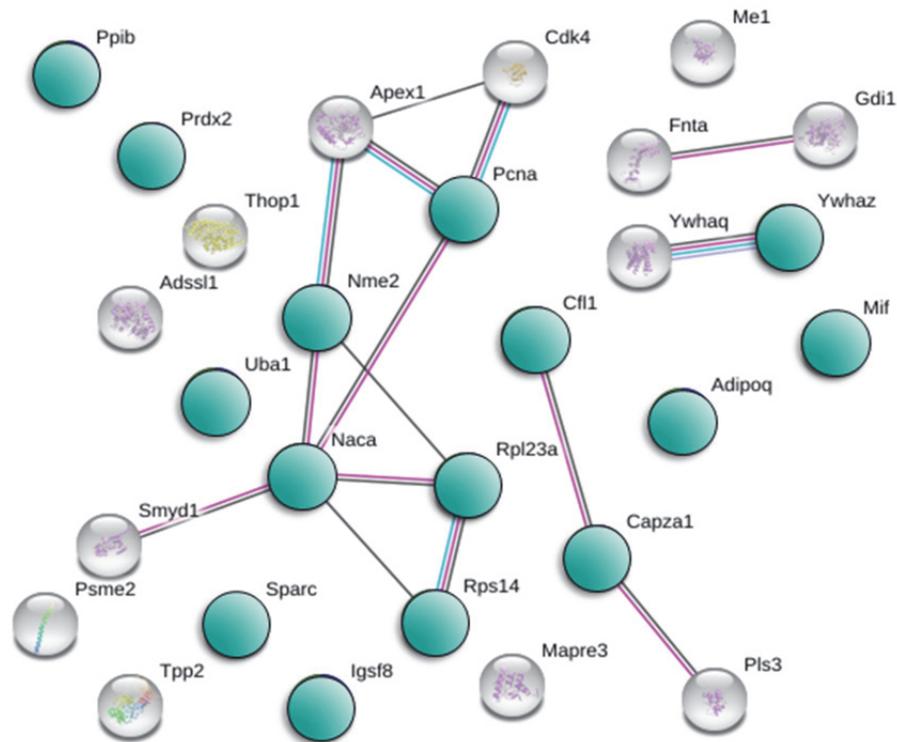


Abbildung 35: Protein-Protein Interaktionsnetzwerk. Die Netzwerkanalyse wurde mit dem Programm String-db.org durchgeführt und visualisiert. In die Analyse gingen die potentiellen Proteinkandidaten für eine redox-abhängige Proteinsekretion ein. In Grün sind Proteine dargestellt die mit der GOCC Kategorie „membrangebundenes Vesikel“ assoziiert werden“.

Zu den bekannten redox-abhängig sekretierten Proteinen zählen Peroxiredoxin 1 und 2 (Prdx1 und Prdx2). Prdx2 wurde ebenfalls in der Arbeit als redox-abhängig sekretiertes Protein gefunden. In der Zelle regulieren Prdx die lokale Konzentration von H_2O_2 , können jedoch auch als Sensoren und die Weiterleitung der H_2O_2 Signalgebung auf andere Proteine bewirken (Rhee, 2016; Wadley *et al.*, 2016). Prdx2 wird z.B. als Antwort auf einen inflammatorischen Stimulus wie $TNF-\alpha$ oder eine Oxidation in Exosomen freigesetzt (Mullen *et al.*, 2015). Die Sekretion von Prdxs aus dem Skelettmuskel als Antwort auf hohe H_2O_2 Konzentrationen wurde bereits von Wadley *et al.* postuliert (Wadley *et al.*, 2016). In der Literatur ist beschrieben, dass sekretierte Peroxiredoxine als Homodimere vorkommen, die über Disulfidbindungen miteinander verbunden sind. Hierbei sind die Cysteine C51 und C172 von Prdx2 und die Cysteine C52 und C173 von Prdx1 für die Ausbildung eines Homodimers und ihre Sekretion essentiell (Mullen *et al.*, 2015).

Des Weiteren wurde das klassisch sekretierte Protein Sparc nach Palmitatbehandlung verringert sekretiert und verringert reversibel oxidiert gefunden. In der Literatur ist beschrieben, dass Sparc während der frühen Skelettmuskelzellendifferenzierung von Myoblasten zu Myotuben erst stark und im späteren Verlauf der Differenzierung vermindert sekretiert wird (Forterre *et al.*, 2014). Sparc ist ein Matrixprotein, das als extrazelluläres Chaperon agiert, das Komponenten der extrazellulären Matrix bindet und den Transport vom Extrazellulärraum in die Zelle und somit die Interaktion von Zellen mit

der Umgebung ermöglicht (Chlenski *et al.*, 2016; Chlenski *et al.*, 2011). Möglicherweise kommt es über die Behandlung der Zellen mit Palmitat zu der von Kraemer *et al.* postulierten Inhibition der klassischen Sekretion über den ER-Golgi Sekretionsmechanismus, da die für die Sekretion notwendige Struktur der intramolekularen Disulfidbindungen im ER nicht ausgebildet werden kann.

Weiterhin wurde in der Arbeit das Protein Mif nach Palmitatbehandlung als verstärkt oxidiert und verringert sekretiert gefunden. In der Literatur ist Mif als ein Protein aus der Familie der Thioredoxine (Trx) beschrieben. Wie die Trx enthält Mif ein redox-aktives CXXC (Cys-Ala-Leu-Cys) Sequenzmotif (Kleemann *et al.*, 1998), was die Ergebnisse der detektierten Redoxaktivität von Mif bekräftigen.

Miyatake *et al.* zeigten bereits im Skelettmuskel, dass Mif nach induzierter Kontraktion von Skelettmuskelzellen und somit vermehrter ROS-Bildung verringert sekretiert wurde (Miyatake *et al.*, 2014). Die Forscher postulieren einen Einfluss von sekretiertem Mif auf die Regulation des Glukosemetabolismus in Skelettmuskelzellen und die Ausbildung einer Insulinresistenz (Cui *et al.*, 2018; Miyatake *et al.*, 2014). Bisher konnte ein Zusammenhang der Cysteinoxidationen und der Regulation der Sekretion von Mif nicht belegt werden. Die in der Arbeit erzielten Ergebnisse legen jedoch nahe, dass eine verstärkte Oxidation mit einer Inhibition der Sekretion von Mif assoziiert werden kann.

5.2.5.1 Validierung des unkonventionell sekretierten redox-sensitiven Proteins Mif

Das Protein Mif zählt zu der kleinen Gruppe der identifizierten Proteine, die sowohl als sekretiert als auch als redox-sensitiv detektiert wurden. Ob ein direkter funktioneller Zusammenhang besteht, wurde in der Arbeit für das Kandidatenprotein Mif weiterführend detailliert untersucht.

Mif ist ein stark konserviertes Protein mit Homologen bei Pflanzen, Nematoden und Vertebraten (Swope *et al.*, 1998). Die Aminosäuresequenzhomologie von humanen und murinen Mif liegt bei 90 % (Schindler *et al.*, 2018). Mif besteht aus 115 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 12,5 kDa. Zudem ist in der Literatur beschrieben, dass Mif ein Homotrimer ausbildet und die Struktur für die Funktionalität von Mif eine wichtige Rolle spielt (Crichlow *et al.*, 2009; Reidy *et al.*, 2013) (Abbildung 36 B).

In der Literatur wird das Protein Mif im Zusammenhang mit einer ganzen Reihe von akuten und chronischen entzündlichen Erkrankungen wie Diabetes, Asthma, Sepsis, Krebs, Atherosklerose und weiteren kardiovaskulären Morbiditäten beschrieben (Kassaa *et al.*, 2017a; Miller *et al.*, 2008; Mizue *et al.*, 2005; Morand *et al.*, 2006; Orita *et al.*, 2002; Schinagl *et al.*, 2016).

5.2.5.2 Nachweis von reversiblen oxidativen Cysteinmodifikationen

Schwerpunkt dieser Arbeit war insbesondere die Untersuchung von reversibel oxidierten Cysteinmodifikationen. In der aktuellen Literatur ist eine ganze Reihe unterschiedlicher posttranslatinaler Modifikation (PTM) von Mif wie etwa Phosphorylierungen oder Cysteinoxidationen beschrieben, und es wurde bereits gezeigt, dass Mif strukturell modifiziert werden

kann, was eine veränderte Aktivität bewirkt (Abbildung 36 A) (Schindler *et al.*, 2018). In der Arbeit konnte eine bereits beschriebene oxidative Modifikation von Mif am Cystein C81 über die C2C12 Redox-Proteom-Studie bestätigt werden (Schinagl *et al.*, 2018). Für das C81 wird in der Literatur eine Nitrosylierung postuliert (Luedike *et al.*, 2012; Watarai *et al.*, 2000). In der C2C12 Redox-Proteom-Studie wurde kein Peptid gefunden, das die Cysteine C57 und C60 enthält. Jedoch ist in der Literatur für das Cystein an der Position C60 eine Cysteinylierung beschrieben (Luedike *et al.*, 2012; Watarai *et al.*, 2000) (Abbildung 36 A). Die Cysteine C57 und C60 gelten als die katalytischen Cysteine, zwischen denen sich eine Disulfidbrücke öffnet und schließt und die für die Oxidoreduktaseaktivität verantwortlich sind (Quan *et al.*, 2007). Deshalb wurde in der Arbeit ein Ansatz entwickelt, der die Analyse aller in der Mif-Sequenz enthaltenen Cysteine ermöglicht und im Folgenden näher erläutert werden soll.

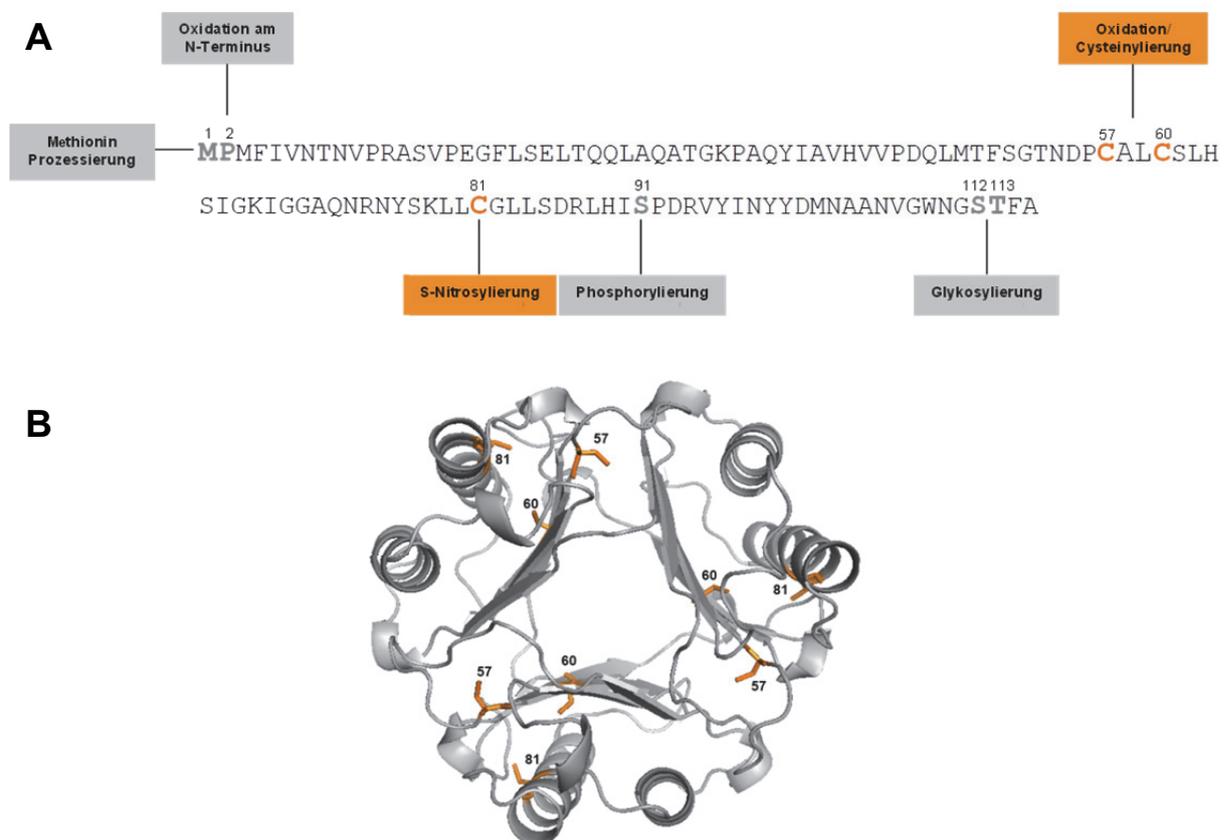


Abbildung 36: Bekannte posttranslationale Modifikationen (PTM) von Mif (modifiziert nach (Schindler *et al.*, 2018)). A) In der Aminosäuresequenz von Mif sind die beschriebenen PTM an den drei Cysteinen orange markiert. B) Homotrimerstruktur von Mif. Die Farbcodierung von B entspricht den in A beschriebenen PTM.

Für die gezielte Untersuchung des Oxidationsstatus von Mif wurde die in der Arbeit generierte *Mif-GFP* überexprimierende Zelllinie verwendet und das Fusionsprotein Mif-GFP mit Hilfe einer Immunpräzipitation (IP) unter Verwendung von einem Antikörper gegen GFP angereichert und reversibel oxidierte Cysteine mit NEM-D5 markiert. Da für die Analyse von PTM die Sequenzabdeckung des zu analysierenden Proteins eine wichtige Rolle spielt (Mann und Jensen,

2003), wurde der Proteinverdau spezifisch für das Zielprotein Mif angepasst und eine Sequenzabdeckung von 96,5 % erzielt. Trotz der erhöhten Menge des Zielproteins und des spezifischen Verdaus wurden die markierten Peptide nur in einzelnen Replikaten detektiert, und es konnte keine statistisch valide Aussage über den Oxidationsstatus von Mif vor und nach Palmitatbehandlung getroffen werden. Vorstellbar wäre hier für die MS-basierte Analyse des Redoxstatus von Mif, die Methode des *selected reaction monitoring* (SRM) zu testen. Der Vorteil dieser Methode besteht in der hohen Spezifität und Sensitivität (Lange *et al.*, 2008).

Auch die von Burgoyne *et al.* beschriebene Methode des Redox-Switch Assays wurde im Rahmen der Arbeit für den Nachweis der reversiblen Oxidation von Mif mit und ohne Palmitatbehandlung untersucht (Burgoyne *et al.*, 2013). Dafür sollten freie Cysteinthiole zunächst mit NEM blockiert und reversibel oxidierte Thiolgruppen differentiell mittels Polyethylenglykol (PEG) markiert und anschließend über Western Blot Analyse visualisiert werden (Burgoyne *et al.*, 2013). Jedoch schien die Zugabe von PEG das Signal von Mif negativ zu beeinflussen, weshalb der Assay nicht auswertbar war. Möglicherweise blockiert die Bindung von PEG die Antikörperbindung mit dem Zielprotein Mif, sodass dieses nicht mehr nachweisbar war.

Zudem könnten hier ebenfalls die spezifischen Mif-Antikörper BaxB01 oder BaxM159 eingesetzt werden, um die oxidierte Form mittels Western Blot Analyse nachzuweisen. Jedoch sind diese Antikörper zwar in der Literatur beschrieben, stehen aber nicht zur Verfügung.

5.2.5.3 Untersuchung der redox-abhängigen Sekretion von Mif

Bezüglich des Sekretionsmechanismus von Mif gibt es widersprüchliche Angaben in der Literatur (Flieger *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2016). Aus diesem Grund sollte im Rahmen der Arbeit die Sekretion von Mif systematisch untersucht werden, um die in der Arbeit erzielten Ergebnisse zu belegen.

Im Zusammenhang mit dem Modellsystem der murinen C2C12 Myotuben ist Mif als ein konstitutiv sekretiertes Myokin beschrieben (Miyatake *et al.*, 2014). Ebenfalls ist bekannt, dass Mif nicht über den klassischen Sekretionsweg sezerniert wird, da es kein Signalpeptid besitzt. Stattdessen wird es über einen bisher noch unbekanntem Mechanismus der unkonventionellen Proteinsekretion freigesetzt (Merk *et al.*, 2009). In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der C2C12 Myotuben mit dem Inhibitor des ER-Golgi Transports Brefeldin A die Sekretion von dem Protein Mif, wie zu erwarten war, nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls von Flieger *et al.* gezeigt, die für ihre Studie eine humane monozytäre THP 1 Zelllinie verwendeten. Flieger *et al.* fanden zudem heraus, dass die Inhibitoren von ABC-Transportern Gyburid und Probenecid die Sekretion von Mif blockieren, weshalb sie postulieren, dass Mif über den Typ II Sekretionsmechanismus der unkonventionellen Proteinsekretion sezerniert wird (Flieger *et al.*, 2003). In der Arbeit konnte dieses Ergebnis für das Kandidatenprotein Mif im Modellsystem der C2C12 Myotuben nicht bestätigt werden.

Um die Hypothese der redox-abhängigen Sekretion für das Protein Mif zu belegen, wurden zunächst im Rahmen der Arbeit Überexpressionskonstrukte des Mif-GFP Wildtyps und der drei Mutanten erstellt, in denen jeweils eines der drei enthaltenen Cysteine zu einem Serin mutiert ist (C57, C60, C81).

5.2.5.4 Die Rolle der Cysteinreste bei der Sekretion von Mif

Das wohl prominenteste Protein für die unkonventionelle Proteinsekretion ist der Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (FGF2) (Steringer und Nickel, 2018). Für die Sekretion von FGF2 wurden die beiden Cysteine C77 und C95, die auf der molekularen Oberfläche von FGF2 liegen, als essentiell identifiziert. Sie bilden intermolekulare Disulfidbrücken, wodurch die für diesen Mechanismus der Proteinsekretion relevante FGF2-Oligomerisierung und Membraninsertion induziert werden (Steringer und Nickel, 2018). Im Vergleich mit FGF2 bildet Mif Homotrimere aus, bei denen möglicherweise ebenfalls Cysteine an der molekularen Oberfläche liegen.

Um die Bedeutung der drei in der Aminosäuresequenz enthaltenen Cysteine für die Sekretion zu untersuchen, wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Hierfür wurde das Protein Mif in Sekretom- und zelluläre Proteomproben des Mif-GFP WT und der drei Cysteinmutanten (C57, C60, C81) mit und ohne Palmitatbehandlung analysiert.

Die Mutation des C57 und des C81 zeigten einen signifikanten Effekt auf die Sekretion von Mif-GFP. Jedoch wurde im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen der MS-basierten Sekretomstudie nach Palmitatbehandlung eine verstärkte Sekretion von Mif-GFP detektiert.

Es ist denkbar, dass die Klonierung der *GFP*-Sequenz an den C-Terminus von Mif die Sekretion des Fusionsproteins beeinflusst. Alternativ könnte deshalb die *GFP*-Sequenz an den N-Terminus kloniert werden und eine Sekretomanalyse durchgeführt werden.

Denkbar wäre zudem, dass die Fusion von GFP an das Protein Mif die Ausbildung der beschriebenen Homotrimerstruktur beeinträchtigt und die Funktion von Mif verändert hat (Reidy *et al.*, 2013). Als Folge konnte eine verstärkte Sekretion des Fusionsproteins nach Palmitatbehandlung detektiert werden. Die Struktur von Mif könnte über die Auftrennung anhand einer nativen Gelelektrophorese und anschließendem immunologischen Nachweis weiterführend untersucht werden. Ziel dabei ist es zu zeigen, ob das wildtypische Mif und das Fusionsprotein Mif-GFP im zellulären Proteom sowie im Sekretom in seiner aktiven Homotrimerform vorliegen.

Das in der Arbeit gewählte Markierungsprotein GFP ist 27 kDa groß. Alternativ könnten kleinere affinitätsbasierte Markierungen verwendet werden. Hier bietet sich eine Markierung mit einem Poly-Histidin (His) an, das unter einer Größe von 1 kDa liegt und ebenfalls einen immunologischen Nachweis und eine Anreicherung ermöglicht. Das fluoreszierende Enzym Haloalkan Dehydrogenase (Halo) ist in der Literatur als Markierung für Proteinlokalisations-, -transport und -sekretionsanalysen beschrieben (Crivat und Taraska, 2012; Mossuto *et al.*, 2014).

5.2.5.5 Identifizierung potentieller Interaktionspartner von Mif

Eine Untersuchung potentieller Proteininteraktionspartner von dem Kandidatenprotein Mif bietet die Möglichkeit Proteine zu identifizieren, die innerhalb der Zelle in einem Funktionszusammenhang mit Mif stehen. Zudem kann dieser Ansatz Hinweise auf den Sekretionsmechanismus von Mif liefern. Protein-Protein-Interaktionen sind für eine Vielzahl von biologischen Prozessen unerlässlich. Dabei bilden sich stabile oder transiente Proteinkomplexe, die über eine Interaktionsanalyse detektiert werden können und helfen, die Funktion eines Proteins aufzuklären.

Für die Interaktionsanalyse wurde das Fusionsprotein Mif-GFP über eine IP aus dem Zelllysats aufgearbeitet und anschließend mittels LC-MS/MS Analyse untersucht. Als Kontrolle diente ein GFP-gekoppelter Leervektor, der von den C2C12 Myotuben exprimiert wurde.

Im Rahmen der Arbeit konnten über die IP-basierte Aufreinigung des Fusionsproteins Mif-GFP 47 potentielle Interaktionspartner von dem Protein Mif detektiert werden.

Von den in der Arbeit identifizierten Proteinen wurde eine signifikant erhöhte Anzahl mit *tight junctions* (GOCC Kategorie) in Verbindung gebracht. In der Arbeit von Vujicic *et al.* wurde Mif bereits in Epithelzellen des Dickdarms in Zusammenhang mit der Regulation von *tight junctions* gebracht (Vujicic *et al.*, 2018). Jedoch ist der Mechanismus der Mif-induzierten Regulation von *tight junctions* noch nicht vollständig aufgeklärt (Chuang *et al.*, 2015). Es ist bekannt, dass Zytokine über verschiedene Mechanismen z.B. die vaskuläre Permeabilität über die Regulation von der Expression und Lokalisation von sogenannten *tight junction proteins* erhöhen können. Für das Protein Mif wird angenommen, dass es die Barrierefunktion z.B. von Endothelzellen über die Translokation und die Degradation von Verbindungsproteinen fördert, ein Prozess, der im Zusammenhang mit Autophagie beschrieben wird (Chen *et al.*, 2015). Zu diesen bekannten Verbindungsproteinen zählt auch das in der Arbeit als potentieller Mif-Interaktionspartner detektierte Protein ZO-1 (Tjp1). Denkbar wäre, dass Mif über die Regulation der *tight junctions* mit Membranproteinen interagiert und freigesetzt wird. Weiterhin wurde das RNA-bindende Protein Fus als potentieller Interaktionspartner von Mif gefunden. Bezüglich Fus konnte bereits gezeigt werden, dass es mit Komponenten von Exosomen interagiert und somit potentiell in den Sekretionsprozess von Mif involviert sein könnte (Kamelgarn *et al.*, 2016).

Die Proteininteraktionspartner von Mif-Cysteinmutanten wurden in der Arbeit mit denen vom wildtypischen Mif verglichen und 25 potentiellen Proteininteraktionspartnern in allen untersuchten C2C12 Zelllinien detektiert. Von den 25 Proteinen ist bisher keines als potentieller Interaktionspartner von Mif beschrieben. Zu den bekannten Interaktionspartnern zählen u.a. CD74, p115 sowie die CRC-Chemokinrezeptoren CXCR2, CXCR4 und CXCR7 (Alampour-Rajabi *et al.*, 2015; Bernhagen *et al.*, 2007; Leng *et al.*, 2003; Merk *et al.*, 2008).

Interessanterweise zählt zu den in der Arbeit identifizierten Interaktionspartnern von Mif u.a. auch das Protein *AP-3 complex subunit beta-1* (Ap3b1), ein Protein, dass sowohl im *trans*-Golgi-Netzwerk als

auch in Endosomen eine Rolle für die Sortierung und den Transport von Proteinen spielt (Odorizzi *et al.*, 1998).

Es wird vermutet, dass reversible oxidative Cysteinmodifikationen die Protein-Protein Interaktion von Mif verändern könnte (Schinagl *et al.*, 2018). In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mutationen an den Cysteinen C57 sowie C60 möglicherweise einen Einfluss auf die Zusammensetzung des Interaktoms haben. Im Vergleich mit dem Wildtyp zeigte die Mutante Mif-GFP C57 19 und C60 29 exklusive Proteininteraktionspartner. Weiterhin konnte eine Schnittmenge von zusätzlichen 15 Proteinen detektiert werden, die nur in C57 und C60 im Vergleich mit dem Wildtyp in der Interaktionsstudie differenziell abundant waren. Beispielsweise wurde über den Vergleich von C57 mit dem Wildtyp das Protein Disulfidisomerase A4 (Pdia4) erhöht abundant in der Mutante detektiert. Pdia4 katalysiert die Ausbildung von Disulfidbindungen in Proteinen und wird mit der GOBP Kategorie Proteinsekretion assoziiert.

Die beiden Cysteine C57 und C60 gehören zu dem hoch konservierten CXXC Motiv von Mif, das eine β -Faltblattstruktur ausbildet und die biologische Funktion von Mif als Oxidoreduktase darstellt (Kassaar *et al.*, 2017b; Thiele *et al.*, 2015). Die Bedeutung der CXXC Sequenz für die Oxidoreduktaseaktivität von Mif ist bereits am Beispiel der Reduktion von Disulfidbindungen in Insulin beschrieben worden (Kleemann *et al.*, 1999). Die in der Arbeit erzielten Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass insbesondere die Cysteine C57 und C60 die Interaktion von Mif mit anderen Proteinen beeinflussen. Dieses Ergebnis kann über die Oxidoreduktasefunktion dieser Sequenz begründet werden, über die Mif möglicherweise mit anderen Proteinen über die Ausbildung von Disulfidbindungen interagiert.

6. Fazit

In dieser Arbeit konnte mithilfe der Proteomanalyse gezeigt werden, dass die Behandlung der murinen C2C12 Myotuben mit der Fettsäure Palmitat die Abundanz von charakteristischen Proteinen, die im Zusammenhang mit der Ausbildung einer Insulinresistenz stehen, beeinflusst. Eine palmitatinduzierte verstärkte Bildung von ROS konnte ebenfalls bestätigt werden. Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals eine globale Analyse des Redox-Proteoms von Skelettmuskelzellen durchgeführt und 378 potentiell redox-sensitive Proteine identifiziert. Die Analyse des Redox-Proteoms liefert zudem Hinweise darauf, dass ein Zusammenhang zwischen redox-sensitiven Proteinen und einem veränderten sekretorischen Phänotyp der Zellen besteht. Über die Kombination der Daten des sekretorischen Phänotyps und des Redox-Proteoms konnten 28 potentiell redox-abhängig sekretierte Kandidatenproteine identifiziert werden, wozu u.a. die Proteine Mif, Prdx1, Prdx2 und Sparc zählen. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die palmitatinduzierte verstärkte ROS-Bildung reversible Cysteinmodifikationen an redox-sensitiven Proteinen induziert, die wiederum den sekretorischen Phänotyp der Skelettmuskelzellen beeinflussen, ein möglicher Mechanismus der parakrinen Signalgebung von Skelettmuskelzellen. Die in der Arbeit erzielten Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung des Skelettmuskels für die Vermittlung der fettsäureinduzierten Signalkaskade, einem relevanten Mechanismus bei der Pathogenese eines T2D.

Ziel zukünftiger Analysen sollte die Validierung der identifizierten Kandidatenproteine und die Aufklärung möglicher parakrinen Effekte im Kontext der Ausbildung eines T2D sein. Diese Arbeit hat einen Beitrag zum Verständnis der weitreichenden Auswirkungen von Redoxprozessen in Skelettmuskelzellen geleistet und einen Mechanismus der redox-induzierten Proteinsekretion aufgezeigt, der möglicherweise Ansatzpunkt bei der Behandlung eines T2D von therapeutischem Nutzen sein könnte.

7. Literaturverzeichnis

- Aebersold, R. und Mann, M. (2003). **Mass spectrometry-based proteomics**. *Nature* 422, 198-207, doi: 10.1038/nature01511.
- Akter, S., Huang, J., Waszczak, C., Jacques, S., Gevaert, K., Van Breusegem, F. und Messens, J. (2015). **Cysteines under ROS attack in plants: a proteomics view**. *J Exp Bot* 66, 2935-2944, doi: 10.1093/jxb/erv044.
- Alampour-Rajabi, S., El Bounkari, O., Rot, A., Muller-Newen, G., Bachelerie, F., Gawaz, M., Weber, C., Schober, A. und Bernhagen, J. (2015). **MIF interacts with CXCR7 to promote receptor internalization, ERK1/2 and ZAP-70 signaling, and lymphocyte chemotaxis**. *FASEB J* 29, 4497-4511, doi: 10.1096/fj.15-273904.
- Aljhni, R., Ibrahim, F., Guillaume, Y. C. und Andrea, C. (2012). **Reactive oxygen species and nitric oxide effect on the steroid hormone binding with serum albumin**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 62, 129-134, doi: 10.1016/j.jpba.2011.12.037.
- Alscher, R. G., Erturk, N. und Heath, L. S. (2002). **Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants**. *J Exp Bot* 53, 1331-1341.
- Andersen, J. K. (2004). **Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?** *Nat Med* 10 Suppl, S18-25, doi: 10.1038/nrn1434.
- Anderson, N. G. und Anderson, N. L. (1996). **Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future**. *Electrophoresis* 17, 443-453, doi: 10.1002/elps.1150170303.
- Artigiani, S., Barberis, D., Fazzari, P., Longati, P., Angelini, P., van de Loo, J. W., Comoglio, P. M. und Tamagnone, L. (2003). **Functional regulation of semaphorin receptors by proprotein convertases**. *J Biol Chem* 278, 10094-10101, doi: 10.1074/jbc.M210156200.
- Asensi-Fabado, M. A. und Munné-Bosch, S. **Vitamins in plants: occurrence, biosynthesis and antioxidant function**. *Trends in Plant Science* 15, 582-592, doi: 10.1016/j.tplants.2010.07.003.
- Asmat, U., Abad, K. und Ismail, K. (2016). **Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review**. *Saudi Pharmaceutical Journal* 24, 547-553, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>.
- Atapattu, L., Saha, N., Chheang, C., Eissman, M. F., Xu, K., Vail, M. E., Hii, L., Llerena, C., Liu, Z. Q., Horvay, K., Abud, H. E., Kusebauch, U., Moritz, R. L., Ding, B. S., Cao, Z. W., Rafii, S., Ernst, M., Scott, A. M., Nikolov, D. B., Lackmann, M. und Janes, P. W. (2016). **An activated form of ADAM10 is tumor selective and regulates cancer stem-like cells and tumor growth**. *Journal of Experimental Medicine* 213, 1741-1757, doi: 10.1084/jem.20151095.
- Bajpai, V. K., Rather, I. A. und Shukla, S. (2016). **Oxidative Stress: Role of Natural Antioxidant Compounds**. In: *Microbes in Food and Health*, Hrsg. Garg, N., Abdel-Aziz, S. M. und Aeron, A., Springer International Publishing, Cham, S. 65-76.
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. und Kuster, B. (2007). **Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review**. *Anal Bioanal Chem* 389, 1017-1031, doi: 10.1007/s00216-007-1486-6.
- Baraibar, M. A. und Friguet, B. (2013). **Oxidative proteome modifications target specific cellular pathways during oxidative stress, cellular senescence and aging**. *Exp Gerontol* 48, 620-625, doi: 10.1016/j.exger.2012.10.007.
- Bayol, S. A., Bruce, C. R. und Wadley, G. D. (2014). **Growing healthy muscles to optimise metabolic health into adult life**. *J Dev Orig Health Dis* 5, 420-434, doi: 10.1017/S2040174414000452.
- Bechtel, T. J. und Weerapana, E. (2017). **From structure to redox: The diverse functional roles of disulfides and implications in disease**. *Proteomics* 17, doi: 10.1002/pmic.201600391.
- Beck, M., Schmidt, A., Malmstroem, J., Claassen, M., Ori, A., Szymborska, A., Herzog, F., Rinner, O., Ellenberg, J. und Aebersold, R. (2011). **The quantitative proteome of a human cell line**. *Mol Syst Biol* 7, 549, doi: 10.1038/msb.2011.82.
- Benedikter, B. J., Weseler, A. R., Wouters, E. F. M., Savelkoul, P. H. M., Rohde, G. G. U. und Stassen, F. R. M. (2018). **Redox-dependent thiol modifications: implications for the**

- release of extracellular vesicles.** *Cell Mol Life Sci* 75, 2321-2337, doi: 10.1007/s00018-018-2806-z.
- Benhar, M., Forrester, M. T. und Stamler, J. S. (2009). **Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 721-732, doi: 10.1038/nrm2764.
- Benjamini, Y., and Y. Hochberg (1995). **Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.** *Journal of the Royal Statistical Society B* 57 289-300.
- Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J. L., Zernecke, A., Koenen, R. R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., Kooistra, T., Fingerle-Rowson, G., Ghezzi, P., Kleemann, R., McColl, S. R., Bucala, R., Hickey, M. J. und Weber, C. (2007). **MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment.** *Nature Medicine* 13, 587-596, doi: 10.1038/nm1567.
- Biddinger, S. B., Hernandez-Ono, A., Rask-Madsen, C., Haas, J. T., Aleman, J. O., Suzuki, R., Scapa, E. F., Agarwal, C., Carey, M. C., Stephanopoulos, G., Cohen, D. E., King, G. L., Ginsberg, H. N. und Kahn, C. R. (2008). **Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis.** *Cell Metabolism* 7, 125-134, doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.013.
- Bienert, G. P., Schjoerring, J. K. und Jahn, T. P. (2006). **Membrane transport of hydrogen peroxide.** *Biochim Biophys Acta* 1758, 994-1003, doi: 10.1016/j.bbamem.2006.02.015.
- Bolus, D. J., Shanmugam, G., Narasimhan, M. und Rajasekaran, N. S. (2018). **Recurrent heat shock impairs the proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts.** *Cell Stress Chaperones* 23, 399-410, doi: 10.1007/s12192-017-0851-4.
- Borradaile, N. M., Han, X. L., Harp, J. D., Gale, S. E., Ory, D. S. und Schaffer, J. E. (2006). **Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death.** *Journal of Lipid Research* 47, 2726-2737, doi: 10.1194/jlr.M600299-JLR200.
- Bortoluzzi, S., Scannapieco, P., Cestaro, A., Danieli, G. A. und Schiaffino, S. (2006). **Computational reconstruction of the human skeletal muscle secretome.** *Proteins* 62, 776-792, doi: 10.1002/prot.20803.
- Bosma, M., Hesselink, M. K., Sparks, L. M., Timmers, S., Ferraz, M. J., Mattijssen, F., van Beurden, D., Schaart, G., de Baets, M. H., Verheyen, F. K., Kersten, S. und Schrauwen, P. (2012). **Perilipin 2 improves insulin sensitivity in skeletal muscle despite elevated intramuscular lipid levels.** *Diabetes* 61, 2679-2690, doi: 10.2337/db11-1402.
- Brown, G. C. und Borutaite, V. (2012). **There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells.** *Mitochondrion* 12, 1-4, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.02.001>.
- Bruce, C., Stone, K., Gulcicek, E. und Williams, K. (2013). **Proteomics and the analysis of proteomic data: 2013 overview of current protein-profiling technologies.** *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 13*, Unit 13 21, doi: 10.1002/0471250953.bi1321s41.
- Buchanan, B. B., Kalberer, P. P. und Arnon, D. I. (1967). **Ferredoxin-activated fructose diphosphatase in isolated chloroplasts.** *Biochem Biophys Res Commun* 29, 74-79.
- Bulleid, N. J. (2012). **Disulfide bond formation in the mammalian endoplasmic reticulum.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, doi: 10.1101/cshperspect.a013219.
- Burgoyne, J. R., Madhani, M., Cuello, F., Charles, R. L., Brennan, J. P., Schroder, E., Browning, D. D. und Eaton, P. (2007). **Cysteine redox sensor in PKGI α enables oxidant-induced activation.** *Science* 317, 1393-1397, doi: 10.1126/science.1144318.
- Burgoyne, J. R., Oviosu, O. und Eaton, P. (2013). **The PEG-switch assay: A fast semi-quantitative method to determine protein reversible cysteine oxidation.** *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 68, 297-301, doi: 10.1016/j.vascn.2013.07.001.
- Butterfield, D. A., Gu, L., Di Domenico, F. und Robinson, R. A. (2014). **Mass spectrometry and redox proteomics: applications in disease.** *Mass Spectrom Rev* 33, 277-301, doi: 10.1002/mas.21374.
- Butterfield, D. A. und Perluigi, M. (2017). **Redox Proteomics: A Key Tool for New Insights into Protein Modification with Relevance to Disease.** *Antioxid Redox Signal* 26, 277-279, doi: 10.1089/ars.2016.6919.

- Cabral, M., Anjard, C., Malhotra, V., Loomis, W. F. und Kuspa, A. (2010). **Unconventional secretion of AcbA in Dictyostelium discoideum through a vesicular intermediate.** *Eukaryot Cell* 9, 1009-1017, doi: 10.1128/EC.00337-09.
- Caccia, D., Dugo, M., Callari, M. und Bongarzone, I. (2013a). **Bioinformatics tools for secretome analysis.** *Biochim Biophys Acta* 1834, 2442-2453, doi: 10.1016/j.bbapap.2013.01.039.
- Caccia, D., Dugo, M., Callari, M. und Bongarzone, I. (2013b). **Bioinformatics tools for secretome analysis.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1834, 2442-2453, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.01.039>.
- Cancino, J., Capalbo, A., Di Campli, A., Giannotta, M., Rizzo, R., Jung, J. E., Di Martino, R., Persico, M., Heinklein, P., Saltese, M. und Luini, A. (2014). **Control Systems of Membrane Transport at the Interface between the Endoplasmic Reticulum and the Golgi.** *Developmental Cell* 30, 280-294, doi: 10.1016/j.devcel.2014.06.018.
- Catherman, A. D., Skinner, O. S. und Kelleher, N. L. (2014). **Top Down proteomics: facts and perspectives.** *Biochem Biophys Res Commun* 445, 683-693, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.041.
- Chae, H. Z., Uhm, T. B. und Rhee, S. G. (1994). **Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7022-7026.
- Chapman, L. P., Epton, M. J., Buckingham, J. C., Morris, J. F. und Christian, H. C. (2003). **Evidence for a role of the adenosine 5'-triphosphate-binding cassette transporter A1 in the externalization of annexin I from pituitary folliculo-stellate cells.** *Endocrinology* 144, 1062-1073, doi: 10.1210/en.2002-220650.
- Chavez, J. A., Holland, W. L., Bar, J., Sandhoff, K. und Summers, S. A. (2005). **Acid ceramidase overexpression prevents the inhibitory effects of saturated fatty acids on insulin signaling.** *J Biol Chem* 280, 20148-20153, doi: 10.1074/jbc.M412769200.
- Chavez, J. A. und Summers, S. A. (2003). **Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes.** *Arch Biochem Biophys* 419, 101-109.
- Chen, H. R., Chuang, Y. C., Chao, C. H. und Yeh, T. M. (2015). **Macrophage migration inhibitory factor induces vascular leakage via autophagy.** *Biol Open* 4, 244-252, doi: 10.1242/bio.201410322.
- Chen, X., Xu, S., Wei, S., Deng, Y., Li, Y., Yang, F. und Liu, P. (2016). **Comparative Proteomic Study of Fatty Acid-treated Myoblasts Reveals Role of Cox-2 in Palmitate-induced Insulin Resistance.** *Sci Rep* 6, 21454, doi: 10.1038/srep21454.
- Cheung, R. C., Wong, J. H. und Ng, T. B. (2012). **Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications.** *Appl Microbiol Biotechnol* 96, 1411-1420, doi: 10.1007/s00253-012-4507-0.
- Chlenski, A., Dobratic, M., Salwen, H. R., Applebaum, M., Guerrero, L. J., Miller, R., DeWane, G., Solomaha, E., Marks, J. D. und Cohn, S. L. (2016). **Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) induces lipotoxicity in neuroblastoma by regulating transport of albumin complexed with fatty acids.** *Oncotarget* 7, 77696-77706, doi: 10.18632/oncotarget.12773.
- Chlenski, A., Guerrero, L. J., Salwen, H. R., Yang, Q. W., Tian, Y. F., La Madrid, A. M., Mirzoeva, S., Bouyer, P. G., Xu, D., Walker, M. und Cohn, S. L. (2011). **Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine Is a Matrix Scavenger Chaperone.** *Plos One* 6, doi: ARTN e23880
10.1371/journal.pone.0023880.
- Cho, K. A. und Kang, P. B. (2015). **PLIN2 inhibits insulin-induced glucose uptake in myoblasts through the activation of the NLRP3 inflammasome.** *Int J Mol Med* 36, 839-844, doi: 10.3892/ijmm.2015.2276.
- Choi, D. S., Kim, D. K., Kim, Y. K. und Gho, Y. S. (2013). **Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes.** *Proteomics* 13, 1554-1571, doi: 10.1002/pmic.201200329.
- Choi, J. S., Paek, A. R., Kim, S. Y. und You, H. J. (2010). **GIPC mediates the generation of reactive oxygen species and the regulation of cancer cell proliferation by insulin-like growth factor-1/IGF-1R signaling.** *Cancer Letters* 294, 254-263, doi: 10.1016/j.canlet.2010.02.007.
- Choo, K. H., Tan, T. W. und Ranganathan, S. (2009). **A comprehensive assessment of N-terminal signal peptides prediction methods.** *BMC Bioinformatics* 10 Suppl 15, S2, doi: 10.1186/1471-2105-10-S15-S2.

- Chuang, Y. C., Chen, H. R. und Yeh, T. M. (2015). **Pathogenic Roles of Macrophage Migration Inhibitory Factor during Dengue Virus Infection**. *Mediators of Inflammation*, doi: Artn 547094
10.1155/2015/547094.
- Chung, H. S., Wang, S. B., Venkatraman, V., Murray, C. I. und Van Eyk, J. E. (2013). **Cysteine oxidative posttranslational modifications: emerging regulation in the cardiovascular system**. *Circ Res* 112, 382-392, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.268680.
- Cinkajzlova, A., Mraz, M., Lacinova, Z., Klouckova, J., Kavalkova, P., Kratochvilova, H., Trachta, P., Krizova, J., Haluzikova, D., Skrha, J., Papezova, H. und Haluzik, M. (2018). **Angiotensin-like protein 3 and 4 in obesity, type 2 diabetes mellitus, and malnutrition: the effect of weight reduction and realimentation**. *Nutr Diabetes* 8, 21, doi: 10.1038/s41387-018-0032-2.
- Circu, M. L. und Aw, T. Y. (2010). **Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis**. *Free Radic Biol Med* 48, 749-762, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022.
- Coll, T., Eyre, E., Rodriguez-Calvo, R., Palomer, X., Sanchez, R. M., Merlos, M., Laguna, J. C. und Vazquez-Carrera, M. (2008). **Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells**. *J Biol Chem* 283, 11107-11116, doi: 10.1074/jbc.M708700200.
- Coll, T., Palomer, X., Blanco-Vaca, F., Escola-Gil, J. C., Sanchez, R. M., Laguna, J. C. und Vazquez-Carrera, M. (2010). **Cyclooxygenase 2 inhibition exacerbates palmitate-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells**. *Endocrinology* 151, 537-548, doi: 10.1210/en.2009-0874.
- Covarrubias, L., Hernandez-Garcia, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E. und Castro-Obregon, S. (2008). **Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active?** *Dev Biol* 320, 1-11, doi: 10.1016/j.ydbio.2008.04.041.
- Cox, J., Hein, M. Y., Lubner, C. A., Paron, I., Nagaraj, N. und Mann, M. (2014). **Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ**. *Mol Cell Proteomics* 13, 2513-2526, doi: 10.1074/mcp.M113.031591.
- Cox, J. und 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.
- Cox, J., Michalski, A. und Mann, M. (2011). **Software lock mass by two-dimensional minimization of peptide mass errors**. *J Am Soc Mass Spectrom* 22, 1373-1380, doi: 10.1007/s13361-011-0142-8.
- Crichlow, G. V., Lubetsky, J. B., Leng, L., Bucala, R. und Lolis, E. J. (2009). **Structural and kinetic analyses of macrophage migration inhibitory factor active site interactions**. *Biochemistry* 48, 132-139, doi: 10.1021/bi8014423.
- Crivat, G. und Taraska, J. W. (2012). **Imaging proteins inside cells with fluorescent tags**. *Trends Biotechnol* 30, 8-16, doi: 10.1016/j.tibtech.2011.08.002.
- Cui, D., Peng, Y., Zhang, C., Li, Z., Su, Y., Qi, Y., Xing, M., Li, J., Kim, G. E., Su, K. N., Xu, J., Wang, M., Ding, W., Piecychna, M., Leng, L., Hirasawa, M., Jiang, K., Young, L., Xu, Y., Qi, D. und Bucala, R. (2018). **Macrophage migration inhibitory factor mediates metabolic dysfunction induced by atypical antipsychotic therapy**. *J Clin Invest* 128, 4997-5007, doi: 10.1172/JCI93090.
- D'Angelo, M. A. (2018). **Nuclear pore complexes as hubs for gene regulation**. *Nucleus* 9, 142-148, doi: 10.1080/19491034.2017.1395542.
- D'Autreaux, B. und Toledano, M. B. (2007). **ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 813-824, doi: 10.1038/nrm2256.
- Danielson, S. R. und Andersen, J. K. (2008). **Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease**. *Free Radical Biology and Medicine* 44, 1787-1794, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.005.
- Davies, M. J. (2005). **The oxidative environment and protein damage**. *Biochim Biophys Acta* 1703, 93-109, doi: 10.1016/j.bbapap.2004.08.007.
- Dawane, J. S. und Pandit, V. A. (2012). **Understanding redox homeostasis and its role in cancer**. *J Clin Diagn Res* 6, 1796-1802, doi: 10.7860/JCDR/2012/4947.2654.

- Debaisieux, S., Rayne, F., Yezid, H. und Beaumelle, B. (2012). **The ins and outs of HIV-1 Tat.** *Traffic* 13, 355-363, doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01286.x.
- Demontis, F., Piccirillo, R., Goldberg, A. L. und Perrimon, N. (2013). **The influence of skeletal muscle on systemic aging and lifespan.** *Aging Cell* 12, 943-949, doi: 10.1111/accel.12126.
- Derosa, G., D'Angelo, A., Scalise, F., Avanzini, M. A., Tinelli, C., Peros, E., Fogari, E. und Cicero, A. F. G. (2007). **Comparison between metalloproteinases-2 and-9 in healthy subjects, diabetics, and subjects with acute coronary syndrome.** *Heart and Vessels* 22, 361-370, doi: 10.1007/s00380-007-0989-6.
- Deshmukh, A. S., Cox, J., Jensen, L. J., Meissner, F. und Mann, M. (2015). **Secretome Analysis of Lipid-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle Cells by a Combined Experimental and Bioinformatics Workflow.** *J Proteome Res* 14, 4885-4895, doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00720.
- Dey, D., Basu, D., Roy, S. S., Bandyopadhyay, A. und Bhattacharya, S. (2006). **Involvement of novel PKC isoforms in FFA induced defects in insulin signaling.** *Mol Cell Endocrinol* 246, 60-64, doi: 10.1016/j.mce.2005.12.014.
- Dieterich, D. C., Link, A. J., Graumann, J., Tirrell, D. A. und Schuman, E. M. (2006). **Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT).** *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9482-9487, doi: 10.1073/pnas.0601637103.
- Dikalov, S. (2011). **Crosstalk between mitochondria and NADPH oxidases**, Bd. 51.
- Dimauro, I., Pearson, T., Caporossi, D. und Jackson, M. J. (2012). **In vitro susceptibility of thioredoxins and glutathione to redox modification and aging-related changes in skeletal muscle.** *Free Radic Biol Med* 53, 2017-2027, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.031.
- Dimou, E. und Nickel, W. (2018). **Unconventional mechanisms of eukaryotic protein secretion.** *Curr Biol* 28, R406-R410, doi: 10.1016/j.cub.2017.11.074.
- dos Santos, J. M., Benite-Ribeiro, S. A., Queiroz, G. und Duarte, J. A. (2012). **The effect of age on glucose uptake and GLUT1 and GLUT4 expression in rat skeletal muscle.** *Cell Biochem Funct* 30, 191-197, doi: 10.1002/cbf.1834.
- Dröge, W. (2002). **Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function.** *Physiological Reviews* 82, 47-95, doi: 10.1152/physrev.00018.2001.
- Dunger, D. B., Ong, K. K. und Sandhu, M. S. (2003). **Serum insulin-like growth factor-I levels and potential risk of type 2 diabetes.** *Horm Res* 60 Suppl 3, 131-135, doi: 10.1159/000074514.
- Edelheit, O., Hanukoglu, A. und Hanukoglu, I. (2009). **Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies.** *BMC Biotechnol* 9, 61, doi: 10.1186/1472-6750-9-61.
- Eichelbaum, K. und Krijgsveld, J. (2014). **Combining pulsed SILAC labeling and click-chemistry for quantitative secretome analysis.** *Methods Mol Biol* 1174, 101-114, doi: 10.1007/978-1-4939-0944-5_7.
- Eichelbaum, K., Winter, M., Berriel Diaz, M., Herzig, S. und Krijgsveld, J. (2012). **Selective enrichment of newly synthesized proteins for quantitative secretome analysis.** *Nat Biotechnol* 30, 984-990, doi: 10.1038/nbt.2356.
- Eizirik, D. L., Cardozo, A. K. und Cnop, M. (2008). **The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus.** *Endocr Rev* 29, 42-61, doi: 10.1210/er.2007-0015.
- Ellgaard, L., Sevier, C. S. und Bulleid, N. J. (2018). **How Are Proteins Reduced in the Endoplasmic Reticulum?** *Trends in Biochemical Sciences* 43, 32-43, doi: 10.1016/j.tibs.2017.10.006.
- Feige, M. J. und Hendershot, L. M. (2011). **Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis.** *Curr Opin Cell Biol* 23, 167-175, doi: 10.1016/j.ceb.2010.10.012.
- Feng, X. T., Wang, T. Z., Leng, J., Chen, Y., Liu, J. B., Liu, Y. und Wang, W. J. (2012). **Palmitate Contributes to Insulin Resistance through Downregulation of the Src-Mediated Phosphorylation of Akt in C2C12 Myotubes.** *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 76, 1356-1361, doi: 10.1271/bbb.120107.
- Feng, Y. Z., Lund, J., Li, Y., Knabenes, I. K., Bakke, S. S., Kase, E. T., Lee, Y. K., Kimmel, A. R., Thoresen, G. H., Rustan, A. C. und Dalen, K. T. (2017). **Loss of perilipin 2 in cultured myotubes enhances lipolysis and redirects the metabolic energy balance from glucose oxidation towards fatty acid oxidation.** *J Lipid Res* 58, 2147-2161, doi: 10.1194/jlr.M079764.

- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. und Whitehouse, C. M. (1989). **Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules**. *Science* 246, 64-71.
- Fernandes, A. P. und Holmgren, A. (2004). **Glutaredoxins: Glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system**. *Antioxidants & Redox Signaling* 6, 63-74, doi: Doi 10.1089/152308604771978354.
- Ferreira, L. F. und Laitano, O. (2016). **Regulation of NADPH oxidases in skeletal muscle**. *Free Radic Biol Med* 98, 18-28, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.011.
- Ferro-Novick, S. und Brose, N. (2013). **Nobel 2013 Physiology or medicine: Traffic control system within cells**. *Nature* 504, 98, doi: 10.1038/504098a.
- Finkel, T. und Holbrook, N. J. (2000). **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing**. *Nature* 408, 239-247, doi: 10.1038/35041687.
- Fiuza-Luces, C., Garatachea, N., Berger, N. A. und Lucia, A. (2013). **Exercise is the Real Polypill**. *Physiology* 28, 330-358, doi: 10.1152/physiol.00019.2013.
- Flieger, O., Engling, A., Bucala, R., Lue, H., Nickel, W. und Bernhagen, J. (2003). **Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter**. *FEBS Lett* 551, 78-86.
- Forman, H. J., Davies, M. J., Kramer, A. C., Miotto, G., Zaccarin, M., Zhang, H. und Ursini, F. (2017). **Protein cysteine oxidation in redox signaling: Caveats on sulfenic acid detection and quantification**. *Arch Biochem Biophys* 617, 26-37, doi: 10.1016/j.abb.2016.09.013.
- Forman, H. J., Fukuto, J. M. und Torres, M. (2007). **Signal Transduction by Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Pathways and Chemical Principles**, Springer Netherlands.
- Forrester, M. T., Thompson, J. W., Foster, M. W., Nogueira, L., Moseley, M. A. und Stamler, J. S. (2009). **Proteomic analysis of S-nitrosylation and denitrosylation by resin-assisted capture**. *Nat Biotechnol* 27, 557-559, doi: 10.1038/nbt.1545.
- Forterre, A., Jalabert, A., Berger, E., Baudet, M., Chikh, K., Errazuriz, E., De Larichaudy, J., Chanon, S., Weiss-Gayet, M., Hesse, A. M., Record, M., Geloën, A., Lefai, E., Vidal, H., Coute, Y. und Rome, S. (2014). **Proteomic analysis of C2C12 myoblast and myotube exosome-like vesicles: a new paradigm for myoblast-myotube cross talk?** *PLoS One* 9, e84153, doi: 10.1371/journal.pone.0084153.
- Furdui, C. M. und Poole, L. B. (2014). **Chemical approaches to detect and analyze protein sulfenic acids**. *Mass Spectrom Rev* 33, 126-146, doi: 10.1002/mas.21384.
- Gao, Q. und Goodman, J. M. (2015). **The lipid droplet-a well-connected organelle**. *Front Cell Dev Biol* 3, 49, doi: 10.3389/fcell.2015.00049.
- Ghezzi, P., Bonetto, V. und Fratelli, M. (2005). **Thiol-disulfide balance: From the concept of oxidative stress to that of redox regulation**. *Antioxidants & Redox Signaling* 7, 964-972, doi: DOI 10.1089/ars.2005.7.964.
- Giuliani, F., Grieve, A. und Rabouille, C. (2011). **Unconventional secretion: a stress on GRASP**. *Curr Opin Cell Biol* 23, 498-504, doi: 10.1016/j.ceb.2011.04.005.
- Go, Y. M. und Jones, D. P. (2010). **Redox control systems in the nucleus: mechanisms and functions**. *Antioxid Redox Signal* 13, 489-509, doi: 10.1089/ars.2009.3021.
- Grabiec, K., Majewska, A., Wicik, Z., Milewska, M., Blaszczyk, M. und Grzelkowska-Kowalczyk, K. (2016). **The effect of palmitate supplementation on gene expression profile in proliferating myoblasts**. *Cell Biol Toxicol* 32, 185-198, doi: 10.1007/s10565-016-9324-2.
- Grieve, A. G. und Rabouille, C. (2011). **Golgi bypass: skirting around the heart of classical secretion**. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, doi: 10.1101/cshperspect.a005298.
- Grube, L., Dellen, R., Kruse, F., Schwender, H., Stuhler, K. und Poschmann, G. (2018). **Mining the Secretome of C2C12 Muscle Cells: Data Dependent Experimental Approach To Analyze Protein Secretion Using Label-Free Quantification and Peptide Based Analysis**. *J Proteome Res* 17, 879-890, doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00684.
- Gu, H. F., Gu, T. W., Hilding, A., Zhu, Y. M., Karvestedt, L., Ostenson, C. G., Lai, M. D., Kutsukake, M., Frystyk, J., Tamura, K. und Brismar, K. (2013). **Evaluation of IGF1P-7 DNA methylation changes and serum protein variation in Swedish subjects with and without type 2 diabetes**. *Clinical Epigenetics* 5, doi: Artn 20 10.1186/1868-7083-5-20.

- Guo, J., Gaffrey, M. J., Su, D., Liu, T., Camp, D. G., 2nd, Smith, R. D. und Qian, W. J. (2014). **Resin-assisted enrichment of thiols as a general strategy for proteomic profiling of cysteine-based reversible modifications.** *Nat Protoc* 9, 64-75, doi: 10.1038/nprot.2013.161.
- Gupta, Y., Pasupuleti, V., Du, W. und Welford, S. M. (2016). **Macrophage Migration Inhibitory Factor Secretion Is Induced by Ionizing Radiation and Oxidative Stress in Cancer Cells.** *PLoS One* 11, e0146482, doi: 10.1371/journal.pone.0146482.
- Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H. und Aebersold, R. (1999). **Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags.** *Nat Biotechnol* 17, 994-999, doi: 10.1038/13690.
- Hamada, N., Fujimichi, Y., Iwasaki, T., Fujii, N., Furuhashi, M., Kubo, E., Minamino, T., Nomura, T. und Sato, H. (2014). **Emerging issues in radiogenic cataracts and cardiovascular disease.** *J Radiat Res* 55, 831-846, doi: 10.1093/jrr/rru036.
- Hanahan, D. (1983). **Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.** *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Harper, R., Wu, K., Chang, M. M., Yoneda, K., Pan, R., Reddy, S. P. und Wu, R. (2001). **Activation of nuclear factor-kappa b transcriptional activity in airway epithelial cells by thioredoxin but not by N-acetyl-cysteine and glutathione.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 25, 178-185, doi: 10.1165/ajrcmb.25.2.4471.
- Hathout, Y. (2007). **Approaches to the study of the cell secretome.** *Expert Rev Proteomics* 4, 239-248, doi: 10.1586/14789450.4.2.239.
- Hayashida, K., Bartlett, A. H., Chen, Y. und Park, P. W. (2010). **Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding.** *Anat Rec (Hoboken)* 293, 925-937, doi: 10.1002/ar.20757.
- Henique, C., Mansouri, A., Vavrova, E., Lenoir, V., Ferry, A., Esnous, C., Ramond, E., Girard, J., Bouillaud, F., Prip-Buus, C. und Cohen, I. (2015). **Increasing mitochondrial muscle fatty acid oxidation induces skeletal muscle remodeling toward an oxidative phenotype.** *FASEB J* 29, 2473-2483, doi: 10.1096/fj.14-257717.
- Henningsen, J., Rigbolt, K. T., Blagoev, B., Pedersen, B. K. und Kratchmarova, I. (2010). **Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation.** *Mol Cell Proteomics* 9, 2482-2496, doi: 10.1074/mcp.M110.002113.
- Herzog, C., Has, C., Franzke, C. W., Echtermeyer, F. G., Schlotzer-Schrehardt, U., Kroger, S., Gustafsson, E., Fassler, R. und Bruckner-Tuderman, L. (2004). **Dystroglycan in skin and cutaneous cells: beta-subunit is shed from the cell surface.** *J Invest Dermatol* 122, 1372-1380, doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.22605.x.
- Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1988). **Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels.** *Electrophoresis* 9, 28-32, doi: 10.1002/elps.1150090106.
- Holmgren, A. (2000). **Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems.** *Antioxid Redox Signal* 2, 811-820, doi: 10.1089/ars.2000.2.4-811.
- Hsieh, P. S., Tsai, H. C., Kuo, C. H., Chan, J. Y., Shyu, J. F., Cheng, W. T. und Liu, T. T. (2008). **Selective COX2 inhibition improves whole body and muscular insulin resistance in fructose-fed rats.** *Eur J Clin Invest* 38, 812-819, doi: 10.1111/j.1365-2362.2008.02026.x.
- Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M. und Graham Cooks, R. (2005). **The Orbitrap: a new mass spectrometer.** *J Mass Spectrom* 40, 430-443, doi: 10.1002/jms.856.
- Hu, W., Bielawski, J., Samad, F., Merrill, A. H., Jr. und Cowart, L. A. (2009). **Palmitate increases sphingosine-1-phosphate in C2C12 myotubes via upregulation of sphingosine kinase message and activity.** *J Lipid Res* 50, 1852-1862, doi: 10.1194/jlr.M800635-JLR200.
- Jackson, M. J. (2008). **Redox regulation of skeletal muscle.** *IUBMB Life* 60, 497-501, doi: 10.1002/iub.72.
- Jaffrey, S. R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C. D., Tempst, P. und Snyder, S. H. (2001). **Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide.** *Nat Cell Biol* 3, 193-197, doi: 10.1038/35055104.
- Ji, L. L. (2015). **Redox signaling in skeletal muscle: role of aging and exercise.** *Adv Physiol Educ* 39, 352-359, doi: 10.1152/advan.00106.2014.
- Jones, D. P. und Sies, H. (2015). **The Redox Code.** *Antioxidants & Redox Signaling* 23, 734-746, doi: 10.1089/ars.2015.6247.

- Jove, M., Planavila, A., Laguna, J. C. und Vazquez-Carrera, M. (2005). **Palmitate-induced interleukin 6 production is mediated by protein kinase C and nuclear-factor kappa B activation and leads to glucose transporter 4 down-regulation in skeletal muscle cells.** *Endocrinology* 146, 3087-3095, doi: 10.1210/en.2004-1560.
- Jungblut, P. R., Zimny-Arndt, U., Zeindl-Eberhart, E., Stulik, J., Koupilova, K., Pleissner, K. P., Otto, A., Muller, E. C., Sokolowska-Kohler, W., Grabher, G. und Stoffler, G. (1999). **Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases.** *Electrophoresis* 20, 2100-2110, doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19990701)20:10<2100::AID-ELPS2100>3.0.CO;2-D.
- Kalyanaraman, B. (2013). **Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms.** *Redox Biol* 1, 244-257, doi: 10.1016/j.redox.2013.01.014.
- Kamelgarn, M., Chen, J., Kuang, L. S., Arenas, A., Zhai, J. J., Zhu, H. N. und Gal, J. (2016). **Proteomic analysis of FUS interacting proteins provides insights into FUS function and its role in ALS.** *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1862, 2004-2014, doi: 10.1016/j.bbadis.2016.07.015.
- Karve, T. M. und Cheema, A. K. (2011). **Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease.** *J Amino Acids* 2011, 207691, doi: 10.4061/2011/207691.
- Kassar, O., Morais, M. P., Xu, S. Y., Adam, E. L., Chamberlain, R. C., Jenkins, B., James, T., Francis, P. T., Ward, S., Williams, R. J. und van den Elsen, J. (2017a). **Macrophage Migration Inhibitory Factor is subjected to glucose modification and oxidation in Alzheimer's Disease.** *Scientific Reports* 7, doi: ARTN 42874
10.1038/srep42874.
- Kassar, O., Pereira Morais, M., Xu, S., Adam, E. L., Chamberlain, R. C., Jenkins, B., James, T. D., Francis, P. T., Ward, S., Williams, R. J. und van den Elsen, J. (2017b). **Macrophage Migration Inhibitory Factor is subjected to glucose modification and oxidation in Alzheimer's Disease.** *Sci Rep* 7, 42874, doi: 10.1038/srep42874.
- Kausch, C., Staiger, H., Staiger, K., Krutzfeldt, J., Matthaei, S., Haring, H. U. und Stumvoll, M. (2003). **Skeletal muscle cells from insulin-resistant (non-diabetic) individuals are susceptible to insulin desensitization by palmitate.** *Hormone and Metabolic Research* 35, 570-576, doi: DOI 10.1055/s-2003-43501.
- Kim, J., Gee, H. Y. und Lee, M. G. (2018). **Unconventional protein secretion - new insights into the pathogenesis and therapeutic targets of human diseases.** *J Cell Sci* 131, doi: 10.1242/jcs.213686.
- Kim, K. M., Jang, H. C. und Lim, S. (2016). **Differences among skeletal muscle mass indices derived from height-, weight-, and body mass index-adjusted models in assessing sarcopenia.** *Korean Journal of Internal Medicine* 31, 643-650, doi: 10.3904/kjim.2016.015.
- Kim, T. und Yang, Q. (2013). **Peroxisome-proliferator-activated receptors regulate redox signaling in the cardiovascular system.** *World J Cardiol* 5, 164-174, doi: 10.4330/wjc.v5.i6.164.
- Kingsbury, K. J., Paul, S., Crossley, A. und Morgan, D. M. (1961). **The fatty acid composition of human depot fat.** *Biochem J* 78, 541-550.
- Kislinger, T., Gramolini, A. O., Pan, Y., Rahman, K., MacLennan, D. H. und Emili, A. (2005). **Proteome dynamics during C2C12 myoblast differentiation.** *Molecular & Cellular Proteomics* 4, 887-901, doi: 10.1074/mcp.M400182-MCP200.
- Klaunig, J. E. und 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.
- Kleemann, R., Kapurniotu, A., Frank, R. W., Gessner, A., Mischke, R., Flieger, O., Juttner, S., Brunner, H. und Bernhagen, J. (1998). **Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase.** *J Mol Biol* 280, 85-102, doi: 10.1006/jmbi.1998.1864.
- Kleemann, R., Kapurniotu, A., Mischke, R., Held, J. und Bernhagen, J. (1999). **Characterization of catalytic centre mutants of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and comparison to Cys81Ser MIF.** *Eur J Biochem* 261, 753-766.

- Klip, A. und Paquet, M. R. (1990). **Glucose-Transport and Glucose Transporters in Muscle and Their Metabolic-Regulation**. *Diabetes Care* 13, 228-243, doi: DOI 10.2337/diacare.13.3.228.
- Klose, J. und Kobalz, U. (1995). **Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome**. *Electrophoresis* 16, 1034-1059.
- Knowler, W. C., Barrett-Connor, E., Fowler, S. E., Hamman, R. F., Lachin, J. M., Walker, E. A., Nathan, D. M. und Diabetes Prevention Program Research, G. (2002). **Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin**. *N Engl J Med* 346, 393-403, doi: 10.1056/NEJMoa012512.
- Kodiha, M. und Stochaj, U. (2012). **Nuclear transport: a switch for the oxidative stress-signaling circuit?** *J Signal Transduct* 2012, 208650, doi: 10.1155/2012/208650.
- Koppenol-Raab, M., Sjoelund, V., Manes, N. P., Gottschalk, R. A., Dutta, B., Benet, Z. L., Fraser, I. D. und Nita-Lazar, A. (2017). **Proteome and Secretome Analysis Reveals Differential Post-transcriptional Regulation of Toll-like Receptor Responses**. *Mol Cell Proteomics* 16, S172-S186, doi: 10.1074/mcp.M116.064261.
- Krahmer, N., Najafi, B., Schueder, F., Quagliarini, F., Steger, M., Seitz, S., Kasper, R., Salinas, F., Cox, J., Uhlenhaut, N. H., Walther, T. C., Jungmann, R., Zeigerer, A., Borner, G. H. H. und Mann, M. (2018). **Organellar Proteomics and Phospho-Proteomics Reveal Subcellular Reorganization in Diet-Induced Hepatic Steatosis**. *Developmental Cell* 47, 205-+, doi: 10.1016/j.devcel.2018.09.017.
- Kurek, J. B., Bower, J. J., Romanella, M., Koentgen, F., Murphy, M. und Austin, L. (1997). **The role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration**. *Muscle Nerve* 20, 815-822.
- Kwak, H. J., Choi, H. E. und Cheon, H. G. (2017). **5-LO inhibition ameliorates palmitic acid-induced ER stress, oxidative stress and insulin resistance via AMPK activation in murine myotubes**. *Scientific Reports* 7, doi: ARTN 5025
10.1038/s41598-017-05346-5.
- Lacks, S. und Greenberg, B. (1975). **A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA**. *J Biol Chem* 250, 4060-4066.
- Laemmli, U. K. (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature* 227, 680-685.
- Lambertucci, R. H., Hirabara, S. M., Silveira, L. D., Levada-Pires, A. C., Curi, R. und Pithon-Curi, T. C. (2008). **Palmitate increases superoxide production through mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidase activity in skeletal muscle cells**. *Journal of Cellular Physiology* 216, 796-804, doi: 10.1002/jcp.21463.
- Lange, V., Picotti, P., Domon, B. und Aebersold, R. (2008). **Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial**. *Molecular Systems Biology* 4, doi: ARTN 222
10.1038/msb.2008.61.
- Lau, H. T., Suh, H. W., Golkowski, M. und Ong, S. E. (2014). **Comparing SILAC- and stable isotope dimethyl-labeling approaches for quantitative proteomics**. *J Proteome Res* 13, 4164-4174, doi: 10.1021/pr500630a.
- Le Bras, M., Clement, M. V., Pervaiz, S. und Brenner, C. (2005). **Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death**. *Histol Histopathol* 20, 205-219, doi: 10.14670/HH-20.205.
- Le Moal, E., Pialoux, V., Juban, G., Groussard, C., Zouhal, H., Chazaud, B. und Mounier, R. (2017). **Redox Control of Skeletal Muscle Regeneration**. *Antioxid Redox Signal* 27, 276-310, doi: 10.1089/ars.2016.6782.
- Lee, M. C., Miller, E. A., Goldberg, J., Orci, L. und Schekman, R. (2004). **Bi-directional protein transport between the ER and Golgi**. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 87-123, doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.105307.
- Leichert, L. I., Gehrke, F., Gudiseva, H. V., Blackwell, T., Ilbert, M., Walker, A. K., Strahler, J. R., Andrews, P. C. und Jakob, U. (2008). **Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress in vivo**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8197-8202, doi: 10.1073/pnas.0707723105.

- Leng, L., Metz, C. N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y. B., Mitchell, R. A. und Bucala, R. (2003). **MIF signal transduction initiated by binding to CD74.** *Journal of Experimental Medicine* 197, 1467-1476, doi: 10.1084/jem.20030286.
- Leonard, S. E. und Carroll, K. S. (2011). **Chemical 'omics' approaches for understanding protein cysteine oxidation in biology.** *Curr Opin Chem Biol* 15, 88-102, doi: 10.1016/j.cbpa.2010.11.012.
- Leonard, S. E., Reddie, K. G. und Carroll, K. S. (2009). **Mining the Thiol Proteome for Sulfenic Acid Modifications Reveals New Targets for Oxidation in Cells.** *ACS Chemical Biology* 4, 783-799, doi: 10.1021/cb900105q.
- LeRoith, D. und Yakar, S. (2007). **Mechanisms of disease: metabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1.** *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3, 302-310, doi: 10.1038/ncpendmet0427.
- Lichtenthaler, S. F., Lemberg, M. K. und Fluhrer, R. (2018). **Proteolytic ectodomain shedding of membrane proteins in mammals—hardware, concepts, and recent developments.** *EMBO J* 37, doi: 10.15252/embj.201899456.
- Lillig, C. H. und Holmgren, A. (2007). **Thioredoxin and related molecules—from biology to health and disease.** *Antioxid Redox Signal* 9, 25-47, doi: 10.1089/ars.2007.9.25.
- Liu, H., Sadygov, R. G. und Yates, J. R., 3rd (2004). **A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics.** *Anal Chem* 76, 4193-4201, doi: 10.1021/ac0498563.
- Liu, Y. und Min, W. (2002). **Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner.** *Circ Res* 90, 1259-1266.
- Lottspeich, F. (2009). **Introduction to proteomics.** *Methods Mol Biol* 564, 3-10, doi: 10.1007/978-1-60761-157-8_1.
- Lottspeich, F., Engels, J. W. und Solodkoff, Z. L. (2012). **Bioanalytik,** Spektrum Akademischer Verlag.
- Luedike, P., Hendgen-Cotta, U., Sobierajski, J., Totzeck, M., Krisp, C. H., Dewor, M., Lue, H., Kelm, M., Bernhagen, J. und Rassaf, T. (2012). **Cardioprotection through S-nitros(yl)ation of macrophage migration inhibitory factor.** *European Heart Journal* 33, 118-118.
- Luo, X., Liu, Y., Wang, R., Hu, H., Zeng, R. und Chen, H. (2011). **A high-quality secretome of A549 cells aided the discovery of C4b-binding protein as a novel serum biomarker for non-small cell lung cancer.** *J Proteomics* 74, 528-538, doi: 10.1016/j.jprot.2011.01.011.
- Ly, L. D., Xu, S., Choi, S. K., Ha, C. M., Thoudam, T., Cha, S. K., Wiederkehr, A., Wollheim, C. B., Lee, I. K. und Park, K. S. (2017). **Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes.** *Exp Mol Med* 49, e291, doi: 10.1038/emm.2016.157.
- Madamanchi, N. R., Hakim, Z. S. und Runge, M. S. (2005). **Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3, 254-267, doi: doi:10.1111/j.1538-7836.2004.01085.x.
- Mahmood, T. und Yang, P. C. (2012). **Western blot: technique, theory, and trouble shooting.** *N Am J Med Sci* 4, 429-434, doi: 10.4103/1947-2714.100998.
- Makinen, S., Nguyen, Y. H., Skrobuk, P. und Koistinen, H. A. (2017). **Palmitate and oleate exert differential effects on insulin signalling and glucose uptake in human skeletal muscle cells.** *Endocr Connect* 6, 331-339, doi: 10.1530/EC-17-0039.
- Manabe, Y., Takagi, M., Nakamura-Yamada, M., Goto-Inoue, N., Taoka, M., Isobe, T. und Fujii, N. L. (2014). **Redox proteins are constitutively secreted by skeletal muscle.** *J Physiol Sci* 64, 401-409, doi: 10.1007/s12576-014-0334-7.
- Mann, M. und Jensen, O. N. (2003). **Proteomic analysis of post-translational modifications.** *Nature Biotechnology* 21, 255-261, doi: 10.1038/nbt0303-255.
- Marchand, C., Le Marechal, P., Meyer, Y. und Decottignies, P. (2006). **Comparative proteomic approaches for the isolation of proteins interacting with thioredoxin.** *Proteomics* 6, 6528-6537, doi: 10.1002/pmic.200600443.
- Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H. und Antunes, F. (2014). **Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors.** *Redox Biol* 2, 535-562, doi: 10.1016/j.redox.2014.02.006.

- Martins, A. R., Nachbar, R. T., Gorjao, R., Vinolo, M. A., Festuccia, W. T., Lambertucci, R. H., Cury-Boaventura, M. F., Silveira, L. R., Curi, R. und Hirabara, S. M. (2012). **Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function.** *Lipids Health Dis* 11, 30, doi: 10.1186/1476-511X-11-30.
- Mattijssen, F. und Kersten, S. (2012). **Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietin-like proteins.** *Biochim Biophys Acta* 1821, 782-789, doi: 10.1016/j.bbali.2011.10.010.
- May, J. M. und de Haen, C. (1979). **Insulin-stimulated intracellular hydrogen peroxide production in rat epididymal fat cells.** *J Biol Chem* 254, 2214-2220.
- Megger, D. A., Pott, L. L., Ahrens, M., Padden, J., Bracht, T., Kuhlmann, K., Eisenacher, M., Meyer, H. E. und Sitek, B. (2014). **Comparison of label-free and label-based strategies for proteome analysis of hepatoma cell lines.** *Biochim Biophys Acta* 1844, 967-976, doi: 10.1016/j.bbapap.2013.07.017.
- Merk, M., Baugh, J., Zierow, S., Lee, S. J., Kavathas, P. und Bucala, R. (2008). **The golgi-associated protein p115 mediates the secretion of macrophage migration inhibitory factor (MIF).** *Inflammation Research* 57, S101-S101.
- Merk, M., Baugh, J., Zierow, S., Leng, L., Pal, U., Lee, S. J., Ebert, A. D., Mizue, Y., Trent, J. O., Mitchell, R., Nickel, W., Kavathas, P. B., Bernhagen, J. und Bucala, R. (2009). **The Golgi-associated protein p115 mediates the secretion of macrophage migration inhibitory factor.** *J Immunol* 182, 6896-6906, doi: 10.4049/jimmunol.0803710.
- Michalek, R. D., Nelson, K. J., Holbrook, B. C., Yi, J. S., Stridiron, D., Daniel, L. W., Fetrow, J. S., King, S. B., Poole, L. B. und Grayson, J. M. (2007). **The requirement of reversible cysteine sulfenic acid formation for T cell activation and function.** *J Immunol* 179, 6456-6467.
- Michalski, A., Damoc, E., Lange, O., Denisov, E., Nolting, D., Muller, M., Viner, R., Schwartz, J., Remes, P., Belford, M., Dunyach, J. J., Cox, J., Horning, S., Mann, M. und Makarov, A. (2012). **Ultra high resolution linear ion trap Orbitrap mass spectrometer (Orbitrap Elite) facilitates top down LC MS/MS and versatile peptide fragmentation modes.** *Mol Cell Proteomics* 11, O111 013698, doi: 10.1074/mcp.O111.013698.
- Miller, E. J., Li, J., Leng, L., McDonald, C., Atsumi, T., Bucala, R. und Young, L. H. (2008). **Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart.** *Nature* 451, 578-U579, doi: 10.1038/nature06504.
- Mitchell, D. A. und Marletta, M. A. (2005). **Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine.** *Nat Chem Biol* 1, 154-158, doi: 10.1038/nchembio720.
- Miyatake, S., Manabe, Y., Inagaki, A., Furuichi, Y., Takagi, M., Taoka, M., Isobe, T., Hirota, K. und Fujii, N. L. (2014). **Macrophage migration inhibitory factor diminishes muscle glucose transport induced by insulin and AICAR in a muscle type-dependent manner.** *Biochem Biophys Res Commun* 444, 496-501, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.089.
- Mizue, Y., Ghani, S., Leng, L., McDonald, C., Kong, P., Baugh, J., Lane, S. J., Craft, J., Nishihira, J., Donnelly, S. C., Zhu, Z. und Bucala, R. (2005). **Role for macrophage migration inhibitory factor in asthma.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14410-14415, doi: 10.1073/pnas.0507189102.
- Monteleone, M., Stow, J. L. und Schroder, K. (2015). **Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines.** *Cytokine* 74, 213-218, doi: 10.1016/j.cyto.2015.03.022.
- Morales, P. E., Bucarey, J. L. und Espinosa, A. (2017). **Muscle Lipid Metabolism: Role of Lipid Droplets and Perilipins.** *J Diabetes Res* 2017, 1789395, doi: 10.1155/2017/1789395.
- Morand, E. F., Leech, M. und Bernhagen, J. (2006). **MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis.** *Nat Rev Drug Discov* 5, 399-410, doi: 10.1038/nrd2029.
- Mossuto, M. F., Sannino, S., Mazza, D., Fagioli, C., Vitale, M., Yoboue, E. D., Sitia, R. und Anelli, T. (2014). **A dynamic study of protein secretion and aggregation in the secretory pathway.** *PLoS One* 9, e108496, doi: 10.1371/journal.pone.0108496.
- Mukherjee, P. und Mani, S. (2013). **Methodologies to decipher the cell secretome.** *Biochim Biophys Acta* 1834, 2226-2232, doi: 10.1016/j.bbapap.2013.01.022.
- Mullen, L., Hanschmann, E. M., Lillig, C. H., Herzenberg, L. A. und Ghezzi, P. (2015). **Cysteine Oxidation Targets Peroxiredoxins 1 and 2 for Exosomal Release through a Novel Mechanism of Redox-Dependent Secretion.** *Mol Med* 21, 98-108, doi: 10.2119/molmed.2015.00033.

- Muller, G. A., Muller, C. A. und Dihazi, H. (2007). **Clinical proteomics--on the long way from bench to bedside?** *Nephrol Dial Transplant* 22, 1297-1300, doi: 10.1093/ndt/gfl806.
- Munoz-Canoves, P., Scheele, C., Pedersen, B. K. und Serrano, A. L. (2013). **Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword?** *FEBS J* 280, 4131-4148, doi: 10.1111/febs.12338.
- Na, H. K. und Surh, Y. J. (2006). **Transcriptional regulation via cysteine thiol modification: a novel molecular strategy for chemoprevention and cytoprotection.** *Mol Carcinog* 45, 368-380, doi: 10.1002/mc.20225.
- Nakamura, S., Takamura, T., Matsuzawa-Nagata, N., Takayama, H., Misu, H., Noda, H., Nabemoto, S., Kurita, S., Ota, T., Ando, H., Miyamoto, K. und Kaneko, S. (2009). **Palmitate Induces Insulin Resistance in H4IIEC3 Hepatocytes through Reactive Oxygen Species Produced by Mitochondria.** *Journal of Biological Chemistry* 284, 14809-14818, doi: 10.1074/jbc.M901488200.
- Natarajan, V., Scribner, W. M., Al-Hassani, M. und Vepa, S. (1998). **Reactive oxygen species signaling through regulation of protein tyrosine phosphorylation in endothelial cells.** *Environmental Health Perspectives* 106, 1205-1212, doi: Doi 10.2307/3433987.
- Ngounou Wetie, A. G., Sokolowska, I., Woods, A. G., Wormwood, K. L., Dao, S., Patel, S., Clarkson, B. D. und Darie, C. C. (2013). **Automated mass spectrometry-based functional assay for the routine analysis of the secretome.** *J Lab Autom* 18, 19-29, doi: 10.1177/2211068212454738.
- Nielsen, A. R. und Pedersen, B. K. (2007). **The biological roles of exercise-induced cytokines: IL-6, IL-8, and IL-15.** *Appl Physiol Nutr Metab* 32, 833-839, doi: 10.1139/H07-054.
- Nieuwoudt, S., Mulya, A., Fealy, C. E., Martelli, E., Dasarathy, S., Naga Prasad, S. V. und Kirwan, J. P. (2017). **In vitro contraction protects against palmitate-induced insulin resistance in C2C12 myotubes.** *Am J Physiol Cell Physiol* 313, C575-C583, doi: 10.1152/ajpcell.00123.2017.
- Odorizzi, G., Cowles, C. R. und Emr, S. D. (1998). **The AP-3 complex: a coat of many colours.** *Trends Cell Biol* 8, 282-288.
- Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A. und 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, 376-386.
- Orita, M., Yamamoto, S., Katayama, N. und Fujita, S. (2002). **Macrophage migration inhibitory factor and the discovery of tautomerase inhibitors.** *Current Pharmaceutical Design* 8, 1297-1317, doi: Doi 10.2174/1381612023394674.
- Owens, J., Moreira, K. und Bain, G. (2013). **Characterization of primary human skeletal muscle cells from multiple commercial sources.** *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 49, 695-705, doi: 10.1007/s11626-013-9655-8.
- Palade, G. (1975). **Intracellular aspects of the process of protein synthesis.** *Science* 189, 347-358.
- Paul, D., Kumar, A., Gajbhiye, A., Santra, M. K. und Srikanth, R. (2013). **Mass spectrometry-based proteomics in molecular diagnostics: discovery of cancer biomarkers using tissue culture.** *Biomed Res Int* 2013, 783131, doi: 10.1155/2013/783131.
- Paulsen, C. E. und Carroll, K. S. (2013). **Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery.** *Chem Rev* 113, 4633-4679, doi: 10.1021/cr300163e.
- Pedersen, B. K. (2009). **The diseasome of physical inactivity--and the role of myokines in muscle-fat cross talk.** *J Physiol* 587, 5559-5568, doi: 10.1113/jphysiol.2009.179515.
- Pedersen, B. K. (2012). **Muscular interleukin-6 and its role as an energy sensor.** *Med Sci Sports Exerc* 44, 392-396, doi: 10.1249/MSS.0b013e31822f94ac.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. und Nielsen, H. (2011). **SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions.** *Nat Methods* 8, 785-786, doi: 10.1038/nmeth.1701.
- 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. und Nelson, K. J. (2008). **Discovering mechanisms of signaling-mediated cysteine oxidation.** *Current Opinion in Chemical Biology* 12, 18-24, doi: 10.1016/j.cbpa.2008.01.021.
- Poschmann, G. und Stühler, K. (2012). **Oxidation von Cysteinen: mehr als ein Artefakt der Proteinanalytik.** *BIOspektrum* 18, 607-609, doi: 10.1007/s12268-012-0237-1.

- Powell, D. J., Turban, S., Gray, A., Hajduch, E. und Hundal, H. S. (2004). **Intracellular ceramide synthesis and protein kinase C ζ activation play an essential role in palmitate-induced insulin resistance in rat L6 skeletal muscle cells.** *Biochem J* 382, 619-629, doi: 10.1042/BJ20040139.
- Prudovsky, I., Kumar, T. K., Sterling, S. und Neivandt, D. (2013). **Protein-phospholipid interactions in nonclassical protein secretion: problem and methods of study.** *Int J Mol Sci* 14, 3734-3772, doi: 10.3390/ijms14023734.
- Pu, J., Peng, G., Li, L., Na, H., Liu, Y. und Liu, P. (2011). **Palmitic acid acutely stimulates glucose uptake via activation of Akt and ERK1/2 in skeletal muscle cells.** *J Lipid Res* 52, 1319-1327, doi: 10.1194/jlr.M011254.
- Quan, S., Schneider, I., Pan, J., Von Hacht, A. und Bardwell, J. C. A. (2007). **The CXXC motif is more than a redox rheostat.** *Journal of Biological Chemistry* 282, 28823-28833, doi: 10.1074/jbc.M705291200.
- Rabouille, C. (2017). **Pathways of Unconventional Protein Secretion.** *Trends Cell Biol* 27, 230-240, doi: 10.1016/j.tcb.2016.11.007.
- Rabouille, C., Malhotra, V. und Nickel, W. (2012). **Diversity in unconventional protein secretion.** *J Cell Sci* 125, 5251-5255, doi: 10.1242/jcs.103630.
- Raices, M., Bukata, L., Sakuma, S., Borlido, J., Hernandez, L. S., Hart, D. O. und D'Angelo, M. A. (2017). **Nuclear Pores Regulate Muscle Development and Maintenance by Assembling a Localized Mef2C Complex.** *Dev Cell* 41, 540-554 e547, doi: 10.1016/j.devcel.2017.05.007.
- Rains, J. L. und Jain, S. K. (2011). **Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes.** *Free Radic Biol Med* 50, 567-575, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006.
- Rajpathak, S. N., Gunter, M. J., Wylie-Rosett, J., Ho, G. Y. F., Kaplan, R. C., Mazumdar, R., Rohan, T. E. und Strickler, H. D. (2009). **The role of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in glucose homeostasis and type 2 diabetes.** *Diabetes-Metabolism Research and Reviews* 25, 3-12, doi: 10.1002/dmrr.919.
- Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N. und Newsholme, E. A. (1963). **The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus.** *Lancet* 1, 785-789.
- Raymond, S. und Weintraub, L. (1959). **Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis.** *Science* 130, 711.
- Reidy, T., Rittenberg, A., Dwyer, M., D'Ortona, S., Pier, G. und Gadjeva, M. (2013). **Homotrimeric Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Drives Inflammatory Responses in the Corneal Epithelium by Promoting Caveolin-rich Platform Assembly in Response to Infection.** *Journal of Biological Chemistry* 288, 8269-8278, doi: 10.1074/jbc.M112.351064.
- Rhee, S. G. (2016). **Overview on Peroxiredoxin.** *Mol Cells* 39, 1-5, doi: 10.14348/molcells.2016.2368.
- Rhee, S. G., Kang, S. W., Jeong, W., Chang, T. S., Yang, K. S. und Woo, H. A. (2005a). **Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins.** *Curr Opin Cell Biol* 17, 183-189, doi: 10.1016/j.ceb.2005.02.004.
- Rhee, S. G., Yang, K. S., Kang, S. W., Woo, H. A. und Chang, T. S. (2005b). **Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification.** *Antioxid Redox Signal* 7, 619-626, doi: 10.1089/ars.2005.7.619.
- Rogers, L. K., Leinweber, B. L. und Smith, C. V. (2006). **Detection of reversible protein thiol modifications in tissues.** *Anal Biochem* 358, 171-184, doi: 10.1016/j.ab.2006.08.020.
- Roos, G., Foloppe, N. und Messens, J. (2013). **Understanding the pK(a) of redox cysteines: the key role of hydrogen bonding.** *Antioxid Redox Signal* 18, 94-127, doi: 10.1089/ars.2012.4521.
- Rothman, J. E. (1994). **Molecular Mechanisms of Intracellular Protein-Transport.** *Journal of Neurochemistry* 62, S86-S86.
- Ruan, W., Kang, Z., Li, Y., Sun, T., Wang, L., Liang, L., Lai, M. und Wu, T. (2016). **Interaction between IGF1 and insulin: a theoretical and experimental study.** *Sci Rep* 6, 19586, doi: 10.1038/srep19586.
- Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M. und Sitia, R. (1990). **A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence.** *EMBO J* 9, 1503-1510.

- Ryan, B. J., Nissim, A. und Winyard, P. G. (2014). **Oxidative post-translational modifications and their involvement in the pathogenesis of autoimmune diseases**. *Redox Biology* 2, 715-724, doi: 10.1016/j.redox.2014.05.004.
- Saccà, S. C. und Izzotti, A. (2014). **Focus on molecular events in the anterior chamber leading to glaucoma**. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71, 2197-2218, doi: 10.1007/s00018-013-1493-z.
- Samstag, Y., John, I. und Wabnitz, G. H. (2013). **Cofilin: a redox sensitive mediator of actin dynamics during T-cell activation and migration**. *Immunological Reviews* 256, 30-47, doi: 10.1111/imr.12115.
- Samuel, V. T. (2011). **Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance**. *Trends Endocrinol Metab* 22, 60-65, doi: 10.1016/j.tem.2010.10.003.
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, C. A., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M. und Smith, M. (1977). **Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA**. *Nature* 265, 687-695.
- Santos, J. M., Benite-Ribeiro, S. A., Queiroz, G. und Duarte, J. A. (2014). **The interrelation between aPKC and glucose uptake in the skeletal muscle during contraction and insulin stimulation**. *Cell Biochemistry and Function* 32, 621-624, doi: 10.1002/cbf.3081.
- Schey, K. L., Anderson, D. M. und Rose, K. L. (2013). **Spatially-directed protein identification from tissue sections by top-down LC-MS/MS with electron transfer dissociation**. *Anal Chem* 85, 6767-6774, doi: 10.1021/ac400832w.
- Schinagl, A., Kerschbaumer, R. J., Sabarth, N., Douillard, P., Scholz, P., Voelkel, D., Hollerweger, J. C., Goettig, P., Brandstetter, H., Scheiflinger, F. und Thiele, M. (2018). **Role of the Cysteine 81 Residue of Macrophage Migration Inhibitory Factor as a Molecular Redox Switch**. *Biochemistry* 57, 1523-1532, doi: 10.1021/acs.biochem.7b01156.
- Schinagl, A., Thiele, M., Douillard, P., Volkel, D., Kenner, L., Kazemi, Z., Freissmuth, M., Scheiflinger, F. und Kerschbaumer, R. J. (2016). **Oxidized macrophage migration inhibitory factor is a potential new tissue marker and drug target in cancer**. *Oncotarget* 7, 73486-73496, doi: 10.18632/oncotarget.11970.
- Schindler, L., Dickerhof, N., Hampton, M. B. und Bernhagen, J. (2018). **Post-translational regulation of macrophage migration inhibitory factor: Basis for functional fine-tuning**. *Redox Biology* 15, 135-142, doi: 10.1016/j.redox.2017.11.028.
- Schmidt, A., Forne, I. und Imhof, A. (2014). **Bioinformatic analysis of proteomics data**. *BMC Syst Biol* 8 Suppl 2, S3, doi: 10.1186/1752-0509-8-S2-S3.
- Schmitz-Peiffer, C., Craig, D. L. und Biden, T. J. (1999). **Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate**. *Journal of Biological Chemistry* 274, 24202-24210, doi: DOI 10.1074/jbc.274.34.24202.
- Schoneich, C., Dremina, E., Galeva, N. und Sharov, V. (2014). **Apoptosis in differentiating C2C12 muscle cells selectively targets Bcl-2-deficient myotubes**. *Apoptosis* 19, 42-57, doi: 10.1007/s10495-013-0922-7.
- Schrader, M. und Fahimi, H. D. (2006). **Peroxisomes and oxidative stress**. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1755-1766, doi: 10.1016/j.bbamer.2006.09.006.
- Schwanhausser, B., Gossen, M., Dittmar, G. und Selbach, M. (2009). **Global analysis of cellular protein translation by pulsed SILAC**. *Proteomics* 9, 205-209, doi: 10.1002/pmic.200800275.
- Shackleton, B., Crawford, F. und Bachmeier, C. (2016). **Inhibition of ADAM10 promotes the clearance of Abeta across the BBB by reducing LRP1 ectodomain shedding**. *Fluids Barriers CNS* 13, 14, doi: 10.1186/s12987-016-0038-x.
- Shadel, Gerald S. und Horvath, Tamas L. (2015). **Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis**. *Cell* 163, 560-569, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.001>.
- Shapiro, A. L., Vinuela, E. und Maizel, J. V., Jr. (1967). **Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels**. *Biochem Biophys Res Commun* 28, 815-820.
- Sies, H. (1985). **Oxidative stress**, Orlando : Academic Press, London.
- Sies, H. (1993). **Strategies of antioxidant defense**. *Eur J Biochem* 215, 213-219.

- Sies, H. (2014). **Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress.** *J Biol Chem* 289, 8735-8741, doi: 10.1074/jbc.R113.544635.
- Sies, H. und Jones, D. (2007). **Oxidative Stress* A2 - Fink, George.** In: *Encyclopedia of Stress (Second Edition)*, Academic Press, New York, S. 45-48.
- Silva, J. C., Denny, R., Dorschel, C. A., Gorenstein, M., Kass, I. J., Li, G. Z., McKenna, T., Nold, M. J., Richardson, K., Young, P. und Geromanos, S. (2005). **Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs.** *Anal Chem* 77, 2187-2200, doi: 10.1021/ac048455k.
- Skrobuk, P., von Kraemer, S., Semenova, M. M., Zitting, A. und Koistinen, H. A. (2012). **Acute exposure to resveratrol inhibits AMPK activity in human skeletal muscle cells.** *Diabetologia* 55, 3051-3060, doi: 10.1007/s00125-012-2691-1.
- Song, I. K., Lee, J. J., Cho, J. H., Jeong, J., Shin, D. H. und Lee, K. J. (2016). **Degradation of Redox-Sensitive Proteins including Peroxiredoxins and DJ-1 is Promoted by Oxidation-induced Conformational Changes and Ubiquitination.** *Scientific Reports* 6, doi: ARTN 34432 10.1038/srep34432.
- Souto Padron de Figueiredo, A., Salmon, A. B., Bruno, F., Jimenez, F., Martinez, H. G., Halade, G. V., Ahuja, S. S., Clark, R. A., DeFronzo, R. A., Abboud, H. E. und El Jamali, A. (2015). **Nox2 mediates skeletal muscle insulin resistance induced by a high fat diet.** *J Biol Chem* 290, 13427-13439, doi: 10.1074/jbc.M114.626077.
- Spickett, C. M. und Pitt, A. R. (2012). **Protein oxidation: role in signalling and detection by mass spectrometry.** *Amino Acids* 42, 5-21, doi: 10.1007/s00726-010-0585-4.
- Stadtman, E. R. (2006). **Protein oxidation and aging.** *Free Radic Res* 40, 1250-1258, doi: 10.1080/10715760600918142.
- Staiger, H., Haas, C., Machann, J., Werner, R., Weisser, M., Schick, F., Machicao, F., Stefan, N., Fritsche, A. und Haring, H. U. (2009). **Muscle-Derived Angiotensin-Like Protein 4 Is Induced by Fatty Acids via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)-delta and Is of Metabolic Relevance in Humans.** *Diabetes* 58, 579-589, doi: 10.2337/db07-1438.
- Stastna, M. und Van Eyk, J. E. (2012a). **Analysis of protein isoforms: can we do it better?** *Proteomics* 12, 2937-2948, doi: 10.1002/pmic.201200161.
- Stastna, M. und Van Eyk, J. E. (2012b). **Investigating the Secretome: Lessons About the Cells That Comprise the Heart.** *Circulation: Cardiovascular Genetics* 5, o8-o18, doi: 10.1161/circgenetics.111.960187.
- Steensberg, A., Keller, C., Starkie, R. L., Osada, T., Febbraio, M. A. und Pedersen, B. K. (2002). **IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E1272-1278, doi: 10.1152/ajpendo.00255.2002.
- Steringer, J. P., Muller, H. M. und Nickel, W. (2015). **Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2--a novel type of protein translocation across membranes?** *J Mol Biol* 427, 1202-1210, doi: 10.1016/j.jmb.2014.07.012.
- Steringer, J. P. und Nickel, W. (2018). **A direct gateway into the extracellular space: Unconventional secretion of FGF2 through self-sustained plasma membrane pores.** *Semin Cell Dev Biol* 83, 3-7, doi: 10.1016/j.semcdb.2018.02.010.
- Steven, S., Daiber, A., Doppeide, J. F., Munzel, T. und Espinola-Klein, C. (2017). **Peripheral artery disease, redox signaling, oxidative stress - Basic and clinical aspects.** *Redox Biol* 12, 787-797, doi: 10.1016/j.redox.2017.04.017.
- Storr, S. J., Woolston, C. M., Zhang, Y. und Martin, S. G. (2013). **Redox environment, free radical, and oxidative DNA damage.** *Antioxid Redox Signal* 18, 2399-2408, doi: 10.1089/ars.2012.4920.
- Sudhof, T. C. (2012). **Calcium control of neurotransmitter release.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a011353, doi: 10.1101/cshperspect.a011353.
- Sukonina, V., Lookene, A., Olivecrona, T. und Olivecrona, G. (2006). **Angiotensin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17450-17455, doi: 10.1073/pnas.0604026103.
- Svoboda, L. K., Reddie, K. G., Zhang, L., Vesely, E. D., Williams, E. S., Schumacher, S. M., O'Connell, R. P., Shaw, R., Day, S. M., Anumonwo, J. M., Carroll, K. S. und Martens, J. R. (2012). **Redox-Sensitive Sulfenic Acid Modification Regulates Surface Expression of the Cardiovascular Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.5.** *Circulation Research* 111, 842-+, doi: 10.1161/Circresaha.111.263525.

- Tangvarasittichai, S. (2015). **Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus**. *World J Diabetes* 6, 456-480, doi: 10.4239/wjd.v6.i3.456.
- Taverna, S. D., Ueberheide, B. M., Liu, Y., Tackett, A. J., Diaz, R. L., Shabanowitz, J., Chait, B. T., Hunt, D. F. und Allis, C. D. (2007). **Long-distance combinatorial linkage between methylation and acetylation on histone H3 N termini**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2086-2091, doi: 10.1073/pnas.0610993104.
- Thiele, M., Kerschbaumer, R. J., Tam, F. W. K., Volkel, D., Douillard, P., Schinagl, A., Kuhnel, H., Smith, J., McDaid, J. P., Bhangal, G., Yu, M. C., Pusey, C. D., Cook, H. T., Kovarik, J., Magelky, E., Bhan, A., Rieger, M., Mudde, G. C., Ehrlich, H., Jilma, B., Tilg, H., Moschen, A., Terhorst, C. und Scheiflinger, F. (2015). **Selective Targeting of a Disease-Related Conformational Isoform of Macrophage Migration Inhibitory Factor Ameliorates Inflammatory Conditions**. *Journal of Immunology* 195, 2343-2352, doi: 10.4049/jimmunol.1500572.
- Tien, W. S., Chen, J. H. und Wu, K. P. (2017). **SheddomeDB: the ectodomain shedding database for membrane-bound shed markers**. *BMC Bioinformatics* 18, 42, doi: 10.1186/s12859-017-1465-7.
- Tilleman, K., Deforce, D. und Elewaut, D. (2005). **Rheumatology: a close encounter with proteomics**. *Rheumatology (Oxford)* 44, 1217-1226, doi: 10.1093/rheumatology/keh694.
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D., Bron, S. und van Dijk, J. M. (2000). **Signal peptide-dependent protein transport in Bacillus subtilis: a genome-based survey of the secretome**. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 515-547.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R. und Chu, G. (2001). **Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5116-5121, doi: 10.1073/pnas.091062498.
- Tveit, H., Aksten, L. K., Fagereng, G. L., Tranulis, M. A. und Prydz, K. (2009). **A secretory Golgi bypass route to the apical surface domain of epithelial MDCK cells**. *Traffic* 10, 1685-1695, doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00984.x.
- Varjosalo, M., Sacco, R., Stukalov, A., van Drogen, A., Planyavsky, M., Hauri, S., Aebersold, R., Bennett, K. L., Colinge, J., Gstaiger, M. und Superti-Furga, G. (2013). **Interlaboratory reproducibility of large-scale human protein-complex analysis by standardized AP-MS**. *Nat Methods* 10, 307-314, doi: 10.1038/nmeth.2400.
- Virgili, F. und Marino, M. (2008). **Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity**. *Free Radical Biology and Medicine* 45, 1205-1216, doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.001>.
- Vujcic, M., Saksida, T., Despotovic, S., Bajic, S. S., Lalic, I., Koprivica, I., Gajic, D., Golic, N., Tolinacki, M. und Stojanovic, I. (2018). **The Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Function of Intestinal Barrier**. *Scientific Reports* 8, doi: ARTN 6337
10.1038/s41598-018-24706-3.
- Wadley, A. J., Aldred, S. und Coles, S. J. (2016). **An unexplored role for Peroxiredoxin in exercise-induced redox signalling?** *Redox Biol* 8, 51-58, doi: 10.1016/j.redox.2015.10.003.
- Wang, C., Yu, J., Huo, L., Wang, L., Feng, W. und Wang, C. C. (2012a). **Human Protein-disulfide Isomerase Is a Redox-regulated Chaperone Activated by Oxidation of Domain a'**. *Journal of Biological Chemistry* 287, 1139-1149, doi: 10.1074/jbc.M111.303149.
- Wang, G. X., Zhao, X. Y. und Lin, J. D. (2015). **The brown fat secretome: metabolic functions beyond thermogenesis**. *Trends Endocrinol Metab* 26, 231-237, doi: 10.1016/j.tem.2015.03.002.
- Wang, J. und Sevier, C. S. (2016). **Formation and Reversibility of BiP Protein Cysteine Oxidation Facilitate Cell Survival during and post Oxidative Stress**. *Journal of Biological Chemistry* 291, 7541-7557, doi: 10.1074/jbc.M115.694810.
- Wang, Y., Herrera, A. H., Li, Y., Belani, K. K. und Walcheck, B. (2009). **Regulation of mature ADAM17 by redox agents for L-selectin shedding**. *J Immunol* 182, 2449-2457, doi: 10.4049/jimmunol.0802770.
- Wang, Y., Yang, J. und Yi, J. (2012b). **Redox sensing by proteins: oxidative modifications on cysteines and the consequent events**. *Antioxid Redox Signal* 16, 649-657, doi: 10.1089/ars.2011.4313.

- Watarai, H., Nozawa, R., Tokunaga, A., Yuyama, N., Tomas, M., Hinohara, A., Ishizaka, K. und Ishii, Y. (2000). **Posttranslational modification of the glycosylation inhibiting factor (GIF) gene product generates bioactive GIF**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 13251-13256, doi: DOI 10.1073/pnas.230445397.
- Weber, K. und Osborn, M. (1969). **The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis**. *J Biol Chem* *244*, 4406-4412.
- Weerapana, E., Simon, G. M. und Cravatt, B. F. (2008). **Disparate proteome reactivity profiles of carbon electrophiles**. *Nat Chem Biol* *4*, 405-407, doi: 10.1038/nchembio.91.
- Weigert, C., Brodbeck, K., Staiger, H., Kausch, C., Machicao, F., Haring, H. U. und Schleicher, E. D. (2004). **Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappa B**. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 23942-23952, doi: 10.1074/jbc.M312692200.
- Wein, S., Fauroux, M., Laffitte, J., de Nadai, P., Guaini, C., Pons, F. und Comera, C. (2004). **Mediation of annexin 1 secretion by a probenecid-sensitive ABC-transporter in rat inflamed mucosa**. *Biochem Pharmacol* *67*, 1195-1202, doi: 10.1016/j.bcp.2003.11.015.
- Weng, Y., Sui, Z., Shan, Y., Jiang, H., Zhou, Y., Zhu, X., Liang, Z., Zhang, L. und Zhang, Y. (2016). **In-Depth Proteomic Quantification of Cell Secretome in Serum-Containing Conditioned Medium**. *Anal Chem* *88*, 4971-4978, doi: 10.1021/acs.analchem.6b00910.
- Whitelegge, J., Halgand, F., Souda, P. und Zabrouskov, V. (2006). **Top-down mass spectrometry of integral membrane proteins**. *Expert Rev Proteomics* *3*, 585-596, doi: 10.1586/14789450.3.6.585.
- Wilfling, F., Wang, H., Haas, J. T., Krahrmer, N., Gould, T. J., Uchida, A., Cheng, J. X., Graham, M., Christiano, R., Frohlich, F., Liu, X., Buhman, K. K., Coleman, R. A., Bewersdorf, J., Farese, R. V., Jr. und Walther, T. C. (2013). **Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets**. *Dev Cell* *24*, 384-399, doi: 10.1016/j.devcel.2013.01.013.
- Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J. C., Yan, J. X., Gooley, A. A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K. L. und Hochstrasser, D. F. (1996). **From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis**. *Biotechnology (N Y)* *14*, 61-65.
- Wong, H. L. und Liebler, D. C. (2008). **Mitochondrial protein targets of thiol-reactive electrophiles**. *Chem Res Toxicol* *21*, 796-804, doi: 10.1021/tx700433m.
- Xu, A. M., Lam, M. C., Chan, K. W., Wang, Y., Zhang, J. L., Hoo, R. L. C., Xu, J. Y., Chen, B. Y., Chow, W. S., Tso, A. W. K. und Lam, K. S. L. (2005). **Angiopoietin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 6086-6091, doi: 10.1073/pnas.0408452102.
- Yaffe, D. und Saxel, O. (1977). **Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle**. *Nature* *270*, 725-727.
- Yanez-Mo, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borrás, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colas, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel, M., Heegaard, N. H. H., Hendrix, A., Kierulf, P., Kokubun, K., Kosanovic, M., Kralj-Iglic, V., Kramer-Albers, E. M., Laitinen, S., Lasser, C., Lener, T., Ligeti, E., Line, A., Lipps, G., Llorente, A., Lotvall, J., Mancek-Keber, M., Marcilla, A., Mittelbrunn, M., Nazarenko, I., Nolte-t' Hoen, E. N. M., Nyman, T. A., O'Driscoll, L., Olivan, M., Oliveira, C., Pallinger, E., del Portillo, H. A., Reventos, J., Rigau, M., Rohde, E., Sammar, M., Sanchez-Madrid, F., Santarem, N., Schallmoser, K., Ostenfeld, M. S., Stoorvogel, W., Stukelj, R., Van der Grein, S. G., Vasconcelos, M. H., Wauben, M. H. M. und De Wever, O. (2015). **Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions**. *Journal of Extracellular Vesicles* *4*, doi: UNSP 27066
10.3402/jev.v4.27066.
- Yang, J., Carroll, K. S. und Liebler, D. C. (2016). **The Expanding Landscape of the Thiol Redox Proteome**. *Mol Cell Proteomics* *15*, 1-11, doi: 10.1074/mcp.O115.056051.

- Yang, M., Wei, D., Mo, C., Zhang, J., Wang, X., Han, X., Wang, Z. und Xiao, H. (2013). **Saturated fatty acid palmitate-induced insulin resistance is accompanied with myotube loss and the impaired expression of health benefit myokine genes in C2C12 myotubes.** *Lipids Health Dis* 12, 104, doi: 10.1186/1476-511X-12-104.
- Yang, Z. und Li, N. (2015). **Absolute quantitation of protein posttranslational modification isoform.** *Methods Mol Biol* 1306, 105-119, doi: 10.1007/978-1-4939-2648-0_8.
- Yoon, J. H., Yea, K., Kim, J., Choi, Y. S., Park, S., Lee, H., Lee, C. S., Suh, P. G. und Ryu, S. H. (2009). **Comparative proteomic analysis of the insulin-induced L6 myotube secretome.** *Proteomics* 9, 51-60, doi: 10.1002/pmic.200800187.
- Yoshida, K., Noguchi, K., Motohashi, K. und Hisabori, T. (2013). **Systematic exploration of thioredoxin target proteins in plant mitochondria.** *Plant Cell Physiol* 54, 875-892, doi: 10.1093/pcp/pct037.
- Yoshimura, S. H., Otsuka, S., Kumeta, M., Taga, M. und Takeyasu, K. (2013). **Intermolecular disulfide bonds between nucleoporins regulate karyopherin-dependent nuclear transport.** *J Cell Sci* 126, 3141-3150, doi: 10.1242/jcs.124172.
- Yuzefovych, L., Wilson, G. und Rachek, L. (2010). **Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299, E1096-1105, doi: 10.1152/ajpendo.00238.2010.
- Zhang, X. J., Chinkes, D. L., Aarsland, A., Herndon, D. N. und Wolfe, R. R. (2008). **Lipid metabolism in diet-induced obese rabbits is similar to that of obese humans.** *Journal of Nutrition* 138, 515-518.
- Zuo, L. und Pannell, B. (2015). **Redox characterization of functioning skeletal muscle.** *Frontiers in Physiology* 6, doi: 10.3389/fphys.2015.00338.
- Zuo, X., Echan, L., Hembach, P., Tang, H. Y., Speicher, K. D., Santoli, D. und Speicher, D. W. (2001). **Towards global analysis of mammalian proteomes using sample prefractionation prior to narrow pH range two-dimensional gels and using one-dimensional gels for insoluble and large proteins.** *Electrophoresis* 22, 1603-1615, doi: 10.1002/1522-2683(200105)22:9<1603::AID-ELPS1603>3.0.CO;2-I.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Oxidoreduktasen für die Regulation der intrazellulären Wasserstoffperoxidkonzentration.	3
Abbildung 2:	Oxidative Cysteinthiol-Modifikationen.	6
Abbildung 3:	Insulin-Rezeptor-Signalkaskade.	8
Abbildung 4:	Mechanismen der Proteinsekretion.	12
Abbildung 5:	Unterschiedliche Strategien für die MS-basierte Quantifizierung von Proteinen.	18
Abbildung 6:	MS-basierte Analyse der reversibel oxidierten Cysteinreste.	19
Abbildung 7:	Lichtmikroskopische Aufnahmen von C2C12 Skelettmuskelzellen.	41
Abbildung 8:	Messung der Glukoseaufnahme von murinen und humanen Myotuben anhand des fluoreszierenden Glukoseanalogons 2-NBDG.	59
Abbildung 9:	Nachweis für die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies.	61
Abbildung 10:	Untersuchung des Proteoms von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben.	62
Abbildung 11:	Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung für die differenzielle Analyse der C2C12 Proteome im Hinblick auf die Identifizierung von redox-sensitiven Proteinen („C2C12 Redox-Proteom“).	63
Abbildung 12:	Differenzielle Analyse von reversiblen oxidativen Cysteinmodifikationen im zellulären Proteomen von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben.	64
Abbildung 13:	Anreicherungsanalyse basierend auf den Annotation der Proteine zu den jeweiligen GOCC und GOBP Kategorien.	65
Abbildung 14:	Palmitatinduziertes Redox-Proteom von C2C12 Myotuben.	66
Abbildung 15:	Übersicht der Charakterisierung des sekretorischen Phänotyps der C2C12 Myotuben nach Palmitatbehandlung.	67
Abbildung 16:	Analyse des palmitatinduzierten sekretorischen Phänotyps von C2C12 Myotuben.	68
Abbildung 17:	Differenzielle Sekretom- und Proteomanalyse von C2C12 Myotuben.	70
Abbildung 18:	Graphische Ausgabe von dem Tool „Lysate and Secretome Peptide Feature Plotter“ (LSPFP).	73
Abbildung 19:	Immunfärbung gegen Plexin-B2 Proteinisoformentypen (<i>full</i> , <i>shed</i>) in Sekretom- und zellulären Proteomproben von C2C12 Myotuben.	74
Abbildung 20:	Graphische Ausgabe von LSPFP für die identifizierten Peptide des potentiell proteolytisch prozessierten Proteins Plxn2.	75
Abbildung 21:	Versuchsansatz zur Identifizierung von <i>bona fide</i> sekretierten Proteinen von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben.	76
Abbildung 22:	Proteinintensitäten der im Sekretom von C2C12 Myotuben quantifizierten Proteine.	77
Abbildung 23:	Immunfärbung gegen das potentiell redox-aktive Protein Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktor (Mif).	80
Abbildung 24:	Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung für die differenzielle Analyse von redox-sensitiven Cysteinen, unter Verwendung von „leichtem“ <i>N</i> -Ethylmaleinimid (NEM) und isotopenmarkiertem „schwerem“ NEM-D5.	80
Abbildung 25:	SDS-PAGE des Zellysates, des Durchflusses und des IP-Eluats von pCMV3 <i>Mif-gfp</i> transfizierten C2C12 Myotuben.	82
Abbildung 26:	Sequenzabdeckung von dem Protein Mif.	82
Abbildung 27:	MS-Spektrum des NEM-D5 markierten Peptides LLCGLLSDR.	83
Abbildung 28:	Immunocytochemische Färbungen gegen das Protein Mif in C2C12 Myotuben.	84
Abbildung 29:	Immunfärbungen gegen Mif und GFP in C2C12 Myotuben.	85

Abbildung 30: Western Blot Analyse von Mif-GFP Überexpressionsvarianten im zellulären Proteom und Sekretom von C2C12 Myotuben	86
Abbildung 31: Potentielle Interaktionspartner des Mif.....	88
Abbildung 32: Identifizierte Interaktionspartner von Mif: Unterschiede und Gemeinsamkeiten der untersuchten Cysteinvarianten.....	90
Abbildung 33: Vergleich der eigenen Ergebnisse potentiell sekretierter Proteine mit den Studien von Deshmukh <i>et al.</i> und Henningsen <i>et al.</i>	95
Abbildung 34: Palmitatinduzierte Proteinsekretion von C2C12 Myotuben.....	103
Abbildung 35: Protein-Protein Interaktionsnetzwerk.....	105
Abbildung 36: Bekannte posttranslationale Modifikationen (PTM) von Mif (modifiziert nach (Schindler <i>et al.</i> , 2018)).....	107
Abbildung 37: Bestimmung der Zellviabilität von C2C12 Myotuben, unter verschiedenen Konditionen, über Trypanblau-Färbung und automatisierte Zählung der Zellen.	137
Abbildung 38: Bestimmung der Zellviabilität von primären humanen SkMC.	137
Abbildung 39: Hierarchische Clusteranalyse der Intensitäten der quantifizierten Proteine im zellulären Proteom von C2C12 Myotuben (2.371)..	138
Abbildung 40: Quantitative C2C12 Redox-Proteom-Studie von murinen Myotuben nach Palmitatbehandlung.	138
Abbildung 41: Immunfärbung gegen <i>low density lipoprotein receptor</i> (Ldlr) Proteinisoformen in Sekretom- und zellulären Proteomproben von C2C12 Myotuben.	139
Abbildung 42: Auftrennung und Färbung der Sekretom- und der zellulären Proteomprobe mittels Gelelektrophorese und Silberfärbung.	139
Abbildung 43: Graphische Ausgabe von dem Tool LSPFP für die Identifizierung von Ldlr in den jeweils 15 Proteom- und Sekretomfraktionen.	140
Abbildung 44: Analyse des palmitatinduzierten Sekretoms von C2C12 Myotuben.....	141
Abbildung 45: Überprüfung der Aufreinigung des rekombinant in <i>E.coli</i> hergestellten Proteins Mif	141
Abbildung 46: Potentielle Interaktionspartner des Mif. Es wurden C2C12 Myotuben verwendet, in die entweder das Konstrukt <i>Mif-gfp</i> oder als Kontrolle den GFP-Leervektor über Transfektion eingebracht wurde. Nach der Zellernte und Lyse wurde eine IP gegen GFP durchgeführt, die Eluate prozessiert und via LC-MS/MS analysiert. Das <i>VENN</i> Diagramm der Proteine, die im Vergleich mit der GFP-Leervektorkontrolle signifikant erhöhte Abundanzen zeigten. 25 Proteine wurden in allen verwendeten Mif-GFP überexpremierenden Zelllinien als potentielle Interaktionspartner von dem Protein Mif gefunden.	142

Tabelle 1:	Komponenten der PCR Reaktion	35
Tabelle 2:	PCR-Program	35
Tabelle 3:	Komponenten des Restriktionsverdau I	36
Tabelle 4:	Komponenten des Restriktionsverdau II	36
Tabelle 5:	Ligation	37
Tabelle 6:	Komponenten der PCR-Mutagenese-Reaktionen	38
Tabelle 7:	PCR-Programm für die Mutagenese	38
Tabelle 8:	Denaturierung und langsames Abkühlen für die Anlagerung der PCR-Produkte	39
Tabelle 9:	Der Ablauf der Silberfärbung, Lösungen und Inkubationszeiten	48
Tabelle 10:	Teilschritte des HPLC-Programms (60-minütige Probenauftrennung)	52
Tabelle 11:	Teilschritte des HPLC-Programms (120-minütige Probenauftrennung)	53
Tabelle 12:	Massenspektrometrische Parameter für die LC-MS/MS Analysen mit der QExactive Plus	53
Tabelle 13:	Zusammenfassung der verwendeten MaxQuant- und Perseus-Versionen sowie der UniProt KB Proteindatenbanken	55
Tabelle 14:	Potentiell redox-abhängig sekretierte Proteine. Schnittmenge der in der C2C12 Redox-Proteom-Studie identifizierten redox-aktiven Proteine und der palmitatinduziert verändert sekretierten Proteinen von C2C12 Myotuben	78
Tabelle 15:	Das Protein Mif als potentiell redox-sensitiv sekretiertes Protein	79
Tabelle 16:	Gegenüber der GFP-Leervektorkontrolle durch Mif-GFP angereicherten Proteine	89
Tabelle 17:	Proteine, die exklusiv nur im zellulären Proteom von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben gefunden wurden	97
Tabelle 18:	Kategoriale Anreicherungsanalyse (exakter Fischer-Test) der Protein-assoziierten GOBP und GOCC Kategorien	143
Tabelle 19:	Kategoriale Anreicherungsanalyse (exakter Fischer-Test) der Protein-assoziierten GOBP und GOCC Kategorien	144
Tabelle 20:	Differenziell erhöht abundante Proteine im Vergleich Mif-GFP WT gegen die Leervektorkontrolle	144
Tabelle 21:	Differenziell verändert abundante Proteine des zellulären Proteoms von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben und der Lösungsmittelkontrolle	146
Tabelle 22:	Proteinliste der potentiell redox-sensitiven Proteine	160
Tabelle 23:	Liste der 858 im Sekretom der C2C12 Myotuben signifikant überrepräsentierten Proteine inklusive der 401 palmitatinduziert verändert abundanten Proteine	167
Tabelle 24:	Proteinliste der potentiell redox-vermittelten Proteininteraktionspartner von Mif	191

9. Abkürzungsverzeichnis

1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
AHA	Azidohomoalani
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
°C	Grad Celsius
CHAPS	3-[N-(Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfat
CID	<i>Collision-induced Dissociation</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy	Cyanin
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DIGE	Differenz-Gelelektrophorese
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'Desoxy-nucleotid-5'Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol
FA	Ameisensäure (<i>formic acid</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FDR	<i>false discovery rate</i>
FFA	Freie Fettsäuren (<i>free fatty acids</i>)
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GO	<i>Gene Ontology</i>
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCD	<i>High-energy collision dissociation</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

H ₂ O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HS	Pferdeserum (<i>horse serum</i>)
IAM	Iodacetamid
ICAT	<i>isotope-coded affinity tag</i>
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IF	Immunfluoreszenz
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
ITRAQ	<i>isobaric tags for relative and absolute quantitation</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
L	Liter
LB	Nährmedium für Bakterien (<i>lysogeny broth</i>)
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie
LFQ	Markierungsfreie Quantifizierung (<i>label free quantification</i>)
M	Molar
mA	Milliamper
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
Mif	Makrophagen-Migrations-Inhibitions Faktor
min	Minuten
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
mut	mutiert
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
NEM	N-Ethylmaleimid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel Elektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid (Jump to search)
RIPA	Radioimmunoprecipitation
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RNS	Reaktiven Stickstoffspezies (<i>reactive nitrogen species</i>)

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
SkMC	Humane Skelettmuskelzellen (<i>Human Skeletal Muscle Cells</i>)
SRM	<i>selected reaction monitoring</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	Bakterienkultivierung (<i>terrific broth</i>)
TBS-T	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCA	Tichloressigsäure
T1D	Typ 1 Diabetes
T2D	Typ 2 Diabetes
TFA	Trifluoressigsäure
TMT	<i>tandem mass tag</i>
TPS	Thiopropyl Sepharose 6B
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
vol	Volumen
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
μ	Mikro

10. Anhang

Abbildungen

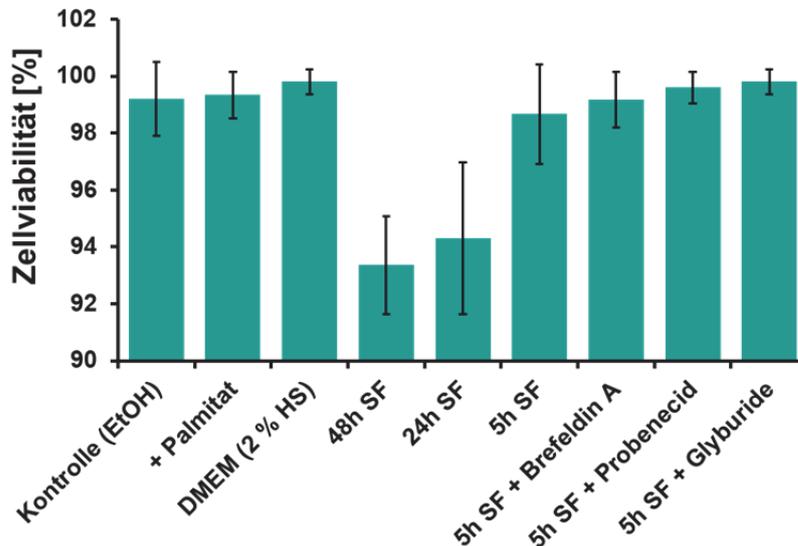


Abbildung 37: Bestimmung der Zellviabilität von C2C12 Myotuben, unter verschiedenen Konditionen, über Trypanblau-Färbung und automatisierte Zählung der Zellen. Die verwendeten C2C12 Myotuben wurden für 16 h mit 500 μ M Palmitat oder als Kontrolle mit dem Lösungsmittel Ethanol (EtOH) behandelt. Für die Sekretomanalyse wurde untersucht, welchen Einfluss die Inkubationsdauer (48 h, 24 h und 5 h) der C2C12 Zellen in serumfreiem Medium auf die Zellviabilität hat. Weiterhin wurde der Effekt der fünfständigen Behandlung mit 1 μ g/mL Brefeldin A, 2 μ M Probenecid, oder 2,5 μ M Glyburid in serumfreiem Medium analysiert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der gemessenen Zellviabilität [%] und die Fehlerbalken die Standardabweichung der Zellviabilität.

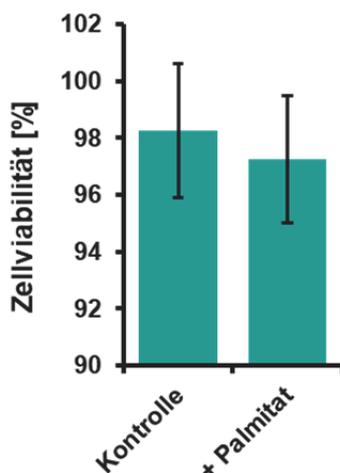


Abbildung 38: Bestimmung der Zellviabilität von primären humanen SKMC. Analyse der Zellviabilität von palmitatbehandelten und als Kontrolle mit dem Lösungsmittel (EtOH)-behandelten SKMC Myotuben anhand einer Trypanblau-Färbung. Die Zellviabilität lag in der Lösungsmittelkontrolle Ethanol bei 98,2 % und nach Palmitatbehandlung bei 97,2 %. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichung.

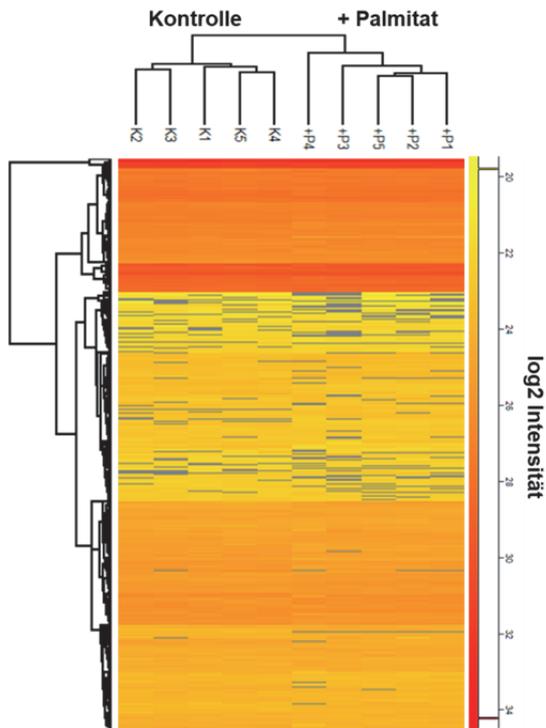


Abbildung 39: Hierarchische Clusteranalyse der Intensitäten der quantifizierten Proteine im zellulären Proteom von C2C12 Myotuben (2.371). Die Zellen wurden für 16 h mit 500 μM Palmitat (+P) oder als Kontrolle mit dem Lösungsmittel Ethanol (K) behandelt ($n=5$). Die Analyse zeigt eine deutliche Abgrenzung der Proben der beiden untersuchten Konditionen. Die Farbkodierung repräsentiert die detektierte \log_2 LFQ Intensität jedes Proteins, wobei Rot eine hohe und Gelb eine niedrige Intensität repräsentiert.

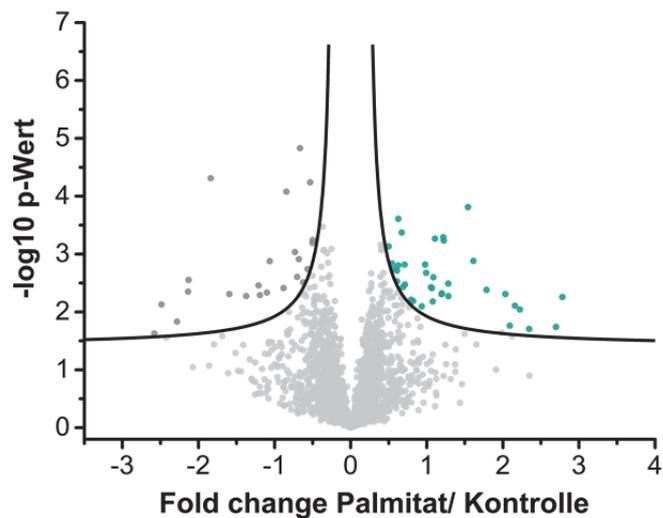


Abbildung 40: Quantitative C2C12 Redox-Proteom-Studie von murinen Myotuben nach Palmitatbehandlung. Die untersuchten Zellen wurden für 16 h mit 500 μM Palmitat oder als Kontrolle mit dem Lösungsmittel Ethanol behandelt ($n=5$). *Volcano Plot* der nicht normalisierten Daten der C2C12 Redox-Proteom-Studie.

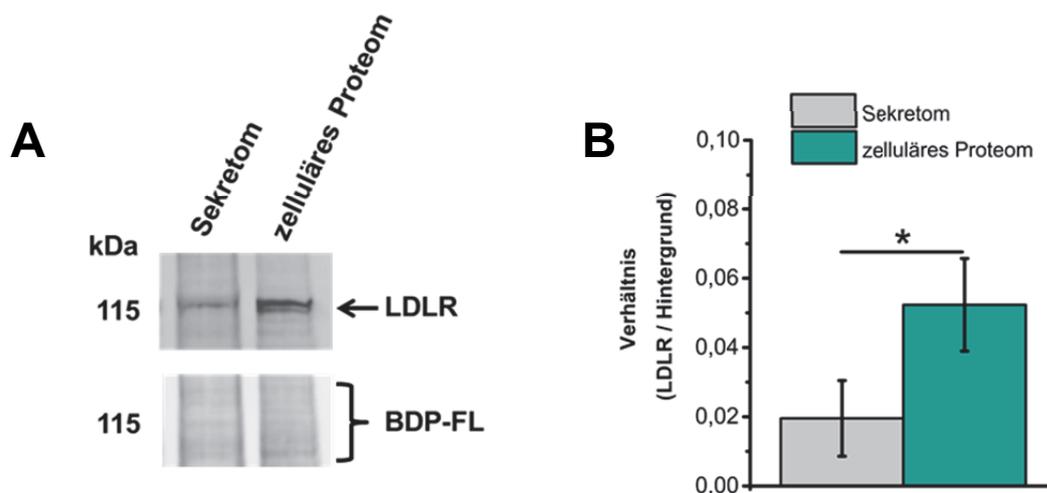


Abbildung 41: Immunfärbung gegen low density lipoprotein receptor (Ldlr) Proteinisoformen in Sekretom- und zellulären Proteomproben von C2C12 Myotuben. A) Es wurde ein Antikörper gegen die zytoplasmatische Region des Proteins Ldlr für den Nachweis des Proteins in Sekretom- und Proteomproben verwendet. B) Die quantitative Analyse der detektierten Ldlr-Bandensignale zeigten, dass in den Proteomproben im Vergleich zu den Sekretomproben das Signal signifikant erhöht war (p-Wert = 0,03; n=3/Gruppe). Des Weiteren wurden von den analysierten Proben Ladekontrollen über die Färbung mit dem fluoreszierenden Farbstoff BDP-FL angefertigt, um zu gewährleisten, dass die gleiche Menge Protein geladen wurde und die detektierten Signalintensitäten auf die Gesamtproteinmenge zu normalisieren.

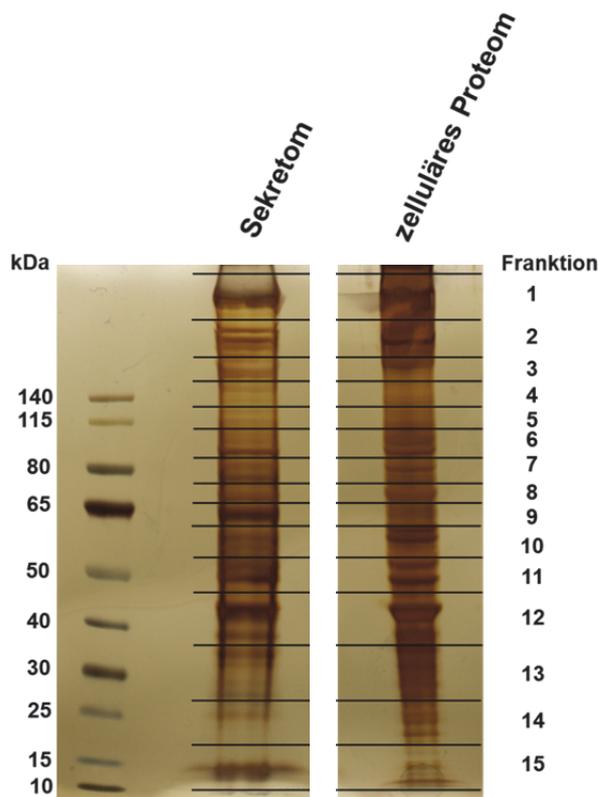


Abbildung 42: Auftrennung und Färbung der Sekretom- und der zellulären Proteomprobe mittels Gelelektrophorese und Silberfärbung. Um die Sequenzabdeckung der im Sekretom und zellulären Proteom identifizierte Proteine zu erhöhen, wurden 20 µg Protein pro Probe über eine SDS-PAGE aufgetrennt, über eine Silberfärbung visualisiert und 15 Fraktionen pro Probe angefertigt, die anschließend prozessiert und individuell via LC-MS/MS analysiert wurden.

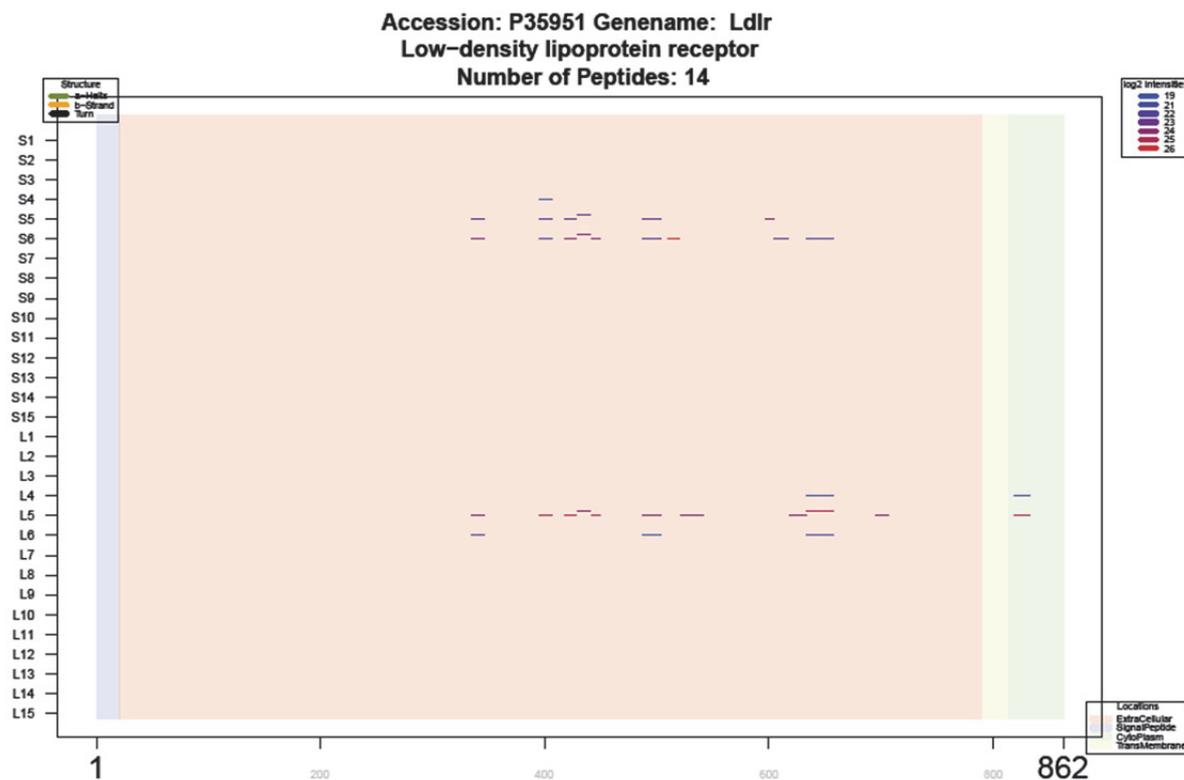


Abbildung 43: Graphische Ausgabe von dem Tool LSPFP für die Identifizierung von Ldlr in den jeweils 15 Proteom- und Sekretomfraktionen. Für den Versuch wurde eine C2C12 Sekretomprobe und eine Probe des zugehörigen zellulären Proteoms in einer SDS-PAGE aufgetrennt und jede Gelspur in 15 Fraktionen zerteilt (Sekretom: S1–S15; zelluläres Proteom: L1–L15). Die Fraktionen wurden anschließend via quantitativer MS einzeln analysiert. Die identifizierten Peptide pro Fraktionen wurden unter Verwendung des Tools LSPFP visualisiert. Dieser Versuchsansatz ermöglicht eine höhere Proteinsequenzabdeckung.

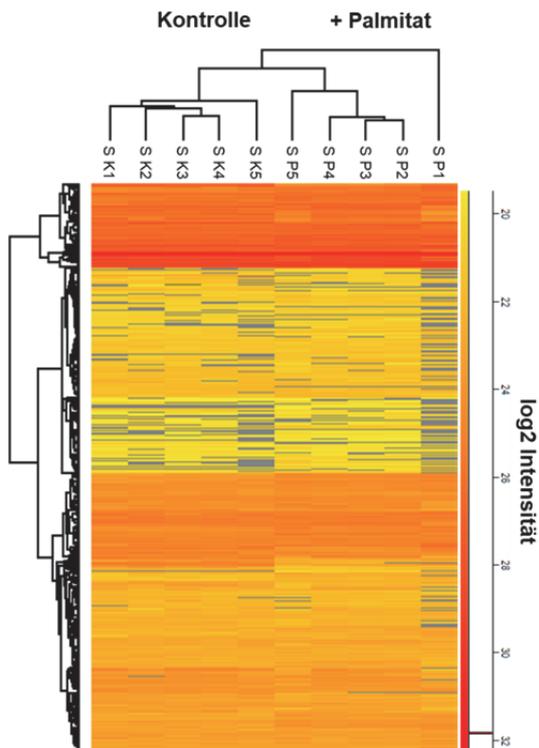


Abbildung 44: Analyse des palmitatinduzierten Sekretoms von C2C12 Myotuben. Hierarchische Clusteranalyse basierend auf den detektierten \log_2 LFQ Intensitäten der 1.487 quantifizierten Proteine. Für den Versuch wurden die C2C12 Myotuben für 16 h mit 500 μ M Palmitatlösung (P1–P5) oder als Kontrolle mit dem Lösungsmittel (K1–K5) behandelt und anschließend für 5 h in serumfreiem Medium inkubiert ($n=5$). Die Analyse zeigt eine deutliche Abgrenzung zwischen den palmitatbehandelten und den Kontrollproben.

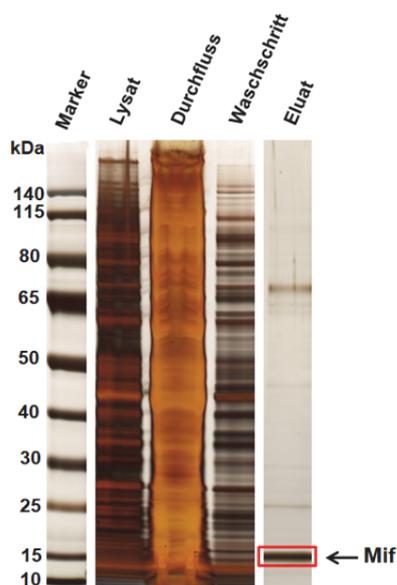


Abbildung 45: Überprüfung der Aufreinigung des rekombinant in *E.coli* hergestellten Proteins Mif. Es wurde eine Probe des Zellysates, des Durchflusses sowie des ersten Wascheschrittes und des Eluats der IMAC basierten Aufreinigung, im 1D-Gel aufgetrennt und mit Silber angefärbt. In der Gelspur des Eluats wurde die Bande auf Höhe des Zielproteins Mif (13 kDa) ausgeschnitten, prozessiert und via LC-MS/MS das Protein Mif verifiziert.

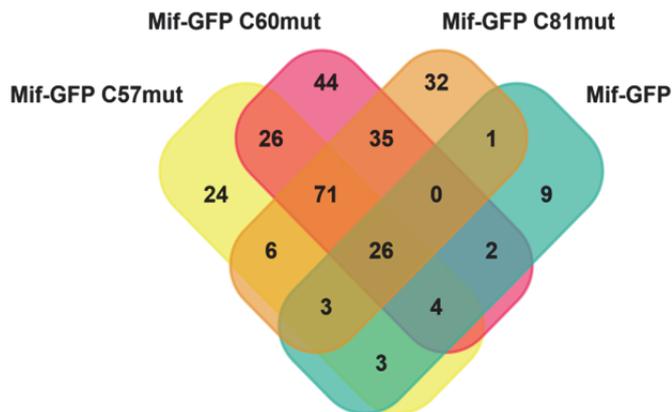


Abbildung 46: Potentielle Interaktionspartner des Mif. Es wurden C2C12 Myotuben verwendet, in die entweder das Konstrukt *Mif-GFP* oder als Kontrolle den GFP-Leervektor über Transfektion eingebracht wurde. Nach der Zellernte und Lyse wurde eine IP gegen GFP durchgeführt, die Eluate prozessiert und via LC-MS/MS analysiert. Das *VENN* Diagramm der Proteine, die im Vergleich mit der GFP-Leervektorkontrolle signifikant erhöhte Abundanzen zeigten. 25 Proteine wurden in allen verwendeten Mif-GFP überexprimierenden Zelllinien als potentielle Interaktionspartner von dem Protein Mif gefunden.

Tabellen

Tabelle 18: Kategoriale Anreicherungsanalyse (exakter Fischer-Test) der Protein-assoziierten GOBP und GOCC Kategorien.

A) Im zellulären Proteom nach Palmitatbehandlung angereicherte Proteine (330).

Go Kategorie	Anzahl der Proteine	Anreicherungs-faktor	p-Wert	Angepasster p-Wert (Benj. Hoch. FDR)
receptor complex	16	4,04	7,33E-05	0,0012
ECM-receptor interaction	29	3,96	1,51E-07	3,65E-05
PPAR signaling pathway	19	3,78	6,02E-05	0,0021
Cardiac muscle contraction	24	3,29	0,0001	0,0037
Protein digestion and absorption	17	2,96	0,0043	0,0412
Peroxisome	28	2,82	0,0006	0,0102
extracellular structure organization	26	2,76	0,0012	0,0129
extracellular matrix organization	26	2,76	0,0012	0,0134
Fatty acid metabolism	27	2,66	0,0017	0,0216
transmembrane transport	41	2,63	0,0002	0,0039
microbody	36	2,39	0,0017	0,0167
response to extracellular stimulus	53	2,17	0,0010	0,0116
mitochondrion organization	44	2,12	0,0034	0,0299
cell adhesion	80	1,98	0,0005	0,0098
response to external stimulus	82	1,93	0,0008	0,0109
lipid metabolic process	155	1,76	0,0001	0,0030
cytoplasmic membrane-bounded vesicle	128	1,74	0,0005	0,0067
membrane	748	1,55	7,54E-13	4,48E-11
vesicle	182	1,54	0,0012	0,0132
mitochondrion	363	1,43	0,0002	0,0028
response to stress	277	1,30	0,0083	0,0466
nucleus	491	0,56	1,11E-06	3,31E-05
regulation of organelle organization	93	0,39	0,0046	0,0334
ribonucleoprotein complex	289	0,37	2,68E-07	0,0000
regulation of cell cycle	89	0,32	0,0024	0,0222
cytoplasm	478	0,29	2,99E-15	3,56E-13
regulation of translation	77	0,19	0,0007	0,0104
protein phosphorylation	45	0,16	0,0082	0,0470
cell division	61	0,12	0,0010	0,0112

B) Im zellulären Proteom nach Palmitatbehandlung abgereicherte Proteine (500).

GO Kategorie	Anzahl der Proteine	Anreicherungs-faktor	p-Wert	Angepasster p-Wert (Benj. Hoch. FDR)
cytoplasm	478	1,75	1,33E-19	1,59E-17
microtubule organizing center	67	1,70	0,0020	0,0336
nucleus	491	1,47	2,03E-09	8,06E-08
proteolysis	144	1,45	0,0017	0,0382
protein modification process	190	1,40	0,0012	0,0351
macromolecule modification	202	1,39	0,0011	0,0378
protein metabolic process	471	1,22	0,0013	0,0319
mitochondrion	363	0,60	2,82E-06	8,39E-05
membrane	748	0,53	1,43E-17	8,51E-16
lipid metabolic process	155	0,52	0,0003	0,0398
response to external stimulus	82	0,40	0,0012	0,0323
Oxidative phosphorylation	73	0,06	4,64E-07	0,0001

Tabelle 19: Kategoriale Anreicherungsanalyse (exakter Fischer-Test) der Protein-assoziierten GOBP und GOCC Kategorien.

A) Im zellulären Proteom nach Palmitatbehandlung über die TPS-Matrix angereichert (233).

GO Kategorie	Anzahl der Proteine	Anreicherungs-faktor	p-Wert	Angepasster p-Wert (Benj. Hoch. FDR)
nuclear pore	24	4,37	7,55E-07	8,69E-05
protein transport	181	1,78	4,59E-05	0,01231
cytoplasm	371	1,50	3,47E-05	0,001998

B) Im zellulären Proteom nach Palmitatbehandlung abgereichert (145).

GO Kategorie	Anzahl der Proteine	Anreicherungs-faktor	p-Wert	Angepasster p-Wert (Benj. Hoch. FDR)
Proton-Transport ATPase Komplex	8	6,48	0,0017	0,0401
Rezeptorkomplex	15	5,19	0,0005	0,0183
Membran	592	1,40	0,0003	0,0160
Zytoplasma	371	0,38	1,69E-05	0,0019
Nukleolus	118	0,11	0,0006	0,0170
RNA Prozessierung	139	0,09	0,0001	0,0308

Tabelle 20: Differenziell erhöht abundante Proteine im Vergleich Mif-GFP WT gegen die Leervektorkontrolle

Proteinname	Genname	-Log Student's T-test p-value WT K_K	Student's T-test Difference WT K_K
Septin-9	Sep9	2,37	1,63
AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)	Ahnak	3,02	3,11
Annexin A2;Annexin	Anxa2	1,44	0,89
AP-3 complex subunit beta-1	Ap3b1	2,19	2,58
Aspartyl aminopeptidase	Dnpep	4,68	3,53
ATP-dependent zinc metalloprotease YME1L1	Yme1l1	1,87	1,33
Band 4.1-like protein 2	Epb41l2	6,10	5,57
Bcl-2-associated transcription factor 1	Bclaf1	3,96	4,52
Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase;Glutamate--tRNA ligase;Proline--tRNA ligase	Eprs	1,74	1,22

Brain acid soluble protein 1	Basp1	4,21	3,70
Bromodomain-containing protein 2	Brd2	2,79	3,50
Cadherin-15	Cdh15	3,87	2,93
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Uqcrc2	2,68	1,32
E3 SUMO-protein ligase RanBP2	Ranbp2	1,88	0,87
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	Eif3a	1,32	1,71
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	Eif3c	5,06	2,58
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	Eif3i	1,76	1,03
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	Eif3l	2,03	1,8
Fatty acid synthase:[Acyl-carrier-protein] S-acetyltransferase;	Fasn	2,47	1,20
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	Glud1	5,26	3,41
Hepatoma-derived growth factor-related protein 2	Hdgfrp2	2,95	3,34
Hexokinase;Hexokinase-1	Hk1	2,40	0,84
LIM and SH3 domain protein 1	Lasp1	1,70	1,91
Macrophage migration inhibitory factor	Mif	2,37	4,46
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Marcks	4,95	3,63
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	Ybx1	3,40	3,01
Nucleolin	Ncl	1,87	1,46
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3bp1	1,32	2,15
Ribosome-binding protein 1	Rrbp1	2,06	1,79
RNA-binding protein FUS	Fus	3,72	2,84
Serine/arginine-rich splicing factor 2	Srsf2	4,68	4,49
Serine/arginine-rich splicing factor 6	Srsf6	4,24	3,49
Serpin H1	Serpinh1	3,33	1,34
Serrate RNA effector molecule homolog	Srrt	1,31	1,25
Sorting nexin-9	Snx9	2,03	1,8
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	Sfpq	4,30	3,27
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	Vat1	1,26	1,47
Thyroid hormone receptor-associated protein 3	Thrap3	4,35	3,62
Tight junction protein ZO-1	Tjp1	6,81	5,25
Tight junction protein ZO-2	Tjp2	3,62	2,93
Transcriptional activator protein Pur-beta	Purb	1,56	1,98
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Vcp	4,11	1,99
Valine--tRNA ligase	Vars	2,75	1,27
Y-box-binding protein 3	Ybx3	2,29	2,68
Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2	Zranb2	3,78	4,06
Zyxin	Zyx	4,46	2,96

Tabelle 21: Differenziell verändert abundante Proteine des zellulären Proteoms von palmitatbehandelten C2C12 Myotuben und der Lösungsmittelkontrolle.

Proteinname	Gencode	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
Perilipin-2	Plin2	P43883	7,84E-08	6,04
Heme oxygenase 1	Hmox1	P14901	0,0002	3,38
ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial	Atp5e	P56382	0,1045	3,26
Sequestosome-1	Sqstm1	Q64337	7,68E-09	2,79
Prostaglandin G/H synthase 2	Ptgs2	Q05769	2,78E-07	2,53
ATP synthase subunit delta, mitochondrial	Atp5d	Q9D3D9	0,0253	2,40
Nucleoside diphosphate kinase A	Nme1	P15532	0,0085	2,28
Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin like domain member 1 protein	Herpud1	Q8C4N0	5,62E-07	2,27
Protein-lysine 6-oxidase	Lox	P28301	0,0004	2,04
60S ribosomal protein L36a	Rpl36a	P83882	0,0439	1,75
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9	Timm9	Q9WV98	0,0344	1,72
Proteolipid protein 2	Plp2	Q9R1Q7	0,1072	1,68
Collectin-12	Colec12	Q8K4Q8	0,0037	1,65
ATP synthase subunit gamma	Atp5c1	A2AKU9	0,0087	1,65
Angiopoietin-related protein 4	Angptl4	Q9Z1P8	0,0016	1,61
Multidrug resistance-associated protein 1	Abcc1	O35379	0,0009	1,42
Ras-related protein Rab-31	Rab31	Q3TXV4	0,0416	1,41
28S ribosomal protein S2, mitochondrial	Mrps2	Q924T2	0,0316	1,38
Nidogen-1	Nid1	P10493	0,0058	1,37
Vacuolar protein sorting-associated protein 13C	Vps13c	Q8BX70	0,0171	1,35
B-cell receptor-associated protein 31	Bcap31	Q61335	0,0539	1,33
Thymidylate kinase	Dtymk	P97930	0,0728	1,32
Translocation protein SEC62	Sec62	Q8BU14	0,0202	1,25
Transmembrane protein 106B	Tmem106b	D3Z191	0,0120	1,24
Glutathione S-transferase A4	Gsta4	P24472	5,10E-07	1,24
Pigment epithelium-derived factor	Serpinf1	P97298	0,0198	1,24
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2	Cisd2	D3Z3X4	0,0413	1,22
Protein lin-7 homolog C	Lin7c	O88952	0,0649	1,18
Trafficking protein particle complex subunit 11	Trappc11	B2RXC1	0,0080	1,04
Transmembrane emp24 domain-containing protein 1	Tmed1	Q3V009	0,0328	1,02
39S ribosomal protein L12, mitochondrial	Mrpl12	Q9DB15	0,0118	1,01
Fibulin-2	Fbln2	P37889	5,79E-07	1,00
Integrin beta-3	Itgb3	O54890	0,0598	0,95
Catalase	Cat	P24270	4,57E-08	0,94
Cytochrome c oxidase protein 20 homolog	Cox20	Q9D7J4	0,0142	0,93
Ribosomal RNA small subunit methyltransferase NEP1	Emg1	O35130	0,0426	0,93
Cell differentiation protein RCD1 homolog	Rqcd1	Q9JKY0	0,0994	0,92
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	Slc2a1	P17809	0,0004	0,92
Fibronectin	Fn1	A0A087WSN6	0,0175	0,91
Vascular cell adhesion protein 1	Vcam1	Q3UPN1	0,0470	0,90
Pleckstrin homology-like domain family B member 2	Phldb2	D3Z069	0,0386	0,89
EG627828 protein	Gm6793	B2RXM2	0,0319	0,89
Monocarboxylate transporter 1	Slc16a1	P53986	0,0017	0,89
Collagen alpha-2(IV) chain	Col4a2	P08122	1,86E-05	0,89
Early endosome antigen 1	Eea1	Q8BL66	0,0105	0,89
Serine protease HTRA1	Htra1	Q9R118	4,15E-06	0,88
Pleiotropic regulator 1	Plrg1	D3Z4V1	0,0004	0,85
Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase	Alg5	Q9DB25	0,0032	0,83
Long-chain fatty acid transport protein 4	Slc27a4	Q91VE0	0,0269	0,83
Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform	Cpt1a	P97742	0,0004	0,83
Uncharacterized protein C17orf62 homolog	BC017643	Q3TYS2	0,0556	0,82
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14	Dnajc19	G3X8S1	0,0496	0,82
Torsin-1A-interacting protein 2	Tor1aip2	Q8BYU6	0,0686	0,82
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	Slc38a2	Q8CFE6	0,0457	0,82
Optic atrophy 3 protein homolog	Opa3	Q505D7	0,0790	0,81
Neuroplastin	Nptn	H3BIX4	3,28E-05	0,80
Fibronectin	Fn1	A0A087WR50	0,0001	0,80
4F2 cell-surface antigen heavy chain	Slc3a2	P10852	2,09E-07	0,80

Proteinname	Genname	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
Synaptophysin-like protein 1	Sypl1	O09117	0,0097	0,80
Ceramide synthase 2	Cers2	Q924Z4	0,0158	0,80
Fibrillin-1	Fbn1	Q61554	0,0017	0,79
Transmembrane protein 263	Tmem263	Q9DAM7	0,0176	0,78
Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit	Nfkb2	Q9WTK5	0,0353	0,78
Integrin alpha-5	Itga5	P11688	0,0001	0,78
Sphingolipid delta(4)-desaturase DES1	Degs1	O09005	0,0526	0,76
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	Itih2	G3X977	0,0003	0,76
Carbonyl reductase [NADPH] 3	Cbr3	Q8K354	0,0841	0,76
Fatty acyl-CoA reductase 1	Far1	Q922J9	1,92E-05	0,75
Granulins	Grn	Q3U9N4	0,0062	0,75
Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	Cpox	P36552	0,0147	0,72
CD44 antigen	Cd44	Q3U8S1	0,0058	0,71
Rho-related GTP-binding protein RhoB	Rhob	P62746	0,0017	0,71
Zinc transporter SLC39A7	Slc39a7	Q31125	0,0014	0,70
High affinity cationic amino acid transporter 1	Slc7a1	E9Q3N1	0,0422	0,69
Laminin subunit gamma-1	Lamc1	F8VQJ3	0,0001	0,69
Signal peptidase complex subunit 3	Spcs3	Q6ZWQ7	0,0054	0,69
Lactadherin	Mfge8	P21956	4,27E-06	0,68
78 kDa glucose-regulated protein	Hspa5	P20029	1,28E-05	0,68
Sideroflexin-1	Sfxn1	Q99JR1	4,66E-05	0,68
Low-density lipoprotein receptor	Ldlr	P35951	0,0005	0,67
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial	Ndufb5	Q9CQH3	0,0041	0,67
Receptor expression-enhancing protein	Reep5	G3X8R0	0,0085	0,67
Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	Ech1	O35459	0,0004	0,66
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit DAD1	Dad1	P61804	0,0001	0,66
Epoxide hydrolase 1	Ephx1	Q9D379	1,13E-05	0,65
L-lactate dehydrogenase B chain	Ldhb	P16125	0,0044	0,65
Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	Vdac3	A0A140T8V3	0,0001	0,64
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	Hspg2	Q05793	0,0014	0,64
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	Lamp1	P11438	0,0003	0,64
Lysosome membrane protein 2	Scarb2	O35114	0,0036	0,63
Secretory carrier-associated membrane protein 3	Scamp3	E9Q855	0,0002	0,62
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Hspd1	P63038	0,0001	0,62
Translocon-associated protein subunit delta	Ssr4	Q9D8L3	4,18E-05	0,62
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	Gpd2	A2AQR0	4,66E-08	0,62
Sorting nexin-9	Snx9	Q91VH2	0,0028	0,62
Retinol dehydrogenase 11	Rdh11	Q9R1R8	0,0007	0,61
Deoxyguanosine kinase, mitochondrial	Dguok	A0A0U1RPX3	0,0130	0,60
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	Acs11	D3Z041	0,0005	0,60
Serine/arginine-rich splicing factor 7	Srsf7	Q8BL97	0,0005	0,60
Prohibitin	Phb	P67778	0,0003	0,60
Protein lunapark	Lnp	A2ASL8	0,0495	0,60
NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	Nnt	Q61941	0,0004	0,58
Hexokinase-2	Hk2	O08528	1,87E-05	0,58
Interferon-induced transmembrane protein 3	Ifitm3	Q9CQW9	0,0139	0,58
Aquaporin-5	Aqp5	Q9WTY4	2,69E-05	0,58
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	Cox4i1	P19783	0,0005	0,58
Cytochrome c oxidase subunit 6C	Cox6c	Q9CPQ1	0,0030	0,57
Cytochrome b-c1 complex subunit 8	Uqcrc	Q9CQ69	0,0102	0,57
Up-regulated during skeletal muscle growth protein 5	Usmg5	Q78IK2	0,0013	0,57
Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	Galnt2	Q6PB93	0,0099	0,57
Ankycorbin	Rai14	Q9EP71	9,84E-06	0,56
Membrane-associated progesterone receptor component 2	Pgrmc2	Q80UU9	0,0095	0,56
Aspartate aminotransferase, mitochondrial	Got2	P05202	4,99E-05	0,56
Integrin beta	Itgb5	Q6PE70	0,0042	0,56
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial	Ndufb8	Q9D6J5	0,0127	0,56
Nucleolar complex protein 2 homolog	Noc2l	Q8BHX6	0,0401	0,55

Proteinname	Gencode	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Vdac2	Q60930	0,0008	0,55
Sideroflexin-3	Sfxn3	Q91V61	3,27E-07	0,55
Membrane-associated progesterone receptor component 1	Pgrmc1	O55022	0,0033	0,55
Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	M6pr	P24668	0,0007	0,55
Protein sel-1 homolog 1	Sel1l	J3QJX3	0,0143	0,54
Syntenin-1	Sdcbp	Q3TMX0	0,0048	0,54
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	Dld	O08749	1,75E-05	0,54
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	Ndufa12	A0A0R4J275	0,0016	0,53
Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	Aldh1l2	Q8K009	0,0002	0,53
Fatty acid desaturase 2	Fads2	Q9Z0R9	0,0051	0,53
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, mitochondrial	Clpp	O88696	0,0163	0,52
Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	Pecr	Q3UXD9	0,0006	0,52
ADP/ATP translocase 1	Slc25a4	P48962	0,0001	0,52
Amine oxidase [flavin-containing] A	Maoa	Q64133	0,0001	0,51
Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial	Bcat2	O35855	0,0020	0,51
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7	Ndufb7	Q9CR61	0,0215	0,51
Anoctamin-6	Ano6	Q6P9J9	0,0003	0,51
Laminin subunit alpha-5	Lama5	Q61001	0,0028	0,51
Dipeptidyl peptidase 2	Dpp7	Q9ET22	0,0083	0,51
DnaJ homolog subfamily A member 1	Dnaja1	P63037	0,0011	0,51
Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	Slc25a1	Q8JZU2	0,0016	0,51
ER membrane protein complex subunit 3	Emc3	Q99KI3	0,0095	0,51
Beta-2-syntrophin	Sntb2	Q61235	0,0270	0,50
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	Hspg2	E9PZ16	0,0015	0,50
Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial	Acot2	Q9QYR9	0,0199	0,50
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	Atp1b1	P14094	0,0053	0,50
Flotillin-2	Flot2	Q60634	0,0014	0,50
10 kDa heat shock protein, mitochondrial	Hspe1	Q64433	0,0526	0,50
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	Atp1b3	P97370	0,0007	0,49
Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1	Ergic1	Q9DC16	0,0001	0,49
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	Glud1	P26443	0,0034	0,49
CD82 antigen	Cd82	P40237	0,0013	0,49
Transferrin receptor protein 1	Tfre	Q62351	0,0001	0,49
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Vdac1	Q60932	0,0061	0,49
Cytochrome b5 type B	Cyb5b	Q9CQX2	0,0005	0,49
Signal peptidase complex subunit 2	Spcc2	Q9CYN2	0,0072	0,49
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Atp5a1	Q03265	0,0000	0,49
Integrin alpha-3	Itga3	Q62470	0,0170	0,49
Transmembrane 9 superfamily member 3	Tm9sf3	Q9ET30	0,0038	0,48
Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial	Pdhx	Q8BKZ9	0,0002	0,48
Integrin alpha-V	Itgav	P43406	0,0002	0,48
Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	Cox5b	Q9D881	0,0113	0,48
Dystroglycan	Dag1	Q62165	0,0095	0,48
NADH-cytochrome b5 reductase 3	Cyb5r3	Q9DCN2	0,0104	0,48
Prohibitin-2	Phb2	O35129	0,0016	0,48
Transmembrane emp24 domain-containing protein 9	Tmed9	Q99KF1	0,0061	0,48
Solute carrier family 12 member 4	Slc12a4	F8WUJ0	0,0013	0,48
Transmembrane protein 33	Tmem33	A0A0R4J1Z3	0,0142	0,48
Integrin beta-1	Itgb1	P09055	0,0008	0,48
Serine hydroxymethyltransferase	Shmt2	Q9CZN7	0,0001	0,48
Basigin	Bsg	J3QP71	0,0010	0,48
Transmembrane protein 11, mitochondrial	Tmem11	Q8BK08	0,0190	0,47
RNA-binding protein 14	Rbm14	Q8C2Q3	2,74E-06	0,47
Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	Acox1	Q9R0H0	0,0177	0,47
Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	Tomm40	Q9QYA2	0,0012	0,47
Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	Etfdh	Q6PF96	4,31E-05	0,47
Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha	Pmpca	Q9DC61	0,0051	0,47
Transmembrane emp24 domain-containing protein 3	Tmed3	Q78IS1	0,0050	0,47
Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1	Cacna2d1	O08532	0,0047	0,46

Proteinname	Genname	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
Phosphate carrier protein, mitochondrial	Slc25a3	Q8VEM8	0,0001	0,46
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	Atp1a1	Q8VDN2	0,0006	0,46
3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	Acaa2	Q8BWT1	0,0026	0,46
Acyl-coenzyme A thioesterase 13	Acot13	Q9CQR4	0,0335	0,46
Golgi integral membrane protein 4	Golim4	D3YVW2	0,0210	0,46
Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	Mogs	Q80UM7	0,0003	0,46
Transmembrane 9 superfamily member 4	Tm9sf4	Q8BH24	0,0005	0,46
Golgin subfamily A member 5	Golga5	Q9QYE6	0,0053	0,46
DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial	Dnaja3	Q99M87	0,0000	0,46
Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	Lamp2	P17047	0,0012	0,45
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	Rpn1	Q91YQ5	0,0015	0,45
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Uqcrc2	Q9DB77	0,0005	0,45
Reticulon-3	Rtn3	Q9ES97	0,0023	0,45
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B	Stt3b	A0A0R4J0D3	0,0305	0,45
Malate dehydrogenase, mitochondrial	Mdh2	P08249	0,0019	0,45
Protein disulfide-isomerase A5	Pdia5	Q921X9	0,0187	0,44
Erythrocyte band 7 integral membrane protein	Stom	P54116	0,0001	0,44
Collagen alpha-1(XVIII) chain	Col18a1	E9QPX1	0,0034	0,44
Prosaposin	Psap	E9PZ00	0,0002	0,44
ATP synthase subunit gamma	Atp5c1	Q8C2Q8	0,0042	0,44
Sorting and assembly machinery component 50 homolog	Samm50	Q8BGH2	0,0152	0,44
Myoferlin	Myof	Q69ZN7	0,0015	0,44
Renin receptor	Atp6ap2	Q9CYN9	0,0158	0,44
Transmembrane p24-trafficking protein 7	Tmed7	E9Q7G1	0,0052	0,43
Protein S100-A10	S100a10	P08207	0,0397	0,43
V-type proton ATPase subunit d 1	Atp6v0d1	P51863	0,0015	0,43
Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	Hsd17b4	P51660	0,0018	0,43
Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial	Eci2	Q3TCD4	0,0188	0,43
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	Ndufb4	Q9CQC7	0,0004	0,43
Argininosuccinate synthase	Ass1	P16460	0,0004	0,43
Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial	Pgam5	Q8BX10	0,0004	0,43
MICOS complex subunit Mic60	Immt	Q8CAQ8	0,0001	0,43
28S ribosomal protein S24, mitochondrial	Mrps24	Q9CQV5	0,0220	0,42
ADP/ATP translocase 2	Slc25a5	P51881	0,0004	0,42
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Uqcrc1	Q9CZ13	0,0013	0,42
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Atp5b	P56480	0,0012	0,41
V-type proton ATPase subunit a	Atp6v0a1	K3W4T3	0,0032	0,41
Lon protease homolog, mitochondrial	Lonp1	Q8CGK3	0,0002	0,41
Prostaglandin G/H synthase 1	Ptgs1	P22437	0,0003	0,41
Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11	Sec11a	D3YWT0	0,0204	0,41
Lon protease homolog 2, peroxisomal	Lonp2	Q9DBN5	0,0033	0,41
Cytoskeleton-associated protein 4	Ckap4	Q8BMK4	0,0002	0,41
Choline transporter-like protein 2	Slc44a2	Q8BY89	0,0001	0,41
Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	Pccb	Q99MN9	1,41E-05	0,40
Plasminogen receptor (KT)	Plgrkt	Q9D3P8	0,0071	0,40
Phosphatidylinositol phosphatase SAC1	Sacm11	Q9EP69	0,0134	0,40
LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1, mitochondrial	Letm1	Q9Z210	0,0040	0,40
Transmembrane protein 65	Tmem65	Q4VAE3	0,0038	0,40
VPS10 domain-containing receptor SorCS2	Sorcs2	Q9EPR5	0,0002	0,40
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP11	Fkbp11	Q9D1M7	0,0166	0,40
Protein NDRG1	Ndrg1	Q62433	0,0283	0,40
Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	Tmed10	Q9D1D4	0,0060	0,40
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	Aldh18a1	Q9Z110	0,0011	0,40
Mitochondrial carrier homolog 2	Mtch2	Q791V5	0,0029	0,40
Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, mitochondrial	Pnpt1	Q8K1R3	0,0019	0,39
Ornithine aminotransferase, mitochondrial	Oat	P29758	5,44E-06	0,39
Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	Hsd17b12	O70503	0,0034	0,39
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	Rps27a	P62983	0,0002	0,39
Glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Gcdh	A0A0A0MQ68	0,0203	0,39

Proteinname	Genname	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
Dehydrogenase/reductase SDR family member 7B	Dhrs7b	Z4YKT6	0,0309	0,39
Presequence protease, mitochondrial	Pitrm1	Q8K411	0,0032	0,39
Alkyldihydroxyacetonephosphate synthase, peroxisomal	Agps	A2AL50	0,0003	0,39
Nidogen-2	Nid2	O88322	0,0007	0,39
2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	Ogdh	Q60597	0,0040	0,39
Protein disulfide-isomerase TMX3	Tmx3	Q8BXZ1	4,84E-05	0,39
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	Dlst	Q9D2G2	0,0009	0,39
Serine/arginine-rich splicing factor 6	Srsf6	Q3TWW8	0,0088	0,38
Caldesmon 1	Cald1	E9QA16	0,0049	0,38
Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	Slc25a11	Q9CR62	0,0027	0,38
Mitochondrial glutamate carrier 1	Slc25a22	Q9D6M3	0,0181	0,38
Heat shock 70 kDa protein 1A	Hspa1a	Q61696	0,0090	0,38
Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3, mitochondrial	Ptc3	Q14C51	0,0078	0,38
Endoplasmic reticulum chaperone protein	Hsp90b1	P08113	0,0007	0,38
Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	Trap1	Q9CQN1	0,0004	0,38
Dephospho-CoA kinase domain-containing protein	Dcald	Q8BHC4	0,0030	0,37
Stress-70 protein, mitochondrial	Hspa9	P38647	0,0001	0,37
Ras-related protein R-Ras2	Rras2	P62071	0,0112	0,37
Nucleolar protein 56	Nop56	Q9D6Z1	0,0004	0,37
Tetraspanin	Tspan6	H3BL26	0,0036	0,37
DnaJ homolog subfamily A member 2	Dnaja2	Q9QYJ0	0,0007	0,37
ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	Atp5f1	Q9CQ7	0,0010	0,37
Ras-related protein Rab-35	Rab35	Q6PHN9	0,0032	0,36
Cytochrome c oxidase subunit 7A-related protein, mitochondrial	Cox7a2l	E9PZS8	0,0106	0,36
1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase delta	Agpat4	Q8K4X7	0,0115	0,36
Casein kinase II subunit beta	Csnk2b	P67871	0,0235	0,36
Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 1	Fmo1	P50285	0,0063	0,36
RuvB-like 2	Ruvbl2	Q9WTM5	0,0003	0,36
AFG3-like protein 2	Afg3l2	Q8JZQ2	0,0081	0,36
Alpha-1,3/1,6-mannosyltransferase ALG2	Alg2	Q9DBE8	0,0038	0,36
Biglycan	Bgn	P28653	0,0105	0,35
3-ketoacyl-CoA thiolase A, peroxisomal	Acaa1a	Q921H8	0,0128	0,35
Transmembrane protein 43	Tmem43	Q9DBS1	2,36E-05	0,35
WD repeat domain 36	Wdr36	Q3TA68	0,0122	0,35
28S ribosomal protein S23, mitochondrial	Mrps23	Q3TI14	0,0235	0,35
Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	Sod2	P09671	0,0179	0,35
Prostaglandin F2 receptor negative regulator	Ptgfrn	Q9WV91	0,0052	0,35
Vimentin	Vim	P20152	0,0088	0,35
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	Idh3a	Q9D6R2	0,0092	0,35
Zinc finger protein-like 1	Zfp1	Q9DB43	0,0152	0,35
Calcium uniporter protein, mitochondrial	Mcu	Q3UMR5	0,0200	0,35
Plexin-B2	Plxnb2	B2RXS4	0,0002	0,35
Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Acadl	P51174	0,0012	0,34
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	Pdha1	P35486	0,0086	0,34
Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	Gls	D3Z7P3	0,0002	0,34
Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein	Slc25a20	Q9Z2Z6	0,0050	0,34
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	Lrp1	A0A0R4J019	0,0018	0,34
Signal recognition particle receptor subunit beta	Gm20425	E9Q035	0,0191	0,34
GPI transamidase component PIG-T	Pigt	Q8BXQ2	0,0098	0,34
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	Ndufa6	Q9CQZ5	0,0214	0,34
Y-box-binding protein 3	Ybx3	Q9JKB3	0,0150	0,34
Prolactin regulatory element-binding protein	Preb	Q9WUQ2	0,0026	0,34
Laminin subunit beta-1	Lamb1	E9QN70	0,0096	0,34
Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	Suclg2	Q9Z2I8	0,0134	0,34
Very-long-chain enoyl-CoA reductase	Tecr	Q9CY27	0,0035	0,34
DBIRD complex subunit ZNF326	Znf326	A0A0R4J098	0,0054	0,33
Prelamin-A/C	Lmna	P48678	1,34E-05	0,33
Serine protease 23	Prss23	Q9D6X6	0,0153	0,33
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	Atp2b1	G5E829	0,0034	0,33

Proteinname	Genname	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
Inactive hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 1	Hsd1l	Q8BTX9	0,0141	0,33
AP-2 complex subunit mu	Ap2m1	Q3TWW4	0,0155	0,33
Lanosterol 14-alpha demethylase	Cyp51a1	Q8K0C4	0,0039	0,33
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	P4ha2	Q5SX75	0,0023	0,32
Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit	Rab3gap2	A0A0A6YWM5	0,0102	0,32
Probable Xaa-Pro aminopeptidase 3	Xpnpep3	B7ZMP1	0,0088	0,32
ATPase family AAA domain-containing protein 3	Atad3	Q925I1	0,0001	0,32
5-nucleotidase domain-containing protein 3	Nt5dc3	Q3UHB1	0,0056	0,31
Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	Hgs	B1ATZ0	0,0088	0,31
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	Slc25a12	Q8BH59	0,0003	0,31
Mitochondrial import receptor subunit TOM70	Tomm70a	Q9CZW5	0,0009	0,31
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	Mccc2	Q3ULD5	0,0124	0,31
Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Ivd	Q9JHI5	0,0003	0,30
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	Hnrmpm	Q9D0E1	0,0084	0,30
RNA binding protein fox-1 homolog 2	Rbfox2	Q8BP71	0,0120	0,29
NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial	Me2	Q99KE1	0,0025	0,29
Beta-1-syntrophin	Sntb1	Q99L88	0,0023	0,29
Golgi apparatus protein 1	Glg1	F8WHM5	0,0010	0,28
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	Ddost	O54734	0,0022	0,28
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Sdha	Q8K2B3	0,0009	0,28
Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Acadm	P45952	0,0040	0,28
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	Gnb1	P62874	0,0034	0,28
Prolyl 3-hydroxylase 1	P3h1	A6PW84	0,0067	0,27
NADPH--cytochrome P450 reductase	Por	P37040	0,0015	0,27
Glucosylceramidase	Gba	P17439	0,0044	0,27
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	Ddx17	Q3U741	0,0010	0,27
Actin, cytoplasmic 2	Actg1	P63260	0,0004	0,27
Acyl-CoA dehydrogenase family member 9, mitochondrial	Acad9	Q8JZN5	0,0044	0,26
Flotillin-1	Flot1	O08917	0,0016	0,26
Alpha-soluble NSF attachment protein	Napa	Q9DB05	0,0030	0,26
Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Acadv1	P50544	0,0001	0,26
Dihydroorotate dehydrogenase (quinone), mitochondrial	Dhodh	O35435	0,0022	0,26
Myosin-7	Myh7	Q91Z83	0,0015	0,26
RuvB-like 1	Ruvb1l	P60122	0,0007	0,24
La-related protein 4	Larp4	E9Q066	0,0009	0,24
Extended synaptotagmin-1	Esyt1	Q3U7R1	0,0005	0,21
Lamin-B2	Lmnb2	P21619	0,0002	0,20
Histone H2B type 1-C/E/G	Hist1h2bc	Q6ZWY9	0,0007	-0,22
Coatomer subunit alpha	Copa	F8WHL2	0,0019	-0,24
Coatomer subunit beta	Copb1	Q9JIF7	0,0018	-0,24
Heat shock 70 kDa protein 4L	Hspa4l	P48722	0,0018	-0,24
Coatomer subunit beta	Copb2	O55029	0,0018	-0,25
Poly(rC)-binding protein 1	Pcbp1	P60335	0,0051	-0,26
Coronin-1B	Coro1b	Q9WUM3	0,0040	-0,26
Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	Eprs	Q8CGC7	0,0006	-0,26
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Phgdh	Q61753	0,0054	-0,26
PRA1 family protein 3	Arl6ip5	Q8R5J9	0,0038	-0,27
ATP-dependent 6-phosphofructokinase	Pfkip	Q8C605	0,0091	-0,29
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	Uba1	Q02053	0,0022	-0,29
SEC24 related gene family, member C (S. cerevisiae), isoform CRA_a	Sec24c	G3X972	0,0065	-0,29
Catenin alpha-1	Cttna1	P26231	0,0005	-0,29
Cell division control protein 42 homolog	Cdc42	P60766	0,0047	-0,29
DNA damage-binding protein 1	Ddb1	Q3U1J4	0,0074	-0,29
Splicing factor 1	Sfl	E9Q4Q2	0,0028	-0,29
Ankyrin repeat domain-containing protein 2	Ankrd2	Q9WV06	0,0078	-0,29
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	Psm4	O35226	0,0016	-0,29
Valine--tRNA ligase	Vars	Q9Z1Q9	0,0058	-0,30
Microtubule-actin cross-linking factor 1	Macf1	B1ARU4	0,0023	-0,30

Proteinname	Genname	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
Septin-11	Sept11	A0A0J9YTY0	0,0022	-0,30
Rho guanine nucleotide exchange factor 2	Arhgef2	H3BJU7	0,0032	-0,30
Alpha-centractin	Actr1a	P61164	0,0088	-0,31
Proliferation-associated protein 2G4	Pa2g4	P50580	0,0015	-0,31
Protein QIL1	Qil1	Q8R404	0,0061	-0,31
Nuclear migration protein nudC	Nudc	O35685	0,0047	-0,31
60S ribosomal protein L3	Rpl3	P27659	0,0109	-0,31
T-complex protein 1 subunit epsilon	Cct5	P80316	0,0004	-0,31
Eukaryotic translation initiation factor 2A	Eif2a	Q8BJW6	0,0158	-0,31
Microtubule-associated protein 1B	Map1b	P14873	0,0001	-0,32
CLIP-associating protein 1	Clasp1	J3QP81	0,0118	-0,33
Tubulin alpha-1B chain	Tuba1b	P05213	0,0013	-0,33
Importin-5	Ipo5	Q8BKC5	0,0090	-0,33
Alpha-actinin-3	Actn3	O88990	0,0020	-0,33
Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit	Rpa1	Q5SWN2	0,0001	-0,33
WASH complex subunit strumpellin	Kiaa0196	Q8C2E7	0,0058	-0,33
Puromycin-sensitive aminopeptidase	Npepps	Q11011	4,02E-05	-0,33
N-acetyltransferase 10	Nat10	Q8K224	0,0094	-0,33
Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	Luc7l2	Q7TNC4	0,0016	-0,33
Protein transport protein Sec23B	Sec23b	Q9D662	0,0049	-0,33
Spermatogenesis-associated protein 5	Spata5	A0A0G2JFY0	0,0019	-0,34
Microtubule-associated protein	Map4	A0A0G2JFH2	0,0085	-0,34
Calpain-1 catalytic subunit	Capn1	O35350	0,0017	-0,34
Alpha-enolase	Eno1	P17182	2,91E-05	-0,35
39S ribosomal protein L44, mitochondrial	Mrpl44	Q9CY73	0,0120	-0,35
Ezrin	Ezr	P26040	0,0008	-0,35
40S ribosomal protein S2	Rps2	P25444	0,0230	-0,35
Cytoskeleton-associated protein 5	Ckap5	Z4YL78	0,0238	-0,35
Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta	Mat2b	Q99LB6	0,0178	-0,35
PDZ and LIM domain protein 2	Pdlim2	Q8R1G6	0,0010	-0,35
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	Usp9x	Q4FE56	0,0069	-0,36
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial	Aldh4a1	Q8CHT0	0,0213	-0,36
T-complex protein 1 subunit beta	Cct2	P80314	0,0009	-0,36
Coatamer subunit epsilon	Cope	O89079	0,0080	-0,36
Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog	Sugt1	Q9CX34	0,0191	-0,36
Elongation factor 1-delta	Eef1d	E9QN08	0,0206	-0,36
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	Usp5	Q3U4W8	0,0037	-0,36
Septin-2	Sept2	P42208	0,0160	-0,36
Isoleucine-tRNA ligase, cytoplasmic	Iars	Q8BU30	0,0013	-0,37
Protein TBRG4	Tbrg4	Q91YM4	0,0021	-0,37
1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3	Plcb3	P51432	0,0009	-0,37
Developmentally-regulated GTP-binding protein 1	Drg1	P32233	0,0028	-0,37
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	Usp4	A0A0A6YW28	0,0251	-0,37
Dynein light chain Tctex-type 1	Dynlt1	P51807	0,0050	-0,37
Signal recognition particle subunit SRP72	Srp72	F8VQC1	0,0014	-0,37
Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	Dync1li1	Q8R1Q8	0,0009	-0,37
Proteasome subunit beta type-3	Psmb3	Q9R1P1	0,0173	-0,37
Microtubule-associated protein 1S	Map1s	Q8C052	0,0012	-0,38
Proteasome subunit alpha type-2	Psma2	P49722	0,0310	-0,38
UPF0160 protein MYG1, mitochondrial	Myg1	Q9JK81	0,0258	-0,38
Septin-7	Sept7	E9Q9F5	1,12E-05	-0,38
Transaldolase	Taldo1	A0A1B0GR11	0,0138	-0,38
26S protease regulatory subunit 8	Psmc5	P62196	0,0282	-0,38
Troponin T, slow skeletal muscle	Tnnt1	E9Q688	0,0196	-0,39
Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B	Pds5b	F8WHU5	0,0210	-0,39
Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	Atic	Q9CWJ9	2,72E-06	-0,39
Calponin-2	Cnn2	Q08093	0,0015	-0,39
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	Chd4	E9QAS4	0,0008	-0,39
Kelch-like protein 41	Klhl41	A2AUC9	0,0075	-0,39
Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	Gart	Q64737	0,0137	-0,39
Methionine aminopeptidase 1	Metap1	Q8BP48	0,0053	-0,39

Proteinname	Genname	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	Mtnd5	P03921	0,0339	-0,39
DNA replication licensing factor MCM6	Mcm6	P97311	0,0243	-0,39
Nuclear RNA export factor 1	Nxf1	Q99JX7	0,0034	-0,39
Heat shock protein HSP 90-alpha	Hsp90aa1	P07901	0,0008	-0,39
Protein flightless-1 homolog	Flii	Q9JJ28	0,0194	-0,39
Kinectin	Ktn1	A0A087WQQ5	0,0036	-0,40
Adenylosuccinate lyase	Adsl	P54822	0,0089	-0,40
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2	Ube2d2	A0A0G2JE32	0,0249	-0,40
E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	Ubr4	A2AN08	0,0091	-0,40
Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3	Sart3	Q9JL18	0,0112	-0,40
14-3-3 protein beta/alpha	Ywhab	Q9CQV8	0,0345	-0,40
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	Eif2s2	Q99L45	0,0002	-0,40
Inorganic pyrophosphatase	Ppa1	Q9D819	0,0000	-0,40
Coatomer subunit delta	Arcn1	Q5XJY5	0,0276	-0,40
Acetyl-CoA carboxylase 1	Acaca	Q5SWU9	0,0034	-0,41
HEAT repeat-containing protein 3	Heatr3	Q8BQM4	0,0226	-0,41
Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	Etf1	Q8BWY3	0,0002	-0,41
Zinc finger CCCH domain-containing protein 15	Zc3h15	Q3TIV5	0,0023	-0,41
Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1	Aimp1	Q3UZG4	0,0001	-0,41
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Vcp	Q01853	0,0003	-0,41
Elongation factor 2	Eef2	P58252	0,0009	-0,41
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	Iqgap1	Q9JKF1	0,0004	-0,41
Protein transport protein Sec31A	Sec31a	Q3UPL0	0,0011	-0,41
Phosphoribosylformylglycinamide synthase	Pfas	Q5SUR0	0,0087	-0,41
Ribosome-binding protein 1	Rrbp1	A2AVJ7	0,0036	-0,41
Glutamine--tRNA ligase	Qars	Q8BML9	0,0003	-0,41
Protein unc-45 homolog B	Unc45b	Q8CGY6	0,0010	-0,42
Tyrosine--tRNA ligase	Yars	A2A7S7	0,0217	-0,42
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	Hnmpab	Q80XR6	0,0241	-0,42
Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	Got1	P05201	0,0017	-0,42
Palladin	Palld	Q9ET54	0,0198	-0,42
Serpin H1	Serpinh1	P19324	0,0009	-0,42
Prolyl endopeptidase	Prep	Q9QUR6	0,0001	-0,42
Heat shock 70 kDa protein 4	Hspa4	Q3U2G2	0,0001	-0,42
Transgelin	Tagln	P37804	0,0014	-0,42
Target of Myb protein 1	Tom1	Q3UDC3	0,0089	-0,43
Aspartyl aminopeptidase	Dnpep	Q3TVK3	0,0008	-0,43
PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2	Gigyf2	G3UYG6	0,0240	-0,43
Triosephosphate isomerase	Tpi1	P17751	0,0059	-0,43
Nucleophosmin	Npm1	Q5SQB0	0,0065	-0,43
Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	Arpc3	H7BWZ3	0,0249	-0,43
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	Nudt21	Q9CQF3	0,0336	-0,43
Annexin A5	Anxa5	P48036	0,0012	-0,43
Pyruvate kinase PKM	Pkm	P52480	7,87E-06	-0,43
Nucleosome assembly protein 1-like 1	Nap1l1	P28656	3,07E-05	-0,43
Stress-induced-phosphoprotein 1	Stip1	Q60864	0,0031	-0,43
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	Usp14	E9PYI8	0,0031	-0,44
Protein arginine N-methyltransferase 1	Prmt1	A0A171KXD3	0,0048	-0,44
Protein deglycase DJ-1	Park7	Q99LX0	0,0075	-0,44
Thimet oligopeptidase	Thop1	A0A0R4IZY0	0,0007	-0,44
Tubulin alpha-1A chain	Tuba1a	P68369	0,0100	-0,44
Creatine kinase M-type	Ckm	P07310	0,0172	-0,44
Vacuolar protein sorting-associated protein 29	Vps29	D3Z645	0,0186	-0,44
14-3-3 protein theta	Ywhaq	P68254	0,0008	-0,44
Alpha-actinin-2	Actn2	Q9JI91	0,0033	-0,44
Lysine--tRNA ligase	Kars	Q99MN1	0,0001	-0,44
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	Snrpd1	P62315	0,0247	-0,45
RNA-binding protein Musashi homolog 2	Msi2	Q920Q6	0,0235	-0,45
Chromobox protein homolog 1	Cbx1	P83917	0,0420	-0,45
Signal recognition particle subunit SRP68	Srp68	Q8BMA6	0,0068	-0,45

Proteinname	Genname	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
Protein CDV3	Cdv3	A0A087WNP6	0,0019	-0,45
Chromobox protein homolog 3	Cbx3	Q9DCC5	0,0059	-0,45
COP9 signalosome complex subunit 7a	Cops7a	Q9CZ04	0,0297	-0,45
E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	Huwe1	A2AFQ0	0,0131	-0,45
Septin-9	40057	A2A6U3	7,29E-06	-0,45
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	Fkbp2	P45878	0,0105	-0,45
Golgi-specific brefeldin A-resistance factor 1	Gbf1	Q6DFZ1	0,0018	-0,45
60S ribosomal protein L27a	Rpl27a	P14115	0,0208	-0,45
Adenylyl cyclase-associated protein 1	Cap1	P40124	0,0003	-0,45
NudC domain-containing protein 1	Nudcd1	Q6PIP5	0,0358	-0,46
14-3-3 protein eta	Ywhah	P68510	0,0094	-0,46
Small nuclear ribonucleoprotein E	Snrpe	P62305	0,0303	-0,46
AP-1 complex subunit gamma-1	Ap1g1	Q8CBB7	0,0173	-0,46
Inositol-3-phosphate synthase 1	Isynal	Q9JHU9	0,0239	-0,46
Histone deacetylase complex subunit SAP18	Gm10094	E9Q317	0,0278	-0,46
N-alpha-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit	Naa15	A0A0A6YW80	0,0379	-0,46
Proteasome subunit alpha type-7	Psma7	Q9Z2U0	0,0065	-0,46
Tubulin alpha-4A chain	Tuba4a	A0A0A0MQA5	0,0258	-0,47
Structural maintenance of chromosomes protein 2	Smc2	Q8CG48	0,0063	-0,47
Ras-related GTP-binding protein A	Rraga	Q80X95	0,0040	-0,47
Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	Sepep1	Q920A5	0,0166	-0,47
RNA 3-terminal phosphate cyclase	RtcA	Q9D7H3	0,0091	-0,47
Ribonuclease inhibitor	Rnh1	Q91VI7	0,0002	-0,47
Histone H4	Hist1h4a	P62806	0,0019	-0,47
Proteasome subunit alpha type-5	Psma5	Q9Z2U1	0,0041	-0,48
Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	Aars	Q8BGQ7	0,0009	-0,48
60S ribosomal protein L38	Rpl38	Q9JJI8	0,0427	-0,48
Proteasome subunit alpha type-4	Psma4	Q9R1P0	0,0039	-0,48
Riboflavin kinase	Rfk	Q8CFV9	0,0352	-0,48
Fragile X mental retardation protein 1 homolog	Fmr1	E9QAS9	0,0031	-0,48
Importin subunit beta-1	Kpnb1	P70168	0,0003	-0,48
Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	Tars	Q9D0R2	0,0002	-0,48
Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2	Bzw2	Q91VK1	0,0146	-0,48
Dipeptidyl peptidase 3	Dpp3	Q99KK7	0,0000	-0,48
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Arhgdia	Q99PT1	0,0047	-0,48
60S ribosomal protein L5	Rpl5	P47962	0,0014	-0,48
Transcription elongation factor B polypeptide 1	Tceb1	A0A087WQE6	0,0028	-0,48
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	Hnrnp1l	Q921F4	0,0061	-0,48
Proteasome subunit beta type-7	Psbm7	P70195	0,0093	-0,48
Dynactin subunit 2	Dctn2	Q99KJ8	0,0009	-0,49
Cysteine-rich protein 1	Crip1	A0A0G2JEK2	0,0008	-0,49
Plastin-3	Pls3	B1AX58	8,36E-06	-0,49
Non-specific serine/threonine protein kinase	Pak1	G5E884	0,0033	-0,49
Transportin-1	Tnpo1	Q8BFY9	0,0004	-0,49
Nuclear cap-binding protein subunit 1	Ncbp1	Q3UYV9	0,0068	-0,49
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	Eif3e	P60229	0,0036	-0,49
Fumarylacetoacetase	Fah	P35505	0,0206	-0,49
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Hnrmpk	P61979	0,0280	-0,49
Myeloid-derived growth factor	Mydgf	Q9CPT4	0,0261	-0,49
ATP-binding cassette sub-family F member 1	Abcf1	Q6P542	0,0002	-0,49
Collagen, type VI, alpha 3	Col6a3	E9PWQ3	0,0022	-0,49
14-3-3 protein gamma	Ywhag	P61982	0,0008	-0,49
Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha	Sgta	Q8BJU0	0,0075	-0,49
Fermitin family homolog 2	Fermt2	Q8CIB5	0,0041	-0,49
Protein S100-A11	S100a11	P50543	0,0037	-0,50
MCG21756, isoform CRA b	Nup205	B9EJ54	0,0013	-0,50
EH domain-containing protein 2	Ehd2	Q8BH64	0,0003	-0,50
Serine-threonine kinase receptor-associated protein	Strap	Q9Z1Z2	0,0003	-0,50
PDZ and LIM domain protein 3	Pdlim3	O70209	0,0045	-0,50
Nucleoside diphosphate kinase	Gm20390	E9PZF0	0,0053	-0,50

Proteinname	Genname	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
Proteasome subunit beta type-4	Psmb4	P99026	0,0010	-0,50
Serpin B6	Serpinb6	Q60854	0,0011	-0,50
Hsc70-interacting protein	St13	F8WJK8	0,0085	-0,50
Collagen alpha-1(I) chain	Coll1a1	P11087	0,0038	-0,50
Proteasome-associated protein ECM29 homolog	Ecm29	Q6PDI5	0,0097	-0,50
Fatty acid synthase	Fasn	P19096	0,0002	-0,51
Leukotriene A-4 hydrolase	Lta4h	P24527	0,0007	-0,51
Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1	Pbxip1	Q3TVI8	0,0076	-0,51
Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	Cand1	Q6ZQ38	0,0060	-0,51
Hepatoma-derived growth factor	Hdgf	P51859	0,0013	-0,51
Coatomer subunit gamma-2	Copg2	Q9QXK3	0,0218	-0,51
Radixin	Rdx	P26043	0,0017	-0,51
Adenylate kinase isoenzyme 1	Ak1	Q9R0Y5	0,0095	-0,52
Glutaredoxin-3	Glrx3	A0A1B0GS58	0,0432	-0,52
Histidine--tRNA ligase, cytoplasmic	Hars	Q61035	0,0059	-0,52
LDLR chaperone MESD	Mesdc2	Q9ERE7	0,0310	-0,52
Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	Nmt1	O70310	0,0009	-0,52
Protein SET	Set	A2BE93	0,0132	-0,52
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	Usp7	F8VFX1	0,0107	-0,52
Coatomer subunit zeta-1	Copz1	P61924	0,0122	-0,52
COP9 signalosome complex subunit 2	Cops2	P61202	0,0002	-0,52
Glycogen phosphorylase, muscle form	Pygm	Q9WUB3	0,0003	-0,53
Vacuolar protein sorting-associated protein 35	Vps35	Q9EQH3	0,0001	-0,53
Phosphoglucomutase-1	Pgm1	Q9D0F9	0,0001	-0,53
COP9 signalosome complex subunit 4	Cops4	O88544	0,0002	-0,53
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	Ppic	P30412	0,0127	-0,53
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3	Fkbp3	Q62446	0,0077	-0,53
Glyoxalase domain-containing protein 4	Glod4	Q9CPV4	0,0241	-0,53
N-alpha-acetyltransferase 50	Naa50	Q6PGB6	0,0540	-0,53
Eukaryotic initiation factor 4A-II	Eif4a2	P10630	0,0028	-0,53
La-related protein 1	Larp1	Z4YJT3	0,0037	-0,53
Rho-related GTP-binding protein RhoC	Rhoc	Q62159	0,0132	-0,53
Importin subunit alpha-3	Kpna4	A0A0B4J1E7	0,0067	-0,54
NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit	Uba3	Q3TL72	0,0189	-0,54
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	Idh1	O88844	0,0001	-0,54
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit	Ppp2r5d	Q91V89	0,0023	-0,54
Amylo-1,6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase	Agl	F8VFN4	0,0116	-0,54
Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	Sars	Q8C483	4,88E-05	-0,54
Sarcalumenin	Srl	Q7TQ48	0,0086	-0,54
Phosphoserine aminotransferase	Psat1	Q99K85	0,0005	-0,54
Beta-enolase	Eno3	P21550	0,0011	-0,54
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J-A	Eif3j1	Q3UGC7	0,0124	-0,55
SUMO-activating enzyme subunit 1	Sae1	Q9RIT2	0,0007	-0,55
Phosphoglucomutase-like protein 5	Pgm5	Q8BZF8	0,0065	-0,55
Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	Arpc2	Q9CVB6	0,0014	-0,55
Copper transport protein ATOX1	Atox1	O08997	0,0554	-0,55
E3 ubiquitin-protein ligase Midline-1	Mid1	O70583	0,0051	-0,55
Histone H2A type 1-H	Hist1h2ah	A0A0N4SV66	0,0319	-0,55
Leukocyte elastase inhibitor A	Serpinb1a	Q9D154	0,0025	-0,56
Phospholipase A-2-activating protein	Plaa	P27612	0,0002	-0,56
Transcription elongation factor B polypeptide 2	Tceb2	P62869	0,0027	-0,56
NSFL1 cofactor p47	Nsfl1c	Q9CZ44	0,0002	-0,56
Exportin-1	Xpo1	Q6P5F9	0,0002	-0,56
Calponin-3	Cnn3	Q9DAW9	0,0000	-0,56
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	Ugp2	Q91ZJ5	0,0039	-0,56
Vacuolar protein sorting-associated protein 16 homolog	Vps16	G3X8X7	0,0055	-0,56
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB3	Polr2c	Q99M46	0,0078	-0,56
Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	Cyfp1	A0A0R4J119	0,0271	-0,56
Syntaxin-binding protein 3	Stxbp3	Q60770	0,0247	-0,56
Histone H1.2	Hist1h1c	P15864	0,0342	-0,56
PDZ and LIM domain protein 4	Pdlim4	P70271	0,0002	-0,57

Proteinname	Genname	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
Non-specific protein-tyrosine kinase	Src	Q80XU2	0,0165	-0,57
Dihydropyrimidinase-related protein 3	Dpysl3	E9PWE8	0,0000	-0,57
60S ribosomal protein L23a	Rpl23a	A0A140T8M7	0,0025	-0,57
EH domain-binding protein 1-like protei	Ehbp1l1	E9QP49	1,89E-05	-0,57
Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog	Ufd1l	P70362	0,0006	-0,57
DNA topoisomerase 2-alpha	Top2a	Q01320	0,0026	-0,57
14-3-3 protein zeta/delta	Ywhaz	P63101	3,70E-06	-0,57
Casein kinase I isoform alpha	Csnk1a1	H7BXB1	0,0004	-0,58
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3	Eif4g3	A2AMI7	0,0293	-0,58
40S ribosomal protein S25	Rps25	P62852	0,0066	-0,58
Elongator complex protein 3	Elp3	Q9CZX0	0,0158	-0,58
RNA transcription, translation and transport factor protein	RTRAF	Q9CQE8	0,0033	-0,58
Calcium uptake protein 1, mitochondrial	Micu1	Q8VCX5	0,0072	-0,58
Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	Dhx30	A0A0G2JGL8	0,0425	-0,58
Histone-binding protein RBBP7	Rbbp7	A2AFJ1	0,0008	-0,59
Cofilin-1	Cfl1	P18760	0,0022	-0,59
Cysteine-rich protein 2	Crip2	Q9DCT8	0,0008	-0,59
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	Ppp2r1a	Q76MZ3	0,0005	-0,59
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Ppia	P17742	0,0023	-0,59
Four and a half LIM domains protein 1	Fhl1	P97447	0,0007	-0,59
Alpha-parvin	Parva	Q9EPC1	0,0004	-0,59
Myotubularin-related protein 5	Sbf1	Q6ZPE2	0,0017	-0,59
Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2	Pacsin2	Q9WVE8	0,0000	-0,59
ADP-ribosylation factor-like protein 2	Arl2	Q9D0J4	0,0011	-0,60
60S ribosomal protein L36	Rpl36	Q6ZWZ4	0,0209	-0,60
Dihydropyrimidinase-related protein 2	Dpysl2	O08553	2,23E-05	-0,60
Methionine aminopeptidase 2	Metap2	Q3UI33	4,51E-05	-0,60
AP-3 complex subunit delta-1	Ap3d1	O54774	0,0227	-0,61
General transcription factor II-I	Gtf2i	G3UYD0	0,0030	-0,61
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 7	Cpsf7	Q8BTV2	0,0227	-0,61
Proteasome subunit beta type-1	Psmb1	O09061	0,0029	-0,61
Collagen alpha-1(III) chain	Col3a1	P08121	0,0004	-0,61
Importin subunit alpha-1	Kpna2	P52293	0,0003	-0,61
14-3-3 protein epsilon	Ywhae	P62259	0,0019	-0,62
cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	Prkar2a	A0A0A6YX73	0,0003	-0,62
39S ribosomal protein L10, mitochondrial	Mrpl10	Q3TBW2	0,0002	-0,62
Proliferating cell nuclear antigen	Pcna	P17918	0,0008	-0,62
eIF-2-alpha kinase activator GCN1	Gcn1l1	E9PVA8	0,0088	-0,62
Myc box-dependent-interacting protein 1	Bin1	Q6P1B9	3,23E-06	-0,62
Proteasome assembly chaperone 1	Psmg1	D3Z795	0,0310	-0,63
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	Naca	P70670	1,76E-05	-0,63
Tubulin gamma-1 chain	Tubg1	P83887	0,0330	-0,63
Galectin-1	Lgals1	P16045	0,0211	-0,63
Nuclear autoantigenic sperm protein	Nasp	B1AU76	0,0004	-0,64
Dclk1 protein	Dclk1	Q80VB6	0,0014	-0,64
Thioredoxin domain-containing protein 5	Txndc5	A0A0R4J1Y7	0,0033	-0,64
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	Ube2n	P61089	0,0106	-0,64
Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	Mapre1	Q61166	0,0000	-0,64
Vacuolar protein-sorting-associated protein 25	Vps25	Q9CQ80	0,0019	-0,64
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	Eif3k	Q9DBZ5	0,0016	-0,65
Protocadherin gamma C3	Pcdhgc3	Q91XX1	0,0235	-0,65
Unconventional myosin-Ie	Myo1e	E9Q634	0,0425	-0,65
Cohesin subunit SA-2	Stag2	A2AFF6	0,0545	-0,65
Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1	Bzw1	A0A087WQS2	0,0008	-0,66
Mitochondrial fission regulator 1-like	Mtfr1l	Q9CWE0	0,0715	-0,66
Coatomer subunit gamma-1	Copg1	Q9QZE5	0,0001	-0,66
Sepiapterin reductase	Spr	Q91XH5	0,0579	-0,66
CTP synthase 1	Ctps1	P70698	0,0001	-0,67
Protein MEMO1	Memo1	Q91VH6	0,0300	-0,67

Proteinname	Gencode	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
Tropomodulin-1	Tmod1	P49813	0,0027	-0,67
Destrin	Dstn	Q9R0P5	0,0009	-0,67
Malate dehydrogenase, cytoplasmic	Mdh1	P14152	0,0013	-0,68
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	Hprt1	P00493	0,0012	-0,68
Leucine-rich repeat-containing protein 47	Lrrc47	Q505F5	0,0024	-0,68
Myosin light polypeptide 6	Myl6	Q60605	0,0007	-0,68
Ras suppressor protein 1	Rsu1	Q9D031	0,0023	-0,68
CCR4-NOT transcription complex subunit 1	Cnot1	B7ZWL1	0,0070	-0,69
Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	Ppp2r4	P58389	0,0161	-0,69
Glutathione S-transferase Mu 5	Gstm5	E9PVM7	0,0158	-0,69
DNA topoisomerase 1	Top1	Q04750	0,0670	-0,70
Proteasome subunit beta type-2	Psmb2	Q9R1P3	0,0021	-0,70
Tropinin T, cardiac muscle	Tnnt2	K3W4R6	0,0075	-0,70
Coiled-coil domain-containing protein 134	Ccdc134	Q8C7V8	0,0138	-0,70
Thioredoxin	Txn	P10639	0,0050	-0,71
L-lactate dehydrogenase	Ldha	Q564E2	0,0000	-0,71
Glucose-6-phosphate isomerase	Gpi	P06745	0,0002	-0,71
Importin-7	Ipo7	Q9EPL8	0,0001	-0,71
WD repeat-containing protein 61	Wdr61	D6RDC7	0,0002	-0,71
Nucleoredoxin	Nxn	P97346	4,43E-05	-0,72
THO complex subunit 2	Thoc2	B1AZI6	0,0108	-0,72
Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	Idi1	G3XA48	0,0106	-0,73
Nischarin	Nisch	Q80TM9	0,0005	-0,73
Obg-like ATPase 1	Ola1	Q9CZ30	0,0000	-0,74
Cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic	Cars	Q9ER72	0,0053	-0,74
Eukaryotic translation initiation factor 4B	Eif4b	Q8BGD9	0,0053	-0,74
Serine/threonine-protein kinase OSR1	Oxsr1	Q6P9R2	0,0385	-0,75
Protein S100-A6	S100a6	P14069	0,0570	-0,75
GDP-fucose protein O-fucosyltransferase 2	Pofut2	Q8VHI3	0,0051	-0,75
Myotrophin	Mtpn	P62774	0,0449	-0,76
Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	Erap1	Q9EQH2	0,0485	-0,76
Trimeric intracellular cation channel type A	Tmem38a	Q3TMP8	0,0017	-0,76
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15	Usp15	Q8R5H1	0,0043	-0,76
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	Ppid	Q9CR16	0,0313	-0,76
Rab GDP dissociation inhibitor beta	Gdi2	Q61598	2,57E-06	-0,77
6-phosphogluconolactonase	Pgls	Q9CQ60	0,0061	-0,77
Apoptosis inhibitor 5	Api5	O35841	0,0030	-0,78
Polymerase delta-interacting protein 3	Poldip3	Q3UDD3	0,0896	-0,78
Dynactin subunit 4	Dctn4	Q8CBY8	0,0317	-0,78
Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	Mylpf	P97457	0,0174	-0,79
Exportin-5	Xpo5	Q924C1	0,0007	-0,79
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	Pafah1b2	Q61206	0,0256	-0,79
m7GpppX diphosphatase	Dcps	Q9DAR7	0,0002	-0,79
Proteasome activator complex subunit 1	Psmc1	G3UXZ5	0,0015	-0,81
Peroxiredoxin-2	Prdx2	Q61171	0,0001	-0,81
40S ribosomal protein S15	Rps15	P62843	0,0093	-0,81
Farnesyl pyrophosphate synthase	Fdps	Q920E5	5,43E-07	-0,82
Macrophage migration inhibitory factor	Mif	P34884	0,0044	-0,82
Protein S100-A4	S100a4	A0A0G2JGD2	0,0008	-0,82
Exportin-2	Cse1l	Q9ERK4	3,27E-05	-0,83
Creatine kinase B-type	Ckb	Q04447	2,15E-05	-0,83
Importin-9	Ipo9	E9QKZ2	0,0006	-0,84
WD repeat-containing protein 82	Wdr82	Q8BFQ4	0,0445	-0,84
Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	Acat2	Q8CAY6	0,0023	-0,84
Ribosomal L1 domain-containing protein 1	Rsl1d1	Q8BVY0	0,0590	-0,84
Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	Samhd1	E9PYG9	0,0027	-0,85
Tubulin-specific chaperone D	Tbcd	Q8BYA0	0,0940	-0,85
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	Eif5a	P63242	0,0004	-0,86
40S ribosomal protein S17	Rps17	P63276	0,0009	-0,86
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5	Uchl5	Q9WUP7	0,0596	-0,86
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	Anp32e	E9Q5H2	0,0030	-0,87

Proteinname	Genname	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
N-alpha-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit	Naa25	Q8BWZ3	0,0014	-0,87
Nucleosome assembly protein 1-like 4	Nap114	B7ZNL2	1,63E-05	-0,87
Lactoylglutathione lyase	Glo1	Q9CPU0	0,0008	-0,87
RIKEN cDNA 2410002F23 gene	2410002F23Rik	Q3TE80	0,0001	-0,88
Alcohol dehydrogenase class-3	Adh5	P28474	4,25E-05	-0,88
Cyclin-dependent kinase 4	Cdk4	E9Q9E4	0,0014	-0,89
Thioredoxin domain-containing protein 17	Txndc17	Q9CQM5	0,0033	-0,89
Histone-lysine N-methyltransferase Smyd1	Smyd1	P97443	0,0702	-0,89
Pleckstrin homology domain-containing family G member 5	Plekhhg5	A0A0A0MQC2	0,0913	-0,89
Ragulator complex protein LAMTOR2	Lamtor2	Q9JHS3	0,0390	-0,89
Glycogen phosphorylase, brain form	Pygb	Q8CI94	0,0004	-0,90
Importin subunit alpha-4	Kpna3	O35344	0,0208	-0,90
DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	Apex1	P28352	0,0003	-0,90
Collagen alpha-1(V) chain	Col5a1	O88207	0,0003	-0,90
Rab GDP dissociation inhibitor alpha	Gdi1	P50396	0,0008	-0,91
Histone-lysine N-methyltransferase setd3	Setd3	Q91WC0	0,0039	-0,91
Golgi phosphoprotein 3	Golph3	Q9CRA5	0,0006	-0,91
Cysteine and glycine-rich protein 1	Csrp1	P97315	3,37E-05	-0,91
Inositol monophosphatase 1	Impa1	Q924B0	0,0823	-0,91
Ran-binding protein 3	Ranbp3	Q9CT10	0,0102	-0,92
Sacsin	Sacs	E9QNY8	0,0526	-0,93
SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	Sh3bgrl	Q9JJU8	0,0187	-0,93
U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp31	Prpf31	Q8CCF0	0,0242	-0,95
Tripartite motif-containing protein 54	Trim54	E9QAT9	0,1013	-0,95
ATP-dependent RNA helicase DHX36	Dhx36	Q8VHK9	0,0754	-0,96
Cyclin-dependent kinase 9	Cdk9	Q99J95	0,0656	-0,97
Methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	Apip	Q9WVQ5	0,0156	-0,98
Nucleoplasmin-3	Npm3	Q9CPP0	0,0376	-1,00
D-dopachrome decarboxylase	Ddt	O35215	0,0063	-1,00
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	Pebp1	P70296	0,0062	-1,00
Replication protein A 32 kDa subunit	Rpa2	Q3TE40	0,0339	-1,01
Translation initiation factor eIF-2B subunit alpha	Eif2b1	Q99LC8	0,0230	-1,01
RAC-beta serine/threonine-protein kinase	Akt2	F8WHG5	0,0523	-1,02
Mimecan	Ogn	Q62000	0,0520	-1,02
Protein prune homolog 2	Prune2	Q52KR3	0,0628	-1,03
Transcription factor BTF3	Btf3	Q64152	0,0001	-1,03
Transgelin-2	Tagln2	Q9WVA4	2,63E-06	-1,04
Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	Fnta	Q61239	0,0228	-1,04
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	Ube2l3	P68037	0,0025	-1,04
Malic enzyme	Me1	Q3TQP6	1,72E-05	-1,04
60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein	Trove2	O08848	0,0764	-1,04
COP9 signalosome complex subunit 3	Cops3	O88543	0,0791	-1,05
Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase FTO	Fto	Q8BGW1	0,0022	-1,05
Translationally-controlled tumor protein	Tpt1	P63028	0,0026	-1,05
Quinone oxidoreductase	Cryz	A0A0A6YXR4	0,0630	-1,07
Diphosphomevalonate decarboxylase	Mvd	Q99JF5	0,0021	-1,07
Nardilysin	Nrd1	A6PWC3	0,0008	-1,08
Coatomer subunit zeta-2	Copz2	Q9JHH9	0,0145	-1,08
Catenin alpha-2	Ctnna2	E0CXB9	0,0186	-1,08
Cleavage stimulation factor subunit 1	Cstf1	Q99LC2	0,0151	-1,09
5-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1	Prkaa1	Q5EG47	0,0578	-1,10
Sec24-related gene family, member B	Sec24b	Q80ZX0	0,0008	-1,10
UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 2	Uggt2	E9Q4X2	0,0140	-1,10
Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	Pitpna	J3QQ30	0,1105	-1,10
Spermatogenesis-associated serine-rich protein 2	Spats2	Q8K1N4	0,0034	-1,11
RAP1, GTP-GDP dissociation stimulator 1	Rap1gds1	E9Q912	0,0126	-1,11
Adenylosuccinate synthetase isozyme 1	Adssl1	P28650	0,0004	-1,12
Importin subunit alpha-7	Kpna6	O35345	0,0727	-1,12
Porphobilinogen deaminase	Hmbs	P22907	0,0350	-1,12
Dynein light chain roadblock-type 1	Dynlrbl	P62627	0,0361	-1,13

Proteinname	Genname	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
Methyl-CpG-binding domain protein 3	Mbd3	D3YTR5	0,0125	-1,13
WASH complex subunit 7	Kiaa1033	Q3UMB9	0,0125	-1,13
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	Ppp1cc	P63087	0,0065	-1,14
60S acidic ribosomal protein P1	Rplp1	P47955	0,0006	-1,14
MCG5400	Myl12a	Q6ZWQ9	0,0011	-1,14
Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1B	Rprd1b	A0A0R4J195	0,0789	-1,15
Proteasome activator complex subunit 2	Psmc2	G3X9V0	2,16E-05	-1,15
60S acidic ribosomal protein P2	Rplp2	P99027	0,0026	-1,16
F-box/WD repeat-containing protein 8	Fbxw8	Q8BIA4	0,0096	-1,18
Splicing factor 3B subunit 4	Sf3b4	Q8QZY9	0,0096	-1,21
Protein Hook homolog 3	Hook3	Q8BUK6	0,0242	-1,22
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	Arpc5	Q9CPW4	0,0528	-1,23
Eukaryotic translation initiation factor 4E	Eif4e	P63073	0,0444	-1,23
Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon-1	Eef1e1	Q9D1M4	0,0334	-1,24
Fatty acid-binding protein, epidermal	Fabp5	Q05816	0,0321	-1,25
Bleomycin hydrolase	Blmh	Q8R016	0,0016	-1,26
UV excision repair protein RAD23 homolog B	Rad23b	P54728	0,0150	-1,26
Zinc finger RNA-binding protein	Zfr	O88532	0,0009	-1,29
Delta-aminolevulinic acid dehydratase	Alad	P10518	0,0172	-1,29
Caspase-3	Casp3	P70677	0,0023	-1,30
Acylamino-acid-releasing enzyme	Apeh	A0A0R4J107	0,0129	-1,31
Flap endonuclease 1	Fen1	Q91Z50	0,0004	-1,32
Histone H2A	Hist1h2al	F8WIX8	0,0013	-1,33
BUB3-interacting and GLEBS motif-containing protein ZNF207	Znf207	Q9JMD0	0,0423	-1,33
Low-density lipoprotein receptor-related protein 4	Lrp4	Q8VI56	0,0465	-1,33
Elongation factor 1-beta	Eef1b	O70251	0,0421	-1,36
Ribosomal protein S6 kinase alpha-3	Rps6ka3	B1AXN9	0,0032	-1,36
Citrate lyase subunit beta-like protein, mitochondrial	Clybl	Q8R4N0	0,0824	-1,37
Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	Manf	Q80ZP8	0,0589	-1,38
Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog	Vta1	Q9CR26	0,1056	-1,39
E3 ubiquitin-protein ligase ARIH1	Arih1	Q9Z1K5	0,0037	-1,40
Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	Adss	P46664	0,0175	-1,41
Thioredoxin domain-containing protein 12	Txndc12	Q9CQU0	0,0139	-1,42
Eukaryotic translation initiation factor 1	Eif1	P48024	0,0029	-1,45
Cystatin-B	Cstb	Q62426	0,0007	-1,46
Mitochondrial pyruvate carrier 1	Mpc1	P63030	0,0084	-1,48
60S ribosomal protein L35	Rpl35	Q6ZWV7	0,0762	-1,50
Eukaryotic translation initiation factor 4H	Eif4h	Q9WUK2	0,0005	-1,52
Ran-binding protein 10	Ranbp10	A0A0R4J0G4	0,0058	-1,52
COP9 signalosome complex subunit 8	Cops8	Q8VBV7	0,0356	-1,53
Adenosine kinase	Adk	P55264	0,0031	-1,53
Ran-specific GTPase-activating protein	Ranbp1	P34022	0,1046	-1,59
Argininosuccinate lyase	Asl	Q91YI0	0,0267	-1,61
Splicing factor 3A subunit 2	Sf3a2	G3UVU2	0,0057	-1,70
Prefoldin subunit 3	Vbp1	P61759	0,0008	-1,72
SUMO-conjugating enzyme UBC9	Ube2i	Q8CFZ0	0,0347	-1,72
NEDD8	Nedd8	P29595	0,0007	-1,73
Protein canopy homolog 2	Cnpy2	Q9QXT0	0,0016	-1,88
Growth factor receptor-bound protein 2	Grb2	B1AT92	7,80E-07	-1,90
C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4	Spag9	A0A0R4J196	0,0061	-1,91
Guanidinoacetate N-methyltransferase	Gamt	O35969	0,0017	-1,94
Choline-phosphate cytidylyltransferase A	Pcyt1a	P49586	7,57E-07	-1,94
MAP7 domain-containing protein 1	Map7d1	F6WF36	0,0009	-2,00
Inosine triphosphate pyrophosphatase	Itpa	Q9D892	0,0030	-2,01
Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	Acp1	Q9D358	0,0023	-2,53
Dynein light chain 1, cytoplasmic	Dynll1	P63168	1,56E-05	-3,13
Tubulin polymerization-promoting protein family member 3	Tppp3	Q9CRB6	0,0015	-3,39

Tabelle 22: Proteinliste der potentiell redox-sensitiven Proteine

Proteinname	Genname	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
Guanidinoacetate N-methyltransferase	Gamt	O35969	0,0191	3,55
E3 ubiquitin-protein ligase TRIM56	Trim56	Q80V11	0,0093	3,26
Anoctamin-10	Ano10	Q8BH79	0,0023	2,75
Sphingolipid delta(4)-desaturase DES1	Degs1	O09005	0,0740	2,44
7-dehydrocholesterol reductase	Dhcr7	O88455	0,0113	2,38
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2	Cisd2	Q9CQB5	0,0199	2,15
UV excision repair protein RAD23 homolog B	Rad23b	P54728	0,0781	1,99
Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase	Gnpat	P98192	0,0287	1,89
Troponin T, fast skeletal muscle	Tnnt3	Q9QZ47	5,32E-06	1,73
Synaptophysin-like protein 1	Sypl1	O09117	0,0576	1,64
Macrophage migration inhibitory factor	Mif	P34884	0,0001	1,60
Nucleoside diphosphate kinase B	Nme2	Q01768	0,0002	1,58
Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1	Chordc1	Q9D1P4	0,0002	1,58
14-3-3 protein theta	Ywhaq	P68254	0,0001	1,55
Mitochondrial pyruvate carrier 2	Mpc2	Q9D023	0,0055	1,53
Clathrin interactor 1	Clint1	Q99KN9	0,0002	1,51
Protein S100-A4	S100a4	P07091	0,0001	1,47
NEDD8	Nedd8	P29595	0,0199	1,38
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	Ube2l3	P68037	0,0037	1,36
Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	Acin1	Q9JIX8	0,0001	1,36
40S ribosomal protein S17	Rps17	P63276	3,42E-05	1,33
CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase	Cdipt	Q8VDP6	4,32E-05	1,25
Low-density lipoprotein receptor-related protein 4	Lrp4	Q8VI56	0,0006	1,19
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4	Mtnd4	P03911	0,0569	1,18
G-rich sequence factor 1	Grsf1	Q8C5Q4	0,0402	1,17
Exportin-5	Xpo5	Q924C1	0,0001	1,16
Integrator complex subunit 1	Ints1	Q6P4S8	0,0001	1,16
60S ribosomal protein L27a	Rpl27a	P14115	0,0004	1,13
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	Naca	P70670	0,0017	1,12
ER lumen protein-retaining receptor 2	Kdelr2	Q9CQM2	0,0063	1,10
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	Eif5a	P63242	4,67E-07	1,04
Proteasome activator complex subunit 2	Psme2	P97372	0,0003	1,03
Collagen alpha-1(V) chain	Col5a1	O88207	0,0522	0,99
Trimeric intracellular cation channel type A	Tmem38a	Q3TMP8	0,0014	0,99
Glutathione S-transferase Mu 5	Gstm5	P48774	0,0049	0,99
Nardilysin	Nrd1	Q8BHG1	1,76E-06	0,99
FAS-associated factor 1	Faf1	P54731	0,0002	0,98
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1	Cpsf1	Q9EPU4	3,31E-05	0,97
Cofilin-1	Cfl1	P18760	0,0007	0,97
Symplekin	Sympk	Q80X82	3,36E-05	0,93
Junctional sarcoplasmic reticulum protein 1	Jsrp1	Q3MI48	0,0176	0,93
Transgelin-2	Tagln2	Q9WVA4	0,0016	0,91
Exportin-1	Xpo1	Q6P5F9	0,0007	0,91
CCR4-NOT transcription complex subunit 1	Cnot1	Q6ZQ08	7,97E-06	0,90
Phosphatidate cytidyltransferase 2	Cds2	Q99L43	0,0018	0,90
Exportin-2	Cse11	Q9ERK4	4,19E-05	0,89
Maleylacetoacetate isomerase	Gstz1	Q9WVL0	1,00E-05	0,88
Replication factor C subunit 2	Rfc2	Q9WUK4	0,0048	0,87
Importin-7	Ipo7	Q9EPL8	0,0015	0,86
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	Ppid	Q9CR16	0,0000	0,86
WASH complex subunit 7	Kiaa1033	Q3UMB9	0,0003	0,86
Importin-9	Ipo9	Q91YE6	4,14E-06	0,86
40S ribosomal protein S14	Rps14	P62264	0,0056	0,85
RNA transcription, translation and transport factor protein	RTRAF	Q9CQE8	0,0001	0,84
Eukaryotic initiation factor 4A-II	Eif4a2	P10630	0,0023	0,83
60S ribosomal protein L21	Rpl21	O09167	0,0100	0,82
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3	Eif4g3	Q80X13	3,51E-05	0,82
Histone-lysine N-methyltransferase Smyd1	Smyd1	P97443	0,0006	0,82

Proteinname	Genname	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
60S ribosomal protein L35	Rpl35	Q6ZVW7	0,0055	0,82
Catenin alpha-2	Ctnna2	Q61301	0,0229	0,82
60S ribosomal protein L17	Rpl17	Q9CPR4	0,0016	0,80
Glycogen phosphorylase, brain form	Pygb	Q8C194	0,0002	0,80
Calponin-3	Cnn3	Q9DAW9	0,0007	0,79
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15	Usp15	Q8R5H1	0,0001	0,78
Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	Dhx30	Q99PU8	0,0002	0,78
Sacsin	Sacs	Q9JLC8	9,35E-06	0,78
UDP-glucose 4-epimerase	Gale	Q8R059	0,0055	0,77
Myosin light polypeptide 6	Myl6	Q60605	0,0142	0,77
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	Hnrnp11	Q921F4	1,34E-05	0,76
Nischarin	Nisch	Q80TM9	0,0002	0,76
THO complex subunit 2	Thoc2	B1AZI6	0,0006	0,76
Adenosine kinase	Adk	P55264	0,0003	0,76
Methionine aminopeptidase 1	Metap1	Q8BP48	0,0378	0,76
Glutathione S-transferase Mu 1	Gstm1	P10649	0,0017	0,76
Importin-8	Ipo8	Q7TMY7	0,0006	0,76
Dextrin	Dstn	Q9R0P5	0,0288	0,75
60S ribosomal protein L15	Rpl15	Q9CZM2	4,93E-05	0,74
Unconventional myosin-Ie	Myo1e	E9Q634	0,0002	0,74
E3 ubiquitin-protein ligase Midline-1	Mid1	O70583	0,0002	0,74
NADP-dependent malic enzyme	Me1	P06801	4,70E-05	0,74
Coatomer subunit gamma-1	Copg1	Q9QZE5	0,0002	0,73
Proliferating cell nuclear antigen	Pcna	P17918	0,0058	0,73
Rho-related GTP-binding protein RhoC	Rhoc	Q62159	0,0180	0,73
Rab GDP dissociation inhibitor alpha	Gdi1	P50396	0,0016	0,72
Phospholipase A-2-activating protein	Plaa	P27612	2,58E-06	0,72
Transportin-1	Tnpo1	Q8BFY9	3,79E-05	0,70
Nuclear pore complex protein Nup107	Nup107	Q8BH74	0,0021	0,70
Histone H4	Hist1h4a	P62806	0,0102	0,70
Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	Samhd1	Q60710	0,0001	0,70
N-alpha-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit	Naa25	Q8BWZ3	0,0042	0,70
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP11	Fkbp11	Q9D1M7	0,0203	0,69
Peroxiredoxin-2	Prdx2	Q61171	0,0113	0,69
Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	Fnta	Q61239	0,0004	0,69
Nuclear receptor-binding protein	Nrbp1	Q99J45	0,0001	0,68
Protein S100-A11	S100a11	P50543	0,0014	0,68
Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B	Pds5b	Q4VA53	0,0001	0,67
Nuclear pore complex protein Nup160	Nup160	Q9Z0W3	0,0017	0,67
Cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic	Cars	Q9ER72	0,0001	0,67
AP-1 complex subunit gamma-1	Ap1g1	P22892	0,0001	0,67
Dihydropyrimidinase-related protein 3	Dpys13	Q62188	0,0110	0,67
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	Chd4	Q6PDQ2	0,0002	0,67
CTP synthase 1	Ctps1	P70698	1,18E-05	0,66
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	Ppib	P24369	0,0141	0,66
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	Usp7	Q6A4J8	0,0001	0,66
14-3-3 protein beta/alpha	Ywhab	Q9CQV8	0,0025	0,66
WD repeat-containing protein 3	Wdr3	Q8BHB4	0,0162	0,66
40S ribosomal protein S20	Rps20	P60867	0,0317	0,65
Importin subunit alpha-4	Kpna3	O35344	0,0218	0,65
Ribosome-binding protein 1	Rrbp1	Q99PL5	0,0001	0,65
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	Ppp1r12a	Q9DBR7	0,0254	0,65
Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	Cyfi1	Q7TMB8	0,0022	0,64
Peroxiredoxin-1	Prdx1	P35700	0,0346	0,64
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	Usp9x	P70398	0,0011	0,64
Cyclin-dependent kinase 4	Cdk4	P30285	0,0054	0,64
60S ribosomal protein L38	Rpl38	Q9JJI8	0,0050	0,64
AP-3 complex subunit delta-1	Ap3d1	O54774	0,0005	0,63
WASH complex subunit strumpellin	Kiaa0196	Q8C2E7	0,0017	0,62
Exocyst complex component 4	Exoc4	O35382	0,0001	0,61

Proteinname	Genname	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
Elongator complex protein 3	Elp3	Q9CZX0	0,0002	0,61
DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase;DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase, mitochondrial	Apex1	P28352	0,0104	0,61
60S ribosomal protein L23a	Rpl23a	P62751	0,0080	0,61
Pescadillo homolog	Pes1	Q9EQ61	0,0025	0,60
Histone-lysine N-methyltransferase setd3	Setd3	Q91WC0	0,0167	0,60
ATP-binding cassette sub-family F member 1	Abcf1	Q6P542	0,0001	0,60
Sarcolumenin	Srl	Q7TQ48	1,77E-06	0,59
Nuclear cap-binding protein subunit 1	Ncbp1	Q3UYV9	0,0003	0,59
Vacuolar protein sorting-associated protein 18 homolog	Vps18	Q8R307	0,0022	0,59
Peroxisomal membrane protein PMP34	Slc25a17	O70579	0,0154	0,59
Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase FTO	Fto	Q8BGW1	0,0125	0,58
Proteasome-associated protein ECM29 homolog	Ecm29	Q6PD15	0,0024	0,58
Platelet-derived growth factor receptor beta	Pdgfrb	P05622	0,0247	0,58
Nuclear pore complex protein Nup214	Nup214	Q80U93	0,0048	0,58
RNA 3-terminal phosphate cyclase	RtcA	Q9D7H3	0,0043	0,58
Nucleosome assembly protein 1-like 4	Nap114	Q78ZA7	0,0054	0,58
Protein transport protein Sec31A	Sec31a	Q3UPL0	0,0001	0,57
60S ribosomal protein L27	Rpl27	P61358	0,0183	0,57
Adenylosuccinate synthetase isozyme 1	Adss1	P28650	3,49E-05	0,57
Condensin complex subunit 1	Ncapd2	Q8K2Z4	0,0001	0,57
Lon protease homolog 2, peroxisomal	Lonp2	Q9DBN5	0,0258	0,57
Vacuolar protein sorting-associated protein 35	Vps35	Q9EQH3	0,0076	0,57
Lipid phosphate phosphohydrolase 1	Ppap2a	Q61469	0,0086	0,56
Importin-4	Ipo4	Q8VI75	0,0001	0,56
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	Ppp2r1a	Q76MZ3	0,0001	0,55
Integrator complex subunit 5	Ints5	Q8CHT3	0,0002	0,55
Heat shock 70 kDa protein 4	Hspa4	Q61316	0,0003	0,54
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	Hnrnp1	Q8R081	0,0027	0,54
Sphingomyelin phosphodiesterase 4	Smpd4	Q6ZPR5	0,0069	0,54
Interferon-activable protein 204	Ifi204	P15092	0,0173	0,54
Lipase maturation factor 2	Lmf2	Q8C3X8	0,0014	0,54
Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1	Pbxip1	Q3TV18	0,0018	0,54
Vacuolar protein sorting-associated protein 16 homolog	Vps16	Q920Q4	0,0043	0,53
14-3-3 protein zeta/delta	Ywhaz	P63101	0,0012	0,53
Leukotriene A-4 hydrolase	Lta4h	P24527	0,0072	0,53
Obg-like ATPase 1	Ola1	Q9CZ30	0,0018	0,53
Protein TBRG4	Tbrg4	Q91YM4	0,0006	0,53
Chloride intracellular channel protein 4	Clic4	Q9QYB1	0,0212	0,53
Plastin-3	Pls3	Q99K51	0,0024	0,52
ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	Pfkip	Q9WUA3	0,0037	0,52
Nucleoporin NUP188 homolog	Nup188	Q6ZQH8	0,0025	0,52
HEAT repeat-containing protein 3	Heatr3	Q8BQM4	0,0191	0,52
GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1	Gapvd1	Q6PAR5	0,0007	0,51
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	Iqgap1	Q9JKF1	0,0123	0,51
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX27	Ddx27	Q921N6	0,0097	0,51
Testis-expressed sequence 10 protein	Tex10	Q3URQ0	0,0017	0,51
Myotubularin-related protein 5	Sbfl	Q6ZPE2	0,0122	0,51
Syntaxin-binding protein 3	Stxbp3	Q60770	0,0040	0,51
Nck-associated protein 1	Nckap1	P28660	0,0084	0,50
SUN domain-containing protein 2	Sun2	Q8BJS4	0,0009	0,50
Insulin-degrading enzyme	Ide	Q9JHR7	0,0007	0,50
Minor histocompatibility antigen H13	Hm13	Q9D8V0	0,0026	0,50
F-box/WD repeat-containing protein 8	Fbxw8	Q8BIA4	0,0006	0,50
Nuclear pore complex protein Nup155	Nup155	Q99P88	0,0025	0,50
N-acetyltransferase 10	Nat10	Q8K224	0,0039	0,49
Microtubule-associated protein 4	Map4	P27546	0,0129	0,49
Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog A	Pds5a	Q6A026	0,0127	0,49
General transcription factor II-I	Gtf2i	Q9ESZ8	0,0164	0,49
DNA replication licensing factor MCM7	Mcm7	Q61881	0,0045	0,49
MMS19 nucleotide excision repair protein homolog	Mms19	Q9D071	0,0146	0,48

Proteinname	Genname	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
Fermitin family homolog 2	Fermt2	Q8CIB5	0,0150	0,48
Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	Prcp	Q7TMR0	0,0172	0,48
Structural maintenance of chromosomes protein 2	Smc2	Q8CG48	0,0064	0,47
Pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1	Pdxdc1	Q99K01	0,0020	0,47
Fragile X mental retardation protein 1 homolog	Fmr1	P35922	0,0041	0,47
Fatty acid synthase:[Acyl-carrier-protein] S-acetyltransferase	Fasn	P19096	0,0137	0,47
Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1	Bzw1	Q9CQC6	0,0148	0,47
Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	Eprs	Q8CGC7	0,0116	0,47
Major vault protein	Mvp	Q9EQK5	0,0004	0,46
Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	Lars	Q8BMJ2	0,0077	0,46
Coatomer subunit beta	Copb1	Q9JIF7	0,0018	0,46
GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	Gmps	Q3THK7	0,0072	0,46
Acetyl-CoA carboxylase 1	Acaca	Q5SWU9	0,0007	0,46
Tripeptidyl-peptidase 2	Tpp2	Q64514	0,0043	0,46
Coatomer subunit beta	Copb2	O55029	0,0136	0,46
Glucose-6-phosphate isomerase	Gpi	P06745	0,0089	0,46
Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	Tars	Q9D0R2	0,0025	0,46
Rab GDP dissociation inhibitor beta	Gdi2	Q61598	0,0013	0,45
Nuclear protein localization protein 4 homolog	Nploc4	P60670	0,0026	0,45
Rabankyrin-5	Ankfy1	Q810B6	0,0001	0,44
Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic	Iars	Q8BU30	0,0070	0,44
Kinesin-like protein KIF2A	Kif2a	P28740	0,0010	0,44
Importin subunit beta-1	Kpnb1	P70168	0,0126	0,44
Serpin H1	Serpinh1	P19324	0,0020	0,44
Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	Nmt1	O70310	0,0084	0,43
Eukaryotic translation initiation factor 5B	Eif5b	Q05D44	0,0104	0,43
Protein FAM91A1	Fam91a1	Q3UVG3	0,0071	0,43
Puromycin-sensitive aminopeptidase	Npepps	Q11011	0,0003	0,42
SUN domain-containing protein 1	Sun1	Q9D666	0,0011	0,42
Serum paraoxonase/arylesterase 2	Pon2	Q62086	0,0113	0,42
Tubulin alpha-1A chain	Tuba1a	P68369	0,0002	0,42
UDP-N-acetylglucosamine--peptide N-acetylglucosaminyltransferase 110 kDa subunit	Ogt	Q8CGY8	0,0009	0,41
Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	Aimp2	Q8R010	0,0074	0,41
Phosphoribosylformylglycinamide synthase	Pfas	Q5SUR0	0,0061	0,41
Coatomer subunit gamma-2	Copg2	Q9QXK3	0,0057	0,40
Valine--tRNA ligase	Vars	Q9Z1Q9	0,0078	0,40
Calcium uptake protein 1, mitochondrial	Micu1	Q8VCX5	0,0090	0,40
Radixin	Rdx	P26043	0,0005	0,39
Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic	Nars	Q8BP47	0,0036	0,39
Elongator complex protein 1	Ikkkap	Q7TT37	0,0028	0,39
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX56	Ddx56	Q9D0R4	0,0061	0,39
Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	Mars	Q68FL6	0,0024	0,39
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	Uba1	Q02053	0,0001	0,38
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Vcp	Q01853	0,0023	0,38
Thimet oligopeptidase	Thop1	Q8C1A5	0,0008	0,38
Pyruvate kinase PKM	Pkm	P52480	0,0001	0,38
Microtubule-associated protein 1A	Map1a	Q9QYR6	0,0067	0,38
Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	Txnrd1	Q9JMH6	0,0010	0,38
CST complex subunit CTC1	Ctc1	Q5SUQ9	0,0013	0,37
Xaa-Pro aminopeptidase 1	Xpnpep1	Q6P1B1	0,0036	0,36
Metastasis-associated protein MTA2	Mta2	Q9R190	0,0040	0,35
Prolyl endopeptidase	Prep	Q9QUR6	0,0014	0,35
Bifunctional purine biosynthesis protein Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase	Atic	Q9CWJ9	0,0000	0,34
Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	Aars	Q8BGQ7	0,0003	0,33
Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 1	Ppp4r1	Q8K2V1	0,0016	0,33
Acyl-CoA dehydrogenase family member 9, mitochondrial	Acad9	Q8JZN5	0,0025	-0,33
Plexin-B2	Plxnb2	B2RXS4	0,0019	-0,36
Solute carrier family 12 member 4	Slc12a4	Q9JIS8	0,0051	-0,37

Proteinname	Genname	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
Nucleolar protein 56	Nop56	Q9D6Z1	0,0022	-0,37
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	Slc25a12	Q8BH59	0,0038	-0,37
Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	Aldh1l2	Q8K009	0,0002	-0,38
Monoacylglycerol lipase ABHD12	Abhd12	Q99LR1	0,0017	-0,40
Serine protease HTRA2, mitochondrial	Htra2	Q9JIY5	0,0009	-0,40
Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	Tomm40	Q9QYA2	0,0008	-0,40
Prostacyclin synthase	Ptgis	O35074	0,0074	-0,41
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	Plod3	Q9R0E1	0,0107	-0,41
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	Lrp1	Q91ZX7	0,0099	-0,41
Copine-2	Cpne2	P59108	0,0081	-0,41
Carnitine O-acetyltransferase	Crat	P47934	0,0111	-0,42
Beta-1-syntrophin	Sntb1	Q99L88	0,0071	-0,42
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial	Clpx	Q9JHS4	0,0109	-0,42
Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	Gnas	P63094	0,0115	-0,42
Beta-2-syntrophin	Sntb2	Q61235	0,0028	-0,42
Annexin A2	Anxa2	P07356	0,0061	-0,42
Coiled-coil domain-containing protein 47	Ccdc47	Q9D024	0,0075	-0,44
Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	Mogs	Q80UM7	0,0079	-0,45
Annexin A4	Anxa4	P97429	0,0046	-0,45
RuvB-like 1	Ruvbl1	P60122	0,0105	-0,45
Calsequestrin-2	Casq2	O09161	0,0099	-0,45
Collagen alpha-1(XVIII) chain;Endostatin	Col18a1	P39061	0,0145	-0,45
Ribosome-releasing factor 2, mitochondrial	Gfm2	Q8R2Q4	0,0045	-0,45
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	Vat1	Q62465	0,0005	-0,46
Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	Slc25a11	Q9CR62	0,0113	-0,47
Amine oxidase [flavin-containing] A	Maoa	Q64133	0,0007	-0,48
LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1, mitochondrial	Letm1	Q9Z210	0,0016	-0,49
Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 1	Fmo1	P50285	0,0176	-0,49
Protein disulfide-isomerase A5	Pdia5	Q921X9	0,0098	-0,49
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	Ddost	O54734	0,0012	-0,50
Tripartite motif-containing protein 47	Trim47	Q8C0E3	0,0149	-0,50
Fatty acyl-CoA reductase 1	Far1	Q922J9	0,0166	-0,50
Flotillin-1	Flot1	O08917	0,0077	-0,50
ER membrane protein complex subunit 3	Emc3	Q99K13	0,0021	-0,51
Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1	Ergic1	Q9DC16	0,0010	-0,51
Integrin beta-5	Itgb5	O70309	0,0080	-0,52
Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform	Cpt1a	P97742	0,0033	-0,52
Activating signal cointegrator 1 complex subunit 2	Ascc2	Q91WR3	0,0006	-0,53
RuvB-like 2	Ruvbl2	Q9WTM5	0,0035	-0,53
Hexokinase-2	Hk2	O08528	0,0011	-0,53
Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3, mitochondrial	Ptcd3	Q14C51	0,0009	-0,54
DnaJ homolog subfamily C member 7	Dnajc7	Q9QYI3	0,0108	-0,54
Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	Trap1	Q9CQN1	0,0002	-0,55
Sorting nexin-4	Snx4	Q91YJ2	0,0037	-0,55
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	Mccc2	Q3ULD5	0,0230	-0,55
Leukocyte surface antigen CD47	Cd47	Q61735	0,0089	-0,56
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44	Timm44	O35857	0,0169	-0,56
39S ribosomal protein L21, mitochondrial	Mrpl21	Q9D1N9	0,0190	-0,56
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	Acs1l	P41216	0,0009	-0,56
Cytoskeleton-associated protein 4	Ckap4	Q8BMK4	0,0047	-0,58
Transcriptional activator protein Pur-alpha	Pura	P42669	0,0127	-0,59
RNA polymerase-associated protein CTR9 homolog	Ctr9	Q62018	0,0248	-0,60
Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	Galnt2	Q6PB93	0,0194	-0,60
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	Gpd2	Q64521	0,0003	-0,60
39S ribosomal protein L28, mitochondrial	Mrpl28	Q9D1B9	0,0134	-0,60
V-type proton ATPase subunit d 1	Atp6v0d1	P51863	0,0158	-0,60
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	Ndufv1	Q91YT0	0,0010	-0,61
F-actin-capping protein subunit alpha-1	Capza1	P47753	0,0075	-0,62
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Hspd1	P63038	0,0049	-0,62

Proteinname	Genname	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
Splicing factor 3A subunit 3	Sf3a3	Q9D554	0,0044	-0,62
Spartin	Spg20	Q8R1X6	0,0026	-0,62
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	P4ha2	Q60716	0,0046	-0,62
Secretory carrier-associated membrane protein 3	Scamp3	O35609	0,0001	-0,62
Divergent protein kinase domain 2A	Dipk2a	Q3USZ8	0,0008	-0,63
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP8	Fkbp8	O35465	0,0000	-0,63
Catalase	Cat	P24270	0,0136	-0,65
VPS10 domain-containing receptor SorCS2	Sorcs2	Q9EPR5	0,0009	-0,65
ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	Atp5c1	Q91VR2	0,0212	-0,65
Protein-lysine 6-oxidase	Lox	P28301	0,0146	-0,66
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	Glud1	P26443	0,0000	-0,66
Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1	Cacna2d1	O08532	0,0035	-0,66
Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial	Acot9	Q9R0X4	0,0035	-0,66
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Vdac2	Q60930	0,0039	-0,66
Flotillin-2	Flot2	Q60634	0,0091	-0,66
Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1	Hs2st1	Q8R3H7	0,0221	-0,67
Dehydrogenase/reductase SDR family member 7B	Dhrs7b	Q99J47	0,0044	-0,67
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	Atp1b3	P97370	0,0077	-0,67
Integrin alpha-3	Itga3	Q62470	0,0054	-0,67
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	Dld	O08749	0,0094	-0,68
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Atp5b	P56480	0,0014	-0,69
ATP synthase subunit f, mitochondrial	Atp5j2	P56135	0,0022	-0,71
Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial	Acot2	Q9QYR9	0,0089	-0,72
Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	Pccb	Q99MN9	0,0015	-0,72
Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	Gnai3	Q9DC51	0,0008	-0,73
Glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Gcdh	Q60759	0,0015	-0,74
Casein kinase II subunit alpha	Csnk2a1	Q60737	0,0288	-0,74
Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	Vdac3	Q60931	0,0001	-0,74
4F2 cell-surface antigen heavy chain	Slc3a2	P10852	0,0004	-0,74
Cytochrome b5 type B	Cyb5b	Q9CQX2	0,0020	-0,75
Prohibitin-2	Phb2	O35129	0,0042	-0,76
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Uqcrc1	Q9CZ13	0,0016	-0,76
Sideroflexin-1	Sfxn1	Q99JR1	0,0152	-0,77
78 kDa glucose-regulated protein	Hspa5	P20029	0,0007	-0,78
Translational activator of cytochrome c oxidase 1	Taco1	Q8K0Z7	0,0429	-0,78
40S ribosomal protein S5 processed	Rps5	P97461	0,0076	-0,78
Integrin beta-1	Itgb1	P09055	0,0008	-0,78
Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	Hsd17b12	O70503	0,0345	-0,78
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Atp5a1	Q03265	0,0002	-0,79
Epoxide hydrolase 1	Ephx1	Q9D379	0,0000	-0,80
Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	M6pr	P24668	0,0045	-0,81
Transferrin receptor protein 1	Tfrc	Q62351	0,0001	-0,85
DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial	Dnaja3	Q99M87	0,0030	-0,89
28S ribosomal protein S23, mitochondrial	Mrps23	Q8VE22	0,0209	-0,90
Serine protease HTRA1	Htra1	Q9R118	0,0037	-0,90
Prohibitin	Phb	P67778	0,0019	-0,91
Lysosome membrane protein 2	Scarb2	O35114	0,0154	-0,92
Neuroplastin	Nptn	P97300	0,0000	-0,93
Vacuolar protein sorting-associated protein 13C	Vps13c	Q8BX70	0,0093	-0,96
SPARC	Sparc	P07214	0,0113	-0,96
CD44 antigen	Cd44	P15379	0,0098	-1,01
Aspartate aminotransferase, mitochondrial	Got2	P05202	0,0001	-1,01
Aldehyde dehydrogenase family 3 member B1	Aldh3b1	Q80VQ0	0,0243	-1,02
Immunoglobulin superfamily member 8	Igsf8	Q8R366	0,0000	-1,04
Progressive ankylosis protein	Ankh	Q9JHZ2	0,0133	-1,06
Ankycorbin	Rai14	Q9EP71	0,0122	-1,06
Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b	Smpdl3b	P58242	0,0010	-1,06
Xaa-Pro dipeptidase	Pepd	Q11136	0,0318	-1,08
Glutathione S-transferase A4	Gsta4	P24472	0,0003	-1,08
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha	Camk2a	P11798	0,0171	-1,12
Zinc transporter SLC39A7	Slc39a7	Q31125	0,0007	-1,12

Proteinname	Genname	Uniprot ID	p-Wert	Fold Change
Adiponectin	Adipoq	Q60994	0,0022	-1,14
PRA1 family protein 2	Praf2	Q9JIG8	0,0060	-1,15
CD63 antigen	Cd63	P41731	0,0034	-1,17
Golgi integral membrane protein 4	Golim4	Q8BXA1	0,0027	-1,22
Microtubule-associated protein RP/EB family member 3	Mapre3	Q6PER3	0,0397	-1,23
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	Slc2a1	P17809	0,0239	-1,34
Protein FAM114A2	Fam114a2	Q8VE88	0,0140	-1,35
Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	Cpox	P36552	0,0373	-1,40
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	Atp1a1	Q8VDN2	6,21E-06	-1,41
Vimentin	Vim	P20152	0,0003	-1,53
Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	Myl1	P05977	0,0210	-1,58
D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, mitochondrial	D2hgdh	Q8CIM3	0,0234	-1,60
Sequestosome-1	Sqstm1	Q64337	0,0258	-1,73
Blood vessel epicardial substance	Bves	Q9ES83	0,0068	-1,78
Sulfite oxidase, mitochondrial	Suox	Q8R086	0,0153	-1,79
Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	Akr7a2	Q8CG76	0,0591	-1,96
Zinc finger and BTB domain-containing protein 20	Zbtb20	Q8K0L9	0,0792	-1,98
Ras-related protein Rap-2b	Rap2b	P61226	0,0355	-2,07
Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2	Bzw2	Q91VK1	0,0228	-2,17
Sigma non-opioid intracellular receptor 1	Sigmar1	O55242	0,0192	-2,21
Transmembrane protein 2	Tmem2	Q5FWI3	4,19E-06	-2,28
Serine palmitoyltransferase 1	Sptlc1	O35704	4,22E-06	-2,93

Tabelle 23: Liste der 858 im Sekretom der C2C12 Myotuben signifikant überrepräsentierten Proteine inklusive der 401 palmitatinduziert verändert abundanten Proteine.

Proteinname	Genname	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓	p-Wert	Fold change
Protein unc-45 homolog B	Unc45b	Q8CGY6	+				0,0003	2,97
Angiopoietin-related protein 4	Angptl4	Q9Z1P8	+		+		0,0005	2,95
Mth938 domain-containing protein	Aamdc	D3Z442	+		+		0,0348	2,44
Protein NDRG1	Ndrgr1	Q62433	+				8,45E-05	2,18
Prostaglandin reductase 2	Ptgr2	Q3TXN1	+				0,0031	2,14
Kelch-like protein 40	Klhl40	A0A0R4J166	+				0,0005	1,78
ATP-dependent 6-phosphofruktokinase, muscle type	Pfkm	P47857	+				0,0002	1,78
MCG19772	Trim55	G3X8Y1	+				0,0077	1,57
ADP-ribose pyrophosphatase, mitochondrial	Nudr9	A2AH27	+				0,0171	1,55
Cysteine and glycine-rich protein 3	Csrp3	P50462	+				7,04E-05	1,52
Protein disulfide-isomerase A4	Pdia4	A0A0R4J0Z1	+		+		2,45E-06	1,49
Tripartite motif-containing protein 54	Trim54	E9QAT9	+				0,0508	1,41
Serine/threonine-protein kinase PAK 2	Pak2	Q8CIN4	+	+			3,28E-05	1,38
LIM domain-binding protein 3	Ldb3	E9PYJ9	+				0,0002	1,37
Protein disulfide-isomerase A3	Pdia3	P27773	+		+		4,13E-06	1,36
General vesicular transport factor p115	Uso1	Q9Z1Z0	+				0,0001	1,36
Tripartite motif-containing protein 72	Trim72	Q1XH17	+				0,0003	1,32
60S ribosomal protein L26	Rpl26	P61255	+				0,0034	1,24
Kinesin light chain 1	Klc1	Q5UE59	+				0,0001	1,24
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1	Map2k1	P31938	+				0,0020	1,23
Protein CDV3	Cdv3	A0A087WNP6	+	+			0,0046	1,23
Tubulin beta-6 chain	Tubb6	Q922F4	+				0,0002	1,20
Alcohol dehydrogenase class 4 mu/sigma chain	Adh7	Q64437	+	+			0,0008	1,19
Gremlin-1	Grem1	O70326	+		+		0,0139	1,18
Adenylyl cyclase-associated protein 2	Cap2	Q9CYT6	+	+			0,0014	1,17
Myeloid-derived growth factor	Mydgr	Q9CPT4	+		+		0,0020	1,16
Microtubule-associated protein	Map4	A0A0G2JFH2	+				0,0003	1,12
Tubulin beta-2B chain	Tubb2b	Q9CWF2	+				0,0015	1,11
Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic	Wars	P32921	+				0,0007	1,11
Kelch-like protein 41	Klhl41	A2AUC9	+				0,0014	1,10
High mobility group protein HMG-I/HMG-Y	Hmgal	P17095	+				0,0183	1,09
RAC-beta serine/threonine-protein kinase	Akt2	Q60823	+				0,0578	1,07
Heat shock 70 kDa protein 4L	Hspa4l	P48722	+				8,99E-05	1,06
Creatine kinase M-type	Ckm	P07310	+	+			0,0032	1,03
Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic	Nars	Q8BP47	+				0,0124	0,99

Proteinname	Gennamen	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓	p-Wert	Fold change
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	Ppib	P24369	+		+		0,0004	0,98
Ankyrin repeat domain-containing protein 2	Ankrd2	Q9WV06	+	+			0,0187	0,98
Glycogen phosphorylase, muscle form	Pygm	Q9WUB3	+	+			0,0049	0,97
Tubulin alpha-4A chain	Tuba4a	A0A0A0MQA5	+				0,0161	0,97
Zyxin	Zyx	Q62523	+				5,56E-06	0,96
Histone-lysine N-methyltransferase Smyd1	Smyd1	P97443	+				0,0091	0,96
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	Naca	P70670	+				0,0087	0,94
Glycogen [starch] synthase, muscle	Gys1	A0A1B0GT92	+				0,0005	0,93
60S ribosomal protein L8	Rpl8	P62918	+				0,0036	0,92
Eukaryotic translation initiation factor 4B	Eif4b	Q8BGD9	+				0,0029	0,91
Heat shock protein 105 kDa	Hsph1	Q61699	+				0,0003	0,91
Enolase	Eno1	B0QZL1	+				0,0115	0,91
Tubulin beta-2A chain	Tubb2a	Q7TMM9	+				0,0002	0,90
Elongation factor 1-alpha 1	Eef1a1	P10126	+				0,0007	0,90
cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	Prkar1a	Q9DBC7	+				0,0010	0,89
Phosphoglucomutase-like protein 5	Pgm5	Q8BZF8	+				0,0006	0,87
Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	Lars	Q8BMJ2	+				0,0004	0,86
Adenylosuccinate synthetase isozyme 1	Adssl1	P28650	+				0,0003	0,85
60S ribosomal protein L36a	Rpl36a	P83882	+	+			0,0980	0,85
60S ribosomal protein L7a	Rpl7a	P12970	+				0,0213	0,82
60S ribosomal protein L14	Rpl14	Q9CR57	+				0,0061	0,81
60S ribosomal protein L13	Rpl13	P47963	+				0,0023	0,81
UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase-like protein 1	Uap111	Q3TW96	+	+			0,0033	0,81
Protein prune homolog	Prune	Q8BIW1	+	+			0,0012	0,80
Ribosomal protein L19	Rpl19	A2A547	+				0,1204	0,80
Vasodilator-stimulated phosphoprotein	Vasp	P70460	+				0,0012	0,80
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	Prkaca	P05132	+				0,0015	0,80
Clustered mitochondria protein homolog	Cluh	A0A0R4J140	+				0,0049	0,80
Amylo-1,6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase	Agl	F8VPN4	+				0,0322	0,79
Tubulin alpha-1B chain	Tuba1b	P05213	+				0,0266	0,79
Rho GDP-dissociation inhibitor 2	Arhgdib	Q61599	+	+			0,0131	0,79
Glycogenin-1	Gyg1	Q9R062	+				0,0157	0,78
Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A	Gspt1	Q8R050	+				8,52E-05	0,78
60S ribosomal protein L28	Rpl28	P41105	+				0,0098	0,78
60S ribosomal protein L18	Rpl18	A0A1B0GQU8	+				0,0460	0,78

Proteinname	Gennamen	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓	p-Wert	Fold change
Tripeptidyl-peptidase 2	Tpp2	Q64514	+	+			0,0001	0,76
40S ribosomal protein S2	Rps2	P25444	+				0,0016	0,76
ATPase Asn1	Asn1	O54984	+				3,52E-05	0,75
HEAT repeat-containing protein 3	Heatr3	Q8BQM4	+				0,0052	0,75
Microtubule-associated protein RP/EB family member 3	Mapre3	Q6PER3	+	+			0,0259	0,74
Aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring	Aldh3a1	P47739	+				0,0034	0,74
NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	Nqo1	Q64669	+				0,0106	0,73
S-formylglutathione hydrolase	Esd	H3BKH6	+	+			7,57E-05	0,73
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	Psm4	O35226	+				0,0002	0,72
40S ribosomal protein S19	Rps19	Q9CZX8	+	+			0,0520	0,72
40S ribosomal protein S3a	Rps3a	P97351	+				0,0029	0,69
Coiled-coil domain-containing protein 124	Ccdc124	Q9D8X2	+				0,1144	0,68
Thioredoxin domain-containing protein 5	Txndc5	A0A0R4J1Y7	+		+		0,0068	0,68
Protein bicucullin D homolog 2	Bicd2	Q921C5	+				0,0047	0,68
40S ribosomal protein S20	Rps20	P60867	+	+			0,0046	0,68
Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic	Dars	Q922B2	+				0,0001	0,67
Glycine--tRNA ligase	Gars	Q9CZD3	+	+			0,0003	0,67
Myc box-dependent-interacting protein 1	Bin1	Q6P1B9	+	+			0,0002	0,67
AH receptor-interacting protein	Aip	O08915	+	+			0,0003	0,67
60S ribosomal protein L23a	Rpl23a	A0A140T8M7	+	+			0,0003	0,67
Heat shock 70 kDa protein 1B	Hspa1b	P17879	+	+			1,64E-05	0,66
Protein PRRC1	Prrc1	Q3UPH1	+				0,0953	0,66
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	Psm9	Q9CR00	+				0,0935	0,65
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein	Gpd1l	Q3ULJ0	+	+			0,0188	0,65
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Phgdh	Q61753	+				0,0003	0,64
60S ribosomal protein L6	Rpl6	P47911	+				0,0211	0,64
40S ribosomal protein S7	Rps7	P62082	+				0,0148	0,63
60S ribosomal protein L32	Rpl32	P62911	+				0,0326	0,63
60S ribosomal protein L29	Gm17669	F6QL70	+	+			0,0023	0,62
40S ribosomal protein S10	Rps10	P63325	+				0,0113	0,62
Elongation factor 1-delta	Eef1d	Q80T06	+				0,0077	0,61
Creatine kinase B-type	Ckb	Q04447	+	+			0,0002	0,61
Quinone oxidoreductase	Cryz	P47199	+	+			0,0293	0,60
Mannose-1-phosphate guanyltransferase beta	Gmppb	Q8BTZ7	+	+			0,0129	0,60
60S ribosomal protein L12	Rpl12	P35979	+				7,21E-06	0,60
60S ribosomal protein L31	Rpl31	A0A0A6YX26	+	+			0,0883	0,59
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3, X-linked	Eif2s3x	Q9Z0N1	+				0,0008	0,59

Proteinname	Gennamen	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓	p-Wert	Fold change
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	Gnb2l1	P68040	+				0,0080	0,59
40S ribosomal protein S11	Rps11	P62281	+	+			0,0030	0,59
PC4 and SFRS1-interacting protein	Psip1	Q99JF8	+				0,0697	0,57
Microtubule-associated protein 4	Map4	P27546	+				0,0171	0,56
Y-box-binding protein 3	Ybx3	Q9JKB3	+	+			0,0425	0,55
60S ribosomal protein L27	Rpl27	P61358	+				0,0695	0,53
Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	Picalm	Q7M6Y3	+				9,33E-05	0,53
T-complex protein 1 subunit zeta	Cct6a	P80317	+	+			0,0228	0,53
Histone-lysine N-methyltransferase SETD7	Setd7	Q8VHL1	+				0,0747	0,52
Calcyclin-binding protein	Cacybp	Q9CXW3	+	+			0,0073	0,52
40S ribosomal protein S23	Rps23	P62267	+				0,0554	0,52
Cysteine-rich protein 2	Crip2	Q9DCT8	+	+			0,0004	0,51
Dynamin-1-like protein	Dnm1l	E9PUD2	+	+			0,0006	0,51
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	Psm8	Q9CPS5	+				0,0319	0,50
Mannose-6-phosphate isomerase	Mpi	Q924M7	+	+			0,0166	0,50
T-complex protein 1 subunit eta	Cct7	P80313	+	+			0,0014	0,50
Galactokinase	Galk1	Q9R0N0	+				0,0027	0,50
Transcription factor BTF3	Btf3	Q64152	+				0,0024	0,49
Calcium-regulated heat stable protein 1	Carhsp1	Q9CR86	+				0,0506	0,49
Peroxiredoxin-1	Prdx1	P35700	+	+			0,0032	0,49
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	Pgd	Q9DCD0	+	+			0,0007	0,48
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Z	Ube2z	Q3UE37	+	+			0,0245	0,48
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	Ugp2	Q91ZJ5	+	+			0,0378	0,48
Anamorsin	Ciapin1	Q8WTY4	+	+			0,0272	0,48
Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	Rars	Q9D0I9	+				0,0006	0,47
PDZ and LIM domain 3, isoform CRA_a	Pdlim3	A0A1B0GSX6	+				0,0011	0,47
ATP-binding cassette sub-family E member 1	Abce1	P61222	+				0,0124	0,47
Glutamine--tRNA ligase	Qars	Q8BML9	+				0,0217	0,47
40S ribosomal protein S16	Rps16	P14131	+	+			0,0021	0,47
Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	Farsb	Q9WUA2	+				0,0044	0,46
T-complex protein 1 subunit gamma	Cct3	P80318	+				6,39E-05	0,45
Septin-11	Sept11	A0A0J9YTY0	+	+			0,0003	0,45
LIM and SH3 domain protein 1	Lasp1	Q61792	+	+			0,0245	0,45
Fructose-bisphosphate aldolase A	Aldoa	P05064	+	+	+		0,0185	0,45
Stress-induced-phosphoprotein 1	Stip1	Q60864	+	+			0,0027	0,44
Leukocyte elastase inhibitor A	Serp1b1a	Q9D154	+	+			0,0459	0,44
Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	Serbp1	Q9CY58	+	+			0,0233	0,44
Peroxiredoxin-2	Prdx2	Q61171	+	+			0,0242	0,43

Proteinname	Gennamen	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓	p-Wert	Fold change
Hsc70-interacting protein	St13	F8WJK8	+	+			0,0351	0,43
40S ribosomal protein S14	Rps14	P62264	+	+			0,0147	0,42
Major vault protein	Mvp	E9Q3X0	+	+			0,0519	0,42
Septin-7	Sept7	E9Q9F5	+				0,0023	0,42
Protein enabled homolog	Enah	A0A0A6YXC8	+				0,0111	0,41
Heat shock protein HSP 90-beta	Hsp90ab1	P11499	+	+			0,0088	0,41
Transcription elongation factor A protein 1	Tcea1	P10711	+	+			0,0363	0,40
Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	Asns	Q61024	+	+			0,0254	0,40
Inosine-5-monophosphate dehydrogenase 2	Impdh2	P24547	+				0,0089	0,39
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	Ube2v2	Q9D2M8	+	+			0,0452	0,39
Elongation factor 2	Eef2	P58252	+	+			0,0198	0,38
Heat shock cognate 71 kDa protein	Hspa8	P63017	+	+			0,0271	0,37
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	Ube2v1	Q9CZY3	+	+			0,0400	0,36
Beta-enolase	Eno3	P21550	+	+			0,0052	0,35
Thimet oligopeptidase	Thop1	A0A0R4IZY0	+	+			0,0224	0,35
Cytosol aminopeptidase	Lap3	Q9CPY7	+	+			0,0148	0,34
T-complex protein 1 subunit theta	Cct8	P42932	+	+			0,0206	0,33
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	Eif3i	Q9QZD9	+	+			0,0268	0,31
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	Uba1	Q02053	+	+			0,0128	0,31
L-lactate dehydrogenase	Ldha	Q564E2	+	+			0,0110	0,29
Four and a half LIM domains protein 3	Fhl3	Q9R059	+	+			0,0093	0,28
Importin-5	Ipo5	Q8BKC5	+	+			0,0087	0,26
Prolyl endopeptidase	Prep	Q9QUR6	+	+			0,0178	-0,29
Vacuolar protein sorting-associated protein 26A	Vps26a	P40336	+	+			0,0139	-0,30
Ran GTPase-activating protein 1	Rangap1	P46061	+	+			0,0005	-0,33
Importin subunit beta-1	Kpnb1	P70168		+			0,0223	-0,35
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 1	Ppil1	Q9D0W5		+			0,0192	-0,35
Prostaglandin reductase 1	Ptgr1	Q91YR9	+	+			0,0289	-0,38
Proteasome activator complex subunit 2	Psme2	G3X9V0		+			0,0009	-0,38
MOB-like protein phocein	Mob4	Q6PEB6		+			0,0183	-0,38
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Ppia	P17742	+	+			0,0349	-0,38
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3bp1	P97855	+	+			0,0400	-0,39
m7GpppX diphosphatase	Dcps	Q9DAR7	+	+			0,0545	-0,39
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	Pafah1b2	Q61206	+	+			0,0148	-0,40
Ribosylidihydroxynicotinamide dehydrogenase [quinone]	Nqo2	Q9JI75	+	+			0,0220	-0,40
Dihydropyrimidinase-related protein 2	Dpysl2	O08553	+	+			0,0368	-0,41
NADP-dependent malic enzyme	Me1	P06801	+	+			0,0093	-0,41
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit	Pafah1b3	Q61205		+			0,0092	-0,42

Proteinname	Gennamen	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓	p-Wert	Fold change
gamma								
Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta	Mat2b	Q99LB6	+	+			0,0405	-0,43
Histone H2B	Hist1h2br	Q8CBB6		+			0,0030	-0,43
Biliverdin reductase A	Blvra	Q9CY64	+	+			0,0105	-0,44
F-actin-capping protein subunit alpha-1	Capza1	P47753	+	+			0,0062	-0,44
Osteoclast-stimulating factor 1	Ostf1	Q62422	+	+			0,0181	-0,44
Epididymal secretory protein E1	Npc2	Q9Z0J0		+	+		0,0313	-0,44
GDP-L-fucose synthase	Tsta3	P23591	+	+			0,0218	-0,44
Ezrin	Ezr	P26040	+	+			0,0523	-0,46
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	Hprt1	P00493	+	+			0,0230	-0,47
CCA tRNA nucleotidyltransferase 1, mitochondrial	Trnt1	Q8K1J6		+			0,0567	-0,47
Aldose 1-epimerase	Galm	Q8K157		+			0,0069	-0,47
PDZ and LIM domain protein 5	Pdlim5	Q8C151	+	+			0,0273	-0,47
Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	Acot7	E9PYH2	+	+			0,0400	-0,47
Thioredoxin	Txn	P10639	+	+			0,0550	-0,48
Filamin-A	Flna	B7FAU9		+			0,0005	-0,48
Twinfilin-1	Twf1	Q91YR1	+	+			0,0398	-0,50
Axin interactor, dorsalization-associated protein	Aida	Q8C4Q6	+				0,0295	-0,50
Glutaredoxin-3	Glrx3	Q9CQM9	+	+			0,0082	-0,50
Glyoxalase domain-containing protein 4	Glod4	Q9CPV4	+	+			0,0459	-0,51
Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	Fnta	Q61239		+			0,0326	-0,51
Pleiotropic regulator 1	Plrg1	D3Z4V1		+			0,0031	-0,52
Carboxypeptidase	Ctsa	G3X8T3		+	+	+	0,0137	-0,53
Prostaglandin E synthase 3	Ptges3	Q9R0Q7	+				0,0923	-0,53
Cathepsin B	Ctsb	P10605		+	+	+	0,0357	-0,54
Aminoacylase-1	Acy1	Q99JW2	+	+			0,0010	-0,54
SUMO-activating enzyme subunit 1	Sae1	Q9R1T2	+	+			0,0406	-0,55
F-box-like/WD repeat-containing protein TBL1X	Tbl1x	Q9QXE7		+			0,0381	-0,55
Ceruloplasmin	Cp	G3X9T8	+	+	+	+	0,0072	-0,55
THO complex subunit 4	Alyref	O08583	+	+			0,0082	-0,55
Macrophage migration inhibitory factor	Mif	P34884	+	+			0,0073	-0,56
Testin	Tes	Q3ULB1		+			0,0169	-0,56
DnaJ homolog subfamily C member 8	Dnajc8	Q6NZB0		+			0,0070	-0,57
UPF0160 protein MYG1, mitochondrial	Myg1	Q9JK81	+	+			0,0116	-0,58
Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	Arpc2	Q9CVB6	+	+			0,0030	-0,58
Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	Acp1	Q9D358	+	+			0,0481	-0,59
Prosaposin	Psap	E9PZ00	+	+	+	+	0,0115	-0,59

Proteinname	Gennamen	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓	p-Wert	Fold change
Granulins	Grn	Q3U9N4	+	+	+	+	0,0301	-0,59
ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 2	Arfgap2	Q99K28	+				0,0446	-0,59
Fibulin-2	Fbln2	P37889		+	+	+	0,0019	-0,60
Coronin-1C	Coro1c	Q9WUM4		+			0,0022	-0,60
Intraflagellar transport protein 25 homolog	Hspb11	Q9D6H2		+			0,0434	-0,60
Protein BUD31 homolog	Bud31	E0CX20		+			0,0572	-0,60
DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	Apex1	P28352	+	+			0,0072	-0,61
Delta-aminolevulinic acid dehydratase	Alad	P10518	+	+			0,0611	-0,62
Cathepsin Z	Ctsz	Q9WUU7		+	+	+	0,0006	-0,62
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	Ppp1r7	Q3UM45	+	+			0,0260	-0,63
FACT complex subunit SSRP1	Ssrp1	A2AW05		+			0,0084	-0,63
N(4)-(beta-N-acetylglucosaminyl)-L-asparaginase	Aga	Q64191		+	+		0,0021	-0,64
Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	Adss	P46664	+	+			0,0126	-0,64
Rab GDP dissociation inhibitor alpha	Gdi1	P50396	+	+			0,0011	-0,64
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H	Ppih	Q9D868	+	+			0,0327	-0,65
Plastin-3	Pls3	Q99K51	+	+			0,0039	-0,66
1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3	Plcb3	P51432	+	+			0,0008	-0,66
Filamin-B	Flnb	Q80X90		+			0,0004	-0,66
Histone H1.1	Hist1h1a	P43275	+	+			0,0088	-0,67
Thiopurine S-methyltransferase	Tpmt	A0A0R4J018		+			0,0847	-0,69
Low-density lipoprotein receptor	Ldlr	P35951	+	+	+		0,0324	-0,69
Pirin	Pir	A2AIH8	+	+			0,0534	-0,69
Four and a half LIM domains protein 1	Fhl1	P97447	+	+	+		0,0053	-0,69
Ran-specific GTPase-activating protein	Ranbp1	P34022	+	+			0,0722	-0,70
2-aminoethanethiol dioxygenase	Ado	Q6PDY2		+			0,0140	-0,70
Metalloproteinase inhibitor 1	Timp1	P12032	+	+	+	+	0,0012	-0,73
Beta-hexosaminidase subunit beta	Hexb	P20060		+	+	+	0,0001	-0,73
Arylsulfatase A	Arsa	P50428		+	+		0,0202	-0,74
Beta-hexosaminidase subunit alpha	Hexa	P29416	+	+	+	+	0,0002	-0,76
Caspase-3	Casp3	P70677	+	+			0,0038	-0,76
Histone H3.3	H3f3a	P84244	+				0,0252	-0,77
Proteasome subunit beta type-4	Psmb4	P99026	+	+			0,0078	-0,77
Farnesyl pyrophosphate synthase	Fdps	Q920E5	+	+	+		0,0583	-0,79
Serine/threonine-protein phosphatase CPPED1	Cpped1	Q8BFS6	+	+			0,0662	-0,79
N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	Ddah2	Q99LD8	+	+			0,0026	-0,80
GTP cyclohydrolase 1 feedback regulatory protein	Gchfr	P99025	+	+			0,0297	-0,80
Collagen alpha-1(IV) chain	Col4a1	P02463		+	+	+	0,0235	-0,81

Proteinname	Gennamen	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓	p-Wert	Fold change
Uroporphyrinogen decarboxylase	Urod	P70697	+	+			0,0123	-0,81
Decorin	Dcn	P28654		+	+	+	0,0290	-0,82
SEC14-like protein 2	Sec14l2	Q99J08	+	+			0,0501	-0,84
Latent-transforming growth factor beta-binding protein 3	Ltbp3	F8VQ06		+	+	+	0,0454	-0,85
SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	Sh3bgrl	Q9JJU8	+	+			0,0068	-0,85
Matrilin-2	Matn2	A0A0A0MQM7		+	+	+	0,0456	-0,85
Adenine phosphoribosyltransferase	Aprt	P08030		+			0,0195	-0,87
Collagen alpha-1(XVIII) chain	Col18a1	E9QPX1		+	+	+	0,0013	-0,87
Calumenin	Calu	O35887	+	+	+		0,0459	-0,88
Cyclin-dependent kinase 4	Cdk4	E9Q9E4		+			0,0087	-0,88
Tubulin polymerization-promoting protein family member 3	Tppp3	Q9CRB6	+	+			0,0095	-0,89
Fatty acid-binding protein, epidermal	Fabp5	Q05816	+	+			0,0008	-0,91
Histone H2A type 1-H	Hist1h2ah	A0A0N4SV66		+			0,0002	-0,91
Glypican-1	Gpc1	Q9QZF2	+	+	+		0,0016	-0,91
Thrombospondin-1	Thbs1	Q80YQ1	+	+	+	+	0,0002	-0,91
Phospholipase A1 member A	Pla1a	Q8V178		+	+	+	0,0265	-0,91
Cathepsin L1	Ctsl	P06797	+	+	+	+	0,0001	-0,92
Nucleobindin-1	Nucb1	Q02819		+	+	+	0,0015	-0,92
Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	Adam10	D3Z1E6		+	+		0,0252	-0,93
Inactive tyrosine-protein kinase 7	Ptk7	Q8BKG3	+	+	+		0,0031	-0,95
Legumain	Lgmn	O89017	+	+	+	+	0,0054	-0,97
Dextrin	Dstn	Q9R0P5	+	+			0,0046	-0,97
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D1	Ube2d1	P61080		+			0,1010	-0,98
Chloride intracellular channel protein 1	Clic1	Q9Z1Q5	+	+			0,0345	-0,98
Neural cell adhesion molecule 1	Ncam1	E9Q589		+	+		0,0011	-0,98
Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	Arpc3	H7BWZ3		+			0,0852	-0,99
Dihydrofolate reductase	Dhfr	P00375	+	+			0,0009	-1,01
Ribonuclease UK114	Hrsp12	P52760		+			0,0352	-1,02
Transforming growth factor beta-2	Tgfb2	A0A0A6YXU9		+	+	+	0,0120	-1,03
Cadherin-2	Cdh2	P15116		+	+		0,0027	-1,05
Sushi repeat-containing protein SRPX2	Srpx2	Q8R054		+	+	+	0,0933	-1,05
Importin subunit alpha-1	Kpna2	P52293		+			0,0027	-1,06
Cofilin-1	Cfl1	P18760	+	+			0,0292	-1,06
ADP-ribosylation factor-like protein 3	Arl3	Q9WUL7	+	+			0,0247	-1,08
Oligoribonuclease, mitochondrial	Rexo2	Q9D8S4		+			0,0026	-1,08
Nephronectin	Npnt	D3YTX1		+	+		0,0006	-1,09
5(3)-deoxyribonucleotidase, cytosolic type	Nt5c	Q9JM14		+			0,0593	-1,10

Proteinname	Gennamen	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓	p-Wert	Fold change
Isopenentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	Idi1	P58044		+			0,1056	-1,12
Fibronectin	Fn1	P11276		+	+		0,0003	-1,14
14-3-3 protein zeta/delta	Ywhaz	P63101		+			0,0738	-1,14
Nidogen-2	Nid2	O88322	+	+	+	+	2,12E-05	-1,15
Palmitoyl-protein thioesterase 1	Ppt1	O88531		+	+		0,0032	-1,17
Collagen alpha-2(IV) chain	Col4a2	P08122	+	+	+	+	0,0020	-1,17
Nucleoside diphosphate kinase	Gm20390	E9PZF0	+	+			0,0192	-1,19
Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	Pam	E9Q704		+	+	+	0,0005	-1,21
EF-hand domain-containing protein D2	Efhd2	Q8C845		+			0,1132	-1,21
Carboxypeptidase Q	Cpq	Q9WVJ3		+	+	+	4,39E-05	-1,23
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	Hspg2	E9PZ16		+	+	+	0,0004	-1,25
Carboxypeptidase E	Cpe	Q00493		+	+	+	0,0010	-1,27
Collagen, type VI, alpha 3	Col6a3	E9PWQ3	+	+	+	+	0,0002	-1,29
Proteasome subunit beta type-2	Psmb2	Q9R1P3		+			0,0491	-1,31
14-3-3 protein theta	Ywhaq	P68254		+			0,0111	-1,32
Tubulin beta-3 chain	Tubb3	Q9ERD7		+			0,0006	-1,33
14-3-3 protein eta	Ywhah	P68510		+			0,0638	-1,34
Complement factor H	Cfh	D6RGQ0		+	+	+	0,0004	-1,36
Collagen alpha-1(XII) chain	Col12a1	E9PX70	+	+	+	+	0,0002	-1,38
Proliferating cell nuclear antigen	Pcna	P17918	+	+			0,0002	-1,38
Serine protease 23	Prss23	Q9D6X6		+	+	+	0,0016	-1,39
Sulfhydryl oxidase 1	Qsox1	Q8BND5	+	+	+	+	2,81E-05	-1,40
Tenascin	Tnc	Q80YX1	+	+	+	+	0,0002	-1,41
Phosphotriesterase-related protein	Pter	A2AUR3		+			0,1452	-1,45
14-3-3 protein epsilon	Ywhae	P62259		+			0,0616	-1,45
Calsyntenin-1	Clstn1	Q9EPL2		+	+	+	5,54E-06	-1,45
Exostosin-2	Ext2	E9Q1M5		+		+	0,0057	-1,46
Thioredoxin domain-containing protein 17	Txndc17	Q9CQM5	+	+			0,0084	-1,47
Collagen alpha-1(VI) chain	Col6a1	Q04857	+	+	+	+	9,09E-05	-1,49
Fibronectin	Fn1	A0A087WSN6		+	+	+	7,88E-05	-1,50
Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	Rrm2	P11157		+	+		0,0048	-1,51
Insulin-like growth factor-binding protein 6	Igfbp6	P47880	+	+	+	+	7,58E-05	-1,55
Insulin-like growth factor-binding protein 7	Igfbp7	F8WH23	+	+	+	+	5,62E-07	-1,58
Ribonuclease 4	Rnase4	Q9JJH1	+	+	+	+	0,0001	-1,59
Collagen alpha-2(V) chain	Col5a2	Q3U962	+	+	+	+	1,86E-05	-1,60
Pigment epithelium-derived factor	Serpinf1	P97298	+	+	+	+	2,09E-06	-1,60
Phospholipid transfer protein	Pltp	A2A5K2		+	+	+	0,0022	-1,61

Proteinname	Gennamen	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓	p-Wert	Fold change
Ribonuclease T2	Rnaset2	Q9CQ01		+			0,0160	-1,62
Cystatin-C	Cst3	P21460	+	+	+	+	0,0068	-1,62
Urokinase-type plasminogen activator	Plau	P06869	+	+	+	+	0,0013	-1,64
Extracellular matrix protein 1	Ecml	Q61508	+		+		0,0004	-1,66
Prolargin	Prelp	Q9JK53		+	+	+	0,0006	-1,67
Dystroglycan	Dag1	Q62165	+	+	+	+	2,23E-06	-1,70
Calsequestrin-2	Casq2	O09161		+	+	+	0,0003	-1,70
Bone morphogenetic protein 1	Bmp1	P98063		+	+	+	0,0023	-1,70
Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	Sod3	O09164		+	+	+	0,0010	-1,71
Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	Pcolce	D3YUE2	+	+	+	+	2,39E-05	-1,73
Insulin-like growth factor-binding protein 2	Igfbp2	P47877	+	+	+	+	0,0007	-1,73
Gamma-glutamyl hydrolase	Ggh	Q9Z0L8		+	+	+	0,0216	-1,75
Biglycan	Bgn	P28653	+	+	+	+	0,0011	-1,75
Vitamin K-dependent protein S	Pros1	Q08761		+	+	+	0,0003	-1,77
Leucine-rich repeat-containing protein 17	Lrrc17	Q9CXD9		+	+	+	0,0296	-1,77
72 kDa type IV collagenase	Mmp2	P33434	+	+	+	+	5,90E-07	-1,79
Collagen alpha-1(V) chain	Col5a1	O88207	+	+	+	+	4,07E-05	-1,83
Acylphosphatase-1	Acyp1	P56376		+			0,0807	-1,84
Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1	Minpp1	Q9Z2L6		+	+	+	7,00E-05	-1,84
Mesothelin	Msln	Q61468	+	+	+	+	2,15E-07	-1,85
Cadherin-15	Cdh15	P33146	+	+	+		1,11E-05	-1,89
Flap endonuclease 1	Fen1	Q91Z50		+			0,0032	-1,90
Collagen alpha-1(III) chain	Col3a1	P08121	+	+	+	+	2,86E-05	-1,93
Fibrillin-1	Fbn1	Q61554		+	+	+	2,16E-05	-1,93
Insulin-like growth factor-binding protein 5	Igfbp5	Q07079	+	+	+	+	3,82E-05	-1,96
Follistatin-related protein 1	Fstl1	Q62356	+	+	+	+	3,15E-05	-2,00
Amyloid beta A4 protein	App	P12023	+	+	+	+	0,0005	-2,07
Metalloproteinase inhibitor 2	Timp2	Q6P117	+	+	+	+	1,13E-05	-2,09
Collagen alpha-1(I) chain	Col1a1	P11087	+	+	+	+	0,0004	-2,09
Cyclin-dependent kinase 1	Cdk1	P11440		+			0,0005	-2,11
Protocadherin gamma C3	Pcdhgc3	Q91XX1		+	+		0,0002	-2,12
Tissue-type plasminogen activator	Plat	P11214		+	+	+	0,0003	-2,12
SPARC	Sparc	Q5NCU4	+	+	+	+	2,46E-06	-2,14
Protein NOV homolog	Nov	Q64299		+	+	+	0,0035	-2,16
Immunoglobulin superfamily member 8	Igsf8	Q8R366		+	+		0,0003	-2,16
Periostin	Postn	Q62009	+	+	+	+	3,87E-05	-2,23
Transcobalamin-2	Tcn2	O88968	+	+	+	+	2,35E-05	-2,24
Adipocyte enhancer-binding protein 1	Aebp1	Q640N1		+	+	+	0,0006	-2,24

Proteinname	Gennamen	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓	p-Wert	Fold change
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S	Ptprs	B0V2N1		+	+		0,0002	-2,26
Chymotrypsinogen B	Ctrb1	Q9CR35	+	+	+	+	2,14E-05	-2,28
Fibulin-1	Fbln1	Q08879		+	+	+	0,0113	-2,31
Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT2	Flrt2	Q8BLU0		+	+		0,0002	-2,31
Cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes	Cdon	Q32MD9		+	+		0,0002	-2,34
Multiple epidermal growth factor-like domains protein 10	Megf10	A0A140T8S0	+	+	+	+	0,0042	-2,35
Bis(5-nucleosyl)-tetrphosphatase [asymmetrical]	Nudt2	P56380		+			0,0014	-2,36
Collagen alpha-2(I) chain	Col1a2	Q01149	+	+	+	+	7,64E-05	-2,37
Insulin-like growth factor II	Igf2	E9QLW5	+	+	+	+	0,0015	-2,40
Olfactomedin-like protein 2B	Olfml2b	Q3V1G4		+	+	+	0,0001	-2,51
Collagen alpha-2(VI) chain	Col6a2	Q02788	+	+	+	+	7,21E-05	-2,52
Beta-2-microglobulin	B2m	P01887		+	+	+	0,0055	-2,53
Olfactomedin-like protein 3	Olfml3	A0A0R4J086		+	+	+	0,0021	-2,53
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	Efemp2	G5E8D6		+	+	+	0,0106	-2,56
Renin receptor	Atp6ap2	Q9CYN9		+	+	+	0,0016	-2,61
Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3	C1qtnf3	D3YZ61	+	+	+	+	0,0002	-2,65
Coiled-coil domain-containing protein 80	Ccdc80	Q8R2G6		+	+	+	0,0013	-2,68
Lysyl oxidase homolog 3	Lox13	Q9Z175		+	+	+	0,0011	-2,75
Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat protein	Islr	Q6GU68	+	+	+	+	5,86E-06	-2,75
Follistatin	Fst	A0A0R4J026		+	+	+	0,0010	-2,94
Serotransferrin	Gm20425	E9Q035		+	+		0,0028	-3,10
Adiponectin	Adipoq	Q60994		+	+		0,0006	-3,15
Platelet-derived growth factor receptor-like protein	Pdgfrl	A0A0R4J0C9		+	+	+	3,54E-05	-3,23
Peroxidasin homolog	Pxdn	Q3UQ28		+	+	+	6,28E-06	-3,26
Cartilage intermediate layer protein 1	Cilp	A0A0R4J0F8		+	+	+	0,0005	-3,42
Chordin	Chrd	A2CG33		+	+		6,60E-05	-3,54
Mimecan	Ogn	Q62000	+	+	+	+	1,70E-07	-3,69
Serum albumin	Alb	P07724		+	+		0,0004	-3,99
Fibronectin type III domain-containing 1	Fndc1	E9Q043		+		+	6,66E-05	-5,32

Proteinname	Gennamen	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓
Non-histone chromosomal protein HMG-17	Gm16494	E9Q2Z4	+	+		
40S ribosomal protein S15	Rps15	P62843	+			
Phosphoacetylglucosamine mutase	Pgm3	Q8BWW3	+			
Myoglobin	Mb	P04247	+	+		
Active breakpoint cluster region-related protein	Abr	E9PUE7	+			

Proteinname	Gennname	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓
FAS-associated factor 1	Faf1	P54731	+			
Twinfilin-2	Twf2	Q9Z0P5	+			
N-acylglucosamine 2-epimerase	Renbp	D6RHA2	+			
40S ribosomal protein S13	Rps13	Q921R2	+	+		
Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2	Inpp1l	A0A087WPT7		+		
Synembryn-A	Ric8a	Q3TIR3	+			
Spermidine synthase	Srm	Q64674	+	+		
Aldose reductase-related protein 2	Akr1b8	P45377	+	+		
Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform	Ppp3ca	P63328	+			
60S ribosomal protein L5	Rpl5	P47962	+			
60S ribosomal protein L35	Rpl35	Q6ZVV7	+			
Adenylate kinase isoenzyme 1	Akl1	Q9R0Y5	+	+		
60S ribosomal protein L22	Rpl22	P67984	+	+		
T-complex protein 1 subunit alpha	Tcp1	P11983	+			
Glutathione S-transferase A4	Gsta4	P24472	+	+		
Importin-7	Ipo7	Q9EPL8	+	+		
Transgelin	Tagln	P37804	+	+		
E2/E3 hybrid ubiquitin-protein ligase UBE2O	Ube2o	Q6ZPJ3	+			
Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	Tars	Q9D0R2	+	+		
SPI6	Serpinb9	O08797	+			
Toll-interacting protein	Tollip	Q8C5G6	+			
PDZ and LIM domain protein 4	Pdlim4	P70271	+			
Striatin-3	Strn3	B2RQS1	+	+		
Cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic	Cars	Q9ER72	+	+		
Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	Gelc	P97494	+			
60S ribosomal protein L35a	Rpl35a	O55142	+			
Mitogen-activated protein kinase 1	Mapk1	P63085	+	+		
Protein farnesyltransferase subunit beta	Fntb	Q8K2I1	+			
Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1	Aimp1	Q3UZG4	+	+		
Elongation factor 1-gamma	Eef1g	Q9D8N0	+			
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J-A	Eif3j1	Q3UGC7	+	+		
40S ribosomal protein SA	Rpsa	P14206	+	+		
Carbonyl reductase [NADPH] 3	Cbr3	Q8K354	+	+		
T-complex protein 1 subunit epsilon	Cct5	P80316	+			
Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	Dync1li2	Q6PDL0	+			
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform	Ppp2r2a	Q6P1F6	+			

Proteinname	Gennname	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓
Oxysterol-binding protein 1	Osbp	Q3B7Z2	+			
Histidine--tRNA ligase, cytoplasmic	Hars	Q61035	+	+	+	
Peroxiredoxin-6	Prdx6	O08709	+	+		
Methylosome protein 50	Wdr77	Q99J09	+	+		
40S ribosomal protein S26	Rps26	P62855	+			
Heat shock-related 70 kDa protein 2	Hspa2	P17156	+	+		
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	Ppic	P30412	+			
Transcription factor BTF3 homolog 4	Btf314	Q9CQH7	+			
Phospholipase A-2-activating protein	Plaa	P27612	+	+		
Serine/threonine-protein phosphatase	Ppp5c	F7BX26	+			
Glutathione S-transferase omega-1	Gsto1	O09131	+	+		
Protein MEMO1	Memo1	Q91VH6	+	+		
Aldose reductase	Akr1b1	P45376	+	+		
Protein SEC13 homolog	Sec13	Q9D1M0	+			
Sorbitol dehydrogenase	Sord	Q64442	+	+		
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	Eif2s2	Q99L45	+			
Quinone oxidoreductase-like protein 1	Cryz11	Q921W4		+		
Serine/threonine-protein kinase OSR1	Oxsr1	Q6P9R2	+			
Proline synthase co-transcribed bacterial homolog protein	Prosc	A0A1B0GRP7	+	+		
Thioredoxin-like protein 1	Txn11	Q8CDN6	+	+		
Carbonyl reductase [NADPH] 1	Cbr1	P48758	+	+		
Chondroitin sulfate proteoglycan 4	Cspg4	Q8VHY0	+	+	+	
Guanidinoacetate N-methyltransferase	Gamt	O35969	+	+		
40S ribosomal protein S21	Rps21	Q9CQR2	+			
Glutathione reductase, mitochondrial	Gsr	P47791	+	+		
Echinoderm microtubule-associated protein-like 2	Eml2	E9QK48	+	+		
Pyruvate kinase PKM	Pkm	P52480	+	+		
Adenosine kinase	Adk	P55264	+			
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	Fkbp1a	P26883	+	+		
Microtubule-associated protein 1S	Map1s	Q8C052	+	+		
Protein arginine N-methyltransferase 5	Prmt5	Q8CIG8	+	+		
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5	Uchl5	Q9WUP7	+	+		
Sorting nexin-1	Snx1	Q6NZD2	+	+		
Eukaryotic translation initiation factor 2A	Eif2a	Q8BJW6	+	+		
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Vcp	Q01853	+	+		
Alpha-mannosidase	Man2c1	E9PZ88	+			
Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1	Eps1511	Q60902	+			
Nuclear protein localization protein 4 homolog	Nploc4	P60670	+			

Proteinname	Genname	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓
60S ribosomal protein L36	Rpl36	Q6ZWZ4	+			
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	Ppid	Q9CR16	+	+		
THUMP domain-containing protein 1	Thumpd1	Q99J36	+			
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	Fkbp4	P30416	+	+		
Flavin reductase (NADPH)	Blvrb	Q923D2	+	+		
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1	Pin1	Q9QUR7	+			
Plasminogen activator inhibitor 1	Serpine1	P22777	+	+	+	+
ATP-citrate synthase	Acly	Q3V117	+			
Density-regulated protein	Denr	Q9CQJ6	+	+		
Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	Pitpna	P53810	+	+		
28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein	Pdap1	Q3UHX2	+			
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3	Fkbp3	Q62446	+	+		
40S ribosomal protein S18	Gm10260	F6YVP7		+		
Moesin	Msn	P26041	+	+		
Methionine aminopeptidase 1	Metap1	Q8BP48	+			
Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	Nmt1	O70310	+			
COP9 signalosome complex subunit 1	Gps1	Q3MIA8	+	+		
Triosephosphate isomerase	Tpi1	P17751	+	+		
40S ribosomal protein S25	Rps25	P62852	+	+		
Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	Etf1	Q8BWY3	+	+		
Glycogen synthase kinase-3 beta	Gsk3b	E9QAQ5	+	+		
Septin-2	Sept2	P42208	+	+		
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	Ybx1	P62960	+	+		
General transcription factor IIF subunit 1	Gtf2f1	Q3THK3	+			
Acylamino-acid-releasing enzyme	Apeh	A0A0R4J107	+	+		
Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	Atic	Q9CWJ9	+	+		
Crk-like protein	Crkl	P47941	+	+		
Dynactin subunit 2	Dctn2	Q99KJ8	+	+		
Septin-8	Sept8	B7ZC46	+			
Histone H1.4	Hist1h1e	P43274	+	+		
AP-1 complex subunit mu-1	Ap1m1	P35585	+			
Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2	Wasf2	Q8BH43	+			
Omega-amidase NIT2	Nit2	Q9JHW2	+	+		
Protein phosphatase 1B	Ppm1b	Q99NF7	+	+		
Cellular nucleic acid-binding protein	Cnbp	A0A0N4SVS6	+			
Deoxyhypusine synthase	Dhps	Q3TXU5	+			
Macrophage-capping protein	Capg	Q99LB4	+	+		
Vacuolar protein sorting-associated protein 29	Vps29	D3Z645	+	+		

Proteinname	Genname	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	Usp5	Q3U4W8	+	+		
Neurolysin, mitochondrial	Nln	Q91YP2		+		
Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	Yars	Q91WQ3	+	+		
Microtubule-associated protein 1B	Map1b	P14873	+			
Vasorin	Vasn	Q9CZT5	+		+	
Talin-1	Tln1	P26039	+			
Protein mono-ADP-ribosyltransferase PARP3	Parp3	Q8CFB8	+			
Ribosome maturation protein SBDS	Sbds	P70122	+	+		
Four and a half LIM domains protein 2	Fhl2	O70433	+	+		
ADP-ribosylation factor-binding protein GGA1	Gga1	Q8R0H9	+			
Phosphoglucomutase-1	Pgm1	Q9D0F9	+	+		
Inositol-3-phosphate synthase 1	Isyn1	Q9JHU9	+	+		
Translation initiation factor eIF-2B subunit delta	Eif2b4	D3Z780	+			
Dihydropyrimidinase-related protein 3	Dpysl3	E9PWE8	+	+		
DNA damage-binding protein 1	Ddb1	Q3U1J4	+	+		
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5	Uba5	Q8VE47	+			
Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	Gart	Q64737	+	+		
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	Pafah1b1	P63005	+	+		
Eukaryotic translation initiation factor 6	Eif6	O55135	+	+		
Protein phosphatase 1F	Ppm1f	Q8CGA0		+		
Phosphomannomutase 2	Pmm2	Q9Z2M7		+		
Protein transport protein Sec23A	Sec23a	Q01405		+		
Geranylgeranyl transferase type-2 subunit alpha	Rabggt1	Q9JHK4	+	+		
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	Hmgcs1	Q8JZK9	+	+		
3(2),5-bisphosphate nucleotidase 1	Bpnt1	A0A1B0GRV0	+	+		
Sorting nexin-27	Snx27	A0A0G2JF85	+			
Radixin	Rdx	P26043	+	+		
Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	Aars	Q8BGQ7	+	+		
Lysine--tRNA ligase	Kars	Q99MN1	+	+		
Immunity-related GTPase family Q protein	Irgq	Q8VIM9	+	+		
WD repeat-containing protein 1	Wdr1	O88342	+	+		
Inorganic pyrophosphatase	Ppa1	Q9D819	+	+		
Tubulin--tyrosine ligase-like protein 12	Ttl12	Q3UDE2	+	+		
Eukaryotic translation initiation factor 5	Eif5	P59325	+	+		
Septin-9	Sept9	A2A6U3	+			
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	Pebp1	P70296	+	+		
Phosphoglucomutase-2	Pgm2	Q7TSV4	+	+		
E3 ubiquitin-protein ligase ARIH1	Arih1	Q9Z1K5	+			

Proteinname	Gennname	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓
High mobility group protein B1	Hmgb1	A0A0J9YUZ4	+	+		
Leucine-rich repeat-containing protein 47	Lrrc47	Q505F5	+	+		
Pyroline-5-carboxylate reductase 3	Pycrl	Q9DCC4	+	+		
F-actin-capping protein subunit beta	Capzb	P47757	+	+		
Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha	Sgta	Q8BJU0	+	+		
Diphosphomevalonate decarboxylase	Mvd	Q99JF5	+	+		
Serpin B6	Serpinb6	Q60854	+	+		
Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	Dync1i2	Q3TPJ8	+	+		
Programmed cell death 6-interacting protein	Pdcd6ip	Q9WU78	+	+		
Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog	Vta1	Q9CR26	+	+		
Putative hydroxypyruvate isomerase	Hyi	Q8R1F5	+	+		
WD repeat-containing protein 61	Wdr61	Q9ERF3	+			
Inosine triphosphate pyrophosphatase	Itpa	Q9D892	+	+		
AP-1 complex subunit beta-1	Ap1b1	Q5SVG5	+			
Nardilysin	Nrd1	A6PWC3	+	+	+	
Insulin-degrading enzyme	Ide	F6RPJ9	+			
Proteasome subunit beta type-6	Psmb6	Q60692	+	+		
TIP41-like protein	Tipr1	Q8BH58	+	+		
Methylthioribose-1-phosphate isomerase	Mri1	Q9CQT1	+	+		
Eukaryotic translation initiation factor 1A	Eif1a	Q60872	+	+		
Nitrilase homolog 1	Nit1	Q8VVK1	+	+		
Heat shock 70 kDa protein 4	Hspa4	Q3U2G2	+	+		
Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	Arpc1b	Q91Z25	+	+		
Vinculin	Vcl	Q64727	+	+		
Mitogen-activated protein kinase	Mapk3	D3Z3G6	+			
Ribosomal protein	Rp110a	Q5XJF6	+	+		
Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	Sars	Q8C483	+	+		
COP9 signalosome complex subunit 5	Cops5	O35864	+	+		
Cytoplasmic aconitate hydratase	Aco1	P28271	+	+		
Puromycin-sensitive aminopeptidase	Npepps	Q11011	+	+		
Glutathione S-transferase Mu 1	Gstm1	P10649		+		
Poly(ADP-ribose) glycohydrolase ARH3	Adprh12	Q8CG72		+		
[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase	Adprh	P54923	+	+		
Nicotinamide phosphoribosyltransferase	Nampt	Q99KQ4	+	+		
Beta-centractin	Actr1b	Q8R5C5	+	+		
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	Eif3g	Q9Z1D1	+	+		
Nischarin	Nisch	Q80TM9	+			

Proteinname	Gennamen	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓
Drebrin-like protein	Dbnl	Q62418	+			
Proteasome assembly chaperone 1	Psmg1	D3Z795	+	+		
Endothelial differentiation-related factor 1	Edf1	Q9JMG1	+	+		
GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	Gmps	Q3THK7	+	+		
Aminopeptidase B	Rnpep	Q8VCT3	+	+		
Coronin-1B	Coro1b	Q9WUM3	+	+		
Glucose-6-phosphate isomerase	Gpi	P06745	+	+		
CTP synthase 1	Ctps1	P70698	+	+		
GTP-binding nuclear protein Ran	Ran	P62827	+	+		
Secernin-1	Scrn1	Q9CZC8	+	+		
Heat shock protein HSP 90-alpha	Hsp90aa1	P07901	+	+		
PDZ and LIM domain protein 1	Pdlim1	O70400	+	+		
Phosphoglycerate kinase 1	Pgk1	P09411	+	+		
UV excision repair protein RAD23 homolog B	Rad23b	P54728	+			
Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	Cand1	Q6ZQ38	+	+		
Nucleosome assembly protein 1-like 4	Nap1l4	B7ZNL2	+	+		
Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	Acat2	Q8CAY6	+	+		
Adenosylhomocysteinase	Ahcy	P50247	+	+		
Proteasome subunit alpha type-6	PsmA6	Q9QUM9	+	+		
Niban-like protein 1	Fam129b	Q8R1F1	+			
Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1	Chordc1	Q9D1P4	+			
Protein CREG1	Creg1	O88668	+		+	
Transcriptional activator protein Pur-beta	Purb	O35295	+	+		
Glutathione synthetase	Gss	P51855	+	+		
Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2	Pacsin2	Q9WVE8	+	+		
Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase FTO	Fto	Q8BGW1	+			
Sulfite oxidase, mitochondrial	Suox	Q8R086		+		
Dynactin subunit 4	Dctn4	Q8CBY8	+			
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	Ptpn11	P35235	+	+		
Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	Got1	P05201	+	+		
Proteasome subunit beta type-5	PsmB5	O55234	+	+		
Protein PBDC1	Pbdc1	Q9D0B6	+			
NHL repeat-containing protein 2	Nhlre2	Q8BZW8	+	+		
N-alpha-acetyltransferase 50	Naa50	Q6PGB6	+	+		
Spermine synthase	Sms	P97355	+	+		
Transketolase	Tkt	P40142	+	+		
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3	Ube2d3	A0A0G2JE32	+	+		

Proteinname	Genname	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓
Elongation factor 1-beta	Eef1b	O70251	+	+		
Adenylosuccinate lyase	Adsl	P54822	+	+		
Carbonic anhydrase 3	Ca3	P16015	+	+		
Exportin-2	Cse1l	Q9ERK4		+		
Alpha-actinin-1	Actn1	Q7TPR4		+		
Probable aminopeptidase NPEPL1	Npepl1	Q6NSR8	+	+		
Nuclear migration protein nudC	Nudc	O35685	+	+		
Phosphoserine aminotransferase	Psat1	Q99K85	+	+		
Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog	Sugt1	Q9CX34	+	+		
COP9 signalosome complex subunit 3	Cops3	O88543	+	+		
Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein	Gabarap	Q9DCD6		+		
Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	Mapre1	Q61166	+	+		
L-lactate dehydrogenase B chain	Ldhb	P16125	+	+		
Nucleoside diphosphate kinase A	Nme1	P15532	+	+		
Inositol monophosphatase 1	Impa1	Q924B0	+	+		
Serine-threonine kinase receptor-associated protein	Strap	Q9Z1Z2	+	+		
Fascin	Fscn1	Q61553	+	+		
Protein-methionine sulfoxide oxidase MICAL1	Mical1	E9PUI4	+	+		
von Willebrand factor A domain-containing protein 5A	Vwa5a	Q99KC8	+	+		
Protein transport protein Sec23B	Sec23b	Q9D662	+	+		
NAD(P)H-hydrate epimerase	Apoa1bp	Q8K4Z3	+	+		
NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit	Uba3	Q3TL72	+	+		
Ribonuclease inhibitor	Rnh1	Q91VI7	+	+		
Malate dehydrogenase, cytoplasmic	Mdh1	P14152	+	+		
Beta-lactamase-like protein 2	Lactb2	Q99KR3	+	+		
S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	Mat2a	Q3THS6	+	+		
cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	Prkar2a	A0A0A6YX73	+			
Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	Ahsa1	Q8BK64	+	+		
NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit	Nae1	Q8VBW6	+	+		
Cytochrome c, somatic	Cycs	P62897	+	+		
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15	Usp15	Q8R5H1	+			
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase X	G6pdx	Q00612	+	+		
Non-specific serine/threonine protein kinase	Pak1	G5E884	+	+		
Methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	Apip	Q9WVQ5	+	+		
Dipeptidyl peptidase 9	Dpp9	Q8BVG4	+	+		
14 kDa phosphohistidine phosphatase	Phpt1	Q9DAK9	+	+		
COP9 signalosome complex subunit 2	Cops2	P61202	+	+		

Proteinname	Gennamen	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓
Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A	Arpc1a	A0A0G2JF52	+			
Selenide, water dikinase 1	Sephs1	Q8BH69		+		
Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1	Ufc1	Q9CR09	+	+		
Sialic acid synthase	Nans	Q99J77	+	+		
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	Eif3f	Q9DCH4	+	+		
CAP-Gly domain-containing linker protein 1	Clip1	D3Z3M7	+			
Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	Txnrd1	Q9JMH6	+	+		
Eukaryotic translation initiation factor 4E	Eif4e	P63073	+			
Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	G3bp2	P97379	+			
Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	Hagh	E9PYA3	+	+		
Semaphorin-4C	Sema4c	Q64151		+	+	
Serine hydroxymethyltransferase	Shmt1	G3UZ26	+	+		
COP9 signalosome complex subunit 6	Cops6	D3Z0F5		+		
Obg-like ATPase 1	Ola1	Q9CZ30	+	+		
NSFL1 cofactor p47	Nsfl1c	Q9CZ44	+	+		
Translin	Tsn	Q62348		+		
Semaphorin-7A	Sema7a	Q9QUR8	+	+	+	
Xaa-Pro dipeptidase	Pepd	Q11136	+	+		
Putative deoxyribonuclease TATDN1	Tatdn1	A0A0R4J1E8		+		
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Arhgdia	Q99PT1	+	+		
Collagen type V alpha 3 chain	Col5a3	Q9JLI2		+	+	+
Dipeptidyl peptidase 3	Dpp3	Q99KK7	+	+		
Fatty acid synthase	Fasn	P19096	+	+		
Lactoylglutathione lyase	Glo1	Q9CPU0	+	+		
Cytosolic non-specific dipeptidase	Cndp2	Q9D1A2	+	+		
Phosphoglycolate phosphatase	Pgp	Q8CHP8	+	+		
Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 3	Alkbh3	A2AKV7	+	+		
DCC-interacting protein 13-alpha	App11	Q8K3H0	+	+		
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM4	Lsm4	D3YTP8	+	+		
COP9 signalosome complex subunit 4	Cops4	O88544		+		
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23	Ptpn23	Q6PB44	+			
Adenylyl cyclase-associated protein 1	Cap1	P40124	+	+		
Cysteine and glycine-rich protein 2	Csrp2	P97314	+			
Cystatin-B	Cstb	Q62426	+	+		
COP9 signalosome complex subunit 7a	Cops7a	D3Z440	+	+		
Proteasome subunit alpha type-5	Psma5	Q9Z2U1	+	+		
Dipeptidyl peptidase 2	Dpp7	Q9ET22		+	+	

Proteinname	Genname	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓
Alcohol dehydrogenase class-3	Adh5	P28474	+	+		
Proteasome subunit alpha type-1	Psmal	Q9R1P4	+	+		
Ester hydrolase C11orf54 homolog	N/A	Q91V76	+	+		
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	Arcp5	Q9CPW4		+		
Xaa-Pro aminopeptidase 1	Xpnpep1	S4R1I3	+	+		
Tropomyosin alpha-4 chain	Tpm4	Q6IRU2	+	+		
Hepatoma-derived growth factor	Hdgf	P51859	+	+		
Transaldolase	Taldo1	A0A1B0GR11	+	+		
Methionine aminopeptidase 2	Metap2	Q3UI33	+	+		
Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	Prpsap2	Q8R574	+	+		
Tubulin-folding cofactor B	Tbcb	Q9D1E6	+			
Nucleosome assembly protein 1-like 1	Nap111	P28656	+	+	+	
Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit	Ppp6c	Q9CQR6	+	+		
Actin-like protein 6A	Actl6a	Q9Z2N8		+		
Actin-related protein 3	Actr3	Q99JY9	+	+		
Sorting nexin-12	Snx12	Q6ZWQ5	+	+		
Transgelin-2	Tagln2	Q9WVA4	+	+		
Protein RCC2	Rcc2	Q8BK67	+	+		
Glycogen phosphorylase, brain form	Pygb	Q8C194	+	+		
Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	Grhpr	Q91Z53	+	+		
Probable C->U-editing enzyme APOBEC-2	Apobec2	Q9WV35	+	+		
Phosphoserine phosphatase	Psph	Q99LS3	+	+		
Vascular cell adhesion protein 1	Vcam1	Q3UPN1	+	+	+	
Prefoldin subunit 3	Vbp1	P61759	+	+		
MOB kinase activator 1A	Mob1b	Q3UDM0	+	+		
Dynein light chain roadblock-type 1	Dynlrb1	P62627	+	+		
Coatmer subunit delta	Arcn1	Q5XJY5	+	+		
Hsp90 co-chaperone Cdc37	Cdc37	Q61081	+	+		
Glutathione S-transferase P 1	Gstp1	P19157	+	+		
Bleomycin hydrolase	Blmh	Q8R016	+	+		
Transcription elongation factor B polypeptide 2	Tceb2	P62869		+		
Aspartyl aminopeptidase	Dnpep	Q3TVK3	+	+		
Cysteine-rich protein 1	Crip1	A0A0G2JEK2	+	+		
N-acetyl-D-glucosamine kinase	Nagk	D3YXG2	+			
Dual specificity protein phosphatase 3	Dusp3	Q9D7X3	+	+		
Fumarylacetoacetase	Fah	P35505	+	+		
Cellular nucleic acid-binding protein	Cnbp	P53996	+	+		
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	Idh1	O88844	+	+		

Proteinname	Gennamen	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓
Galectin-1	Lgals1	P16045	+	+		
Uridine diphosphate glucose pyrophosphatase	Nudt14	Q9D142		+		
Malignant T-cell-amplified sequence 1	Mcts1	Q9DB27	+	+		
Phosphoribosylformylglycinamidase synthase	Pfas	Q5SUR0	+	+		
AP-1 complex subunit gamma-1	Ap1g1	Q8CBB7	+	+		
Protein mago nashi homolog 2	Magohb	G3UZW7		+		
Nidogen-1	Nid1	P10493	+	+	+	+
Chromobox protein homolog 3	Cbx3	Q9DCC5	+	+		
Cysteine and glycine-rich protein 1	Csrp1	P97315	+	+		
Alpha-enolase	Eno1	P17182	+	+		
Translationally-controlled tumor protein	Tpt1	P63028	+	+		
Rab GDP dissociation inhibitor beta	Gdi2	Q61598	+	+		
Argininosuccinate lyase	Asl	Q91Y10	+	+		
Transmembrane protein 132A	Tmem132a	D3Z4S6		+	+	+
Proteasome subunit alpha type-2	Psm2	P49722	+	+		
Secernin-2	Scrn2	Q8VCA8	+	+		
Histone H1.5	Hist1h1b	P43276	+	+		
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	Usp14	E9PYI8	+	+		
Latent-transforming growth factor beta-binding protein 4	Ltbp4	D3Z598		+	+	+
Proteasome subunit beta type-3	Psm3	Q9R1P1	+	+		
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	Uchl3	Q9JKB1	+	+		
S-methyl-5-thioadenosine phosphorylase	Mtap	Q9CQ65	+	+		
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	Eif5a	P63242	+	+		
Protein SET	Set	A2BE93	+	+		
Serine/threonine-protein kinase 24	Stk24	Q99KH8	+	+		
Leukotriene A-4 hydrolase	Lta4h	P24527	+	+		
Tropomyosin alpha-3 chain	Tpm3	E9Q7Q3		+		
Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	Pcmt1	F7D432	+			
Tether containing UBX domain for GLUT4	Aspser1	Q8VBT9	+			
Histone-binding protein RBBP4	Rbbp4	Q60972	+	+		
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	Ube2k	P61087	+	+	+	
NEDD8-conjugating enzyme Ubc12	Ube2m	P61082	+	+		
High mobility group protein B2	Hmgb2	P30681	+	+		
Gamma-enolase	Eno2	P17183	+	+		
UMP-CMP kinase	Cmpk1	Q9DBP5	+	+		
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	Ppp2r1a	Q76MZ3		+		
F-actin-capping protein subunit alpha-2	Capza2	P47754	+	+		

Proteinname	Genname	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓
Rho guanine nucleotide exchange factor 7	Arhgef7	A0A0R4J0X8		+		
Ribose-5-phosphate isomerase	Rpia	P47968	+			
Proteasome subunit alpha type-4	PsmA4	Q9R1P0	+	+		
Gelsolin	Gsn	P13020	+	+	+	+
Histone-binding protein RBBP7	Rbbp7	A2AFJ1	+			
Profilin-1	Pfn1	P62962	+			
Protein deglycase DJ-1	Park7	Q99LX0	+	+		
Proteasome subunit beta type-1	Psmb1	O09061	+	+		
Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	Iah1	Q9DB29		+		
Dihydropteridine reductase	Qdpr	Q8BV14	+	+		
Proteasome activator complex subunit 3	PsmE3	P61290		+		
Proteasome subunit alpha type-7	PsmA7	Q9Z2U0	+	+		
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4	Pin4	Q9CWW6		+		
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	Ube2l3	P68037	+	+		
Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	Akr1a1	Q9JH6	+	+		
Thrombospondin-2	Thbs2	Q03350		+	+	+
Proliferation-associated protein 2G4	Pa2g4	P50580	+	+		
Pyridoxal phosphate phosphatase	Pdpx	P60487	+	+		
Adapter molecule crk	Crk	Q64010	+	+		
BRO1 domain-containing protein BROX	Brox	Q8K2Q7	+	+		
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	Eif3l	Q8QZY1		+		
Spondin-2	Spon2	Q8BMS2		+	+	+
Translin-associated protein X	Tsnax	Q9QZE7	+	+		
Inositol polyphosphate 1-phosphatase	Inpp1	P49442		+		
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Sod1	P08228	+	+		
Histone H1.2	Hist1h1c	P15864	+	+		
Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2	Hdh2	Q3UGR5	+	+		
Proteasome activator complex subunit 1	PsmE1	G3UXZ5		+		
Proteasome subunit alpha type-3	PsmA3	O70435	+	+		
Growth factor receptor-bound protein 2	Grb2	Q60631	+	+		
Pyridoxal kinase	Pdpx	Q8K183	+	+		
Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	Ppp2ca	P63330		+		
Coatmer subunit epsilon	Cope	O89079		+		
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	Ube2n	P61089	+	+		
Proteasome subunit beta type-7	Psmb7	P70195	+	+		
Cofilin-2	Cfl2	P45591	+	+		
Phosphoglycerate mutase 1	Pgam1	Q9DBJ1	+	+		

Proteinname	Gennname	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	Anp32a	F6UFG6	+			
Ferritin	Ftl1	Q9CPX4		+		
Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A	Map1lc3a	Q91VR7		+		
Peroxisredoxin-5, mitochondrial	Prdx5	P99029		+		
Ras suppressor protein 1	Rsu1	Q9D031	+	+		
Putative hydrolase RBBP9	Rbbp9	O88851		+		
Stathmin	Stmn1	D3Z1Z8		+		
Integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C	Ilkap	Q8R0F6	+			
Carbonic anhydrase 13	Ca13	Q9D6N1	+	+		
Protein FAM49B	Fam49b	Q921M7	+	+		
Nuclear receptor-binding protein	Nrbp1	D3YUV1	+			
Hsp70-binding protein 1	Hspbp1	Q99P31		+		
N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	Ddah1	Q9CWS0	+	+		
Alpha-actinin	Actr1a	P61164	+	+		
Porphobilinogen deaminase	Hmbs	P22907	+	+		
Chloride intracellular channel protein 4	Clic4	Q9QYB1	+	+		
Guanylate kinase	Guk1	Q64520	+	+		
Glutathione S-transferase Mu 2	Gstm2	P15626		+	+	
6-phosphogluconolactonase	Pgls	Q9CQ60	+	+		
LanC-like protein 1	Lancl1	O89112		+		
Sorbin and SH3 domain-containing protein 2	Sorbs2	B2RXQ9		+		
Translation initiation factor eIF-2B subunit epsilon	Eif2b5	Q8CHW4	+			
Sepiapterin reductase	Spr	Q91XH5	+	+		
Parkinson disease 7 domain-containing protein 1	Pdpc1	Q8BFQ8		+	+	
COP9 signalosome complex subunit 8	Cops8	Q8VBV7		+		
Ubiquitin thioesterase OTUB1	Otub1	Q7TQI3		+		
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa	Ptprk	P35822		+	+	
Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2	Bzw2	Q91VK1	+			
Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	Ppp2r4	P58389	+	+		
Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 1	Nudt3	I1E4X7		+		
SUMO-conjugating enzyme UBC9	Ube2i	P63280	+	+		
Nucleoredoxin	Nxn	P97346	+			
Magnesium-dependent phosphatase 1	Mdp1	Q9D967	+	+		
Adenylate kinase 2, mitochondrial	Ak2	Q9WTP6		+		
D-dopachrome decarboxylase	Ddt	O35215	+	+		
14-3-3 protein beta/alpha	Ywhab	Q9CQV8		+		
14-3-3 protein gamma	Ywhag	P61982		+		

Proteinname	Gencode	Uniprot ID	↑ Sekretom (+P)	↑ Sekretom (K)	Signalpeptid (SignalP)	+ BFA ↓
DCN1-like protein 1	Dcun1d1	Q9QZ73		+		
Acyl-CoA-binding protein	Dbi	P31786		+		
UPF0587 protein C1orf123 homolog	0610037L13Rik	A2A8E2		+		
Histone H1.0	H1f0	P10922	+	+		
Copper transport protein ATOX1	Atox1	O08997		+		

Tabelle 24: Proteinliste der potentiell redox-vermittelten Proteininteraktionspartner von Mif

Proteinname	Genname	Uniprot ID	Mif-GFP C57 mut/Mif-GFP		Mif-GFP C60 mut/Mif-GFP		Mif-GFP C81 mut/Mif-GFP	
			p-Wert	Fold Change	p-Wert	Fold Change	p-Wert	Fold Change
Septin-9	Sept9	A2A6U3			0,0017	-1,62		
ATP-binding cassette sub-family F member 1	Abcf1	Q6P542	0,0034	1,58				
THO complex subunit 4	Alyref	O08583			0,0178	1,29		
Annexin A2	Anxa2	P07356			0,0106	-1,20		
Ataxin-2-like protein	Atxn2l	Q3TGG2	0,0010	1,92				
Brain acid soluble protein 1	Basp1	Q91XV3			0,0077	-1,83		
Bcl-2-associated transcription factor 1	Bclaf1	Q8K019			0,0334	-1,94	0,0003	-2,25
Bromodomain-containing protein 2	Brd2	Q7JU13			0,0161	-1,71	0,0001	-3,37
Caldesmon 1	Cald1	Q8VCQ8			0,0164	-1,53		
Cadherin-15	Cdh15	P33146			0,0126	-1,12		
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	Chd4	E9QAS4			0,0182	1,55		
Cold shock domain-containing protein E1	Csde1	A0A0G2JF72	0,0036	2,27	0,0168	1,66		
Pre-mRNA-splicing factor CWC22 homolog	Cwc22	B1AYU4			0,0217	1,47		
Protein DEK	Dek	Q7TNV0	0,0016	1,65	0,0071	1,24		
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	Eftud2	G3UZ34	0,0169	1,26				
Eukaryotic translation initiation factor 2A	Eif2a	Q8BJW6	4,79E-06	3,35	0,0005	2,99	0,0027	1,86
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	Eif2s2	Q99L45	0,0086	2,30				
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	Eif3b	Q8JZQ9			0,0006	-0,81		
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	Eif3c	Q8R1B4			0,0008	-0,97	0,0011	-1,54
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	Eif3h	Q91WK2	0,0009	1,23				
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	Eif3i	Q9QZD9					0,0054	-1,14
Eukaryotic translation initiation factor 4B	Eif4b	Q8BGD9	0,0018	1,37				
Eukaryotic translation initiation factor 5B	Eif5b	Q05D44	0,0003	2,32				
Band 4.1-like protein 2	Epb4112	O70318			0,0076	-0,84	0,0005	-1,43
Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	Etfdh	Q6PF96	0,0010	1,49				
Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	FAM120A	Q6A0A9	0,0233	1,58	0,0088	1,68		
Fatty acid synthase	Fasn	P19096			0,0003	-2,03	0,0028	-1,72
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	Fxr1	Q61584	0,0015	2,66	0,0011	2,37	0,0029	2,16
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3bp1	P97855	0,0073	1,86	0,0043	1,85	0,0056	1,63
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	Glud1	P26443	0,0031	-1,25				
Glypican-1	Gpc1	Q9QZF2			0,0003	2,47		
Vigilin	Hdlbp	Q8VDJ3	0,0008	2,24				
Hexokinase;Hexokinase-1	Hk1	G3UVV4	0,0032	-1,10	0,0042	-0,91		
Hexokinase;Hexokinase-2	Hk2	E9Q5B5					0,0014	-1,42

Proteinname	Genname	Uniprot ID	Mif-GFP C57 mut/Mif-GFP		Mif-GFP C60 mut/Mif-GFP		Mif-GFP C81 mut/Mif-GFP	
			p-Wert	Fold Change	p-Wert	Fold Change	p-Wert	Fold Change
Heterochromatin protein 1-binding protein 3	Hp1bp3	Z4YKB8	1,51E-05	3,75				
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	Igf2bp2	Q5SF07			0,0046	2,06		
Interleukin enhancer-binding factor 3	Ilf3	Q45VK5			0,0104	1,87		
Lysine--tRNA ligase	Kars	Q8R2P8	0,0002	2,22				
La-related protein 1	Larp1	Z4YJT3			0,0157	1,50		
LIM and SH3 domain protein 1	Lasp1	Q61792			0,0183	-1,59		
Calcium uptake protein 2, mitochondrial	Micu2	Q8CD10			0,0122	1,14		
Macrophage migration inhibitory factor	Mif	P34884			0,0218	-3,14		
Protein LYRIC	Mtdh	Q80WJ7	1,64E-05	3,35	3,95E-05	3,48		
Myb-binding protein 1A	Mybbp1a	Q7TPV4	0,0059	2,39	0,0043	2,16		
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha;Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	Naca	Q60817	0,0154	1,47				
Nucleolin	Ncl	P09405	0,0003	2,78	0,0006	1,97	0,0012	1,83
Nestin	Nes	Q6P5H2	1,94E-06	2,81	1,28E-07	3,61	0,0000	2,79
Non-POU domain-containing octamer-binding protein	Nono	Q99K48	0,0028	1,94	0,0008	2,57		
Protein disulfide-isomerase A4	Pdia4	Pdia5	0,0038	2,72				
Plectin	Plec	Q9QXS1	0,0002	3,67	1,75E-05	4,70	0,0001	3,71
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	Ppib	P24369	0,0003	2,62	0,0014	2,48		
U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3	Prpf3	Q922U1			0,0103	2,05		
PC4 and SFRS1-interacting protein	Psip1	Q99JF8	0,0001	1,87	0,0173	1,97		
Polypyrimidine tract-binding protein 1	Ptbp1	Q8BGJ5	0,0304	2,39				
Polypyrimidine tract-binding protein 3	Ptbp3	G8JL74	0,0166	1,37	0,0244	1,82		
Polymerase I and transcript release factor	Ptrf	O54724	0,0253	1,73			0,0008	2,67
Transcriptional activator protein Pur-beta	Purb	O35295			0,0167	2,47		
Ribosome-binding protein 1	Rrbp1	A2AVJ7	0,0007	2,20				
Septin-10	Rrbp1	A2AVJ7			0,0152	1,47		
Ribosomal L1 domain-containing protein 1	Rsl1d1	Q8BVY0	0,0223	2,06				
Serum deprivation-response protein	Sdpr	Q63918			0,0065	1,74		
Serpin H1	Serpinh1	P19324			0,0004	-1,50		
Splicing factor 3b, subunit 2	Sf3b2	Q3UJB0	0,0008	2,16				
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	Sfpq	Q8VIJ6			0,0003	2,07		
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	Snrpd3	P62320			0,0166	1,81		
Sorting nexin-9	Snx9	Q91VH2	0,0002	-2,45	0,0004	-2,76	0,0000	-2,86
Sorbin and SH3 domain-containing protein 2	Sorbs2	B9EKP8			0,0025	3,92	0,0142	2,61
Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	Sptan1	A3KGU5	2,90E-05	4,19	8,65E-05	5,79	0,0001	4,99
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	Sptbn1	Q62261	1,96E-05	4,09	1,45E-06	5,80	0,0000	5,19
Signal recognition particle subunit SRP72	Srp72	F8VQC1	0,0045	1,87				

Proteinname	Genname	Uniprot ID	Mif-GFP C57 mut/Mif-GFP		Mif-GFP C60 mut/Mif-GFP		Mif-GFP C81 mut/Mif-GFP	
			p-Wert	Fold Change	p-Wert	Fold Change	p-Wert	Fold Change
Serine/arginine repetitive matrix protein 2	Srrm2	Q8BTI8			0,0158	2,27	0,0064	2,71
Serrate RNA effector molecule homolog	Srrt	Q99MR6	0,0057	-2,02	0,0009	-2,25	0,0003	-2,47
Serine/arginine-rich splicing factor 4	Srsf4	Q542V3	0,0179	1,32				
Serine/arginine-rich splicing factor 5	Srsf5	Q9D8S5	0,0093	2,50	0,0314	2,27		
Lupus La protein homolog	Ssb	P32067	0,0004	3,37	0,0055	2,96		
Serine/threonine-protein kinase TAO1	Taok1	Q5F2E8	0,0061	2,10	0,0158	2,17		
Tight junction protein ZO-1	Tjp1	B9EHJ3	0,0007	-2,00	0,0017	-2,55	0,0000	-2,85
Tight junction protein ZO-2	Tjp2	Q9Z0U1	0,0003	-2,32	0,0021	-2,72	0,0001	-3,04
Troponin T, cardiac muscle	Tnnt2	K3W4R6	0,0340	2,16				
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Uqcrc2	Q9DB77	0,0041	-0,74	0,0002	-1,04	0,0002	-0,95
Valine--tRNA ligase	Vars	Q9Z1Q9			0,0111	-1,24		
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	Vat1	Q62465			0,0049	-1,55		
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	Ybx1	P62960	1,14E-05	2,95	0,0001	2,07	0,0020	1,44
Y-box-binding protein 3	Ybx3	Q9JKB3			0,0015	2,43		
Zyxin	Zyx	Q62523	3,05E-05	-1,88	0,0001	-3,27	0,0002	-2,07

Veröffentlichung

Teile der Dissertation stammen aus der Publikation Grube *et al.* 2018. Es wurden die Ergebnisse sowie Teile der Diskussion aus diesem Manuskript übernommen. Die Planung und Durchführung der Zellkultur-Experimente, molekulare biologischen- sowie die massenspektrometrischen Arbeiten erfolgten durch Frau Grube. Konkret umfasste diese Arbeiten die Kultivierung, Ausdifferenzierung und Behandlung der murinen C2C12 Skelettmuskelzellen, die Generierung des Sekretoms sowie die Ernte des zellulären Proteoms. Die anschließende Probenvorbereitung sowie die Analyse mittels Massenspektrometrie wurden von Frau Grube durchgeführt. Die Datenanalyse und Auswertung sowie die weiterführende bioinformatische Datenauswertung, die Erstellung der Abbildungen und das Verfassen des Manuskripts erfolgten durch Frau Grube und Herrn Dr. Gereon Poschmann gemeinsam. Des Weiteren war Frau Grube Erstautorin des Manuskriptes.

Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Kai Stühler für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung dieser Arbeit, die vielen lehrreichen Diskussionen und hervorragenden Anregungen danken. Unsere Dialoge habe ich stets als Ermutigung und Motivation empfunden.

Prof. Dr. Mathias Beller möchte ich für seine hilfreichen Ratschläge, die konstruktiven Diskussionen und die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Gereon Poschmann, der mich stets inspiriert und über meine gesamte Promotion kompetent betreut hat. Vielen Dank für die wertvollen Ratschläge und Hilfestellungen, die mir einen Zugang zum Forschungsgebiet der Proteinanalytik mittels Massenspektrometrie eröffnet haben.

Bei meinen Kollegen des Molecular Proteomics Laboratory möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung und die stete Hilfsbereitschaft bedanken. Für die ausführliche und kompetente Einarbeitung danke ich Eva Bruns. Mein besonderer Dank gilt meinen Bürokollegen Nina Schmidt, Omid Etemad-Parishanzadeh und Maike Langini für den konstruktiven Austausch, die gute Teamarbeit und die tolle gemeinsame Zeit. Dr. Anja Stefanski und Dr. Daniel Waldera-Lupa danke ich für die vielen wertvollen Ratschläge während meiner Zeit am MPL. Die gute Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe sowie die inspirierende Arbeitsatmosphäre haben wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Meiner ganzen Familie möchte ich für die Unterstützung während meines gesamten Studiums danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre! Zudem danke ich insbesondere meinen Eltern Karin und John und meinen beiden Brüdern Julian und Niels für ihr stets offenes Ohr und die liebevolle Unterstützung. Danke auch an meine Freundinnen dafür, dass ihr mich immer motiviert und an mich glaubt.

Außerordentlicher Dank gilt Christian Gierlich für seine unendliche Geduld, die zahlreichen Diskussionen und seine bedingungslose Unterstützung während meiner Promotion. Danke!

Eidesstaatliche Erklärung

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

Düsseldorf, den

Leonie Grube