

**Charakterisierung der Redoxsensitivität und  
Funktion des *macrophage capping protein* (CAPG)  
in humanen Glioblastomzelllinien**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Nina Prescher**  
aus Bischkek

Düsseldorf, April 2020

aus dem Molecular Proteomics Laboratory  
des Instituts für Molekulare Medizin I  
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. APL-Prof. Dr. Peter Jahns
3. Prof. Dr. Georg Groth

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2020

Für meine Familie

*„Man merkt nie, was schon getan wurde,  
man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.“*

**Marie Curie**

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	i
Summary .....	iii
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Reaktive Sauerstoffspezies und ihre Entstehung .....	1
1.2 Funktion und Regulation von ROS.....	3
1.3 Posttranslationale Modifikation von Proteinen .....	6
1.3.1 Oxidative posttranslationale Modifikation von Proteinen.....	6
1.3.2 Oxidative posttranslationale Cysteinmodifikationen .....	6
1.4 Das Aktinfilamentsystem.....	8
1.5 Regulation der Aktinpolymerisation durch aktinbindende Proteine .....	10
1.6 Das humane Protein CAPG .....	12
1.7 Regulation der Aktinpolymerisation durch ROS.....	14
1.8 Die Bedeutung von ROS in Tumorzellen .....	16
1.8.1 Die Rolle von CAPG in Tumorzellen .....	17
1.8.2 Epidemiologie von Gliomen .....	18
1.8.3 Glioblastomzelllinien als Modellsystem .....	19
1.9 Proteomanalyse.....	20
1.9.1 Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie .	21
1.9.2 Analyse von oxidativen Cysteinmodifikationen mittels Massenspektrometrie .....	25
<b>2 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>29</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>31</b>
3.1 Material.....	31
3.1.1 Geräte .....	31
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	32
3.1.3 Chemikalien.....	33
3.1.4 Puffer und Lösungen .....	35
3.1.5 Größenstandards .....	39

---

3.1.6	Antikörper .....	39
3.1.7	Plasmide .....	40
3.1.8	Primer .....	40
3.1.9	Software.....	40
3.2	Methoden .....	41
3.2.1	Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden.....	41
3.2.1.1	Bakterienstämme .....	41
3.2.1.2	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	41
3.2.1.3	Retransformation von <i>E. coli</i> -Zellen mittels Hitzeschock.....	42
3.2.1.4	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mittels Hitzeschock.....	42
3.2.1.5	Vorkultur.....	42
3.2.1.6	Hauptkultur .....	42
3.2.1.7	Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen.....	43
3.2.1.8	Plasmid-DNA-Präparation.....	43
3.2.1.9	DNA-Konzentrationsbestimmung .....	43
3.2.1.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	43
3.2.1.11	Mutagenese .....	45
3.2.1.12	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	46
3.2.1.13	Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4-DNA-Ligase .....	47
3.2.1.14	Agarosegelelektrophorese.....	48
3.2.1.15	Geextraktion linearer DNA-Fragmente .....	48
3.2.1.16	DNA-Sequenzierung .....	48
3.2.1.17	Bakterielle Expression und Aufreinigung des Zielproteins CAPG .....	49
3.2.2	Zellbiologische Methoden.....	50
3.2.2.1	Zelllinien.....	50
3.2.2.2	Wasserstoffperoxidbehandlung von Zellen .....	51
3.2.2.3	Bestimmung der Viabilität und der Zellzahl mit Trypanblau.....	51
3.2.2.4	Passagieren von Zellen .....	51

3.2.2.5	Zelltransfektion mittels Lipofectamine®3000.....	52
3.2.2.6	Kryokonservierung .....	52
3.2.3	Histologische Methoden.....	53
3.2.3.1	Immunhistochemische Färbungen .....	53
3.2.4	Proteinbiochemische und immunologische Methoden.....	54
3.2.4.1	Zellernte.....	54
3.2.4.2	Mechanischer Zellaufschluss.....	54
3.2.4.3	Probenvorbereitung für die globale Analyse von reversiblen Cysteinmodifikationen .....	54
3.2.4.4	Subzelluläre Fraktionierung.....	56
3.2.4.5	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	56
3.2.4.6	Abtrennung von überschüssigen Pufferkomponenten mit niedrigem Molekulargewicht mittels Gelfiltration .....	56
3.2.4.7	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	57
3.2.4.8	Coomassie-Färbung .....	57
3.2.4.9	Silberfärbung .....	57
3.2.4.10	<i>Semidry</i> Western Blot .....	58
3.2.4.11	Immunpräzipitation von GFP und GFP-Fusionsproteinen .....	59
3.2.4.12	Polyethylenglykol (PEG)- <i>Switch Assay</i> .....	59
3.2.4.13	Immunzytochemische Färbungen .....	60
3.2.4.14	Mikroskopie .....	61
3.2.4.15	Konfokal-Mikroskopie.....	61
3.2.4.16	Lebendzell-Mikroskopie .....	61
3.2.4.17	Molekulardynamik (MD)-Simulation .....	62
3.2.4.18	Aktinpolymerisations-/depolymerisationsassay .....	62
3.2.4.19	<i>Scratch Assay</i> .....	62
3.2.5	LC-MS/MS-Analysen .....	63
3.2.5.1	Probenvorbereitung für den In-Gel-Verdau.....	63

3.2.5.2	Reduzieren und Alkylieren der Banden.....	63
3.2.5.3	Proteolytischer Verdau .....	64
3.2.5.4	Peptidextraktion.....	64
3.2.5.5	Massenspektrometrie .....	64
3.2.5.5.1	Flüssigkeitschromatographie .....	64
3.2.5.5.2	Massenspektrometrische Analyse.....	66
3.2.6	Bioinformatische Datenanalyse.....	68
3.2.6.1	Massenspektrometrische Proteinidentifizierung.....	68
3.2.6.2	Quantitative Auswertung der massenspektrometriebasierten Daten .....	69
3.2.6.3	Quantitative Auswertung der PRM-Daten.....	70
3.2.6.4	Anreicherungsanalysen.....	70
3.2.6.5	VENN-Analyse.....	70
3.2.6.6	Quantifizierung der freien Fläche in den <i>Scratch Assay</i> .....	70
3.2.6.7	Statistische Auswertung des Aktinpolymerisationsassays .....	70
3.2.6.8	Statistische Auswertung immunhistochemischer Färbungen .....	71
3.2.6.9	Statistische Auswertung.....	71
4	Ergebnisse .....	73
4.1	Differenzielle Analyse von reversibel redox-sensitiven Cysteinresten im Proteom von A172-Zellen.....	73
4.2	Stabile Überexpression von <i>CAPG</i> in humanen Zelllinien .....	77
4.3	Ermittlung der Cysteinanzahl von <i>CAPG</i> , die sensitiv für die Oxidation sind, mittels <i>PEG-Switch</i> .....	79
4.4	Bestimmung des Anteils an oxidiertem <i>CAPG</i> in humanen A172- <i>CAPG</i> -His-Zellen .....	80
4.5	Direkter positionsgenauer Nachweis von oxPTM von <i>CAPG</i> in humanen A172- <i>CAPG</i> -His-Zellen mittels PRM .....	83
4.6	Molekulardynamik-Simulationen mit der Struktur der <i>CAPG</i> -Sev-Mutante .....	85
4.7	Gerichtete Mutagenese der einzelnen Cysteine von <i>CAPG</i> .....	87
4.8	Stabile Überexpression der Cysteinmutanten von <i>CAPG</i> in humanen Zelllinien....	88

4.9	Für die Cysteinmutanten C282S und C290S von CAPG ließ sich keine Oxidation mehr im PEG- <i>Switch Assay</i> nachweisen .....	89
4.10	Einfluss der einzelnen Cysteinmutanten von CAPG auf die Migration.....	90
4.11	Funktionelle Untersuchung der kanonischen Funktion von CAPG in Abhängigkeit von der jeweiligen Cysteinmutante .....	93
4.12	Analyse des CAPG-Interaktoms .....	97
4.12.1	Einfluss einer oxidierenden Umgebung auf das Interaktom von CAPG.....	97
4.12.2	Interaktionsstudie von CAPG aus A172-CAPG-His-Zellen .....	100
4.13	Zelluläre Lokalisation von CAPG in humanen A172-Zellen.....	106
4.13.1	Western Blot Analyse der subzellulären Lokalisationsänderung von CAPG in Abhängigkeit von der Wasserstoffperoxidbehandlung .....	107
4.13.2	Nach Wasserstoffperoxidbehandlung zeigt CAPG eine zelluläre Lokalisationsänderung in immunzytochemischen Färbungen .....	108
4.13.3	Einfluss der einzelnen Cysteinmutanten auf die subzelluläre Lokalisation von CAPG in humanen LN18-Zellen.....	110
4.13.4	Lebendzell-Mikroskopie .....	112
4.14	CAPG-Abundanz in humanen Gliomen.....	114
4.14.1	Erhöhte CAPG-Menge in humanen primären GBM-Proben .....	114
4.14.2	Subzellulärer Nachweis von CAPG in immunhistochemischen Färbungen humaner Gliome .....	115
5	Diskussion .....	118
5.1	Methodische Diskussion.....	118
5.1.1	Methodische Aspekte zur Analyse von redox-sensitiven Proteinen .....	118
5.1.1.1	Gezielte Analyse des CAPG-Redoxstatus .....	118
5.1.1.2	Globale Identifizierung von redox-sensitiven Proteinen mittels Proteomanalyse .....	122
5.1.2	Methodische Aspekte der Identifizierung potenzieller redox-sensitiver Interaktionspartner von CAPG .....	124
5.2	Biologische Diskussion .....	127

5.2.1	Einfluss der einzelnen Cysteine von CAPG auf die Proteinfunktion.....	127
5.2.1.1	Die Cysteine von CAPG haben keinen Einfluss auf die Inhibition der Aktinpolymerisation.....	127
5.2.1.2	Subzelluläre Lokalisation von CAPG.....	128
5.2.1.2.1	Zelluläre Verteilung und Abundanz von CAPG in Tumorproben.....	129
5.2.2	Identifizierung potenzieller redox-sensitiver Interaktionspartner von CAPG .	130
5.2.2.1	Mögliche Beteiligung des Kernporenkomplexproteins Nup153 am CAPG-Export aus dem Zellkern .....	131
5.2.2.2	RAVER1 und CAPG .....	133
5.2.3	Die CAPG-Cysteinmutanten C282S und C290S inhibieren die Migration der LN18-Zellen .....	135
6	Fazit.....	138
7	Literaturverzeichnis.....	139
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	165
9	Abkürzungsverzeichnis .....	170
10	Anhang .....	174
10.1	CAPG-Sequenz .....	174
10.2	Vektorkarten.....	175
10.3	Abbildungen .....	177
10.4	Tabellen.....	181
10.5	Danksagung.....	200
10.6	Eidesstaatliche Erklärung.....	202

## Zusammenfassung

Das humane Protein CAPG (*macrophage capping protein*) ist 38,5 kDa groß und gehört zur Gelsolin-/Villin-Familie aktinbindender Proteine. Durch seine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige aktinblockierende Eigenschaft wird die Aktindynamik reguliert und dadurch die Zellmotilität moduliert. Bei verschiedenen Tumorentitäten wie z. B. dem Glioblastom wurde bereits eine CAPG-Überexpression mit einer erhöhten Invasivität und Migration assoziiert. Erste Hinweise deuten zudem darauf hin, dass es sich bei CAPG um ein redox-sensitives Protein handeln könnte. Somit stand die genauere Charakterisierung von CAPG als redox-sensitives Protein im Fokus dieser Arbeit.

- Die Behandlung von A172-Glioblastomzellen mit Wasserstoffperoxid führte zur Identifizierung von CAPG als eines von 382 redox-sensitiven Proteinen nach Anreicherung über eine Thiopropyl Sepharose Matrix.
- Im Rahmen dieser Arbeit wurde das PEG-*Switch* Protokoll erfolgreich für die weitere Charakterisierung des Redoxstatus von CAPG etabliert. Die detektierte Molekulargewichtsverschiebung deutet darauf hin, dass zwei der fünf Cysteine von CAPG sensitiv für die Oxidation sind.
- Mit Hilfe des differenziellen massenspektrometrie-basierten Markierungsexperiments konnten die beiden Cysteine, C282 und C290, von CAPG in den unbehandelten Proben positionsgenau als reversibel oxidiert nachgewiesen werden. Wohingegen es unter Wasserstoffperoxidbehandlung zu einer Überoxidation zu einer Sulfin- ( $\text{SO}_2\text{H}$ ) oder Sulfonsäure ( $\text{SO}_3\text{H}$ ) zu kommen scheint. Mittels zielgerichtetem PRM-Experiment wurde eine Trioxidation an dem Cystein C290 nachgewiesen. Der mögliche funktionelle Einfluss der oxidativen posttranslationalen Modifikationen sollte im Folgenden geklärt werden.
- In *Scratch Assays* konnte erstmals gezeigt werden, dass die beiden Cysteinmutanten C282S und C290S von CAPG das Migrationspotenzial der LN18-Zellen inhibieren. Überdies konnte mit Hilfe der Cysteinmutanten gezeigt werden, dass keines der Cysteine von CAPG einen signifikanten Einfluss auf die kanonische Aktin-*Capping*-Funktion von CAPG hat. Dessen ungeachtet ist die Lokalisation von CAPG jedoch redox-abhängig und nach Wasserstoffperoxidbehandlung verringert sich die CAPG-Menge im Kern. Außerdem zeigte die Analyse der subzellulären Lokalisation von CAPG in menschlichem Tumorgewebe eine heterogene CAPG-Verteilung, die in verschieden-gradigen Gliomen kein klares Muster zeigte.

- Mittels einer Interaktomstudie konnte eine weitere zelluläre Funktion, in Form einer möglicherweise redox-abhängigen Beteiligung an Adhäsionskomplexen, postuliert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde CAPG als redox-sensitives Protein in humanen Glioblastomzelllinien umfassend charakterisiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass die beiden Cysteine, C282 und C290, dabei eine relevante Rolle für die Proteinfunktion spielen. Dabei deuten die Daten daraufhin, dass CAPG in Abhängigkeit seines Redoxzustandes an der Ausbildung von Adhäsionskomplexen beteiligt ist und dass dies zu einem gesteigerten Migrationspotenzial der Zellen führen könnte.

## Summary

The human macrophage capping protein (CAPG) is a 38.5 kDa actin filament capping protein of the gelsolin/villin family of actin binding proteins. Due to its  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent actin blocking property, actin dynamics are regulated and thereby cell motility is modulated. In a number of tumors such as glioblastoma a CAPG overexpression has already been associated with increased invasiveness and migration. Preliminary studies suggested CAPG as a potential redox-sensitive protein. The aim of this work was the detailed characterization of CAPG as a redox-sensitive protein.

- The hydrogen peroxide treatment of A172 glioblastoma cells led to the identification of CAPG as one of 382 redox-sensitive proteins after enrichment via a Thiopropyl Sepharose matrix.
- As part of this work the PEG switch protocol was successfully established for a further characterization of the redox status of CAPG. The detected molecular weight shift indicates that two of the five CAPG cysteines are sensitive to oxidation.
- With the differential mass spectrometry based labeling experiment the two cysteines, C282 and C290, of CAPG could be detected as reversibly oxidized in the untreated samples. Whereas an overoxidation to a sulfinic ( $\text{SO}_2\text{H}$ ) or sulfonic acid ( $\text{SO}_3\text{H}$ ) occurs as a result of the hydrogen peroxide treatment. Additionally, a trioxidation was detected on the cysteine C290 in a targeted parallel reaction monitoring experiment. However, the possible functional impact of the oxidative posttranslational modifications should be further validated.
- It was shown for the first time that the two cysteine mutants, C282S and C290S, inhibit the invasion potential of the LN18 cells in scratch assays. But however, the cysteines of CAPG had no significant influence on the canonical actin capping function of CAPG. Using the cysteine mutants, it could be shown that the subcellular localization of CAPG is redox-dependent and that the amount of CAPG in the nucleus decreases after hydrogen peroxide treatment. Furthermore, the analysis of the subcellular localization of CAPG in human tumor tissue showed a heterogeneous CAPG distribution showing no clear pattern in different glioma grades.
- With the results from the interactome studies another cellular function for CAPG could be postulated in form of a possibly redox-dependent involvement in adhesion complexes.

This work extensively contributes to the comprehensive characterization of CAPG as a redox-sensitive protein in human glioblastoma cell lines. It was shown that the two cysteines, C282 and C290, play a relevant role for protein function and regulation. Additionally, the data indicates that CAPG is involved in the formation of adhesion complexes depending on its redox state and that this could lead to an increased migration of the cells.

# 1 Einleitung

## 1.1 Reaktive Sauerstoffspezies und ihre Entstehung

Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species*, ROS), die von molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) abgeleitet sind, können in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen in freie Radikale, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen, wodurch sie besonders reaktiv sind und gleichzeitig nur eine kurze Halbwertszeit besitzen. Zu dieser Gruppe gehören das Superoxidanion ( $O_2^{\cdot-}$ ), das Hydroxyl-Radikal ( $\cdot OH$ ) und Stickstoffmonoxid ( $NO\cdot$ ). Zur zweiten Gruppe gehören Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und die hypochlorige Säure ( $HOCl$ ), die häufig irrtümlich als freie Radikale des Sauerstoffs bezeichnet werden, sich jedoch ihre ungepaarten Elektronen teilen (Betteridge, 2000; Birben et al., 2012; Fridovich, 1999; Halliwell, 1996; Halliwell und Cross, 1994). Darüber hinaus wird auch der Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) zu den reaktiven Sauerstoffspezies gezählt (Sies, 1993; Sies, 2017). Die stufenweise Reduktion von molekularem Sauerstoff führt dabei zur Entstehung und Verknüpfung der verschiedenen aufgezählten ROS durch einen 1-Elektronentransfer (Cai und Harrison, 2000; Nordberg und Arnér, 2005). Neben ROS zählen auch reaktive Stickstoff- (RNS) (del Rio, 2015) und reaktive Schwefelspezies (RSS) (Giles et al., 2001) zu weiteren wichtigen reaktiven Spezies (RS).

In allen aeroben Organismen werden ROS gebildet und abgebaut. Die Regulation des Auf- und Abbaus führt zu physiologischen ROS-Konzentrationen, die für eine normale Zellfunktion erforderlich sind (Finkel und Holbrook, 2000; Nordberg und Arnér, 2005). 1985 wurde erstmals der Begriff oxidativer Stress für den Zustand, bei dem es als Folge zu molekularen Zellschäden kommen kann, wenn ein Ungleichgewicht in der zellulären Redox-Homöostase aufgrund einer Überproduktion an ROS oder einer unzureichenden antioxidativen Abwehr besteht, eingeführt (Sies, 1985). Innerhalb der Zelle sind ROS in der Lage Proteine, Lipide und Desoxyribonukleinsäuren (DNA) zu modifizieren, was zu einer Veränderung der Funktion des jeweiligen Moleküls führen kann (Stadtman, 2006) und weshalb eine enge und komplexe Regulierung der Prozesse zur Aufrechterhaltung des zellulären Redoxzustandes erforderlich ist.

Pro Tag ist eine humane Zelle ca.  $1,5 \times 10^5$  oxidativen Addukten ausgesetzt (Beckman und Ames, 1997; Nakajima *et al.*, 1996), die endogen als Neben- oder Zwischenprodukt während des zellulären Metabolismus erzeugt werden oder durch exogene Quellen entstehen. Mitochondrien stellen die wichtigste intrazelluläre Quelle für ROS im Organismus dar. Wobei während der Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese zwei Elektronen auf molekularem Sauerstoff über oxidative Phosphorylierungen in den Mitochondrien übertragen werden

müssen. Dabei wird ein Protonengradient erzeugt, der für die ATP-Synthese genutzt wird. Hier wird ein Großteil des molekularen Sauerstoffs zu Wasser reduziert (Deutzmann *et al.*, 2006; Löffler *et al.*, 2014). Als Nebenprodukt dieser Reaktion entstehen aus 1-3 % des molekularen Sauerstoffs primär  $O_2^{\cdot -}$  und  $H_2O_2$ , als auch sekundär  $\cdot OH$  durch Monoaminoxidasen an Komplex I (Nicotinamidadeninindinukleotid (NADH): Ubichinon-Oxidoreduktase) und Komplex III (Ubihydrochinon (Ubichinol): Cytochrom c-Oxidoreduktase) in der Atmungskette (Ames *et al.*, 1993; Turrens, 2003; Turrens *et al.*, 1985; Turrens und Boveris, 1980). Dabei führt eine mitochondriale Dysfunktion schnell zu oxidativem Stress (Tahara *et al.*, 2009). Zudem entstehen ROS endogen auch im Zytosol, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), in Peroxisomen und durch extramitochondriale, mit der Plasmamembran assoziierte Oxidasen (Fuchs-Tarlovsky, 2013; Gough und Cotter, 2011). Bei enzymatischen Reaktionen, beispielsweise durch Peroxidasen, Xanthin- und Aldehydoxidasen, Cytochrom-c-Oxidasen, NO-Synthasen, Lipooxygenasen oder Cyclooxygenasen, entstehen zellulär ebenfalls ROS (Droge, 2002; Fransen *et al.*, 2012). Zu einer weiteren wesentlichen zellulären ROS-Quelle zählen membrangebundene NADPH-Oxidase-Komplexe (NOX) (Bedard und Krause, 2007), die  $O_2^{\cdot -}$  als Endprodukt generieren, welches spontan ( $\sim 10^5 M^{-1} s^{-1}$ ) oder enzymkatalysiert zu  $H_2O_2$  und  $O_2$  umgewandelt wird. Wohingegen die enzymkatalysierte Umwandlung um etwa vier Größenordnungen schneller über die Superoxid-Dismutase (SOD) erfolgt (Gardner *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 1996; Tyler, 1975). Zu der NOX-Familie gehören fünf kanonische NOX (NOX1 bis NOX5) und zwei duale Oxidasen (DUOX1 und DUOX2), die die  $O_2^{\cdot -}$ -Produktion in einer NADPH-abhängigen Reaktion katalysieren (Lambeth *et al.*, 2007). Superoxidanionen haben nur eine kurze Lebensdauer und einen begrenzten Diffusionsbereich, wodurch ihre Reaktivität relativ gering ist (Weidinger und Kozlov, 2015). Im Vergleich besitzt  $H_2O_2$  eine verhältnismäßig lange Halbwertszeit von 1 ms, ist membrangängig und diffusionsfähig, wodurch es als zelluläres Signalmolekül fungieren kann (Bedard und Krause, 2007; Sies, 1993). Bei der Reduktion von  $H_2O_2$  in Gegenwart von Eisen-(II)-Ionen entstehen hochreaktive Hydroxylradikale während der sogenannten Fenton-Reaktion (Zepp *et al.*, 1992). Hydroxylradikale gelten als instabilste und reaktionsfreudigste ROS, wodurch sie häufig stark toxisch wirken (Halliwell und Gutteridge, 1984). Neutrophile, Eosinophile und Makrophagen sind in der Lage ROS eigenständig zu produzieren. Aktivierte Makrophagen produzieren Superoxidanionen, Stickoxid und Wasserstoffperoxid, um z. B. eindringende Bakterien abzutöten (Conner und Grisham, 1996; Thomas *et al.*, 1988).

Exogene Stimuli, wie z. B. Chemotherapeutika, Medikamente, Xenobiotika, Ultraviolette (UV)- und ionisierende Strahlung, inflammatorische Zytokine und Umwelttoxine tragen ebenso zur Entstehung von ROS in Zellen bei (Poole, 2015; Saccà und Izzotti, 2014; Sies, 1993). Die Vielzahl unterschiedlicher Stimuli, die zur Entstehung von ROS beitragen, verdeutlicht, wie komplex die Regulation der Redox-Homöostase zur Vermeidung von oxidativem Stress sein muss.

### 1.2 Funktion und Regulation von ROS

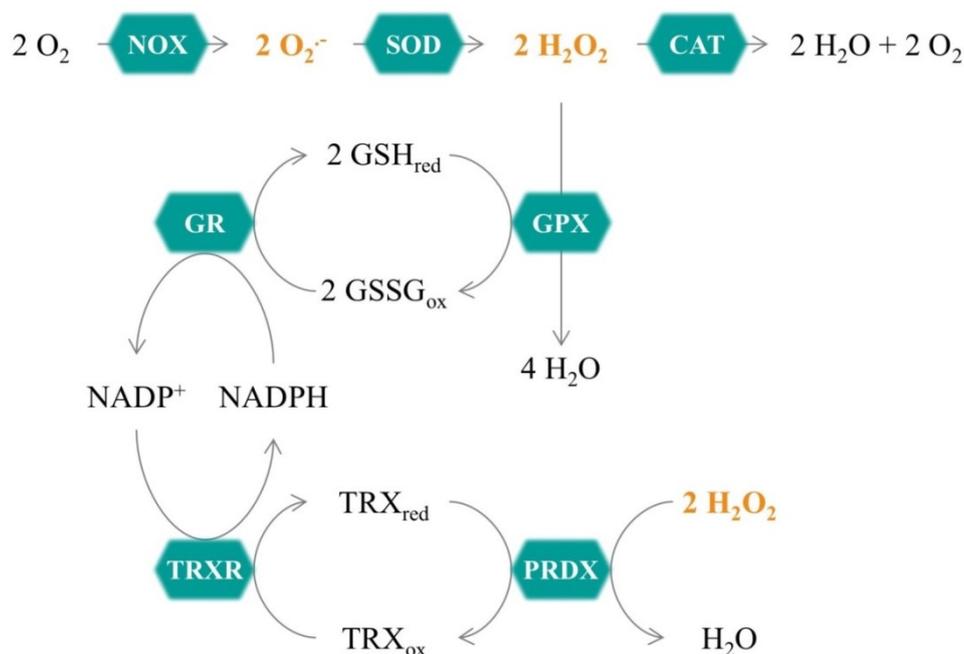
In den vergangenen Jahren hat sich die Sichtweise, dass ROS nur mit oxidativem Stress und Zellschäden assoziiert sind, stark gewandelt. Besteht intrazellulär ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen pro- und antioxidativen Einflüssen, herrscht eine Redoxbalance in der Zelle. Um diese aufrecht zu erhalten, existieren Oxido-Reduktionssysteme, die die entstehenden RS in ihren physiologischen Grenzen halten (Droge, 2002; Valko *et al.*, 2007). Derzeitig besteht großes Interesse an Prozessen, die durch ROS reguliert werden. Denn es hat sich gezeigt, dass ROS an einer Reihe von physiologischen, als auch pathophysiologischen Prozessen, wie z. B. der Genexpression, der Zellproliferation, der Migration, der Differenzierung und der Apoptose beteiligt sind (Finkel, 2003; Sinha *et al.*, 2013; Steven *et al.*, 2017). In geringen Konzentrationen fungieren ROS zudem als wichtige Signalmoleküle (Finkel, 1999). Mehrere Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und Neurotransmitter stehen in Zusammenhang mit ROS als sekundären Botenstoff bei der intrazellulären Signaltransduktion (Thannickal und Fanburg, 2000). Die durch oxidative posttranslationale Modifikationen (oxPTM) verursachten Veränderungen der Proteinfunktion und ihre Fähigkeit, mit anderen Proteinen, Makromolekülen und DNA zu interagieren, werden allgemein als Redoxsignalweiterleitung bezeichnet. Können die Oxido-Reduktionssysteme die Überproduktion an ROS nicht mehr kompensieren, kommt es zur Akkumulation oxidativer Zellschäden und es wird von oxidativem Stress gesprochen (Schieber und Chandel, 2014).

Dabei können ROS sowohl DNA, Lipide, als auch Proteine modifizieren, was direkte Auswirkungen auf die Zellphysiologie hat (Laval, 1996; Stadtman, 2006; Valko *et al.*, 2006). Interagieren ROS mit DNA kann dies zu oxidativen Schäden in Form von Einzel-, sowie Doppelstrangbrüchen und DNA-Addukten führen. Daraus entstehende Mutationen können die Tumorentstehung begünstigen (Manda *et al.*, 2009; Pitot, 1993). Durch die Reaktion von Lipiden mit ROS wird eine radikalische Kettenreaktion in Gang gesetzt, bei der es zur Lipidperoxidation kommt, was in einer veränderten Fluidität und Zellpermeabilität von biologischen Membranen und einer Modifikation von membranassoziierten Rezeptoren resultieren kann (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Halliwell und Chirico, 1993; Stocker und Keaney

Jr, 2004). ROS können eine Peptidkettenfragmentierung, eine Änderung der elektrischen Ladung und eine Vernetzung von Proteinen verursachen (Berlett und Stadtman, 1997). Zudem sind ROS in der Lage einzelne Aminosäuren spezifisch reversibel und irreversibel zu modifizieren, wodurch sowohl die Proteinfunktion, -aktivität, als auch -struktur beeinflusst werden kann (Birben *et al.*, 2012; Kelly und Mudway, 2003). Aber auch Proteine werden durch oxidativen Stress geschädigt. Dabei greifen vor allem Hydroxylradikale die Peptidbindung an und induzieren die Fragmentierung von Polypeptidsträngen (Berlett und Stadtman, 1997).

Durch enzymatische und nicht-enzymatische Oxido-Reduktionssysteme wird die Redox-Homöostase aufrechterhalten und eine Signalweiterleitung durch oxidative Modifikation redox-sensitiver Proteine innerhalb der Zelle ermöglicht. Denn auch für die redox-spezifische Signalweiterleitung spielt die Menge an ROS eine entscheidende Rolle. Schützende antioxidative Enzyme entfernen Oxidationsmittel durch Metall-, Thiol- oder Selen-abhängige Reaktionen und werden ihrerseits durch Reduktasesysteme aufrechterhalten (Abbildung 1) (Poole, 2015). Da aus einer Vielzahl an ROS-Quellen primär  $O_2^{\cdot-}$  entsteht, zählen die drei Isoformen der Superoxiddismutase (SOD) zu den wichtigsten enzymatischen Antioxidantien. Zu den Isoformen zählen die Kupfer-Zink-SOD (CuZn-SOD,(SOD1)), die Mangan-SOD (Mn-SOD,(SOD2)) und die extrazelluläre SOD (EC-SOD,(SOD3)), die  $O_2^{\cdot-}$  zu  $H_2O_2$  und  $O_2$  dismutieren (Zelko *et al.*, 2002). Um eine Akkumulation von  $H_2O_2$  in der Zelle zu verhindern, sind der SOD zwei Enzymsysteme nachgeschaltet. Zum einen kann das gebildete  $H_2O_2$  durch das in den Peroxisomen lokalisierte Enzym Katalase zu Wasser und  $O_2$  disproportioniert werden (Kirkman *et al.*, 1999), zum anderen durch die Enzymfamilie der Glutathion-Peroxidasen (GPX) oder Peroxiredoxine (PRDX) (Flohe, 1988). Einige GPX besitzen die seltene Aminosäure Selenocystein in ihrem aktiven Zentrum und nutzen niedermolekulare Thiole, wie Glutathion (GSH), zur Reduktion von Wasserstoffperoxid. Das Tripeptid GSH (L- $\gamma$ -Glutamyl-L-Cysteinyl-Glycin) ist mit einer Konzentration im niedrig millimolaren (mM) Bereich das in allen Zellen am häufigsten vorkommende Reduktionsmittel. Bei der Reduktion von  $H_2O_2$  durch GPX werden zwei Moleküle GSH oxidiert und bilden das Glutathiondisulfid (GSSG), welches seinerseits durch das Enzym Glutathion-Reduktase (GR) unter Verbrauch von NADPH wieder reduziert werden kann. Die Glutathion-Peroxidase 1 (GPX1) ist dabei das am häufigsten vorkommende Mitglied der GPX-Familie, welches sich in allen Zellen, sowohl im Zytosol, als auch in den Mitochondrien und in einigen Zellen sogar in Peroxisomen befindet (Esworthy *et al.*, 1997; Flohe und Schlegel, 1971; Singh *et al.*, 1994). GSH ist ebenfalls in der Lage Glutaredoxine (GLRX) zu

reduzieren, die ihrerseits verschiedene Substrate, wie z. B. glutathionylierte Proteine, reduzieren können (Abbildung 1). Peroxiredoxine sind sowohl im Zytosol, in Mitochondrien, als auch an Membranen lokalisiert und kommen in einer Vielzahl von Lebewesen vor. Beim Menschen sind sechs verschiedene PRDX (PRDX1-6) bekannt, die ein redox-sensitives Cystein in ihrem katalytischen Zentrum besitzen. Das durch die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  selbst oxidierte Peroxiredoxin kann im Anschluss selbst durch Thioredoxine (TRX) reduziert werden. Denn TRX besitzen im aktiven Zentrum eine Cystein-X-X-Cystein-Sequenz, welche bei der Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Wasser selber oxidiert wird. Im reduzierten Zustand besitzen TRX zwei freie Thiol-Gruppen, während im oxidierten Zustand eine Disulfidbrücke ausgebildet wird. Regeneriert wird das Thioredoxin durch die Thioredoxin-Reduktase (TRXR) unter Beteiligung von NADPH als Elektronendonator (Holmgren, 2000).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des enzymatischen Antioxidationssystems zur Entfernung von ROS.**  $\text{O}_2^-$  wird von NADPH-Oxidase-Komplexen (NOX) als Endprodukt generiert und kann im nächsten Schritt von Superoxiddismutasen (SOD) zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2$  dismutiert werden. Katalasen (CAT), Glutathion-Peroxidasen (GPX) und Peroxiredoxine (PRDX) können die Umwandlung von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) zu Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) und Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) katalysieren. Oxidiertes Glutathion ( $\text{GSSG}_{\text{ox}}$ ) und oxidiertes Thioredoxin ( $\text{TRX}_{\text{ox}}$ ) können durch die Glutathion-Reduktase (GR) bzw. die Thioredoxin-Reduktase (TRXR) zu Glutathion ( $\text{GSH}_{\text{red}}$ ) und  $\text{TRX}_{\text{red}}$  reduziert werden. [  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  = oxidiertes/reduziertes Nicotinamidadeninucleotidphosphat/die Abbildung wurde modifiziert nach Kageyama und Waditee-Sirisattha, 2019]

Nicht-enzymatische Antioxidantien werden in zwei Gruppen unterschieden. Zu der hydrophoben Gruppe nicht-enzymatischer Antioxidantien zählen z. B. Vitamin E (White *et al.*, 1997), Carotinoide und Ubiquinol (Rice-Evans *et al.*, 1997). Diese lagern sich vor allem in Zellmembranen ein, um diese vor der Schädigung durch Lipidperoxidation zu schützen (Sies und Stahl, 1995). Zu den hydrophilen Substanzen gehören unter anderem Vitamin C (Bunker, 1992) und GSH (Masella *et al.*, 2005; Sies, 1993). Aufgrund seiner hohen

intrazellulären Konzentration und der wichtigen Rolle, die GSH im Glutathionsystem einnimmt, ist es maßgeblich für die Redox-Homöostase (Meister und Anderson, 1983).

Durch eine Dysregulation der Redox-Homöostase kann es zur Ausbildung von einer Reihe von Krankheiten, wie Krebs, neurologischen Störungen, Atherosklerose, Bluthochdruck und Diabetes, kommen (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

### **1.3 Posttranslationale Modifikation von Proteinen**

Die Untersuchung reversibler und irreversibler posttranslationaler Modifikationen (PTM) von Proteinen spielt eine wichtige Rolle bei der Beschreibung biologischer Funktionszusammenhänge. Dabei sind die Zellen in der Lage solche Proteinveränderungen, die maßgebend für die Proteinfunktion, -lokalisation, -struktur oder für die Protein-Protein-Interaktion sind, zu regulieren. Zu den bekanntesten PTM zählen die Acetylierung, die Glykosylierung, die Phosphorylierung und die Methylierung (Larsen *et al.*, 2006). Die Phosphorylierung zählt ihrerseits zu den am häufigsten untersuchten Proteinmodifikationen, wobei z. B. Serin-, Threonin- und Tyrosinreste durch Proteinkinasen phosphoryliert werden.

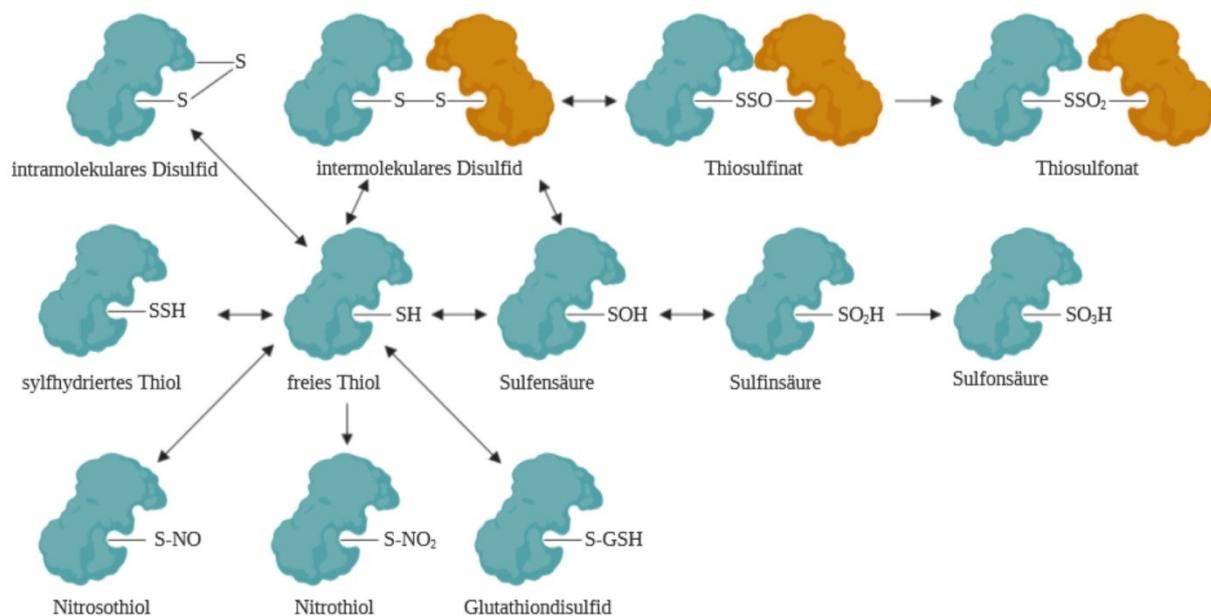
#### **1.3.1 Oxidative posttranslationale Modifikation von Proteinen**

Die Bedeutung von ROS als sekundäre Botenstoffe mit regulatorischen Funktionen rückt in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus. Dabei kann die Signaltransduktion über die Induktion von reversiblen und irreversiblen oxidativen posttranslationalen Modifikationen (oxPTM) erfolgen. Denn in physiologisch geringen bzw. moderaten Mengen sind ROS an einer Vielzahl wichtiger zellulärer Prozesse beteiligt. Wobei die oxidative Modifikation von redox-sensitiven Proteinen eine entscheidende Rolle bei der intrazellulären Signalweiterleitung durch Veränderung der Proteinfunktion, -lokalisation oder der Protein-Protein-Interaktion spielt. Cysteine, Methionine, Tryptophane, Tyrosine und Histidine zählen zu den für die Oxidation zugänglichsten Aminosäuren (Hawkins und Davies, 2001; Stadtman, 1993; Valderrama *et al.*, 2002). Wobei davon vor allem die Cystein- und Methioninreste anfällig für die Oxidation sind (Dean *et al.*, 1985).

#### **1.3.2 Oxidative posttranslationale Cysteinmodifikationen**

Cystein ist eine der seltener vorkommenden proteinogenen Aminosäuren (Jones, 2008). Dennoch findet sie sich häufig als hochkonservierter Rest innerhalb wichtiger funktioneller oder struktureller Proteinstellen (Fomenko *et al.*, 2008). Im Vergleich zu Methionin ist die Thiolgruppe (-SH) des Cysteins ionisierbar, wobei eine negativ geladene Thiolatgruppe ( $-S^-$ ) nach der Deprotonierung entsteht und somit die nucleophile Reaktivität erhöht wird. Dabei

erfolgt die Deprotonierung bereits ab einem physiologischen pH-Wert von 7,4. Das elektronenreiche Schwefelatom kann in mehreren Oxidationsstufen (von -2 bis +6) vorliegen, weshalb es für die Oxidation durch ROS anfällig ist und es zur Ausbildung einer Vielzahl verschiedener oxidativ posttranslationaler Modifikationen (oxPTM) kommen kann (Abbildung 2). Dazu zählen reversible Modifikationen, wie die S-Nitrosylierung (R-SNO), S-Glutathionylierung (R-S-GSH), intra- und intermolekulare Disulfidbindungen (R-S-S-R') und die Sulfenylierung (Sulfensäure, SOH) (Chung *et al.*, 2013). Diese spielen eine entscheidende Rolle bei der Redoxregulation von Proteinen, weil sie in der Lage sind die Proteineigenschaften zu verändern (Wani *et al.*, 2014). Diese reversiblen Thiolmodifikationen können ihrerseits wie ein redox-regulierter Schalter die Proteinfunktion regulieren. So stellt die oxidative Modifikation von Proteinen einen wichtigen Mechanismus dar, bei dem ein oxidatives Signal in eine biologische Antwort umgewandelt wird (Paulsen und Carroll, 2013). Die hochreaktive Sulfensäure kann zu den weitestgehend irreversiblen Modifikationen, einer Sulfin- (R-SO<sub>2</sub>H) und einer Sulfonsäure (R-SO<sub>3</sub>H) weiter oxidieren. Diese werden häufig mit einer Dysregulation der Redox-Homöostase und daraus resultierenden Krankheiten, wie z. B. Krebs, assoziiert (Klaunig und Kamendulis, 2004).



**Abbildung 2: Mögliche oxidative posttranslationale Cysteinmodifikationen und deren gegenseitige Umwandlung.** Das Schwefelatom im Kern des Thiole ist elektronenreich und ermöglicht mehrere Oxidationsstufen, wodurch freie Thiole (R-SH) unter oxidierenden Bedingungen intra- und intermolekulare Disulfide (R-S-S-R') ausbilden können, die durch Thioredoxin oder Glutaredoxin reduziert werden können. Thiosulfinate und Thiosulfonate entstehen durch die Oxidation von Disulfiden. Thiole können ebenfalls sulfhydryliert (R-S-SH) werden oder reagieren mit niedermolekularen Thiolen wie Glutathion (GSH) zu einem Glutathiondisulfid (R-S-S-GH). Zu weiteren reversiblen Modifikationen zählen die S-Nitrosylierung (R-SNO) und die Sulfenylierung (Sulfensäure/R-SOH). Die reaktive Sulfensäure kann in Gegenwart hoher Wasserstoffperoxidkonzentrationen zu den weitestgehend irreversiblen Modifikationen, einer Sulfin- (R-SO<sub>2</sub>H) oder einer Sulfonsäure (R-SO<sub>3</sub>H) weiter oxidieren. [die Abbildung wurde modifiziert nach Poschmann und Stühler, 2012, sowie Brandes *et al.*, 2009]

Die Reaktionsfähigkeit eines Cysteins bzgl. der Oxidation wird durch Faktoren, wie die umliegenden Aminosäurereste, deren Zugänglichkeit, die subzelluläre Proteinlokalisierung, dem pH-Wert und der jeweiligen Säurekonstante ( $pK_a$ ) des Cysteins beeinflusst. Normalerweise haben Cysteinreste in Proteinen einen  $pK_a$ -Wert von ca. 8,5. Oxidation-sensitive und dadurch reaktivere Cysteine weisen jedoch häufig einen geringeren  $pK_a$ -Wert auf. Reaktive Cysteine in der Thiolatform werden unter anderem durch positiv geladene Aminosäurereste stabilisiert (Jacob *et al.*, 2011; Poole, 2015). Die Reihe unterschiedlicher oxPTM und deren Reversibilität erhöht die mechanistische Vielfalt für die Proteinfunktion und macht die Untersuchung von Zellsignalwegen, bei denen Cysteinreste oxidiert werden, zu einem wachsenden Forschungsgebiet (Paulsen und Carroll, 2013).

Zu Proteinen, die durch Ausbildung von Disulfidbrücken aktiviert werden, zählen beispielsweise der Transkriptionsfaktor OxyR aus *E. coli* (Zheng *et al.*, 1998), der Transkriptionsfaktor Yap1p aus *S. cerevisiae* (Kuge *et al.*, 2001), das als molekulare Chaperon fungierende Protein Hsp33 aus *E. coli* (Jakob *et al.*, 1999) und der humane Apoptosefaktor p66<sup>shc</sup> (Gertz *et al.*, 2008). Die Oxidation von p66<sup>shc</sup> führt in den Mitochondrien zur Produktion von Wasserstoffperoxid, welches wiederum die Membranpermeabilität erhöht und die Apoptose einleitet (Giorgio *et al.*, 2005). Eine Vielzahl von Signalmolekülen, einschließlich Rezeptortyrosinkinasen, Phosphatasen und Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B (engl.: *nuclear factor- $\kappa$ B*) und AP-1 (engl.: *activator protein-1*), besitzen redox-sensitive Cysteinreste (Brigelius-Flohe und Flohe, 2011; de Nigris *et al.*, 2001; Mohora *et al.*, 2009) und sind an einer Reihe von physiologischen Prozessen, wie dem Stoffwechsel, der Signaltransduktion, der Zellproliferation, der Genexpression und der Apoptose beteiligt (Jakob und Leichert, 2009; Spickett und Pitt, 2012). Ebenfalls wird angenommen, dass RS die Entwicklung und Verknüpfung neuronaler Synapsen, sowie Lern- und Gedächtnisprozesse beeinflussen (Milton und Sweeney, 2012).

### 1.4 Das Aktinfilamentsystem

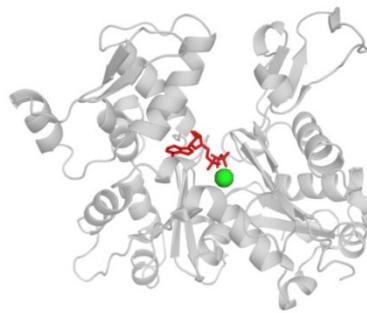
Das Zytoskelett ist neben der Stabilisation der Form der Zellen, auch an einer Reihe unterschiedlicher Prozesse, wie der Zellwanderung, der Endozytose, dem intrazellulären Transport, der morphologischen Veränderung, der Zellteilung und der Adhäsion beteiligt (Blain, 2009). Dabei setzt sich das Zytoskelett einer eukaryotischen Zelle aus dem Intermediären-, dem Mikrotubulisystem und dem Aktinzytoskelett zusammen. Diese drei Klassen weisen jeweils einen für sich spezifischen Aufbau auf und übernehmen dadurch verschiedene Aufgaben in der Zelle. Das Aktinzytoskelett ist hochdynamisch und nimmt eine besondere Rolle bei der Zellbewegung ein (Chen *et al.*, 2000). Der Auf- und Abbau von

Aktinfilamenten ermöglicht der Zelle eine Anpassung auf extra- oder intrazelluläre Signale. Durch aktinbindende Proteine (ABP), die mit dem Netzwerk interagieren und die Polymerisation der Aktinfilamente steuern, wird die Umorganisation des Aktinzytoskeletts bewältigt (Giebing *et al.*, 1994; Lauffenburger und Horwitz, 1996).

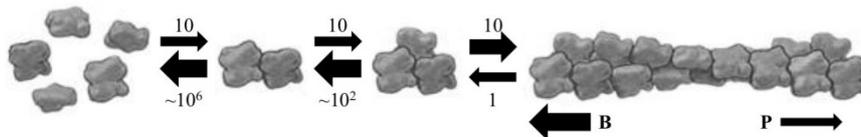
Aktin wird in fast allen eukaryotischen Zellen exprimiert und kann in zwei verschiedenen Formen in der Zelle vorliegen. Das als globuläres Aktin (G-Aktin) bezeichnete Monomer (42 kDa) kann in einer reversiblen Reaktion zu helikalen Filamenten, die ihrerseits als F-Aktin bezeichnet werden, polymerisieren (Abbildung 3A) (Holmes *et al.*, 1990). Dabei zählt Aktin zu den am häufigsten vorkommenden, hoch konservierten, multifunktionalen Proteinen in vielen Zellen. Beim Menschen sind drei Aktin-Isoformen bekannt, die sich nur in wenigen Aminosäuren unterscheiden und in verschiedenen Gewebetypen exprimiert werden. Funktionell sind diese Isoformen in alpha ( $\alpha$ )-Aktin (muskuläre Variante), beta ( $\beta$ )-Aktin (nicht muskuläre Variante) oder gamma-Aktin (glatte Muskel- und Nichtmuskelvariante) unterteilbar (Garrels und Gibson, 1976; Khaitlina, 2001).

Im Wesentlichen findet die Aktinpolymerisation in drei Schritten statt. Im ersten Schritt, der Nukleation, lagern sich drei bis vier ATP-beladene Aktinmonomere langsam zu einem Kern zusammen, denn nur so entsteht ein thermodynamisch hinreichend stabiler Komplex, um in den folgenden Schritten ein F-Aktinfilament auszubilden. Im nächsten Schritt binden weitere Aktinmonomere bidirektional an den zuvor gebildeten Kern. Dieser Vorgang wird als Elongation bezeichnet (Abbildung 3B) und läuft schnell ab bis sich ein Fließgleichgewicht (engl.: *steady-state*) zwischen neuanlagernden und dissoziierenden Aktinmonomeren einstellt (Pollard und Cooper, 1986). Der Polymerisationsvorgang ist ATP-abhängig und benötigt ein- bzw. zweiwertige Kationen ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ). Die Konzentration an freiem G-Aktin, die im Gleichgewicht zwischen Polymer und Monomer besteht, wird als kritische Konzentration ( $C_c$ , engl.: *critical concentration*) bezeichnet. Sie bestimmt den Polymerisationsgrad und ist für beide Enden unterschiedlich. Deshalb wird zwischen dem schnell wachsenden (engl.: *barbed-end* oder (+)-Ende,  $C_{c+}$  von  $0,1 \mu M$ ) und dem langsam wachsenden (engl.: *pointed-end* oder (-)-Ende,  $C_{c-}$  von  $0,8 \mu M$ ) Aktinfilament unterschieden (Carlier und Pantaloni, 1997; Wegner, 1976). Diese Asymmetrie kommt durch die G-Aktin-Struktur und durch die Verteilung von ATP- bzw. ADP-beladenen Aktinmonomeren zustande (Bugyi und Carlier, 2010). Am (+)-Ende erfolgt vor allem die Polymerisation während am (-)-Ende vor allem die Depolymerisation stattfindet. Dieser Vorgang wird als Tretmühlenmechanismus bezeichnet (Neuhaus *et al.*, 1983; Wegner, 1976).

A) Aktinmonomer



B) Spontane Nukleation und Elongation

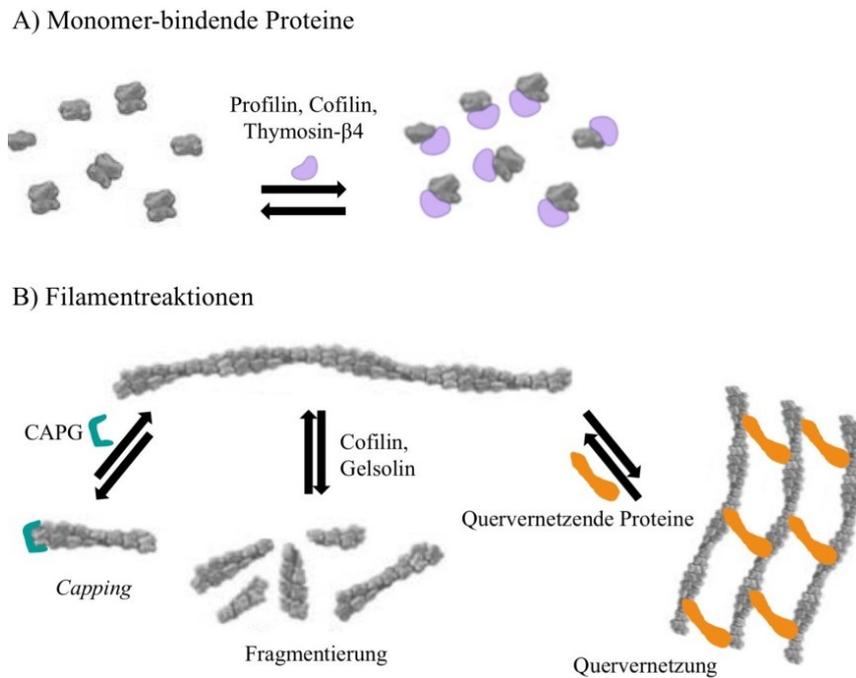


**Abbildung 3: A) Struktur eines Aktinmonomers als Bandmodell.** Die Abbildung wurde mit Hilfe der Software *PyMOL* und dem PDB-File: 1ATN erstellt. In Rot ist das gebundene ATP-Molekül und in Grün das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion dargestellt. **In B) ist der spontane Nukleations- und Elongationsprozess dargestellt.** Dimere und Trimere sind instabil. Das Längenwachstum findet schnell am *barbed-end* (B) und langsam am *pointed-end* (P) statt. [die Abbildung wurde modifiziert nach Pollard und Cooper, 2009]

Die hoch dynamische Struktur des Aktinzytoskeletts, die eine schnelle Anpassung an unterschiedliche Stimuli ermöglicht, erklärt warum es an einer Reihe relevanter Prozesse, wie der Zellbewegung, der Zellteilung, der Endozytose, der Remodellierung von Chromatin und der Sekretion beteiligt ist (Bettinger *et al.*, 2004; Stossel, 1993; Trifaró *et al.*, 2002; Trifaró *et al.*, 2008; Yarar *et al.*, 2005). Aufgrund der hohen Konzentrationen an Aktinmonomeren und hoher Salz- und ATP-Konzentrationen innerhalb der Zelle, würde das gesamte Aktin polymerisiert vorliegen, wenn keine aktinbindenden Proteine vorhanden wären. Denn diese sorgen durch die Regulation des dynamischen Auf- und Abbaus von Aktinfilamenten dafür, dass die Hälfte des Aktins in der Zelle als F-Aktin vorliegt (Stossel *et al.*, 1985).

## 1.5 Regulation der Aktinpolymerisation durch aktinbindende Proteine

Die Organisation des Aktinzytoskeletts wird unter anderem durch die Verfügbarkeit von Aktinmonomeren und dem Wechsel zwischen verschiedenen Kationen beeinflusst, aber auch durch eine Vielzahl aktinbindender Proteine. Aktinbindende Proteine modulieren das Längenwachstum von Aktinfilamenten und können anhand ihrer Funktion und ihrer unterschiedlichen Aktinbindeigenschaften in verschiedene Gruppen unterteilt werden (Winder und Ayscough, 2005). Einige Prozesse zur Modulierung der Aktinpolymerisation sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt.



**Abbildung 4: Modulation von G- und F-Aktin durch ABP.** In A) sind aktinmonomerbindende Proteine und in B) filamentbindende Proteine dargestellt. [die Abbildung wurde modifiziert nach Pollard und Cooper, 2009]

Die Verfügbarkeit an freiem G-Aktin wird in der Zelle durch aktinmonomerbindende Proteine, wie z. B. Profilin und Thymosin, reguliert (Abbildung 4A). Wohingegen filamentbindende Proteine die Polymerisation und Depolymerisation der Filamente regulieren, indem sie die Filamentlänge durch *Capping*, Fragmentierung und die Ausbildung komplexer Netzwerke durch Filamentquervernetzung modulieren (Lee und Dominguez, 2010). Einige repräsentative Vertreter der ABP sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1: Einige repräsentative Vertreter der ABP, sowie deren Eigenschaften und Funktionen.**

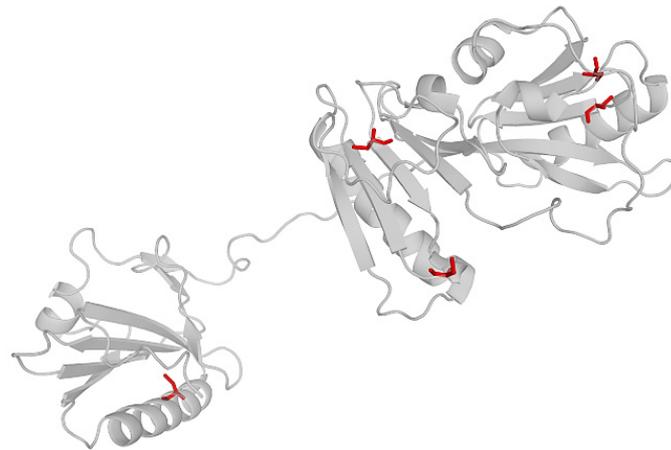
Eigenschaft	Protein	Funktion
Aktinmonomerbindende Proteine	Thymosin, Profilin	Durch bevorzugte Bindung des G-Aktins wird die Polymerisation verhindert Katalyse des Nukleotidaustauschs (Dominguez, 2009; Pollard und Borisys, 2003; Safer <i>et al.</i> , 1997)
Polymerisationsfördernd	Formine	Beschleunigen den F-Aktinaufbau (Chesarone <i>et al.</i> , 2010)
Depolymerisationsfördernd	Cofilin	Beschleunigen den F-Aktinabbau (Paavilainen <i>et al.</i> , 2004)
Bindung des (-)-Ende	Tropomodulin	Verhindern eine Anlagerung oder Dissoziation von Aktinuntereinheiten durch das <i>Cappen</i> des (-)-Endes (Weber <i>et al.</i> , 1994)

Eigenschaft	Protein	Funktion
Bindung des (+)-Ende	CAPG	Blockiert das (+)-Filamentende, ohne es zu spalten (Yu <i>et al.</i> , 1990)
Fragmentierungsproteine	Gelsolin, Villin, Severin	Erzeugen kürzere Fragmente durch Filamentbrüche (Burtnick <i>et al.</i> , 2004)
Quervernetzende Proteine	$\alpha$ -Actinin, Filamin	Vernetzen F-Aktinfilamente zu Bündeln, wodurch 3D-Netzwerke entstehen (Sjöblom <i>et al.</i> , 2008; Tseng <i>et al.</i> , 2004)

ABP fungieren als wichtige Regulatoren der Aktinzytoskelettdynamik und werden ihrerseits beispielsweise von Mitgliedern der Proteinfamilie der Rho-GTPasen über komplexe Signalwege gesteuert (Takenawa und Suetsugu, 2007). Zusätzlich spielen Stimuli, wie z. B. der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel (Blanchard *et al.*, 1989) und das Vorhandensein von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) (Yu *et al.*, 1990), sowie posttranslationale Modifikationen von Aminosäureresten, eine wichtige Rolle bei der Regulation von ABP.

## 1.6 Das humane Protein CAPG

Das humane Protein CAPG, ebenfalls bekannt als *macrophage capping protein*, ist 38,5 kDa groß und besteht aus drei Domänen und 348 Aminosäuren (Yu *et al.*, 1990). Codiert wird CAPG durch das *CAPG*-Gen, welches sich auf dem proximalen, kurzen Arm von Chromosom 2 befindet (Mishra *et al.*, 1994). Überdies gehört CAPG zu der Gelsolin-/Villin-Familie aktinbindender Proteine. Dabei weist CAPG eine 55 %-ige Homologie zu Gelsolin auf und besteht aus drei Gelsolin-Domänen, wohingegen Gelsolin selbst aus sechs solcher Domänen besteht (Mishra *et al.*, 1994). Vom nativen CAPG existiert bislang noch keine Kristallstruktur, daher ist nur die Struktur der CAPG-Mutante (CAPG-Sev), bei der die Aminosäuren 84-91 und 124-137 durch die aktinbindenden Helix-Sequenzen bzw. das WH2-enthaltende Segment von Gelsolin ersetzt wurden, verfügbar (Zhang *et al.*, 2006). Die 3D-Struktur der CAPG-Mutante (CAPG-Sev) ist in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: 3D-Struktur der CAPG-Mutante (CAPG-Sev).** In Rot eingefärbt wurden die fünf in der Aminosäuresequenz enthaltenen Cysteine. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Software *PyMOL* und dem PDB-File: 1J72 erstellt.

Durch *single nucleotide polymorphism* (SNP) Analysen wurden zwei verschiedene Varianten des CAPG Proteins identifiziert. Diese unterscheiden sich durch einen Aminosäureaustausch an der Position 335. Die eine Variante weist ein Histidin (H), die andere ein Arginin (R) an dieser Position auf (Burillo *et al.*, 2009). Des Weiteren besitzt CAPG eine dem herkömmlichen Kernlokalisierungssignal (engl.: *nuclear localization signal*, NLS) ähnelnde Sequenz (KKLYQVKGKK) (Van Impe *et al.*, 2003) und ist sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern lokalisiert (Gettemans *et al.*, 2005). Es wird angenommen, dass die Zellkernlokalisierung von CAPG im Zusammenhang mit dessen Phosphorylierung steht (Onoda und Yin, 1993). In epithelialen Zellen wurde, durch Fusion eines Kernexportsignals (NES, engl.: *nuclear export signal*) von Fragmin an CAPG, die Kernlokalisierung von CAPG verhindert. Was in einem weniger invasiven Zelltyp resultierte (Gettemans *et al.*, 2005). Der Zellkernimport von CAPG ist ATP- und Importin- $\beta$ -abhängig (De Corte *et al.*, 2004) und wird vom *nuclear transport factor 2* (NTF2) und Ran-GTPase vermittelt. NTF2 und Ran-GTPase zählen zu den Hauptregulatoren für den Zytoplasma-Kern Transport (Van Impe *et al.*, 2008). Dabei stellt das im Kern lokalisierte CAPG eine mögliche Verknüpfung zwischen dem Aktinzytoskelett und den auf mikrotubulibasierenden, für die Zellteilung entscheidenden Organellen, wie der Mutter-Zentriole und der mitotischen Spindel, her (Hubert *et al.*, 2009). Darüber hinaus könnte das im Kern lokalisierte CAPG in Chromatin-Remodeling-Komplexen (Olave *et al.*, 2002; Silacci *et al.*, 2004) und an der Transkription (De Corte *et al.*, 2004) durch seine Aktin-Capping-Eigenschaft beteiligt sein (Chi *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2018).

CAPG wird ubiquitär exprimiert, aber besonders abundant in Makrophagen. Erstmals wurde CAPG aus Makrophagen der Lungenbläschen (Alveolen) von Kaninchen isoliert, in denen es ca. 1 % des zytoplasmatischen Gesamtproteins ausmachte (Southwick und DiNubile, 1986).

Im Vergleich zu anderen Mitgliedern der Gelsolin-Familie schneidet CAPG Aktinfilamente nicht, sondern blockiert (*capped*) diese am (+)-Ende (Schafer und Cooper, 1995). Durch diesen Prozess wird die Aktindynamik moduliert. Wobei die Affinität von CAPG gegenüber Aktin durch mikromolare  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen kontrolliert wird. Wenn die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abnimmt oder die  $\text{PIP}_2$ -Menge unabhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration steigt, dissoziiert CAPG leicht von den Aktinfilamenten (Johnston *et al.*, 1990; Young *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1990). Die reversible  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung bedingt eine Konformationsänderung von CAPG, durch welche die Aktinbindestelle freigelegt wird (Young *et al.*, 1994). Wohingegen es durch die Interaktion von  $\text{PIP}_2$  mit CAPG zur Dissoziation von CAPG und der Freigabe der (+)-Enden der Aktinfilamente kommt. Somit könnte angenommen werden, dass CAPG eine Rolle im Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweg (PIK3) spielt (Chi *et al.*, 2019; Silacci *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 1990).

In vielen Studien wurde bereits beschrieben, dass CAPG eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellmotilität einnimmt (Pellieux *et al.*, 2003; Witke *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2009). In Wundheilungsexperimenten in Fibroblasten wurde z. B. gezeigt, dass eine moderate CAPG-Überexpression in einer erhöhten Zellbeweglichkeit resultiert (Sun *et al.*, 1995). Zudem wurde in vielen Studien nachgewiesen, dass CAPG in invasiven Tumorzellen hochreguliert wird (Condeelis *et al.*, 2005). Eine CAPG-Überexpression wurde ebenfalls in Brust-, Ovarial- und Pankreastumoren, sowie Glioblastomen und Lungenadenokarzinomen gefunden (Dahl *et al.*, 2005; Lal *et al.*, 1999; Shao *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 2007; Van Ginkel *et al.*, 1998).

## **1.7 Regulation der Aktinpolymerisation durch ROS**

Die Dynamik des Aktinzytoskeletts wird zum einen, durch die Bindung von ABP und zum anderen über die Modifikation von Aktin, seinerseits durch reaktive Sauerstoff- oder Stickstoffspezies, reguliert. Dabei ist die intrazelluläre Produktion an ROS für eine ordnungsgemäße Zellmigration und Chemotaxis erforderlich (Ambruso *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 1999). Für eine Reihe von Proteinen, die mit dem Zytoskelett assoziiert werden, wurde bereits eine Redoxregulation nachgewiesen (Wilson und González-Billault, 2015).

Aktin seinerseits ist sensitiv für die Oxidation durch ROS/RNS (Fiaschi *et al.*, 2006; Lassing *et al.*, 2007; Milzani *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 2016). Sechs Cysteine des  $\beta/\gamma$ -Aktin und fünf Cysteine des  $\alpha$ -Aktins können oxidiert vorliegen, wobei das Cystein an Position 374 die höchste Redoxsensitivität aufweist (Wilson *et al.*, 2016). An den Cysteinen der Positionen 10 (nur im  $\alpha$ -Aktin), 217, 257 und 374 konnte eine Glutathionylierung (Berndt *et al.*, 2014; Hamnell-Pamment *et al.*, 2005; Stournaras *et al.*, 1990) und an den Cysteinen 217, 257, 285

und 374 eine Nitrosylierung nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 2008; Dalle-donne *et al.*, 2000; Thom *et al.*, 2008). Darüber hinaus konnte eine Sulfen-, Sulfin- oder Sulfonsäure bei den Cysteinen an Position 217, 257, 272 (nur im  $\beta$ -Aktin), 285 und 374 gezeigt werden (Fedorova *et al.*, 2010; Gellert *et al.*, 2015; Ishiwata, 1976; Lassing *et al.*, 2007). Die meisten Cysteinmodifikationen sind dabei mit Konformationsänderungen verbunden, die die Polymerisation bzw. Depolymerisation, sowie die Wechselwirkung mit Bindungspartnern beeinflussen. Es wird angenommen, dass die Oxidation die Polymerisation von G-Aktin verlangsamt (DalleDonne *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001) und die F-Aktinfilamente destabilisiert (Stournaras *et al.*, 1990). Kritisch zu betrachten ist allerdings, dass viele Studien hohe Oxidationsmittelkonzentrationen im mikromolaren Bereich verwendeten. Neuere Arbeiten zeigen hingegen, dass in einigen Systemen eine niedrige, physiologisch relevante ROS-Konzentration (nM- $\mu$ M-Bereich) die Aktinpolymerisation fördern kann (Fiaschi *et al.*, 2006; Moldovan *et al.*, 2000; Munnamalai und Suter, 2009; Xu *et al.*, 2017).

Darüber hinaus sind viele aktinbindende Proteine ebenfalls sensitiv für die Oxidation durch RS. Ein Beispiel dafür ist das Protein Cofilin, das die Depolymerisation von F-Aktin fördert, indem es Filamentfragmente abtrennt, wodurch mehr neues G-Aktin und schnell wachsende Enden (engl.: *barbed-ends*) entstehen (Gunst und Zhang, 2008). Die Bindung von Cofilin an F-Aktin wird durch die Oxidation von Aktin durch MICAL erhöht (Grintsevich *et al.*, 2016). Zusätzlich kann Cofilin seinerseits an vier Cysteinen (Cys39, Cys80, Cys139, Cys147) und einem Methionin (Met115) auch direkt oxidiert werden.

Neben der Regulation des Aktinzytoskeletts über ROS gehört eine große Gruppe an Proteinen, wie Integrine, kleine GTPasen, Kinasen, Phosphatasen, Ionenkanäle und Transporter, zu dem Signalnetzwerk. Diese Proteine regulieren nicht nur direkt den Aufbau, die Organisation und die Funktion des Aktinzytoskeletts im Hinblick auf verschiedene zelluläre Stimuli, sondern lösen auch unterschiedliche Signalkaskaden aus, die z. B. das Zellwachstum oder die Migration beeinflussen. Hervorzuheben ist, dass die Regulatoren des Aktinzytoskeletts ihrerseits ebenfalls durch ROS beeinflusst werden können, was die strikte Kontrolle der ROS nochmals unterstreicht (Chuang *et al.*, 2003; Eble und de Rezende, 2014). Zum Beispiel umfasst die Rho-Familie der GTPasen 20 Proteine von denen ca. die Hälfte ein konserviertes redox-sensitives Motiv (GXXXXGK(S/T)C) aufweist. Das Cystein der Konsensussequenz ist dabei lösungsmittelzugänglich und kann somit gut oxidiert werden (Heo und Campbell, 2005).

Weitere ABP, wie Myosin, Profilin, Tropomyosin und Vimentin weisen ihrerseits oxidative posttranslationale Cysteinmodifikationen auf (Gellert *et al.*, 2015). In einer Proteomstudie, in

der der Einfluss von Peroxiredoxin 1 auf die Chemoresistenz von A172-Glioblastomzellen untersucht wurde, wurde auch CAPG als mögliches redox-sensitives Protein beschrieben. Dabei wurde eine Veränderung in der Abundanz nachgewiesen (Poschmann *et al.*, 2015). Mögliche oxidative posttranslationale Modifikationen der fünf Cysteine von CAPG sind allerdings bislang noch nicht beschrieben.

## **1.8 Die Bedeutung von ROS in Tumorzellen**

Tumorzellen unterscheiden sich von nicht-entarteten Zellen in einigen Gesichtspunkten. Zu den in der Literatur bereits beschriebenen Unterschieden zählen die unkontrollierte Proliferation, die Inhibition von Apoptose-Prozessen, Veränderungen der Zell-Zell-Kommunikation, des Metabolismus und der Zelladhäsion (Evan und Vousden, 2001; Gogvadze *et al.*, 2008; Hanahan und Weinberg, 2000; Hanahan und Weinberg, 2011). ROS zählen zu einer Vielzahl von Faktoren, durch deren Kombination Krebs induziert werden kann. Wobei Tumorzellen einen basal höheren ROS-Gehalt aufweisen, wodurch es zur Akkumulation von Oxidationsprodukten kommen kann (Liou und Storz, 2010; Pelicano *et al.*, 2004; Prasad *et al.*, 2017; Schumacker, 2006). Dies stellt wiederum große Herausforderungen an das Oxido-Reduktionssystem der Zellen. Die basal hohen ROS-Mengen liegen durch das Oxido-Reduktionssystem unter der toxischen Schwelle und haben unterschiedliche Einflüsse auf die Tumorzellen. Zum einen wird durch Modifikation von DNA die genomische Instabilität erhöht, wodurch die Tumorpromotion gefördert wird (Pelicano *et al.*, 2004). Zudem steigern ROS die Proliferation von Tumorzellen durch Modulation von Signalwegen, wie z. B. des MAP-Kinase-Signalweges oder durch Modifikation redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren, wie HIF-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B oder AP-1 (Afanas'ev, 2011; Waris und Ahsan, 2006). Des Weiteren steigern ROS die Invasivität von Tumorzellen und fördern die Metastasierung (Manda *et al.*, 2009; Nishikawa, 2008; Nishikawa und Hashida, 2006). Dabei stellt der veränderte Redoxstatus in Tumorzellen einen Ansatzpunkt für mögliche Therapieansätze dar. Bei einem möglichen redox-modulierenden Ansatz werden antioxidativ wirkende Substanzen verwendet, um den ROS-Gehalt zu verringern und als Folge Apoptose auszulösen. Wohingegen beim prooxidativen Ansatz der ROS-Gehalt weiter erhöht wird, was ebenfalls zur Apoptose der Tumorzellen führt. Im Vergleich zu entarteten Zellen sind nicht-entartete Zellen in der Lage sich an die erhöhte ROS-Menge anzupassen und diese aufgrund ihres funktionalen Oxido-Reduktionssystems zu kompensieren (Panieri und Santoro, 2016; Sullivan und Chandel, 2014; Trachootham *et al.*, 2009). Ein erhöhter ROS-Gehalt in Tumorzellen korreliert häufig mit der Aggressivität von Tumoren und einer schlechten Prognose (Kumar *et al.*, 2008).

### 1.8.1 Die Rolle von CAPG in Tumorzellen

Zellen benötigen ein funktionales Zytoskelett, um auf intra- und extrazelluläre Signale entsprechend reagieren zu können. Das Aktinzytoskelett ist ein komplexes Netzwerk, das aus einer Vielzahl verschiedener Proteine besteht. ABP fungieren als wichtige Regulatoren der Aktinzytoskelettdynamik und werden ihrerseits über komplexe Signalwege gesteuert. Eine entartete ABP-Regulation kann zur onkogenen Transformation der Zelle führen, indem sich die Migration und Invasion von Krebszellen verändert. Dabei spielt der Expressionsstatus, die subzelluläre Lokalisation oder die Aktivität der ABP eine Rolle.

Eine Reihe von Studien haben bereits gezeigt, dass es sich bei CAPG um ein wichtiges Aktin-Capping-Protein handelt, welches mit einer Reihe klinisch pathologischer Merkmale von Tumorzellen, wie der Motilität, der Invasivität und der Metastasierung, assoziiert wird (Renz *et al.*, 2008; Van Impe *et al.*, 2013). Es wurde gezeigt, dass ein erhöhtes CAPG-Level in zunächst nicht invasiven Zellen mit einer erhöhten zellulären Motilität/Chemotaxis einhergeht und in einer erhöhten Invasion in eine Kollagen Typ I-Matrix oder primäres Herzgewebe von Hühnern resultiert (De Corte *et al.*, 2004). Wohingegen die Invasion unterschiedlicher Krebszelllinien durch Runterregulation der CAPG-Expression verringert wird (Kimura *et al.*, 2013; Thompson *et al.*, 2007; Van den Abbeele *et al.*, 2007). Zudem zeigten in den letzten Jahren eine Vielzahl von Proteomanalysen, dass CAPG in verschiedenen Krebsarten überexprimiert wird (Ichikawa *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2010; Voisin *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2010). Ferner wurde gezeigt, dass CAPG die Tumorentstehung durch Veränderung tumorassoziierter Proteine, wie z. B. STAT4, ANK3 und IGF2, fördert (Papala *et al.*, 2017). Kürzlich wurde beschrieben, dass CAPG die Brustkrebsmetastasierung durch Modulation des Transkriptionsfaktors STC-1 erhöht. Mechanistisch konkurriert CAPG mit dem Transkriptionsrepressor Arginin-Methyltransferase 5 (PRMT5) um die Bindung an den Stanniocalcin-1-Promotor (STC-1), was zu einer verringerten Histon-H4R3-Methylierung und einer verstärkten *STC-1*-Transkription führt (Huang *et al.*, 2018). In einer umfassenden Studie, bei der Veränderungen in der Genexpression humaner Glioblastome, der aggressivsten Form von primären Hirntumoren, untersucht wurden, zeigte sich, dass das *CAPG*-Transkript um ein achtfaches erhöht vorlag (Lal *et al.*, 1999). Zudem ist die Proteinmenge an CAPG in Gliomen des Grades III und IV im Vergleich zu normalem Gewebe erhöht (Xing und Zeng, 2016). Yun und Kollegen bestätigten kürzlich, dass der mRNA- und Proteinspiegel von CAPG in humanen Gliomen signifikant erhöht ist und dass eine höhere CAPG-Expression als unabhängiger Faktor zur Vorhersage einer ungünstigen Prognose dienen könnte. Die Funktionsvalidierung wurde in den Glioblastomzelllinien U87 und U251 durchgeführt. Bei

denen gezeigt werden konnte, dass eine Überexpression oder Deletion von *CAPG* die Zellproliferation, die Invasivität und die Migration beeinflusst. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei *CAPG* um ein mutmaßliches Onkogen in humanen Glioblastomen handeln könnte (Yun *et al.*, 2018). Yang *et al.* (2018) identifizierten *CAPG* und eine Reihe anderer Proteine als mögliche Biomarker für Glioblastome oder als mögliche Ziele für eine Gentherapie (Yang *et al.*, 2018b).

Darüber hinaus legen Erkenntnisse aus Studien nahe, dass Tumorzellen im Vergleich zu gesunden, nicht-entarteten Zellen, einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt sind, der mit onkogenen Transformationen, wie der Veränderung der Stoffwechselaktivität und einer erhöhten ROS-Produktion einhergeht (Behrend *et al.*, 2003; Pelicano *et al.*, 2004; Toyokuni *et al.*, 1995). ROS können ihrerseits die Metastasierung fördern, die Invasivität steigern und die Proliferation modulieren, indem bestimmte Signalwege oder redox-sensitive Transkriptionsfaktoren reguliert werden (Manda *et al.*, 2009; Waris und Ahsan, 2006). Die vorliegenden Ergebnisse lassen mutmaßen, dass *CAPG* eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese von Glioblastomen spielen könnte. Deshalb liegt der Fokus dieser Arbeit auf der näheren Charakterisierung des Proteins, sowie seines Redoxstatus in Glioblastomzelllinien.

### 1.8.2 Epidemiologie von Gliomen

Primäre Tumore des zentralen Nervensystems bestehen generell aus heterogenen Gruppen benigner und maligner Neoplasien und werden als Gliome bezeichnet, weil die meisten einen glialen Ursprung besitzen (Ohgaki und Kleihues, 2005). Weiter unterteilt werden die Gliome nach dem ursprünglichen glialen Zelltyp in astrozytäre, oligodendrozytäre und ependymale Gruppen, sowie Mischformen hieraus (Kleihues *et al.*, 2002; Louis *et al.*, 2007). 2016 gab die Weltgesundheitsorganisation (WHO) eine neue Klassifizierung für Tumore heraus, die erstmals molekulare Unterschiede zwischen den Tumoren berücksichtigte (Louis *et al.*, 2016). Während WHO-Grad I Tumore, wie z. B. das pilozytische Astrozytom, als biologisch gutartig gelten und vom umgebenden Gewebe deutlich abgrenzbar und resezierbar sind, wachsen niedrig-gradige (WHO-Grad II) und höher-gradige Gliome (WHO-Grad III und IV) diffus in das angrenzende Hirngewebe und rezidivieren (Wilson, 1992). Häufige Vertreter der WHO-Grad II Gliome sind diffuse Astrozytome, Oligodendrogliome und Oligoastrozytome, welche in ihrem weiteren Verlauf stets in höhere WHO-Grade übergehen können (Ohgaki und Kleihues, 2005).

Das Glioblastoma multiforme (GBM) zählt zu den häufigsten malignen hirneigenen Tumoren bei Erwachsenen und zeichnet sich insbesondere durch starke Vaskularisierung und diffuse

Invasion in das benachbarte Hirngewebe aus. Glioblastompatienten haben unabhängig von der Tumorentstehung meist einen schnell fortschreitenden Krankheitsverlauf mit schlechten Heilungsprognosen, ungeachtet der Behandlungen (Boisen *et al.*, 2018; Gilbert *et al.*, 2014). Der Grund hierfür ist die hohe Invasivität der Glioblastomzellen. Deshalb wird nach neuen Therapiemöglichkeiten gesucht, um besser gegen den Tumor vorgehen zu können und so die Lebensqualität, sowie die Überlebenszeit der Patienten zu erhöhen. Die Hemmung der Tumorzellmigration stellt einen weiteren experimentell therapeutischen Ansatz dar. Wird die Migration gehemmt, wäre es denkbar, dass die schon angewandten lokalen Methoden, wie die Resektion des Tumors und die Bestrahlung, einen höheren Wirkungsgrad erreichen könnten. In den letzten Jahrzehnten konnte zudem eine erhöhte Hypoxie, sowie eine vermehrte Laktatproduktion und eine gesteigerte glykolytische Aktivität in Glioblastomen gezeigt werden (Hegde *et al.*, 2004).

### 1.8.3 Glioblastomzelllinien als Modellsystem

Die Ergebnisse aus der Literatur legen nahe, dass es sich bei CAPG um ein mögliches Onkogen in humanen Glioblastomen handeln könnte. Vor allem die Überexpression des Proteins scheint dabei eine große Rolle für die Invasivität und die Migration zu spielen. Unklar bleibt, inwiefern ROS Einfluss auf die Regulation von CAPG haben. Für die Untersuchung einzelner Proteine werden in der Regel Zelllinien als Modellsystem herangezogen. In dieser Arbeit wurden die Glioblastomzelllinien A172 und LN18 ausgewählt, um den Einfluss der Überexpression des Kandidatengens *CAPG* und dessen Cysteinmutanten zu untersuchen.

Zelllinien eignen sich besonders gut als Modellsystem, weil sie sich in der Regel leicht kultivieren lassen und größere Mengen an Zellmaterial kostengünstig und in kurzer Zeit generiert werden können. Einflussfaktoren, wie die Temperatur oder die Nährstoffversorgung, können exakt kontrolliert und standardisiert werden, wodurch reproduzierbare Ergebnisse generiert werden können. Ein weiterer Vorteil von Zellkulturmodellen besteht darin, dass unter definierten Bedingungen, der Einfluss von beispielsweise ROS auf das gesamte Proteom, aber auch auf ein einzelnes Kandidatenprotein, in einer vereinfachten *in vitro* Umgebung untersucht werden kann. Ein Nachteil könnte sein, dass die Mikroumgebung außeracht gelassen wird, weil nur ein Zelltyp in Kultur betrachtet wird, wodurch z. B. keine Informationen über die Zell-Zellkommunikation erhalten wird. Durch Modulation des Redoxstatus lassen sich für die Oxidation sensitive Cysteine identifizieren. Eine Aufrechterhaltung des Redoxstatus in primärem Tumorgewebe gestaltet sich als schwierig, weil der oxidative Zustand der einzelnen Cysteinmodifikationen nicht arretiert werden kann,

da einige Oxidationszustände sehr instabil sind und mit Umgebungsoxidationsmittel, wie Sauerstoff, weiter hoch oxidiert werden können. Nachteilig ist ebenfalls, dass der Redoxstatus in primärem Gewebe nicht moduliert werden kann. Im Zellkultorexperiment können die Zellen dafür mit unterschiedlichen Mengen an Wasserstoffperoxid behandelt werden. Denn obwohl Wasserstoffperoxid ein relativ schwaches Oxidationsmittel ist, ist exogen zugegebenes Wasserstoffperoxid in der Lage die Zellmembran z. B. über Aquaporine schnell zu durchqueren, um redox-sensitive Cysteine intrazellulärer Proteine zu oxidieren und ihre Aktivität in Signalwegen zu modulieren (Bienert *et al.*, 2007; Henzler und Steudle, 2000). Diese Art von Manipulation potentieller redox-regulierter Proteine wurde bereits erfolgreich in der Literatur verwendet. Die in dieser Arbeit verwendete Wasserstoffperoxidkonzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  bzw. 250  $\mu\text{M}$  und eine Behandlungsdauer von 10 min wurde basierend auf Angaben aus vergleichbaren publizierten Studien gewählt (Upadhyay *et al.*, 2019; Wani *et al.*, 2011; Zmijewski *et al.*, 2010).

### 1.9 Proteomanalyse

Eine Möglichkeit posttranslationale Modifikationen in komplexen Systemen zu untersuchen stellt die Proteomanalyse dar. Dabei wird die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt unter definierten Bedingungen in einer Zelle, einem Gewebe, einer Körperflüssigkeit oder einem Organismus exprimiert wird, als Proteom bezeichnet (Wilkins *et al.*, 1996) und lässt sich nur mit Hilfe der Proteomanalyse erfassen. Exogene Faktoren, wie Medikamente oder Umwelteinflüsse, sowie endogene Faktoren, wie der pH-Wert oder intrazelluläre Signale sind in der Lage die Zusammensetzung des Proteoms maßgebend zu beeinflussen (Anderson und Anderson, 1996). Durch alternatives Spleißen und als Folge posttranskriptioneller Modifikation von Genprodukten können unterschiedliche Proteinvarianten entstehen, wodurch die Komplexität des Proteoms erhöht wird (Missler und Südhof, 1998). Zusätzlich machen posttranslationale Modifikationen (PTM), wie z. B. die Phosphorylierung, Methylierung oder die oxidative Modifizierung von Cysteinresten an Proteinen, das Proteom zu einem hoch komplexen System (Apweiler *et al.*, 2009). Denn PTM können die Proteinfunktion, -struktur, -lokalisation und deren Degradation beeinflussen (Karve und Cheema, 2011). Dabei kann das Proteom einer eukaryotischen Zelle näherungsweise 10.000-20.000 Proteinspezies enthalten (Aebersold *et al.*, 2018; Zuo *et al.*, 2001), deren Abundanz in einem dynamischen Bereich von sieben Größenordnungen liegt (Beck *et al.*, 2011). Das Ziel der Proteomanalyse besteht in der Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen im Kontext komplexer biologischer Prozesse (Lottspeich, 2009). Denn bereits kleine Veränderungen der Proteinmengen können einen entscheidenden

regulatorischen Einfluss auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse haben (Choudhary und Grant, 2004). In differenziellen Proteomanalysen lassen sich die Veränderungen zwischen unterschiedlichen Zuständen oder Zelltypen erfassen, wodurch physiologische oder pathophysiologische Prozesse aufgeklärt werden können. Mittels Proteomanalyse können zudem ebenfalls einzelne Zellkompartimente, wie das Zytosol, der Nukleus, einzelne Zellorganellen oder das Sekretom, als auch PTM gezielt untersucht werden (Liu *et al.*, 2018). Die Massenspektrometrie (MS) ist zur Proteomanalysetechnik der Wahl geworden, mit deren Hilfe nicht nur globale Proteomstudien durchgeführt, sondern ebenfalls Protein-Protein-Interaktionen oder auch Netzwerke aufgeklärt werden können (Blagoev *et al.*, 2003; Dunham *et al.*, 2012; Gavin *et al.*, 2002). Um weiterführende Erkenntnisse aus den gewonnenen MS-Daten ziehen zu können, schließt sich eine bioinformatische Datenauswertung an. Mit deren Hilfe sich einzelne Aspekte, wie Protein-Protein-Interaktionen, Proteinfunktionen und -modifikationen verknüpfen lassen, sodass sich möglicherweise Signalwege, Netzwerke oder biologische Prozesse identifizieren lassen, die eine wichtige Rolle spielen (Kumar und Mann, 2009; Schmidt *et al.*, 2014).

### **1.9.1 Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie**

Die zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese (Klose und Kobalz, 1995) und massenspektrometriebasierte Quantifizierungstechniken, wie die markierungsfreie Analyse (Silva *et al.*, 2005) oder metabolische Markierungsstrategien (SILAC, engl.: *stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) (Ong *et al.*, 2002) zählen zu den grundlegenden Methoden der Proteomanalyse (Abbildung 6). Bei der 2D-Gelelektrophorese können bis zu drei Proteinproben vor der elektrophoretischen Trennung mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert werden. Dabei weisen die Fluoreszenzfarbstoffe eine ähnliche Struktur und eine nahezu identische Masse auf, besitzen allerdings unterschiedliche Absorptions- und Emissionsspektren, wodurch es möglich ist Proteine unterschiedlicher Proben auf einem einzigen 2D-Gel aufzutrennen. Nach der Fluoreszenzmarkierung werden die Proteine mittels isoelektrischer Fokussierung über einen pH-Gradienten nach ihrem isoelektrischen Punkt in einer Gelmatrix aufgetrennt. Anschließend erfolgt die Auftrennung nach dem Molekulargewicht in einer zweiten Dimension (Ünlü *et al.*, 1997). Nach aufeinanderfolgender Anregung bei den unterschiedlichen Wellenlängen liefert jede Probe ein eigenes farbcodiertes Spotmuster. Die erhaltenen Muster können anschließend in einer entsprechenden Software übereinandergelegt und die Unterschiede verglichen werden (Chakravarti *et al.*, 2005). Zudem

können die gewünschten Proteinspots aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie einer detaillierten Analyse unterzogen werden.

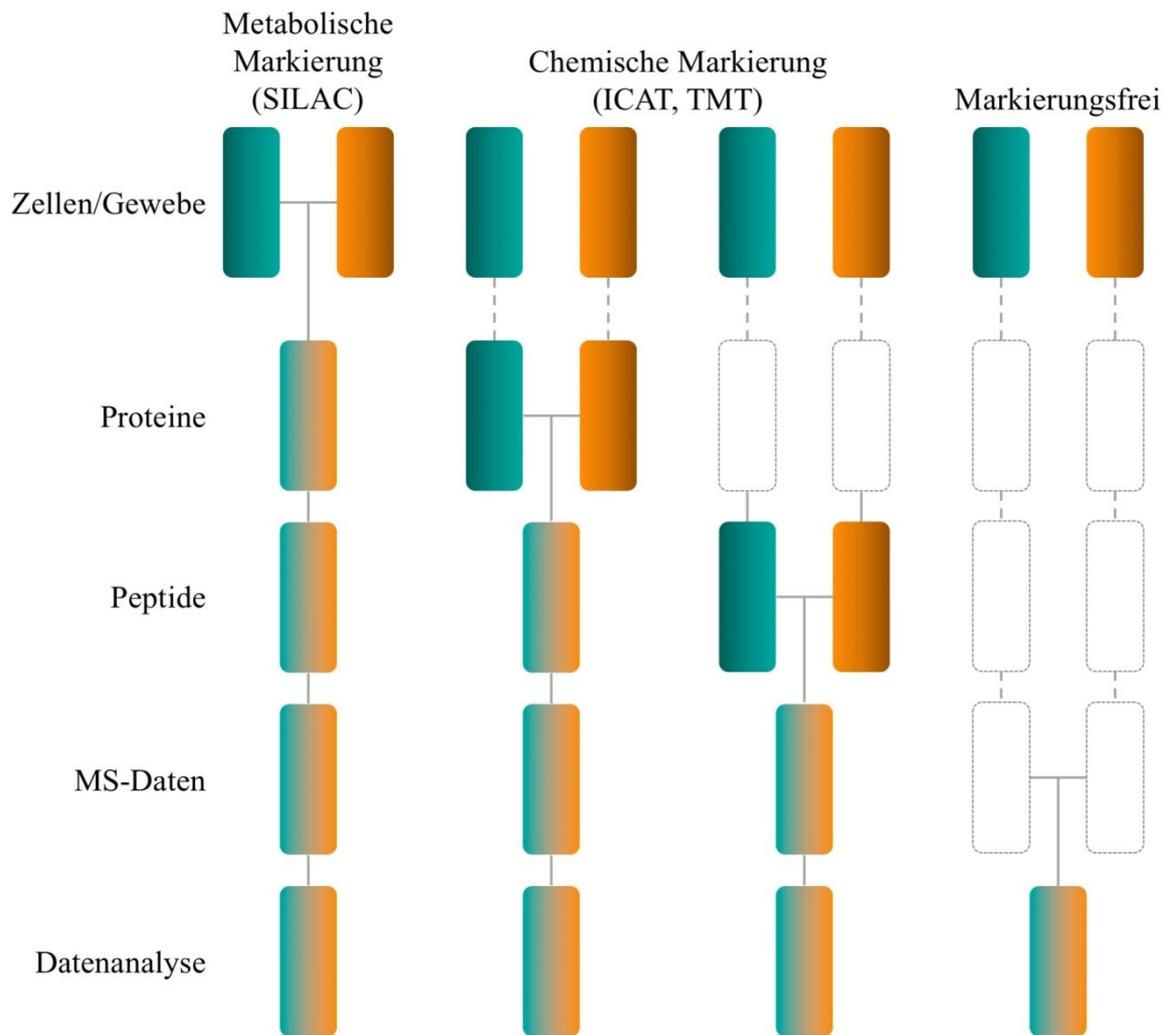
Die Massenspektrometrie bietet den Vorteil, dass tausende Proteine aus komplexen Gemischen gleichzeitig identifiziert und quantifiziert werden können. Dazu kommt der technische Fortschritt, wodurch heutzutage massenspektrometriebasierte Ansätze, als Methode der Wahl für eine Proteomanalyse genutzt werden. Massenspektrometriebasierte Analysetechniken werden zudem aufgrund ihrer hohen Sensitivität und der hohen Genauigkeit bei der Massenbestimmung bevorzugt verwendet.

Im einfachsten Fall besteht ein Massenspektrometer dabei aus einer Ionenquelle, die die geladenen Ionen generiert, einem Massenanalysator, der die Ionen nach dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis ( $m/z$ ) auftrennt und einem Detektor, der den Ionenstrom misst (Aebersold und Mann, 2003). Bei massenspektrometriebasierten Methoden wird zwischen dem *bottom-up* und dem *top-down* Ansatz unterschieden. Während beim *top-down* Ansatz intakte Proteine analysiert werden, wird bei der *bottom-up* Methode das Proteingemisch zunächst proteolytisch verdaut, massenspektrometrisch analysiert und nach Abgleich der Spektren mit Datenbanken einem Protein zugeordnet. Jedoch ist nach aktuellem Stand der Technik eine Intaktmessung von komplexen Proteingemischen bislang nur eingeschränkt möglich (Catherman *et al.*, 2014). Häufig wird das komplexe Protein- oder Peptidgemische zunächst über eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl.: *high performance liquid chromatography*) aufgetrennt und anschließend mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation (MALDI, engl.: *matrix-assisted laser desorption/ionization*) (Karas und Hillenkamp, 1988) oder mittels Elektrosprayionisation (ESI) (Fenn *et al.*, 1989) von der Flüssig- in die Gasphase überführt. Beim *top-down* Ansatz weisen die zu analysierenden Proteine hohe Ladungszustände auf. Wohingegen bei der *bottom-up* Methode niedrig geladene Peptidionen erzeugt und im Anschluss massenspektrometrisch nach dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis analysiert werden (Catherman *et al.*, 2014; Fenn *et al.*, 1989).

Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Massenanalysatoren, wie z. B. einem Flugzeitanalysator (engl.: *time of flight*, TOF), einer Ionenfalle, einem Tripel-Quadrupole oder einer Orbitrap, die zur Auswahl stehen (Haag, 2016; Jennings und Dolnikowski, 1990). Jeder Massenanalysator hat dabei seine Vor- und Nachteile und je nach Wahl können gerichtete Analysen, wie z. B. PRM (engl.: *parallel reaction monitoring*) (Ronsein *et al.*, 2015) oder ungerichtete Analysen durchgeführt werden. Die gerichtete Analyse wird häufig zur Untersuchung niedrig abundanter Proteine aus einem komplexen Gemisch und zur

Untersuchung von PTM verwendet. Wohingegen sich die ungerichtete Analyse vor allem für die Untersuchung von komplexen Proben eignet. Aktuell werden vermehrt Hybridgeräte benutzt, die eine Kombination aus mehreren Massenanalysatoren verbaut haben. Im ersten Schritt erfolgt die Analyse der Mutterionen, während im nächsten Schritt Ionen ausgewählt, fragmentiert und anschließend die entstandenen Fragmentionen analysiert werden (Tandem-MS).

Darüber hinaus lassen sich Abundanzunterschiede von Proteinen zwischen unterschiedlichen Zuständen mittels massenspektrometrischer Analyse relativ oder absolut quantifizieren (Bantscheff *et al.*, 2007). Bei der relativen Quantifizierung werden die ermittelten Proteinabundanzen im Verhältnis zueinander betrachtet. Voraussetzung für eine gute markierungsfreie Analyse ist jedoch eine hohe Reproduzierbarkeit bei der Probenvorbereitung und eine gleichbleibende Performance der HPLC und des Massenspektrometers (Cox und Mann, 2011). Im Vergleich dazu können bei der absoluten Quantifizierung genaue Konzentrationen ermittelt werden. Dabei werden z. B. Standards mit definierter Konzentration zu den Proben gegeben, wodurch anschließend eine genaue Konzentrationsbestimmung möglich ist. Für die relative Proteinquantifizierung stehen dabei verschiedene massenspektrometriebasierte Strategien zur Verfügung (Abbildung 6). Dazu zählt beispielsweise die metabolische Markierung mittels SILAC, bei der isotoopenmarkierte Aminosäuren in das Zellkulturmedium gegeben werden, wodurch die Zellen die isotoopenmarkierten Aminosäuren in alle neu gebildeten Proteine einbauen. Während der Probenvorbereitung können chemische Markierungsmethoden, wie die Isotoopen-codierte Affinitätsmarkierung (engl.: *isotope-coded affinity tag*, ICAT) (Gygi *et al.*, 1999), eingesetzt werden. Sowohl bei einem SILAC-, als auch bei einem ICAT-Ansatz wird ein Signalkonzept mit einem spezifischen Massenunterschied detektiert. Über das Verhältnis der Signalintensitäten des Signalkonzepts kann im Anschluss eine Quantifizierung erfolgen.



**Abbildung 6: Gängige Methoden für die massenspektrometrie-basierte Quantifizierung von Proteinen.** Die orangen und grünen Kästchen repräsentieren zwei unterschiedliche Probengruppen. Die horizontalen Linien verdeutlichen, wann die beiden Proben kombiniert werden. [SILAC = *stable isotope labeling by amino acids in cell culture*; ICAT = *isotope coded affinity tag*; TMT = *tandam mass tag*/die Abbildung wurde modifiziert nach Bantscheff *et al.*, 2007]

Im Vergleich zu den beispielhaft vorgestellten markierungsbasierten Methoden kann auch eine markierungsfreie Quantifizierung (engl.: *label-free quantification*, LFQ) genutzt werden. Ein großer Vorteil der markierungsfreien Quantifizierung besteht darin, dass die Proben nicht manipuliert werden und die Analyse direkt erfolgt. Dabei kann die Quantifizierung auf den Intensitäten des Mutterions (*area under the curve*) oder über die Anzahl der aufgenommenen Fragmentspektren pro Protein (*spectral counting*) erfolgen (Bruce *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2004).

Da der Fokus dieser Arbeit auf der massenspektrometrischen Analyse von oxidativen, posttranslationalen Cysteinmodifikationen liegt, wird darauf im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

## 1.9.2 Analyse von oxidativen Cysteinmodifikationen mittels Massenspektrometrie

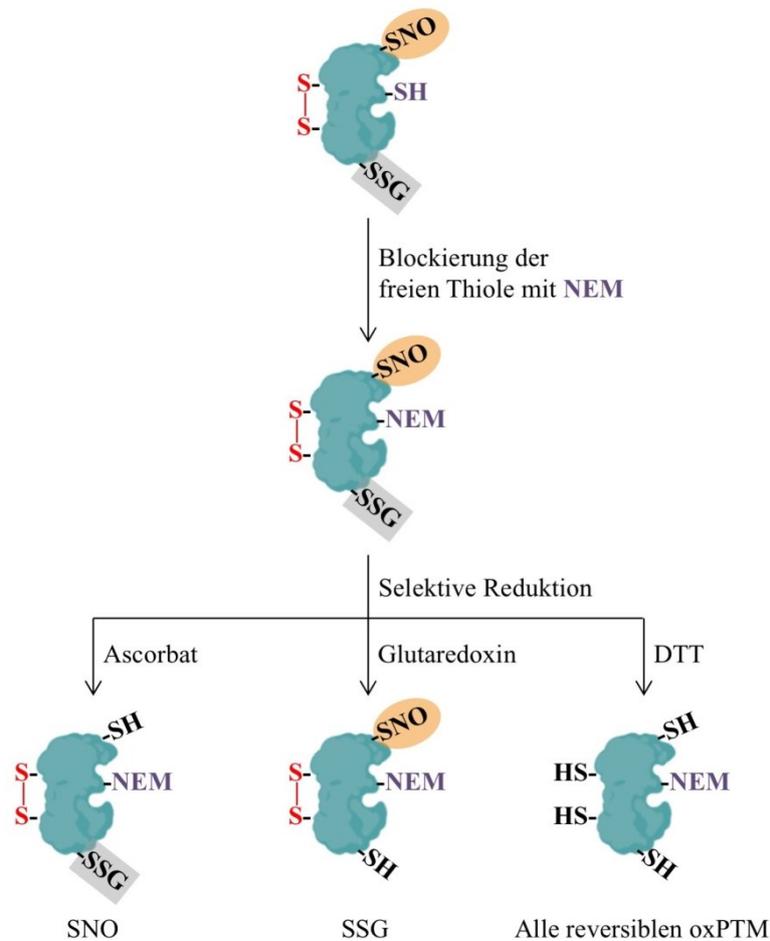
Die Untersuchung von oxidativen posttranslationalen Modifikationen (oxPTM) gewinnt immer mehr an Bedeutung, weil oxPTM vielfältige intrazelluläre Einflüsse aufweisen. Die Reihe diverser oxPTM und deren Reversibilität unterstreicht ihre Rolle für die Proteinfunktion und macht die Untersuchung von Zellsignalwegen, bei denen Cysteinreste oxidiert werden, zu einem wachsenden Forschungsgebiet. Um die Rolle von oxPTM in biologischen Systemen verstehen zu können, ist ihre Identifizierung und Charakterisierung von enormer Bedeutung. Die Identifizierung von oxPTM gestaltet sich allerdings als schwierig, weil diese in biologischem Material häufig nur in substöchiometrischen Mengen vorkommen und die meisten von ihnen reversibel sind. Deshalb muss bereits bei der Probenvorbereitung vor allem darauf geachtet werden, dass die freien Thiole blockiert werden, sodass der oxidative Zustand der Cysteine möglichst arretiert ist. Denn einige Oxidationszustände sind sehr instabil und können mit Umgebungsoxidationsmitteln, wie  $O_2$ , oxidiert werden. Um Oxidationsartefakte während der Zell- oder Gewebeaufarbeitung zu minimieren, werden üblicherweise zwei Methoden angewendet. Zum einen kann der Oxidationszustand der Cysteine durch Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) während der Probenaufarbeitung arretiert werden. Beim TCA-*Quenching* kommt es zur Ausfällung und Denaturierung von Proteinen, wodurch die Reaktivität von Thiolanionen unterdrückt wird, indem der pH-Wert unter ihren  $pK_a$ -Wert gesenkt wird. Als Alternative sind eine Reihe von thiolreaktiven Chemikalien entwickelt worden, die während der Zellyse die freien Thiole blockieren und mit massenspektrometrie-basierten Analysen kombinierbar sind, um globale Veränderungen der oxidativen posttranslationalen Cysteinmodifikationen im Proteom (Redox-Proteom) untersuchen zu können (Giron *et al.*, 2011; Held und Gibson, 2012; Kramer *et al.*, 2015; Leichert und Jakob, 2006). So kann ebenfalls der Einfluss von bestimmten exogenen Stimuli, wie z. B. die Behandlung mit Wasserstoffperoxid, auf die Proteinoxidation untersucht werden, um nicht nur redox-sensitive Proteine zu identifizieren, sondern auch deren mögliche Beteiligung in Signalkaskaden oder Netzwerken abzuleiten.

Heutzutage werden oxPTM bevorzugt mittels massenspektrometrie-basierter Methoden untersucht, da hier auch Informationen über die genaue Lokalisation der Modifikation erhalten werden können.

Wie in Abschnitt 1.9.1 beschrieben, kann für die Detektion von PTM eine 2D-DIGE (DIGE, engl.: *Difference Gel Electrophoresis*) Gelelektrophorese durchgeführt werden. Dabei kann beispielhaft jeweils eine Probe, die unter reduzierenden, oxidierenden oder unveränderten Bedingungen aufgeschlossenen wurde verglichen werden. Die unterschiedlichen Proteinspots

können aus dem Gel ausgeschnitten und mittels MS analysiert werden. Nachteilig ist, dass niedrig abundante Proteine mit dieser Methode häufig schlecht nachgewiesen werden können, was eine vorherige Anreicherung von oxidierten Proteinen notwendig macht (Leichert und Jakob, 2006).

Im Jahre 2001 veröffentlichten Jaffrey *et al.* die Biotin-Switch-Technik (BST), die erste massenspektrometrie-basierte Methode für die Analyse von reversiblen oxPTM (Jaffrey und Snyder, 2001). Diese ist über die Jahre immer weiterentwickelt worden (Leichert und Jakob, 2004; Lind *et al.*, 2002; Reynaert *et al.*, 2006). Dabei werden die freien Thiole mittels Methanthiosulfonat (MMTS), N-Ethylmaleimid (NEM) oder Iodoacetamid (IAM) im ersten Schritt alkyliert. Im Anschluss erfolgt die selektive oder globale Reduktion der reversiblen oxPTM (Abbildung 7). Die nun freien Thiole werden im dritten Schritt mit spezifischen thiolreaktiven Reagenzien markiert (Jaffrey und Snyder, 2001). Im Anschluss kann eine affinitätschromatographische oder eine matrixbasierte Anreicherung erfolgen (Forrester *et al.*, 2009), bevor die Proben im Anschluss mittels LC-MS/MS analysiert werden (Yang und Li, 2015). Zur gezielten Anreicherung von Sulfensäuren kann z. B. Biotin-gekoppeltes Dimedon verwendet werden (Charles *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2010). Allerdings bietet die matrixbasierte Anreicherung den Vorteil, dass kein weiterer Schritt zur Abtrennung des Biotins vor der LC-MS/MS-Analyse nötig ist (Guo *et al.*, 2014). Zudem haben matrixbasierte Anreicherungsverfahren im Vergleich zu den Ansätzen auf Biotin-Basis den Vorteil, dass sie simpler vom Arbeitsablauf sind und eine sehr hohe Anreicherungsspezifität, sowie Sensitivität aufweisen (Forrester *et al.*, 2009).



**Abbildung 7: Probenvorbereitungsstrategien für den Nachweis verschiedener Arten reversibler Cysteinmodifikationen.** Die freien Thiole (-SH) werden anfänglich durch Alkylierung mit N-Ethylmaleimid (NEM) blockiert. Im Anschluss werden die verschiedenen Arten von modifizierten Cysteinen unter Verwendung verschiedener Reagenzien selektiv zu freien Thiolen reduziert. [SH = freies Thiol; SNO = Nitrosylierung; SSG = Glutathionylierung/die Abbildung wurde modifiziert nach Guo *et al.*, 2014]

Zudem können Reagenzien, wie iodoTMT (engl.: *iodoacetyl-based cysteine reactive isobaric tags*), zur positionsgenauen Detektion und Quantifizierung von Cysteinmodifikationen verwendet werden. Bei iodoTMT-Reagenzien handelt es sich um eine Reihe von isobaren Verbindungen mit deren Hilfe sich bis zu sechs Proben markieren lassen, die anschließend in einer MS-Analyse kombiniert werden können. Das iodoTMT-Reagenz bindet spezifisch und irreversibel freie Thiole, die mit Hilfe dieses *Tags* im nächsten Schritt angereichert und anschließend über LC-MS/MS analysiert werden können (Araki *et al.*, 2016; Murray *et al.*, 2012; Qu *et al.*, 2014). Ebenfalls eignen sich isotonenmarkierte, biotinylierte, thiolreaktive Chemikalien, wie ICAT. Dabei gibt es zwei isotopische Formen, eine leichte  $^{12}\text{C}$ -Form und eine schwere  $^{13}\text{C}$ -Form. Für die Bestimmung des Oxidationszustandes von Cysteinen werden reduzierte Thiole spezifisch mit  $^{12}\text{C}$ -ICAT und oxidierte Thiole nach deren Reduktion mit  $^{13}\text{C}$ -ICAT differenziell markiert, über den *Tag* angereichert, proteolytisch verdaut und über LC-MS/MS analysiert. Der Oxidationszustand des Cysteins kann folglich aus dem Verhältnis

von schwer zu leicht markierten Cysteinen quantitativ bestimmt werden (Leichert *et al.*, 2008). Ein Vorteil von iodoTMT- und ICAT-Reagenzien ist, dass sie kommerziell erhältlich sind. Allerdings haben diese Reagenzien eine sterisch anspruchsvolle Struktur, die die Effizienz der Thiol-Markierung herabsetzen kann (Yang *et al.*, 2016). Um das Problem der sterischen Hinderung zu umgehen, werden häufig thiolreaktive Chemikalien, mit sterisch kleineren Strukturen, wie das Iodoacetamid (IAM) oder das N-Ethylmaleimid (NEM) verwendet. Diese bilden stabile Thioether mit den freien Thiolresten aus (Ratnayake *et al.*, 2013). Eine Quantifizierung ist ebenfalls möglich, wenn die nach der Reduktion neu frei gewordenen Thiole mit der jeweils isotopenschweren Variante markiert werden (McDonagh *et al.*, 2014). Nachteilig ist allerdings, dass IAM ungewünschte Nebenreaktionen mit Histidin-, Methionin- oder Tyrosinresten eingehen kann. NEM hingegen reagiert schneller und spezifischer mit Thiolgruppen in einem pH-Bereich von 6,5 bis 7,5, ist aber instabiler als IAM. Eine weitere vorteilhafte Eigenschaft beider thiolreaktiver Reagenzien ist, dass beide membranpermeabel sind (Rogers *et al.*, 2006).

Bei den vorgestellten Methoden handelt es sich um einen indirekten Nachweis der oxPTM. Darüber hinaus gibt es ebenfalls Strategien bei denen oxPTM direkt nachgewiesen werden können. Häufig wird allerdings die indirekte Nachweismethode bevorzugt, weil der oxidative Zustand der Cysteine besser arretiert werden kann und grundsätzlich mehr indirekte Strategien für den Nachweis von oxPTM zur Verfügung stehen (Kramer *et al.*, 2015). Bei der Untersuchung von oxPTM ist es ebenfalls wichtig die Stöchiometrie von oxidierten zu reduzierten Thiolen quantifizieren zu können. Dafür bietet sich die Kopplung eines differenziellen Alkylierungsansatzes mit NEM und seinem schweren Isotop NEM-D5 mit einem MRM-Experiment zur Quantifizierung des ortsspezifischen Cysteinoxidationsstatus eines endogenen Proteins an (Held *et al.*, 2010).

Je nach Fragestellung müssen die einzelnen Vor- und Nachteile der jeweiligen Strategien abgewogen werden. Für die Analyse eines komplexen Proteoms in Bezug auf oxidative Modifikationen werden häufig indirekte Nachweismethoden verwendet und ein Kompromiss gewählt, um möglichst viele redox-sensitive Proteine zu identifizieren. Die Untersuchung eines einzelnen Proteins hat den Vorteil, dass die Reaktionsbedingungen gezielter auf das jeweilige Protein abgestimmt werden können.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Das humane Protein CAPG (*macrophage capping protein*) ist ein wichtiges Aktin-Capping-Protein, welches mit verschiedenen klinisch pathologischen Merkmalen von Tumorzellen, wie der Invasion, Migration und Metastasierung, assoziiert ist. Zudem deuten erste Hinweise darauf hin, dass es sich bei CAPG um ein redox-sensitives Protein handeln könnte. Dies soll in dieser Arbeit eingehend untersucht werden.

Zunächst soll ein zelluläres Modellsystem etabliert werden, um mögliche redox-induzierte oxidative posttranslationale Cysteinmodifikationen im Kontext humaner Tumorzelllinien untersuchen zu können. Im Anschluss soll das Modellsystem in einem globalen Ansatz über die Behandlung mit Wasserstoffperoxid, einer matrixbasierten Aufarbeitung der Zelllysate und einer massenspektrometrie-basierten Analyse validiert werden.

Um die Frage zu klären, ob es sich bei CAPG um ein redox-sensitives Protein handelt, soll sowohl ein indirekter als auch ein direkter Nachweis der Cysteinmodifikationen stattfinden. Für den indirekten positionsgenauen Nachweis reversibler oxPTM, mittels Massenspektrometrie, soll zum einen eine affinitätsbasierte Anreicherung von CAPG und Kopplung mit einer differenziellen Markierung, sowie der PEG-*Switch Assay* etabliert und durchgeführt werden. Zudem sollen im nächsten Schritt die oxidativen Cysteinmodifikationen von CAPG mit Hilfe eines massenspektrometrie-basierten zielgerichteten Experiments (PRM) direkt nachgewiesen werden.

Als nächstes soll ermittelt werden, ob ein Zusammenhang zwischen den identifizierten Cysteinmodifikationen von CAPG und dem Migrationspotential der humanen LN18-Glioblastomzellen besteht. Dies soll durch einen gezielten Aminosäureaustausch der einzelnen Cysteine von CAPG untersucht werden. Zudem soll dieses Experiment Aufschluss über einen möglichen Einfluss der Cysteine auf die subzelluläre Lokalisation von CAPG geben.

Um mögliche neue funktionelle Zusammenhänge im Kontext der Tumorbilogie von CAPG unter verändertem Redoxzustand aufzudecken, soll eine Untersuchung des Interaktoms nach Wasserstoffperoxidbehandlung mittels affinitätsbasierter Anreicherung und massenspektrometrischer Analyse durchgeführt werden.

Da Zellkultursysteme eine artifizielle Umgebung darstellen, soll CAPG außerdem direkt in humanen Tumorproben analysiert werden, um Hinweise über die Proteinabundanz von CAPG und seine subzelluläre Lokalisation im Tumor *in situ* zu erhalten. Dies soll mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen von verschieden-gradigen Gliomen und Kontrollgewebe untersucht werden.

Die durchgeführten Arbeiten sollen einen Beitrag leisten die Rolle von CAPG als redox-sensitives Protein zu untersuchen, um ein besseres Verständnis dafür zu erhalten, ob der Redoxstatus einen Einfluss auf die Funktion des Proteins hat.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Bildgebungssystem, <i>ChemiDoc MP</i>	Bio-Rad
Brutschrank	Bode Hartmann
CO <sub>2</sub> -Inkubator, <i>HERAcell 150i</i>	Thermo Fisher Scientific
DNA Engine Tetrad® 2 Thermocycler	Bio-Rad
Feinwaage, <i>Entris</i>	Sartorius
Folienschweißgerät	Severin
Geldokumentationssystem	Intas Science Imaging
Gelkammer für 1D-Gele	Thermo Fisher Scientific
Heiz- & Magnetrührer, <i>RCT basic</i>	IKA
Heiz- & Magnetrührer, <i>MR-Hei</i>	Heidolph
Heizschüttler, <i>MKR 13</i>	Hettich
Konfokal Mikroskop, <i>LSM710</i>	Carl Zeiss Microscopy
Konfokal Mikroskop <i>TCS SP8 STED 3X</i>	Leica Microsystems
Probenschüttler, <i>HulaMixer</i>	Thermo Fisher Scientific
Laser Scanner, <i>Typhoon 9400</i>	GE Healthcare
Massenspektrometer, <i>Fusion Lumos Tribid</i>	Thermo Fisher Scientific
Massenspektrometer, <i>QExactive Plus</i>	Thermo Fisher Scientific
Mikroskop, <i>Axioplan</i>	Carl Zeiss Microscopy
Mikroskop, <i>Axiovert 25</i>	Carl Zeiss Microscopy
Milli-Q® Integral Wasseraufbereitungssystem	Merck Millipore
Minischüttler, <i>MSI</i>	IKA
Multifuge <i>XI</i>	Thermo Fisher Scientific
Multifuge <i>XIR</i>	Thermo Fisher Scientific
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific
pH-Meter	Mettler Toledo
Pipetten, <i>Research Plus</i>	Eppendorf
Pipetus	Hirschmann
Plattenlesegerät, <i>DTX 880</i>	Beckman Coulter
Plattformschüttler, <i>KS250 basic</i>	IKA
Plattformschüttler, <i>Unimax 1010</i>	Heidolph
Power Blotter <i>XL System</i>	Thermo Fisher Scientific
Präzisionswaage, <i>PCB</i>	Kern
Präzisionswaage, <i>822</i>	Kern
<i>Revco Ultima</i> CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Fisher Scientific
Scanner, <i>ViewPix 700</i>	Biostep

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Schüttler, <i>MaxQ 6000</i>	Thermo Fisher Scientific
Semi-Dry Blotter, <i>Multiphor II</i>	Amersham Pharmacia Biotech
Spannungsgerät, <i>Consort E815</i>	Sigma-Aldrich
Spannungsgerät, <i>EPS 301</i>	Amersham Pharmacia Biotech
Sterilbank, <i>clean air</i>	Clean Air Techniek B.V.
Tischzentrifuge, <i>Mikro 20</i>	Hettich
Tischzentrifuge, <i>Mikro 220R</i>	Hettich
<i>Tissue Lyser LT</i>	QIAGEN
Ultraschallbad, <i>Sonorex</i>	Bandelin
Vakuumkonzentrator, <i>5301</i>	Eppendorf
Zellzähler, <i>Countess II FL Automated Cell Counter</i>	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge, <i>Rotina 46 R</i>	Hettich
Zentrifuge, <i>5430 R</i>	Eppendorf

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Acrodisc MS syringe filter, 0,2 µm</i>	Pall
<i>Actin Polymerization / Depolymerisation Kit</i>	Biozol
<i>Amicon Ultra Zentrifugenfiltereinheiten, 0,5 ml 3K, 10K</i>	Merck
Analytische Säule, <i>Acclaim PepMap C18 reversed phase</i>	Thermo Fisher Scientific
Deckgläser 12mm	VWR
Dispenser-Spitzen	Eppendorf
nanoESI-Emitter	New Objective
<i>High Pure PCR Product Purification Kit</i>	Roche
<i>Imaging µ-Dish</i>	ibidi
Kapillarsäule, <i>Acclaim PepMap C18 reversed phase</i>	Thermo Fisher Scientific
Kryogefäße	VWR
Lipofectamin 3000 Transfektionskit	Thermo Fisher Scientific
<i>Low Bind</i> Reaktionsgefäße 0,5, 1,5, 2 µl	Eppendorf
Mikrotiterplatten, 96-Well, transparent, flacher Boden	Greiner
Mikrotiterplatten, 96-Well, weiß, flacher Boden	Greiner
<i>Mini Bio-Spin Säulen</i>	Biorad
Objektträger mit Mattrand 26x76mm	VWR
Pipettenspitzen 10, 200, 1.000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen mit Filtereinsatz 200, 1.000 µl	Eppendorf
Plasmid Plus Maxi Kit	QIAGEN
Plasmid Plus Mini Kit	QIAGEN
PVDF-Membran <i>Immobilon®-FL</i>	Merck Millipore
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5, 2 µl	Eppendorf
Röhrchen 15, 50 ml	Greiner

Verbrauchsmaterial	Hersteller
<i>SigmaPrep spin</i> Säulen	Sigma-Aldrich
Stripetten 2, 5, 10, 25 ml	Corning
Zellkulturflaschen, -schalen, -platten	Sarstedt
Zellschaber	Corning

### 3.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich
3 - [(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propansulfonathydrat (CHAPS)	Sigma-Aldrich
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich
Aceton	Sigma-Aldrich
Acetonitril	Merck Millipore
Acrylamidkugeln, <i>Bio-Gel P6</i>	Biorad
Agar	Sigma-Aldrich
Agarosematrix, <i>HIS-Select® Nickel Affinity Gel</i>	Sigma-Aldrich
Agarose, <i>NEEO Ultra-Qualität</i>	Roth
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (Bis-Tris)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau Natriumsalz	Roth
Calciumchlorid, dehydriert	Fluka
<i>Complete Ultra Ethylenediaminetetraacetic (EDTA) free Mini</i> Tablette	Roche
Coomassie Brilliant Blau G250	VWR
Desoxyribonukleinsäurefarbstoff, <i>Roti-Load DNASTain</i>	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Serva
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	Sigma-Aldrich
Eindeckelmedium, <i>Prolong Diamond Antifade Mountant</i>	Life Technologies
Ethyldiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Ethanol 99,5 %, vergällt	VWR
Ethanol, absolut	Merck Millipore
Fetales Kälberserum (FBS)	Pan Biotech
Gele, <i>Bolt Bis-Tris Plus 4-12% 10 Well</i>	Thermo Fisher Scientific
Gele, <i>Mini-Protean TGX Stain-Free Protein Gels 4-15%, 10 Well, 12 Well</i>	Biorad
Gele, <i>NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel</i>	Thermo Fisher Scientific

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Geneticin (G418)	Thermo Fisher Scientific
Glycerol	Sigma-Aldrich
Glycin	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Roth
HEPES (4-2 Hydroxyethylpiperazine-1-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich
Hygromycin B Lösung 50 mg/mL	Roth
Imidazol	Roth
India Ink	Pelikan Holding
Iodoacetamid (IAM)	Sigma-Aldrich
Iodoacetamid D4, 98 %	Eurisotop
Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Thermo Fisher Scientific
Kaliumhexacyanoferrat III K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	Roth
Kanamycin	Roth
L-Glutamin Lösung	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver ( <i>Skim milk powder</i> )	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich
Magnetische Agarosepartikel, <i>GFP-Trap®_MA</i>	Chromotek
Methansäure ( <i>formic acid</i> , FA)	Merck Millipore
Nährmedium, <i>LB Broth</i>	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Sigma-Aldrich
Natriumcarbonat	Merck Millipore
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich
Natriumthiosulfat Pentahydrat	Fluka
N-Ethylmaleinimid	Fluka
N-Ethylmaleimid D5	Cambridge Isotope Laboratories
N-Lauroylsarcosin Natriumsalz	Sigma-Aldrich
Nonidet P 40 (NP40), <i>Substitute</i>	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd extra rein	Sigma-Aldrich
Penicillin Streptomycin	Sigma-Aldrich
Pepton aus Casein	Roth
Phosphosäure (85 %)	Sigma-Aldrich
Proteinfraktionierungskit, <i>NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents</i>	Thermo Fisher Scientific
Proteinkonzentrationsbestimmungskit, <i>Pierce 660 nm Protein Assay</i>	Thermo Fisher Scientific
Proteinstandard, <i>Micro 1 mg BSA/ml</i>	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Silbernitrat	Merck Millipore

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Thiopropyl Sepharose 6B	GE Healthcare
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich
Tricin	Sigma-Aldrich
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck Millipore
Triton X 100	Sigma-Aldrich
Trizma base	Sigma-Aldrich
Trypanblaulösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich
Trypsin	Serva
Trypsin-EDTA-Lösung (0,25 %)	Sigma-Aldrich
Trypsin/Lys-C Mix	Promega
Tween 20	Sigma-Aldrich
Urea	Sigma-Aldrich
Wasserbad-Schutzmittel, <i>Aqua Resist</i>	VWR
Zellkulturmedium <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Sigma-Aldrich
Zellkulturmedium <i>DMEM high glucose, HEPES, no phenol red</i>	Sigma-Aldrich

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer bei denen kein Lösungsmittel angegeben ist, wurde Wasser verwendet.

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Anodenpuffer	300 mM Tris Base 100 mM Tricin pH 8,7-8,8
Blockierlösung	2 Gew.-% BSA 3 Gew.-% Magermilchpulver in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween 20 (TBS-T)
Coomassie Färbelösung	40 Vol.-% Ethanol 10 Vol.-% Essigsäure 250 mg/L Coomassie
Coomassie Entfärbelösung	10 Vol.-% Essigsäure
DTT	1,4 M in 100 mM Ammoniumbicarbonat
DTT für In-Gel-Verdau	10 mM DTT 50 mM Ammoniumbicarbonat
Elutionspuffer für die Aufreinigung (Bakterien)	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 300 mM Natriumchlorid 250 mM Imidazol 0,5 mM DTT pH 8,0

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Elutionspuffer für die Aufreinigung (Zelllinien)	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 300 mM Natriumchlorid 250 mM Imidazol 0,05 Vol.-% Tween 20 pH 8,0
Entfärbelösung 1	30 mM Natriumthiosulfat
Entfärbelösung 2	100 mM Kaliumhexacyanoferrat
Extraktionslösung (Gelbande)	50 Vol.-% Trifluoressigsäure (aus 0,1 %-iger Lösung) 50 Vol.-% Acetonitril
IAM für In-Gel-Verdau	55 mM Iodoacetamid in 50 mM Ammoniumbicarbonat
Kathodenpuffer	300 mM Aminocaprinsäure 30 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) pH 8,6-8,7
LB-Medium	10 g/L Pepton 10 g/L Natriumchlorid 5 g/L Hefeextrakt pH 7,4
LC-MS Lösemittel A	Für die Ladepumpe: 0,1 Vol.-% Trifluoressigsäure Für die Hauptpumpe: 0,1 Vol.-% Methansäure (FA)
LC-MS Lösemittel B	Für die Ladepumpe: 0,1 Vol.-% Trifluoressigsäure 84 Vol.-% Acetonitril Für die Hauptpumpe: 0,1 Vol.-% Methansäure (FA) 84 Vol.-% Acetonitril
Lysepuffer	30 mM Tris Base 2 M Thioharnstoff 7 M Harnstoff 4 Gew.-% CHAPS pH 8,5
Lysepuffer (für Bakterien)	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 300 mM Natriumchlorid 10 mM Imidazol 0,5 mM DTT pH 8,0
Lysepuffer (für Zelllinien)	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 300 mM Natriumchlorid 10 mM Imidazol 0,05 % Tween 20 pH 8,0

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
MES Puffer, 20-fach konzentriert	1 M MES 1 M Tris Base 2 Gew.-% SDS 20 mM EDTA pH 7,3
MOPS Puffer, 20-fach konzentriert	1 M MOPS 1 M Tris Base 2 Gew.-% SDS 20 mM EDTA pH 7,7
RIPA Puffer	50 mM Tris HCl 150 mM Natriumchlorid 0,5 mM EDTA 1 Vol.-% NP 40 Auf 10 mL Puffer 1 Tablette <i>Complete Ultra Tablet mini</i> ohne EDTA
SDS-Probenpuffer, 2-fach konzentriert	600 mM DTT (wurde bei Bedarf verwendet) 30 Vol.-% Glycerin 12 Gew.-% SDS 150 mM Tris HCl pH 7,0 Spatelspitze Bromphenolblau
Silberfärbung Lösung A	50 Vol.-% Ethanol 10 Vol.-% Essigsäure
Silberfärbung Lösung B	30 Vol.-% Ethanol 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 Vol.-% Formaldehyd
Silberfärbung Lösung F	50 mM EDTA pH 8,0
SOB-Medium	20 g/L Pepton 5 g/L Hefeextrakt 0,5 g/L Natriumchlorid 2,5 mM Kaliumchlorid 10 mM Magnesiumsulfat 10 mM Magnesiumchlorid pH 7,0

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE), 50-fach konzentriert	2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA
TB-Puffer	0,75 g/L Pipes 15 mM Calciumchlorid 250 mM Kaliumchlorid 10,88 g/L Mangan(II)-chlorid pH 6,7
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS), 10-fach konzentriert	100 mM Tris Base 1,5 M Natriumchlorid pH 8
TBS-T	50 mM Tris 150 mM Natriumchlorid 0,1 % Tween 20
TPS-Anreicherungspuffer	50 mM HEPES 1 mM EDTA pH 7,5
TPS-Lysepuffer	8 M Urea 1 Gew.-% SDS 250 mM HEPES 100 mM NEM pH 7,5
TPS-Resuspensionspuffer	8 M Urea 0,1 Gew.-% SDS 250 mM HEPES pH 7,7
Trypsin Lösung Waschlösung A Waschlösung B	0,033 µg/µL Trypsin in 50 mM Ammoniumbicarbonat 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat 50 Vol.-% 5 mM Ammoniumhydrogencarbonat 50 Vol.-% Acetonitril
Waschpuffer (für Bakterien)	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 300 mM Natriumchlorid 20 mM Imidazol 0,5 mM DTT pH 8,0
Waschpuffer (für Zelllinien)	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 300 mM Natriumchlorid 20 mM Imidazol 0,05 % Tween 20 pH 8,0

### 3.1.5 Größenstandards

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

### 3.1.6 Antikörper

#### Primärantikörper

Spezifität	Hersteller (Bestellnr.)	Spezies	Verdünnung (Verwendung)
anti-CAPG [AK 1]	Sino Biological (SIN-14213-T52-200)	Kaninchen (polyklonal)	1:500 (WB) 1:200 (IF)
anti-CAPG (6D6) [AK 2]	Sigma (SAB1403632-100UG)	Maus (monoklonal)	1:500 (WB) 1:200 (IF)
anti-Tubulin $\beta$ III	Chemicon (MAB1637)	Maus (monoklonal)	1:500 (WB)
anti-GFP	Chromotek (3h9-100)	Ratte (monoklonal)	1:500 (WB)
anti-6x His-Tag	Thermo Fisher Scientific (PA1-983B)	Kaninchen (polyklonal)	1:500 (WB) 1:200 (IF)

#### Sekundärantikörper

Spezifität	Hersteller (Bestellnr.)	Spezies	Verdünnung (Verwendung)
anti-rabbit IgG Abberior STAR 635P	Abberior (2-0012-007-2)	Ziege (polyklonal)	1:500 (IF)
anti-mouse IgG Alexa Fluor 488	Invitrogen (A11029)	Ziege (polyklonal)	1:5000 (WB) 1:500 (IF)
anti-mouse IgG Alexa Fluor 555	Invitrogen (A21424)	Ziege (polyklonal)	1:5000 (WB) 1:500 (IF)
anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488	Invitrogen (A21206)	Esel (polyklonal)	1:5000 (WB) 1:500 (IF)
anti-rabbit IgG Alexa Fluor 555	Invitrogen (A21429)	Ziege (polyklonal)	1:5000 (WB) 1:200 (IF)
anti-rabbit IgG Alexa Fluor 647	Dianova (711-605-152)	Ziege (polyklonal)	1:5000 (WB)
anti-rat IgG Alexa Fluor 488	Invitrogen (A21208)	Esel (polyklonal)	1:5000 (WB)

### 3.1.7 Plasmide

Plasmid	Hersteller	Verwendung
pcMV3-CAPG-His	Sino Biological	Transfektion
pcMV3-CAPG-c-GFSpark	Sino Biological	Transfektion
pcMV3-c-GFSpark	Sino Biological	Transfektion
pQE30	QIAGEN	Bakterielle Expression

### 3.1.8 Primer

Die verwendeten *forward* (fw) und *reverse* (rv) Primer wurden von der Firma biomers.net produziert und geliefert.

Primer	Sequenz	Verwendung
CAPG C77S fw	5'-atgagcagggggcctctgccgtgc-3'	
CAPG C77S rv	5'-gcacggcagaggccccctgctcat-3'	
CAPG C165S fw	5'-caaacctggggactcctcatcctggacc-3'	
CAPG C165S rv	5'-ggtccaggatgaaggagtccccagtgtg-3'	
CAPG C178S fw	5'-gaacatcttcgctggctggtggaaagtcca-3'	Mutagenese
CAPG C178S rv	5'-tggactttccaccagaccaggcgaagatgttc-3'	
CAPG C282S fw	5'-gctgatctgatgactcctttgtgctggacaacg-3'	
CAPG C282S rv	5'-cgttgccagcacaaggagtcacagatatcagc-3'	
CAPG C290S fw	5'-tgctggacaacgggctctctggcaagatc-3'	
CAPG C290S rv	5'-gatcttgccagagagcccgtgtccagca-3'	

### 3.1.9 Software

Software	Hersteller
Chromleon	Thermo Fisher Scientific
ImageLab	Bio-Rad
LAS X	Leica Microsystems
MaxQuant	Max Planck Institut für Biochemie
OriginPro 9.0	OriginLab
Perseus	Max Planck Institut für Biochemie
Proteome Discoverer	Thermo Fisher Scientific
PyMOL 1.74	Schrödinger
R	RCORE Team
RStudio	RStudio
Skyline	MacCoss Lab Software
Tune	Thermo Fisher Scientific
X-Calibur	Thermo Fisher Scientific
ZEN 2011	Carl Zeiss Mikroskopie

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden

Das Wasser und alle verwendeten Medien wurden vor dem Gebrauch im Autoklaven sterilisiert. Alle mikrobiologischen und molekularbiologischen Arbeiten erfolgten an der Bunsenbrennerflamme unter sterilen Bedingungen. Zudem wurden ausschließlich sterile Einwegmaterialien verwendet oder das verwendete Material vorab im Autoklav sterilisiert. Die verwendeten Plasmide wurden über die Firmen Sino Biological und QIAGEN bezogen (3.1.7) und die verwendeten Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Puffer über Thermo Fisher Scientific. Die für die Selektion benutzten Antibiotika, Ampicillin (Amp) und Kanamycin (Kan), wurden zunächst als 1000-fache Stocklösungen in Wasser angesetzt und steril filtriert (Ampicillin: 100 mg/mL, Kanamycin: 50 mg/mL).

#### 3.2.1.1 Bakterienstämme

Es wurden zwei unterschiedliche *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterienstämme der Firma Agilent, ehemals Stratagene, verwendet.

##### **XL1 blue:**

Dieser Stamm wird zur DNA-Amplifikation eingesetzt und besitzt eine Tetracyclinresistenz. Durch eine Mutation im EcoK-Endonukleasesystem wird die klonierte DNA vor dem Abbau geschützt.

Genotyp:

*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]*

##### **BL21:**

Dieser Stamm wurde für die bakterielle Expression des Proteins CAPG verwendet.

Genotyp:

*fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS*

#### 3.2.1.2 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Es wurden 3 mL einer Vorkultur des Stammes *E. coli* XL1 blue oder BL21 aus jeweils einer Einzelkolonie angelegt (3.2.1.5). Am nächsten Tag wurden 100 mL SOB-Medium mit 800 µL der Vorkultur beimpft und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von ~0,2 bei 37 °C und 180 Umdrehungen pro Minute (upm) im Warmluftschüttler inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten OD<sub>600</sub>, wurde die Bakteriensuspension in Falkons überführt und für 10 min bei 4 °C und 1280 xg zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Sediment in 40 mL kaltem TB-Puffer resuspendiert und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Nach wiederholter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das Sediment in 10 mL kaltem TB-Puffer

aufgenommen. Um die Bakterienzellen beim Einfrierprozess nicht zu beschädigen, wurde die Bakteriensuspension mit 750  $\mu\text{L}$  Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension zügig in 100  $\mu\text{L}$  Ansätze in sterile, vorgekühlte 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.1.3 Retransformation von *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschock

Die Plasmide (3.1.7) wurden zunächst in sterilem Wasser nach Herstellerangaben resuspendiert und anschließend in chemokompetente XL1 *blue* Zellen transformiert, um genügend Ausgangsmaterial der Plasmide für nachfolgende Versuche herzustellen. Dafür wurden 0,5  $\mu\text{L}$  der Plasmid-DNA in ein steriles 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und mit 30  $\mu\text{L}$  der langsam auf Eis aufgetauten XL1 *blue* Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen erfolgte über einen Hitzeschock für 1,5 min bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Hanahan, 1983). Nachdem die Zellen im Anschluss 5 min auf Eis inkubiert worden sind, wurden sie auf eine LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert.

### 3.2.1.4 Transformation von *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschock

Die Transformation von Plasmid-DNA, sowie ligierter Plasmid-DNA nach Klonierungen, wurde nach der Hitzeschock-Methode durchgeführt (Hanahan, 1983). Pro Ansatz wurde ein 100  $\mu\text{L}$  Aliquot chemisch kompetenter Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden die Zellen mit ca. 1  $\mu\text{g}$  der zu transformierenden DNA versetzt und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Dem nachfolgenden Hitzeschock von 1,5 min bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  folgte eine 1-2-minütige Inkubation auf Eis. Für die anschließende phänische Expression wurde der Ansatz mit 700  $\mu\text{L}$  LB-Medium versetzt und für 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 300 upm inkubiert. Dann wurden die Zellen für 2 min bei 5000 xg zentrifugiert und das Pellet in 100  $\mu\text{L}$  LB-Medium aufgenommen. Im Anschluss wurde der komplette Ansatz auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### 3.2.1.5 Vorkultur

3 mL LB-Medium wurden in einem Kulturröhrchen mit dem entsprechenden Antibiotikum (1:1000) versetzt und mit einer transformierten Bakterienkolonie unter sterilen Bedingungen angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 180 upm im Wärmeschüttler über Nacht.

### 3.2.1.6 Hauptkultur

100 mL LB-Medium wurden in einem 250 mL Schüttelkolben mit dem entsprechenden Antibiotikum (1:1000) versetzt und mit einer transformierten Bakterienkolonie oder 5 mL der

Vorkultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 200 upm über Nacht im Wärmeschüttler.

### 3.2.1.7 Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen

Die Zelldichte der Bakterienkulturen wurde durch das Messen der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm im Plattenlesegerät bestimmt.

### 3.2.1.8 Plasmid-DNA-Präparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des kommerziell erhältlichen *QIAprep Spin Miniprep Kits* aus Vorkulturen oder mittels *QIAprep Spin Maxiprep Kits* aus Hauptkulturen. Die DNA wurde in 50 µL (Vorkultur) bzw. 400 µL (Hauptkultur) autoklaviertem Wasser eluiert. Diese Aufreinigung basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und der Bindung der Plasmid-DNA an eine Silica-Matrix. Die mit diesem Verfahren isolierte DNA weist eine sehr hohe Reinheit auf.

### 3.2.1.9 DNA-Konzentrationsbestimmung

Nukleinsäuren weisen aufgrund der Purin- und Pyrimidinbasen ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 260 nm auf. Deshalb konnte die DNA-Konzentration durch photometrische Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt werden. Dabei gilt, dass eine  $OD_{260}$  von 1 50 µg/mL DNA entspricht (Sambrook *et al.*, 1989). Zusätzlich kann die Reinheit durch den Quotienten  $\frac{E_{260}}{E_{280}}$  angegeben werden. Liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 entspricht das reiner, doppelsträngiger DNA. Befindet sich der Quotient nicht im angegebenen Bereich deutet dies z. B. auf Proteinverunreinigungen hin. Die Bestimmung der DNA-Reinheit und der -konzentration erfolgte an einem NanoDrop ND-1000 UV/VIS-Spektralphotometer im *Genomics & Transcriptomics* Labor (GTL) des Biologisch Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ). Der jeweilige Elutionspuffer diente als Referenz. Zur Messung der jeweiligen Probe wurden 1,5 µL Eluat aufgetragen und die Konzentration in Doppelbestimmung ermittelt.

### 3.2.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Verfahren der Polymerasekettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*; PCR) ermöglicht die gezielte Amplifikation vordefinierter Nukleinsäurefragmente mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase. Definiert werden die zu vervielfältigenden Bereiche durch die Wahl der Primer, die aufgrund ihrer Sequenz spezifisch an den zu replizierenden Nukleinsäureeinzelstrang binden können. Durch den Denaturierungsschritt bei 98 °C wird die Auftrennung des DNA-Doppelstranges in Einzelstränge ermöglicht. Während des sich hieran anschließenden Anlagerungsschrittes (engl.: *annealing*) bei Temperaturen zwischen 50 °C

und 65 °C können die Primer über entsprechende komplementäre Sequenzen mit den DNA-Einzelsträngen hybridisieren. Die genaue Temperatur, bei der dieser Schritt abläuft, richtet sich nach der jeweiligen Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des Primers. Diese ist von der Länge, der Sequenz und dem GC-Gehalt der Oligonukleotide abhängig. Im dritten Schritt erfolgt bei 72 °C die Synthese der neuen komplementären Stränge. Durch das Wiederholen dieser drei Schritte Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung lassen sich gewünschte DNA-Bereiche innerhalb kurzer Zeit beliebig amplifizieren. In Tabelle 2 wurde der PCR-Ansatz zusammengefasst.

**Tabelle 2: PCR-Ansatz.**

<b>Komponente</b>	<b>Menge [<math>\mu</math>L]</b>
<i>5x Phusion HF</i> Puffer	10
10 mM dNTPs	1
<i>Forward</i> Primer (10 pmol/ $\mu$ L)	1,25
<i>Reversed</i> Primer (10 pmol/ $\mu$ L)	1,25
<i>Template</i> DNA (5-50 ng)	5
<i>Phusion</i> DNA-Polymerase (2 U/ $\mu$ L)	0,5
Wasser	26

Die Amplifikation des Reaktionsansatzes wurde in einem *Thermocycler* mit beheizbarem Deckel durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen für die PCR sind in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: PCR-Programm.**

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklen</b>
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec	1
2. Denaturierung	98 °C	15 sec	
3. Anlagerung	55 °C	1 min	25
4. Elongation	72 °C	1 min	
5. Finale Elongation	72 °C	8 min	1
6. Lagerung	4 °C	$\infty$	

Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und analysiert (3.2.1.14).

### 3.2.1.11 Mutagenese

Bei der gerichteten DNA-Mutagenese werden gezielt Veränderungen in eine DNA-Sequenz eingebracht, um die Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Proteinstruktur und -funktion zu untersuchen. Dafür wurde in den Versuchen die humane *CAPG*-DNA-Sequenz als Vorlage verwendet und gezielt im Basentriplett der fünf in *CAPG* enthaltenen Cysteine die Nukleotidbase Guanin zu Cytosin mutiert, wodurch in jeder Mutante anstatt des jeweiligen Cysteins (Position: C77, C165, C178, C282, C290) ein Serin entstand. Die für die Mutagenese verwendeten synthetischen Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma *biomers.net* hergestellt und geliefert.

Für die durchgeführte gerichtete DNA-Mutagenese wurde das Verfahren *Single-Primer Reactions IN Parallel* (SPRINP) (Edelheit *et al.*, 2009) verwendet. Hierbei werden die Primer (*forward* und *reverse*) (3.1.8) zunächst in zwei parallel ablaufenden Einzelreaktionen genutzt. Die PCR-Reaktionskomponenten und das verwendete PCR-Programm sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 4: Komponenten der gerichteten PCR-Mutagenesereaktion.**

<b>Komponente</b>	<b>PCR 1</b>	<b>PCR 2</b>
<i>Template</i> Plasmid DNA	500 ng	500 ng
<i>Forward</i> Primer	50 pmol	-
<i>Reverse</i> Primer	-	50 pmol
DMSO (100 %)	1 µL	1 µL
dNTPs (2 mM)	0,2 mM	0,2 mM
<i>Phusion HF</i> DNA Polymerase (2 U/µL)	1 U	1 U
5x <i>Phusion HF</i> Puffer	5 µL	5 µL
Wasser	ad 25 µL	ad 25 µL

**Tabelle 5: PCR-Programm für die Mutagenese.**

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Dauer</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>
1. Initiale Denaturierung	98	2 min	1
2. Denaturierung	98	30 s	
3. Primer Anlagerung	primerspezifisch (55-65)	60 s	30
4. Elongation	72	4,5 min	
5. Finale Extension	72	8 min	1
6. Abkühlen	4	∞	1

Im Anschluss an die Single-Primer-PCR wurden die jeweils zusammengehörigen PCR-Ansätze vereint und über das *Combining*-Programm (Tabelle 6) von 95 °C auf 37 °C langsam abgekühlt, sodass sich die komplementären Doppelstränge vereinen konnten.

**Tabelle 6: 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 Restriktionsendonuklease DpnI, die spezifisch methylierte, nicht-mutierte, parentale Plasmid-DNA (Ausgangsplasmid) zerschneidet (Lacks und Greenberg, 1975), nach Herstellerangaben. Im letzten Schritt wurde das mutierte Plasmid in XL1 *blue* Zellen transformiert, auf Selektionsplatten ausgestrichen (3.2.1.4) und am nächsten Tag eine Einzelkolonie für eine Vorkultur gepickt (3.2.1.5). Die aus den Bakterien der Vorkultur isolierte DNA wurde über eine Sequenzierung (3.2.1.16) analysiert und die erfolgreiche Mutagenese bestätigt.

### 3.2.1.12 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen dient sowohl als präparatives Hilfsmittel für Klonierungszwecke, als auch für analytische Zwecke wie zur Überprüfung von Plasmiden nach Klonierungen. Jedes Restriktionsenzym hat eine spezifische Erkennungssequenz, die unter optimalen Pufferbedingungen und optimaler Inkubationstemperatur, geschnitten wird. Die Inkubationsdauer richtet sich nach der Temperatur und den eingesetzten Mengen an DNA und Enzym. Analytische Spaltungen konnten durch die verschiedenen Puffersysteme zeitsparend, mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen in einem Reaktionsansatz durchgeführt werden, sofern beide Enzyme ausreichende Kompatibilität für einen Puffer zeigten. Der Verdau erfolgte für 2 h bei 37 °C.

**Tabelle 7: Komponenten des ersten Restriktionsverdau.**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [<math>\mu\text{L}</math>]</b>
pcMV3-CAPG-His (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	3,26
Puffer BamHI	2
KpnI (10 U/ $\mu\text{L}$ )	2
XbaI (10 U/ $\mu\text{L}$ )	2
Wasser	ad 20

**Tabelle 8: Komponenten des zweiten Restriktionsverdau.**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [<math>\mu\text{L}</math>]</b>
pQE30 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	3,26
Puffer BamHI	2
KpnI (10 U/ $\mu\text{L}$ )	2
XbaI (10 U/ $\mu\text{L}$ )	2
Wasser	ad 20

Im Anschluss wurden die Proben für 20 min bei 80 °C inkubiert, um den Restriktionsverdau zu stoppen. Die geschnittenen Produkte wurden mit Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs; finale Konzentration:0,1 mM) mittels T4-Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ) für 5 min bei RT aufgefüllt. Das Ergebnis der jeweiligen Restriktionspaltung wurde über ein Agarosegel analysiert (3.2.1.14). Anschließend wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA-Produkte aus dem Gelstück extrahiert (3.2.1.15).

### **3.2.1.13 Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4-DNA-Ligase**

Die T4-DNA-Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxylgruppe von überstehenden und glatten DNA-Enden. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die Vektor-DNA (pQE30) wurde mit der doppelten Menge an *Insert*-DNA (CAPG) ligiert. In Tabelle 9 sind die einzelnen Komponenten zusammengefasst.

**Tabelle 9: Ligationsansatz.**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [<math>\mu\text{L}</math>]</b>
<i>Insert</i> -DNA (CAPG)	7
Vektor-DNA (pQE30)	3,5
Puffer T4 Ligase	1,5
T4 DNA-Ligase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	1,5
Wasser	ad 15

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach der Ligation wurde die Ligase für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert und der Ansatz konnte direkt zur Transformation kompetenter *E. coli* XL1 *blue* Zellen verwendet werden (3.2.1.4).

### 3.2.1.14 Agarosegelelektrophorese

Um DNA-Fragmente aufzutrennen, ihre Größe zu bestimmen und gewünschte Fragmente zu isolieren, wurde eine Gelelektrophorese nach Sambrook *et al.* 1989 durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte in 0,8 %-igen oder 2 %-igen (w/v) Agarosegelen in Gelelektrophoresekammern mit TAE-Puffer als Laufpuffer. Wobei die Agarosekonzentration von der Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente abhing. Für die Auftrennung von kleineren DNA-Fragmenten (<500 bp) wurden 0,8 %-ige Agarosegele verwendet und für die Aufreinigung größerer Fragmente (>500 bp) 2 %-ige Agarosegele. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in TAE-Puffer gelöst, in der Mikrowelle erhitzt und in eine Gelkammer mit passendem Kamm gegossen. Nach Erkalten des Gels wurden die DNA-Proben mit 6-fach Ladepuffer *Roti® Load DNastain* (Roth) für eine finale einfache Konzentration versetzt und in die gewünschten Geltaschen pipettiert. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen diente die *1 kb DNA Ladder* als Marker, der mit *1x Roti® Load DNastain* versetzt wurde. Danach erfolgte die elektrophoretische Auftrennung für 20 bis 60 min bei 100 V. Im Anschluss wurden die Gele mit einem Geldokumentationssystem (Intas) aufgenommen. Hierbei wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht. Denn der im *Roti® Load DNastain* enthaltene Fluoreszenzfarbstoff interkaliert mit doppelsträngiger DNA und wird durch UV-Licht ( $\lambda = 254\text{-}366\text{ nm}$ ) angeregt und emittiert dieses bei einer Wellenlänge von 525 nm.

### 3.2.1.15 Gelextraktion linearer DNA-Fragmente

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel (3.2.1.14) wurde auch zur Isolierung von DNA mit spezifischer Länge verwendet. Dafür wurde die Bande der entsprechenden Größe mit dem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Nach der Überführung in ein Reaktionsgefäß und anschließender Gewichtsbestimmung, wurde die DNA aus dem herausgelösten Gelstück mit Hilfe des *High Pure PCR Product Purification Kits* von Roche nach Herstellerangaben isoliert.

### 3.2.1.16 DNA-Sequenzierung

Der Erfolg einer PCR wurde durch eine Sequenzierung überprüft, für die das aufgereinigte PCR-Produkt zuvor auf eine Konzentration im Bereich von 150 ng/μL bis 600 ng/μL verdünnt werden musste.

Die Sequenzierung wurde freundlicherweise von den Mitarbeitern des *Genomics and Transcriptomics Laboratory* (GTL) des Biologisch Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt.

### 3.2.1.17 Bakterielle Expression und Aufreinigung des Zielproteins CAPG

Für die bakterielle Expression des Zielproteins CAPG wurde zunächst das pQE30-CAPG-His-Konstrukt in den *E. coli* Stamm BL21 transformiert (3.2.1.4). Über Nacht erfolgte die Selektion eines Bakterienklons, der das Plasmid aufgenommen hat, auf selektiven LB-Agarplatten. Am nächsten Tag wurde wie in 3.2.1.5 beschrieben eine Vorkultur durch Picken einer Einzelkolonie angelegt. Am darauffolgenden Tag wurden 500 mL LB-Medium in einem 1 L Schüttelkolben vorgelegt mit dem entsprechenden Antibiotikum (1:1000) versetzt und auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 aus der Vorkultur angeimpft. Die Bakterienkultur wurde bei 37 °C und 200 upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,2 inkubiert. Für die Bestimmung der OD wurden jeweils 200 µL der Bakteriensuspension verwendet und die Messung erfolgte am Multimode Detektor (Beckman Coulter) bei 600 nm. Anschließend wurde die Expression von CAPG durch die Zugabe von 0,15 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Direkt nach der Induktion (Nullprobe) und nach einer weiteren Stunde wurde eine Probe entnommen. 2 h nach der Induktion wurde eine weitere Probe entnommen und die Bakterienkultur vollständig abgeerntet. Dafür wurde die Zellsuspension in sterile 400 mL Zentrifugenbecher überführt und für 20 min bei 7.197 xg und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 3 mL Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mittels Ultraschallbehandlung auf Eis aufgeschlossen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 30 min bei 10.000 xg und 4 °C. Mit dem Überstand wurde weitergearbeitet und das Sediment verworfen. Im Anschluss erfolgte 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). Die Sequenz für das Zielprotein wurde so kloniert, dass CAPG einen c-terminalen Polyhistidin-Tag trug. Über diesen war das Protein in der Lage an das für die IMAC verwendete Säulenmaterial *HIS-Select® Nickel Affinity Gel* zu binden. Dafür wurden zunächst 100 µL der Säulenmatrix in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und mit Lysepuffer eingewaschen. Der nach dem Aufschluss erhaltene Überstand wurde auf die gewaschene Matrix pipettiert und das Gemisch für 1 h bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurde die Suspension auf ein Säulchen überführt und

für 1 min bei 1000 xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und es folgten vier Waschschriffe à 400 µL Waschpuffer. Im Anschluss wurde das Protein von der Säule eluiert. Die Elution erfolgte mit zweimal 100 µL Elutionspuffer und anschließend mit zweimal 50 µL Elutionspuffer, wobei die Probe zwischen jedem Schritt für 1 min bei 1000 xg zentrifugiert wurde. Eluat 1 und 2 sowie 3 und 4 wurden im Anschluss jeweils vereint. Zur Überprüfung der Produktreinheit wurden die Proben über eine SDS-PAGE (3.2.4.7) aufgetrennt, das Gel anschließend mit Silbernitrat gefärbt (3.2.4.9) und eine Probe des jeweiligen Eluates mittels LC-MS/MS analysiert (3.2.5), sowie immunologisch mittels *Semidry Blotting* mit einem Antikörper gegen CAPG oder den His-Tag nachgewiesen.

### 3.2.2 Zellbiologische Methoden

Sämtliche zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank nach entsprechenden Sicherheitsrichtlinien im Zellkulturlabor der Sicherheitsstufe 1 (S1) durchgeführt. Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien waren steril verpackte Einwegartikel oder wurden vor der Verwendung in einem Autoklaven sterilisiert und alle Zelllinien regelmäßig auf den Befall von Mykoplasmen getestet.

#### 3.2.2.1 Zelllinien

Für die Analyse des Proteins CAPG wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Glioblastomzelllinien verwendet. Die Zellkultivierung erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in verschiedenen Gewebekulturflaschen, Petrischalen oder Multiwell-Platten.

##### **A172:**

Es wurde die Glioblastomzelllinie A172 (*American Type Culture Collection*, Manassas, USA) verwendet, die ursprünglich aus dem Glioblastom eines 53-jährigen männlichen Patienten stammt (Giard *et al.*, 1973). Diese Zellen wuchsen adhärent und wurden in *high glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert und das Medium alle 2-3 Tage gewechselt.

##### **LN18:**

Zudem wurde die Glioblastomzelllinie LN18 (*American Type Culture Collection*, Manassas, USA) verwendet, die ursprünglich 1976 aus dem rechten Temporallappen-Glioblastom eines 65-jährigen männlichen Patienten etabliert wurde (Diserens *et al.*, 1981). Diese Zellen wuchsen adhärent und wurden in *high glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % L-Glutamin kultiviert und das Medium alle 2-3 Tage gewechselt.

### 3.2.2.2 Wasserstoffperoxidbehandlung von Zellen

Für die Wasserstoffperoxidbehandlung der Zellen wurde die verdünnte Stocklösung immer frisch aus der 30%-igen sterilen Wasserstoffperoxidlösung für die Zellkultur angesetzt. Für die tatsächliche Behandlung wurden die Zellen final mit 100  $\mu\text{M}$  oder 250  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid für 10 min bei Raumtemperatur (RT) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen oder Zellen die für 10 min mit 20 mM DTT bei 37 °C behandelt worden sind.

### 3.2.2.3 Bestimmung der Viabilität und der Zellzahl mit Trypanblau

Trypanblau ist ein acider Farbstoff, der durch defekte Zellmembranen ins Zytosol toter Zellen eindringen kann, wo dessen Anion an Zellproteine bindet und die Zellen tiefblau färbt. Im Vergleich erscheinen lebende Zellen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Bei zu langer Einwirkzeit ist ein Anstieg von toten Zellen zu beobachten, da dieser Farbstoff zytotoxisch wirkt. Mit diesem Test kann die Zellviabilität überprüft und gleichzeitig die Gesamtzellzahl ermittelt werden. Hierzu wurden gleiche Volumina (10  $\mu\text{L}$ ) der Zellsuspension und der 0,25 %-igen Trypanblaulösung gemischt und die Zellviabilität und die Zellzahl mit dem Zellzähl-Gerät *Countess II FL* bestimmt.

### 3.2.2.4 Passagieren von Zellen

Adhärente Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 90 % alle zwei bis drei Tage passagiert. Dafür wurde zunächst das Wachstumsmedium entfernt und die Zellen anschließend mit einer 0,25 %-igen Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt bis sich die Zellen vom Kulturgefäßboden abgelöst haben. Danach wurde das doppelte Volumen an vorgewärmtem Vollmedium, das die Wirksamkeit des Trypsins herabsetzte, zugegeben. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 800 xg zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in dem entsprechenden Volumen an frischem Kulturmedium resuspendiert (Tabelle 10). Ein Teil der Zellsuspension wurde anschließend in eine neue Zellkulturflasche ausgesät. Das Umsetzungsverhältnis variierte je nach Zelldichte zwischen 1:2 und 1:3. Tabelle 10 fasst die verwendeten Mengen an Trypsin und Wachstumsmedium zusammen.

**Tabelle 10: Verwendete Mengen an Wachstumsmedium und Trypsin in Abhängigkeit des verwendeten Kulturgefäßes.**

<b>Kulturgefäß</b>	<b>Trypsin [mL]</b>	<b>Wachstumsmedium [mL]</b>
<b>Schalen</b>		
10 cm	3	10
15 cm	6	20
<b>Flaschen</b>		
T-75	3	10
T-175	6	20
<b>Platten</b>		
24-Well	0,5	1
6-Well	2	5

### **3.2.2.5 Zelltransfektion mittels Lipofectamine®3000**

Für die stabile Transfektion der Zelllinien wurde das Lipofectamin 3000 Reagenz verwendet. Die Zellen wurden 24 h vorher ausgesät, sodass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70 bis 80 % aufwiesen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben und die transfizierten Zellen wurden in dem oben beschriebenen Medium (3.2.2.1) kultiviert. Der Expressionsvektor beinhaltet eine Hygromycin B-Resistenz wodurch transfizierte Zellen durch die Zugabe von 250 µg/mL Hygromycin B (Roth) selektiert wurden.

### **3.2.2.6 Kryokonservierung**

Die gut etablierte Lagerung von Zellen ist z. B. in flüssigem Stickstoff bei -196 °C möglich. Um zu gewährleisten, dass möglichst wenig Zellen in Folge der Eiskristallbildung im Zellinneren beim Einfrierprozess Schaden nehmen, können diese mit DMSO versetzt werden. Die Zellen wurden wie in 3.2.2.4 beschrieben vom Kulturgefäß abgelöst und bei 800 xg für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 1 mL Kulturmedium mit 10 % DMSO resuspendiert und in ein 2 mL Kryogefäß überführt. Die Kryogefäße wurden in einer verschlossenen Styroporbox bei -80 °C über Nacht eingefroren und am nächsten Tag in katalogisierter Position in einen Stickstofftank überführt. Auf diese Weise wurden die Zellen schonend eingefroren.

Zur Weiterkultivierung wurden die Zellen schnell aufgetaut und langsam mit 10 mL 37 °C warmen Medium ausverdünnt. Das restliche DMSO wurde durch einmaliges Abzentrifugieren der Zellen für 5 min bei 800 xg abgetrennt. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und in eine entsprechende Kulturflasche ausgesät. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit.

### 3.2.3 Histologische Methoden

#### 3.2.3.1 Immunhistochemische Färbungen

Zur Untersuchung der CAPG-Lokalisation in verschieden-gradigen Gliomen wurden immunhistochemische Färbungen freundlicherweise am Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf von Frau Dr. Christiane B. Knobbe-Thomsen durchgeführt. Dafür wurden anonymisierte Archivproben aus Düsseldorf (Ethikantragsnummern: 3005, 5144, 5576, 6217R) immunhistochemisch untersucht.

Tabelle 11: Klinisch-pathologische Merkmale der 24 Gliompatienten.

#	Alter	Geschlecht	WHO-Grad	Histologie	Molekularer Befund
1	49	m	IV	Glioblastom	wt
2	19	f	III	Anaplastisches Oligodendrogliom	IDH1-R132H
3	37	f	II	Oligodendrogliom	IDH1-R132H
4	56	m	IV	Glioblastom mit sarkomatöser Komponente	wt
5	45	m	III	Anaplastisches Astrozytom	wt
6	19	f	IV	K27M-mutiertes Gliom	wt
7	69	m	IV	Glioblastom	wt
8	52	m	III	Anaplastisches Oligodendrogliom	IDH1-R132H
9	47	m	III	Anaplastisches Oligodendrogliom	IDH1-R132H
10	27	f	II	Diffuses Astrozytom	IDH1-R132S
11	55	f	III	Anaplastisches Oligodendrogliom	IDH1-R132H
12	68	m	IV	GBM	wt
13	70	f	IV	GBM	wt
14	29	f	II	Diffuses Astrozytom	IDH1-R132C
15	53	m	III	Anaplastisches Oligodendrogliom	IDH1-R132H
16	82	f	IV	GBM	wt
17	29	f	III	Anaplastisches Astrozytom	IDH1-R132H
18	40	m	II	Oligodendrogliom	IDH1-R132H
19	50	f	IV	GBM	wt
20	41	f	II	Oligodendrogliom	IDH2-R172K
21	26	m	III	Anaplastisches Oligodendrogliom	IDH1-R132H

#	Alter	Geschlecht	WHO-Grad	Histologie	Molekularer Befund
22	46	m	III	Anaplastisches Oligodendrogliom	IDH1-R132H
23	62	f	III	Anaplastisches Astrozytom	IDH1-R132H
24	47	m	III	Anaplastisches Oligodendrogliom	IDH1-R132H

### 3.2.4 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

#### 3.2.4.1 Zellernte

Für die Zellernte wurde zunächst das Medium entfernt und einmal mit 10 mL PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 mL PBS auf die Zellen pipettiert und die Zellen mit Hilfe eines Schabers von der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein zuvor abgewogenes 2 mL Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1000 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pelletgewicht bestimmt. Das gewonnene Zellpellet wurde entweder direkt für den Zellaufschluss eingesetzt oder zunächst bei -80 °C gelagert.

#### 3.2.4.2 Mechanischer Zellaufschluss

Für den Aufschluss des Zellpellets wurde das dreifache Volumen eines Lysepuffers hinzugegeben und das Pellet resuspendiert. Nach Zugabe einer Stahlkugel mit 5 mm Durchmesser wurde die Zellsuspension für 1 min bei 40 Hz mit dem *Tissue Lyser* aufgeschlossen. Anschließend wurde die Probe sechs Mal für 10 s sonifiziert, wobei nach je 10 s Beschallung eine 10-sekündige Pause auf Eis folgte. Um Zelltrümmer abzutrennen, folgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 16.000 xg und 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues 1,5 mL *low bind* Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Im Anschluss wurde das Sediment ein zweites Mal nach demselben Prinzip aufgeschlossen. Nur dieses Mal wurde nur die zweifache Menge an Lysepuffer eingesetzt. Zum Schluss wurden die Überstände vereinigt.

#### 3.2.4.3 Probenvorbereitung für die globale Analyse von reversiblen Cysteinmodifikationen

Die globale Analyse reversibler oxPTM erfolgte nach dem Protokoll von Guo (Guo *et al.*, 2014). Dafür wurde zunächst ein Teil der A172-Zellen mit 250 µM Wasserstoffperoxid behandelt (3.2.2.2) (n=4) und die Proteine mittels TCA-Fällung gefällt, um den oxidativen Zustand der Cysteine zu arretieren. Hierfür mussten zunächst alle Puffer für mindestens 15 min entgast werden. Dann wurden die Zellkulturschalen auf Eis gestellt und zwei Mal mit 10 mL kaltem PBS gewaschen. Danach wurde 1 mL 20 %-ige (v/v) Trichloressigsäure (TCA)

in Wasser auf die Zellen gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen von der Schale geschabt und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Um das Zellpellet zu erhalten, folgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13.000 xg und 4 °C. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Pellets nacheinander vorsichtig mit 10 und 5 %-iger (v/v) Trichloressigsäure gewaschen. Nachdem der Überstand nach erneuter Zentrifugation komplett abgenommen und verworfen wurde, wurden die Proben in 400 µL TPS-Zellysepuffer, der N-Ethylmaleimid (NEM) enthielt, resuspendiert. Anschließend wurden die Proben für 1,5 h bei 850 upm und 37 °C im Dunkeln inkubiert und danach mit je 1,6 mL 100 %-igem Aceton (-20 °C) versetzt, um nicht gebundenes NEM zu entfernen. Die Proben wurden gut resuspendiert und über Nacht bei -20 °C eingefroren. Am Folgetag wurden die Proben für 10 min bei 13.000 xg und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellpellets anschließend mit 500 µL 70 %-igem Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wurde der Überstand erneut verworfen und die Pellets für 5 min mit offenem Reaktionsgefäßdeckel an der Luft getrocknet, damit das Aceton vollständig abdampfen konnte. Danach wurden die Pellets in je 100 µL TPS-Resuspensionspuffer resuspendiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Reduktion der Proben schüttelnd für 1 h bei 37 °C nach Zugabe von 2,86 µL der 1,4 M DTT-Stammlösung (finale DTT-Konzentration der Proben: 10 mM). Im Anschluss wurde das überschüssige DTT über eine 30-minütige Ultrafiltration bei 14.000 xg und 14 °C entfernt. Es folgten zwei Waschschriffe, zum einen mit 8 M Harnstoff und zum Schluss mit kaltem Wasser. Während des letzten Waschschriffes wurde parallel die Thiopropyl Sepharose 6B Matrix (TPS-Matrix) vorbereitet. Dafür wurden pro Probe 35 mg der TPS-Matrix in 1 mL Wasser gelöst und für 15 min bei RT quellen gelassen. Nach der Inkubation wurde das Gemisch durch pipettieren erneut resuspendiert und für weitere 10 min quellen gelassen. Vor der Verwendung wurde die TPS-Matrix jeweils fünfmal mit Wasser und TPS-Resuspensionspuffer gewaschen. Nach dem Waschschriff mit Wasser wurden die Filter in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und die Proben durch 5-minütige Zentrifugation bei 1000 xg eluiert. Nach Aufnahme der Proben in je 50 µL TPS-Bindungspuffer wurde eine Proteingehaltsbestimmung durchgeführt (3.2.4.5), um jeweils 100 µg Protein für die anschließende Anreicherung einzusetzen. Bevor die Proben mit der TPS-Matrix gemischt wurden, wurden noch 1,7 µL der 1,4 M DTT-Stammlösung (finale DTT-Konzentration: 20 mM) und 1,2 µL der 10 %-igen SDS-Stammlösung (finale SDS-Konzentration: 0,1 %) zugesetzt. Dann folgte die Inkubation für 2 h bei RT und 850 upm. Nicht gebundene Proteine wurden durch stringente Waschschriffe entfernt. Dafür wurde die TPS-Matrix jeweils fünfmal mit 500 µL 8 M Harnstoff, 2 M Natriumchlorid,

80 % Acetonitril mit 0,1 % TFA und zuletzt 25 mM HEPES gewaschen. Dann wurden 50 µL SDS-Probenpuffer hinzugefügt und die Proben unter ständigem Schütteln bei 42 °C für 20 min inkubiert. Im letzten Schritt erfolgte die Elution der Proben von der TPS-Matrix in ein frisches Reaktionsgefäß über einen Zentrifugationsschritt für 1 min bei 1000 xg. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C weggefroren.

### 3.2.4.4 Subzelluläre Fraktionierung

Die subzelluläre Fraktionierung wurde nach Herstellerangaben mittels *NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit* von Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Abweichend von den Herstellerangaben wurde nach der Lyse mit CER1 das Kernpellet noch einmal mit 100 µL CER1 gewaschen und erneut für 5 min bei 16.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Zur Kernfraktionierung wurden die Pellets alle 10 min resuspendiert und zusätzlich mit dem Pistill bearbeitet. Anschließend wurden die Proben viermal für je 10 s im Ultraschallbad sonifiziert.

### 3.2.4.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur quantitativen, photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der *Pierce 660 nm Protein-Assay* genutzt. Dieser eignet sich für Konzentrationsbereiche von 50 µg/mL bis 2,0 mg/mL. Detektiert wird eine Verschiebung des Absorptionsmaximums eines Farbstoffs, die durch die Bindung eines Farbstoff-Metall-Komplexes an die Proteine in einem sauren Puffer resultiert. Für die Messung wurden sowohl je 10 µL einer BSA Standardreihe (0 ng/µL bis 2000 ng/µL), als auch je 10 µL der zu messenden Probe in eine *non-binding* 96 *Well*-Platte pipettiert. Die Konzentration aller Proben wurde in Doppelbestimmung gemessen. Dafür wurde zu allen Proben je 150 µL des Reagenz hinzu pipettiert und die Platte anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Die Messung erfolgte in einem Multimode Detektor (Beckman Coulter) bei einer Wellenlänge von 660 nm. Anhand einer Kalibriergerade konnte die Proteinkonzentration anschließend berechnet.

### 3.2.4.6 Abtrennung von überschüssigen Pufferkomponenten mit niedrigem Molekulargewicht mittels Gelfiltration

Verwendet wurden *Mini Spin* Säulen mit einem Fassungsvermögen von 50 µL bis 100 µL, die im ersten Schritt in ein 2 mL Reaktionsgefäß gesetzt wurden. Bevor dann je 1 mL der Matrix auf die Säule gegeben wurde, wurde die P6-Matrix gut gemischt. Es folgte ein 2-minütiger Zentrifugationsschritt bei 1000 xg, damit sich die Matrix absetzen konnte. Anschließend wurden zum Waschen der Säule 600 µL PBS auf die Säule gegeben und es folgte erneut ein 2-minütiger Zentrifugationsschritt bei 1000 xg. Der Durchfluss wurde verworfen und der Waschschrift ein zweites Mal wiederholt. Anschließend wurde die *Mini Spin* Säule in ein

frisches 1,5 mL Reaktionsgefäß gesetzt und die Probe auf die Matrix gegeben. Durch erneute Zentrifugation für 5 min bei 1000 xg wurde die Probe von der Säule eluiert.

### 3.2.4.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). Dabei überdeckt das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) die Eigenladung der Proteine. So weisen die Proteine eine negative Ladung auf, die proportional zu ihrer Masse ist und eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht ermöglicht. Durch das teilweise im SDS Probenpuffer enthaltene DTT werden die Disulfidbrücken aufgebrochen, wodurch die Proteine denaturieren und ihre native Struktur verlieren. Oxidierte Cysteine würden dadurch ebenfalls reduziert werden. Für die SDS-PAGE wurden 4-12 %-ige Gradientengele von Thermo Fisher Scientific oder 4-15 %-ige Mini PROTEAN<sup>®</sup> TGX *Stain free* Gel von der Firma Biorad verwendet. Die Proben wurden mit vierfachem SDS-Puffer versetzt und 10 min bei 40 °C inkubiert. Für eine anschließende Western Blot Analyse wurden die Geltaschen je nach Experiment mit 20-30 µg Protein beladen und als Marker wurde der *PageRuler Prestained Protein Ladder* verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 15 min bei 50 V und anschließend für weitere 45-60 min bei 200 V.

### 3.2.4.8 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung zählt zu den Standardmethoden, um aufgetrennte Proteine im Gel zu visualisieren. Dafür wurden die Proteine zunächst mittels SDS-PAGE (3.2.4.7) aufgetrennt und das Gel anschließend für mindestens 1 h in Coomassie-Schnellfärbelösung inkubiert. Bei dieser Färbemethode handelt es sich um eine Endpunktfärbung bei der sich der Farbstoff sowohl an basische, als auch aromatische Aminosäureseitenketten anlagert und alle Proteine anfärbt. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde das Gel für mindesten 1 h in Coomassie-Entfärbelösung gegeben, um nicht gebundenes Coomassie zu entfernen und das Hintergrundsignal zu minimieren. Anschließend wurde mit Wasser gewaschen und das Gel zu Dokumentationszwecken eingescannt.

### 3.2.4.9 Silberfärbung

Die Silberfärbung zählt ebenfalls zu den Standardmethoden um aufgetrennte Proteine im Gel zu visualisieren (Nesterenko *et al.*, 1994). Der Färbeablauf ist in Tabelle 12 zusammengefasst.

**Tabelle 12: Der Ablauf, die Lösungen und die Inkubationszeiten der Silberfärbung.** Es wurden pro Lösung 50 mL angesetzt.

Schritt	Lösung	Dauer
Fixierung	A	15 min-24 h
Inkubation	B	15 min-2 h
Wässern	Wasser	3x5 min
Färbung	C	15 min-30 min
Wässern	Wasser	wenige Sekunden
Spülen	D	1 min
Entwicklung	E	1 min-7 min
Stoppen	F	20 min-2 h
Waschen	Wasser	10 min-24 h

#### 3.2.4.10 *Semidry* Western Blot

Um die mittels SDS-PAGE (3.2.4.7) aufgetrennten Proteine zu immobilisieren, wurden diese mit Hilfe des *Semidry Blotting* Verfahrens auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF)-Membran transferiert, um sie anschließend immunologisch detektieren zu können. Für den Proteintransfer wurden auf die Anodenplatte zunächst zwei zuvor in Anodenpuffer eingeweichte Filterpapiere platziert. Darauf wurde eine zuvor mittels 100 % Isopropanol aktivierte und anschließend in Anodenpuffer inkubierte PVDF-Membran gelegt. Auf die aktivierte Membran kam das Gel und abschließend wurden zwei weitere zuvor in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere darauf gestapelt. Eingeschlossene Luftblasen wurden entfernt und eine konstante Spannung von 2 mA pro cm<sup>2</sup> für 1 h angelegt, um einen gleichmäßigen Proteintransfer zu gewährleisten. Durch hydrophobe Wechselwirkungen bleiben die Proteine an der Membranoberfläche haften und das Auftrennungsmuster bleibt erhalten. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran schüttelnd in 50 mL Blockierlösung für 30 min bei RT inkubiert, um die unspezifischen Bindestellen auf der Membran abzusättigen. Anschließend wurde der gewünschte Primärantikörper (3.1.6) in 1 mL Blockierlösung verdünnt, auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran zweimal für 5 min mit einfach TBS-T auf einem Schüttler gewaschen, bevor der an einen fluorophorgekoppelte Sekundärantikörper (3.1.6) in Blockierlösung verdünnt und auf die Membran gegeben wurde. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte im Dunkeln für 1,5 h bei RT auf dem Schüttler. Nachdem je zweimal für 5 min mit einfach TBS-T und einfach TBS lichtgeschützt gewaschen wurde, wurde die Membran für mindestens 30 min bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet. Anschließend konnte die Membran am Fluoreszenzplattenlesegerät im jeweiligen Kanal aufgenommen werden.

### 3.2.4.11 Immunpräzipitation von GFP und GFP-Fusionsproteinen

Für die Untersuchung des CAPG-GFP-Fusionsproteins und den fünf daraus generierten Cysteinmutanten (C77, C165, C178, C282, C290) wurde ein Protokoll für die Immunpräzipitation (IP) etabliert. Die Zellernte erfolgte wie bereits in 3.2.4.1 beschrieben. Anstelle des Standardlysepuffers wurde hier RIPA-Lysepuffer, der mit NEM versetzt war (final: 100 mM NEM), für den Aufschluss verwendet 3.2.4.2. Für die Analyse des CAPG-GFP-Fusionsproteins und dessen potentiellen Interaktionspartnern wurde die IP von GFP-Fusionsproteinen unter Verwendung von *GFP-Trap®\_MA* (Chromotek) durchgeführt. Bei der *GFP-Trap®\_MA* werden Alpaka-Antikörperfragmente, die kovalent an die Oberfläche von magnetischen Agarosepartikeln gekoppelt sind, verwendet. Die IP wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die Elution erfolgte mit 100 µL SDS-Probenpuffer. Die Eluate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.2.4.12 Polyethylenglykol (PEG)-Switch Assay

Zur Untersuchung reversibler oxidativer posttranslationaler Cysteinmodifikationen (oxPTM) von Zielproteinen wurde der PEG-Switch Assay nach Burgoyne *et al.* 2013 verwendet. Dabei lassen sich mit dieser Methode unter Verwendung eines Alkylierungsmittels auf PEG-Basis (Methoxypolyethylenglykolmaleimid, Sigma) reversible oxPTM eines Zielproteins nachweisen.

Um zu untersuchen, ob es sich bei CAPG um ein redox-sensitives Protein handelt und um den Redoxzustand der einzelnen Cysteinmutanten von CAPG zu analysieren, wurden LN18-Zellen verwendet, in die CAPG-His oder die jeweilige Cysteinmutante von CAPG stabil eingebracht wurden. Die Zellen wurden auf 15 cm Kulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90-100 % kultiviert. Alle Puffer und Lösung wurden vor dem Gebrauch entgast. Es wurden unterschiedliche Kontrollen verwendet und die Schalen dem entsprechend beschriftet (1) unmodifiziert, 2) Minimale Molekulargewichtsverschiebung, 3) unbehandelt, 4) 250 µM Wasserstoffperoxid, 5) 1 mM Wasserstoffperoxid, 6) Maximale Molekulargewichtsverschiebung). Jeweils eine Schale wurde mit 250 µM Wasserstoffperoxid für 10 min bei RT und eine weitere mit 1 mM Wasserstoffperoxid für 5 min bei 37 °C behandelt. Die Zellernte erfolgte wie bereits in 3.2.4.1 beschrieben. Der Überstand wurde abgenommen und das gewonnene Zellpellet der Proben 1, 2 und 6 in 100 µL Blockierpuffer pH 6,9 (100 mM HEPES und 1 % SDS) ohne N-Ethylmaleimid (NEM) resuspendiert. Die Pellets der Proben 3, 4 und 5 wurden in 100 µL Blockierpuffer pH 6,9 (100 mM HEPES und 1 % SDS) mit 100 mM NEM aufgenommen. Die Zellyse und die Alkylierung der freien Thiole mittels NEM erfolgten durch Inkubation bei 50 °C und 850 upm für 25 min im

Dunkeln. Im nächsten Schritt wurde überschüssiges nicht gebundenes NEM mittels Gelfiltration (3.2.4.6) abgetrennt. Anschließend erfolgte die Reduktion reversibler oxPTM durch Zugabe von 10 mM Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) und Inkubation für 15 min bei 45 °C und 300 upm. Überschüssiges TCEP wurde erneut mittels Gelfiltration abgetrennt. Die neu freigewordenen Thiole wurden bei Probe 2 mit 100 mM NEM markiert und bei den Proben 3 bis 6 mit 40 mM PEG-maleimid. Zusätzlich wurde den Proben 0,5 % SDS zugesetzt. Probe 1 wurde unmodifiziert gelassen. Nach 2 h Inkubation leicht schüttelnd bei RT im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 mM HEPES-Puffer mit 100 mM NEM (pH 6,8) zu den Proben 2 bis 6 gestoppt. Mittels Acetonfällung über Nacht wurde überschüssiges NEM entfernt. Dafür wurden 800 µL -20 °C kaltes Aceton zu den Proben gegeben, die Proben im Anschluss gut durchmischt und über Nacht bei -20 °C eingefroren. Am Folgetag wurden die Proben für 10 min bei 13.000 xg und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellpellets anschließend mit 100 µL 70 %-igem Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde der Überstand erneut verworfen und die Pellets für 5 min mit offenem Reaktionsgefäßdeckel an der Luft getrocknet, damit das Aceton vollständig abdampfen konnte. Danach wurden die Pellets in je 50 µL Minimalpuffer mit HEPES resuspendiert und die Proteinkonzentration bestimmt (3.2.4.5). Im nächsten Schritt wurden die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt (3.2.4.7), auf eine PVDF-Membran übertragen und das Kandidatenprotein immunologisch nachgewiesen (3.2.4.10). Wies das Protein reversible oxPTM auf so korreliert die Molekulargewichtsverschiebung im Blot nach Alkylierung mit PEG-maleimid mit der Anzahl an oxPTM.

### 3.2.4.13 Immunzytochemische Färbungen

Für die mikroskopischen Untersuchungen der CAPG-Lokalisation wurden die Zellen auf Deckgläsern kultiviert. Dazu wurden zunächst die Deckgläser in Ethanol desinfiziert, in ein 24-Well gelegt und zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläser mit je 250 µL Poly-L-Lysin (0,1 %), welches zuvor 1:10 in PBS verdünnt wurde, beschichtet. Nach 2-stündiger Inkubation bei RT unter der Sterilbank wurde das Poly-L-Lysin-Gemisch abgenommen und die Deckgläser für 20 min mit UV-Licht bestrahlt. Daraufhin wurde drei Mal mit PBS gewaschen, bevor ca.  $1 \times 10^5$  Zellen/mL pro Deckgläschen ausgesät und über Nacht in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, um eine Konfluenz von ca. 70 % zu erreichen.

Am nächsten Tag erfolgte zunächst die jeweilige Behandlung der Zellen. Nach der Behandlung wurde für eine Minute mit PBS gewaschen und die Zellen im Anschluss mit

4 %-iger Paraformaldehydlösung (PFA) in PBS für 15 min bei RT unter dem Abzug fixiert. Nach zwei anschließenden Waschschrritten mit PBS wurden die Zellen in einer Lösung mit 10 % FKS und 0,6 % TritonX 100 in PBS für 20 min inkubiert, damit unspezifische Bindestellen blockiert und die Zellen permeabilisiert wurden. Die Zellen wurden über Nacht bei 4 °C in dem jeweiligen in 200 µL PBS verdünnten Primärantikörper (3.1.6) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Deckgläser drei Mal für 5 min mit PBS gewaschen, um nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Danach erfolgte die 1-stündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper und DAPI bei RT im Dunkeln. Drei Waschschrritte mit PBS schlossen sich an bevor die Deckgläser mit den Zellen nach unten auf einem Objektträger mit Eindeckmedium (*Prolong Diamond Antifade Mountant*, Life Technologies) aufgebracht wurden. Bis zum Mikroskopieren wurden die Objektträger bei RT im Dunkeln gelagert.

### 3.2.4.14 Mikroskopie

Die Bilder wurden am Mikroskop *Axioplan* (Zeiss) zum einen mit einem 40x und zum anderen mit einem 100x Objektiv aufgenommen. Das Mikroskop war mit einer Quecksilberdampflampe und einer Digitalkamera ausgestattet. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Software *AxioVision* und *ZEN 2011*.

### 3.2.4.15 Konfokal-Mikroskopie

Die Aufnahmen der immunzytochemisch angefärbten Zellen wurden 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 aufgenommen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Software *LAS X* (Leica).

### 3.2.4.16 Lebendzell-Mikroskopie

Zur Untersuchung des Einflusses der Wasserstoffperoxidbehandlung (3.2.2.2) auf lebende Glioblastomzellen, in die entweder CAPG-GFP oder eine der Cysteinmutanten (C282S-GFP oder C290S-GFP) stabil eingebracht wurde, wurden die lebenden Zellen über die Zeit 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 aufgenommen. Die Lebendzell-Mikroskopie bietet den entscheidenden Vorteil, dass sich mit dieser Methode Einblicke in die Dynamik von Prozessen erhalten lassen, wohingegen fixierte Proben immer nur eine Momentaufnahme liefern. Die LN18-CAPG-GFP-, LN18-CAPG C282S-GFP- und LN18-CAPG C290S-GFP-Zellen wurden auf µ-Schalen von ibidi ausgesät und in Medium ohne Phenolrot, um die Autofluoreszenz zu minimieren, bis zu einer Konfluenz von

ca. 70-80 % kultiviert. Die subzelluläre Lokalisation von CAPG in lebenden Zellen wurde durch Anregung des GFP-*Tags* nachverfolgt. Zunächst wurden die Zellen jeweils über einen Zeitraum von ca. 5 min im unbehandelten Zustand aufgenommen. Im Anschluss erfolgte die Wasserstoffperoxidzugabe ohne die Unterbrechung der Aufnahmen, um den Fokus nicht zu verlieren. Danach wurden die Zellen noch für mindestens weitere 30 min aufgenommen. Die Aufnahme erfolgte unter Kulturbedingungen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (3.2.2.1), um die Zellen nicht noch zusätzlichem Stress auszusetzen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software *ImageJ*.

### 3.2.4.17 Molekulardynamik (MD)-Simulation

Die MD-Simulationen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Markus Dick (Institut für pharmazeutische und chemische Chemie, AG *Computational Pharmaceutical Chemistry* von Prof. Dr. Gohlke) angefertigt. Als Grundlage für die MD-Simulationen diente die publizierte Struktur der CAPG-Sev-Mutante (pdb: 1j72). Es wurde die Lage der einzelnen Cysteine von CAPG und deren Lösemittelzugänglichkeit untersucht, um eine Aussage darüber treffen zu können, wie zugänglich diese für die Redox-Regulation sind. Dafür wurden unter anderem Distanzmessungen zwischen den einzelnen Cysteinpaaren durchgeführt. Zur Visualisierung und Analyse wurde die Software *VMD* (*visual molecular dynamics*) verwendet. Zum einen wurde das komplette Protein betrachtet und zum anderen vereinzelte Domänen.

### 3.2.4.18 Aktinpolymerisations-/depolymerisationsassay

Zur Messung der Aktin-*Capping*-Aktivität der verschiedenen, rekombinant in *E. coli* hergestellten CAPG-Proteinvarianten wurde der Aktinpolymerisations-/depolymerisationsassay (*Fluorometric/* BIV-K457-100) von Biozol verwendet. Die Experimente wurden nach Herstellerangaben durchgeführt und 2,8 µM der jeweiligen CAPG-Proteinvariante für die Experimente verwendet. Abweichend von den Herstellerangaben wurde die jeweilige CAPG-Proteinvariante für 10 min mit 100 µM Wasserstoffperoxid bei RT, während der letzten 10 min der 1-stündigen Inkubationsphase nach der Rekonstitution von markiertem Aktin, behandelt, um den Einfluss möglicher oxidativer posttranslationaler Cysteinmodifikationen der CAPG-Proteinvarianten auf die Aktin-*Capping*-Aktivität zu untersuchen.

### 3.2.4.19 Scratch Assay

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens verschiedener LN18-Zelllinien wurde der *Scratch Assay* verwendet. Hierbei wurde das Migrationspotenzial herkömmlicher LN18-Zellen mit dem CAPG-His oder die jeweilige Cysteinmutante von CAPG überexprimierender LN18-Zellen verglichen, um herauszufinden welchen Einfluss zum einen eine erhöhte Menge

an CAPG und zum anderen die einzelnen Cysteinmutanten auf das Migrationsverhaltens haben. Dafür wurden die entsprechenden Zellen auf 6-*Wells* ausgesät. Am Folgetag wurde dem konfluenten Zellrasen unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer 200 µL Pipettenspitze ein gleichmäßiger Kratzer (engl.: *scratch*) zugefügt. Im Anschluss folgten drei Waschschrte mit PBS, um die beim *Scratch*-Vorgang abgelösten Zellen zu entfernen. Danach wurden die Zellen im Standardkulturmedium kultiviert. Durch Verlaufsfotodokumentation direkt im Anschluss, nach 24 h und 48 h nach dem Zufügen des Kratzers und Ausmessen der zellfreien Fläche konnten Rückschlüsse auf das Migrationsverhalten der untersuchten Zellen gezogen werden. Für das Ausmessen der freien Fläche wurde die Software *ImageJ* verwendet. Die Versuche wurden in drei Replikaten durchgeführt. Die Ergebnisse wurden statistisch und graphisch mit *Microsoft Excel* aufbereitet und dargestellt.

### 3.2.5 LC-MS/MS-Analysen

#### 3.2.5.1 Probenvorbereitung für den In-Gel-Verdau

Das silbergefärbte Gel (3.2.4.9) wurde auf eine Glasplatte gelegt, die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in die entsprechenden Verdauörhrchen gelegt. Die Waschlösungen A und B, sowie die Entfärbelösungen eins und zwei wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäßen vorgelegt. Die Entfärbelösungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und davon je 40-60 µL auf die jeweilige Gelbande pipettiert, sodass diese vollständig bedeckt war. Die Lösung blieb solange drauf bis die Bande vollständig entfärbt war. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und je 60 µL der Waschlösung A auf die entfärbten Gelbanden pipettiert. Nach einer Inkubation für 3-10 min bei RT wurde der Überstand abgenommen und 60 µL der Waschlösung B auf die Bande gegeben. Es folgte eine erneute Inkubation für 3-10 min bei RT. Anschließend wurde alternierend noch zweimal mit Waschlösung A und B gewaschen, bevor die Gelstücke zum Trocknen in die Vakuumzentrifuge gestellt wurden. Die Banden konnten entweder weggefroren, zunächst noch reduziert und alkyliert (3.2.5.2) oder direkt für den Verdau (3.2.5.3) eingesetzt werden.

#### 3.2.5.2 Reduzieren und Alkylieren der Banden

Um die trockenen Gelstücke zu reduzieren, wurden die Banden in je 50 µL 10 mM DTT in 50 mM Ammoniumbicarbonat für 45 min bei 56 °C quellen gelassen. Anschließend wurde die überschüssige Lösung abgenommen und zügig 50 µL 55 mM Iodoacetamid (IAM) in 50 mM Ammoniumbicarbonat zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT wurden die Gelstücke erneut zweimal alternierend für 3-10 min mit den Waschlösungen A und B gewaschen und dann in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Je nachdem wofür die Banden

eingesetzt werden sollten, wurden sie trocken weggefroren oder direkt proteolytisch mit Trypsin über Nacht verdaut (3.2.5.3). Je nach Versuch wurde der Reduktionsschritt weggelassen oder anstelle mit IAM mit IAM-D4 alkyliert.

### 3.2.5.3 Proteolytischer Verdau

Zum Ansetzen der Arbeitslösung wurden 32,5 µL der 100 mM Ammoniumbicarbonatlösung (pH 8,0) zu einem 5 µL Trypsin-Aliquot, welches eine Konzentration von 250 ng/µL hat und in 10 mM Salzsäure gelöst ist, pipettiert, um eine Trypsin-Endkonzentration von 0,033 µg/µL zu erhalten. Anschließend wurden 3 µL der frisch angesetzten Arbeitslösung und 3 µL der Waschlösung A auf das Gelstück gegeben. Nach Aufquellen des Gelstücks wurden die Verdauröhrchen verschlossen und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert.

### 3.2.5.4 Peptidextraktion

Zunächst wurde die Extraktionslösung frisch aus 0,1 %-iger TFA und Acetonitril 1:1 angesetzt und anschließend je nach Bandengröße 10-40 µL der frisch angesetzten Extraktionslösung auf die Gelbande gegeben. Nachdem die Proben für 15 min im mit Eis gefüllten Ultraschallbad beschallt wurden, wurde der Überstand in ein HPLC-Probengefäß überführt. Anschließend wurde erneut die gleiche Menge an Extraktionslösung auf die Gelbanden gegeben und die Proben kamen für weitere 15 min ins Ultraschallbad, bevor die Überstände vereint wurden. Anschließend wurden die HPLC-Probengefäße für ca. 4 h zum Trocknen in die Vakuumzentrifuge gestellt, um das komplette Acetonitril zu entfernen. Die trockenen Proben wurden entweder direkt in 17 µL 0,1 %-iger TFA aufgenommen und gemessen oder bei -20 °C gelagert.

### 3.2.5.5 Massenspektrometrie

Alle, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, prozessierten Proben wurden massenspektrometrisch analysiert. Für die MS-Analyse wurde der *bottom-up* Ansatz verwendet. Zunächst wurden alle Proben über eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: *high performance liquid chromatography*; HPLC) aufgetrennt, bevor sie anschließend an der QExactive Plus analysiert wurden. An die LC-MS/MS-Analyse schloss sich die bioinformatische Datenauswertung an. Um ein stabiles Laufverhalten des HPLC-MS-Systems zu gewährleisten, liefen in regelmäßigen Abständen Peptidstandards. Die jeweiligen Geräteeinstellungen sind in den folgenden Unterkapiteln beschrieben.

#### 3.2.5.5.1 Flüssigkeitschromatographie

Für die Probenauftrennung wurde ein *Ultimate 3000* Flüssigkeitschromatographiesystem genutzt. Mit Hilfe des *Autosamplers* wurden je 15 µL einer Probe auf eine Vorsäule (Acclaim

PepMap C18, 75 µm Innendurchmesser, 3 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße, 2 cm Länge) geladen, um vorab mögliche Verschmutzungen der Probe zu reduzieren. Im Anschluss erfolgte die eigentliche Auftrennung der Probe mit einer Flussrate von 0,3 µL/min über eine analytische Säule (Acclaim PepMap C18, 75 µm Innendurchmesser, 2 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße, 25 cm Länge). Dabei war die gewählte Gradientenlänge von der Komplexität der zu analysierenden Probe abhängig. Für weniger komplexe Proben wurde ein 60-minütiger Gradient verwendet und für komplexe Peptidgemische ein 120-minütiger. Auf den jeweiligen Gradienten folgte jeweils ein Spül- und Equilibrierungsschritt von 60 min. Die Teilschritte des jeweiligen Gradienten sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst. Im Anschluss wurden die Proben über eine Nanoelektrospray-Ionisationsquelle (nESI) in das Massenspektrometer eingebracht.

**Tabelle 13: Teilschritte des 60-minütigen Gradienten für die Probenauftrennung mittels HPLC.**

<b>Zeit [min]</b>	<b>Anteil an B [%]</b>	<b>Flussrate [µl/min]</b>	<b>Schritt</b>
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	
69,5-70	4	0,3	
71-75	95	0,4	
75,5-80	4	0,4	Spülen und Equilibrieren
81-85	50	0,4	
85,5-90	96	0,4	
95,5-120	4	0,4	

**Tabelle 14: Teilschritte des 120-minütigen Gradienten für die Probenauftrennung mittels HPLC.**

<b>Zeit [min]</b>	<b>Anteil an B [%]</b>	<b>Flussrate [µL/min]</b>	<b>Schritt</b>
0-15	4	0,3	Beladen der Vorsäule
15-78	10-20	0,3	Beladen der analytischen Säule/linearer Gradient
78-130	20-40	0,3	linearer Gradient
130-137	95	0,3	
141-145	50	0,4	
145,5-150	96	0,4	
150,5-153	4	0,4	Spülen und Equilibrieren
153-158	96	0,4	
158,5-180	4	0,4	

### 3.2.5.5.2 Massenspektrometrische Analyse

Tandem-Massenspektren wurden mit dem hochauflösenden Orbitrap-Quadrupol Hybridgerät QExactive Plus aufgezeichnet. Hierbei werden Ionen in der C-Falle gesammelt und zur Orbitalfalle, die als Analysator dient, weitergeleitet. Dort wird ein *Transient* aufgenommen, der mittels Fourier-Transformation in Massenspektren umgewandelt wird. Die Vorläuferionen werden mit Hilfe einer Nanoelektrospray-Ionisationsquelle (nESI-Quelle) erzeugt und anschließend in Zyklen Vorläuferionen- und Fragmentspektren aufgezeichnet. Für die Aufzeichnung von Vorläuferionenspektren werden Vorläuferionen in der Orbitalfalle gesammelt und analysiert. Bis zu zehn der 2 bis 4-fach geladenen Vorläuferionen mit dem höchsten Signal werden anschließend nacheinander im Quadrupol isoliert, in der *High Energy Collision Dissociation* (HCD) Zelle fragmentiert und in der Orbitalfalle analysiert. Danach folgt ein neuer Zyklus. Die Peptidfragmentierung in der HCD-Zelle erfolgt durch Zusammenstöße mit dem Kollisionsgas Stickstoff.

Die verwendeten Einstellungen für die QExactive Plus wurden in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Massenspektrometrische Parameter für die MS/MS-Analysen mit der QExactive Plus.

Parameter	Werte 120-minütiger HPLC-Gradient	Werte 60-minütiger HPLC-Gradient
Spray Spannung (+)	1,4 kV	1,4 kV
Kapillartemperatur	250 °C	250 °C
Polarität	positiv	positiv
MS1-Auflösung	70,000	70,000
MS2-Auflösung	17,500	17,500
MS1-Scan-Bereich	350 bis 2000 <i>m/z</i>	200 bis 2000 <i>m/z</i>
MS2-Scan-Bereich	200 bis 2000 <i>m/z</i>	200 bis 2000 <i>m/z</i>
TopN	10	20
Isolationsfenster Quadrupol	2 <i>m/z</i>	4 <i>m/z</i>
<i>Automatic Gain Control</i> (MS1)	3.00E+06	3.00E+06
<i>Automatic Gain Control</i> (MS2)	1.00E+05	1.00E+05
Maximale Ionenzeit (MS1)	80 ms	50 ms
Maximale Ionenzeit (MS2)	60 ms	50 ms
Ladeausschluss	Nicht zugeordnet, 1, >3	Nicht zugeordnet, 1, >5
Dynamischer Ausschluss	100 s	10 s
Fragmentierungsmethode	HCD	HCD
Kollisionsgas	Stickstoff	Stickstoff
Kollisionsenergie	30 %	30 %

Die gezielte direkte Detektion von oxidativen posttranslationalen Cysteinmodifikationen des Zielproteins wurde mittels *Parallel Reaction Monitoring* (PRM) ebenfalls an der QExactive Plus durchgeführt. Aus einer vorherigen *shotgun*-Analyse wurde eine Einschlussliste (engl.: *inclusion list*) für die PRM-Analyse des Proteins CAPG erstellt (Tabelle 16).

**Tabelle 16: Peptid-Einschlussliste für die gezielte MS/MS-Analyse der oxidativen posttranslationalen Cysteinmodifikationen des Kandidatenproteins CAPG.**

Peptide	Modifikation	m/z	RT [min]	Zeitfenster
VADSSPFALELLISD DCFVLDNGLCGK	2 Carbamidomethyl (C)	985,8087	62	
VADSSPFALELLISD DCFVLDNGLCGK	2 Cys-Cys	947,1224	42,5	
VADSSPFALELLISD DCFVLDNGLCGK	2 Cys-Cys	947,1224	64,9	ab Minute 36 bis zum Ende
VADSSPFALELLISD DCFVLDNGLCGK	Carbamidomethyl (C), Dioxidation (C)	977,4648	69,5	
VADSSPFALELLISD DCFVLDNGLCGK	Carbamidomethyl (C), Trioxidation (C)	982,7964	68,6	
ANAQAAALYK	unmodifiziert	510,77	21	
ARDLALAIR	unmodifiziert	333,5417	20	
DLALAIRDSER	unmodifiziert	420,2298	24	Minute 10 bis 26
EGNPEEDLTADK	unmodifiziert	659,2939	18	
QFFKDWK	unmodifiziert	333,5080	30	Minute 26 bis 35

Für die PRM-Analysen wurde der 120-minütige HPLC-Gradient verwendet. Die verwendeten massenspektrometrischen Einstellungen wurden in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 17: Massenspektrometrische Parameter für die PRM-Analysen mit der QExactive Plus.**

Parameter	Werte
Spray Spannung (+)	1,4 kV
Kapillartemperatur	250 °C
Polarität	positiv
MS1-Auflösung	70,000
MS2-Auflösung	17,500
MS1-Scan-Bereich	200 bis 2000 <i>m/z</i>
MS2-Scan-Bereich	200 bis 2000 <i>m/z</i>
Isolationsfenster Quadrupol	2 <i>m/z</i>

Parameter	Werte
<i>Automatic Gain Control</i> (MS1)	3.00E+06
<i>Automatic Gain Control</i> (MS2)	2.00E+05
Maximale Ionenzeit (MS1)	50 ms
Maximale Ionenzeit (MS2)	100 ms
Fragmentierungsmethode	HCD
Kollisionsgas	Stickstoff
Kollisionsenergie	30 %

### 3.2.6 Bioinformatische Datenanalyse

Für die bioinformatische Datenanalyse wurden je nach Probenart, Komplexität und Probenaufarbeitung verschiedene Strategien angewandt.

#### 3.2.6.1 Massenspektrometrische Proteinidentifizierung

Für die Identifizierung von Proteinen wurde der *bottom-up* Ansatz verwendet. Für diesen Ansatz wurden die Proteine zuvor proteolytisch verdaut (3.2.5.3). Die generierten MS- und MS/MS-Spektren wurden für die Identifizierung und Quantifizierung von Peptiden und Proteinen mit Hilfe der Software *MaxQuant* (Max Planck Institut für Biochemie, Planegg) (Cox und Mann, 2008) mit dem implementierten Andromeda-Such-Algorithmus ausgewertet. Die Suchen wurden mit Standardparametern durchgeführt, wenn nicht anders angegeben. Die Parameter für den Datenbankabgleich sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

**Tabelle 18: Parameter für den Datenabgleich mit MaxQuant.**

Protease	Trypsin (Schnittstelle hinter den Aminosäuren Arginin und Lysin/max. zwei überlesene Schnittstellen)
Toleranz MS1 Suche	20 ppm
Toleranz MS2 Suche	4,5 ppm
FDR (Peptidebene)	1 %
FDR (Proteinebene)	1 %
Taxonomie	<i>Homo sapiens</i>
Masse	Monoisotopisch
Min. Peptidlänge	8

Für die Datenbanksuchen wurden humane Sequenzen aus der *UniProt* oder *SwissProt Knowledgebase* (KB) verwendet. In Tabelle 19 sind die für die unterschiedlichen Experimente verwendeten Programmversionen und Proteom-Datenbanken zusammengefasst.

**Tabelle 19: Zusammenfassung der verwendeten Proteindatenbanken, sowie der MaxQuant (MQ)- und Perseus-Versionen.**

<b>Studie</b>	<b>MQ-Version</b>	<b>Datenbank</b>	<b>Perseus-Version</b>
		20.08.2018	
A172-Redox-Proteom	1.6.2.10	<i>Uniprot</i> (73.112 Einträge)	1.6.1.1
		20.08.2018	
A172-Proteom	1.6.2.10	<i>Uniprot</i> (73.112 Einträge)	1.6.1.1
		19.02.2018	
IAM/IAM-D4	1.6.3.4	<i>SwissProt</i> (42.271 Einträge)	-
		19.02.2018	
Interaktionspartner A172-CAPG-His	1.6.3.4	<i>SwissProt</i> (42.271 Einträge)	1.6.1.1
		19.02.2018	
Interaktionspartner		<i>SwissProt</i> (42.271 Einträge)	
LN18-CAPG/-CAPG C282S/ -CAPG C290S-GFP	1.6.3.4	GFP-fasta fasta-Datei der Cysteinmutanten von CAPG	1.6.2.3

Für die markierungsfreie Quantifizierung wurde der Modus *match between runs* verwendet. Für die Analyse des A172-Proteoms und des A172-Redox-Proteoms wurden folgende Suchparameter zusätzlich verwendet: variable Modifikationen an der Aminosäure Cystein: Carbamidomethyl (IAM) (m/z = 57,021) und NEM (m/z = 125,048).

Für die markierungsbasierte Studie mit IAM/IAM-D4 und die Interaktionsstudie (LN18-CAPG/-CAPG C282S/-CAPG C290S-GFP) wurde neben IAM als variable Modifikation am Cystein noch IAM-D4 (m/z = 61,047) berücksichtigt. Zusätzlich wurde die max. Peptidlänge auf 35 hochgesetzt.

### **3.2.6.2 Quantitative Auswertung der massenspektrometriebasierten Daten**

Die weiterreichende Datenanalyse nach der *MaxQuant*-Suche erfolgte mittels *Perseus* Software (Tabelle 19). Dafür wurden zunächst die erhaltenen Informationen aus der *MaxQuant*-Suche eingeladen, die Proben nach ihrer Zugehörigkeit gruppiert und die Proteinliste nach den folgenden Gütekriterien gefiltert: Identifizierung *by site*, *reverse*-Einträge, potenzielle Kontaminanten anhand der *MaxQuant* Kontaminantenliste und mindestens zwei identifizierte Peptide. Anschließend wurden alle Proteine rausgefiltert, die

nicht in mindestens einer Gruppe in allen Replikaten identifiziert worden sind. Im Anschluss wurde von den LFQ-Intensitäten der Logarithmus zur Basis 2 gebildet. Vor der statistischen Analyse wurden die jetzt noch fehlenden Werte basierend auf den Werten der Normalverteilung ( $width = 0,3$ ;  $down\ shift = 1,8$ ) imputiert (Cox *et al.*, 2014). Es wurde eine *significance analysis of microarrays* (SAM) auf Basis eines zweiseitigen T-Tests durchgeführt (FDR = 0,05;  $S_0 = 0,1$ ). Die Differenz ist definiert als: 
$$\frac{\sum_{n=1}^n \log_2 A_n}{n_A} - \frac{\sum_{n=1}^n \log_2 B_n}{n_B}$$
.

### 3.2.6.3 Quantitative Auswertung der PRM-Daten

Für die Identifizierung und Quantifizierung von Peptiden und Proteinen aus den PRM-Experimenten wurde ebenfalls die *MaxQuant* Software verwendet. Die weiterführende Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Software *Skyline-daily* (MacLean *et al.*, 2010). Die Quantifizierung erfolgte auf  $MS^2$ -Ebene.

### 3.2.6.4 Anreicherungsanalysen

Für die Erstellung von Proteinnetzwerken und die Annotation von Proteinen nach Ontologiebegriffen wurde die Software *STRING* (Version 11.0) verwendet (Snel *et al.*, 2000), um so Informationen über mögliche überrepräsentative biologische Prozesse in den jeweiligen Datensätzen zu erhalten. Dargestellt sind Protein-Protein-Interaktionen, die auf experimentellen Daten basieren oder aus kurierten Datenbanken stammen.

### 3.2.6.5 VENN-Analyse

Für die vergleichende Darstellung der quantifizierten Daten in VENN-Diagrammen wurde die Software *FunRich* (Pathan *et al.*, 2015) verwendet.

### 3.2.6.6 Quantifizierung der freien Fläche in den *Scratch Assay*

Für die Quantifizierung der noch nicht zu gewachsenen Fläche nach dem Zufügen einer Wunde, wurde die freie Fläche mit Hilfe der Software *ImageJ* ermittelt. Hierbei wurde für jede Zelllinie und jeden Zeitpunkt eine Stichprobenanzahl von 3 ausgewertet. Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichung, sowie die graphische Darstellung erfolgte mit *Excel 2010* (Microsoft). Die statistische Auswertung erfolgte über einen zweiseitig gepaarten studentischen T-Test. Der Signifikanzwert (p-Wert) ist in den Abbildungen mit Sternen (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) dargestellt.

### 3.2.6.7 Statistische Auswertung des Aktinpolymerisationsassays

Die Auswertung der Daten aus dem Aktinpolymerisationsversuch erfolgte in der R-Umgebung (Version 3.6.0 R Core Team (2019); R: *A language and environment for statistical computing*, R Foundation for Statistical Computing) unter Verwendung der Pakete “MASS” und “growthcurver”. Bei der funktionellen Untersuchung der kanonischen Funktion

von CAPG in Abhängigkeit der Cysteinmutanten wurden sechs der sieben Gruppen mit einem n von 5 analysiert. Für die CAPG-His C178S-Mutante wurde ein n von 4 für die statistische Datenauswertung verwendet, weil eine Messung als Ausreißer gewertet wurde. Bei der Untersuchung des Einflusses von Wasserstoffperoxid auf die kanonische Funktion von CAPG wurden fünf Gruppen mit einem n von 4 analysiert. Dafür wurden zuerst die gemessenen Hintergrundintensitäten berücksichtigt. Durch eine robuste lineare Regression (Funktion „*rlm*“ der logarithmierten Intensitäten der Hintergrundproben) wurde der mittlere Hintergrund pro Zeitpunkt berechnet, der dann von den weiteren gemessenen Intensitäten abgezogen wurde. Kennwerte für die erhaltenen Wachstumskurven wurden dann mit der Funktion „*SummarizeGrowth*“ für die jeweiligen Einzelproben kalkuliert. Die erhaltenen Kennwerte wurden gruppiert und mittels Varianzanalyse und nachfolgenden Post-Hoc-Test nach Tukey auf Unterschiede zwischen den Gruppen untersucht.

### 3.2.6.8 Statistische Auswertung immunhistochemischer Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden basierend auf einem Färbeindex, dem sogenannten Immunreaktiv-Score (engl.: *immunoreactive score*, (IRS) (Fedchenko und Reifenrath, 2014; Remmele, 1987), semiquantitativ ausgewertet. Der Immunreaktiv-Score (IRS) gibt einen Bereich von 0 bis 12 als Produkt der Multiplikation zwischen dem Prozentsatz positiver Zellen (0-4) und der Intensität der Färbung (0-3) an (Tabelle 20).

Tabelle 20: Zusammensetzung des IRS.

A (Prozentsatz positiver Zellen)	B (Intensität der Färbung)	IRS (A*B)
0 = keine positiven Zellen	0 = keine Färbung	0-1 = negative
1 = weniger als 10 % an positiven Zellen	1 = milde Färbung	2-3 = mild
2 = 10-50 % an positiven Zellen	2 = moderate Färbung	4-8 = moderat
3 = 51-80 % an positiven Zellen	3 = starke Färbung	9-12 = stark
4 = mehr als 81% an positiven Zellen	<b>Finaler IRS (A*B): 0-12</b>	

Die Auswertung erfolgte zunächst blind, ohne vorherige Kenntnis der Patientendaten (Tabelle 11).

### 3.2.6.9 Statistische Auswertung

Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie die graphische Darstellung erfolgte mit *Excel 2010* (Microsoft). Signifikanzen wurden durch einen zweiseitig gepaarten studentischen T-Test ermittelt. Die Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) mit anschließendem multiplen Vergleichstest nach Tukey erfolgte mittels R/RStudio anhand

eines R-Skriptes (MPL). Der Signifikanzwert (p-Wert) ist in den Abbildungen mit Sternen (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) dargestellt.

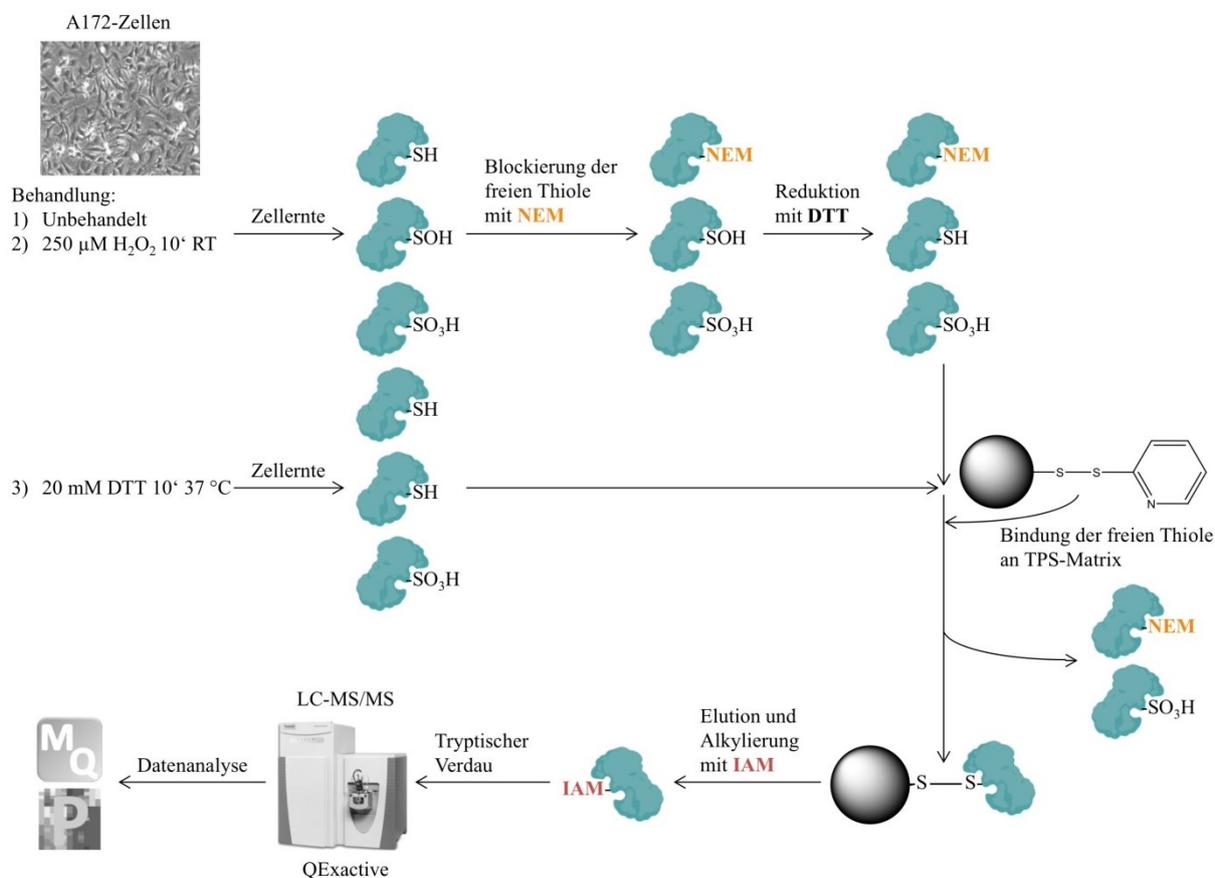
## 4 Ergebnisse

Verschiedene Studien zeigen, dass das Aktin-Capping-Protein CAPG mit verschiedenen klinisch pathologischen Merkmalen von Tumorzellen, wie der Migration, der Invasivität und der Metastasierung, assoziiert ist (Renz *et al.*, 2008; Van Impe *et al.*, 2013). In humanen Gliomen und vor allem Glioblastomen ist der mRNA- und Proteinspiegel von CAPG signifikant erhöht (Xing und Zeng, 2016). Eine höhere CAPG-Expression kann als unabhängiger Faktor zur Vorhersage einer ungünstigen Prognose dienen (Yun *et al.*, 2018). In einer Proteomstudie, in welcher der Einfluss von Peroxiredoxin 1 auf die Chemoresistenz von A172-Glioblastomzellen untersucht wurde, gab es erste Hinweise darauf, dass es sich bei CAPG um ein redox-sensitives Protein handelt (Poschmann *et al.*, 2015). In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, ob es sich bei CAPG tatsächlich um ein redox-sensitives Protein handelt und welche Auswirkungen der Redoxstatus von CAPG auf humane Glioblastomzelllinien hat. Dafür wurden zwei verschiedene Glioblastomzelllinien als Modellsystem verwendet und deren Redoxzustand manipuliert. Zur Validierung und um einen ersten Hinweis zu bekommen, ob es sich bei CAPG tatsächlich um ein redox-sensitives Protein handelt, wurde das Redox-Proteom global analysiert. Im nächsten Schritt wurden die Cysteine von CAPG, die sensitiv für die Oxidation sind, positionsgenau nachgewiesen. Abschließend wurden die möglichen Konsequenzen dieser Redoxregulation in funktionellen Studien und die CAPG-Abundanz in humanen Gewebeproben untersucht.

### 4.1 Differenzielle Analyse von reversibel redox-sensitiven Cysteinresten im Proteom von A172-Zellen

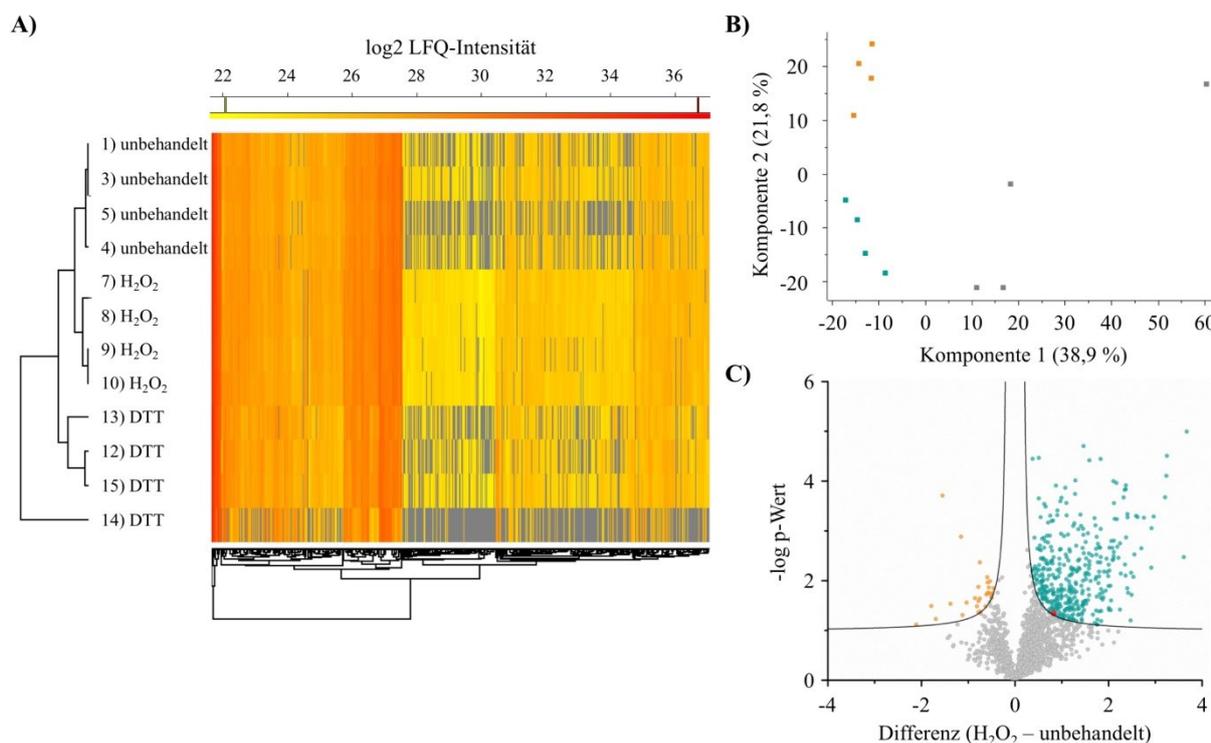
Die Reihe diverser oxidativer Cysteinmodifikationen (oxPTM) und deren Reversibilität unterstreicht ihre Rolle für die Proteinfunktion und macht die Untersuchung von Zellsignalwegen, bei denen Cysteinreste oxidiert werden, zu einem sehr interessanten Forschungsgebiet. Um herauszufinden, ob es in Folge der Behandlung von entsprechenden Zellmodellen mit Wasserstoffperoxid zu reversiblen Oxidationen an Proteinen kommt, hat sich die Anreicherung von reversiblen Cysteinmodifikationen über eine Thiopropyl Sepharose Matrix (TPS-Matrix) anhand des modifizierten Protokolls nach Guo (Guo *et al.*, 2014) und deren Analyse mittels differenzieller, markierungsfreier Proteomanalyse via LC-MS/MS als effektive Methode herausgestellt. Insbesondere die Informationen aus der Massenspektrometrie ergeben erste Hinweise über die für die Oxidation sensitiven Cysteine, die als redox-sensitiv identifizierten Proteine, im Redox-Proteom der A172-Zellen nach Wasserstoffperoxidbehandlung. Die mit DTT-behandelten Proben dienten als Reduktionskontrolle und diese Studie wird im Folgenden als A172-Redox-Proteom

bezeichnet. Mit diesem globalen Ansatz lässt sich das Modellsystem validieren und die Anfangshypothese mit einem globaleren *Readout* reproduzieren. Der Ablauf der Probenaufarbeitung ist schematisch in Abbildung 8 gezeigt.



**Abbildung 8 Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung für die differenzielle Analyse von redox-sensitiven Proteinen aus humanen A172-Zellen.** A172-Zellen wurden mit 250 µM Wasserstoffperoxid für 10 Minuten bei RT und als Kontrolle mit 20 mM DTT für 10 Minuten bei 37 °C behandelt. Zusätzlich wurden nicht behandelte A172-Zellen analysiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Lysepuffer, der optional N-Ethylmaleimid (NEM) enthielt, mittels TCA-Fällung geerntet. So wurden im ersten Schritt die freien Thiole blockiert. Im nächsten Schritt erfolgte durch DTT-Zugabe die Reduktion von reversiblen Cysteinmodifikationen. Hier am Beispiel einer Sulfensäure (-SOH) gezeigt. Die neu frei gewordenen Thiole konnten im folgenden Schritt an die TPS-Matrix binden. Nach der Elution wurden die Proteine tryptisch verdaut und die freien Thiole anschließend mit Iodoacetamid (IAM) alkyliert. Das Peptidgemisch wurde über LC-MS/MS analysiert und die Quantifizierung erfolgte markierungsfrei anhand der Signalintensitäten mit MaxQuant und Perseus. [SH = freies Thiol; SOH = Sulfensäure, als Beispiel für eine reversible Oxidation am Cystein; SO<sub>3</sub>H = Sulfonsäure, als Beispiel für eine irreversible Oxidation am Cystein]

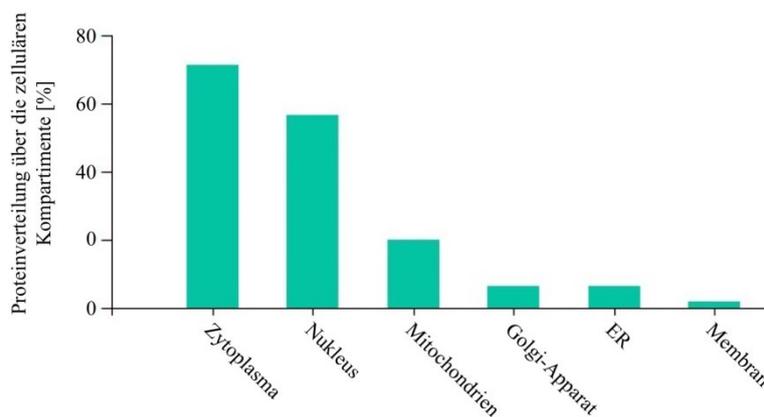
Mit dem gewählten Versuchsansatz konnten von den 4089 identifizierten Proteinen 3229 Proteine quantifiziert werden. Um eine höhere Stringenz zu erreichen, wurde noch ein weiterer Filterschritt angewandt (4 valide Werte in mindestens einer Gruppe bei einem n = 4). Das resultierte in 1763 Proteinen, die in die differenzielle Analyse eingingen. Zum Hervorheben potenzieller Unterschiede in der Proteinexpression wurde ein hierarchisches Cluster der quantifizierten Proteine erstellt.



**Abbildung 9: Differenzielle Analyse von reversiblen oxidativen Cysteinmodifikationen im Proteom von A172-Zellen nach Wasserstoffperoxidbehandlung.** A172-Zellen im unbehandelten Zustand (unbehandelt), für 10 Minuten bei RT mit 250  $\mu$ M Wasserstoffperoxid- ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und für 10 Minuten bei 37  $^\circ\text{C}$  mit 20 mM DTT-behandelte A172-Zellen wurden nach dem Protokoll zur Probenvorbereitung für die globale Analyse von reversiblen Cysteinmodifikationen aufgearbeitet ( $n = 4$ ). In **A**) ist das hierarchische, euklidische Cluster für die 1763 quantifizierten Proteine und in **B**) das Ergebnis der Komponentenanalyse dargestellt. Die Proteine gruppieren entsprechend der jeweiligen Gruppe in Abhängigkeit von der Behandlung (unbehandelt = Orange;  $\text{H}_2\text{O}_2$  = Grün; DTT = Grau). In **C**) ist ein *Volcano*-Plot basierend auf den Vorläuferionenintensitäten für die unbehandelten und mit Wasserstoffperoxid-behandelten A172-Zellen gezeigt (FDR = 0,05;  $S_0 = 0,1$ ). In Grün sind die Proteine dargestellt, die eine erhöhte Abundanz infolge der Wasserstoffperoxidbehandlung zeigen und in Orange die, die im Vergleich eine erhöhte Proteinabundanz in den unbehandelten Proben aufwiesen. In Rot ist CAPG hervorgehoben.

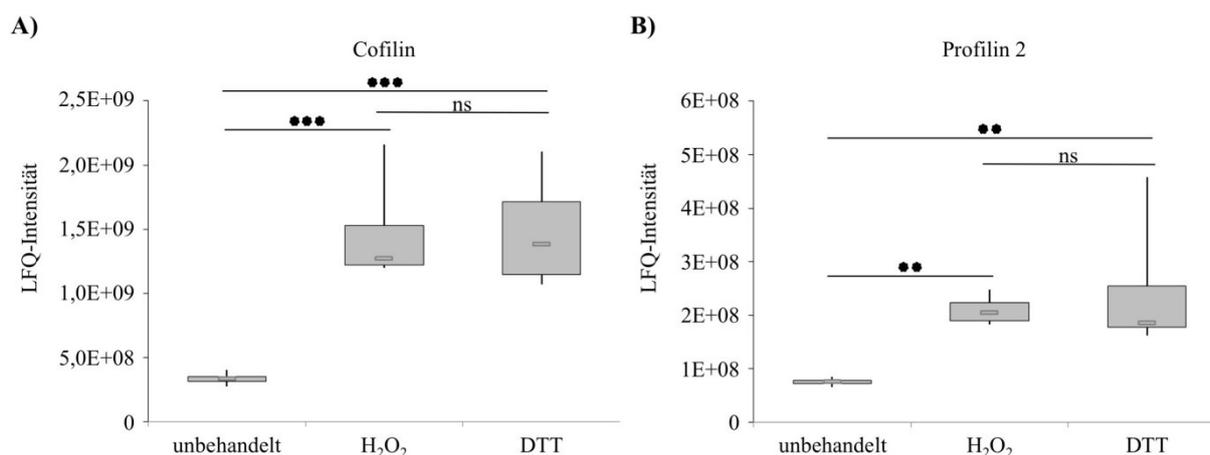
Die hierarchische Cluster- und Komponentenanalyse zeigte, dass sich die drei Behandlungszustände voneinander abgrenzen und dass die 10-minütige Behandlung mit Wasserstoffperoxid bereits einen Einfluss auf das Redox-Proteom der A172-Zellen hat. Die Signifikanzanalyse auf T-Test-Basis der analysierten Proben zeigte, dass 382 Proteine nach Wasserstoffperoxidbehandlung (Anhang Tabelle 25) und 29 Proteine (Anhang Tabelle 26) in den unbehandelten Proben eine signifikant erhöhte Proteinabundanz nach spezifischer Aufarbeitung und Anreicherung über die TPS-Matrix aufwiesen. Nach der selektiven Anreicherung über die TPS-Matrix spricht eine erhöhte Proteinabundanz dafür, dass die 382 Proteine reversibel oxidierbare Cysteinreste aufwiesen und es sich somit um redox-sensitive Proteine handelt.

Des Weiteren zeigte eine Annotation entsprechend der Proteinlokalisierung in der Zelle, dass die identifizierten 382 redox-sensitiven Proteine über viele zelluläre Kompartimente verteilt sind (Abbildung 10).



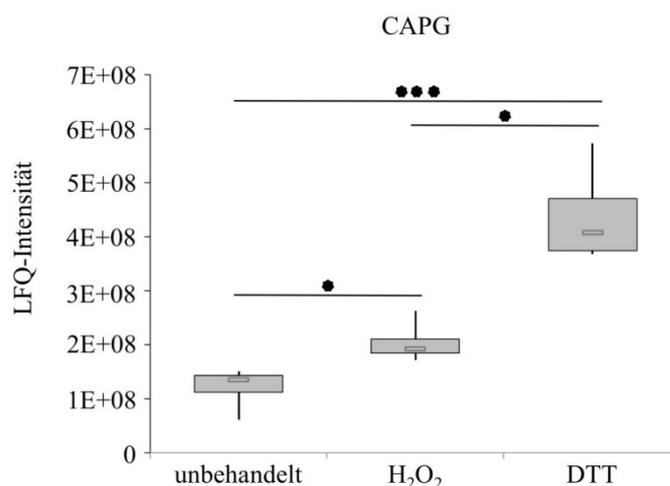
**Abbildung 10: Proteinverteilung über die zellulären Kompartimente, der 382 quantifizierten Proteine, die eine höhere Proteinabundanz nach Wasserstoffperoxidbehandlung gezeigt haben.** Das Balkendiagramm zeigt zu welchem Anteil die Proteine den unterschiedlichen Kompartimenten zugeordnet werden können (Mehrfachnennung möglich). Die meisten Proteine sind mit 71,24 % im Zytoplasma lokalisiert, gefolgt vom Nukleus mit 56,45 %.

Eine genauere Betrachtung der nach Wasserstoffperoxidbehandlung identifizierten Proteine zeigte, dass u.a. auch die bereits in der Literatur beschriebenen redox-sensitiven Proteine, wie Thioredoxin (TXN) (p-Wert = 0,0177) oder ebenso die redox-sensitiven aktinbindenden Proteine Cofilin (p-Wert = 0,00006) und Profilin 2 (p-Wert = 0,00219) (Abbildung 11; Anhang Tabelle 25) zu den 382 nach Wasserstoffperoxidbehandlung redox-sensitiven Proteinen zählten. Für Cofilin und Profilin 2 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Wasserstoffperoxid- und DTT-behandelten Proben nachgewiesen werden. Dies könnte dafürsprechen, dass alle Cysteine, dieser beiden Proteine, vor der Aufarbeitung reversibel oxidiert vorlagen.



**Abbildung 11: Quantifizierung zweier bekannter redox-sensitiver aktinbindender Proteine in den unbehandelten, mit Wasserstoffperoxid- und DTT-behandelten Proben.** In **A)** ist ein Box-Plot der LFQ-Intensitäten für das Protein Cofilin dargestellt. Cofilin zeigte eine signifikant höhere Proteinabundanz in den Wasserstoffperoxid- ( $H_2O_2$ ) und den mit DTT-behandelten Proben im Vergleich zu den unbehandelten Proben. **B)** zeigt den Box-Plot der LFQ-Intensitäten für das Protein Profilin 2, das ebenfalls zu den ABP gehört und eine signifikant höhere Proteinabundanz in den Wasserstoffperoxid- und mit DTT-behandelten Proben im Vergleich zu den unbehandelten Proben zeigte. 50 % der Werte befinden sich innerhalb der Box, die *Whiskers* geben das Minimum und Maximum der erhaltenen Signalintensitäten an. Der Median wird durch  $\square$  repräsentiert und eine Varianzanalyse (ANOVA) wurde durchgeführt. [ns = nicht signifikant; \*\* kennzeichnen einen p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\* kennzeichnen einen p-Wert  $\leq 0,001$ ]

Darüber hinaus konnte im Vergleich zu den unbehandelten Proben eine signifikant veränderte Proteinabundanz für CAPG nach Wasserstoffperoxid- (p-Wert = 0,0475) und DTT-Behandlung (p-Wert = 0,0003) sowie Bindung an die TPS-Matrix gezeigt werden (Abbildung 12). Dies spricht dafür, dass CAPG reversibel oxidierbare Cysteine enthält und es sich somit um ein redox-sensitives Protein handelt. Der signifikante Unterschied zwischen den mit Wasserstoffperoxid- und DTT-behandelten Proben zeigt, dass nur ein Teil der im CAPG enthaltenen Cysteine reversibel oxidiert vorliegt. Wenn alle Cysteine eines Proteins reversibel oxidiert vorlägen, gäbe es keinen Unterschied zur Reduktionskontrolle.



**Abbildung 12: Quantifizierung des Proteins CAPG in den unbehandelten, mit Wasserstoffperoxid- und DTT-behandelten TPS-Proben.** Dargestellt ist der Box-Plot der LFQ-Intensität für CAPG. CAPG zeigte eine signifikant höhere Proteinabundanz in den mit Wasserstoffperoxid- und DTT-behandelten Proben im Vergleich zu den unbehandelten Proben. 50 % der Werte befinden sich innerhalb der Box, die *Whiskers* geben das Minimum und Maximum der erhaltenen Signalintensitäten an. Der Median wird durch □ repräsentiert und eine Varianzanalyse (ANOVA) wurde durchgeführt. [\* kennzeichnet einen p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\*\* kennzeichnen einen p-Wert  $\leq 0,001$ ]

Allerdings wurden nicht alle Cystein-enthaltenen Peptide von CAPG in der A172-Redox-Proteom-Studie gefunden. Deshalb wurden für die folgenden Versuche CAPG überexprimierende Zellenlinien verwendet und weitere methodische Ansätze verfolgt, um CAPG, als redox-sensitives Protein zu verifizieren.

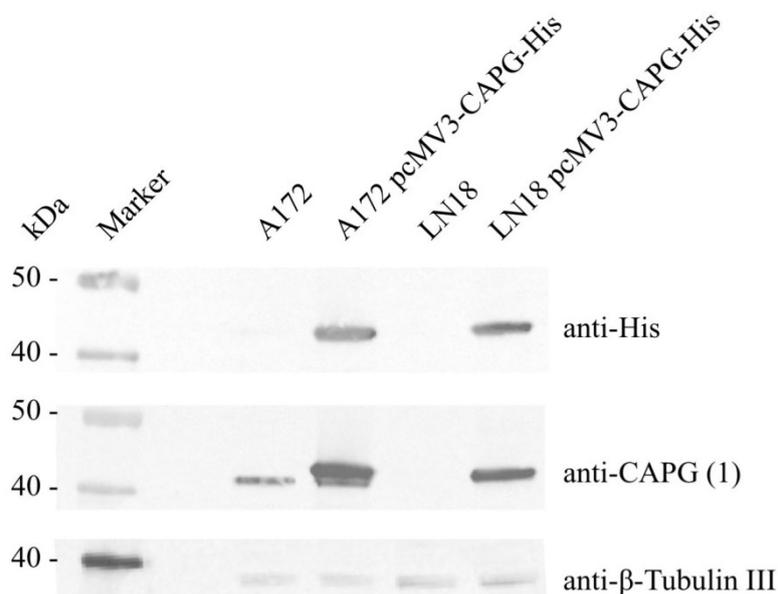
Mit diesem Ansatz konnte das etablierte Modellsystem erfolgreich validiert werden. Da die Ergebnisse zeigten, dass die Behandlung mit Wasserstoffperoxid zur reversiblen Oxidation von Cysteinresten führte und einen Einfluss auf das A172-Redox-Proteom hatte.

## 4.2 Stabile Überexpression von CAPG in humanen Zelllinien

Die vorangegangenen Experimente konnten zeigen, dass eine Anreicherung von CAPG zwingend erforderlich ist, um oxidative posttranslationale Modifikationen am Protein nachweisen zu können. Um eine größere Proteinmenge für die folgenden Experimente zu erhalten, wurde ein Konstrukt zur Überexpression von CAPG (pcMV3-CAPG-His) in zwei

humane Glioblastomzelllinien (A172 und LN18) transfiziert. Die auf dem Expressionsvektor kodierte Hygromycin B-Resistenz eignete sich für die Selektion stabil *CAPG*-überexprimierender Zellen. Die Vektorkarte des Konstruktes ist im Anhang (Anhang Abbildung 54) dargestellt.

Um die stabile Expression des Zielproteins zu überprüfen, wurden die jeweiligen Zellen mechanisch aufgeschlossen und nach Auftrennung über ein Gel immunologisch mit einem gegen *CAPG* gerichteten Antikörper, sowie mit einem gegen den fusionierten c-terminalen *His-Tag* gerichteten Antikörper nachgewiesen (Abbildung 13). Wodurch das exogene vom endogenen *CAPG* unterschieden werden konnte.



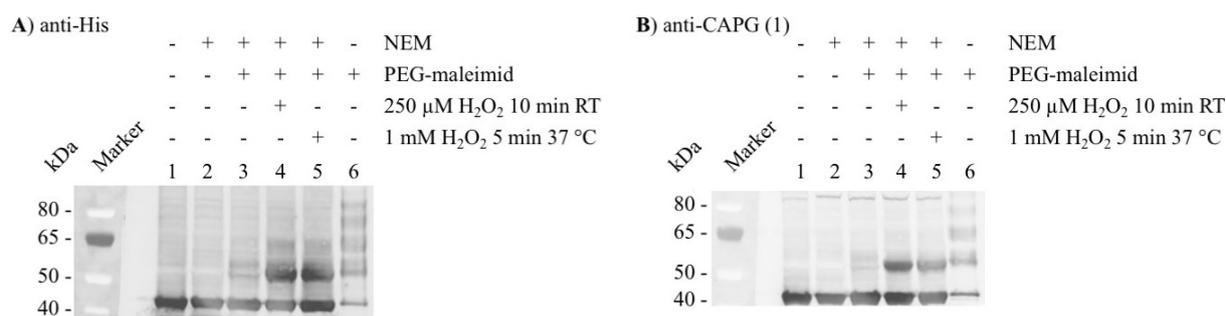
**Abbildung 13: Western Blots zur Überprüfung der stabilen Expression von CAPG-His in A172- und LN18-Zellen.** Nach mechanischem Aufschluss in Lysepuffer wurden je 5 µg der jeweiligen Probe auf das Gel aufgetragen. Die Proteine wurden über eine 4-12 %-ige Bis-Tris SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen analysiert und das stabil in die Zelllinien eingebrachte humane Protein CAPG-His mit einem gegen den *His-Tag* gerichteten Antikörper und die Gesamtmenge an *CAPG* mit dem anti-CAPG (1)-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente β-Tubulin III.

Mittels immunologischer Detektion des *His-Tags* konnte eine Bande bei ca. 40 kDa in beiden *CAPG*-His stabil überexprimierenden humanen Zelllinien nachgewiesen werden, deren Laufhöhe in etwa dem Molekulargewicht von *CAPG* (38,5 kDa) entspricht (Abbildung 13) und das exogene *CAPG* widerspiegelt. Durch Verwendung des gegen *CAPG* gerichteten Antikörpers sollte in den nicht transfizierten Zellen die endogene *CAPG*-Menge veranschaulicht werden und in den *CAPG*-His überexprimierenden Zellen die Gesamtmenge des Proteins. In den A172-, A172-*CAPG*-His- und LN18-*CAPG*-His-Zellen konnte eine Bande in Laufhöhe von *CAPG* nachgewiesen werden. Wohingegen in den LN18-Zellen keine Bande in derselben Höhe zu erkennen war. Die Ladekontrolle zeigte jedoch, dass von allen Proben vergleichbare Mengen aufgetragen worden sind (Abbildung 13).

Um sicher zu gehen, dass dennoch genug Protein vorhanden war, wurden in parallelen Gelen die Banden in Höhe des apparenten Molekulargewichts von CAPG ausgeschnitten, mittels LC-MS/MS analysiert und das humane Protein CAPG in beiden CAPG überexprimierenden humanen Zelllinien nachgewiesen. Zudem wurden alle Cysteine-enthaltenden Peptide identifiziert, was ohne jede Form von Anreicherung nicht der Fall war. Im Folgenden werden die stabilen Zelllinien als A172-CAPG-His und als LN18-CAPG-His bezeichnet.

### 4.3 Ermittlung der Cysteinanzahl von CAPG, die sensitiv für die Oxidation sind, mittels PEG-Switch

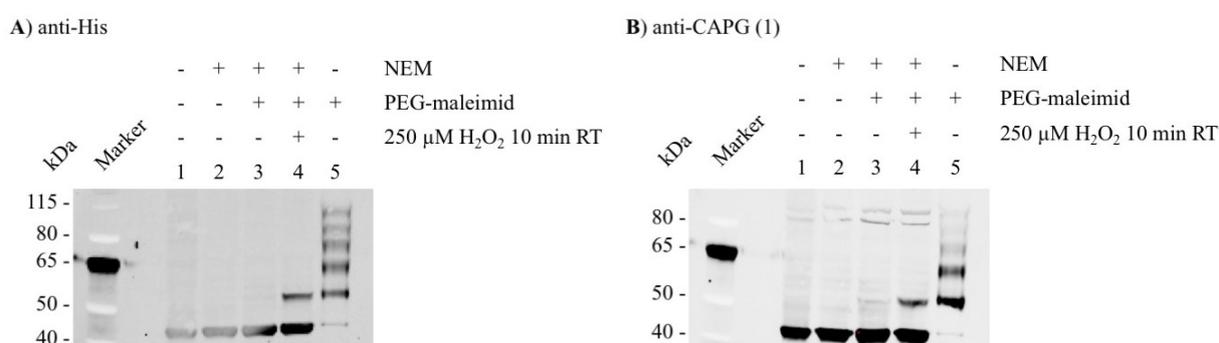
In der durchgeführten A172-Redox-Proteomstudie wurde CAPG als potenzielles redox-sensitives Protein identifiziert, wobei jedoch nicht alle Cystein-enthaltenden Peptide von CAPG gefunden wurden. Als Resultat musste die Proteinmenge unabdingbar erhöht werden, um die Anzahl der für die Oxidation sensitiven Cysteine von CAPG zu bestimmen. Deshalb wurden für die folgenden Versuche die CAPG stabil überexprimierenden Zelllinien verwendet. Um als nächstes zu überprüfen, ob die stabil transfizierten Zelllinien auf dieselbe Veränderung in der Proteinabundanz hindeuten und es sich bei CAPG tatsächlich um ein redox-sensitives Protein handelt, wurde im Rahmen dieser Arbeit das PEG-Switch Protokoll nach Burgoyne *et al.* etabliert. Dabei können gezielt reversible Oxidationen eines Zielproteins als Molekulargewichtsverschiebung durch Verwendung eines polyethylenglykolbasierten Alkylanz mittels Western Blot Analyse detektiert werden. Durch die bekannte Masse des PEG-Tags kann letztendlich eine Aussage über die Anzahl der reversibel modifizierten Cysteinreste des Zielproteins getroffen werden.



**Abbildung 14: Western Blot Analyse zur indirekten Untersuchung der reversiblen oxPTM von CAPG in A172-CAPG-His-Zellysaten mittels PEG-Switch.** Nach der Aufarbeitung nach dem PEG-Switch Protokoll wurden je 30  $\mu$ g der jeweiligen Probe auf ein Gel aufgetragen. Die Proteine wurden in einer 4-12 %-igen Bis-Tris SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen analysiert und das humane Protein CAPG in **A)** mit dem gegen den His-Tag gerichteten Antikörper und in **B)** mit dem anti-CAPG (1)-Antikörper in einer Western Blot Analyse nachgewiesen. [Spur 1) unmodifizierte Probe; Spur 2) Minimale Molekulargewichtsverschiebung; Spur 3) unbehandelte Probe; Spur 4) für 10 min bei RT mit 250  $\mu$ M Wasserstoffperoxid-behandelte Probe; Spur 5) für 5 min bei 37 °C mit 1 mM Wasserstoffperoxid-behandelte Probe; Spur 6) Maximale Molekulargewichtsverschiebung]

Die mittels PEG-*Switch Assay* detektierte Molekulargewichtsverschiebung von 10 kDa deutet daraufhin, dass zwei der fünf Cysteine von CAPG in den unbehandelten A172-CAPG-His-Zellen oxidiert vorliegen (Abbildung 14). In den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Zellen deuteten die Ergebnisse auf eine Zunahme der PEGylierten Form von CAPG. In Zellen, die mit TCEP reduziert worden sind und anschließend mit PEG-maleimid markiert, wurde ein Verlust der unmodifizierten Form von CAPG und eine Zunahme an möglichen PEGylierten Formen mit einem höheren Molekulargewicht beobachtet (Abbildung 14).

Um das Ergebnis zu verifizieren, wurde dasselbe Experiment in einer weiteren humanen CAPG überexprimierenden Glioblastomzelllinie (LN18-CAPG-His) durchgeführt.



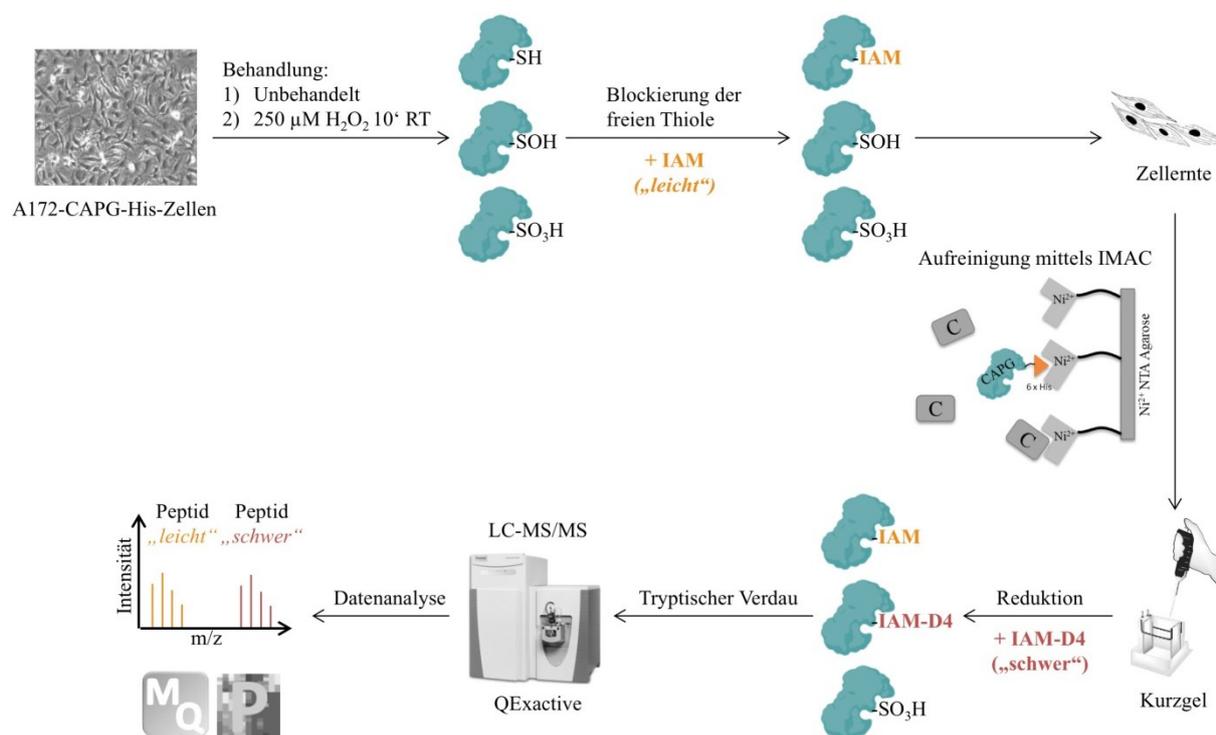
**Abbildung 15: Western Blot Analyse zur indirekten Untersuchung reversibler oxPTM von CAPG in LN18-CAPG-His-Zelllysaten mittels PEG-Switch.** Nach der Aufarbeitung nach dem PEG-*Switch* Protokoll wurden je 30  $\mu$ g der jeweiligen Probe auf ein Gel aufgetragen. Die Proteine wurden in einer 4-12 %-igen Bis-Tris SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen analysiert und das humane Protein CAPG in **A**) mit dem gegen den His-Tag gerichteten Antikörper und in **B**) mit dem anti-CAPG (1)-Antikörper in einer Western Blot Analyse nachgewiesen. [Spur 1) unmodifizierte Probe; Spur 2) Minimale Molekulargewichtsverschiebung; Spur 3) unbehandelte Probe; Spur 4) für 10 min bei RT mit 250  $\mu$ M Wasserstoffperoxid-behandelte Probe; Spur 5) Maximale Molekulargewichtsverschiebung]

Im Vergleich zu den A172-CAPG-His-Zellen war die 10 kDa Molekulargewichtsverschiebung in den unbehandelten LN18-CAPG-His-Zellen kaum zu erkennen (Abbildung 15). Die Ergebnisse deuteten jedoch ebenfalls auf eine Zunahme der PEGylierten Form von CAPG nach Wasserstoffperoxidbehandlung in den LN18-CAPG-His-Zellen hin. Ähnlich wie im vorherigen Experiment konnte in der maximalen Molekulargewichtsverschiebungsprobe ein Verlust der unmodifizierten Form von CAPG und eine Zunahme an möglichen PEGylierten Formen mit einem höheren Molekulargewicht beobachtet werden (Abbildung 15).

#### 4.4 Bestimmung des Anteils an oxidiertem CAPG in humanen A172-CAPG-His-Zellen

Mittels PEG-*Switch* konnte nachgewiesen werden, dass zwei der fünf Cysteine von CAPG reversibel oxidiert vorliegen. Um nun die reversibel oxidativ modifizierten Cysteine

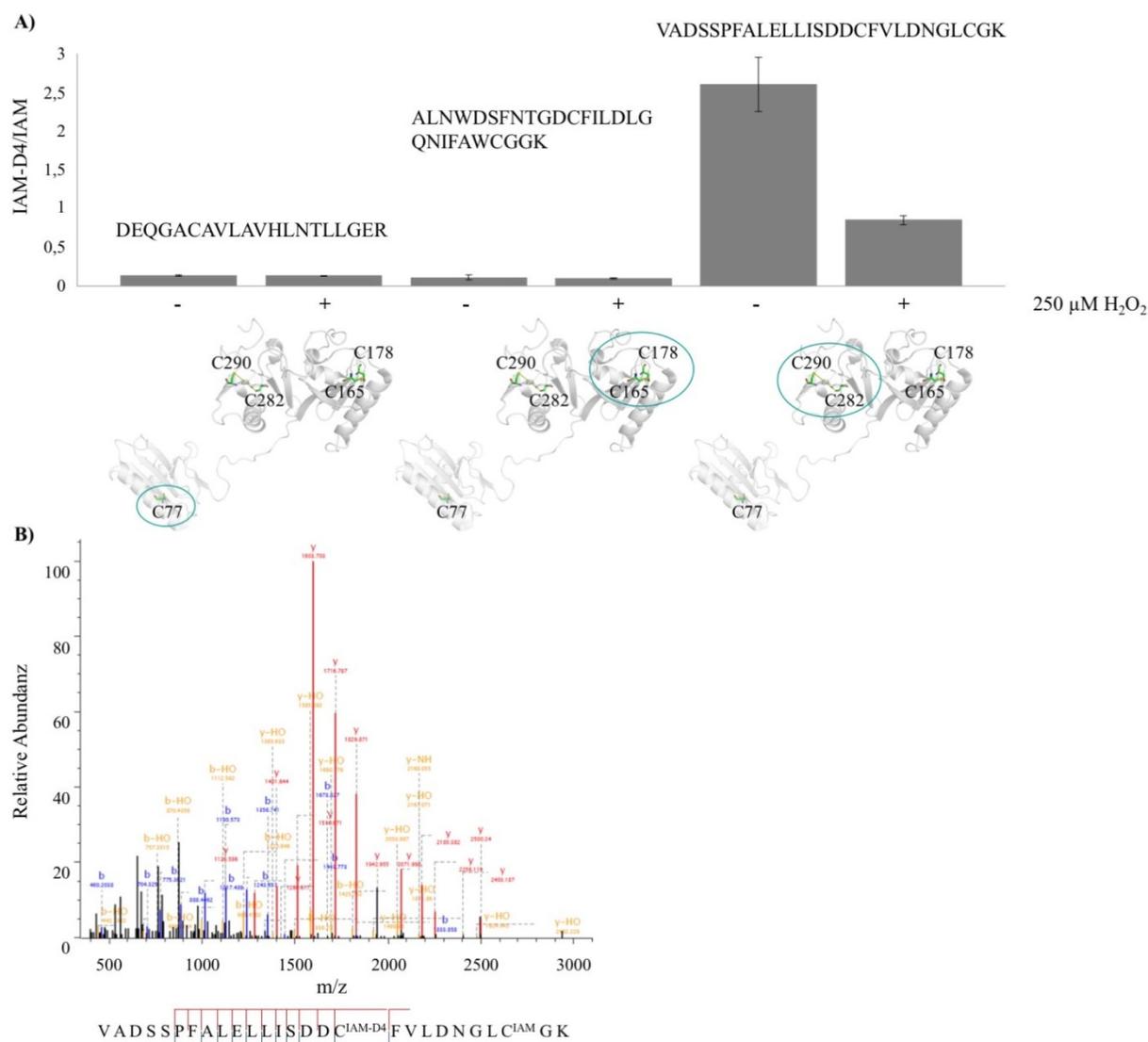
positionsgenau zu ermitteln und das genaue Verhältnis an modifizierten und unmodifizierten CAPG-Peptiden zu bestimmen, wurde ein differentielles Markierungsexperiment mit dem thiolreaktiven Reagenz IAM und einer isotonenmarkierten Variante von IAM, IAM-D4, durchgeführt. Werden mit IAM-D4 modifizierte Cysteine gefunden, so kann auf eine reversible oxidative Cysteinmodifikation an dieser Position zurückgeschlossen werden. Die Stöchiometrie kann aus dem Verhältnis ein und desselben Peptides mit IAM-D4 und IAM bestimmt werden. Ein Wert über eins spricht dafür, dass ein Großteil der Cysteine an dieser Position eine reversible oxidative posttranslationale Modifikation aufweist. Um die Proteinmenge des Zielproteins für die Analyse zusätzlich zu erhöhen, wurden CAPG überexprimierende A172-Zellen verwendet und CAPG affinitätschromatographisch aufgereinigt und mit der vorgestellten differentiellen Markierung gekoppelt. Für einen Vergleich wurden unbehandelte und mit Wasserstoffperoxid-behandelte A172-CAPG-His-Zellen mit diesem Ansatz mittels LC-MS/MS untersucht (n = 4). Der schematische Ablauf des durchgeführten Experiments ist in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung für die Aufreinigung von CAPG, mittels IMAC und Kopplung mit einer differentiellen Markierung, bis zur massenspektrometrischen Analyse und Datenauswertung.** Im ersten Schritt werden die freien Thiolgruppen mit IAM markiert und CAPG aus den aufgeschlossenen Zellen über den His-Tag mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Reduktion der reversibel oxidierten Cysteinreste erfolgt durch die DTT-Zugabe und die neu freigewordenen Thiole werden anschließend mit der isotonenmarkierten Variante von IAM, IAM-D4, markiert. Die Proteine werden tryptisch verdaut und über LC-MS/MS analysiert. Die Stöchiometrie kann für jedes detektierte Peptid aus dem Verhältnis von IAM-D4 zu IAM berechnet werden. [SH = freies Thiol; SOH = Sulfensäure, als Beispiel für eine reversible Oxidation am Cystein; SO<sub>3</sub>H = Sulfonsäure, als Beispiel für eine irreversible Oxidation am Cystein; IAM = Iodoacetamid; IAM D4 = isotonenmarkiertes Iodoacetamid]

Mit dem gewählten Versuchsansatz konnte für CAPG eine Sequenzabdeckung von 92 % erzielt und alle drei Cystein-enthaltenden Peptide nachgewiesen werden. Dabei wurden alle fünf Cysteine sowohl mit einer IAM-, als auch IAM-D4-Markierung identifiziert.

Für die Quantifizierung wurde im nächsten Schritt das Verhältnis von IAM-D4 zu IAM für das jeweilige CAPG-Peptid gebildet, um eine quantitative Aussage über den Oxidationszustand des jeweiligen Cysteins treffen zu können. Da es jeweils zwei CAPG-Peptide gibt in denen je gleich zwei der Cysteine liegen, gestaltete sich die Quantifizierung als schwierig, weil die Lokalisation der Markierung mit IAM oder IAM-D4 nicht in allen Fällen positionsgenau auf eines der Cysteine desselben Peptides zurückzuführen war, da der *Precursor* für beide dieselbe Masse aufweist. Dadurch muss beachtet werden, dass zwischen den Cysteinen C165 und C178, sowie C282 und C290 nicht unterschieden werden konnte. Die bestimmten Verhältnisse wurden in dem nachfolgenden Balkendiagramm dargestellt und die entsprechenden Cysteine in der CAPG-Sev-Struktur zur besseren Veranschaulichung eingezeichnet (Abbildung 17).



**Abbildung 17: A) Verhältnisse der Signalintensitäten von IAM-D4 und IAM markierten Cystein-enthaltenden CAPG-Peptiden in unbehandelten und mit Wasserstoffperoxid-behandelten A172-CAPG-His-Zellen.** Unterhalb der jeweiligen Balken sind die entsprechenden Cysteine in der CAPG-Sev-Struktur zur besseren Visualisierung in Grün eingezeichnet. In **B)** ist das MS-Spektrum des Peptides VADSSPFALELLISDDCFVLDNGLCGK dargestellt. Auf der x-Achse wurde  $m/z$  gegen die relative Abundanz (y-Achse) aufgetragen. In Rot ist die y Ionenserie dargestellt und in Blau die b-Ionenserie. Unterhalb des Spektrums ist die entsprechende Peptidsequenz dargestellt und die gefundenen Modifikationen annotiert. [IAM = Iodoacetamid; IAM D4 = isotope markiertes Iodoacetamid]

Das berechnete Verhältnis von IAM-D4 zu IAM lag für die Cysteine C77, C165 und C178 sowohl in den unbehandelten, als auch in den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Proben unter eins, was für keine vorherige Oxidation an dieser Position spricht. Für die Cysteine C282 und C290 hingegen lag das Verhältnis von IAM-D4 zu IAM in den unbehandelten Proben über eins, was auf eine vorherige reversible Oxidation dieser Cysteinreste deutet. Im Vergleich zu den unbehandelten Proben lag das Verhältnis von IAM-D4 zu IAM in den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Proben unter eins, was in diesem Fall für eine Überoxidation in Folge der Wasserstoffperoxidbehandlung sprechen könnte. Zusätzlich wurden die beiden Cysteine C282 und C290 auch beide gleichzeitig mit IAM-D4-Markierung identifiziert. Das kalkulierte Verhältnis zeigte denselben Verlauf, wie wenn nur eines der beiden Cysteine mit IAM-D4-Markierung gefunden wird. Allerdings war dafür keine Spektrumsinformation verfügbar.

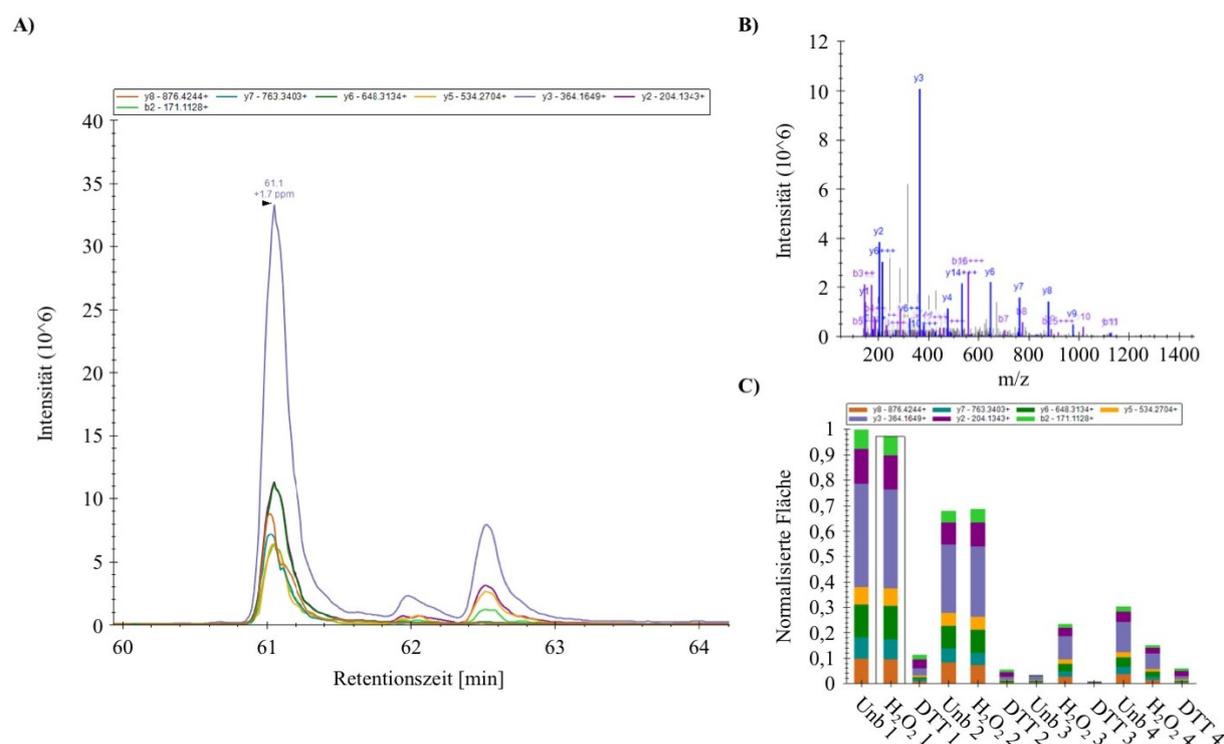
#### **4.5 Direkter positionsgenauer Nachweis von oxPTM von CAPG in humanen A172-CAPG-His-Zellen mittels PRM**

In Vorarbeiten habe ich keinen Hinweis auf eine Glutathionylierung oder Sulfenylierung der einzelnen Cysteine von CAPG gefunden (Schmidt, 2016). Dessen ungeachtet wurden in weiteren Experimenten oxidative Cysteinmodifikationen vereinzelt detektiert, jedoch nie in allen Replikaten eines Behandlungszustandes. Fehlende Intensitäten machten eine Quantifizierung unmöglich. Um einen besseren direkten Nachweis und eine bessere Quantifizierung von posttranslationale oxidative Cysteinmodifikationen zu ermöglichen, wurde ein massenspektrometriebasiertes zielgerichtetes (engl.: *parallel-reaction monitoring*, PRM) Experiment etabliert und gezielt nach einem intramolekularen Disulfid, sowie nach einer Zweifach- (Di-) und Dreifach-Oxidation (Trioxidation) an den beiden Cysteinen C282 und C290 gesucht, weil diese vereinzelt in Vorexperimenten detektiert wurden. Dafür wurden zunächst die freien Thiole mit IAM, wie bei dem differenziellen Markierungsexperiment, markiert. Im Anschluss erfolgte die affinitätschromatographische Aufreinigung von CAPG. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass eine ausreichend große Proteinmenge von CAPG zur Verfügung stand, um die Möglichkeit zu haben auch alle Cystein-enthaltenden Peptide, sowie substöchiometrisch vorhandene oxidative posttranslationale Modifikationen detektieren

zu können. Mittels SDS-PAGE wurden die Eluate im Sammelgel konzentriert und für die PRM-Analyse vorbereitet, wobei der Reduktions- und zweite Alkylierungsschritt entfiel, um mögliche oxPTM direkt identifizieren zu können. Die Proteinidentifizierung und -quantifizierung durch Datenbankabgleich und Intensitätsvergleich erfolgte auf Grundlage der MS<sup>2</sup>-Spektren mit der Software *Skyline*.

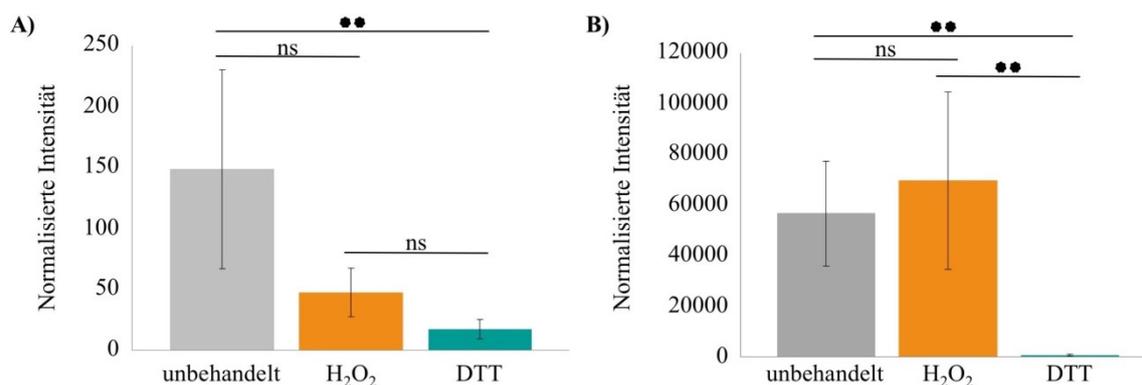
Mit diesem Versuchsansatz wurden die Cysteine, C282 und C290, des CAPG-Peptides VADSSPFALELLISDDCFVLDNGLCGK, sowohl beide IAM-markiert, als auch mit einer Trioxidation identifiziert.

In Abbildung 18 sind die einzelnen *Transitions*, die integrierten Flächen und ein Spektrum beispielhaft für das CAPG-Peptid VADSSPFALELLISDDCFVLDNGLCGK, das an den beiden Cysteinen, C282 und C290 mit IAM-Markierung gefunden wurde, dargestellt. Dieselbe Darstellung für das CAPG-Peptid mit nachgewiesener Trioxidation am Cystein C290 ist im Anhang gezeigt (Anhang Abbildung 61).



**Abbildung 18:** In **A)** ist exemplarisch ein *Transition*-Chromatogramm und in **B)** ein MS<sup>2</sup>-Spektrum für das CAPG-Peptid VADSSPFALELLISDDCFVLDNGLCGK, bei dem beide Cysteine mit IAM-Markierung identifiziert wurden, dargestellt. Das Balkendiagramm in **C)** zeigt die integrierten Flächen, die auf den maximalen Wert normalisiert wurden.

Die *Peaks* aller sieben *Transitions* für das CAPG-Peptid, das an den beiden Cysteinen, C282 und C290 mit IAM-Markierung identifiziert wurde, eluierten zur selben Zeit und die relative Ionenhäufigkeit war ebenfalls äußerst konsistent (Abbildung 18).

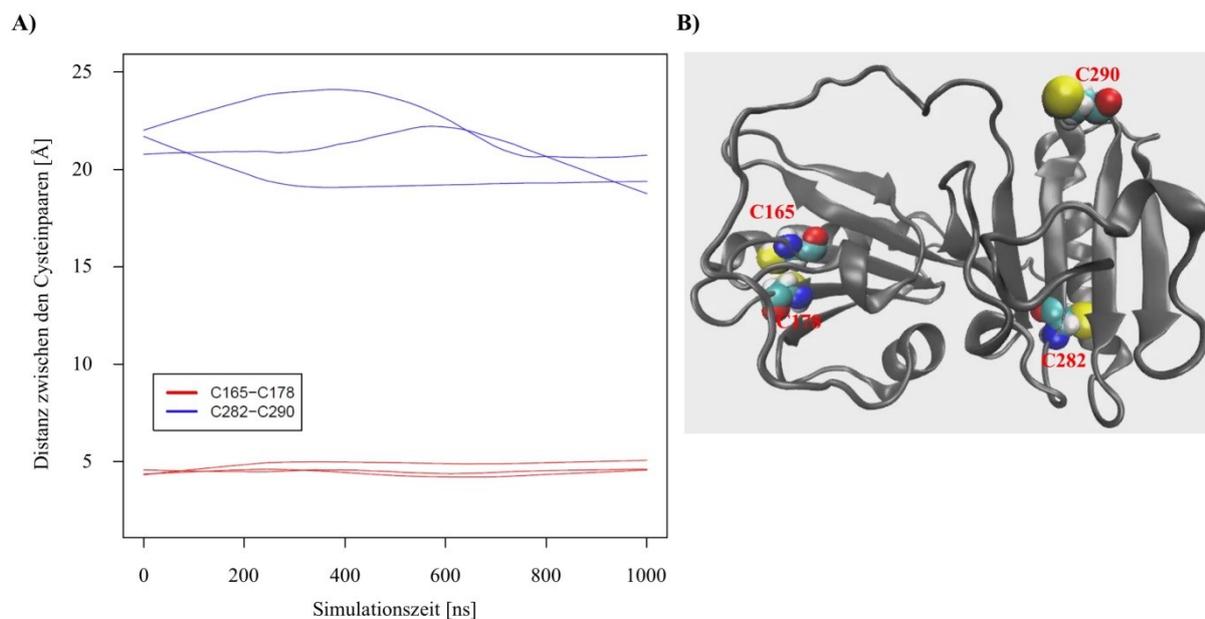


**Abbildung 19: Balkendiagramme der normalisierten Signalintensitäten für das CAPG-Peptid VADSSPFALELLISDDCFVLDNGLCGK in den unbehandelten, mit Wasserstoffperoxid- und DTT-behandelten PRM-Proben aus den A172-CAPG-His-Zellen.** Normalisiert wurde auf die Summe der Intensitäten der beiden CAPG-Peptide EGNPEEDLTADK und ANAQAAALYK. In **A)** sind die Intensitäten für die detektierte Trioxidation am Cystein C290 dargestellt. Im Vergleich zu der Reduktionskontrolle mit DTT wurde in den unbehandelten Proben signifikant mehr von der dreifach oxidierten Variante detektiert (p-Wert = 0,0063). In **B)** sind die Intensitäten für dasselbe Peptide gezeigt, bei dem jedoch beide Cysteine mit IAM markiert identifiziert wurden. [ns = nicht signifikant, \*\* kennzeichnen einen p-Wert von  $\leq 0,01$ ]

Die Quantifizierung zeigte, dass im Vergleich zu der Markierung mit IAM an beiden Cysteinen (C282 und C290) eine Trioxidation am Cystein C290 nur mit einer deutlich geringeren Intensität identifiziert werden konnte (Abbildung 19).

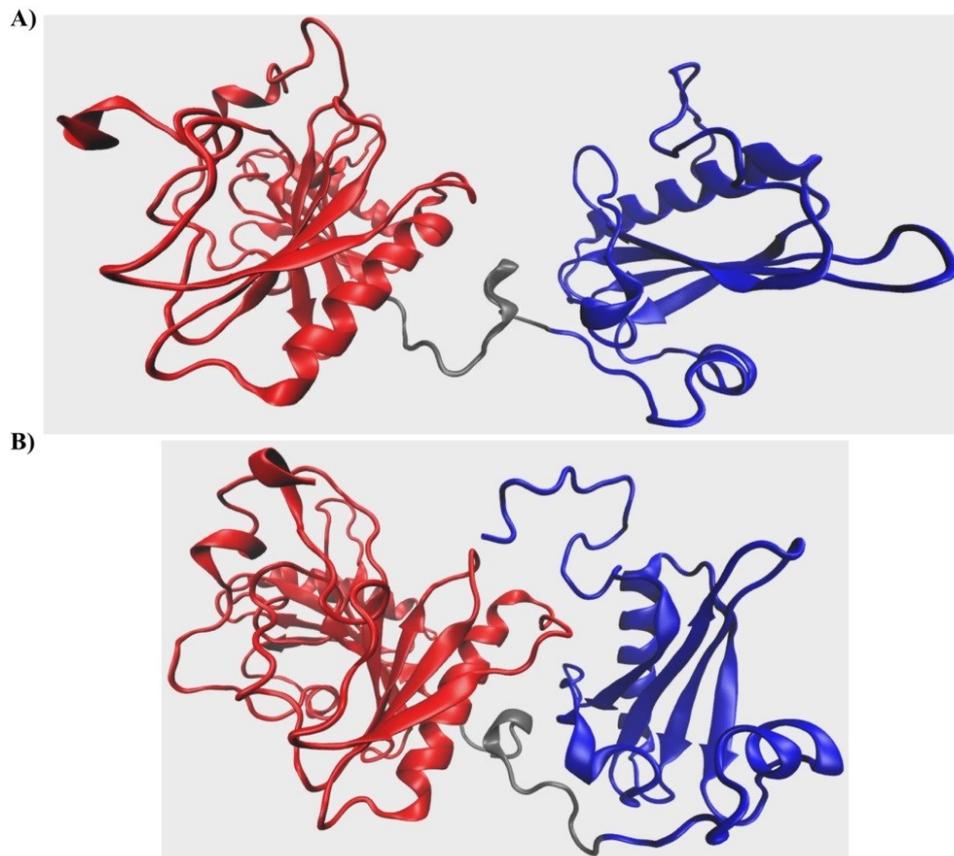
## 4.6 Molekulardynamik-Simulationen mit der Struktur der CAPG-Sev-Mutante

Im nächsten Schritt sollte die publizierte Struktur der CAPG-Sev-Mutante für Molekulardynamik-(MD)-Simulationen verwendet werden, um sich die Zugänglichkeit der identifizierten Oxidationsstellen von CAPG in der Struktur anzuschauen. Zudem konnten ebenfalls dynamische Veränderungen der Proteinstruktur über die Zeit nachvollzogen werden. Die MD-Simulationen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Markus Dick und Prof. Dr. Holger Gohlke (Institut für pharmazeutische und chemische Chemie, AG *Computational Pharmaceutical Chemistry*) durchgeführt. Für die Distanzmessungen über die Zeit zwischen den zwei Cysteinpaaren von CAPG, C165 und C178 sowie C282 und C290, wurde die Struktur der CAPG-Sev-Mutante ab der c-terminalen Domäne, beginnend bei G131, verwendet, um die Zeit für die durchgeführten Simulationen und die Datenmenge zu begrenzen. Unter den gewählten Bedingungen und unter der Annahme, dass die publizierte Struktur sich unter unterschiedlichen Bedingungen nicht verändert, war eine Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke nur zwischen dem Cysteinpaar, C165-C178, denkbar, da die Cysteine, C282 und C290, mit etwa 20 Å zu weit voneinander entfernt sind (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** In **A)** sind die Ergebnisse der Distanzmessung für die zwei Cysteinpaare, C165-C178 und C282-C290, von CAPG dargestellt ( $n = 3$ ). Auf der x-Achse wurde die Simulationszeit in ns gegen die Distanz zwischen den beiden Cysteinpaaren in Ångström (y-Achse) aufgetragen. In Rot ist die gemessene Distanz über die Zeit für das Cysteinpaar, C165-C178, dargestellt und in Blau für das Cysteinpaar, C282-C290. In **B)** ist die für die Distanzmessungen verwendete Struktur der CAPG-Sev-Mutante ab der c-terminalen Domäne (G131) als Bandmodell gezeigt und die vier Cysteine hervorgehoben.

Zudem konnte eine Aussage über die Lösungsmittelzugänglichkeit der Cysteine getroffen werden. C282 war beispielsweise schlechter lösungsmittelzugänglich, als die anderen Cysteine von CAPG. Darüber hinaus wurden die strukturellen Veränderungen über die Zeit für das gesamte Protein mit Hilfe von MD-Simulationen untersucht und zwei entscheidende Momentaufnahmen aus der Simulation in Abbildung 21 dargestellt.



**Abbildung 21: Zwei Momentaufnahmen aus der MD-Simulation für das vollständige CAPG Protein.** Als Grundlage für die MD-Simulation wurde die Struktur der CAPG-Sev-Mutante verwendet. Zur besseren Veranschaulichung sind zwei CAPG-Domänen in Rot und die über den grauen Linker verbundene dritte Domäne in Blau dargestellt. In **A**) ist eine Aufnahme vom Start der Simulation gezeigt, wohingegen in **B**) die konformationelle Änderung über die Zeit dargestellt ist.

Über die Dauer der MD-Simulation näherte sich die dritte in Abbildung 21 blau dargestellte Domäne den anderen beiden Domänen von CAPG an (Abbildung 21). Durch die Beweglichkeit des *Linkers* wäre eine mögliche Interaktion zwischen den Cysteinen C77-C282 oder C77-C290 denkbar.

#### 4.7 Gerichtete Mutagenese der einzelnen Cysteine von CAPG

Um herauszufinden welchen Einfluss die einzelnen Cysteine und vor allem die beiden für die Oxidation sensitiven Cysteine von CAPG auf die Proteinfunktion haben, wurden alle fünf Cysteine von CAPG (C77, C165, C178, C282 und C290) in den entsprechenden Konstrukten mittels gerichteter Mutagenese zu einem Serin mutiert (Tabelle 21). Alle Konstrukte wurden zusätzlich sequenziert (3.2.1.16), wodurch die eingebrachte Mutation überprüft und gleichzeitig ausgeschlossen werden konnte, dass unerwünschte Mutationen eingebracht wurden. Alle klonierten Konstrukte sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 21: Zusammenfassung der erstellten Konstrukte mittels gerichteter Mutagenese.

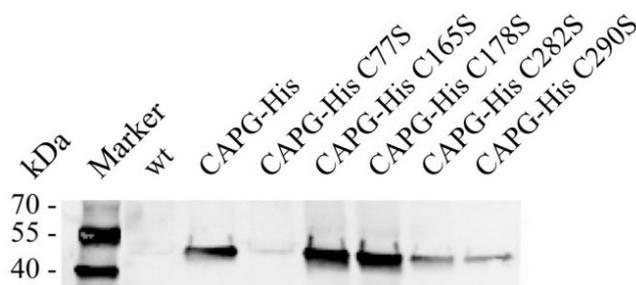
Konstrukt	Mutation					Verwendung
	C77S	C165S	C178S	C282S	C290S	
pQE30-CAPG-His	✓	✓	✓	✓	✓	bakterielle Proteinexpression
pcMV3-CAPG-c-His	✓	✓	✓	✓	✓	Erstellung stabiler humaner Zelllinien
pcMV3-CAPG-c-eGFP	✓	✓	✓	✓	✓	Zelllinien

#### 4.8 Stabile Überexpression der Cysteinmutanten von CAPG in humanen Zelllinien

Im nächsten Schritt wurden die Konstrukte zur Überexpression der einzelnen Cysteinmutanten von CAPG mit c-terminalem His- und c-terminalem eGFP-Spark-Tag in zwei humane Glioblastomzelllinien (A172 und LN18) transfiziert. Die auf dem Expressionsvektor kodierte Hygromycin B-Resistenz eignete sich für die stabile Selektion von LN18-Zellen, in welche die jeweilige CAPG-Variante stabil eingebracht war. Die Vektorkarten sind im Anhang dargestellt (Anhang Abbildung 54, Abbildung 55 und Abbildung 57).

Die stabile Transfektion der einzelnen Cysteinmutanten von CAPG in den A172-Zellen war nicht erfolgreich. Die Zellen ließen sich nicht selektionieren und starben innerhalb der Selektionsphase ab, sodass nur mit den LN18-Zellen weitergearbeitet wurde.

Um die stabile Expression des Zielproteins zu überprüfen, wurden die jeweiligen Zellen mechanisch aufgeschlossen, die Proteine über ein Gel aufgetrennt und die exogenen CAPG-Varianten immunologisch mit einem gegen den fusionierten c-terminalen His-Tag gerichteten Antikörper nachgewiesen. So konnte das exogene CAPG vom endogenen unterschieden werden.

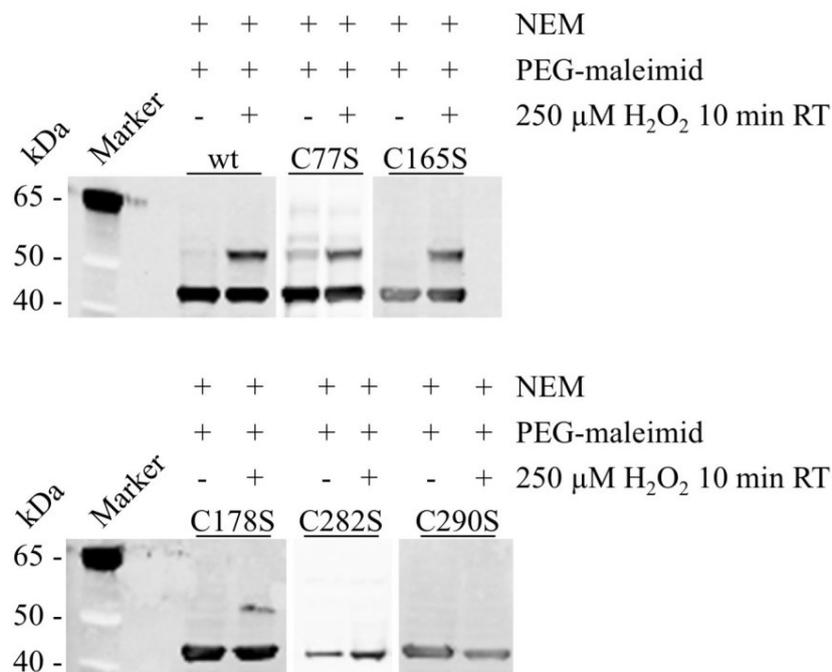


**Abbildung 22: Western Blot Analyse der Überexpression der einzelnen Cysteinmutanten von CAPG in LN18-Zellen.** Nach mechanischem Aufschluss in Lysepuffer wurden je 5 µg der jeweiligen Probe auf das Gel aufgetragen. Die Proteine wurden über ein 4-15 %-iges *Stain free* Gel unter denaturierenden Bedingungen analysiert und die stabil in die Zelllinien eingebrachten Cysteinmutanten des CAPG-His Proteins mit einem gegen den His-Tag gerichteten Antikörper in einer Western Blot Analyse nachgewiesen. [wt = wild typische LN18-Zellen]

Mittels immunologischer Detektion des His-Tags konnte eine Bande bei ca. 40 kDa in LN18-Zellen, die entweder CAPG-His oder die jeweilige Cysteinmutante von CAPG stabil überexprimierten, nachgewiesen werden, deren apparentes Molekulargewicht in etwa dem von CAPG (38,5 kDa) entspricht (Abbildung 22). Die Menge an überexprimiertem Protein variiert stark innerhalb der unterschiedlichen Zelllinien. Für die CAPG-His überexprimierenden Zellen konnte eine moderate Menge an CAPG detektiert werden. Bei den LN18-Zellen, welche die zwei Cysteinmutanten C165S und C178S stabil exprimierten, wurde eine sehr intensive Bande in Höhe des apparenten Molekulargewichtes von CAPG detektiert. Im Vergleich dazu zeigten die LN18-Zellen, welche die Cysteinmutanten C77S, C282S und C290S stabil exprimierten, eher eine schwache Expression von CAPG. Als Negativkontrolle wurden die wildtypischen LN18-Zellen verwendet, bei denen die entsprechende Bande fehlte.

#### **4.9 Für die Cysteinmutanten C282S und C290S von CAPG ließ sich keine Oxidation mehr im PEG-Switch Assay nachweisen**

Mittels massenspektrometriebasierten Analysen (4.5) konnte bereits gezeigt werden, dass die zwei Cysteine, C282 und C290, des humanen Proteins CAPG eine oxidative Modifikation nach Behandlung der Glioblastomzelllinien mit Wasserstoffperoxid aufwiesen. Zur Validierung der vorherigen Ergebnisse wurde erneut der gezielte Nachweis von reversibel oxidierbaren Cysteinen mittels PEG-Switch durchgeführt. Dafür wurden die LN18-Zelllinien, die die jeweilige Cysteinmutante von CAPG exprimierten, nach dem PEG-Switch Protokoll aufgearbeitet, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die exogene CAPG-Variante immunologisch über den His-Tag detektiert (Abbildung 23).



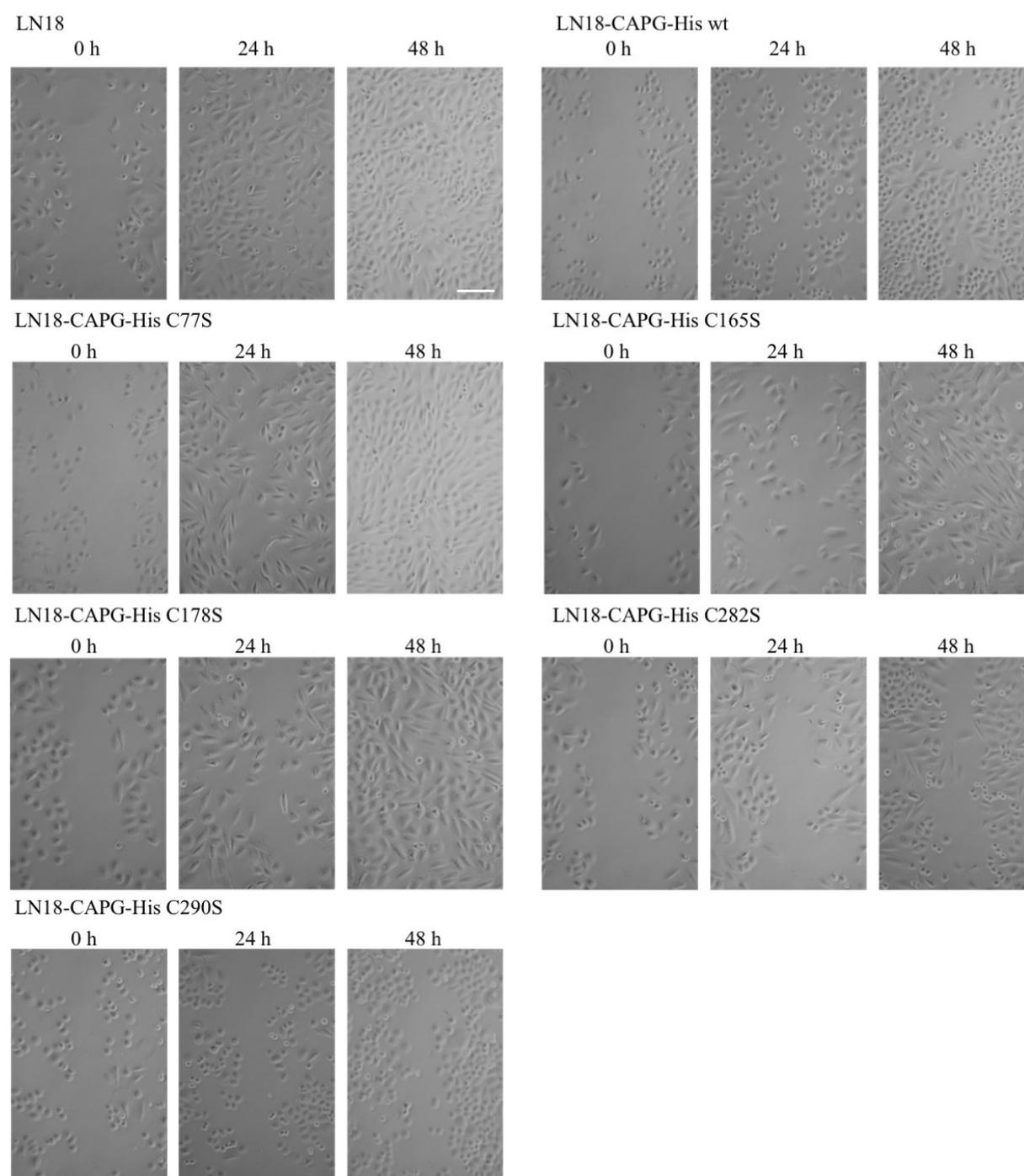
**Abbildung 23: Western Blot Analyse zum Nachweis der Oxidation mittels PEG-Switch in LN18-Zellen, unter Überexpression der jeweiligen Cysteinmutante von CAPG.** Nach der Aufarbeitung nach dem PEG-Switch Protokoll wurden je 30 μg der jeweiligen Probe auf das Gel aufgetragen. Die Proteine wurden in einer 4-12 %-igen Bis-Tris SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen analysiert und die exogenen CAPG-Varianten mit dem gegen den His-Tag gerichteten Antikörper in einer Western Blot Analyse nachgewiesen. Es wurde immer im Wechsel zunächst die unbehandelte und dann die mit Wasserstoffperoxid-behandelte Probe für den Wildtyp und dann für die jeweilige Cysteinmutante aufgetragen.

Die Cysteinmutanten C282S und C290S von CAPG zeigten keine 10 kDa Molekulargewichtsverschiebung, wohingegen die 10 kDa Molekulargewichtsverschiebung bei den anderen Cysteinmutanten und den CAPG-His überexprimierenden LN18-Zellen vorhanden war (Abbildung 23). Dies bestätigte die Annahme, dass diese beiden Cysteine (C282 und C290) von CAPG sensitiv für die Oxidation sind. Da bei diesen Einzelmutanten auch keine Bande detektiert werden konnte, die einer 5 kDa Molekulargewichtsverschiebung entsprach, deutet dies daraufhin, dass die oxidativen Modifikationen der beiden Cysteine C282 und C290 sich einander bedingen.

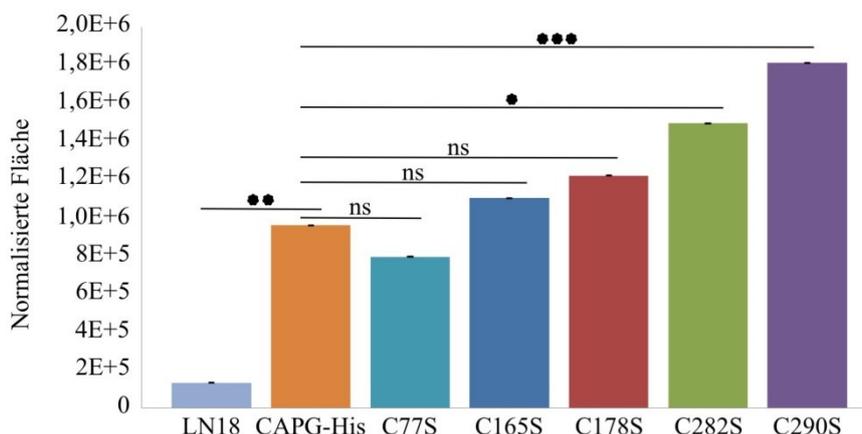
#### 4.10 Einfluss der einzelnen Cysteinmutanten von CAPG auf die Migration

CAPG, als aktinbindendes Protein, ist an der Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts beteiligt und hat somit einen Einfluss auf die Morphologie von Zellen und deren Bewegung. Für die Invasivität und die Fähigkeit zu Metastasieren, ist die Motilität von Tumorzellen Voraussetzung. In einer Vielzahl von Studien wurde bereits gezeigt, dass eine geringe Proteinabundanz an CAPG das Invasionspotenzial und Migrationsverhalten von Zellen inhibiert. Um im nächsten Schritt herauszufinden, ob die Cysteinmutanten von CAPG und daraus resultierend der Redoxstatus des Proteins einen Einfluss auf die Migration hat, wurden

die LN18-Zellen, welche die jeweilige CAPG-Variante stabil überexprimierten, mit Hilfe von *Scratch Assays* untersucht, da die Möglichkeit besteht, dass eines der Cysteine funktionell relevant ist. Wie weit der zellfreie Bereich zugewachsen war, wurde nach 24 und 48 Stunden gemessen. Die entsprechenden Werte für den Wundverschluss nach 24 Stunden sind in einem Balkendiagramm in Abbildung 25 und die repräsentativen Phasenkontrastbilder in Abbildung 24 dargestellt.



**Abbildung 24: Einfluss der einzelnen CAPG-Varianten auf die Migration von LN18-Zelllinien.** Dargestellt sind die repräsentativen Phasenkontrastbilder zum Zeitpunkt 0 h (nach dem *Scratch*), nach 24 h und 48 h des *Scratch Assays*. Untersucht wurde der Einfluss der stabilen Überexpression des wildtypischen CAPG oder der einzelnen Cysteinmutanten (C77S, C165S, C178S, C282S, C290S) in *Scratch Assays* über 48 h im Vergleich zu untransfizierten LN18 Zellen (n=3). Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 25: Vergleich der normalisierten, gemittelten, noch nicht zu gewachsenen Flächen zum Zeitpunkt 24 h.** Zusätzlich wurde die jeweilige Standardabweichung vom Mittelwert in Prozent eingezeichnet und eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Eingezeichnet sind die Vergleiche der einzelnen Cysteinmutanten von CAPG zu den CAPG-His überexprimierenden LN18-Zellen, als auch der Vergleich zwischen den nicht transfizierten LN18-Zellen zu den CAPG-His überexprimierenden Zellen. [\* kennzeichnet einen p-Wert von  $\leq 0,05$ ; \*\* kennzeichnen einen p-Wert von  $\leq 0,01$ ; \*\*\* kennzeichnen einen p-Wert von  $\leq 0,001$ ; ns = nicht signifikant]

**Tabelle 22: Statistischer Vergleich der normalisierten, gemittelten, noch nicht zu gewachsenen Flächen zum Zeitpunkt 24 h aus den Scratch Assays.** Es wurde eine Varianzanalyse (engl.: *analysis of variance*, ANOVA) durchgeführt.

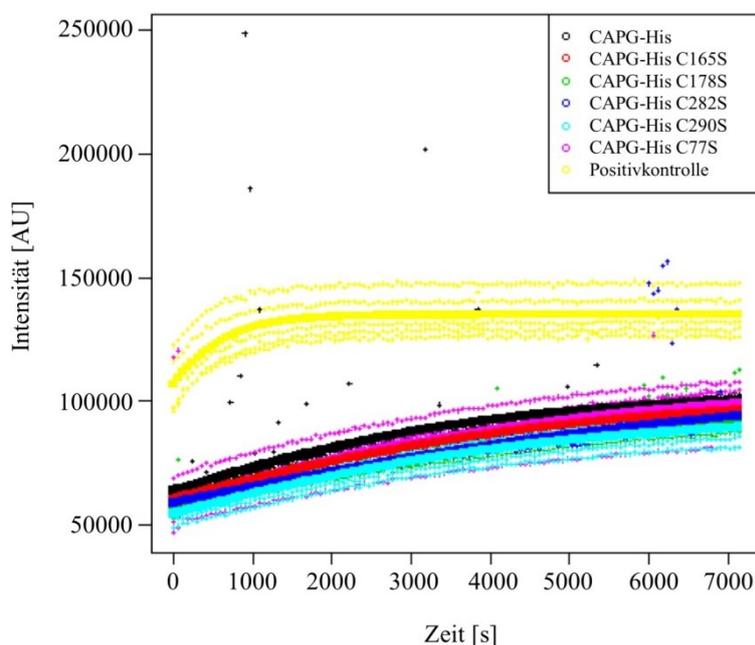
Vergleich	p-Wert
LN18/CAPG-His	0,0012
CAPG-His/ C77S	0,9065
CAPG-His/C165S	0,1000
CAPG-His/ C178S	0,3836
CAPG-His/C282S	0,0119
CAPG-His/C290S	0,0003

Der vollständige Wundverschluss konnte bei den untransfizierten LN18-Zellen und bei den die Cysteinmutante C77S und C178S überexprimierenden LN18-Zellen nach 48 Stunden beobachtet werden. Wobei die untransfizierten Zellen bereits nach 24 h fast einen vollständigen Wundverschluss gezeigt haben. Wohingegen sich bei den Zellen, welche das wildtypische CAPG überexprimierten und denen die Cysteinmutante C165S überexprimierten, die Wunde nach 48 h noch nicht vollkommen geschlossen hatte. Die LN18-Zellen, welche die Cysteinmutante C282S und C290S, eingebracht hatten, zeigte sich der geringste Wundverschluss über die Zeit. Die Varianzanalyse zeigte signifikante Unterschiede im Vergleich der das nicht mutierte CAPG überexprimierenden, zu den die jeweilige Cysteinmutante überexprimierenden LN18-Zellen (Tabelle 22). Interessanterweise wurde das Migrationsverhalten der Cysteinmutanten C282S und C290S von CAPG im Vergleich zu den das nicht mutierte CAPG überexprimierenden Zellen am stärksten inhibiert (CAPG-His/C282S p-Wert = 0,0119; CAPG-His/C290S p-Wert = 0,0003), was darauf

hindeutet, dass diese beiden Cysteine des humanen Proteins CAPG eine Rolle für die Migration spielen könnten. Zusätzlich konnte ein phänotypischer Unterschied in der Morphologie der Zellen beobachtet werden. Die CAPG-, die CAPG-C282S- und C290S-überexprimierenden LN18-Zellen wiesen eher eine runde Form auf. Wohingegen die anderen verwendeten Zelllinien eher spindelförmig wuchsen. Somit ist es möglich, dass das Zytoskelett durch die Mutanten gravierend beeinflusst wird.

#### 4.11 Funktionelle Untersuchung der kanonischen Funktion von CAPG in Abhängigkeit von der jeweiligen Cysteinmutante

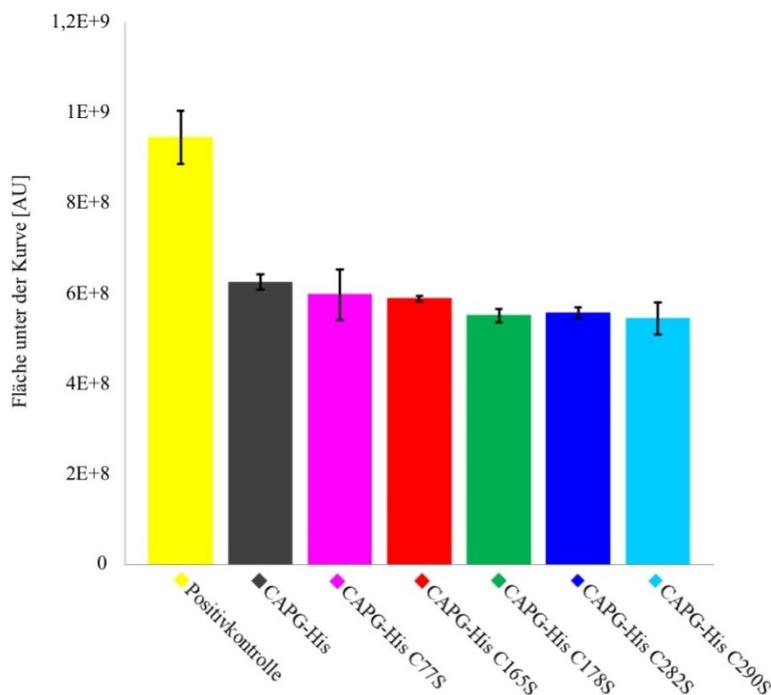
Um die möglichen Konsequenzen des Redoxstatus auf die kanonische Aktin-Capping-Funktion von CAPG zu untersuchen, wurde CAPG zunächst in *E. coli* rekombinant hergestellt, im Anschluss über den His-Tag aufgereinigt und die Qualität der Aufreinigung per LC-MS/MS-Analyse überprüft (Anhang: Abbildung 62). Mittels bakterieller Expression konnten ausreichende Mengen der einzelnen Proteinvarianten von CAPG (CAPG-His, CAPG-His C77S, CAPG-His C165S, CAPG-His C178S, CAPG-His C282S und CAPG-His C290S) hergestellt werden, um diese im Anschluss auf ihre Aktin-Capping-Eigenschaft in Aktinpolymerisationsassays zu untersuchen.



**Abbildung 26: Pyrenaktinpolymerisationsassay in Abwesenheit oder Gegenwart der jeweiligen Proteinvariante von CAPG.** Die Aktinpolymerisation wurde durch Zugabe des Polymerisationspuffers induziert. Die Polymerisation wurde durch Messen der Zunahme der Fluoreszenzintensität gemessen. Für die Negativkontrolle wurde kein Polymerisationspuffer hinzugegeben. Diese diente als Basislinie und wurde direkt von allen Proben abgezogen. Die Positivkontrolle enthielt kein CAPG, sondern nur den Puffer, indem die Proteine vorlagen. Durch die Zugabe von  $2,8 \mu\text{M}$  der entsprechenden Proteinvarianten von CAPG wurde die Polymerisation inhibiert. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und ein  $n = 5$  bzw. für die CAPG-His-Mutante C178S ein  $n = 4$  für die Datenauswertung mit R verwendet. Es sind die Einzelkurven (Kreuze), als auch der Fit der Einzelkurven (Punktkurve) abgebildet.

Der Aktinpolymerisationsassay zeigte, dass sowohl die unmutierte CAPG-His-Variante, als auch alle mutierten CAPG-His-Varianten in der Lage waren die Aktinpolymerisation zu inhibieren. Wodurch eine Beteiligung der Cysteine an der kanonischen Funktion von CAPG sehr unwahrscheinlich ist (Abbildung 26).

Um zusätzlich eine quantitative Aussage über den Einfluss der einzelnen Cysteinmutanten von CAPG auf die Aktinpolymerisation treffen zu können, wurden in einer statistischen Analyse die integrierten Flächen verglichen (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Vergleich der integrierten Flächen des Aktinpolymerisationsassays für die unterschiedlichen CAPG-Varianten.** Die Balken repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen. Die entsprechenden p-Werte sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

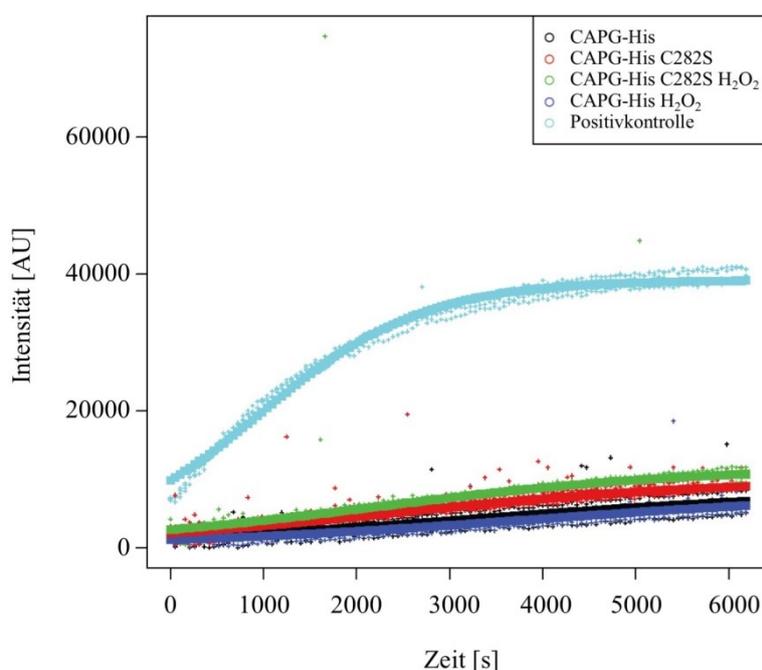
**Tabelle 23: Statistischer Vergleich der integrierten Flächen aus dem Aktinpolymerisationsassay.** Es wurde eine Varianzanalyse (engl.: *analysis of variance*, ANOVA) durchgeführt.

Vergleich	p-Wert
Positivkontrolle/ CAPG-His	4,78E-13
CAPG-His/ CAPG-His C77S	0,964
CAPG-His/ CAPG-His C165S	0,857
CAPG-His/ CAPG-His C178S	0,201
CAPG-His/ CAPG-His C282S	0,232
CAPG-His/ CAPG-His C290S	0,052
Positivkontrolle/ CAPG-His C77S	1,01E-13
Positivkontrolle/ CAPG-His C165S	8,18E-14
Positivkontrolle/ CAPG-His C178S	6,13E-14
Positivkontrolle/ CAPG-His C282S	6,16E-14
Positivkontrolle/ CAPG-His C290S	5,96E-14

Vergleich	p-Wert
CAPG-His C77S/ CAPG-His C165S	1
CAPG-His C77S/ CAPG-His C178S	0,834
CAPG-His C77S/ CAPG-His C282S	0,869
CAPG-His C77S/ CAPG-His C290S	0,447
CAPG-His C165S/ CAPG-His C178S	0,955
CAPG-His C165S/ CAPG-His C282S	0,969
CAPG-His C165S/ CAPG-His C290S	0,667
CAPG-His C178S/ CAPG-His C282S	1
CAPG-His C178S/ CAPG-His C290S	0,999
CAPG-His C282S/ CAPG-His C290S	0,998

Im Vergleich zur Positivkontrolle hemmten alle Proteinvarianten von CAPG die Aktinpolymerisation signifikant (p-Werte im Bereich von  $5,96E-14$  bis  $4,78E-13$ ). Wohingegen die einzelnen Cysteinmutanten untereinander und im Vergleich zum wildtypischen CAPG keinen signifikanten Unterschied gezeigt haben (Tabelle 23). Somit scheinen die einzelnen Cysteinmutanten von CAPG unter den gewählten Bedingungen keinen deutlichen Einfluss auf die kanonische Aktin-*Capping*-Funktion zu haben.

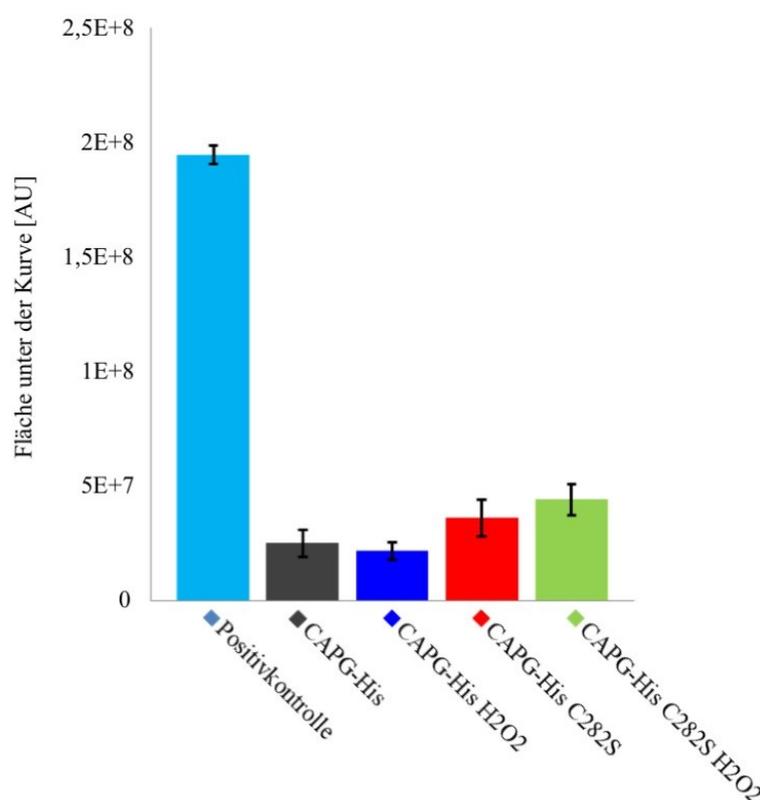
Im Nachfolgenden wurde noch zusätzlich die Rolle einer oxidierenden Umgebung auf die Aktin-*Capping*-Funktion von CAPG untersucht. Dafür wurde die jeweilige CAPG-Variante für 10 Minuten mit Wasserstoffperoxid behandelt, bevor diese zu den restlichen Komponenten pipettiert wurde.



**Abbildung 28: Pyrenaktinpolymerisationsassay in Gegenwart von CAPG oder der Cysteinmutante C282S in Abhängigkeit der Behandlung mit Wasserstoffperoxid.** Die Aktinpolymerisation wurde durch Zugabe des Polymerisationspuffers induziert. Die Polymerisation wurde anhand der Zunahme der Fluoreszenzintensität

gemessen. Für die Negativkontrolle wurde kein Polymerisationspuffer hinzugegeben. Diese diente als Basislinie und wurde direkt von allen Proben abgezogen. Die Positivkontrolle enthielt kein CAPG, sondern nur den Puffer, indem die Proteine vorlagen. Durch die Zugabe von  $2,8 \mu\text{M}$  der entsprechenden Proteinvarianten von CAPG wurde die Polymerisation inhibiert. Die zuvor für 10 min bei RT mit  $100 \mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid-behandelten CAPG-Varianten inhibierten ebenfalls die Aktinpolymerisation. Der *Assay* wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und ein  $n = 4$  für die Datenauswertung mit R verwendet. Es sind die Einzelkurven (Kreuze), als auch der Fit der Einzelkurven (Punktkurve) abgebildet.

Mittels Aktinpolymerisationsassay konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die unmutierte CAPG-His-Variante, als auch die CAPG-His C282S-Variante in der Lage waren die Aktinpolymerisation zu inhibieren. Die zuvor mit Wasserstoffperoxid-behandelten CAPG-Varianten inhibierten die Aktinpolymerisation ebenfalls. Um eine quantitative Aussage über den Einfluss einer vorherigen Wasserstoffperoxidbehandlung von CAPG oder der Cysteinmutante C282S auf die Aktinpolymerisation treffen zu können, wurden in einer statistischen Analyse die integrierten Flächen verglichen (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Vergleich der kalkulierten Flächen unter den Aktinpolymerisationskurven für die unterschiedlichen CAPG-Varianten in Abhängigkeit der Wasserstoffperoxidbehandlung.** Die Balken repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen. Die entsprechenden p-Werte sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 24: Statistischer Vergleich der integrierten Flächen aus dem Aktinpolymerisationsassay in Abhängigkeit der Wasserstoffperoxidbehandlung.** Es wurde eine Varianzanalyse (engl.: *analysis of variance*, ANOVA) durchgeführt.

Vergleich	p-Wert
Positivkontrolle/ CAPG-His	5,90E-14
Positivkontrolle/ CAPG-His H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5,50E-14
Positivkontrolle/ CAPG-His C282S	7,88E-14
Positivkontrolle/ CAPG-His C282S H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,46E-13
CAPG-His/ CAPG-His H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,941
CAPG-His C282S/ CAPG-His C282S H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,558

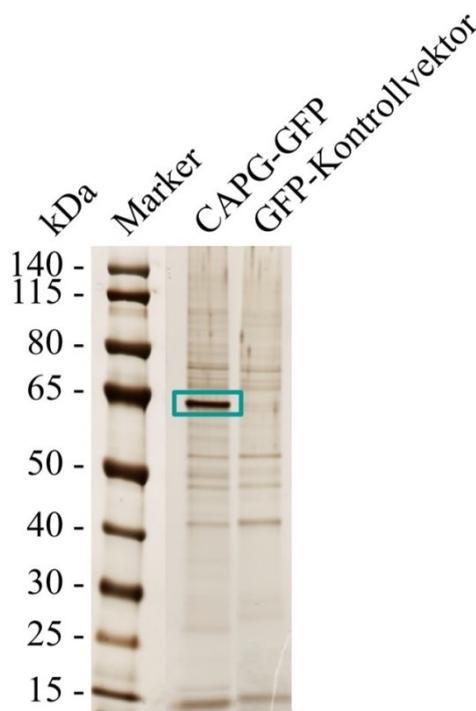
Wie zuvor hemmten CAPG und die Cysteinmutante C282S die Aktinpolymerisation signifikant (p-Werte im Bereich von 7,88E-14 bis 3,46E-13), genauso wie die mit Wasserstoffperoxid-behandelten Varianten. Es konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten und mit Wasserstoffperoxid-behandelten CAPG-Varianten gemessen werden (Tabelle 24). Somit scheint auch die vorherige Behandlung mit Wasserstoffperoxid unter den gewählten Bedingungen keinen signifikanten Einfluss auf die kanonische Aktin-*Capping*-Funktion von CAPG oder der Cysteinmutante C282S zu haben.

## 4.12 Analyse des CAPG-Interaktoms

### 4.12.1 Einfluss einer oxidierenden Umgebung auf das Interaktom von CAPG

Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse (Aktinpolymerisation, Invasivität) kann eine alternative Funktion von CAPG unter oxidierenden Bedingungen nicht ausgeschlossen werden. Hinzu kommen Ergebnisse aus der Literatur, die eine neue Funktion von CAPG im Zellkern beschreiben, bei der CAPG die Brustkrebsmetastasierung durch Modulierung des Transkriptionsfaktors *STC-1* erhöht. Mechanistisch konkurriert CAPG mit dem Transkriptionsrepressor Arginin-Methyltransferase 5 (PRMT5) um die Bindung an den Stanniocalcin-1-Promotor (*STC-1*), was zu einer verringerten Histon-H4R3-Methylierung und einer verstärkten *STC-1*-Transkription führt (Huang *et al.*, 2018). Aus diesen Gründen sollte als nächstes untersucht werden, ob eine oxidierende Umgebung einen Einfluss auf das Interaktom des humanen Proteins CAPG hat, um so Rückschlüsse auf neue Funktionszusammenhänge ziehen zu können. Um eine bessere Anreicherung der spezifischen Interaktionspartner zu erhalten, wurde das Interaktom des GFP-gekoppelten CAPG unter unbehandelten und oxidierenden Bedingungen aus LN18-Zellen analysiert. Zusätzlich wurde eine LN18-Zelllinie verwendet, in welche die GFP-Leervektorkontrolle stabil eingebracht war, um spezifisch mit GFP interagierende Bindungspartner auszuschließen. Zur Überprüfung

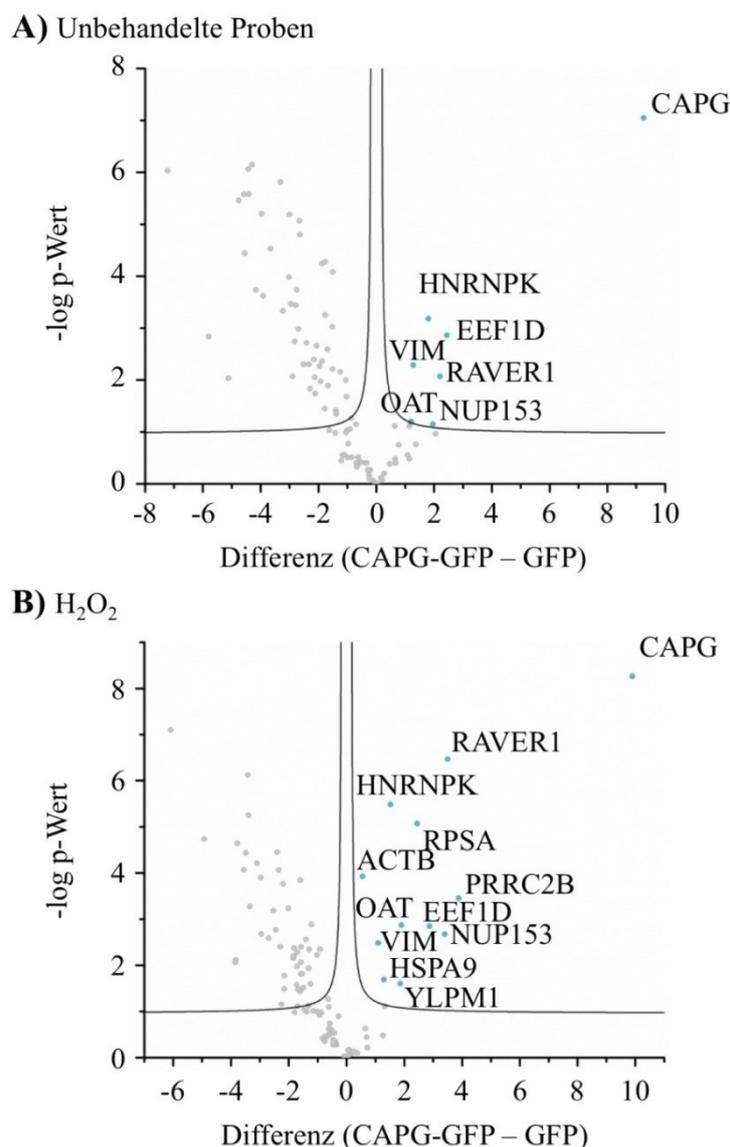
der Aufreinigung des Fusionsproteins, wurde zunächst ein Eluat über eine SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine mittels Silberfärbung visualisiert. In der Gelspur der Eluatprobe wurde die entsprechende Bande auf der Höhe des Fusionsproteins bei ca. 65 kDa ausgeschnitten und im Anschluss via LC-MS/MS analysiert (Abbildung 30).



**Abbildung 30: SDS-PAGE der IP-Eluate aus LN18-Zellen, die entweder CAPG-GFP oder den Leervektor (pcMV3-GFP) stabil überexprimierten.** Die Proben wurden im Gel aufgetrennt und die Proteine mittels Silberfärbung visualisiert. In der Gelspur des CAPG-GFP-Eluats wurde die Bande auf Höhe des Fusionsproteins CAPG-GFP (ca. 65 kDa) ausgeschnitten, prozessiert und CAPG-GFP via LC-MS/MS verifiziert.

Da sowohl CAPG als auch GFP mit diesem Ansatz erfolgreich nachgewiesen werden konnten, wurde dieser Versuchsansatz für die Untersuchung des Interaktoms von CAPG unter oxidierenden Bedingungen genutzt.

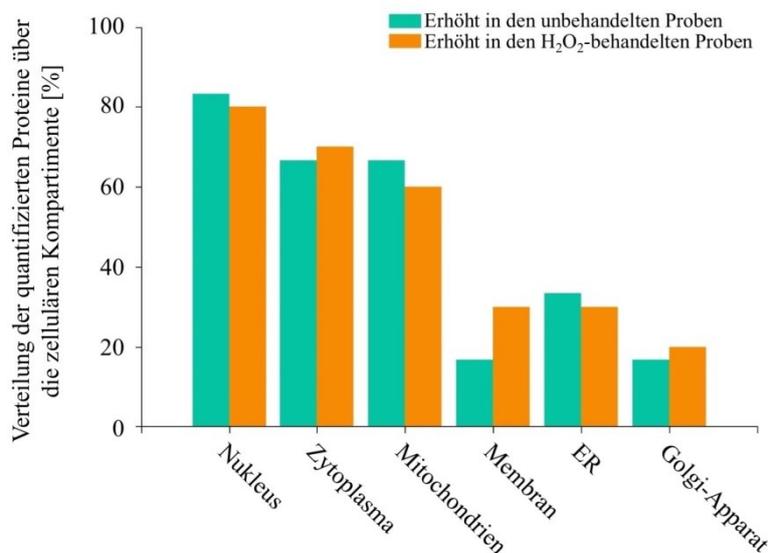
Mit diesem experimentellen Ansatz konnten insgesamt 677 Proteine identifiziert und davon 98 Proteine quantifiziert werden. Um nur spezifische Interaktionspartner von CAPG zu detektieren, wurden potenzielle Abundanzveränderungen zwischen der Leervektorkontrolle und CAPG-GFP anhand einer differentiellen Analyse für beide Behandlungszustände analysiert. Die Untersuchung führte zu der Identifizierung von sechs potenziellen Interaktionspartnern von CAPG in den unbehandelten und zur Identifizierung von 11 potenziellen Interaktionspartnern in den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Proben.



**Abbildung 31: Potenzielle Interaktionspartner von CAPG in Abhängigkeit der Behandlung mit Wasserstoffperoxid.** Es wurden LN18-Zellen verwendet, in welche entweder das Konstrukt pcMV3-CAPG-GFP oder als Kontrolle der GFP-Leervektor stabil eingebracht wurde. Ein Teil der Zellen wurde mit Wasserstoffperoxid behandelt, um den Einfluss einer oxidierenden Umgebung auf das Interaktom von CAPG untersuchen zu können. Nach der Zellernte und Lyse wurde eine IP gegen GFP durchgeführt, die Eluate prozessiert und via LC-MS/MS analysiert. In Grün ist CAPG selbst, sowie Proteine markiert, die in den Proben der CAPG-GFP überexprimierenden LN18-Zellen eine signifikant erhöhte Abundanz zeigten und somit potenzielle Interaktionspartner von CAPG darstellen. Zusätzlich sind die Gennamen angegeben. In **A)** ist ein *Volcano* Plot basierend auf den Vorläuferionenintensitäten für die unbehandelten und in **B)** ein *Volcano* Plot basierend auf den Vorläuferionenintensitäten für die mit Wasserstoffperoxid behandelten Zellen (FDR = 0,05; S0 = 0,1) dargestellt.

Mit diesem Versuchsansatz konnte nur in den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Proben das im Zytoplasma lokalisierte Aktin (ACTB), als bereits in der Literatur beschriebener Interaktionspartner von CAPG nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten nach Wasserstoffperoxidbehandlung, neben den in den unbehandelten Proben bereits identifizierten neuen potenziellen Interaktionspartnern, fünf weitere mögliche redox-abhängige Interaktionspartner (RPSA, ACTB, PRRC2B, HSPA9, YLPM1) detektiert werden

(Abbildung 31). Bei der Betrachtung der zellulären Verteilung der identifizierten Interaktionspartner fiel auf, dass diese über viele Kompartimente verteilt sind (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Verteilung der potenziellen Interaktionspartner von CAPG über die zellulären Kompartimente in LN18-Zellen.** Das Balkendiagramm zeigt, zu welchem Anteil die identifizierten Interaktionspartner von CAPG, in Abhängigkeit der Wasserstoffperoxidbehandlung, den unterschiedlichen Kompartimenten zugeordnet werden können (Mehrfachnennung möglich). Die meisten Proteine wurden dem Zytoplasma und dem Nukleus zugeordnet.

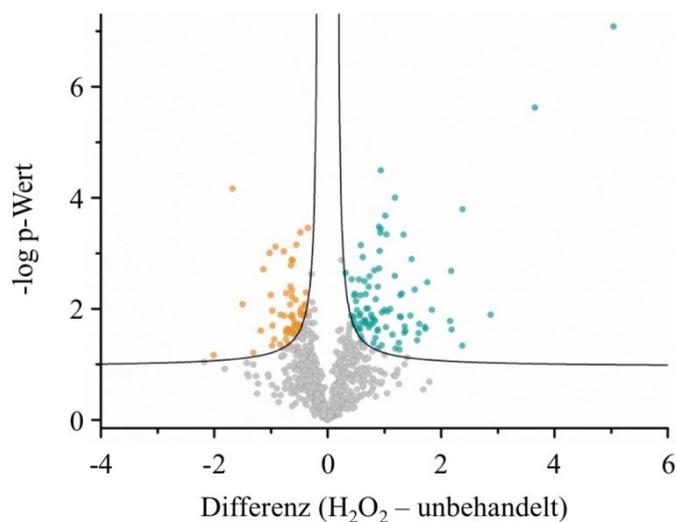
#### 4.12.2 Interaktionsstudie von CAPG aus A172-CAPG-His-Zellen

Da mit dem vorherigen methodischen Ansatz kaum aus der Literatur bekannte Interaktionspartner von CAPG gefunden wurden, wurde trotz fehlender Leervektorkontrolle folgender Versuchsansatz verwendet, um mehr Informationen über das Interaktom von CAPG zu erfahren. Dafür wurde das Fusionsprotein CAPG-His aus unbehandelten und mit Wasserstoffperoxid-behandelten A172-CAPG-His-Zellen aufgereinigt und unspezifische Interaktionspartner durch mehrfaches Waschen abgetrennt. Im Anschluss wurden die Proben nach der Elution mittels LC-MS/MS analysiert.

Mit diesem Ansatz konnten 1911 Protein identifiziert und davon insgesamt 925 quantifiziert werden. Zu den 925 quantifizierten Proteinen zählten die für CAPG bereits in der Literatur beschriebenen Interaktionspartner, wie das *F-actin-capping protein subunit alpha-2* (CAPZA2), Cofilin (CFL1), das *Electron transfer flavoprotein subunit beta* (ETFb), das *Far upstream element binding protein 1* (FUBP1), das *Heat shock protein HSP 90-alpha* (HSPA8), Peroxiredoxin 6 (PRDX6), das *GTP-binding nuclear protein Ran* (RAN) und die Transketolase (TKT).

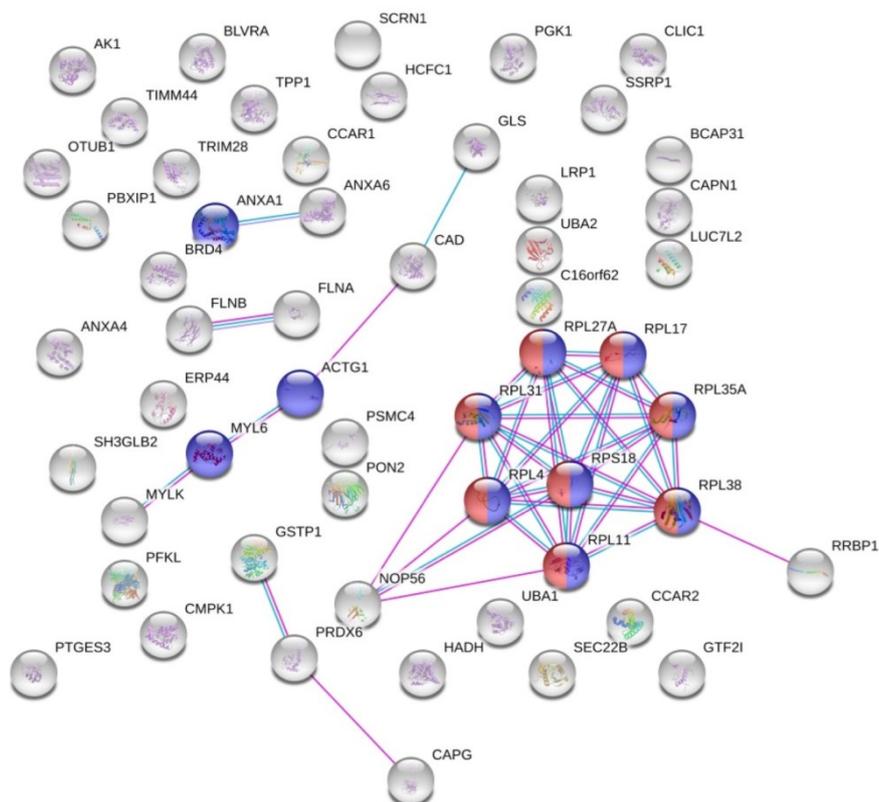
Um im nächsten Schritt potenzielle Unterschiede zwischen den unbehandelten und mit Wasserstoffperoxid-behandelten A172-CAPG-His-Zellen festzustellen, wurde eine differenzielle Analyse durchgeführt. In Abbildung 33 sind die potenziellen Interaktionspartner des CAPG in Abhängigkeit der Behandlung dargestellt. Mit dieser Strategie wurden 58

Interaktionspartner identifiziert (Anhang Tabelle 29), die eine größere Abundanzveränderung in den unbehandelten Proben aufwiesen und 93, die eine größere Abundanzveränderung in den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Zellen aufzeigten (Anhang Tabelle 28). Zu den 58 in den unbehandelten Proben identifizierten Interaktionspartnern zählte PRDX6, welches bereits in der Literatur als bekannter Interaktionspartner von CAPG beschrieben ist.



**Abbildung 33: Potenzielle Interaktionspartner des humanen Proteins CAPG aus A172-CAPG-His-Zellen.** Dargestellt ist ein *Volcano* Plot basierend auf den Vorläuferionenintensitäten für die unbehandelten und mit Wasserstoffperoxid-behandelten A172-CAPG-His-Zellen (FDR = 0,05; S0 = 0,1). In Grün sind die Proteine dargestellt, die eine erhöhte Abundanz infolge der Wasserstoffperoxidbehandlung gezeigt haben und in Orange die, die im Vergleich eine erhöhte Proteinabundanz in den unbehandelten Proben aufwiesen.

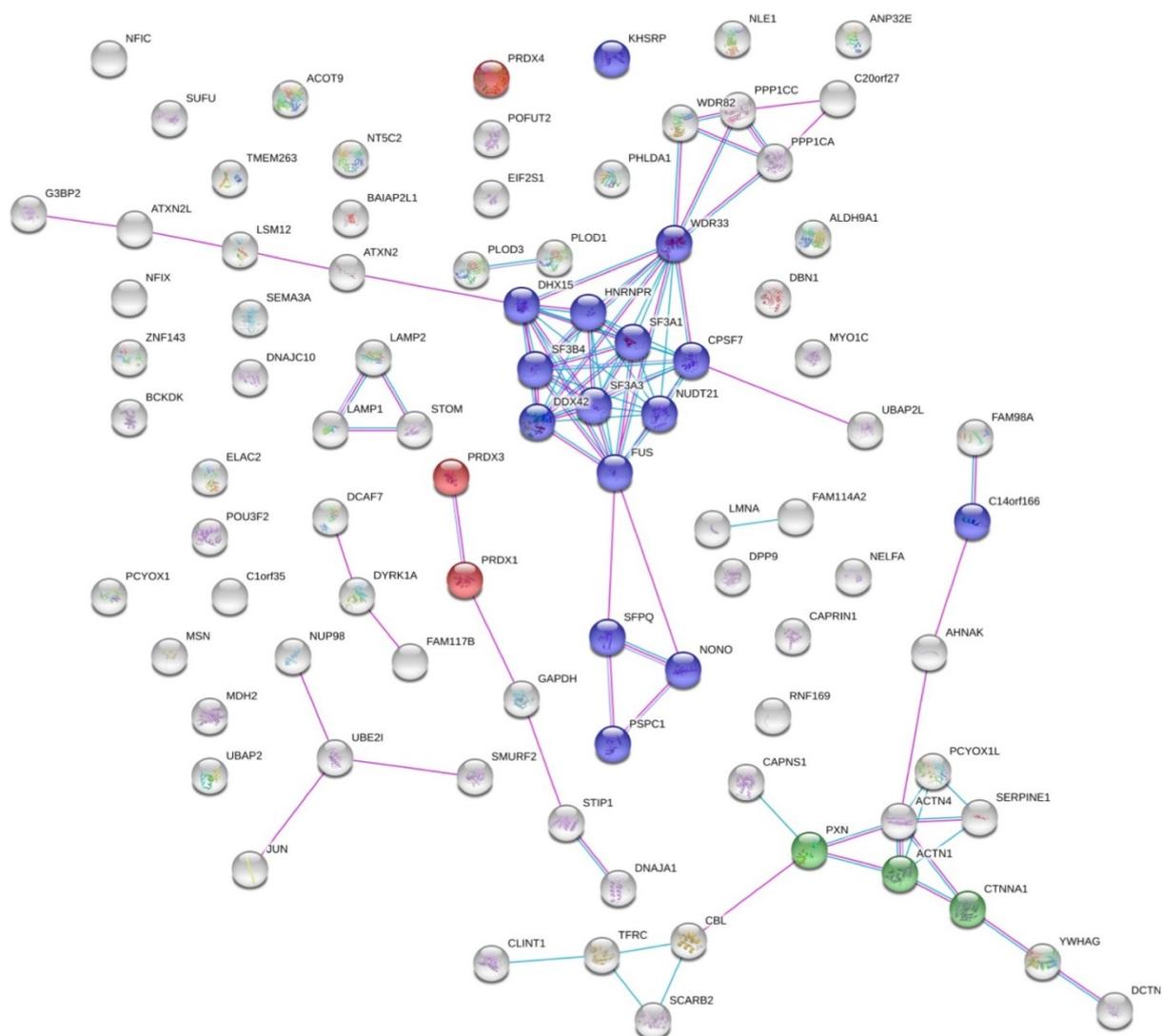
Um zu evaluieren, ob die in Abhängigkeit der Behandlung identifizierten Interaktionspartner funktionelle Zusammenhänge aufweisen, wurde eine Netzwerkanalyse mit der Software *STRING* durchgeführt. Für die Erstellung des Netzwerks wurden nur Interaktionen zugelassen, die auf experimentellen Daten beruhen oder aus kuriierten Datenbanken stammen.



**Abbildung 34: Netzwerk der 58 potenziellen Interaktionspartner des humanen CAPG, die eine höhere Abundanz in den unbehandelten Proben gezeigt haben.** Das Netzwerk wurde mittels *STRING* Software erstellt. Die blauen Linien repräsentieren Interaktionen aus kuriierten Datenbanken und die violetten Linien experimentell nachgewiesene Interaktionen. In Rot sind Proteine markiert, die mit der KEGG-Kategorie Ribosomen assoziiert werden und in Blau sind Proteine markiert, die eine strukturelle Molekülaktivität aufweisen.

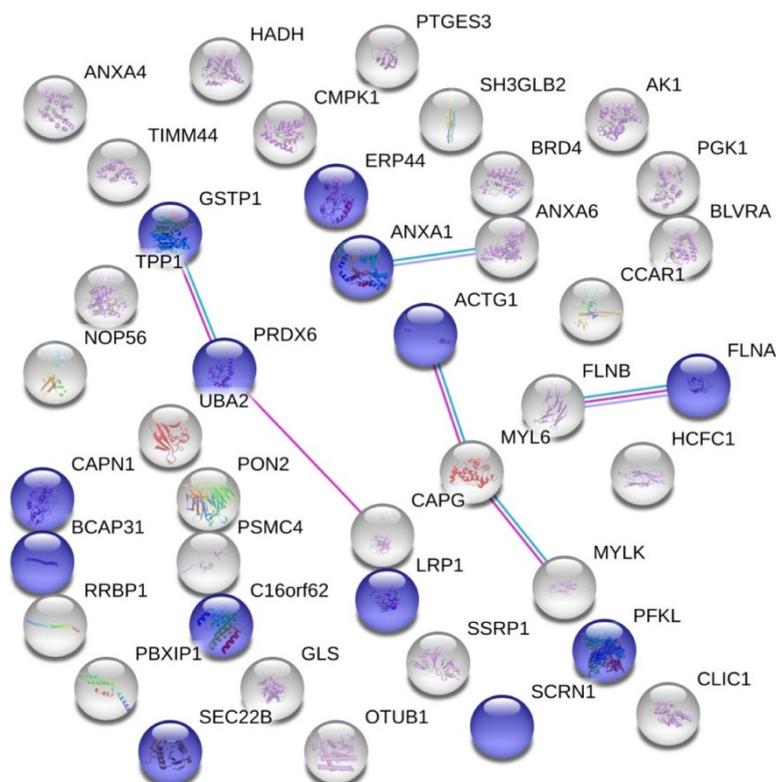
Die Anreicherungsanalyse der 58 potenziellen Interaktionspartner, die eine höhere Abundanzveränderung in den unbehandelten Proben gezeigt haben, ergab eine Assoziation der Proteine mit der KEGG-Kategorie Ribosomen ( $FDR = 4,05E-07$ ) und einer strukturellen Molekülaktivität ( $FDR = 0,00044$ ) (Abbildung 34).

Wohingegen die Anreicherungsanalyse der 93 potenziellen Interaktionspartner, die eine höhere Abundanzveränderung in den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Proben gezeigt haben, eine Beteiligung an biologischen Prozessen wie dem RNA-Spleißen ( $FDR = 4,46E-07$ ) ergab. Zudem wiesen diese Proteine eine Thioredoxin-Peroxidase-Funktion ( $FDR = 0,0010$ ) auf oder wurden mit der Vinculinbindung ( $FDR = 0,0023$ ) assoziiert (Abbildung 35).



**Abbildung 35: Netzwerk der 93 potenziellen Interaktionspartner des humanen CAPG, die eine höhere Abundanz in den Wasserstoffperoxid-behandelten Proben gezeigt haben.** Das Netzwerk wurde mittels *STRING* Software erstellt. Die blauen Linien repräsentieren Interaktionen aus kurierten Datenbanken und die violetten Linien experimentell nachgewiesene Interaktionen. In Blau sind Proteine markiert, die nach GO-Annotation mit dem biologischen Prozess des RNA-Spleißens assoziiert werden. In Rot sind Proteine markiert, die eine Thioredoxin-Peroxidase-Funktion aufweisen und in Grün Proteine, die Vinculin binden.

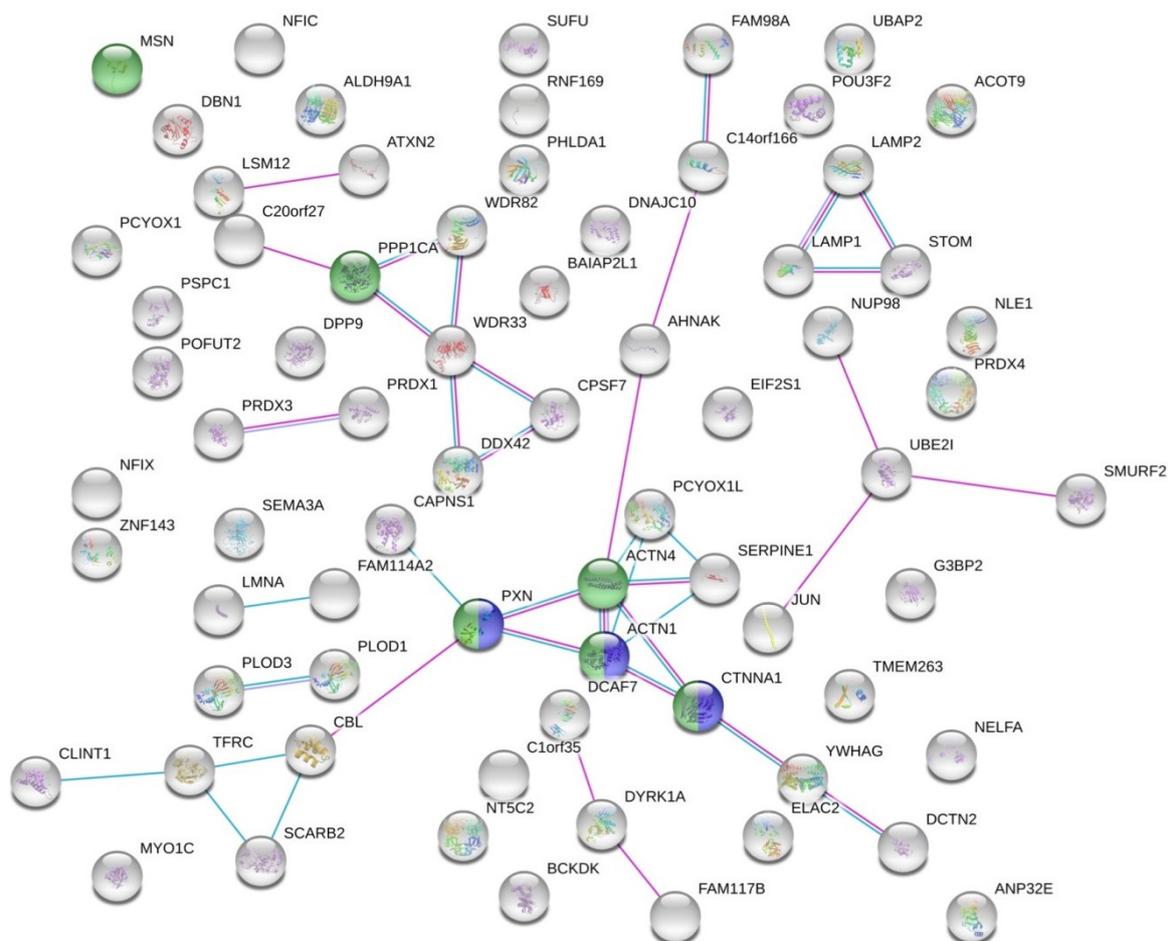
Bei der Betrachtung beider Netzwerke fiel auf, dass vor allem ribosomale Proteine, sowie Spleißfaktoren angereichert waren. Um mögliche kleinere Interaktionsnetzwerke zu identifizieren, wurden im nächsten Schritt häufige Kontaminanten entfernt (Mellacheruvu *et al.*, 2013).



**Abbildung 36:** Netzwerk der 41 potenziellen Interaktionspartner des humanen CAPG ohne häufig auftretende Kontaminanten, die eine höhere Abundanz in den unbehandelten Proben zeigten. Das Netzwerk wurde mittels *STRING* Software erstellt. Die blauen Linien repräsentieren Interaktionen aus kuriierten Datenbanken und die violetten Linien experimentell nachgewiesene Interaktionen. In Blau sind Proteine markiert, die mit dem vesikelvermittelten Transport assoziiert werden.

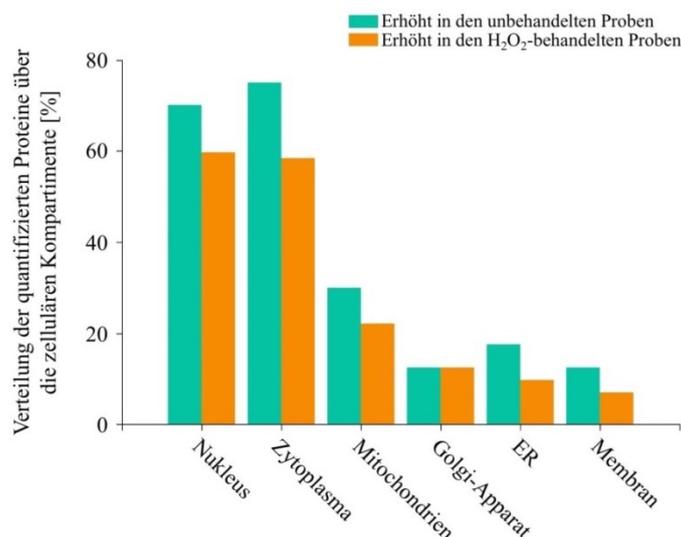
Die Anreicherungsanalyse, bei der die häufig auftretenden Kontaminanten aus den potenziellen Interaktionspartnern, die eine höhere Abundanzveränderung in den unbehandelten Proben gezeigt haben, entfernt wurden, ergab 13 Interaktionspartnern, welche mit dem vesikelvermittelten Transport assoziiert werden (FDR = 0,0124) (Abbildung 36).

Im Vergleich blieben nach Entfernung von häufig auftretenden Kontaminanten 74 potenzielle Interaktionspartner übrig, die eine höhere Abundanzveränderung nach Wasserstoffperoxidbehandlung gezeigt haben. Diese Interaktionspartner wurden mit der Vinculin- (FDR = 0,0014) oder Zelladhäsionsmolekülbindung (FDR = 0,0051) assoziiert (Abbildung 37).



**Abbildung 37: Netzwerk der 74 potenziellen Interaktionspartner des humanen CAPG ohne häufig auftretende Kontaminanten, die eine höhere Abundanz in den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Proben zeigten.** Das Netzwerk wurde mittels *STRING* Software erstellt. Die blauen Linien repräsentieren Interaktionen aus kurierten Datenbanken und die violetten Linien experimentell nachgewiesene Interaktionen. In Blau sind Proteine markiert, die Vinculin binden und in Grün Proteine, die an der Zelladhäsionsmolekülbindung beteiligt sind.

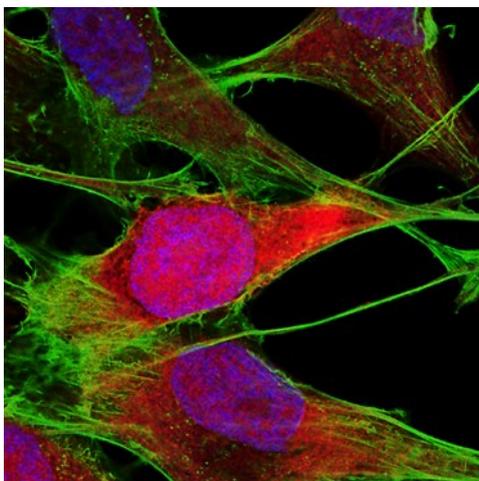
Um die detektierten Interaktionspartner in den zellulären Kontext einzuordnen, wurde die Verteilung der Kandidaten über die zellulären Kompartimente genauer betrachtet (Abbildung 38). Dabei fiel auf, dass die potenziellen Interaktionspartner über viele Kompartimente verteilt waren.



**Abbildung 38: Verteilung der potenziellen Interaktionspartner von CAPG, welche von häufig auftretenden Kontaminanten bereinigt worden sind, über die zellulären Kompartimente in A172-Zellen.** Das Balkendiagramm zeigt, zu welchem Anteil die identifizierten Interaktionspartner von CAPG in Abhängigkeit der Wasserstoffperoxidbehandlung den unterschiedlichen Kompartimenten zugeordnet werden können (Mehrfachnennung möglich). Die meisten Proteine wurden dem Zytoplasma und dem Nucleus zugeordnet.

### 4.13 Zelluläre Lokalisation von CAPG in humanen A172-Zellen

Da eine Vielzahl der gefundenen, potenziellen Interaktionspartner von CAPG sowohl im Zytosol, als auch im Kern lokalisiert zu sein scheinen, wurden im Folgenden immunzytochemische Färbungen durchgeführt, um zunächst die in der Literatur beschriebene CAPG-Lokalisation sowohl im Zytoplasma, als auch im Kern zu verifizieren. Dafür wurden die A172-Zellen wie in 3.2.4.13 beschrieben ausgesät und behandelt. Die Zellkerne wurden mit DAPI und die F-Aktinfilamente mit einem Phalloidin-Farbstoff angefärbt. Das humane Protein CAPG wurde mit Hilfe eines gegen CAPG gerichteten Antikörpers und mit einem an einen Farbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert.

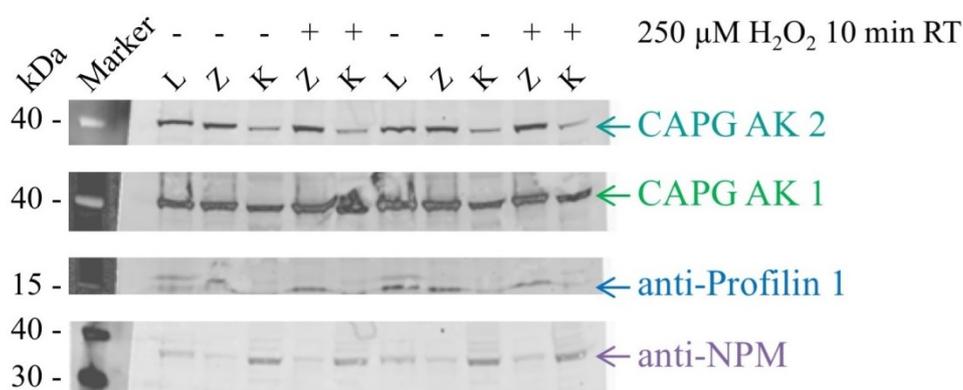


**Abbildung 39: Konfokalmikroskopische Aufnahme einer immunzytochemischen Färbung von CAPG und F-Aktin in A172-Zellen.** Die CAPG-Signale sind in Rot dargestellt, die F-Aktinfilamente in Grün und der Zellkern in Blau. Die Aufnahmen wurden am konfokalen hochauflösenden System Leica TCS SP8STED 3X aufgenommen.

Das humane Protein CAPG konnte sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern detektiert werden (Abbildung 39). Dabei konnte keine Akkumulation von CAPG an den Enden der F-Aktinfilamente nachgewiesen werden. CAPG scheint diffus und ohne eindeutige Assoziation zu Aktinfasern in der Zelle lokalisiert zu sein.

#### 4.13.1 Western Blot Analyse der subzellulären Lokalisationsänderung von CAPG in Abhängigkeit von der Wasserstoffperoxidbehandlung

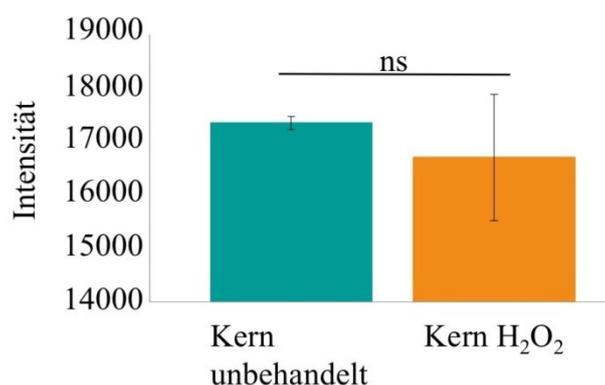
Aufgrund des nachgewiesenen Einflusses einer oxidierenden Umgebung auf die Interaktionspartner von CAPG bei der vorangegangenen Untersuchung des Interaktoms sollte im Folgenden die Auswirkung der Wasserstoffperoxidbehandlung auf die subzelluläre Lokalisation von CAPG untersucht werden. Dafür wurde ein Teil der Zellen zunächst mit Wasserstoffperoxid behandelt. Im Anschluss wurden die unbehandelten und die mit Wasserstoffperoxid-behandelten Zellen für die subzelluläre Fraktionierung geerntet und durch sukzessive Lyse und verschiedene Zentrifugationsschritte in eine zytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion aufgetrennt. Um den Erfolg der Fraktionierung zu überprüfen, wurden zusätzlich Immunfärbungen gegen zwei Markerproteine für die unterschiedlichen Kompartimente durchgeführt (Abbildung 40).



**Abbildung 40: Western Blot Analyse der subzellulären Verteilung des humanen Proteins CAPG.** Nach der Zellernte wurde eine subzelluläre Fraktionierung in eine zytoplasmatische und nukleäre Fraktion durchgeführt. In Doppelbestimmung wurden die unbehandelte und die zuvor mit 250 µM Wasserstoffperoxid-behandelten Kern- und Zytoplasmafraktionen über eine SDS-PAGE analysiert. Dafür wurden pro Spur je 30 µg des jeweiligen Lysates aufgetragen. Das humane Protein CAPG wurde mit zwei spezifischen gegen CAPG gerichteten Antikörpern (CAPG AK 1 und CAPG AK 2) in einer Western Blot Analyse nachgewiesen. Zusätzlich wurde das Protein Profilin 1, als Marker für das Zytoplasma, sowie das Protein Nucleophosmin (NPM), als Marker für die nukleäre Fraktion, immunologisch nachgewiesen. [L = Lysat; Z = Zytoplasmatische Fraktion; K = Kernfraktion]

Als Marker für das Zytoplasma wurde Profilin 1 verwendet und es konnte ein Signal im Lysat und in der zytoplasmatischen Fraktion nachgewiesen werden. Im Vergleich konnte eine Bande mit dem gegen das Protein Nucleophosmin (NPM) gerichteten Antikörper im Lysat und verstärkt im Kern detektiert werden. Mittels subzellulärer Fraktionierung und immunologischem Nachweis konnte mit einer weiteren Methode gezeigt werden, dass CAPG

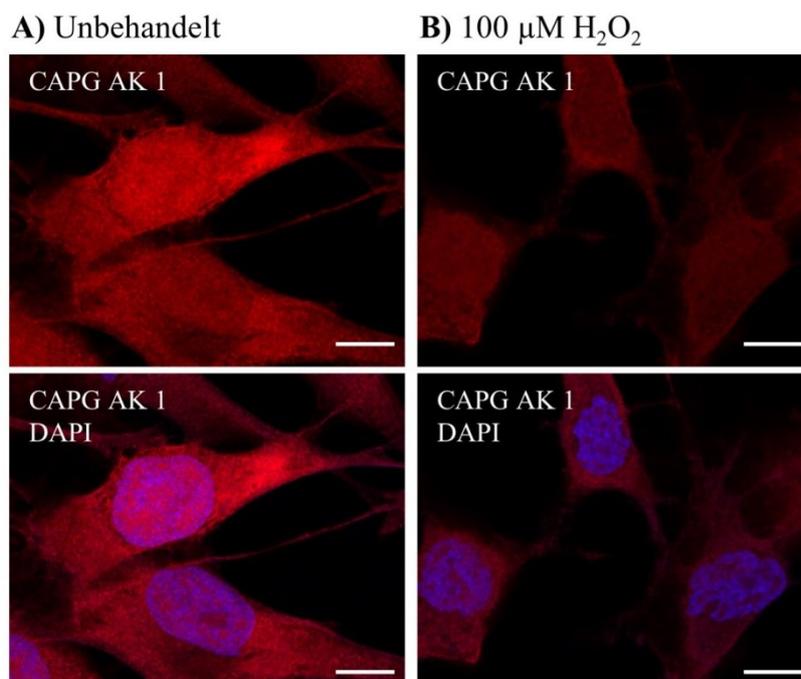
sowohl im Zytoplasma, als auch im Kern lokalisiert ist (Abbildung 40). Bei der Detektion von CAPG mit dem monoklonalen Antikörper (CAPG AK 2) schien die Bande in Höhe von CAPG in der Kernfraktion nach Wasserstoffperoxidbehandlung schwächer zu sein. Um eine deutlichere Aussage darüber treffen zu können, wurde eine quantitative Auswertung für den monoklonalen CAPG-Antikörper (CAPG AK 2) durchgeführt, da das Signal des anderen Antikörpers (CAPG AK 1) durch Luftblasen auf der Membran gestört wurde (Abbildung 41). Allerdings ergab die quantitative Auswertung unter den gewählten Bedingungen und bei einer Stichprobenanzahl von zwei keinen signifikanten Unterschied (p-Wert = 0,643).



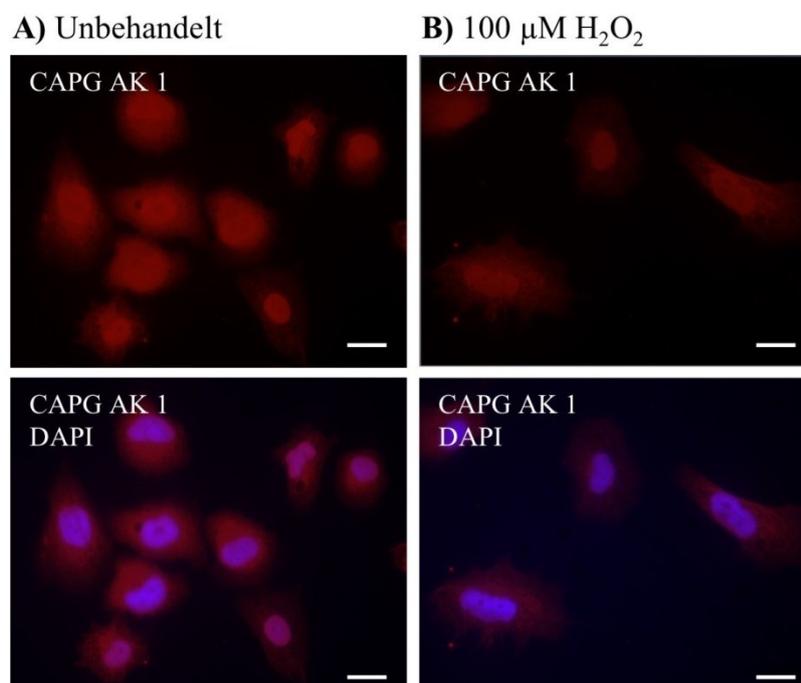
**Abbildung 41: Quantifizierte Signalintensitäten des immunologischen CAPG-Nachweises der Kernfraktionen in Abhängigkeit der Wasserstoffperoxidbehandlung.** Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Signalintensitäten (n = 2), die mit dem monoklonalen CAPG-Antikörper (CAPG AK 2) detektiert wurden. Zusätzlich wurde die Standardabweichung eingezeichnet. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Kernlokalisierung von CAPG nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden. [ns = nicht signifikant]

#### 4.13.2 Nach Wasserstoffperoxidbehandlung zeigt CAPG eine zelluläre Lokalisationsänderung in immunzytochemischen Färbungen

Da das vorherige Experiment einen ersten Hinweis darauf geliefert hat, dass sich die subzelluläre CAPG-Lokalisation nach Wasserstoffperoxidbehandlung verändern könnte, wurde dies im nächsten Schritt in immunzytochemischen Färbungen genauer untersucht. Hierzu wurden zunächst untransfizierte A172- und LN18-Zellen mit Wasserstoffperoxid behandelt (Abbildung 42 und Abbildung 43), um sich die subzelluläre Lokalisation des endogenen CAPG anzuschauen.



**Abbildung 42: Konfokalmikroskopische Aufnahmen immunzytochemischer Färbungen von CAPG in A172-Zellen.** In **A**) sind die konfokalmikroskopischen Aufnahmen unbehandelter A172-Zellen gezeigt. Im Vergleich dazu, wurden in **B**) die für 10 min bei RT mit 100  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid-behandelte A172-Zellen dargestellt. Die CAPG-Signale sind in Rot dargestellt und der Zellkern in Blau. Die Aufnahmen wurden am konfokalen, hochauflösenden System *Leica TCS SP8STED 3X* aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

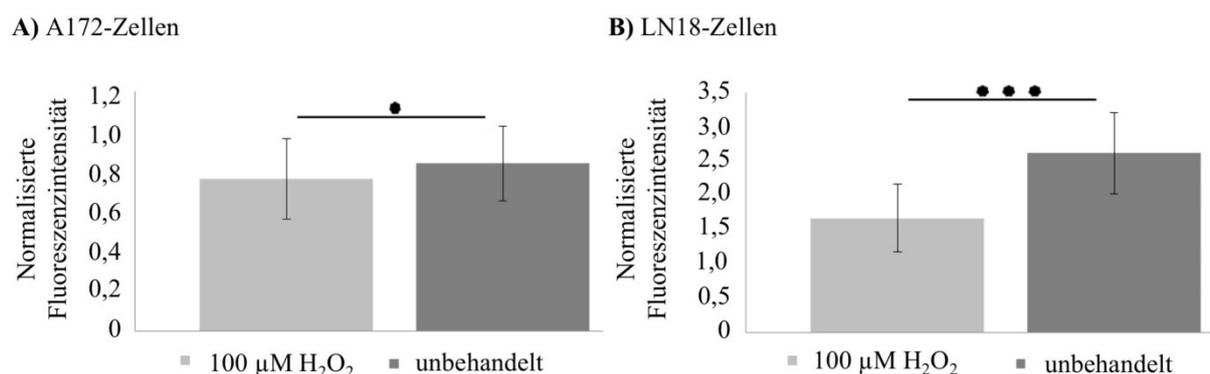


**Abbildung 43: Mikroskopische Aufnahmen immunzytochemischer Färbungen von CAPG in LN18-Zellen.** In **A**) sind die mikroskopischen Aufnahmen unbehandelter LN18-Zellen gezeigt. Im Vergleich dazu, wurden in **B**) die für 10 min bei RT mit 100  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid-behandelte LN18-Zellen dargestellt. Die CAPG Signale sind in Rot dargestellt und der Zellkern in Blau. Die Aufnahmen wurden am *Axioplan* Mikroskop von Zeiss aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zeigte CAPG eine Lokalisationsänderung nach der Behandlung mit Wasserstoffperoxid sowohl in den A172- (Abbildung 42), als auch in den

LN18-Zellen (Abbildung 43). Denn nach der Behandlung war die CAPG-Färbung im Zellkern deutlich geringer.

Die Lokalisationsänderung des humanen Proteins CAPG wurde mit Hilfe der Software *ImageJ* quantifiziert. Dafür wurden die Zellkernfluoreszenzsignalintensitäten von 50 unbehandelten und 50 mit 100  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid-behandelten A172- und LN18-Zellen verglichen. Zusätzlich wurde die Signalintensität des entsprechenden Kerns im DAPI-Kanal bestimmt. Im nächsten Schritt wurden die gemessenen Zellkernintensitäten von CAPG der unbehandelten und behandelten Zellen auf die DAPI-Intensität normiert.



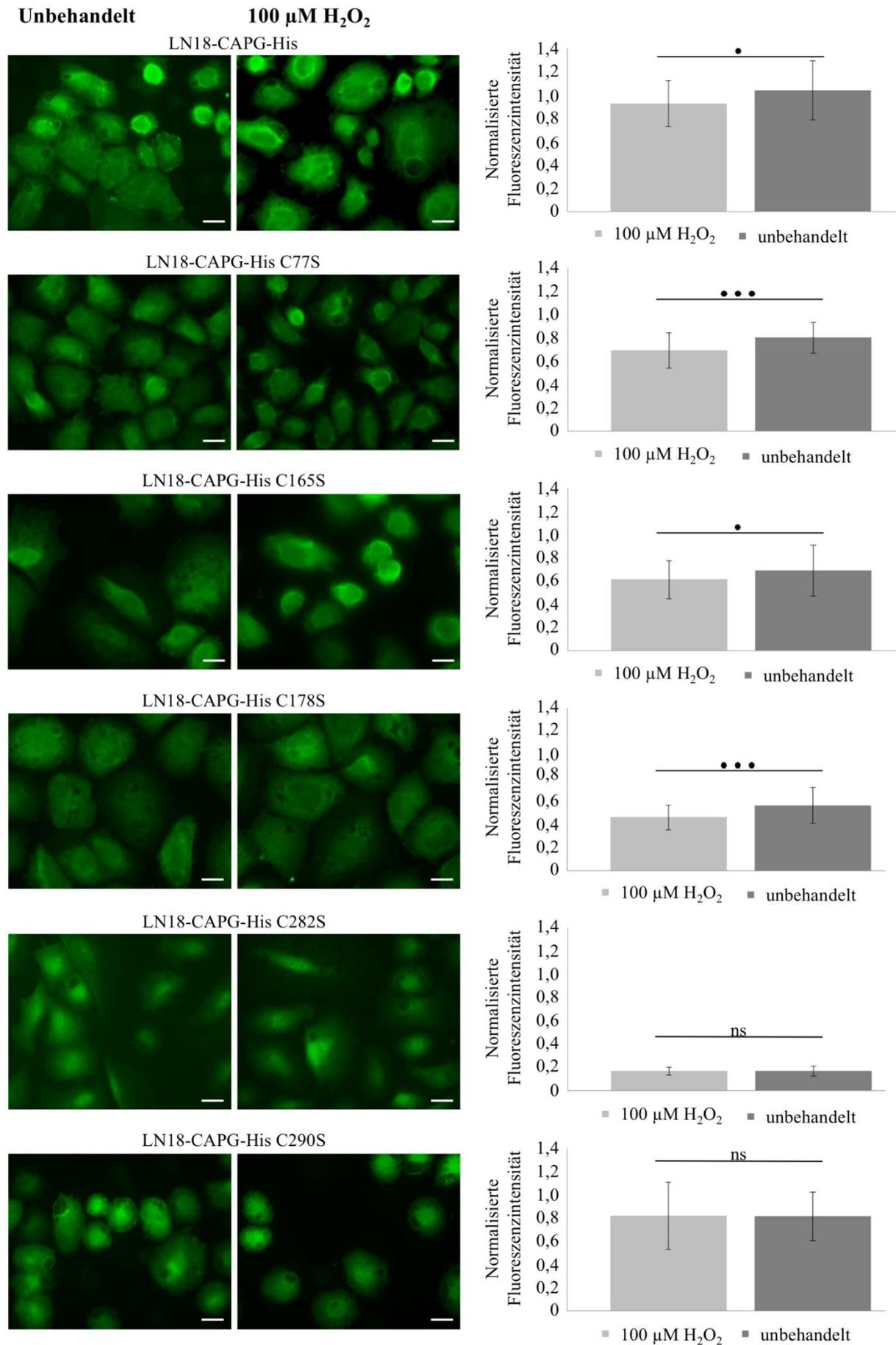
**Abbildung 44:** Normierten Fluoreszenzintensitäten der Zellkernbereiche von 50 unbehandelten und 50 mit 100  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid-behandelten A172- (A) und LN18-Zellen (B). Die y-Achse zeigt die auf die DAPI-Fluoreszenz normierte CAPG-Fluoreszenzintensität. Zusätzlich wurde die jeweilige Standardabweichung dargestellt und ein T-Test durchgeführt. [\* kennzeichnet einen p-Wert von  $\leq 0,05$ ; \*\*\* kennzeichnen einen p-Wert von  $\leq 0,001$ ]

Die normierte Fluoreszenzintensität für CAPG im Kernbereich der behandelten Zellen war im Vergleich zu den unbehandelten Zellen bei beiden humanen Glioblastomzelllinien signifikant niedriger (Abbildung 44, A172: p-Wert = 0,02 und LN18: p-Wert = 3,5E-11). Die Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid führte dazu, dass sich im Kern eine geringere Intensität der CAPG-Färbung zeigte.

### 4.13.3 Einfluss der einzelnen Cysteinmutanten auf die subzelluläre

#### Lokalisation von CAPG in humanen LN18-Zellen

Es wurde bereits gezeigt, dass die im Zellkern lokalisierte Form von CAPG die Zellinvasivität fördert (De Corte *et al.*, 2004). Bislang ist jedoch nicht bekannt, ob die einzelnen Cysteine von CAPG eine Rolle für die subzelluläre Lokalisation spielen und sich ebenfalls eine Translokation des Proteins nach Wasserstoffperoxidbehandlung zeigen würde. Deshalb wurden immunzytochemische Färbungen von den erstellten stabilen LN18-Zelllinien (CAPG-His, CAPG-His C77S, CAPG-His C165S, CAPG-His C178S, CAPG-His C282S und CAPG-His C290S) durchgeführt. Für den Nachweis des exogenen CAPG bzw. der entsprechenden Cysteinmutante wurde ein gegen den His-Tag gerichteter Antikörper verwendet.



**Abbildung 45: Mikroskopische Aufnahmen der immunzytochemischen Färbung der, die jeweilige CAPG-Variante überexprimierenden, LN18-Zellen.** Links sind die mikroskopischen Aufnahmen für die unbehandelten und mit 100  $\mu$ M Wasserstoffperoxid-behandelten LN18-CAPG-His-Zellen und aller Cysteinmutanten von CAPG (C77S, C165S, C178S, C282S und C290S) gezeigt. Das exogene CAPG bzw. die jeweilige Mutante wurde mit einem gegen den His-Tag gerichteten Antikörper nachgewiesen und die Signale sind in Grün dargestellt. Die Aufnahmen wurden am *Axioplan* Mikroskop von Zeiss aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu$ m. Rechts neben den Aufnahmen sind die entsprechenden Balkendiagramme der normierten Fluoreszenzintensitäten der Zellkernbereiche von 50 unbehandelten und 50 mit 100  $\mu$ M Wasserstoffperoxid-behandelten Zellen dargestellt. Die y-Achse zeigt die auf die DAPI-Fluoreszenz normierte CAPG-Fluoreszenzintensität. Zusätzlich wurde die jeweilige Standardabweichung dargestellt und ein T-Test durchgeführt. [\* kennzeichnet einen p-Wert von  $\leq 0,05$ ; \*\*\* kennzeichnen einen p-Wert von  $\leq 0,001$ ; ns = nicht signifikant]

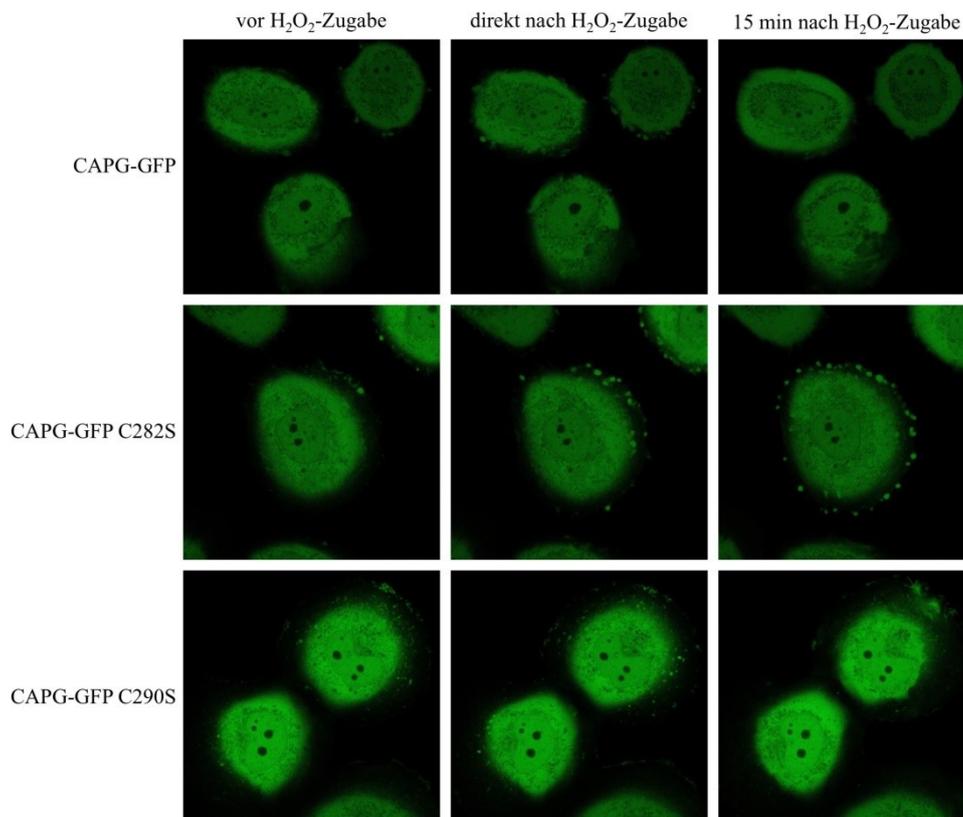
Interessanterweise wiesen die CAPG-His überexprimierenden LN18-Zellen, als auch drei der fünf Cysteinmutanten von CAPG (C77S, C165S und C178S) eine deutlich geringere Zellkernfärbung nach Wasserstoffperoxidbehandlung auf. Dies spiegelte sich ebenfalls in der Quantifizierung wider. Die normierte Fluoreszenzintensität im Kernbereich der behandelten Zellen war im Vergleich zu den unbehandelten Zellen signifikant niedriger. Im Vergleich dazu zeigten die LN18-CAPG-His C282S- und C290S-Zellen keine signifikante Verringerung der Zellkernfärbung nach Wasserstoffperoxidbehandlung (Abbildung 45). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die posttranslationale oxidative Modifikation der beiden Cysteine, C282 und C290, von CAPG einen Einfluss auf die Translokation nach Stimulation mit Wasserstoffperoxid haben könnte.

#### 4.13.4 Lebendzell-Mikroskopie

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass die Behandlung mit Wasserstoffperoxid einen Einfluss auf die Zellkernlokalisierung des wildtypischen CAPG hat. Durch gezielte Mutagenese der einzelnen Cysteine konnte im nächsten Schritt nachgewiesen werden, dass die oxidative posttranslationale Modifikation der beiden Cysteine, C282 und C290, eine Rolle für die geringer werdende CAPG-Menge im Kern spielen könnte. Um artifizielle Effekte durch die Fixierung der Zellen auszuschließen und vielleicht zu sehen, ob das im Kern lokalisierte CAPG nach Wasserstoffperoxidbehandlung aus dem Kern ins Zytoplasma transloziert, sollte der funktionelle Einfluss der beiden identifizierten Cysteine auf die Kernlokalisierung in lebenden Zellen, in Abhängigkeit der Wasserstoffperoxidbehandlung, mittels Lebendzell-Mikroskopie untersucht werden. Zudem kann durch die Verwendung eines anderen Konstruktes, bei dem die jeweilige CAPG-Variante an GFP fusioniert ist, ausgeschlossen werden, dass das Epitop bei der Antikörperbindung den Effekt auslöst. Deshalb wurden für die Lebendzelleexperimente die stabilen LN18-CAPG-GFP-, -CAPG-GFP C282S- und -CAPG-GFP C290S-Zelllinien verwendet. Die subzelluläre Lokalisation von CAPG oder der jeweiligen Cysteinmutante konnte durch das fusionierte GFP detektiert werden. Zunächst wurden die Zellen jeweils über einen Zeitraum

von ca. 5 Minuten im unbehandelten Zustand aufgenommen. Im Anschluss erfolgte die Wasserstoffperoxidzugabe, ohne die Unterbrechung der Aufnahmen, um den Fokus nicht zu verlieren. Danach wurden die Zellen noch für mindestens weitere 30 min aufgenommen. In Abbildung 46 sind exemplarisch Bilder vor, direkt nach und 15 Minuten nach Wasserstoffperoxidzugabe dargestellt, um den Einfluss der Behandlung auf die Proteinlokalisierung von CAPG oder der jeweiligen Cysteinmutante zu zeigen. In immunzytochemischen Färbungen konnte der Effekt auf die Kernlokalisierung von CAPG nach 15 Minuten nachgewiesen werden, weshalb dieser Zeitpunkt ebenfalls für diese Darstellung gewählt wurde.

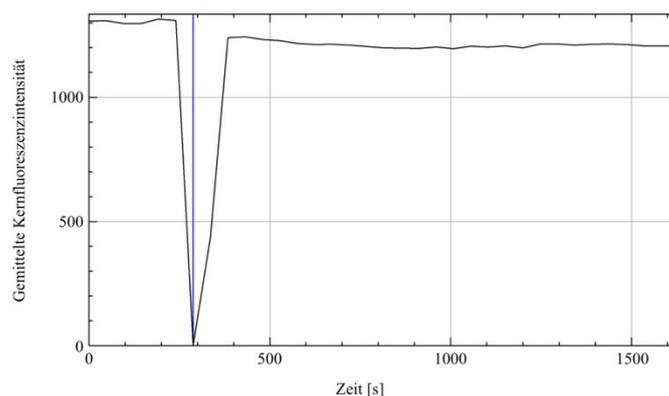
Vor Wasserstoffperoxidzugabe verteilte sich die jeweilige CAPG-Fusionsproteinvariante diffus im Zytoplasma und im Zellkern. Die Zellkernlokalisierung der beiden Cysteinmutanten, C282S und C290S, wurde, durch die Wasserstoffperoxidbehandlung während der Lebendzell-Mikroskopie unter den gewählten Bedingungen, nicht beeinflusst. Wohingegen bei den Zellen, die die wildtypische CAPG-GFP-Variante exprimierten, die Intensität der CAPG-Färbung im Kern 15 Minuten nach Wasserstoffperoxidzugabe abnahm. Zudem war eine erhöhte Menge des Proteins in Zellmembrannähe lokalisiert (Abbildung 46).



**Abbildung 46:** Extrahierte Aufnahmen zu Beginn, direkt nach der Wasserstoffperoxidzugabe und nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten mit Wasserstoffperoxid aus der Lebendzell-Mikroskopie von CAPG-GFP, CAPG-GFP C282S und CAPG-GFP C290S in LN18-Zellen. Die Lebendzell-Aufnahmen wurden am konfokalen hochauflösenden System *Leica TCS SP8STED 3X* bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> aufgenommen.

Die beobachteten Verteilungen in den lebenden Zellen stimmten mit der Lokalisation der jeweiligen CAPG-Variante in den fixierten Zellen überein. Somit scheint der GFP-Tag die Lokalisation der jeweiligen Variante von CAPG nicht zu beeinflussen.

Die Quantifizierung der Intensität der Zellkernfärbung über die Zeit gelang nur exemplarisch für den Wildtyp, da die anderen Zellen sich stärker bewegten. Die gemittelte Intensität der CAPG-Zellkernfärbung lag im unbehandelten Zustand bei etwas über 1300. Nach Wasserstoffperoxidzugabe (final 100  $\mu\text{M}$ ) wurde nur noch eine Intensität von ca. 1200 detektiert, die über 60 min nicht mehr auf den Anfangswert anstieg (Abbildung 47). Somit bestätigen die Ergebnisse aus der Lebendzell-Mikroskopie die Daten aus den vorangegangenen immunzytochemischen Färbungen und zeigen, dass die oxidative posttranslationale Modifikation der beiden Cysteine, C282 und C290, einen Einfluss auf die Zellkernlokalisierung von CAPG hat und eine funktionelle Relevanz besitzt. Zusätzlich konnte anhand der gewonnenen Ergebnisse ein Artefakt, das durch die veränderte Epitopbindung zustande kommen könnte, ausgeschlossen werden.



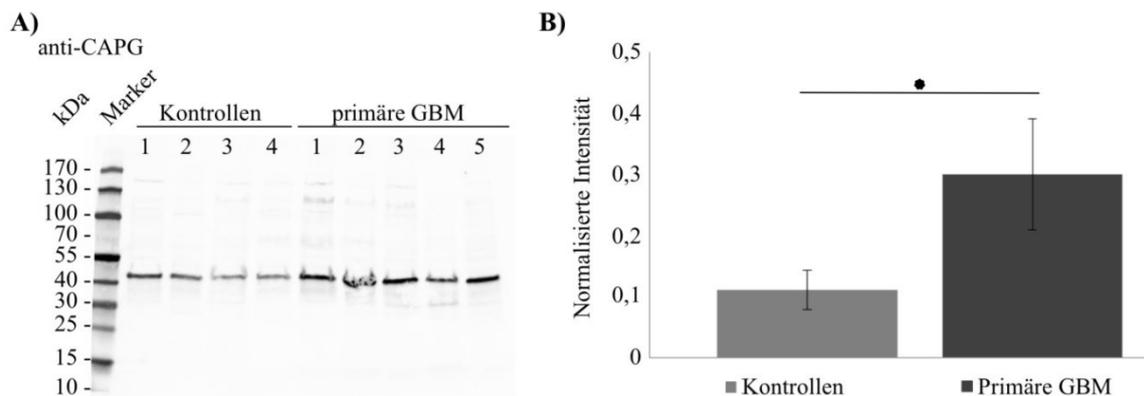
**Abbildung 47: Exemplarischer *Profile Plot* der gemittelten Zellkernfluoreszenz für eine CAPG-GFP-Zelle über die Zeit.** Auf der y-Achse ist die gemittelte Kernfluoreszenz für eine CAPG-GFP-Zelle gegen die Zeit in Sekunden (x-Achse) aufgetragen. Der Abfall auf 0 zeigt den Zeitpunkt der Wasserstoffperoxidzugabe (final 100  $\mu\text{M}$ ), bei der die Aufnahme nicht unterbrochen wurde.

## 4.14 CAPG-Abundanz in humanen Gliomen

### 4.14.1 Erhöhte CAPG-Menge in humanen primären GBM-Proben

Yun und Kollegen haben bereits gezeigt, dass der mRNA- und Proteinspiegel von CAPG in humanen Gliomen signifikant erhöht ist und dass eine höhere Menge an CAPG als unabhängiger Faktor zur Vorhersage einer ungünstigen Prognose dienen könnte (Yun *et al.*, 2018). Um dies zu verifizieren wurde im Rahmen dieser Arbeit die CAPG-Abundanz anhand eines Sets an Tumorproben untersucht. Es standen vier Kontrollproben, die aus dem Cerebellum stammen, und fünf primäre GBM-Proben zur Verfügung. Um nachzuweisen, dass die Proteinmenge an CAPG in den Tumorproben signifikant erhöht ist, wurde CAPG immunologisch mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen (Abbildung 48). Die

Western Blot Analyse, bei der die Gesamtmenge an Protein zur Normalisierung der CAPG-Intensitäten verwendet wurde, ist im Anhang in Abbildung 63 dargestellt.



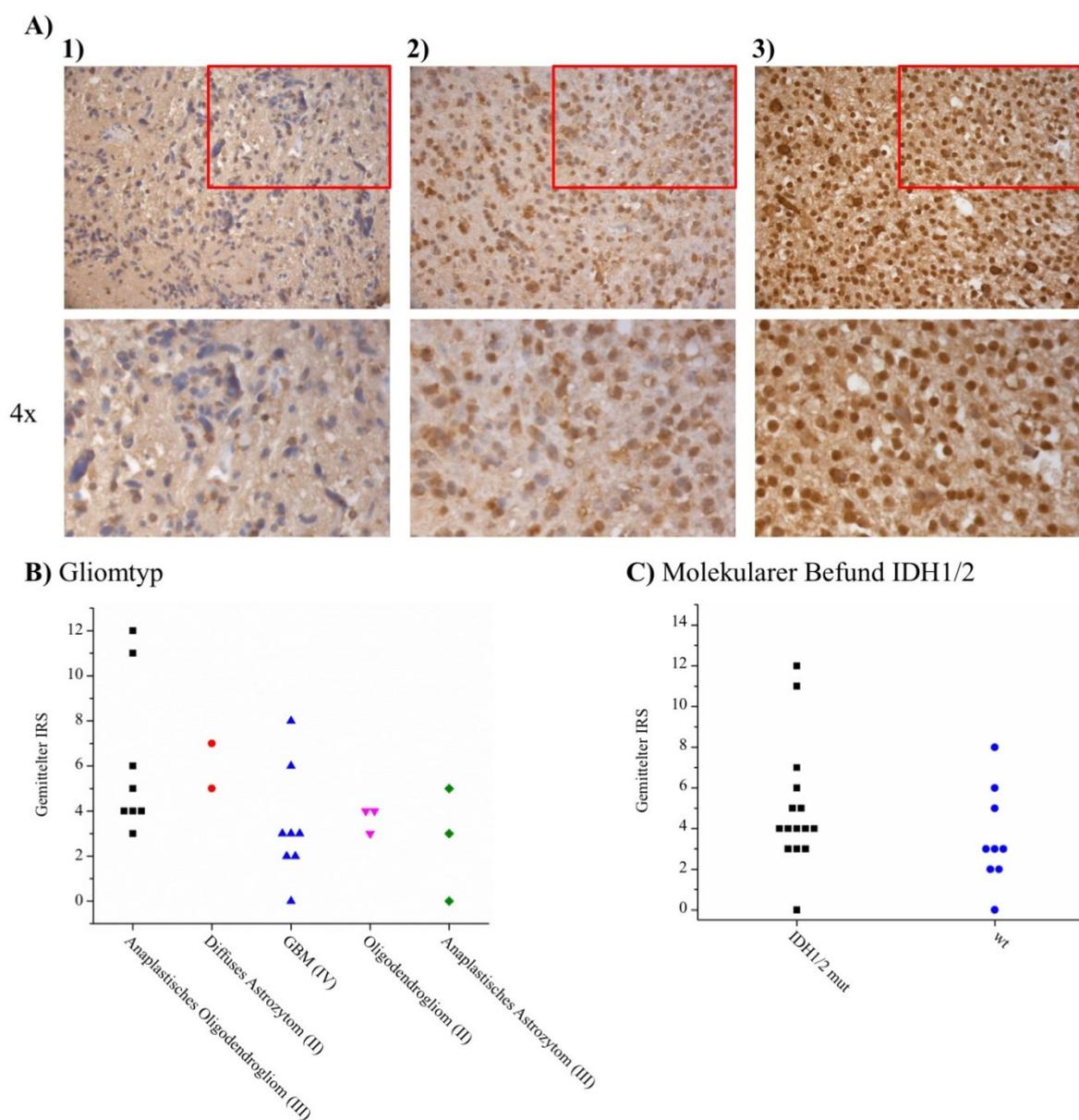
**Abbildung 48: Western Blot Analyse der CAPG-Menge in humanen Cerebellumproben im Vergleich zu primären humanen GBM-Proben.** In A) wurden die Proteine über ein 4-15 %-iges *Stain free* Gel unter denaturierenden Bedingungen analysiert und das humane Protein CAPG mit einem spezifisch gegen CAPG gerichteten Antikörper (CAPG AK 1) nachgewiesen. In B) sind die quantifizierten Bandenintensitäten für CAPG dargestellt. Normalisiert wurde die jeweilige Bande von CAPG auf die gesamte Proteinmenge der entsprechenden Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen. Die quantitative Analyse (T-Test) zeigte eine signifikant erhöhte Proteinabundanz von CAPG in den primären GBM-Proben im Vergleich zu den Kontrollproben ( $p = 0,0177$ ). [Kontrollen = Proben aus dem Cerebellum; primäre GBM = primäre Glioblastomproben; \* =  $p \leq 0,05$ ]

CAPG konnte sowohl in den Kontrollproben, als auch in den primären GBM-Proben immunologisch nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte im Vergleich zu den Kontrollproben in den primären GBM-Proben eine signifikant höhere Proteinmenge an CAPG ( $p = 0,0177$ ) nachgewiesen (Abbildung 48) und so die Ergebnisse aus der Literatur bestätigt werden.

#### 4.14.2 Subzellulärer Nachweis von CAPG in immunhistochemischen Färbungen humaner Gliome

In Studien wurde eine Expression von CAPG im Zytoplasma unterschiedlicher Gliomproben in immunhistochemischen Färbungen (IHC) nachgewiesen. Dabei zeigten höhergradige Gliome (WHO Grad III und IV) eine stärkere Immunreaktivität als niedrig-gradige Gliome (Yun et al. 2018). Das erlaubte eine Korrelation zwischen einer signifikant erhöhten Proteinmenge an CAPG mit hoch-gradigen Gliomen. In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die oxidative Modifikation der beiden Cysteine, C282 und C290, die subzelluläre Proteinlokalisierung von CAPG in humanen Glioblastomzelllinien beeinflusst (4.13.3). Bereits bekannt ist ebenfalls, dass Redoxprozesse in Glioblastomen eine wichtige Rolle spielen (Salazar-Ramiro et al., 2016). Deshalb sollte im letzten Schritt untersucht werden, ob sich eine subzelluläre Veränderung von CAPG auch in humanen verschieden-gradigen Gliomen findet. Denn wenn es Tumore mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation von CAPG gäbe, könnte das möglicherweise als Surrogatmarker für den Redoxzustand der Tumorzelle

herangezogen werden. Um dies zu untersuchen, wurde, in Kooperation mit Dr. Christiane Knobbe-Thomsen, die subzelluläre Lokalisation von CAPG mittels immunhistochemischen Färbungen von humanen Tumorgewebeproben verschieden-gradiger Gliome angeschaut. Alle Schnitte wurden gegen CAPG gefärbt und die Zellkernfärbung mit Hilfe des Immunreaktiv-Scores (IRS) quantifiziert. In Abbildung 49 wurden ausgewählte Färbungen exemplarisch dargestellt.



**Abbildung 49: Expressionsprofilanalyse von CAPG in einer Kohorte von 24 verschieden-gradigen Gliompatienten unter Verwendung von immunhistochemischen Färbungen.** In A) sind exemplarische IHC-Färbungen dargestellt, bei denen jeweils ein Ausschnitt vierfach vergrößert wurde. Das humane Protein CAPG wurde mit einem spezifisch gegen CAPG gerichteten Antikörper (CAPG AK 1) nachgewiesen und in Blau sind die Zellkerne gegengefärbt wurden. CAPG ist sowohl innerhalb der Kerne als auch im Zytoplasma lokalisiert, wobei die CAPG-Verteilung heterogen ist. In B) ist der berechnete Immunreaktiv-Score (IRS) für die CAPG-Färbung im Kern gegen die histologische Einordnung der Gliome dargestellt und in C) gegen den molekularen Befund von IDH-Mutationen. [1) IRS = 0, WHO-Grad: IV, Histologie: K27M-mutiertes Gliom, IDH:wt; 2) IRS = 4, WHO-Grad: II, Histologie: Oligodendrogliom, IDH2-Mutation; 3) IRS = 12, WHO-Grad: III, Histologie: Anaplastisches Oligodendrogliom, IDH1-Mutation/ IDH = Isocitrat Dehydrogenasen; wt = Wildtyp]

Bei der semiquantitativen Betrachtung der Kernlokalisierung von CAPG in den unterschiedlichen Gliomen, unterteilt nach ihrer Histologie zeigte sich eine sehr heterogene Verteilung. 2016 hat die Weltgesundheitsorganisation (WHO) eine neue Klassifizierung für Tumore herausgegeben, welche erstmals auch molekulare Unterschiede zwischen den Tumoren berücksichtigte (Louis *et al.*, 2016). Für die molekulare Einteilung der unterschiedlichen Gliome spielen die Isocitrat-Dehydrogenasen 1 und 2 (IDH1 und IDH2) und deren Mutationen eine wichtige Rolle. Denn aus prognostischer Sicht zeigen Patienten, bei denen ein IDH1 mutiertes Gliom diagnostiziert wurde, eine signifikant höhere Überlebensrate (Hartmann *et al.*, 2010; Sanson *et al.*, 2009). Deshalb wurde die Kernlokalisierung von CAPG auch im Hinblick auf den molekularen Befund betrachtet. Eine Tendenz deutet daraufhin, dass bei Tumorproben, die die wildtypische Isocitrat-Dehydrogenase 1 oder 2 enthalten, weniger CAPG im Kern nachgewiesen wurde. Dieser Unterschied war unter den gewählten Bedingungen und der Stichprobenanzahl jedoch nicht signifikant (p-Wert = 0,17).

## 5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von CAPG als redox-sensitives Protein im Kontext humaner Tumorzelllinien zu untersuchen. Bereits bekannt ist, dass CAPG aufgrund seiner aktinblockierenden Eigenschaft mit einer Vielzahl weiterer aktinbindender Proteine an der Regulation des Aktinzytoskeletts und somit an der Zellbewegung und -kontraktion beteiligt ist (Pellieux *et al.*, 2003; Witke *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2009). In einer Reihe unterschiedlicher Tumorentitäten wurde eine CAPG-Überexpression mit der Tumorgenese in Zusammenhang gebracht (Dahl *et al.*, 2005; Lal *et al.*, 1999; Shao *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 2007; Van Ginkel *et al.*, 1998) und CAPG als Biomarker vorgeschlagen (Renz *et al.*, 2008; Van Impe *et al.*, 2013). Erste Hinweise aus einer Proteomstudie deuten darauf hin, dass es sich bei CAPG auch um ein redox-sensitives Protein handeln könnte (Poschmann *et al.*, 2015) und das es weitere zelluläre Funktionen hat (Huang *et al.*, 2018). Bisher wurden in der Literatur noch keine posttranslationalen oxidativen Cysteinmodifikationen an CAPG beschrieben. Aus diesem Grund widmet sich diese Arbeit der Charakterisierung der Redoxsensitivität von CAPG im Kontext der Tumorgenese von Glioblastomen.

### 5.1 Methodische Diskussion

#### 5.1.1 Methodische Aspekte zur Analyse von redox-sensitiven Proteinen

##### 5.1.1.1 Gezielte Analyse des CAPG-Redoxstatus

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden angewandt, um redox-sensitive Proteine nachzuweisen. Die Identifizierung und Charakterisierung oxidativer Modifikationen stellt aufgrund der substöchiometrischen Mengen und Labilität eine enorme Herausforderung in der Bioanalytik dar (Seo und Lee, 2004).

Für den Nachweis, dass es sich bei CAPG tatsächlich um ein redox-sensitives Protein handelt, wurde in dieser Arbeit zunächst das PEG-*Switch* Protokoll nach Burgoyne *et al.* etabliert. Denn z. B. Ingold *et al.* (2018) gelang es mit der PEG-*Switch* Technik erfolgreich den Redoxstatus des aktiven Zentrums von GPX4 direkt zu überwachen (Ingold *et al.*, 2018). Der PEG-*Switch* Ansatz bietet den Vorteil, bei Vorhandensein eines geeigneten Antikörpers, die Anzahl der redox-sensitiven Cysteine des Kandidatenproteins unmittelbar zu detektieren. Doch ohne weiteres war der Nachweis von oxPTM am endogenen CAPG nicht möglich und die Anreicherung per Antikörper nicht erfolgreich. Deshalb wurde das Konstrukt (pcMV3-CAPG-His) zur Überexpression von CAPG in zwei humane Glioblastomzelllinien (A172 und LN18) transfiziert, um eine größere Proteinmenge für die anstehenden Experimente zu erhalten. Daraufhin konnte eine Molekulargewichtsverschiebung von 10 kDa

im PEG-*Switch Assay* detektiert werden. Diese deutet daraufhin, dass zwei der fünf Cysteine von CAPG in unbehandelten A172-CAPG-His-Zellen oxidiert vorliegen. Die Behandlung mit Wasserstoffperoxid führte zu einer Zunahme der PEGylierten Form von CAPG, was ein Hinweis darauf ist, dass noch mehr Protein in der oxidierten Form vorzuliegen scheint. Diese Ergebnisse ließen sich ebenfalls in einer weiteren Zelllinie (LN18-CAPG-His-Zellen) reproduzieren.

Für die im nächsten Schritt positionsgenaue Ermittlung der reversibel oxidativ modifizierten Cysteine, stehen eine Reihe von thiolreaktiven Reagenzien zur Verfügung, wie z. B. Iodoacetamid (IAM), iodoTMT oder isotopenmarkierte, biotinylierte, thiolreaktive Chemikalien, wie ICAT. Das iodoTMT-Reagenz bindet spezifisch und irreversibel freie Thiole, die im nächsten Schritt mit Hilfe dieses *Tags* angereichert und anschließend über eine MS-Analyse analysiert werden können (Araki *et al.*, 2016). Im Vergleich werden bei der OxICAT-Methode die reduzierten Thiole zunächst mit der isotopisch leichten <sup>12</sup>C-ICAT-Variante und oxidierte Thiole nach Reduktion mit der isotopisch schweren <sup>13</sup>C-ICAT-Variante differenziell markiert, über den *Tag* angereichert, proteolytisch verdaut und über LC-MS/MS analysiert. Der Oxidationszustand des Cysteins kann dann direkt aus dem Verhältnis von schwer und leicht markiertem Cystein bestimmt werden (Jakob und Leichert, 2009). Ein Vorteil der Isotopenmarkierung ist dabei, dass der oxidative Zustand der Cysteine arretiert wird, weil die freien Thiole im ersten Schritt mit einem thiolreaktiven Reagenz reagieren und dann nicht mehr durch Luftsauerstoff weiter oxidiert werden können, um so möglicherweise zu falsch positiven Ergebnissen zu führen.

In dieser Arbeit wurde sich für ein differenzielles Markierungsexperiment mit dem thiolreaktiven Reagenz IAM und einer isotopenmarkierten Variante von IAM, IAM-D4, entschieden. Denn diese thiolreaktiven Reagenzien besitzen den Vorteil, dass sie weniger sterisch anspruchsvolle chemische Strukturen aufweisen, als iodoTMT- oder ICAT-Reagenzien, wodurch die Effizienz der Thiolmarkierung erhöht wird (Yang *et al.*, 2016). Da sich darüber hinaus in Vorarbeiten gezeigt hat, dass der Nachweis von oxPTM für CAPG ohne jegliche Form der Anreicherung nur in einzelnen Replikaten möglich war, wurde das Fusionsprotein über den c-terminalen His-*Tag* affinitätschromatographisch aus den A172-CAPG-His-Zellen aufgereinigt, um die Proteinausbeute zu erhöhen. Mit diesem Ansatz konnten alle Cystein-enthaltenden Peptide detektiert und das Verhältnis von IAM-D4 zu IAM kalkuliert werden. Da es zwei CAPG-Peptide gibt, in denen je zwei der Cysteine liegen, gestaltete sich die Quantifizierung als schwierig, weil die Lokalisation der Markierung mit

IAM oder IAM-D4 nicht in allen Fällen positionsgenau auf eines der Cysteine desselben Peptides zurückgeführt werden konnte, da der *Precursor* für beide dieselbe Masse aufweist. Deshalb konnte mit diesem Ansatz nicht zwischen den Cysteinen C165 und C178, sowie C282 und C290 unterschieden werden. Nichtsdestotrotz konnte mit der gewählten Methode über das berechnete Verhältnis von IAM-D4 zu IAM nachgewiesen werden, dass das Cystein C77, sowohl in den unbehandelten als auch in den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Proben nicht reversibel oxidiert vorzuliegen scheint. Für eines der Cysteine, C165 oder C178, die im selben Peptid liegen, lag das Verhältnis ebenfalls unter eins, was für keine vorherige Oxidation an einer dieser oder beiden Positionen spricht. Im Vergleich deutet das berechnete Verhältnis zwischen IAM-D4 und IAM für die Cysteine C282 und C290 in den unbehandelten Proben auf eine vorherige reversible Oxidation dieser Cysteinreste. Im Vergleich zu den unbehandelten Proben, lag das Verhältnis in den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Proben unter eins. Dies könnte durch eine mögliche Überoxidation zu einer Sulfin- ( $\text{SO}_2\text{H}$ ) oder Sulfonsäure ( $\text{SO}_3\text{H}$ ) in Folge der Wasserstoffperoxidbehandlung erklärbar sein (Griendling *et al.*, 2016; Murray und Van Eyk, 2012; Pan und Carroll, 2014). Zusätzlich wurden die beiden Cysteine C282 und C290 auch beide gleichzeitig mit IAM-D4-Markierung identifiziert. Das kalkulierte Verhältnis zeigte denselben Verlauf, wie wenn nur eines der beiden Cysteine mit IAM-D4-Markierung gefunden wurde. Somit kann angenommen werden, dass mindestens eins der beiden Cysteine (C282 oder C290) sensitiv für die Oxidation ist. Basierend auf einem vergleichbaren Ansatz konnten Danielson *et al.* (2011) unter Verwendung der differentiellen Alkylierung von Cysteinresten mit NEM und NEM-D5 den reversiblen Oxidationszustand von 34 verschiedenen Cysteinresten in 17 Komplex I-Untereinheiten analysieren (Danielson *et al.*, 2011). Khasai *et al.* (2011) und Chouchani *et al.* (2013) nutzten ebenfalls einen vergleichbaren Ansatz, um reversibel oxidierte Cysteinreste eines einzelnen Rezeptors (Khasai *et al.*, 2011) oder Komplexes (Chouchani *et al.*, 2013) erfolgreich nachzuweisen. McDonagh *et al.* (2014) gelang es darüber hinaus mit einem ähnlichen Ansatz sogar global den reversiblen Redoxzustand spezifischer Cysteinreste in unterschiedlichen Muskelproben zu identifizieren und quantifizieren (McDonagh *et al.*, 2014).

In meiner Masterarbeit fand ich keinen Hinweis auf eine Glutathionylierung oder Sulfonylierung der einzelnen Cysteine von CAPG (Schmidt, 2016). In Vorexperimenten konnten oxPTM nicht reproduzierbar bestimmt werden. Aus diesem Grund und um zwischen den Cysteinen desselben Peptides unterscheiden zu können, wurde für eine detaillierte

Analyse ein zielgerichtetes massenspektrometrisches Experiment aufgesetzt. Der Vorteil zielgerichteter Methoden, wie SRM (engl.: *selected reaction monitoring*) oder PRM (engl.: *parallel reaction monitoring*), besteht in der hohen Spezifität und Sensitivität (Lange *et al.*, 2008; Picotti und Aebersold, 2012). Wobei ein PRM-Experiment gegenüber einem SRM-Experiment den Vorteil hat, dass das Aufsetzen der Methode einfacher ist, weil eine Vorauswahl von Zielübergängen nicht erforderlich ist. Darüber hinaus bietet die PRM-Methode eine hohe Spezifität, weil die MS/MS-Daten in einem hochauflösenden Modus erfasst werden. Zudem wird ein vollständiges MS/MS-Spektrum aufgenommen, das alle potenziellen Produktionen enthält und die Identität des Zielpeptids bestätigt (Rauniyar, 2015; Shi *et al.*, 2012).

Aufgrund der überwiegenden Vorteile wurde in dieser Arbeit ein zielgerichtetes PRM-Experiment etabliert und gezielt nach einem intramolekularen Disulfid, sowie nach einer Zweifach- (Di-) und Dreifach-Oxidation (Trioxidation) an den beiden Cysteinen, C282 und C290, gesucht. Da vorab gezeigt werden konnte, dass diese beiden Cysteine sensitiv für die Oxidation sind und es Hinweise auf diese spezifischen Modifikationen gab. Mit diesem Versuchsansatz wurden die Cysteine, C282 und C290, sowohl beide IAM-markiert identifiziert, als auch eine Trioxidation an dem Cystein C290 detektiert. Die gemessenen Intensitäten für die Trioxidation an Position C290 waren relativ niedrig, obwohl das Protein in den Zellen überexprimiert wurde und ein zielgerichteter Ansatz verwendet wurde. Das spricht dafür, dass unter den gewählten Bedingungen nur ein Teil des Proteins oxidiert vorlag. Wodurch eine regulatorische Funktion des Cysteins C290 von CAPG angenommen werden kann und überprüft werden sollte. Die gewonnenen Ergebnisse verdeutlichen auch die Annahme, dass die Identifizierung und die Charakterisierung von PTM trotz der technischen Möglichkeiten immer noch eine große Herausforderung darstellen (Duan *et al.*, 2017; Seo und Lee, 2004), weil häufig innerhalb der Zelle nur ein geringer Anteil des Proteins aufgrund seiner regulatorischen Funktion modifiziert vorliegt.

Der Nachweis eines intramolekularen Disulfides zwischen den Cysteinen C282 und C290 gelang nur vereinzelt in massenspektrometriebasierten Vorexperimenten in A172-Zellen (Anhang Abbildung 64). In dieser Arbeit konnte mit Hilfe des zielgerichteten Experimentes jedoch kein Disulfid zwischen den Cysteinen C282 und C290 reproduzierbar nachgewiesen werden. Die darüber hinaus durchgeführten MD-Simulationen zeigten unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen und unter der Annahme, dass die publizierte Struktur sich unter unterschiedlichen Bedingungen nicht verändert, dass eine Disulfidbrücke zwischen den

Cysteinen C282 und C290 ausgeschlossen werden kann, weil die Cysteine, C282 und C290, mit etwa 20 Å zu weit voneinander entfernt sind. Demnach wäre die Ausbildung eines intramolekularen Disulfides nur möglich, wenn es zu einer starken Strukturveränderung kommen würde, denn die übliche Länge einer Disulfidbrücke liegt bei etwa 2,05 Å.

Im letzten Schritt sollten die bislang erhaltenen massenspektrometrischen Ergebnisse mit einer unabhängigen Methode verifiziert werden. Dafür wurden das erfolgreich etablierte PEG-*Switch* Protokoll und die Cysteinmutanten von CAPG verwendet. Dabei unterdrückt die Mutagenese des jeweiligen Cysteinrestes zu einem Serin eine mögliche Oxidation an dieser Position. Im Vergleich zu dem wildtypischen CAPG-His und den anderen Cysteinmutanten von CAPG (C77S, C165S, C178S) konnte mit diesem Versuchsansatz gezeigt werden, dass bei den beiden Cysteinmutanten C282S und C290S wie erwartet keine Molekulargewichtsverschiebung von 10 kDa detektierbar war. Das bestätigt die vorangegangenen Ergebnisse und die Annahme, dass diese beiden Cysteine (C282 und C290) von CAPG sensitiv für die Oxidation sind. Da bei diesen Einzelmutanten keine Bande detektiert werden konnte, die einer Molekulargewichtsverschiebung von 5 kDa entsprach, deutet dies darauf hin, dass die oxidative Modifikation der beiden Cysteine C282 und C290 sich jeweils gegenseitig bedingen könnte.

### 5.1.1.2 Globale Identifizierung von redox-sensitiven Proteinen mittels Proteomanalyse

Bei den oxidativen posttranslationalen Cysteinmodifikationen (oxPTM) handelt es sich um eine weitere Klasse von PTM mit der eukaryotische Zellen in der Lage ist Informationen weiterzuleiten, welche bisher jedoch wenig erforscht sind. Da die Identifizierung modifizierter Cysteinreste im gesamten Proteommaßstab eine technische Herausforderung bleibt, werden als Standard mehrstufige Protokolle zur Anreicherung von Cystein-enthaltenden Peptiden verwendet (van der Reest *et al.*, 2018). In dieser Arbeit wurde die spezifische Aufarbeitung und Anreicherung von reversiblen Cysteinmodifikationen auf Proteinebene über eine Thiopropyl Sepharose 6B-Matrix nach dem modifizierten Protokoll nach Guo *et al.* (2014) für die massenspektrometrie-basierte Analyse von oxPTM verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung mit Wasserstoffperoxid zur reversiblen Oxidation von Cysteinresten führt und einen Einfluss auf das A172-Redox-Proteom hat. Wohingegen auf Proteomebene keine Veränderungen nach Behandlung detektiert werden konnten (Anhang Abbildung 58 und Abbildung 59). Somit bestätigen die Ergebnisse die Annahme, dass eine Anreicherung von Proteinen oder Peptiden, die eine reversible oxPTM aufweisen, unabdingbar ist, um diese zu identifizieren und deren Rolle untersuchen zu können. Mit dem gewählten Versuchsansatz

konnten nach Behandlung 382 redox-sensitive Proteine, die über viele zelluläre Kompartimente verteilt und mit unterschiedlichen biologischen Prozessen assoziiert sind, identifiziert werden. Wovon bereits einige auch in der Literatur als redox-sensitive Proteine beschrieben sind, wie z. B. Thioredoxin (TXN), welches an verschiedenen Redoxreaktionen, durch die reversible Oxidation der beiden Cysteine in seinem aktiven Zentrum zu einem Disulfid beteiligt ist und Dithiol-Disulfid-Austauschreaktionen katalysiert (Gitler *et al.*, 2002; Holmgren, 1985). Zu den 382 Proteinen zählten ebenfalls die aktinbindenden Proteine, Cofilin (Samstag *et al.*, 2013) und Profilin 2, die auch schon in der Literatur als redox-sensitive Proteine beschrieben sind. Als Folge einer strukturellen Veränderung von Cofilin nach Oxidation verliert es die Fähigkeit zur Aktindepolymerisation (Klemke *et al.*, 2008), wodurch es eine Schlüsselrolle bei der Modulation der Aktindynamik einnimmt. Für das in dieser Arbeit untersuchte humane Protein CAPG konnte ebenso eine signifikant veränderte Proteinabundanz nach Wasserstoffperoxidbehandlung und Bindung an die TPS-Matrix gezeigt werden. Dabei wurden die Cysteine an den Positionen C282 und C290 als carbamidomethyliert detektiert, was die vorangegangenen Ergebnisse bestätigt und dafürspricht, dass es sich bei CAPG somit um ein redox-sensitives Protein handelt.

Fu *et al.* (2017) etablierten ihrerseits eine chemoproteomische Strategie, die als quantitatives Thiol-Reaktivitätsprofil (QTRP) bezeichnet wird. Wobei bei der Auswertung eine Aussage über die für die Oxidation sensitiven Cysteine in Folge der Wasserstoffperoxidbehandlung, durch die Bildung des Verhältnisses zwischen leicht und schwer markiertem UV-spaltbarem Azido-Biotins getroffen werden kann. Dafür behandelten sie Zellen mit sechs verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen von 0,02 mM bis 5 mM, um in vier verschiedenen humanen Zelllinien unterschiedliche Redoxzustände zu analysieren. Die Zellen wurden für 10 Minuten mit Wasserstoffperoxid behandelt, um frühe Veränderungen des Redoxzustandes zu analysieren. Dabei wurden drei biologische Replikate für jede Konzentration in allen Zelllinien erstellt, was in insgesamt 72 LC-MS/MS-Läufen resultierte. Die Datensätze zeigten, dass verschiedene Zelllinien unterschiedliche und weitestgehend nicht überlappende Wasserstoffperoxid-Redoxome aufwiesen. Wobei die U2OS-Zellen mit 510 die höchste Anzahl an redox-sensitiven Cysteinen nach Wasserstoffperoxidbehandlung aufwiesen, gefolgt von A431-Zellen mit 360, HepG2 mit 152 und HEK293 mit 48. In diese Betrachtung fielen nur Cysteine, für die ein Verhältnis zwischen der leicht zu schwer markierten Variante kalkuliert werden konnte. Im Vergleich zu dem Ansatz von Fu *et al.* (2017) konnten mit dem in dieser Arbeit verwendeten Ansatz, aufgrund einer fehlenden Fraktionierung sowohl Zeit, als auch Kosten gespart und trotzdem vergleichbar viele redox-sensitive Proteine nach

Wasserstoffperoxidbehandlung identifiziert werden. Zusätzlich konnte anhand der bekannten redox-sensitiven Proteine, die in der A172-Redox-Proteom-Studie identifiziert wurden, gezeigt werden, dass sich das in dieser Arbeit verwendete Modellsystem eignet, um etwaige Einflüsse auf den Redoxstatus von Proteinen untersuchen zu können.

Die Reaktionsfähigkeit der Thiole liefert die Basis für eine Vielzahl unterschiedlicher posttranslationaler Modifikationen und Mechanismen für die Proteinregulation. Die daraus resultierende Komplexität macht die Verwendung von einer Reihe analytischer Methoden zur Charakterisierung und Messung von Oxidationsstufenänderungen von Thiolen notwendig. Die fortschreitende Verbesserung von proteomischen Methoden in der biologischen Forschung hat ebenfalls Einflüsse auf die Analyse von oxPTM (Eaton, 2006; Sheehan und McDonagh, 2019). Neben der Information über den Redoxzustand vieler Proteine bietet ein proteomweiter Ansatz, wie die in dieser Arbeit verwendete spezifische Aufarbeitung und Anreicherung von reversiblen Cysteinmodifikationen auf Proteinebene, nach dem modifizierten Protokoll nach Guo für die massenspektrometrische Analyse, den Vorteil das verwendete Modellsystem rückwirkend validieren zu können. Darüber hinaus werden erste Hinweise über die Position, an der die Modifikation lokalisiert ist, erhalten. Allerdings zeigte sich, dass auf Kosten eines globalen *Readouts*, sich nicht für alle Cysteine von CAPG detaillierte Informationen über den Redoxzustand erhalten ließen. Grund dafür mag die geringe Abundanz von CAPG im Vergleich zu anderen Proteinen in den Zellen sein. Gezielte Ansätze, wie der *PEG-Switch Assay* reichen aus, um die Anzahl der Cysteine eines Kandidatenproteins, die sensitiv für die Oxidation sind, zu bestimmen. Im Vergleich zu globalen massenspektrometrischen Ansätzen bietet diese Methode den Vorteil, dass sie kostengünstiger und weniger zeitintensiv durchgeführt werden kann, wenn ein geeigneter Antikörper zur Verfügung steht. Überdies hinaus bieten gezielte massenspektrometrische Methoden den Vorteil, dass noch weitere Informationen über die absolute Menge des Proteins, die Stöchiometrie etwaiger Modifikationen und deren Veränderung über unterschiedliche Behandlungszustände erhalten werden.

### **5.1.2 Methodische Aspekte der Identifizierung potenzieller redox-sensitiver Interaktionspartner von CAPG**

Viele experimentelle Methoden, einschließlich der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse (engl.: *yeast two-hybrid analysis*; Y2H), sowie massenspektrometrische und affinitätschromatographische Ansätze, stehen zur Bestimmung von Interaktionspartnern zur Verfügung. Das Zwei-Hybrid-System ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden zum *Screening* oder

zur Bestätigung von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Es basiert auf der Tatsache, dass viele eukaryotische Transkriptionsaktivatoren zwei unterschiedliche funktionelle Domänen haben. Eine, die an eine Promotor-DNA-Sequenz (engl.: *binding domain*, BD) bindet und eine, die die Transkription (engl.: *activating domain*, AD) aktiviert. Deshalb werden zwei Plasmide konstruiert. Das erste Plasmid codiert ein Köderprotein, das an eine BD fusioniert ist. Das zweite Plasmid codiert ein Zielprotein, das an eine AD fusioniert ist. Die zwei Fusionskonstrukte werden dann in derselben Zelle coexprimiert. Wenn die Köder- und Zielproteine interagieren, werden die beiden Hälften (BD und AD) zu einem intakten und funktionellen Transkriptionsaktivator zusammengeführt. Die Vorteile des Y2H-Systems bestehen darin, dass es die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in zumindest *in vivo*-ähnlichen Verhältnissen, d. h. im Milieu einer Zelle und mit in Eukaryoten vorkommenden posttranslationalen Modifikationen ermöglicht, es relativ kostengünstig ist und wenig Optimierung erfordert. Dem gegenüber stehen viele Nachteile, wie z. B. das nur binäre Wechselwirkungen untersucht werden können und das eine große Anzahl an falsch positiven Ergebnissen erhalten wird (Berggård *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 1994). Eine der beliebtesten Techniken ist nach wie vor die Co-Immunpräzipitation (Co-IP) insbesondere, wenn für diese der Einsatz des endogenen Proteins ausreicht. Bei dieser Methode wird das Zielprotein mit einem spezifischen Antikörper isoliert und die mit dem Protein interagierenden Proteine immunologisch per Western Blot Analyse nachgewiesen. Bei dieser Methode handelt es sich allerdings nicht um einen *Screening*-Ansatz, weil nur bereits bekannte bzw. vermutete Interaktionspartner validiert werden können (Lin und Lai, 2017). Ein Vorteil ist die Kompatibilität der Methode mit der massenspektrometrischen Analyse, wodurch auch neue Interaktionspartner identifiziert werden können (Maccarrone *et al.*, 2017). Wenn kein spezifischer Antikörper zur Verfügung steht können auch klassische affinitätschromatographische Methoden, bei denen das Zielprotein an einen Affinitätstag fusioniert ist, verwendet werden. Diese Methode bietet gegenüber den anderen die Vorteile, dass die interagierenden Proteine sofort in den richtigen Zellkompartimenten exprimiert und sie in *in-vivo*-ähnlichen Verhältnissen posttranslational modifiziert werden können. Zudem ist diese Methode mit massenspektrometrischen Ansätzen kompatibel, wodurch Interaktionen mit mehr als zwei Interaktionspartnern nachgewiesen werden können (Arnau *et al.*, 2006; Berggård *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit wurde die Anreicherung über einen *Tag* bevorzugt verwendet, weil in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, dass das Epitop bei einer Immunpräzipitation mittels eines gegen CAPG gerichteten Antikörpers, nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid

möglicherweise nicht mehr erkannt wird. Deshalb wurden im ersten Schritt für die Identifizierung des Interaktoms von CAPG in Abhängigkeit einer oxidierenden Umgebung LN18-Zellen verwendet, die das wildtypische Fusionsprotein CAPG-GFP stabil überexprimieren. Da unspezifische Bindungen an die GFP-Kopplung, den Vektor oder den Antikörper bei Immunpräzipitationsexperimenten häufig vorkommen (Markham *et al.*, 2007; Selbach und Mann, 2006), wurden zusätzlich LN18-Zellen genutzt in die der GFP-Leervektor stabil eingebracht wurde, um spezifisch mit GFP interagierende Bindungspartner ausschließen zu können. Die Untersuchung führte zu der Identifizierung von nur sechs potenziellen Interaktionspartnern von CAPG in den unbehandelten und zur Identifizierung von 11 potenziellen Interaktionspartnern in den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Proben, weil viele der identifizierten Proteine eine höhere Abundanz in der Leervektorkontrolle gezeigt haben, was für eine Interaktion mit dem GFP-Tag oder dem Vektor spricht. Bei der Betrachtung der zellulären Verteilung der identifizierten Interaktionspartner fiel auf, dass diese über viele Kompartimente verteilt sind und die meisten von Ihnen dem Zytoplasma und dem Nukleus zugeordnet werden konnten. Da sowohl Studien gezeigt haben (Gettemans *et al.*, 2005), dass CAPG konstitutiv im Zellkern und Zytoplasma vorliegt und es in dieser Arbeit ebenfalls per Fluoreszenzfärbung bestätigt wurde, ist eine Interaktion mit den identifizierten Proteinen durchaus möglich und eine Subfraktionierung nicht nötig. Zudem konnten sogar fünf potenzielle redox-abhängige Interaktionspartner identifiziert werden. Da es bislang keine vergleichbaren Redox-Interaktionsstudien in Glioblastomzelllinien gibt, ist ein Vergleich der identifizierten redox-abhängigen Interaktionspartner nicht möglich.

Um mehr Informationen über das CAPG-Interaktom, in Abhängigkeit der Behandlung mit Wasserstoffperoxid, erhalten zu können, wurde im nächsten Schritt, trotz fehlender Leervektorkontrolle, das Fusionsprotein CAPG-His aus unbehandelten bzw. mit Wasserstoffperoxid-behandelten A172-CAPG-His-Zellen affinitätschromatographisch aufgereinigt. Durch mehrfaches Waschen sollten unspezifische Interaktionspartner abgetrennt werden, bevor die Proben nach der Elution ebenfalls mittels LC-MS/MS analysiert wurden. Mit diesem Ansatz konnten erfolgreich mehr potenzielle redox-abhängige Interaktionspartner von CAPG identifiziert werden. Dabei kann angenommen werden, dass es sich vielleicht nicht nur um stabile, sondern auch zusätzlich um transiente Interaktionen handeln könnte. Bei der Betrachtung der beiden Netzwerke fiel jedoch auf, dass vor allem ribosomale Proteine, sowie Spleißfaktoren mit diesem methodischen Ansatz angereichert wurden. Diese Proteine sind bereits in der Literatur als häufige Kontaminanten bekannt, wodurch sie im nächsten Schritt einfach entfernt werden konnten (Mellacheruvu *et al.*, 2013), um mögliche kleinere

Interaktionsnetzwerke zu identifizieren. Nichtsdestotrotz könnte durch Verwendung einer Leervektorkontrolle die Kontaminantenanzahl möglicherweise von Anfang an geringer gehalten werden.

Wie im ersten Ansatz konnten mit dieser Methode ebenfalls potenzielle redox-abhängige Interaktionspartner identifiziert werden, die in ihrer zellulären Lokalisation zu CAPG passen.

## 5.2 Biologische Diskussion

Bisher ist wenig über die Rolle von oxPTM bei der Funktion von CAPG bekannt. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse geben zum erstmal Hinweis darauf, dass CAPG weitere redox-abhängige Funktionen aufweisen könnte. Diese neuen Funktionszusammenhänge von CAPG sollen hier aufgeführt und diskutiert werden.

### 5.2.1 Einfluss der einzelnen Cysteine von CAPG auf die Proteinfunktion

#### 5.2.1.1 Die Cysteine von CAPG haben keinen Einfluss auf die Inhibition der Aktinpolymerisation

Die Herausforderung nach der Identifizierung von posttranslationalen oxidativen Modifikationen besteht darin, diese in einen physiologisch relevanten Kontext zu setzen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beiden Cysteine von CAPG, C282 und C290, redox-sensitiv sind und als reversibel oxidiert vorlagen. Darüber hinaus konnte in einem zielgerichteten PRM-Experiment eine Trioxidation an Position C290 nachgewiesen werden, was möglicherweise den Schluss zulässt, dass der Redoxzustand der beiden Cysteine, C282 und C290, einen Einfluss auf die Hauptfunktion von CAPG, die Inhibition der Aktinpolymerisation, haben könnte. In der Literatur gibt es bereits eine Reihe von Beispielen für redox-sensitive Proteine, die eine Rolle bei der dynamischen Regulation des Zytoskeletts einnehmen, wie z. B. die aktinbindende Proteine Cofilin, Myosin, Profilin, Tropomyosin und Vimentin, die ihrerseits oxidative posttranslationale Cysteinmodifikationen aufweisen (Gellert *et al.*, 2015).

Für Aktin selbst wurden ebenfalls eine Reihe von posttranslationalen Modifikationen einschließlich Acetylierungen, Phosphorylierungen, Methylierungen und oxidativen Cysteinmodifikationen beschrieben (Terman und Kashina, 2013; Yazar *et al.*, 2005). Die meisten Redoxmodifikationen sind mit Konformationsänderungen verbunden, die sowohl die Polymerisation und Depolymerisation, als auch die Interaktion mit Bindungspartnern beeinflussen (Wilson *et al.*, 2016). Der dynamische Auf- und Abbau des Aktinzytoskeletts wird unter anderem über Redoxsignale reguliert. (Gellert *et al.*, 2015). Die Oxidation von Cofilin erhöht beispielsweise das Verhältnis von F- zu G-Aktin in der Zelle, indem verhindert

wird, dass Cofilin Aktin durchtrennt (Klamt *et al.*, 2009). Denn Cofilin verliert die Fähigkeit zur Aktindepolymerisation als Folge einer strukturellen Veränderung nach Oxidation (Klemke *et al.*, 2008), wodurch es eine Schlüsselrolle bei der Modulation der Aktindynamik einnimmt. Dabei sind sowohl vier Cysteine des Cofilins (C39, C80, C139 und C147), als auch das Methionin an Position 115 sensitiv für die Oxidation (Bernstein *et al.*, 2012; Cameron *et al.*, 2015; Schulte *et al.*, 2013).

Die oben genannten Beispiele verdeutlichen exemplarisch, dass eine Redoxregulation physiologisch relevant ist. Daher sollte der Hypothese nachgegangen werden, ob die Cysteine von CAPG eine relevante Rolle bei der Aktinpolymerisation spielen. Zu diesem Zweck wurden alle Cysteine von CAPG gegen ein Serin ausgetauscht.

Im ersten Schritt konnte gezeigt werden, dass alle Cysteinmutanten analog zum wildtypischen CAPG funktionell aktiv waren und signifikant die Aktinpolymerisation hemmten. Somit scheint es, dass die Cysteine von CAPG unter den gewählten Bedingungen anscheinend keine wesentliche Rolle bei der kanonischen *Capping*-Funktion, nämlich der Inhibition der Aktinpolymerisation, spielen. In einem vergleichbaren Ansatz konnten Schulte *et al.* (2013) zeigen, dass die Cysteinmutanten eine Rolle bei der Funktion von Cofilin einnehmen und somit deren Oxidation sehr wahrscheinlich auch eine funktionelle Konsequenzen hat (Schulte *et al.*, 2013). Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch eine oxidierende Umgebung (Behandlung mit Wasserstoffperoxid) keinen Einfluss auf die Aktinpolymerisation in Anwesenheit von wildtypischen CAPG hat. Somit kann anhand der gewonnenen Ergebnisse in dieser Arbeit die Aussage getroffen werden, dass es wenig wahrscheinlich ist, dass die Oxidation der Cysteine von CAPG eine Rolle bei der Inhibition der Aktinpolymerisation spielt.

#### **5.2.1.2 Subzelluläre Lokalisation von CAPG**

Neben der Inhibition der Aktinpolymerisation von CAPG, dem Aktin-*Capping*, weisen neuere Studien auf eine Funktion von CAPG im Zellkern hin. In diesem Kontext erhöht CAPG die Brustkrebsmetastasierung durch Modulierung des Transkriptionsfaktors STC 1 (Huang *et al.*, 2018). Aufgrund der im Kern beschriebenen Funktion sollte als nächstes der Einfluss der Cysteine auf die Proteinlokalisierung in Abhängigkeit einer oxidierenden Umgebung untersucht werden.

Zum einen konnten in dieser Arbeit die Ergebnisse von Onda und Yin (1993) bestätigt und die Lokalisation von CAPG sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern in immunzytochemischen Färbungen und Western Blot Analysen gezeigt werden (Onda und Yin, 1993). Zum anderen konnte eine Lokalisationsänderung von CAPG nach

Wasserstoffperoxidbehandlung in dieser Arbeit gezeigt werden und zwar führte die Wasserstoffperoxidbehandlung der A172- und LN18-Zellen zu einer Translokation von CAPG aus dem Kern ins Zytoplasma. Darüber hinaus zeigte die detaillierte Analyse der Cysteinmutanten, dass die Cysteinmutanten, C282S und C290S, einen Einfluss auf die Translokation nach Stimulation mit Wasserstoffperoxid hatten. Diese Beobachtungen konnten überdies mittels Aufnahmen aus der Lebendzell-Mikroskopie bestätigt werden. Durch Verwendung des CAPG-GFP-Fusionsproteins konnte zudem ausgeschlossen werden, dass die Beobachtung nicht durch die oxidative Veränderung des Epitopes zustande kam. Darüber hinaus konnte für die wildtypische CAPG-GFP-Variante nicht nur eine Intensitätsabnahme nach Wasserstoffperoxidzugabe im Kern detektiert, sondern auch eine erhöhte Menge des Proteins in Zellmembrannähe nachgewiesen werden. Wohingegen die Zellkernlokalisation der beiden Cysteinmutanten, C282S und C290S, durch die Wasserstoffperoxidbehandlung unter den gewählten Bedingungen nicht beeinflusst wurde.

In FRAP- (engl.: *fluorescence recovery after photobleaching*) und FCS- (engl.: *fluorescence correlation spectroscopy*) Experimenten konnten Renz und Langowski zeigen, dass nach dem Ausbleichen des Zellkerns das CAPG-Protein in Brustkrebszelllinien viel schneller in den Kern zurücktransportiert wird, als bei normalen Brustepithelzellen (Renz *et al.*, 2008). Basierend auf ihren Ergebnissen kamen sie zu dem Schluss, dass das Verständnis der dynamischen Verteilung und insbesondere seines Pendelns zwischen verschiedenen Zellkompartimenten, wichtige Hinweise auf eine veränderte Funktion von CAPG bei der malignen Differenzierung geben könnte. In weiteren in der Literatur beschriebenen Versuchen wurde gezeigt, dass an ein Kernexportsignal (engl.: *nuclear export signal*; NES)-gekoppeltes CAPG in Invasionsstudien eine verminderte Invasivität zeigte als dies bei nativen Zellen mit hohem nukleärem CAPG-Anteil der Fall war. Was in der Hypothese resultierte, dass die Lokalisation von CAPG im Zellkern mit einem invasiven Phänotypen im Zusammenhang steht (De Corte *et al.*, 2004). Anhand dieser Beobachtungen und den in dieser Arbeit erhaltenen Resultaten kann angenommen werden, dass die Oxidation den CAPG-Export ins Zytoplasma begünstigt und dass die Cysteine C282 und C290 daran beteiligt sind.

### 5.2.1.2.1 Zelluläre Verteilung und Abundanz von CAPG in Tumorproben

Die vorangegangenen Experimente zeigten einen Einfluss der oxPTM der beiden Cysteine, C282 und C290, auf die CAPG-Lokalisation in LN18-Glioblastomzelllinien auf. Da gezeigt werden konnte, dass Tumorzellen ihrerseits einen basal höheren ROS Gehalt aufweisen können (Liou und Storz, 2010; Pelicano *et al.*, 2004; Prasad *et al.*, 2017; Schumacker, 2006), sollte zunächst die Abundanz von CAPG und deren subzelluläre Verteilung in humanen

Gewebeproben untersucht werden, um so möglicherweise Rückschlüsse über den Redoxstatus der untersuchten Tumorgrade ziehen zu können.

Zunächst konnten die Ergebnisse aus der Literatur bestätigt und in einer Western Blot Analyse an einem kleinen Probenstet gezeigt werden, dass CAPG im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant höhere Proteinabundanz in den humanen GBM-Proben aufwies. Yun *et al.* (2018) wiesen nach, dass der Proteinspiegel von CAPG um ca. das Doppelte in humanen Glioblastomen im Vergleich zu normalen Hirngewebsproben erhöht ist und dass eine erhöhte CAPG-Abundanz ein unabhängiger Marker zur Vorhersage einer ungünstigen Prognose sein könnte (Yun *et al.*, 2018).

Im nächsten Schritt wurde in dieser Arbeit die subzelluläre Verteilung von CAPG in verschieden-gradigen Gliomen in immunhistochemischen Färbungen analysiert, um herauszufinden, ob die Lokalisation des CAPG mit dem Tumorgrad korreliert.

In einigen Fällen konnte eine starke Kernfärbung von CAPG nachgewiesen werden. Allerdings korrelierte die CAPG-Kernfärbung nicht signifikant mit den untersuchten Gliomtypen oder dem IDH1-Mutationsstatus. Die Erhöhung der Probenzahl könnte möglicherweise einen signifikanten Unterschied belegen. Allerdings deuten die jetzigen Ergebnisse bereits an, dass die veränderte Kernlokalisation von CAPG aufgrund einer unterschiedlichen oxidativen Umgebung nicht nachgewiesen werden kann, weil der Redoxstatus der verwendeten humanen Gewebeproben nicht bekannt ist. Möglich wäre dennoch, dass die subzelluläre Verteilung einen Hinweis auf die Prognose geben könnte. Doch dafür müsste zunächst eine deutlich größere Kohorte an Tumorproben betrachtet und ausgewertet werden.

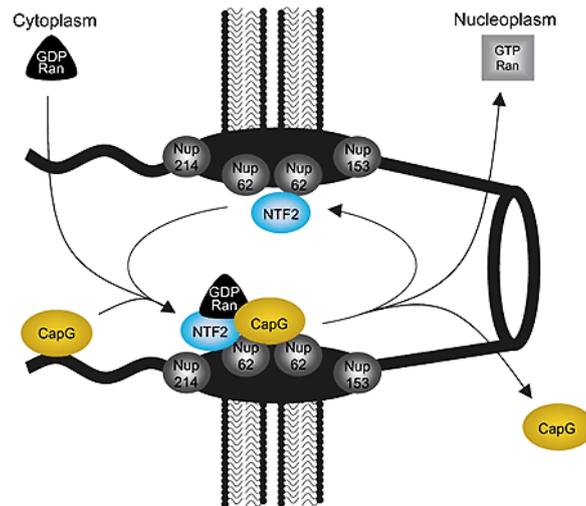
### **5.2.2 Identifizierung potenzieller redox-sensitiver Interaktionspartner von CAPG**

Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse legen nahe, dass im Kontext der Redox-Regulation von CAPG eine alternative mit dem Zellkern assoziierte Funktion von CAPG in den Vordergrund tritt. Diese Interpretation wird auch durch neuere Ergebnisse in der Literatur unterstützt, bei denen eine CAPG-Funktion im Kern näher beschrieben wurde (Huang *et al.*, 2018). Um Rückschlüsse auf neue Funktionszusammenhänge von CAPG im Redox-Kontext ziehen zu können und die Rolle von CAPG besser zu verstehen, wurde der Einfluss einer oxidierenden Umgebung auf das Interaktom des Proteins analysiert. In den LN18-Zellen führte die Untersuchung des CAPG-Interaktoms zur Identifizierung von sechs potenziellen Interaktionspartnern von CAPG in den unbehandelten und zur Identifizierung von 11 potenziellen Interaktionspartnern in den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Proben. Als

bereits in der Literatur bekannter Interaktionspartner von CAPG konnte das im Zytoplasma lokalisierte Aktin (ACTB) in den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Proben nachgewiesen werden. Zudem konnten nach Wasserstoffperoxidbehandlung neben den in den unbehandelten Proben bereits identifizierten potenziellen Interaktionspartnern fünf weitere mögliche redox-abhängige Interaktionspartner (RPSA, ACTB, PRRC2B, HSPA9, YLPM1) erstmalig detektiert werden, die sich über viele zelluläre Kompartimente verteilen, was durch aus als sinnig erscheint, weil wie in dieser Arbeit bestätigt CAPG seinerseits sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern lokalisiert ist. Anhand der identifizierten Interaktionspartner konnten Hinweise auf verschiedene Funktionszusammenhänge abgeleitet werden, die im nachfolgenden diskutiert werden sollen.

### **5.2.2.1 Mögliche Beteiligung des Kernporenkomplexproteins Nup153 am CAPG-Export aus dem Zellkern**

Die Interaktionsstudie führte sowohl in den unbehandelten, als auch in den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Proben unter anderem zur Identifizierung des Kernporenkomplexproteins Nup153, welches Bestandteil des Kernporenkomplexes (engl.: *nuclear pore complex*, NPC) und essentiell für den nukleozytoplasmatischen Transport von Proteinen und mRNAs ist (Krull *et al.*, 2004). Van Impe *et al.* (2008) haben in MDCK-Zellen (engl.: *Madin-Darby Canine Kidney cells*) gezeigt, dass eine Blockierung von Kernporenkomplexproteinen mit z. B. Weizenkeimagglutinin (engl.: *wheat germ agglutinin*; WGA) den Kerntransport von CAPG verhindert. Zusätzlich haben sie bereits die Interaktion von CAPG mit unterschiedlichen Kernporenkomplexproteinen in einer Dot-Blotanalyse untersucht und dabei nachgewiesen, dass CAPG direkt mit den FxFG-Wiederholungsfragmenten von Nup62, jedoch nicht mit dem GLFG-Fragment von Nup98 oder dem FxFG-Fragment von Nup153 interagiert (Van Impe *et al.*, 2008). Das von Van Impe erstellte Modell für den Kernimport von CAPG ist in Abbildung 50 dargestellt.



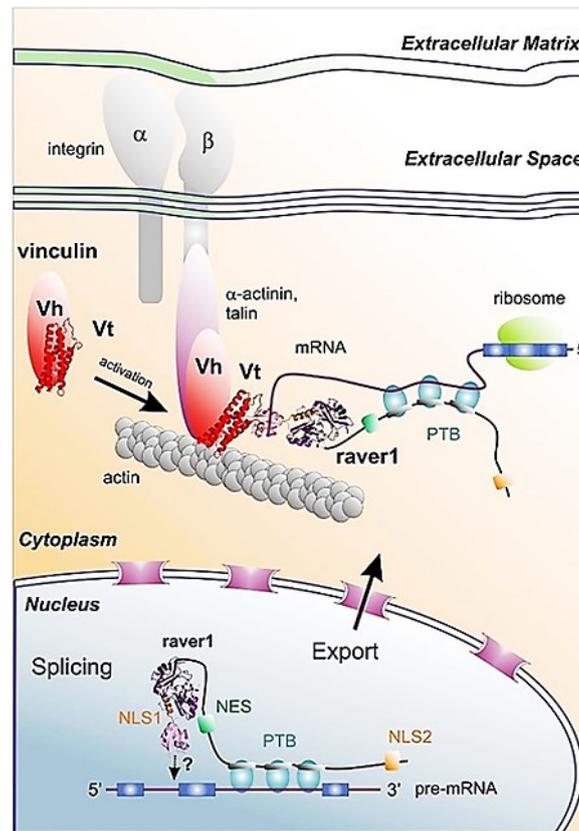
**Abbildung 50: Modell für den Kernimport von CAPG.** Die Interaktion mit Nups ist für das Andocken an die Kernporen erforderlich, für die Translokation jedoch nicht ausreichend. Die Interaktion mit NTF2 und Ran sorgt für Translokation und Direktionalität. [Abbildung aus Van Impe *et al.*, 2008]

Diese Daten sind zunächst konträr zu den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen. Allerdings wurde nur das GLFG-Fragment von Nup98 und das FxFG-Fragment von Nup153 untersucht, wodurch eine Interaktion mit anderen Bereichen nicht auszuschließen ist und mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen daraufhin deutet, dass es sich bei Nup153 tatsächlich um einen Interaktionspartner von CAPG handelt. Nup153 wurde sowohl in den unbehandelten, als auch in den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Proben identifiziert. Im Vergleich konnte es jedoch nach Wasserstoffperoxidbehandlung mit einem geringeren p-Wert detektiert werden. Dadurch kann angenommen werden, dass Nup153 verstärkt unter oxidierenden Bedingungen bei dem CAPG-Export aus dem Kern eine Rolle spielen könnte. Diese Annahme wird durch die Lokalisation von Nup153 auf der nukleoplasmatischen Seite des Kernkomplexes, die als Kernkorb bezeichnet wird, unterstützt. Darüber hinaus konnte in der A172-Interaktionsstudie die Interaktion von CAPG mit Nup98 ebenfalls nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass Nup98 an der Verankerung von Nup153 am Kernporenkomplex beteiligt ist (Krull *et al.*, 2004). Ullman *et al.* (1999) zeigten, dass Nup153 ein zentraler Bestandteil der Exportmaschinerie für verschiedene RNA und Proteine ist (Ullman *et al.*, 1999). Überdies konnte in unabhängigen Studien gezeigt werden, dass eine direkte Wechselwirkungen mit Nup153 und oder Nup214 sowohl für den SMAD2- (Xu *et al.*, 2002), als auch für den STAT1-Kernexport wichtig sind (Marg *et al.*, 2004). Anhand dieser Beispiele und der in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse kann angenommen werden, dass die oxidative Umgebung und wahrscheinlich die Oxidation an den Cysteinen, C282 und C290, zu einem vermehrten CAPG-Export aus dem Kern führt und Nup153 hierbei eine zentrale Rolle spielen könnte.

### 5.2.2.2 RAVER1 und CAPG

In der Interaktionsstudie konnten auch Hinweise über eine mögliche Beteiligung von CAPG an der Regelung der Translation erhalten werden. Die beiden Proteine RAVER1 (Ribonukleoprotein-PTB-Bindung 1) und hnRNP-K (Heterogenes Kernribonukleoprotein K) konnten sowohl in den unbehandelten, als auch in den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Proben identifiziert werden. Beide Proteine sind bisher nicht als Interaktionspartner von CAPG beschrieben. hnRNP-K gehört zu den heterogenen Kernribonukleoproteinen und zählt somit zu der Gruppe RNA-bindender Proteine, die sich durch RNA-Erkennungsmotive (RRMs), hnRNP-K-Homologie-Domänen (KH Domänen) und RGG (Arg-Gly-Gly)-Boxen auszeichnen. Zudem sind diese Proteine an einer Reihe von nukleären Prozessen, wie der Transkriptionsregulation, der Erhaltung der Telomerlänge und dem konstitutivem und alternativem Spleißen beteiligt (Krecic und Swanson, 1999). Einige heterogene Kernribonukleoproteine sind in der Lage zwischen Kern und Zytoplasma zu pendeln (Bomsztyk *et al.*, 2004), wobei sie unter anderem eine entscheidende Rolle bei dem nukleozytoplasmatischen Transport von mRNA spielen, aber auch wichtig sind für die Translation und die Stabilität von mRNA (Nakielny und Dreyfuss, 1999; Shyu und Wilkinson, 2000). In der Literatur wurde bereits die Interaktion des humanen heterogenen Kernribonukleoproteins K mit einer Reihe von Faktoren, die an der Genexpression und Signaltransduktion beteiligt sind, beschrieben (Bomsztyk *et al.*, 1997). Ein möglicher Funktionszusammenhang von CAPG und hnRNP-K könnte sich aus der Homologie von PRMT1 (Protein Argininmethyltransferase 1) und PRMT5 (Protein Argininmethyltransferase 5) ableiten lassen. Zum einen ist bekannt, dass PRMT1 eine wichtige Rolle bei der Gliomentstehung spielt indem es hnRNP-K methyliert und somit zu einer malignen Veränderung der Genexpression führt (Chiou *et al.*, 2007; Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Zum anderen weiß man, dass CAPG eine Rolle bei der Transkription spielen könnte (De Corte *et al.*, 2004) und es mit PRMT5 interagiert (Huang *et al.*, 2018). Somit könnte es sein, dass CAPG an einem Argininmethyltransferase-Komplex aus PRMT1 oder PRMT5 beteiligt ist, der hnRNP-K in Abhängigkeit der oxidativen Umgebung unterschiedlich stark methyliert und dadurch Einfluss auf die Tumorentstehung nimmt.

Das Protein RAVER1 gehört ebenfalls zu der hnRNP-Familie und ist in der Lage zwischen Kern und Zytoplasma zu pendeln (Hüttelmaier *et al.*, 2001). In einigen Studien wurde gezeigt, dass RAVER1 aus dem Kern ins Zytoplasma und da zu Adhäsionskomplexen pendelt, wo es mit aktiviertem Vinculin interagiert (Zieseniss *et al.*, 2007). Zudem ist RAVER1 ebenfalls an einer Reihe von nukleären Prozessen, wie der Transkriptionsregulation, der Erhaltung der Telomerlänge und dem konstitutivem und alternativem Spleißen beteiligt.



**Abbildung 51: Mögliche Rolle von RAVER1 bei der RNA-Prozessierung und des -transportes während der Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen.** RAVER1 umfasst drei RNA-Erkennungsmotive (engl.: *RNA recognition motifs*; RRM) (dargestellt als Bänder; RRM1 in Rosa; RRM2 und RRM3 in Lila), mehrere Bindungsmotive für das Polypyrimidin-Trakt-Bindungsprotein (engl.: *polypyrimidine tract binding protein*; PTB) (graue Kästchen), zwei Kernlokalisierungssignale (NLS1, NLS2, Orange) und eine Kernexportsequenz (NES, Grün). Im Kern kann RAVER1-PTB zur Verarbeitung von fokalen adhäsionsbedingten prä-mRNAs beitragen. Im Zytoplasma könnte die RAVER1-Vinculin-Wechselwirkung mRNAs an fokale Adhäsionsstellen rekrutieren. Vinculin (in Rot dargestellt) umfasst zwei Domänen (Vt:Vinculin-Schwanz, Vh:Vinculin-Kopf). Die Vt-Domäne wird für RAVER1 erst nach Aktivierung von Vinculin voller Länge durch Bindung der Vh-Domäne an Talin oder  $\alpha$ -Actinin zugänglich. [Abbildung aus (Madl und Sattler, 2009)]

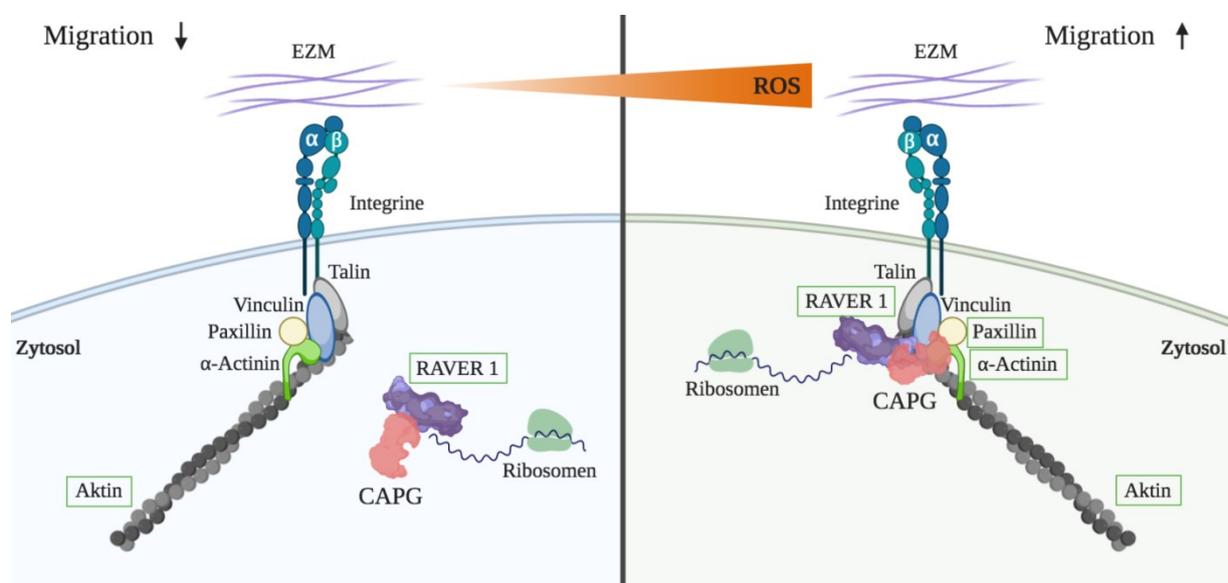
Bei der Adhäsion spielen viele Proteine eine Schlüsselrolle und sorgen dafür, dass das Aktinzytoskelett mit der extrazellulären Matrix (EZM) in Verbindung steht (Madl und Sattler, 2009). In diesem Zusammenspiel wäre es naheliegend, dass CAPG sowohl durch seine Interaktion mit Aktin selber, als auch über die Interaktion mit RAVER1 Einfluss nehmen könnte. Ergänzend konnten die redox-abhängigen CAPG-Interaktionspartner, wie beispielsweise  $\alpha$ -Actinin 1 und 4, Catenin- $\alpha$  1, Paxillin und Moesin, die in der in den A172-Zellen durchgeführten Interaktionsstudie identifiziert wurden, mit Prozessen, wie der Vinculin- und Zelladhäsionsmolekülbindung assoziiert werden. Obwohl die Oxidation von CAPG in diesem Zusammenhang nicht belegt ist, deuten die in dieser Arbeit identifizierten redox-abhängigen Interaktionspartner von CAPG darauf hin, dass CAPG unter oxidierenden Bedingungen am Adhäsionskomplex beteiligt zu sein scheint, was eine Rolle der beiden redox-sensitiven Cysteine, C282 und C290, nahe legt.

### 5.2.3 Die CAPG-Cysteinmutanten C282S und C290S inhibieren die Migration der LN18-Zellen

Die redox-abhängige Funktion von CAPG in nicht-erkranktem Gewebe wie auch in der Tumorbiologie von Gliomen ist bislang nicht beschrieben. Bisher konnte die veränderte Abundanz und die Zellkern-Zytoplasma-Lokalisation mit einer schlechten Prognose und veränderter Migration bzw. Invasivität bei Brust- und Gehirntumoren in Verbindung gebracht werden. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal über die Interaktion von CAPG mit RAVER1 und anderen Proteinen ( $\alpha$ -Actinin 1 und 4, Catenin- $\alpha$  1, Paxillin und Moesin) ein Zusammenhang mit dem Adhäsionskomplex und somit der Interaktion mit der extrazellulären Matrix hergestellt werden. Zudem ist aus der Literatur bereits bekannt, dass die Adhäsion durch eine Reihe von Integrinen unterstützt wird. Überdies wird angenommen, dass eine Gruppe der Integrine eine wichtige Rolle bei der Migration und Invasion durch den Umbau der extrazellulären Matrix spielen könnte (Kielosto *et al.*, 2009; Pawelek und Chakraborty, 2008; Rathinam und Alahari, 2010). Durch die Verwendung von Cysteinmutanten konnte eine mögliche funktionelle Beteiligung der beiden redox-sensitiven Cysteine, C282 und C290, abgeleitet werden. Weiterhin ist in der Literatur bekannt, dass ROS zur abnormalen Aktivierung proteolytischer Enzyme in Krebszellen beitragen, was zu einer umfassenden Umgestaltung der EZM-Proteinkomponenten führt, was die Migration und Invasivität der Zellen begünstigt (Nikitovic *et al.*, 2013; San Martin und Griendling, 2010). Das Migrationsverhalten von Zellen wird darüber hinaus durch verschiedene Komponenten beeinflusst, die sich in Eingangs-, Signaltransduktions- und Zytoskelett ereignisse einteilen lassen. Dabei aktiviert eine Vielzahl an Reizen die Signalweiterleitung z. B. über Integrine, die ihrerseits nachgeschaltete Komponenten aktivieren, wie die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K). Der wichtigste Signalweg, der über die Phosphoinositid-3-Kinase aktiviert wird, ist der PI3K/Akt-Signalweg. Über das Signaltransduktionsnetzwerk kann letztendlich auch das Zytoskelettnetzwerk gesteuert werden, was in einer erhöhten Zellmigration und Invasivität resultieren kann (Pal *et al.*, 2019; Stephens *et al.*, 2008). Zudem nicht nur die Integrine (de Rezende *et al.*, 2012; Eble und de Rezende, 2014), sondern auch kleine GTPasen (Aghajanian *et al.*, 2009; Heo und Campbell, 2005), Kinasen (Giannoni *et al.*, 2005; Giorgi *et al.*, 2010), Phosphatasen (Meng *et al.*, 2002), Ionenkanäle und Transporter (Fearon *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2008). Die am Aktinsignalnetzwerk beteiligten Proteine regulieren nicht nur direkt als Reaktion auf verschiedene zelluläre Stimuli die Aktinorganisation und -funktion, sondern lösen auch Signalkaskaden aus, die ihrerseits das Zellwachstum, die Migration, die Kontraktion und das Überleben der Zellen beeinflussen. Dabei sind ROS in der Lage diese

regulatorischen Proteine ebenfalls direkt zu oxidieren oder die Signalkaskaden zu beeinflussen (Xu *et al.*, 2017).

Zur Validierung der Hypothese, ob die beiden redox-sensitiven Cysteine, C282 und C290, einen Einfluss auf die Migration der LN18-Zellen haben, wurde deren Rolle auf die Migration in *Scratch Assays* untersucht. Im Vergleich zu den Zellen, die das wildtypische CAPG eingebracht hatten, zeigten die Cysteinmutanten C77S, C165S und C178S keinen signifikanten Einfluss auf die Migration der LN18-Glioblastomzellen. Wohingegen das Migrationsverhalten durch die Cysteinmutanten C282S und C290S von CAPG signifikant gehemmt wurde. Somit konnte zum ersten Mal ein Beleg erhalten werden, dass womöglich das veränderte oxidative Milieu und damit der verbundene Export von CAPG aus dem Zellkern Einfluss auf das Migrationsverhalten und somit auch sehr wahrscheinlich auf die Invasivität der Tumorzellen nimmt. Weiterhin konnten Yun *et al.* (2018) zeigen, dass eine Deletion von CAPG zu einer signifikanten Abnahme der Invasivität der Glioblastomzellen führte (Yun *et al.*, 2018). Derselbe Effekt konnte ebenfalls in Brustkrebszelllinien (Huang *et al.*, 2018), in Hepatozellulärenkarzinomzelllinien (Tsai *et al.*, 2018a), als auch in kolorektalen Adenokarzinomzellen (Tsai *et al.*, 2018b) nachgewiesen werden. In Abbildung 52 ist das aus den in dieser Arbeit gewonnenen Daten und weiterführenden Informationen aus der Literatur postulierte Modell zur weiteren redox-abhängigen CAPG-Funktion dargestellt.



**Abbildung 52: Mögliches Modell zur Beschreibung einer weiteren zellulären Funktion von CAPG in Form einer redox-abhängigen Beteiligung an Adhäsionskomplexen, die zu einer gesteigerten Migration der Zellen führen könnte.** Nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid scheint das oxidierte CAPG vermehrt mit Proteinen, die zum Adhäsionskomplex gehören, zu interagieren, was mit einem erhöhten Migrationspotenzial der Zellen korreliert. Grün umrandete Proteine wurden in dieser Arbeit in einer der beiden Interaktionspartnerstudien in Abhängigkeit der Wasserstoffperoxidbehandlung identifiziert. [EZM = Extrazelluläre Matrix; ROS = reaktive Sauerstoffspezies]

Zusammengefasst liefern die Ergebnisse die ersten Hinweise darauf, dass CAPG eine weitere zelluläre Funktion in Form einer redox-abhängigen Beteiligung an Adhäsionskomplexen aufweisen könnte. Somit wäre es möglich, dass die oxidative Modifikation von CAPG an den Cysteinen, C282 und C290, die in dieser Arbeit als redox-sensitiv charakterisiert wurden, eine entscheidende Rolle für den CAPG-Export, als auch die Beteiligung des Proteins an Adhäsionskomplexen spielen könnte, was mit einem erhöhten Migrationspotenzial der Zellen korreliert.

## 6 Fazit

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal das humane CAPG als redox-sensitives Protein in humanen Glioblastomzelllinien charakterisiert werden. Mit weiteren zielgerichteten Experimenten konnte erstmals gezeigt werden, dass die beiden Cysteine, C282 und C290, von CAPG sensitiv für die Oxidation sind. Die Mutation der einzelnen Cysteine führte zu keiner Veränderung der kanonischen *Aktin-Capping*-Eigenschaft des Proteins. In Lokalisationsstudien konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass weniger CAPG im Zellkern nach Stimulation mit Wasserstoffperoxid vorhanden ist und dass für diesen Vorgang die Cysteine, C282 und C290, eine entscheidende Rolle spielen. Eine erste Überprüfung der Ergebnisse in Tumorgewebe von Glioblastompatienten ergab, dass die subzelluläre Lokalisation von CAPG im Kern sehr heterogen war, was möglicherweise Hinweise für die Prognose geben könnte. Mit Hilfe der durchgeführten Interaktionsstudien gelang die Identifizierung redox-abhängiger und -unabhängiger Interaktionspartner von CAPG. Diese legen eine Beteiligung von CAPG an Adhäsionskomplexen nahe, die möglicherweise über den Redoxzustand des Proteins reguliert wird und in einem erhöhten Migrationspotenzial der Zellen resultieren könnte. Überdies konnte nachgewiesen werden, dass die Cysteinmutanten, C282S und C290S, und somit höchst wahrscheinlich die oxidative Modifikation der beiden Cysteine, C282 und C290, eine essentielle Rolle bei dem Migrationsverhalten der Zellen zu spielen scheint. Das erlaubt die Annahme, dass CAPG eine alternative zelluläre Funktion in Abhängigkeit seines Redoxzustandes ausübt.

Das Ziel zukünftiger Arbeiten sollte die Validierung der erarbeiteten redox-abhängigen Funktionszusammenhänge von CAPG an Adhäsionskomplexen, sowie der vermehrte CAPG-Export nach Oxidation und die Aufklärung des Wirkmechanismus von CAPG im Hinblick auf seinen Redoxzustand sein. Dafür könnten unter anderem chemische Stimuli, wie die Behandlung der Zellen mit Chemotherapeutika (Yang *et al.*, 2018a), die eine ROS Produktion hervorrufen, zur Manipulation des Redoxzustandes genutzt werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aebersold, R., Agar, J. N., Amster, I. J., Baker, M. S., Bertozzi, C. R., Boja, E. S., Costello, C. E., Cravatt, B. F., Fenselau, C. und Garcia, B. A. (2018). **How many human proteoforms are there?** *Nature chemical biology* *14*, 206.
- Aebersold, R. und Mann, M. (2003). **Mass spectrometry-based proteomics.** *Nature* *422*, 198.
- Afanas'ev, I. (2011). **Reactive oxygen species signaling in cancer: comparison with aging.** *Aging and disease* *2*, 219.
- Aghajanian, A., Wittchen, E. S., Campbell, S. L. und Burridge, K. (2009). **Direct activation of RhoA by reactive oxygen species requires a redox-sensitive motif.** *PLoS one* *4*.
- Ambruso, D. R., Knall, C., Abell, A. N., Panepinto, J., Kurkchubasche, A., Thurman, G., Gonzalez-Aller, C., Hiester, A., deBoer, M. und Harbeck, R. J. (2000). **Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* *97*, 4654-4659.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. und Hagen, T. M. (1993). **Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* *90*, 7915-7922.
- Anderson, N. G. und Anderson, N. L. (1996). **Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future.** *Electrophoresis* *17*, 443-453.
- Apweiler, R., Aslanidis, C., Deufel, T., Gerstner, A., Hansen, J., Hochstrasser, D., Kellner, R., Kubicek, M., Lottspeich, F. und Maser, E. (2009). **Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in fluid proteomics.** *Clinical chemistry and laboratory medicine* *47*, 724-744.
- Araki, K., Kusano, H., Sasaki, N., Tanaka, R., Hatta, T., Fukui, K. und Natsume, T. (2016). **Redox sensitivities of global cellular cysteine residues under reductive and oxidative stress.** *Journal of proteome research* *15*, 2548-2559.
- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E. und Pedersen, J. (2006). **Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins.** *Protein expression and purification* *48*, 1-13.
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. und Kuster, B. (2007). **Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review.** *Analytical and bioanalytical chemistry* *389*, 1017-1031.
- 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.** *Molecular systems biology* *7*.
- Beckman, K. B. und Ames, B. N. (1997). **Oxidative decay of DNA.** *Journal of Biological Chemistry* *272*, 19633-19636.

- Bedard, K. und Krause, K.-H. (2007). **The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.** *Physiological reviews* 87, 245-313.
- Behrend, L., Henderson, G. und Zwacka, R. (2003). **Reactive oxygen species in oncogenic transformation** (Portland Press Limited).
- Berggård, T., Linse, S. und James, P. (2007). **Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions.** *Proteomics* 7, 2833-2842.
- Berlett, B. S. und Stadtman, E. R. (1997). **Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress.** *Journal of Biological Chemistry* 272, 20313-20316.
- Berndt, C., Poschmann, G., Stühler, K., Holmgren, A. und Bräutigam, L. (2014). **Zebrafish heart development is regulated via glutaredoxin 2 dependent migration and survival of neural crest cells.** *Redox biology* 2, 673-678.
- Bernstein, B. W., Shaw, A. E., Minamide, L. S., Pak, C. W. und Bamburg, J. R. (2012). **Incorporation of cofilin into rods depends on disulfide intermolecular bonds: implications for actin regulation and neurodegenerative disease.** *Journal of Neuroscience* 32, 6670-6681.
- Bettinger, B. T., Gilbert, D. M. und Amberg, D. C. (2004). **Actin up in the nucleus.** *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 410.
- Bienert, G. P., Møller, A. L., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Møller, I. M., Schjoerring, J. K. und Jahn, T. P. (2007). **Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes.** *Journal of Biological Chemistry* 282, 1183-1192.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. und Kalayci, O. (2012). **Oxidative stress and antioxidant defense.** *World Allergy Organization Journal* 5, 9.
- Blagoev, B., Kratchmarova, I., Ong, S.-E., Nielsen, M., Foster, L. J. und Mann, M. (2003). **A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling.** *Nature biotechnology* 21, 315.
- Blain, E. J. (2009). **Involvement of the cytoskeletal elements in articular cartilage homeostasis and pathology.** *International journal of experimental pathology* 90, 1-15.
- Blanchard, A., Ohanian, V. und Critchley, D. (1989). **The structure and function of  $\alpha$ -actinin.** *Journal of muscle research and cell motility* 10, 280-289.
- Boisen, M. K., Holst, C. B., Consalvo, N., Chinot, O. L. und Johansen, J. S. (2018). **Plasma YKL-40 as a biomarker for bevacizumab efficacy in patients with newly diagnosed glioblastoma in the phase 3 randomized AVAglio trial.** *Oncotarget* 9, 6752.
- Bomsztyk, K., Denisenko, O. und Ostrowski, J. (2004). **hnRNP K: one protein multiple processes.** *Bioessays* 26, 629-638.

- Bomsztyk, K., Van Seuning, I., Suzuki, H., Denisenko, O. und Ostrowski, J. (1997). **Diverse molecular interactions of the hnRNP K protein.** FEBS letters *403*, 113-115.
- Brigelius-Flohe, R. und Flohe, L. (2011). **Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors.** Antioxidants & redox signaling *15*, 2335-2381.
- Bruce, C., Stone, K., Gulcicek, E. und Williams, K. (2013). **Proteomics and the analysis of proteomic data: 2013 overview of current protein-profiling technologies.** Current protocols in bioinformatics *41*, 13.21. 11-13.21. 17.
- Bugyi, B. und Carlier, M.-F. (2010). **Control of actin filament treadmilling in cell motility.** Annual review of biophysics *39*, 449-470.
- Bunker, V. (1992). **Free radicals, antioxidants and ageing.** Medical laboratory sciences *49*, 299-312.
- Burillo, E., Recalde, D., Jarauta, E., Fiddymont, S., Garcia-Otin, A. L., Mateo-Gallego, R., Cenarro, A. und Civeira, F. (2009). **Proteomic study of macrophages exposed to oxLDL identifies a CAPG polymorphism associated with carotid atherosclerosis.** Atherosclerosis *207*, 32-37.
- Burtnick, L. D., Urosev, D., Irobi, E., Narayan, K. und Robinson, R. C. (2004). **Structure of the N-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing, apoptosis and FAF.** The EMBO journal *23*, 2713-2722.
- Cameron, J. M., Gabrielsen, M., Chim, Y. H., Munro, J., McGhee, E. J., Sumpton, D., Eaton, P., Anderson, K. I., Yin, H. und Olson, M. F. (2015). **Polarized cell motility induces hydrogen peroxide to inhibit cofilin via cysteine oxidation.** Current Biology *25*, 1520-1525.
- Carlier, M.-F. und Pantaloni, D. (1997). **Control of actin dynamics in cell motility.** Journal of molecular biology *269*, 459-467.
- Catherman, A. D., Skinner, O. S. und Kelleher, N. L. (2014). **Top down proteomics: facts and perspectives.** Biochemical and biophysical research communications *445*, 683-693.
- Chakravarti, B., Gallagher, S. R. und Chakravarti, D. N. (2005). **Difference gel electrophoresis (DIGE) using CyDye DIGE fluor minimal dyes.** Current protocols in molecular biology *69*, 10.23. 11-10.23. 18.
- Charles, R. L., Schröder, E., May, G., Free, P., Gaffney, P. R., Wait, R., Begum, S., Heads, R. J. und Eaton, P. (2007). **Protein sulfenation as a redox sensor: proteomics studies using a novel biotinylated dimedone analogue.** Molecular & Cellular Proteomics *6*, 1473-1484.
- Chen, H., Bernstein, B. W. und Bamburg, J. R. (2000). **Regulating actin-filament dynamics in vivo.** Trends in biochemical sciences *25*, 19-23.
- Chen, S. C., Huang, B., Liu, Y. C., Shyu, K. G., Lin, P. Y. und Wang, D. L. (2008). **Acute hypoxia enhances proteins' S-nitrosylation in endothelial cells.** Biochemical and biophysical research communications *377*, 1274-1278.

- Chesarone, M. A., DuPage, A. G. und Goode, B. L. (2010). **Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons**. *Nature reviews Molecular cell biology* *11*, 62.
- Cheung, R. C. F., Wong, J. H. und Ng, T. B. (2012). **Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications**. *Applied microbiology and biotechnology* *96*, 1411-1420.
- Chi, Y., Xue, J., Huang, S., Xiu, B., Su, Y., Wang, W., Guo, R., Wang, L., Li, L. und Shao, Z. (2019). **CapG promotes resistance to paclitaxel in breast cancer through transactivation of PIK3R1/P50**. *Theranostics* *9*, 6840.
- Chiou, Y.-Y., Lin, W.-J., Fu, S.-L. und Lin, C.-H. (2007). **Direct mass-spectrometric identification of Arg296 and Arg299 as the methylation sites of hnRNP K protein for methyltransferase PRMT1**. *The protein journal* *26*, 87-93.
- Chouchani, E. T., Methner, C., Nadtochiy, S. M., Logan, A., Pell, V. R., Ding, S., James, A. M., Cochemé, H. M., Reinhold, J. und Lilley, K. S. (2013). **Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I**. *Nature medicine* *19*, 753.
- Choudhary, J. und Grant, S. G. (2004). **Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning**. *Nature neuroscience* *7*, 440.
- Chuang, K. P., Tsai, W. S., Wang, Y. J. und Shieh, C. C. (2003). **Superoxide activates very late antigen-4 on an eosinophil cell line and increases cellular binding to vascular cell adhesion molecule-1**. *European journal of immunology* *33*, 645-655.
- 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**. *Circulation research* *112*, 382-392.
- Condeelis, J., Singer, R. H. und Segall, J. E. (2005). **The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility**. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 695-718.
- Conner, E. M. und Grisham, M. B. (1996). **Inflammation, free radicals, and antioxidants**. *Nutrition* *12*, 274-277.
- 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**. *Molecular & cellular proteomics* *13*, 2513-2526.
- Cox, J. und Mann, M. (2008). **MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized ppb-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification**. *Nature biotechnology* *26*, 1367.
- Cox, J. und Mann, M. (2011). **Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology**. *Annual review of biochemistry* *80*, 273-299.
- Dahl, E., Sadr-Nabavi, A., Klopocki, E., Betz, B., Grube, S., Kreutzfeld, R., Himmelfarb, M., An, H. X., Gelling, S. und Klaman, I. (2005). **Systematic identification and molecular**

- characterization of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer.** The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland 205, 21-28.
- Dalle-donne, I., Milzani, A., Giustarini, D., Di Simplicio, P., Colombo, R. und Rossi, R. (2000). **S-NO-actin: S-nitrosylation kinetics and the effect on isolated vascular smooth muscle.** Journal of Muscle Research & Cell Motility 21, 171-181.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D. und Milzani, A. (2006). **Biomarkers of oxidative damage in human disease.** Clinical chemistry 52, 601-623.
- DalleDonne, I., Milzani, A. und Colombo, R. (1999). **The tert-butyl hydroperoxide-induced oxidation of actin Cys-374 is coupled with structural changes in distant regions of the protein.** Biochemistry 38, 12471-12480.
- Danielson, S. R., Held, J. M., Oo, M., Riley, R., Gibson, B. W. und Andersen, J. K. (2011). **Quantitative mapping of reversible mitochondrial Complex I cysteine oxidation in a Parkinson disease mouse model.** Journal of Biological Chemistry 286, 7601-7608.
- De Corte, V., Van Impe, K., Bruyneel, E., Boucherie, C., Mareel, M., Vandekerckhove, J. und Gettemans, J. (2004). **Increased importin- $\beta$ -dependent nuclear import of the actin modulating protein CapG promotes cell invasion.** Journal of cell science 117, 5283-5292.
- de Nigris, F., Lerman, L. O., Condorelli, M., Lerman, A. und Napoli, C. (2001). **Oxidation-sensitive transcription factors and molecular mechanisms in the arterial wall.** Antioxidants and Redox Signaling 3, 1119-1130.
- de Rezende, F. F., Lima, A. M., Niland, S., Wittig, I., Heide, H., Schröder, K. und Eble, J. A. (2012). **Integrin  $\alpha 7\beta 1$  is a redox-regulated target of hydrogen peroxide in vascular smooth muscle cell adhesion.** Free Radical Biology and Medicine 53, 521-531.
- Dean, R., Roberts, C. und Jessup, W. (1985). **Fragmentation of extracellular and intracellular polypeptides by free radicals.** Progress in clinical and biological research 180, 341-350.
- Deutzmann, R., Rassow, J., Hauser, K. und Netzker, R. (2006). **Mechanismen der Signaltransduktion.** Joachim Rassow, Karin Hauser, Roland Netzker, Rainer Deutzmann: Duale Reihe Biochemie, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, Auflage 1, 544-565.
- Diserens, A., De Tribolet, N., Martin-Achard, A., Gaide, A., Schnegg, J. und Carrel, S. (1981). **Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18.** Acta neuropathologica 53, 21-28.
- Dominguez, R. (2009). **Actin filament nucleation and elongation factors—structure—function relationships.** Critical reviews in biochemistry and molecular biology 44, 351-366.
- Droge, W. (2002). **Free radicals in the physiological control of cell function.** Physiological reviews 82, 47-95.

- Duan, J., Gaffrey, M. J. und Qian, W.-J. (2017). **Quantitative proteomic characterization of redox-dependent post-translational modifications on protein cysteines**. *Molecular BioSystems* *13*, 816-829.
- Dunham, W. H., Mullin, M. und Gingras, A. C. (2012). **Affinity-purification coupled to mass spectrometry: Basic principles and strategies**. *Proteomics* *12*, 1576-1590.
- Eaton, P. (2006). **Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures**. *Free Radical Biology and Medicine* *40*, 1889-1899.
- Eble, J. A. und de Rezende, F. F. (2014). **Redox-relevant aspects of the extracellular matrix and its cellular contacts via integrins**. *Antioxidants & redox signaling* *20*, 1977-1993.
- 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 biotechnology* *9*, 61.
- Esworthy, R. S., Ho, Y.-S. und Chu, F.-F. (1997). **TheGpx1Gene encodes mitochondrial glutathione peroxidase in the mouse liver**. *Archives of biochemistry and biophysics* *340*, 59-63.
- Evan, G. I. und Vousden, K. H. (2001). **Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer**. *nature* *411*, 342.
- Fearon, I., Palmer, A., Balmforth, A., Ball, S., Varadi, G. und Peers, C. (1999). **Modulation of recombinant human cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha$ 1C subunits by redox agents and hypoxia**. *The Journal of physiology* *514*, 629-637.
- Fedchenko, N. und Reifenrath, J. (2014). **Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue—a review**. *Diagnostic pathology* *9*, 221.
- Fedorova, M., Kuleva, N. und Hoffmann, R. (2010). **Identification of cysteine, methionine and tryptophan residues of actin oxidized in vivo during oxidative stress**. *Journal of proteome research* *9*, 1598-1609.
- 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.
- Fiaschi, T., Cozzi, G., Raugei, G., Formigli, L., Ramponi, G. und Chiarugi, P. (2006). **Redox regulation of  $\beta$ -actin during integrin-mediated cell adhesion**. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 22983-22991.
- Finkel, T. (1999). **Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells**. *Journal of leukocyte biology* *65*, 337-340.
- Finkel, T. (2003). **Oxidant signals and oxidative stress**. *Current opinion in cell biology* *15*, 247-254.

- Finkel, T. und Holbrook, N. J. (2000). **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing**. *Nature* *408*, 239.
- Flohe, L. (1988). **Glutathione peroxidase**. In: *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*, Springer, S. 663-668.
- Flohe, L. und Schlegel, W. (1971). **Glutathione peroxidase. IV. Intracellular distribution of the glutathione peroxidase system in the rat liver**. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* *352*, 1401.
- Fomenko, D. E., Marino, S. M. und Gladyshev, V. N. (2008). **Functional diversity of cysteine residues in proteins and unique features of catalytic redox-active cysteines in thiol oxidoreductases**. *Molecules and cells* *26*, 228.
- 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**. *Nature biotechnology* *27*, 557.
- Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B. und Apanasets, O. (2012). **Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* *1822*, 1363-1373.
- Fuchs-Tarlovsky, V. (2013). **Role of antioxidants in cancer therapy**. *Nutrition* *29*, 15-21.
- Gardner, P. R., Raineri, I., Epstein, L. B. und White, C. W. (1995). **Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells**. *Journal of Biological Chemistry* *270*, 13399-13405.
- Garrels, J. I. und Gibson, W. (1976). **Identification and characterization of multiple forms of actin**. *Cell* *9*, 793-805.
- Gavin, A.-C., Bösche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A.-M. und Cruciat, C.-M. (2002). **Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes**. *Nature* *415*, 141.
- Gellert, M., Hanschmann, E.-M., Lepka, K., Berndt, C. und Lillig, C. H. (2015). **Redox regulation of cytoskeletal dynamics during differentiation and de-differentiation**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* *1850*, 1575-1587.
- Gertz, M., Fischer, F., Wolters, D. und Steegborn, C. (2008). **Activation of the lifespan regulator p66Shc through reversible disulfide bond formation**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 5705-5709.
- Gettemans, J., Van Impe, K., Delanote, V., Hubert, T., Vandekerckhove, J. und De Corte, V. (2005). **Nuclear actin-binding proteins as modulators of gene transcription**. *traffic* *6*, 847-857.
- Giannoni, E., Buricchi, F., Raugei, G., Ramponi, G. und Chiarugi, P. (2005). **Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth**. *Molecular and cellular biology* *25*, 6391-6403.

- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. und Parks, W. P. (1973). **In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.** *Journal of the National Cancer Institute* 51, 1417-1423.
- Giebing, T., Hinssen, H. und D'haese, J. (1994). **The Complete Sequence of a 40-kDa Actin-Modulating Protein from the Earthworm Lumbricus terrestris.** *European journal of biochemistry* 225, 773-779.
- Gilbert, M. R., Dignam, J. J., Armstrong, T. S., Wefel, J. S., Blumenthal, D. T., Vogelbaum, M. A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S. und Won, M. (2014). **A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma.** *New England Journal of Medicine* 370, 699-708.
- Giorgi, C., Agnoletto, C., Baldini, C., Bononi, A., Bonora, M., Marchi, S., Missiroli, S., Patergnani, S., Poletti, F. und Rimessi, A. (2010). **Redox control of protein kinase C: cell-and disease-specific aspects.** *Antioxidants & redox signaling* 13, 1051-1085.
- Giorgio, M., Migliaccio, E., Orsini, F., Paolucci, D., Moroni, M., Contursi, C., Pelliccia, G., Luzi, L., Minucci, S. und Marcaccio, M. (2005). **Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis.** *Cell* 122, 221-233.
- Giron, P., Dayon, L. und Sanchez, J. C. (2011). **Cysteine tagging for MS-based proteomics.** *Mass spectrometry reviews* 30, 366-395.
- Gitler, C., Zarmi, B., Kalef, E., Meller, R., Zor, U. und Goldman, R. (2002). **Calcium-dependent oxidation of thioredoxin during cellular growth initiation.** *Biochemical and biophysical research communications* 290, 624-628.
- Gogvadze, V., Orrenius, S. und Zhivotovsky, B. (2008). **Mitochondria in cancer cells: what is so special about them?** *Trends in cell biology* 18, 165-173.
- Gough, D. und Cotter, T. (2011). **Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule.** *Cell death & disease* 2, e213.
- Griendling, K. K., Touyz, R. M., Zweier, J. L., Dikalov, S., Chilian, W., Chen, Y.-R., Harrison, D. G. und Bhatnagar, A. (2016). **Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system: a scientific statement from the American Heart Association.** *Circulation research* 119, e39-e75.
- Grintsevich, E. E., Yesilyurt, H. G., Rich, S. K., Hung, R.-J., Terman, J. R. und Reisler, E. (2016). **F-actin dismantling through a redox-driven synergy between Mical and cofilin.** *Nature cell biology* 18, 876.
- Gunst, S. J. und Zhang, W. (2008). **Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction.** *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 295, C576-C587.

- Guo, J., Gaffrey, M. J., Su, D., Liu, T., Camp II, D. G., 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**. *Nature protocols* 9, 64.
- 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**. *Nature biotechnology* 17, 994.
- Haag, A. M. (2016). **Mass analyzers and mass spectrometers**. In: *Modern Proteomics—Sample Preparation, Analysis and Practical Applications*, Springer, S. 157-169.
- Halliwell, B. und Chirico, S. (1993). **Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance**. *The American journal of clinical nutrition* 57, 715S-725S.
- Halliwell, B. und Gutteridge, J. (1984). **Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage**. *The Lancet* 324, 1095.
- Hamnell-Pamment, Y., Lind, C., Palmberg, C., Bergman, T. und Cotgreave, I. A. (2005). **Determination of site-specificity of S-glutathionylated cellular proteins**. *Biochemical and biophysical research communications* 332, 362-369.
- Hanahan, D. (1983). **Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids**. *Journal of molecular biology* 166, 557-580.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2000). **The hallmarks of cancer**. *cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2011). **Hallmarks of cancer: the next generation**. *cell* 144, 646-674.
- Hartmann, C., Hentschel, B., Wick, W., Capper, D., Felsberg, J., Simon, M., Westphal, M., Schackert, G., Meyermann, R. und Pietsch, T. (2010). **Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas**. *Acta neuropathologica* 120, 707-718.
- Hawkins, C. L. und Davies, M. J. (2001). **Generation and propagation of radical reactions on proteins**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1504, 196-219.
- Hegde, M., Roscoe, J., Cala, P. und Gorin, F. (2004). **Amiloride kills malignant glioma cells independent of its inhibition of the sodium-hydrogen exchanger**. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 310, 67-74.
- Held, J. M., Danielson, S. R., Behring, J. B., Atsriku, C., Britton, D. J., Puckett, R. L., Schilling, B., Campisi, J., Benz, C. C. und Gibson, B. W. (2010). **Targeted quantitation of site-specific cysteine oxidation in endogenous proteins using a differential alkylation and multiple reaction monitoring mass spectrometry approach**. *Molecular & Cellular Proteomics* 9, 1400-1410.

- Held, J. M. und Gibson, B. W. (2012). **Regulatory control or oxidative damage? Proteomic approaches to interrogate the role of cysteine oxidation status in biological processes.** *Molecular & Cellular Proteomics* *11*, R111. 013037.
- Henzler, T. und Steudle, E. (2000). **Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in Chara corallina: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels.** *Journal of experimental botany* *51*, 2053-2066.
- Heo, J. und Campbell, S. L. (2005). **Mechanism of redox-mediated guanine nucleotide exchange on redox-active Rho GTPases.** *Journal of Biological Chemistry* *280*, 31003-31010.
- Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W. und Kabsch, W. (1990). **Atomic model of the actin filament.** *Nature* *347*, 44.
- Holmgren, A. (1985). **Thioredoxin.** *Annual review of biochemistry* *54*, 237-271.
- Holmgren, A. (2000). **Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems.** *Antioxidants & redox signaling* *2*, 811-820.
- Hsu, J.-L., Hsieh, Y., Tu, C., O'Connor, D., Nick, H. S. und Silverman, D. N. (1996). **Catalytic properties of human manganese superoxide dismutase.** *Journal of Biological Chemistry* *271*, 17687-17691.
- Huang, S., Chi, Y., Qin, Y., Wang, Z., Xiu, B., Su, Y., Guo, R., Guo, L., Sun, H. und Zeng, C. (2018). **CAPG enhances breast cancer metastasis by competing with PRMT5 to modulate STC-1 transcription.** *Theranostics* *8*, 2549.
- Hubert, T., Van Impe, K., Vandekerckhove, J. und Gettemans, J. (2009). **The actin-capping protein CapG localizes to microtubule-dependent organelles during the cell cycle.** *Biochemical and biophysical research communications* *380*, 166-170.
- Hüttelmaier, S., Illenberger, S., Grosheva, I., Rüdiger, M., Singer, R. H. und Jockusch, B. M. (2001). **Raver1, a dual compartment protein, is a ligand for PTB/hnRNPI and microfilament attachment proteins.** *The Journal of cell biology* *155*, 775-786.
- Ichikawa, H., Kanda, T., Kosugi, S.-i., Kawachi, Y., Sasaki, H., Wakai, T. und Kondo, T. (2013). **Laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis reveal the role of a novel macrophage-capping protein in lymph node metastasis in gastric cancer.** *Journal of proteome research* *12*, 3780-3791.
- Ingold, I., Berndt, C., Schmitt, S., Doll, S., Poschmann, G., Buday, K., Roveri, A., Peng, X., Freitas, F. P. und Seibt, T. (2018). **Selenium utilization by GPX4 is required to prevent hydroperoxide-induced ferroptosis.** *Cell* *172*, 409-422. e421.
- Ishiwata, S. i. (1976). **Freezing of actin.** *The Journal of Biochemistry* *80*, 595-609.
- Jacob, C., Battaglia, E., Burkholz, T., Peng, D., Bagrel, D. und Montenarh, M. (2011). **Control of oxidative posttranslational cysteine modifications: from intricate chemistry to**

- widespread biological and medical applications.** *Chemical research in toxicology* 25, 588-604.
- Jaffrey, S. R. und Snyder, S. H. (2001). **The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins.** *Sci. STKE* 2001, pl1-pl1.
- Jakob, U. und Leichert, L. I. (2009). **Thiol-Modifikationen mittels Massenspektrometrie auf der Spur.** *Biospektrum* 15, 659.
- Jakob, U., Muse, W., Eser, M. und Bardwell, J. C. (1999). **Chaperone activity with a redox switch.** *Cell* 96, 341-352.
- Jennings, K. R. und Dolnikowski, G. G. (1990). **[2] Mass analyzers.** In: *Methods in enzymology*, Academic Press, S. 37-61.
- Johnston, P. A., Yu, F. X., Reynolds, G. A., Yin, H. L., Moomaw, C. R., Slaughter, C. A. und Südhof, T. C. (1990). **Purification and expression of gCap39. An intracellular and secreted Ca<sup>2+</sup> (+)-dependent actin-binding protein enriched in mononuclear phagocytes.** *Journal of Biological Chemistry* 265, 17946-17952.
- Jones, D. P. (2008). **Radical-free biology of oxidative stress.** *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 295, C849-C868.
- Kahsai, A. W., Xiao, K., Rajagopal, S., Ahn, S., Shukla, A. K., Sun, J., Oas, T. G. und Lefkowitz, R. J. (2011). **Multiple ligand-specific conformations of the  $\beta$  2-adrenergic receptor.** *Nature chemical biology* 7, 692.
- Kang, S., Kang, J., Kwon, H., Frueh, D., Yoo, S. H., Wagner, G. und Park, S. (2008). **Effects of Redox Potential and Ca<sup>2+</sup> on the Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor L3-1 Loop Region IMPLICATIONS FOR RECEPTOR REGULATION.** *Journal of Biological Chemistry* 283, 25567-25575.
- Kang, S., Kim, M. J., An, H., Kim, B. G., Choi, Y. P., Kang, K. S., Gao, M.-Q., Park, H., Na, H. J. und Kim, H. K. (2010). **Proteomic molecular portrait of interface zone in breast cancer.** *Journal of proteome research* 9, 5638-5645.
- Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988). **Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.** *Analytical chemistry* 60, 2299-2301.
- Karve, T. M. und Cheema, A. K. (2011). **Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease.** *Journal of amino acids* 2011.
- Kelly, F. und Mudway, I. (2003). **Protein oxidation at the air-lung interface.** *Amino acids* 25, 375-396.
- Khaitlina, S. Y. (2001). **Functional specificity of actin isoforms.**

- Kielosto, M., Nummela, P., Järvinen, K., Yin, M. und Hölttä, E. (2009). **Identification of integrins  $\alpha 6$  and  $\beta 7$  as c-Jun-and transformation-relevant genes in highly invasive fibrosarcoma cells.** International journal of cancer *125*, 1065-1073.
- Kimura, K., Ojima, H., Kubota, D., Sakumoto, M., Nakamura, Y., Tomonaga, T., Kosuge, T. und Kondo, T. (2013). **Proteomic identification of the macrophage-capping protein as a protein contributing to the malignant features of hepatocellular carcinoma.** Journal of proteomics *78*, 362-373.
- Kirkman, H. N., Rolfo, M., Ferraris, A. M. und Gaetani, G. F. (1999). **Mechanisms of protection of catalase by NADPH Kinetics and stoichiometry.** Journal of Biological Chemistry *274*, 13908-13914.
- Klamt, F., Zdanov, S., Levine, R. L., Pariser, A., Zhang, Y., Zhang, B., Yu, L.-R., Veenstra, T. D. und Shacter, E. (2009). **Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin.** Nature cell biology *11*, 1241-1246.
- Klaunig, J. E. und Kamendulis, L. M. (2004). **The role of oxidative stress in carcinogenesis.** Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *44*, 239-267.
- Kleihues, P., Louis, D. N., Scheithauer, B. W., Rorke, L. B., Reifenberger, G., Burger, P. C. und Cavenee, W. K. (2002). **The WHO classification of tumors of the nervous system.** Journal of Neuropathology & Experimental Neurology *61*, 215-225.
- Klemke, M., Wabnitz, G. H., Funke, F., Funk, B., Kirchgessner, H. und Samstag, Y. (2008). **Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions.** Immunity *29*, 404-413.
- 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.
- Kramer, P. A., Duan, J., Qian, W.-J. und Marcinek, D. J. (2015). **The measurement of reversible redox dependent post-translational modifications and their regulation of mitochondrial and skeletal muscle function.** Frontiers in physiology *6*, 347.
- Krecic, A. M. und Swanson, M. S. (1999). **hnRNP complexes: composition, structure, and function.** Current opinion in cell biology *11*, 363-371.
- Krull, S., Thyberg, J., Bjorkroth, B., Rackwitz, H.-R. und Cordes, V. C. (2004). **Nucleoporins as components of the nuclear pore complex core structure and Tpr as the architectural element of the nuclear basket.** Molecular biology of the cell *15*, 4261-4277.
- Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y. und Nomoto, A. (2001). **Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation.** Molecular and Cellular Biology *21*, 6139-6150.

- Kumar, B., Koul, S., Khandrika, L., Meacham, R. B. und Koul, H. K. (2008). **Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype.** *Cancer research* 68, 1777-1785.
- Kumar, C. und Mann, M. (2009). **Bioinformatics analysis of mass spectrometry-based proteomics data sets.** *FEBS letters* 583, 1703-1712.
- Laemmli, U. K. (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *nature* 227, 680.
- Lal, A., Lash, A. E., Altschul, S. F., Velculescu, V., Zhang, L., McLendon, R. E., Marra, M. A., Prange, C., Morin, P. J. und Polyak, K. (1999). **A public database for gene expression in human cancers.** *Cancer Research* 59, 5403-5407.
- Lambeth, J. D., Kawahara, T. und Diebold, B. (2007). **Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression.** *Free Radical Biology and Medicine* 43, 319-331.
- Lange, V., Picotti, P., Domon, B. und Aebersold, R. (2008). **Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial.** *Molecular systems biology* 4.
- Larsen, M. R., Trelle, M. B., Thingholm, T. E. und Jensen, O. N. (2006). **Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry: Mass Spectrometry For Proteomics Analysis.** *Biotechniques* 40, 790-798.
- Lassing, I., Schmitzberger, F., Björnstedt, M., Holmgren, A., Nordlund, P., Schutt, C. E. und Lindberg, U. (2007). **Molecular and structural basis for redox regulation of  $\beta$ -actin.** *Journal of molecular biology* 370, 331-348.
- Lauffenburger, D. A. und Horwitz, A. F. (1996). **Cell migration: a physically integrated molecular process.** *Cell* 84, 359-369.
- Laval, J. (1996). **Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress.** *Pathologie-biologie* 44, 14-24.
- Lee, S. H. und Dominguez, R. (2010). **Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells.** *Molecules and cells* 29, 311-325.
- 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.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 8197-8202.
- Leichert, L. I. und Jakob, U. (2004). **Protein thiol modifications visualized in vivo.** *PLoS biology* 2, e333.
- Leichert, L. I. und Jakob, U. (2006). **Global methods to monitor the thiol–disulfide state of proteins in vivo.** *Antioxidants & redox signaling* 8, 763-772.

- Lin, J.-S. und Lai, E.-M. (2017). **Protein–Protein Interactions: Co-Immunoprecipitation**. In: Bacterial Protein Secretion Systems, Springer, S. 211-219.
- Lind, C., Gerdes, R., Hammell, Y., Schuppe-Koistinen, I., von Löwenhielm, H. B., Holmgren, A. und Cotgreave, I. A. (2002). **Identification of S-glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis**. Archives of biochemistry and biophysics 406, 229-240.
- Liou, G.-Y. und Storz, P. (2010). **Reactive oxygen species in cancer**. Free radical research 44, 479-496.
- Liu, H., Sadygov, R. G. und Yates, J. R. (2004). **A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics**. Analytical chemistry 76, 4193-4201.
- Liu, X., Salokas, K., Tamene, F., Jiu, Y., Weldatsadik, R. G., Öhman, T. und Varjosalo, M. (2018). **An AP-MS-and BioID-compatible MAC-tag enables comprehensive mapping of protein interactions and subcellular localizations**. Nature communications 9, 1188.
- Löffler, G., Petrides, P., Heinrich, P. und Graeve, L. (2014). **Biochemie und Pathobiochemie, 9. vollst. überarb. Aufl** (Berlin, Heidelberg: Springer).
- Lottspeich, F. (2009). **Introduction to proteomics**. In: Proteomics, Springer, S. 3-10.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Juvet, A., Scheithauer, B. W. und Kleihues, P. (2007). **The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system**. Acta neuropathologica 114, 97-109.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P. und Ellison, D. W. (2016). **The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary**. Acta neuropathologica 131, 803-820.
- Maccarrone, G., Bonfiglio, J. J., Silberstein, S., Turck, C. W. und Martins-de-Souza, D. (2017). **Characterization of a protein interactome by co-immunoprecipitation and shotgun mass spectrometry**. In: Multiplex Biomarker Techniques, Springer, S. 223-234.
- MacLean, B., Tomazela, D. M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G. L., Frewen, B., Kern, R., Tabb, D. L., Liebler, D. C. und MacCoss, M. J. (2010). **Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments**. Bioinformatics 26, 966-968.
- Madl, T. und Sattler, M. (2009). **Adhesion dance with raver**. Structure 17, 781-783.
- Manda, G., Nechifor, M. T. und Neagu, T.-M. (2009). **Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies**. Current Chemical Biology 3, 22-46.
- Marg, A., Shan, Y., Meyer, T., Meissner, T., Brandenburg, M. und Vinkemeier, U. (2004). **Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent**

- nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1.** The Journal of cell biology *165*, 823-833.
- Markham, K., Bai, Y. und Schmitt-Ulms, G. (2007). **Co-immunoprecipitations revisited: an update on experimental concepts and their implementation for sensitive interactome investigations of endogenous proteins.** Analytical and bioanalytical chemistry *389*, 461-473.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C. und Giovannini, C. (2005). **Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes.** The Journal of nutritional biochemistry *16*, 577-586.
- McDonagh, B., Sakellariou, G. K., Smith, N. T., Brownridge, P. und Jackson, M. J. (2014). **Differential cysteine labeling and global label-free proteomics reveals an altered metabolic state in skeletal muscle aging.** Journal of proteome research *13*, 5008-5021.
- Meister, A. und Anderson, M. E. (1983). **Glutathione.** Annual review of biochemistry *52*, 711-760.
- Mellacheruvu, D., Wright, Z., Couzens, A. L., Lambert, J.-P., St-Denis, N. A., Li, T., Miteva, Y. V., Hauri, S., Sardi, M. E. und Low, T. Y. (2013). **The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification–mass spectrometry data.** Nature methods *10*, 730.
- Meng, T.-C., Fukada, T. und Tonks, N. K. (2002). **Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo.** Molecular cell *9*, 387-399.
- Milton, V. J. und Sweeney, S. T. (2012). **Oxidative stress in synapse development and function.** Developmental neurobiology *72*, 100-110.
- Milzani, A., DalleDonne, I. und Colombo, R. (1997). **Prolonged oxidative stress on actin.** Archives of biochemistry and biophysics *339*, 267-274.
- Mishra, V. S., Henske, E. P., Kwiatkowski, D. J. und Southwick, F. S. (1994). **The human actin-regulatory protein cap G: gene structure and chromosome location.** Genomics *23*, 560-565.
- Missler, M. und Südhof, T. C. (1998). **Neurexins: three genes and 1001 products.** Trends in Genetics *14*, 20-26.
- Mohora, M., Greabu, M., Totan, A., Mitrea, N. und Battino, M. (2009). **Redox-sensitive signaling factors and antioxidants.** Farmacia *57*, 399-410.
- Moldovan, L., Moldovan, N. I., Sohn, R. H., Parikh, S. A. und Goldschmidt-Clermont, P. J. (2000). **Redox changes of cultured endothelial cells and actin dynamics.** Circulation research *86*, 549-557.
- Munnamalai, V. und Suter, D. M. (2009). **Reactive oxygen species regulate F-actin dynamics in neuronal growth cones and neurite outgrowth.** Journal of neurochemistry *108*, 644-661.

- Murray, C. I., Uhrigshardt, H., O'Meally, R. N., Cole, R. N. und Van Eyk, J. E. (2012). **Identification and quantification of S-nitrosylation by cysteine reactive tandem mass tag switch assay.** *Molecular & Cellular Proteomics* 11, M111. 013441.
- Murray, C. I. und Van Eyk, J. E. (2012). **Chasing cysteine oxidative modifications: proteomic tools for characterizing cysteine redox status.** *Circulation: Cardiovascular Genetics* 5, 591-591.
- Nakajima, M., Takeuchi, T. und Morimoto, K. (1996). **Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine in human cells under oxygen-free conditions.**
- Nakielny, S. und Dreyfuss, G. (1999). **Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus.** *Cell* 99, 677-690.
- Nelson, K. J., Klomsiri, C., Codreanu, S. G., Soito, L., Liebler, D. C., Rogers, L. C., Daniel, L. W. und Poole, L. B. (2010). **Use of dimedone-based chemical probes for sulfenic acid detection: methods to visualize and identify labeled proteins.** In: *Methods in enzymology*, Elsevier, S. 95-115.
- Nesterenko, M. V., Tilley, M. und Upton, S. J. (1994). **A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels.** *Journal of biochemical and biophysical methods* 28, 239-242.
- Neuhaus, J.-M., Wanger, M., Keiser, T. und Wegner, A. (1983). **Treadmilling of actin.** *Journal of Muscle Research & Cell Motility* 4, 507-527.
- Nikitovic, D., Corsini, E., Kouretas, D., Tsatsakis, A. und Tzanakakis, G. (2013). **ROS-major mediators of extracellular matrix remodeling during tumor progression.** *Food and chemical toxicology* 61, 178-186.
- Nishikawa, M. (2008). **Reactive oxygen species in tumor metastasis.** *Cancer letters* 266, 53-59.
- Nishikawa, M. und Hashida, M. (2006). **Inhibition of tumour metastasis by targeted delivery of antioxidant enzymes.** *Expert opinion on drug delivery* 3, 355-369.
- Nordberg, J. und Arnér, E. S. (2005). **Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System.** *Free Radical Biology and Medicine* 39, 1287.
- Ohgaki, H. und Kleihues, P. (2005). **Epidemiology and etiology of gliomas.** *Acta neuropathologica* 109, 93-108.
- Olave, I. A., Reck-Peterson, S. L. und Crabtree, G. R. (2002). **Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling.** *Annual review of biochemistry* 71, 755-781.
- 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.** *Molecular & cellular proteomics* 1, 376-386.
- Onoda, K. und Yin, H. (1993). **gCap39 is phosphorylated. Stimulation by okadaic acid and preferential association with nuclei.** *Journal of Biological Chemistry* 268, 4106-4112.

- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D. H., Rucknagel, K. P., Schierhorn, A., Moritz, B., Huttelmaier, S., Flach, N., Handoko, L. und Wahle, E. (2006). **Asymmetric arginine dimethylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein-arginine methyltransferase 1 inhibits its interaction with c-Src.** *Journal of Biological Chemistry* 281, 11115-11125.
- Paavilainen, V. O., Bertling, E., Falek, S. und Lappalainen, P. (2004). **Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins.** *Trends in cell biology* 14, 386-394.
- Pal, D. S., Li, X., Banerjee, T., Miao, Y. und Devreotes, P. N. (2019). **The excitable signal transduction networks: movers and shapers of eukaryotic cell migration.** *The International journal of developmental biology* 63, 407.
- Pan, J. und Carroll, K. S. (2014). **Chemical biology approaches to study protein cysteine sulfenylation.** *Biopolymers* 101, 165-172.
- Panieri, E. und Santoro, M. M. (2016). **ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells.** *Cell death & disease* 7, e2253.
- Papala, A., Sylvester, M., Dyballa-Rukes, N., Metzger, S. und D'Haese, J. (2017). **Isolation and characterization of human CapG expressed and post-translationally modified in Pichia pastoris.** *Protein expression and purification* 134, 25-37.
- Pathan, M., Keerthikumar, S., Ang, C. S., Gangoda, L., Quek, C. Y., Williamson, N. A., Mouradov, D., Sieber, O. M., Simpson, R. J. und Salim, A. (2015). **FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool.** *Proteomics* 15, 2597-2601.
- Paulsen, C. E. und Carroll, K. S. (2013). **Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery.** *Chemical reviews* 113, 4633-4679.
- Pawelek, J. M. und Chakraborty, A. K. (2008). **The cancer cell–leukocyte fusion theory of metastasis.** *Advances in cancer research* 101, 397-444.
- Pelicano, H., Carney, D. und Huang, P. (2004). **ROS stress in cancer cells and therapeutic implications.** *Drug resistance updates* 7, 97-110.
- Pellieux, C., Desgeorges, A., Pigeon, C. H., Chambaz, C., Yin, H., Hayoz, D. und Silacci, P. (2003). **Cap G: a gelsolin-family protein modulating protective effects of unidirectional shear stress.** *Journal of Biological Chemistry*.
- Picotti, P. und Aebersold, R. (2012). **Selected reaction monitoring–based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions.** *Nature methods* 9, 555.
- Pitot, H. C. (1993). **The molecular biology of carcinogenesis.** *Cancer* 72, 962-970.
- Pollard, T. D. und Borisy, G. G. (2003). **Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments.** *Cell* 112, 453-465.

- Pollard, T. D. und Cooper, J. A. (1986). **Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions.** Annual review of biochemistry 55, 987-1035.
- Poole, L. B. (2015). **The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry.** Free Radical Biology and Medicine 80, 148-157.
- Poschmann, G., Grzendowski, M., Stefanski, A., Bruns, E., Meyer, H. E. und Stühler, K. (2015). **Redox proteomics reveal stress responsive proteins linking peroxiredoxin-1 status in glioma to chemosensitivity and oxidative stress.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics 1854, 624-631.
- Prasad, S., Gupta, S. C. und Tyagi, A. K. (2017). **Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals.** Cancer letters 387, 95-105.
- Qu, Z., Meng, F., Bomgardner, R. D., Viner, R. I., Li, J., Rogers, J. C., Cheng, J., Greenlief, C. M., Cui, J. und Lubahn, D. B. (2014). **Proteomic quantification and site-mapping of S-nitrosylated proteins using isobaric iodoTMT reagents.** Journal of proteome research 13, 3200-3211.
- Rathinam, R. und Alahari, S. K. (2010). **Important role of integrins in the cancer biology.** Cancer and Metastasis Reviews 29, 223-237.
- Ratnayake, S., Dias, I. H., Lattman, E. und Griffiths, H. R. (2013). **Stabilising cysteinyl thiol oxidation and nitrosation for proteomic analysis.** Journal of proteomics 92, 160-170.
- Rauniyar, N. (2015). **Parallel reaction monitoring: a targeted experiment performed using high resolution and high mass accuracy mass spectrometry.** International journal of molecular sciences 16, 28566-28581.
- Remmele, W. (1987). **Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue.** Pathologie 8, 138-140.
- Renz, M., Betz, B., Niederacher, D., Bender, H. G. und Langowski, J. (2008). **Invasive breast cancer cells exhibit increased mobility of the actin-binding protein CapG.** International journal of cancer 122, 1476-1482.
- Reynaert, N. L., Ckless, K., Guala, A. S., Wouters, E. F., van der Vliet, A. und Janssen-Heininger, Y. M. (2006). **In situ detection of S-glutathionylated proteins following glutaredoxin-1 catalyzed cysteine derivatization.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 1760, 380-387.
- Rice-Evans, C. A., Sampson, J., Bramley, P. M. und Holloway, D. E. (1997). **Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo?** Free radical research 26, 381-398.
- Roberts, A. W., Kim, C., Zhen, L., Lowe, J. B., Kapur, R., Petryniak, B., Spaetti, A., Pollock, J. D., Borneo, J. B. und Bradford, G. B. (1999). **Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense.** Immunity 10, 183-196.

- Rogers, L. K., Leinweber, B. L. und Smith, C. V. (2006). **Detection of reversible protein thiol modifications in tissues.** *Analytical biochemistry* 358, 171-184.
- Ronsein, G. E., Pamir, N., von Haller, P. D., Kim, D. S., Oda, M. N., Jarvik, G. P., Vaisar, T. und Heinecke, J. W. (2015). **Parallel reaction monitoring (PRM) and selected reaction monitoring (SRM) exhibit comparable linearity, dynamic range and precision for targeted quantitative HDL proteomics.** *Journal of proteomics* 113, 388-399.
- 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.
- Safer, D., Sosnick, T. R. und Elzinga, M. (1997). **Thymosin  $\beta$ 4 binds actin in an extended conformation and contacts both the barbed and pointed ends.** *Biochemistry* 36, 5806-5816.
- Salazar-Ramiro, A., Ramírez-Ortega, D., Pérez de la Cruz, V., Hernández-Pedro, N. Y., González-Esquivel, D. F., Sotelo, J. und Pineda, B. (2016). **Role of redox status in development of glioblastoma.** *Frontiers in immunology* 7, 156.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). **Molecular cloning: a laboratory manual,** Cold spring harbor laboratory press.
- 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.
- San Martin, A. und Griendling, K. K. (2010). **Redox control of vascular smooth muscle migration.** *Antioxidants & redox signaling* 12, 625-640.
- Sanson, M., Marie, Y., Paris, S., Idbaih, A., Laffaire, J., Ducray, F., El Hallani, S., Boisselier, B., Mokhtari, K. und Hoang-Xuan, K. (2009). **Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas.** *J Clin Oncol* 27, 4150-4154.
- Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., Irie, S., Iwama, N., Boise, L. H., Thompson, C. B., Golemis, E., Fong, L. und Wang, H.-G. (1994). **Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 9238-9242.
- Schafer, D. A. und Cooper, J. A. (1995). **Control of actin assembly at filament ends.** *Annual review of cell and developmental biology* 11, 497-518.
- Schieber, M. und Chandel, N. S. (2014). **ROS function in redox signaling and oxidative stress.** *Current biology* 24, R453-R462.
- Schmidt, A., Forne, I. und Imhof, A. (2014). **Bioinformatic analysis of proteomics data.** *BMC systems biology* 8, S3.
- Schmidt, N. (2016) **Charakterisierung von oxidativen Modifikationen an Cap G in humanen Glioblastomzellen.** Masterarbeit.

- Schulte, B., John, I., Simon, B., Brockmann, C., Oelmeier, S. A., Jahraus, B., Kirchgessner, H., Riplinger, S., Carlomagno, T. und Wabnitz, G. H. (2013). **A reducing milieu renders cofilin insensitive to phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) inhibition.** *Journal of Biological Chemistry* 288, 29430-29439.
- Schumacker, P. T. (2006). **Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword.** *Cancer cell* 10, 175-176.
- Selbach, M. und Mann, M. (2006). **Protein interaction screening by quantitative immunoprecipitation combined with knockdown (QUICK).** *Nature methods* 3, 981-983.
- Seo, J. und Lee, K.-J. (2004). **Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches.** *Journal of biochemistry and molecular biology* 37, 35-44.
- Shao, F., Zhang, R., Don, L. und Ying, K. (2011). **Overexpression of gelsolin-like actin-capping protein is associated with progression of lung adenocarcinoma.** *The Tohoku journal of experimental medicine* 225, 95-101.
- Sheehan, D. und McDonagh, B. (2019). **The clinical potential of thiol redox proteomics.** *Expert Review of Proteomics*, 1-8.
- Shi, T., Su, D., Liu, T., Tang, K., Camp, D. G., Qian, W. J. und Smith, R. D. (2012). **Advancing the sensitivity of selected reaction monitoring-based targeted quantitative proteomics.** *Proteomics* 12, 1074-1092.
- Shyu, A.-B. und Wilkinson, M. F. (2000). **The double lives of shuttling mRNA binding proteins.** *Cell* 102, 135-138.
- Sies, H. (1985). **Hydroperoxides and thiol oxidants in the study of oxidative stress in intact cells and organs.** *Oxidative stress* 1, 73-90.
- Sies, H. (1993). **Strategies of antioxidant defense.** *European journal of biochemistry* 215, 213-219.
- Sies, H. und Stahl, W. (1995). **Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants.** *The American journal of clinical nutrition* 62, 1315S-1321S.
- Silacci, P., Mazzolai, L., Gauci, C., Stergiopoulos, N., Yin, H. und Hayoz, D. (2004). **Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions.** *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 61, 2614-2623.
- Silva, J. C., Denny, R., Dorschel, C. A., Gorenstein, M., Kass, I. J., Li, G.-Z., McKenna, T., Nold, M. J., Richardson, K. und Young, P. (2005). **Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs.** *Analytical chemistry* 77, 2187-2200.
- Singh, A. K., Dhaunsi, G. S., Gupta, M. P., Orak, J. K., Asayama, K. und Singh, I. (1994). **Demonstration of glutathione peroxidase in rat liver peroxisomes and its intraorganellar distribution.** *Archives of biochemistry and biophysics* 315, 331-338.

- Sinha, K., Das, J., Pal, P. B. und Sil, P. C. (2013). **Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis**. *Archives of toxicology* 87, 1157-1180.
- Sjöblom, B., Salmazo, A. und Djinović-Carugo, K. (2008).  **$\alpha$ -Actinin structure and regulation**. *Cellular and molecular life sciences* 65, 2688.
- Snel, B., Lehmann, G., Bork, P. und Huynen, M. A. (2000). **STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene**. *Nucleic acids research* 28, 3442-3444.
- Southwick, F. und DiNubile, M. (1986). **Rabbit alveolar macrophages contain a Ca<sup>2+</sup>-sensitive, 41,000-dalton protein which reversibly blocks the "barbed" ends of actin filaments but does not sever them**. *Journal of Biological Chemistry* 261, 14191-14195.
- Spickett, C. M. und Pitt, A. R. (2012). **Protein oxidation: role in signalling and detection by mass spectrometry**. *Amino Acids* 42, 5-21.
- Stadtman, E. (1993). **Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions**. *Annual review of biochemistry* 62, 797-821.
- Stadtman, E. R. (2006). **Protein oxidation and aging**. *Free radical research* 40, 1250-1258.
- Stephens, L., Milne, L. und Hawkins, P. (2008). **Moving towards a better understanding of chemotaxis**. *Current Biology* 18, R485-R494.
- Steven, S., Daiber, A., Dopheide, J. F., Münzel, T. und Espinola-Klein, C. (2017). **Peripheral artery disease, redox signaling, oxidative stress—basic and clinical aspects**. *Redox biology* 12, 787-797.
- Stocker, R. und Keaney Jr, J. F. (2004). **Role of oxidative modifications in atherosclerosis**. *Physiological reviews* 84, 1381-1478.
- Stossel, T., Chaponnier, C., Ezzell, R., Hartwig, J., Janmey, P., Kwiatkowski, D., Lind, S., Smith, D., Southwick, F. und Yin, H. (1985). **Nonmuscle actin-binding proteins**. *Annual review of cell biology* 1, 353-402.
- Stossel, T. P. (1993). **On the crawling of animal cells**. *Science* 260, 1086-1094.
- Stournaras, C., Drewes, G., Blackholm, H., Merkler, I. und Faulstich, H. (1990). **Glutathionyl (cysteine-374) actin forms filaments of low mechanical stability**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1037, 86-91.
- Sullivan, L. B. und Chandel, N. S. (2014). **Mitochondrial reactive oxygen species and cancer**. *Cancer & metabolism* 2, 17.
- Sun, H.-Q., Kwiatkowska, K., Wooten, D. C. und Yin, H. L. (1995). **Effects of CapG overexpression on agonist-induced motility and second messenger generation**. *The Journal of cell biology* 129, 147-156.

- Tahara, E. B., Navarete, F. D. und Kowaltowski, A. J. (2009). **Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation.** *Free Radical Biology and Medicine* 46, 1283-1297.
- Takenawa, T. und Suetsugu, S. (2007). **The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton.** *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 37.
- Terman, J. R. und Kashina, A. (2013). **Post-translational modification and regulation of actin.** *Current opinion in cell biology* 25, 30-38.
- Thannickal, V. J. und Fanburg, B. L. (2000). **Reactive oxygen species in cell signaling.** *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 279, L1005-L1028.
- Thom, S. R., Bhopale, V. M., Mancini, D. J. und Milovanova, T. N. (2008). **Actin S-nitrosylation inhibits neutrophil  $\beta 2$  integrin function.** *Journal of Biological Chemistry* 283, 10822-10834.
- Thomas, E. L., Lehrer, R. I. und Rest, R. F. (1988). **Human neutrophil antimicrobial activity.** *Reviews of infectious diseases*, S450-S456.
- Thompson, C. C., Ashcroft, F. J., Patel, S., Saraga, G., Vimalachandran, D., Prime, W., Campbell, F., Dodson, A., Jenkins, R. E. und Lemoine, N. R. (2007). **Pancreatic cancer cells overexpress gelsolin family-capping proteins, which contribute to their cell motility.** *Gut* 56, 95-106.
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J. und Hiai, H. (1995). **Persistent oxidative stress in cancer.** *FEBS letters* 358, 1-3.
- Trachootham, D., Alexandre, J. und Huang, P. (2009). **Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?** *Nature reviews Drug discovery* 8, 579.
- Trifaró, J.-M., Lejen, T., Rose, S., Pene, T. D., Barkar, N. und Seward, E. (2002). **Pathways that control cortical F-actin dynamics during secretion.** *Neurochemical research* 27, 1371-1385.
- Trifaró, J. M., Gasman, S. und Gutierrez, L. (2008). **Cytoskeletal control of vesicle transport and exocytosis in chromaffin cells.** *Acta Physiologica* 192, 165-172.
- Tsai, T.-J., Chao, W.-Y., Chen, C.-C., Chen, Y.-J., Lin, C.-Y. und Lee, Y.-R. (2018a). **Gelsolin-like Actin-capping Protein (CapG) Overexpression in the Cytoplasm of Human Hepatocellular Carcinoma, Associated with Cellular Invasion, Migration and Tumor Prognosis.** *Anticancer research* 38, 3943-3950.
- Tsai, T.-J., Lim, Y.-P., Chao, W.-Y., Chen, C.-C., Chen, Y.-J., Lin, C.-Y. und Lee, Y.-R. (2018b). **Capping Actin Protein Overexpression in Human Colorectal Carcinoma and Its Contributed Tumor Migration.** *Analytical Cellular Pathology* 2018.
- Tseng, Y., An, K. M., Esue, O. und Wirtz, D. (2004). **The bimodal role of filamin in controlling the architecture and mechanics of F-actin networks.** *Journal of Biological Chemistry* 279, 1819-1826.

- Turrens, J. F. (2003). **Mitochondrial formation of reactive oxygen species**. *The Journal of physiology* 552, 335-344.
- Turrens, J. F., Alexandre, A. und Lehninger, A. L. (1985). **Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria**. *Archives of biochemistry and biophysics* 237, 408-414.
- Turrens, J. F. und Boveris, A. (1980). **Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria**. *Biochemical Journal* 191, 421-427.
- Tyler, D. D. (1975). **Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver**. *Biochemical Journal* 147, 493-504.
- Ullman, K. S., Shah, S., Powers, M. A. und Forbes, D. J. (1999). **The nucleoporin nup153 plays a critical role in multiple types of nuclear export**. *Molecular Biology of the Cell* 10, 649-664.
- Ünlü, M., Morgan, M. E. und Minden, J. S. (1997). **Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts**. *Electrophoresis* 18, 2071-2077.
- Upadhyay, S., Vaish, S. und Dhiman, M. (2019). **Hydrogen peroxide-induced oxidative stress and its impact on innate immune responses in lung carcinoma A549 cells**. *Molecular and cellular biochemistry* 450, 135-147.
- Valderrama, B., Ayala, M. und Vazquez-Duhalt, R. (2002). **Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes**. *Chemistry & biology* 9, 555-565.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. und Telser, J. (2007). **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease**. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. und Mazur, M. (2006). **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer**. *Chemico-biological interactions* 160, 1-40.
- Van den Abbeele, A., De Corte, V., Van Impe, K., Bruyneel, E., Boucherie, C., Bracke, M., Vandekerckhove, J. und Gettemans, J. (2007). **Downregulation of gelsolin family proteins counteracts cancer cell invasion in vitro**. *Cancer letters* 255, 57-70.
- van der Reest, J., Lilla, S., Zheng, L., Zanivan, S. und Gottlieb, E. (2018). **Proteome-wide analysis of cysteine oxidation reveals metabolic sensitivity to redox stress**. *Nature communications* 9, 1-16.
- Van Ginkel, P. R., Gee, R. L., Walker, T. M., Hu, D.-N., Heizmann, C. W. und Polans, A. S. (1998). **The identification and differential expression of calcium-binding proteins associated with ocular melanoma**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1448, 290-298.
- Van Impe, K., Bethuyne, J., Cool, S., Impens, F., Ruano-Gallego, D., De Wever, O., Vanloo, B., Van Troys, M., Lambein, K. und Boucherie, C. (2013). **A nanobody targeting the F-actin capping protein CapG restrains breast cancer metastasis**. *Breast cancer research* 15, R116.

- Van Impe, K., De Corte, V., Eichinger, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Vandekerckhove, J. und Gettemans, J. (2003). **The nucleo-cytoplasmic actin-binding protein CapG lacks a nuclear export sequence present in structurally related proteins.** *Journal of Biological Chemistry* 278, 17945-17952.
- Van Impe, K., Hubert, T., De Corte, V., Vanloo, B., Boucherie, C., Vandekerckhove, J. und Gettemans, J. (2008). **A new role for nuclear transport factor 2 and Ran: nuclear import of CapG.** *Traffic* 9, 695-707.
- Voisin, S. N., Krakovska, O., Matta, A., DeSouza, L. V., Romaschin, A. D., Colgan, T. J. und Siu, K. M. (2011). **Identification of novel molecular targets for endometrial cancer using a drill-down LC-MS/MS approach with iTRAQ.** *PLoS one* 6, e16352.
- Wang, J., Boja, E. S., Tan, W., Tekle, E., Fales, H. M., English, S., Mieryl, J. J. und Chock, P. B. (2001). **Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells.** *Journal of Biological Chemistry* 276, 47763-47766.
- Wani, R., Nagata, A. und Murray, B. W. (2014). **Protein redox chemistry: post-translational cysteine modifications that regulate signal transduction and drug pharmacology.** *Frontiers in pharmacology* 5, 224.
- Wani, R., Qian, J., Yin, L., Bechtold, E., King, S. B., Poole, L. B., Paek, E., Tsang, A. W. und Furdai, C. M. (2011). **Isoform-specific regulation of Akt by PDGF-induced reactive oxygen species.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 10550-10555.
- Waris, G. und Ahsan, H. (2006). **Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions.** *Journal of carcinogenesis* 5, 14.
- Weber, A., Pennise, C. R., Babcock, G. G. und Fowler, V. M. (1994). **Tropomodulin caps the pointed ends of actin filaments.** *The Journal of cell biology* 127, 1627-1635.
- Wegner, A. (1976). **Head to tail polymerization of actin.** *Journal of molecular biology* 108, 139-150.
- Weidinger, A. und Kozlov, A. (2015). **Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction.** *Biomolecules* 5, 472-484.
- White, E., Shannon, J. S. und Patterson, R. E. (1997). **Relationship between vitamin and calcium supplement use and colon cancer.** *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 6, 769-774.
- Wilkins, M. R., Sanchez, J.-C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F. und Williams, K. L. (1996). **Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it.** *Biotechnology and genetic engineering reviews* 13, 19-50.
- Wilson, C. (1992). **Glioblastoma: the past, the present, and the future.** *Clinical neurosurgery* 38, 32-48.

- Wilson, C. und González-Billault, C. (2015). **Regulation of cytoskeletal dynamics by redox signaling and oxidative stress: implications for neuronal development and trafficking.** *Frontiers in cellular neuroscience* 9, 381.
- Wilson, C., Terman, J. R., González-Billault, C. und Ahmed, G. (2016). **Actin filaments—a target for redox regulation.** *Cytoskeleton* 73, 577-595.
- Winder, S. J. und Ayscough, K. R. (2005). **Actin-binding proteins.** *Journal of cell science* 118, 651-654.
- Witke, W., Li, W., Kwiatkowski, D. J. und Southwick, F. S. (2001). **Comparisons of CapG and gelsolin-null macrophages: demonstration of a unique role for CapG in receptor-mediated ruffling, phagocytosis, and vesicle rocketing.** *J Cell Biol* 154, 775-784.
- Xing, W. und Zeng, C. (2016). **An integrated transcriptomic and computational analysis for biomarker identification in human glioma.** *Tumor Biology* 37, 7185-7192.
- Xu, L., Kang, Y., Çöl, S. und Massagué, J. (2002). **Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGF $\beta$  signaling complexes in the cytoplasm and nucleus.** *Molecular cell* 10, 271-282.
- Xu, Q., Huff, L. P., Fujii, M. und Griendling, K. K. (2017). **Redox regulation of the actin cytoskeleton and its role in the vascular system.** *Free Radical Biology and Medicine* 109, 84-107.
- Xu, S.-G., Yan, P.-J. und Shao, Z.-M. (2010). **Differential proteomic analysis of a highly metastatic variant of human breast cancer cells using two-dimensional differential gel electrophoresis.** *Journal of cancer research and clinical oncology* 136, 1545-1556.
- Yang, H., Villani, R. M., Wang, H., Simpson, M. J., Roberts, M. S., Tang, M. und Liang, X. (2018a). **The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 37, 266.
- Yang, J., Carroll, K. S. und Liebler, D. C. (2016). **The expanding landscape of the thiol redox proteome.** *Molecular & Cellular Proteomics* 15, 1-11.
- Yang, Q., Wang, R., Wei, B., Peng, C., Wang, L., Hu, G., Kong, D. und Du, C. (2018b). **Candidate biomarkers and molecular mechanism investigation for glioblastoma multiforme utilizing WGCNA.** *BioMed research international* 2018.
- Yang, Z. und Li, N. (2015). **Absolute quantitation of protein posttranslational modification isoform.** In: *Plant Phosphoproteomics*, Springer, S. 105-119.
- Yarar, D., Waterman-Storer, C. M. und Schmid, S. L. (2005). **A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis.** *Molecular biology of the cell* 16, 964-975.

- Young, C. L., Feierstein, A. und Southwick, F. S. (1994). **Calcium regulation of actin filament capping and monomer binding by macrophage capping protein.** *Journal of Biological Chemistry* 269, 13997-14002.
- Yu, F.-X., Johnston, P. A., Sudhof, T. C. und Yin, H. L. (1990). **gCap39, a calcium ion-and polyphosphoinositide-regulated actin capping protein.** *Science* 250, 1413-1415.
- Yun, D.-P., Wang, Y.-Q., Meng, D.-L., Ji, Y.-Y., Chen, J.-X., Chen, H.-Y. und Lu, D.-R. (2018). **Actin-capping protein CapG is associated with prognosis, proliferation and metastasis in human glioma.** *Oncology reports* 39, 1011-1022.
- Zelko, I. N., Mariani, T. J. und Folz, R. J. (2002). **Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression.** *Free Radical Biology and Medicine* 33, 337-349.
- Zepp, R. G., Faust, B. C. und Hoigne, J. (1992). **Hydroxyl radical formation in aqueous reactions (pH 3-8) of iron (II) with hydrogen peroxide: the photo-Fenton reaction.** *Environmental Science & Technology* 26, 313-319.
- Zhang, R., Zhou, L., Li, Q., Liu, J., Yao, W. und Wan, H. (2009). **Up-regulation of two actin-associated proteins prompts pulmonary artery smooth muscle cell migration under hypoxia.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 41, 467-475.
- Zhang, Y., Vorobiev, S. M., Gibson, B. G., Hao, B., Sidhu, G. S., Mishra, V. S., Yarmola, E. G., Bubb, M. R., Almo, S. C. und Southwick, F. S. (2006). **A CapG gain-of-function mutant reveals critical structural and functional determinants for actin filament severing.** *The EMBO journal* 25, 4458-4467.
- Zheng, M., Åslund, F. und Storz, G. (1998). **Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation.** *Science* 279, 1718-1722.
- Zieseniss, A., Schroeder, U., Buchmeier, S., Schoenenberger, C.-A., van den Heuvel, J., Jockusch, B. M. und Illenberger, S. (2007). **Raver1 is an integral component of muscle contractile elements.** *Cell and tissue research* 327, 583-594.
- Zmijewski, J. W., Banerjee, S., Bae, H., Friggeri, A., Lazarowski, E. R. und Abraham, E. (2010). **Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase.** *Journal of Biological Chemistry* 285, 33154-33164.
- 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.

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des enzymatischen Antioxidationsystems zur Entfernung von ROS .....	5
Abbildung 2: Mögliche oxidative posttranslationale Cysteinmodifikationen und deren gegenseitige Umwandlung .....	7
Abbildung 3: A) Struktur eines Aktinmonomers als Bandmodell.....	10
Abbildung 4: Modulierung von G- und F-Aktin durch ABP .....	11
Abbildung 5: 3D-Struktur der CAPG-Mutante (CAPG-Sev).....	13
Abbildung 6: Gängige Methoden für die massenspektrometriebasierte Quantifizierung von Proteinen .....	24
Abbildung 7: Probenvorbereitungsstrategien für den Nachweis verschiedener Arten reversibler Cysteinmodifikationen .....	27
Abbildung 8 Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung für die differenzielle Analyse von redox-sensitiven Proteinen aus humanen A172-Zellen .....	74
Abbildung 9: Differenzielle Analyse von reversiblen oxidativen Cysteinmodifikationen im Proteom von A172-Zellen nach Wasserstoffperoxidbehandlung .....	75
Abbildung 10: Proteinverteilung über die zellulären Kompartimente, der 382 quantifizierten Proteine, die eine höhere Proteinabundanz nach Wasserstoffperoxidbehandlung gezeigt haben .....	76
Abbildung 11: Quantifizierung zweier bekannter redox-sensitiver aktinbindender Proteine in den unbehandelten, mit Wasserstoffperoxid- und DTT-behandelten Proben .....	76
Abbildung 12: Quantifizierung des Proteins CAPG in den unbehandelten, mit Wasserstoffperoxid- und DTT-behandelten TPS-Proben .....	77
Abbildung 13: Western Blots zur Überprüfung der stabilen Expression von CAPG-His in A172- und LN18-Zellen .....	78
Abbildung 14: Western Blot Analyse zur indirekten Untersuchung der reversiblen oxPTM von CAPG in A172-CAPG-His-Zelllysaten mittels PEG-Switch .....	79
Abbildung 15: Western Blot Analyse zur indirekten Untersuchung reversibler oxPTM von CAPG in LN18-CAPG-His-Zelllysaten mittels PEG-Switch .....	80
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung für die Aufreinigung von CAPG, mittels IMAC und Kopplung mit einer differenziellen Markierung, bis zur massenspektrometrischen Analyse und Datenauswertung .....	81
Abbildung 17: A) Verhältnisse der Signalintensitäten von IAM-D4 und IAM markierten Cystein-enthaltenden CAPG-Peptiden in unbehandelten und mit Wasserstoffperoxid-behandelten A172-CAPG-His-Zellen.....	83
Abbildung 18: In A) ist exemplarisch ein <i>Transition</i> -Chromatogramm und in B) ein MS <sup>2</sup> -Spektrum für das CAPG-Peptid VADSSPFALELLISDDCFVLDNGLCGK, bei dem beide Cysteine mit IAM-Markierung identifiziert wurden, dargestellt.....	84

Abbildung 19: Balkendiagramme der normalisierten Signalintensitäten für das CAPG-Peptid VADSSPFALELLISDDCFVLDNGLCGK in den unbehandelten, mit Wasserstoffperoxid- und DTT-behandelten PRM-Proben aus den A172-CAPG-His-Zellen .....	85
Abbildung 20: In A) sind die Ergebnisse der Distanzmessung für die zwei Cysteinpaare, C165-C178 und C282-C290, von CAPG dargestellt (n = 3) .....	86
Abbildung 21: Zwei Momentaufnahmen aus der MD-Simulation für das vollständige CAPG Protein	87
Abbildung 22: Western Blot Analyse der Überexpression der einzelnen Cysteinmutanten von CAPG in LN18-Zellen .....	89
Abbildung 23: Western Blot Analyse zum Nachweis der Oxidation mittels PEG-Switch in LN18-Zellen, unter Überexpression der jeweiligen Cysteinmutante von CAPG.....	90
Abbildung 24: Einfluss der einzelnen CAPG-Varianten auf die Migration von LN18-Zelllinien.....	91
Abbildung 25: Vergleich der normalisierten, gemittelten, noch nicht zu gewachsenen Flächen zum Zeitpunkt 24 h .....	92
Abbildung 26: Pyrenaktinpolymerisationsassay in Abwesenheit oder Gegenwart der jeweiligen Proteinvariante von CAPG .....	93
Abbildung 27: Vergleich der integrierten Flächen des Aktinpolymerisationsassays für die unterschiedlichen CAPG-Varianten .....	94
Abbildung 28: Pyrenaktinpolymerisationsassay in Gegenwart von CAPG oder der Cysteinmutante C282S in Abhängigkeit der Behandlung mit Wasserstoffperoxid .....	95
Abbildung 29: Vergleich der kalkulierten Flächen unter den Aktinpolymerisationskurven für die unterschiedlichen CAPG-Varianten in Abhängigkeit der Wasserstoffperoxidbehandlung. ....	96
Abbildung 30: SDS-PAGE der IP-Eluate aus LN18-Zellen, die entweder CAPG-GFP oder den Leervektor (pcMV3-GFP) stabil überexprimierten .....	98
Abbildung 31: Potenzielle Interaktionspartner von CAPG in Abhängigkeit der Behandlung mit Wasserstoffperoxid.....	99
Abbildung 32: Verteilung der potenziellen Interaktionspartner von CAPG über die zellulären Kompartimente in LN18-Zellen.....	100
Abbildung 33: Potenzielle Interaktionspartner des humanen Proteins CAPG aus A172-CAPG-His-Zellen.....	101
Abbildung 34: Netzwerk der 58 potenziellen Interaktionspartner des humanen CAPG, die eine höhere Abundanz in den unbehandelten Proben gezeigt haben .....	102
Abbildung 35: Netzwerk der 93 potenziellen Interaktionspartner des humanen CAPG, die eine höhere Abundanz in den Wasserstoffperoxid-behandelten Proben gezeigt haben.....	103
Abbildung 36: Netzwerk der 41 potenziellen Interaktionspartner des humanen CAPG ohne häufig auftretende Kontaminanten, die eine höhere Abundanz in den unbehandelten Proben zeigten.....	104

Abbildung 37: Netzwerk der 74 potenziellen Interaktionspartner des humanen CAPG ohne häufig auftretende Kontaminanten, die eine höhere Abundanz in den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Proben zeigten .....	105
Abbildung 38: Verteilung der potenziellen Interaktionspartner von CAPG, welche von häufig auftretenden Kontaminanten bereinigt worden sind, über die zellulären Kompartimente in A172-Zellen .....	106
Abbildung 39: Konfokalmikroskopische Aufnahme einer immunzytochemischen Färbung von CAPG und F-Aktin in A172-Zellen .....	106
Abbildung 40: Western Blot Analyse der subzellulären Verteilung des humanen Proteins CAPG....	107
Abbildung 41: Quantifizierte Signalintensitäten des immunologischen CAPG-Nachweises der Kernfraktionen in Abhängigkeit der Wasserstoffperoxidbehandlung .....	108
Abbildung 42: Konfokalmikroskopische Aufnahmen immunzytochemischer Färbungen von CAPG in A172-Zellen.....	109
Abbildung 43: Mikroskopische Aufnahmen immunzytochemischer Färbungen von CAPG in LN18-Zellen .....	109
Abbildung 44: Normierten Fluoreszenzintensitäten der Zellkernbereiche von 50 unbehandelten und 50 mit 100 µM Wasserstoffperoxid-behandelten A172- (A) und LN18-Zellen (B) .....	110
Abbildung 45: Mikroskopische Aufnahmen der immunzytochemischen Färbung der, die jeweilige CAPG-Variante überexprimierenden, LN18-Zellen .....	112
Abbildung 46: Extrahierte Aufnahmen zu Beginn, direkt nach der Wasserstoffperoxidzugabe und nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten mit Wasserstoffperoxid aus der Lebendzell-Mikroskopie von CAPG-GFP, CAPG-GFP C282S und CAPG-GFP C290S in LN18-Zellen.....	113
Abbildung 47: Exemplarischer <i>Profile</i> Plot der gemittelten Zellkernfluoreszenz für eine CAPG-GFP-Zelle über die Zeit.....	114
Abbildung 48: Western Blot Analyse der CAPG-Menge in humanen Cerebellumproben im Vergleich zu primären humanen GBM-Proben .....	115
Abbildung 49: Expressionsprofilanalyse von CAPG in einer Kohorte von 24 verschieden-gradigen Gliompatienten unter Verwendung von immunhistochemischen Färbungen.....	116
Abbildung 50: Modell für den Kernimport von CAPG.....	132
Abbildung 51: Mögliche Rolle von RAVER1 bei der RNA-Prozessierung und des -transportes während der Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen.....	134
Abbildung 52: Mögliches Modell zur Beschreibung einer weiteren zellulären Funktion von CAPG in Form einer redox-abhängigen Beteiligung an Adhäsionskomplexen, die zu einer gesteigerten Migration der Zellen führen könnte.....	136
Abbildung 53: cDNA- und entsprechende Aminosäuresequenz des humanen Proteins CAPG .....	174
Abbildung 54: Vektorkarte des pcMV3-CAPG-c-His-Konstruktes.....	175
Abbildung 55: Vektorkarte des pcMV3-CAPG-c-GFPspark-Konstruktes.....	175

Abbildung 56: Vektorkarte des pcMV3-c-GFPSpark-Kontrollkonstruktes .....	176
Abbildung 57: pQE30-Vektorkarte .....	176
Abbildung 58: Einfluss der Wasserstoffperoxidbehandlung auf das Proteom der A172-Zellen.....	177
Abbildung 59: Differenzielle Analyse von reversiblen oxidativen posttranslationalen Cysteinmodifikationen im Proteom von A172-Zellen .....	177
Abbildung 60: <i>Stain-free</i> Blot als Ladekontrolle zu der Analyse der Überexpression der einzelnen Cysteinmutanten von CAPG in LN18-Zellen .....	178
Abbildung 61: In A) ist exemplarisch ein <i>Transition</i> -Chromatogramm und in B) ein MS <sup>2</sup> -Spektrum für das CAPG-Peptid VADSSPFALELLISDDCFVLDNGLCGK, bei dem an Cysteine C290 eine Trioxidation identifiziert wurden, dargestellt.....	178
Abbildung 62: Western Blot Analyse der Eluatfraktionen nach affinitätschromatographischer Aufreinigung aus <i>E. coli</i> .....	179
Abbildung 63: <i>Stain-free</i> Gelbild als Ladekontrolle zu der Analyse der CAPG-Menge in humanen Cerebellumproben im Vergleich zu primären humanen GBM-Proben.....	179
Abbildung 64: MS-Spektrum des CAPG-Peptides VADSSPFALELLISDDCFVLDNGLCGK .....	180
Tabelle 1: Einige repräsentative Vertreter der ABP, sowie deren Eigenschaften und Funktionen .....	11
Tabelle 2: PCR-Ansatz .....	44
Tabelle 3: PCR-Programm .....	44
Tabelle 4: Komponenten der gerichteten PCR-Mutagenesereaktion .....	45
Tabelle 5: PCR-Programm für die Mutagenese .....	45
Tabelle 6: Denaturierung und langsames Abkühlen für die Anlagerung der PCR-Produkte .....	46
Tabelle 7: Komponenten des ersten Restriktionsverdaus.....	47
Tabelle 8: Komponenten des zweiten Restriktionsverdaus.....	47
Tabelle 9: Ligationsansatz.....	47
Tabelle 10: Verwendete Mengen an Wachstumsmedium und Trypsin in Abhängigkeit des verwendeten Kulturgefäßes .....	52
Tabelle 11: Klinisch-pathologische Merkmale der 24 Gliompatienten.....	53
Tabelle 12: Der Ablauf, die Lösungen und die Inkubationszeiten der Silberfärbung .....	58
Tabelle 13: Teilschritte des 60-minütigen Gradienten für die Probenauftrennung mittels HPLC .....	65
Tabelle 14: Teilschritte des 120-minütigen Gradienten für die Probenauftrennung mittels HPLC .....	65
Tabelle 15: Massenspektrometrische Parameter für die MS/MS-Analysen mit der QExactive Plus....	66
Tabelle 16: Peptid-Einschlussliste für die gezielte MS/MS-Analyse der oxidativen posttranslationalen Cysteinmodifikationen des Kandidatenproteins CAPG .....	67
Tabelle 17: Massenspektrometrische Parameter für die PRM-Analysen mit der QExactive Plus.....	67
Tabelle 18: Parameter für den Datenabgleich mit MaxQuant .....	68

Tabelle 19: Zusammenfassung der verwendeten Proteindatenbanken, sowie der MaxQuant (MQ)- und Perseus-Versionen .....	69
Tabelle 20: Zusammensetzung des IRS.....	71
Tabelle 21: Zusammenfassung der erstellten Konstrukte mittels gerichteter Mutagenese .....	88
Tabelle 22: Statistischer Vergleich der normalisierten, gemittelten, noch nicht zu gewachsenen Flächen zum Zeitpunkt 24 h aus den <i>Scratch Assays</i> .....	92
Tabelle 23: Statistischer Vergleich der integrierten Flächen aus dem Aktinpolymerisationsassay .....	94
Tabelle 24: Statistischer Vergleich der integrierten Flächen aus dem Aktinpolymerisationsassay in Abhängigkeit der Wasserstoffperoxidbehandlung .....	97
Tabelle 25: Proteinliste, der 382 potenziellen redox-sensitiven Proteine, die eine höhere Proteinabundanz in den mit Wasserstoffperoxid behandelten Proben nach Aufarbeitung mittels TPS-Matrix gezeigt haben.....	181
Tabelle 26: Proteinliste, der 29 differenziell regulierten Proteine, die eine höhere Proteinabundanz in den unbehandelten Proben nach Aufarbeitung mittels TPS-Matrix gezeigt haben .....	193
Tabelle 27: Proteinliste, der 10 Proteine, die eine höhere Proteinabundanz nach Wasserstoffperoxidbehandlung im A172-Proteom gezeigt haben .....	194
Tabelle 28: Proteinliste der 93 potenziellen Interaktionspartner von CAPG, die eine höhere Proteinabundanz nach Wasserstoffperoxidbehandlung im Vergleich zu den unbehandelten Proben gezeigt haben.....	194
Tabelle 29: Proteinliste der 58 potenziellen Interaktionspartner von CAPG, die im Vergleich zu den mit Wasserstoffperoxid behandelten Proben in den unbehandelten Proben eine höhere Proteinabundanz gezeigt haben .....	197

## 9 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
ABP	Aktinbindendes Protein
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure/n
ATP	Adenosintriphosphat
BMFZ	Biologisch-medizinisches Forschungszentrum
bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus Rinderserum ( <i>bovine serum albumin</i> )
BST	<i>Biotin switch technique</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CAPG	<i>Macrophage Capping Protein</i>
C <sub>c</sub>	Kritische Konzentration
CHAPS	3-[N-(Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfat
CID	<i>Collision-induced dissociation</i>
CMV	Zytomegalie-Virus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cy	Cyanin
Cys	Cystein
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DIGE	Differenz-Gelelektrophorese
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	2'Desoxy-nucleotid-5'Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol

Abkürzung	Bedeutung
FA	Ameisensäure ( <i>formic acid</i> )
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FCS	Fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FDR	<i>false discovery rate</i>
g	Gramm
G-Aktin	Globuläres Aktin
GBM	Glioblastom
GFP	Grün fluoreszierendes Protein ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
ggf.	gegebenenfalls
GO	Gen-Ontologie ( <i>Gene Ontology</i> )
GR	Glutathion-Reduktase
GSH/GSSG	Glutathion (reduziert/oxidiert)
GTL	<i>Genomics &amp; Transcriptomics</i> Labor
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCD	<i>High-energy collision dissociation</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
IAM	Iodacetamid
IAM-D4	Schwermarkiertes Iodacetamid
ICAT	<i>Isotope-coded affinity tag</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IF	Immunfluoreszenz
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
IRS	<i>Immuno reactive score</i>
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> )

Abkürzung	Bedeutung
log	Logarithmus
M	Molarität (mol/L)
mA	Milliamper
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
mg	Milligramm
Milli-Q-Wasser	Demineralisiertes Wasser, sterilfiltriert und UV entkeimt durch Milli-Q Wasser-Filteranlage
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
MW	<i>molecular weight</i> , Molekulargewicht
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte/oxidierte Form)
NADP <sup>+</sup> /NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert/oxidierte Form)
NEM	N-ethylmaleinimid
NLS	<i>Nuclear localization sequence</i>
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sup>+</sup>	Nitrosonium
NOX	NADPH Oxidase-Komplex
O <sub>2</sub>	Molekularer Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
OD <sub>600</sub>	bei 600 nm gemessene optische Dichte
OH <sup>-</sup>	Hydroxylradikal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
pI	Isoelektrischer Punkt
pKa	logarithmische Größe der Säurekonstante
PRM	<i>Parallel reaction monitoring</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rcf	x-Faches der Erdbeschleunigung (~9,81 m/s)
RNS	Reaktiven Stickstoffspezies ( <i>reactive nitrogen species</i> )

Abkürzung	Bedeutung
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RS	Reaktive Spezies ( <i>reactive species</i> )
RSS	Reaktive Schwefelspezies ( <i>reactive sulfur species</i> )
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodiumdodecylsulfate</i> )
SILAC	<i>Stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SOB	Medium zur Bakterienkultivierung ( <i>Super Optimal Broth</i> )
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TBS-T	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphine
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	<i>Total ion current</i>
TMT	<i>Tandem mass tag</i>
TPS	Thiopropyl Sepharose 6B
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TXN	Thioredoxin
U	Enzymeinheit ( <i>unit</i> )
ÜN	über Nacht
ÜS	Überstand
UV	Ultraviolett
V	Volt
vol	Volumen
v/v	Volumenanteil einer Flüssigkeit in Lösung ( <i>volume per volume</i> )
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>world health organisation</i> )
wt	Wildtyp
w/v	Gewichtsanteil eines Stoffes in Lösung ( <i>weight per volume</i> )
z. B.	zum Beispiel
%	Prozent
μ	Mikro

## 10 Anhang

### 10.1 CAPG-Sequenz

ATGTACACAGCCATTCCCCAGAGTGGCTCTCCATTCCCAGGCTCAGTGCAGGATCCAGGCCTGC  
 ATGTGTGGCGGGTGGAGAAGCTGAAGCCGGTGCCTGTGGCGCAAGAGAACCAGGGCGTCTTCT  
 TCTCGGGGACTCCTACCTAGTGTGCACAATGGCCCAGAAGAGTTTCCCATCTGCACCTGTG  
 GATAGGCCAGCAGTCATCCGGGATGAGCAGGGGGCCTGTGCCGTGCTGGCTGTGCACCTCAA  
 CACGCTGCTGGGAGAGCGGCCTGTGCAGCACCGCGAGGTGCAGGGCAATGAGTCTGACCTTT  
 CATGAGCTACTTCCCACGGGGCCTCAAGTACCAGGAAGGTGGTGTGGAGTCAGCATTTACAAG  
 ACCTCCACAGGAGCCCCAGCTGCCATCAAGAACTCTACCAGGTGAAGGGGAAGAAGAACATCC  
 GTGCCACCGAGCGGGCACTGAACTGGGACAGCTTCAACTGGGGACTGCTTCATCCTGGACCT  
 GGGCCAGAACATCTTCGCTGGTGTGGTGGAAAGTCCAACATCCTGGAACGCAACAAGGCGAGG  
 GACCTGGCCCTGGCCATCCGGGACAGTGAGCGACAGGGCAAGGCCAGGTGGAGATTGTCACT  
 GATGGGGAGGAGCCTGCTGAGATGATCCAGGTCTGGGCCCAAGCCTGCTCTGAAGGAGGGC  
 AACCTGAGGAAGACCTCACAGCTGACAAGGCAAATGCCAGGCCGCAGCTCTGTATAAGGTCT  
 CTGATGCCACTGGACAGATGAACCTGACCAAGGTGGCTGACTCCAGCCCATTTGCCCTTGAAC  
 GCTGATATCTGATGACTGCTTTGTGCTGGACAACGGGCTCTGTGGCAAGATCTATATCTGGAAG  
 GGCGAAAAGCGAATGAGAAGGAGCGGCAGGCAGCCCTGCAGGTGGCCGAGGGCTTCATCTCGC  
 GCATGCAGTACGCCCCGAACACTCAGGTGGAGATTCTGCCTCAGGGCCGTGAGAGTCCCATCTT  
 CAAGCAATTTTTCAAGGACTGGAAA **GGGGGTGGAGGCTCTCACCATCACCACCATCATCACCACC**  
**ATCACTAA**

MYTAIPQSGSPFPGSVQDPGLHVWRVEKLPVPVAQENQGVFFSGDSYLVLHNGPEEVSHLHLWIG  
 QQSSRDEQGACAVLAVHLNLTLLGERPVQHREVQGNESDLFMSYFPRGLKYQEGGVESAFHKTSTGA  
 PAAIKKLYQVKGKKNIRATERALNWDSFNTGDCFILDLGQNIFAWCGGKSNILERNKARDLALAIRDSE  
 RQGKAQVEIVTDGEEPAEMIQVLGPKPALKEGNPEEDLTADKANAQAAALYKVSDATGQMNLTKVAD  
 SSPFALELLISDDCFVLDNGLCGKIYWKGRKANERQAALQVAEGFISRMQYAPNTQVEILPQGRES  
 PIFKQFFKDWK **GGGGS** **HHHHHHHHHHH**

**Abbildung 53: cDNA- und entsprechende Aminosäuresequenz des humanen Proteins CAPG.** Die cDNA-Sequenz ist in den nachfolgenden Vektoren am Replikationsursprung (engl.: *origin of replication*, ORF) eingebaut ist. In Grün ist der His-Tag markiert und in Gelb der Linker.

## 10.2 Vektorkarten

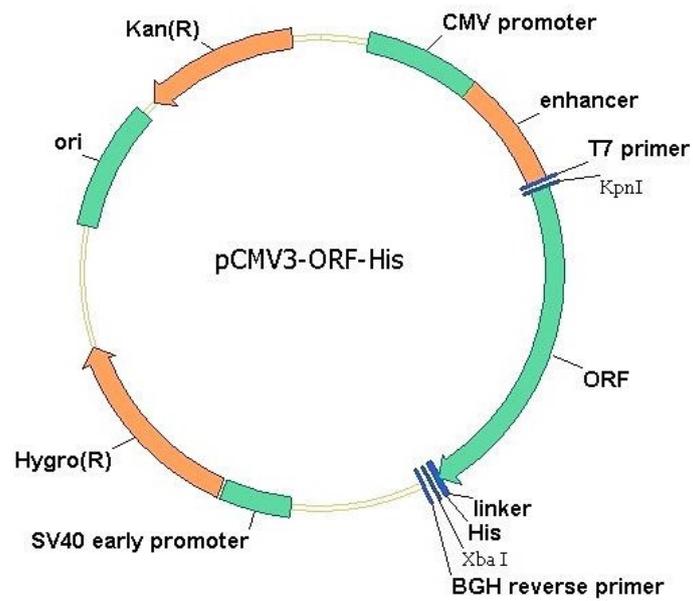


Abbildung 54: Vektorkarte des pCMV3-CAPG-c-His-Konstruktes.

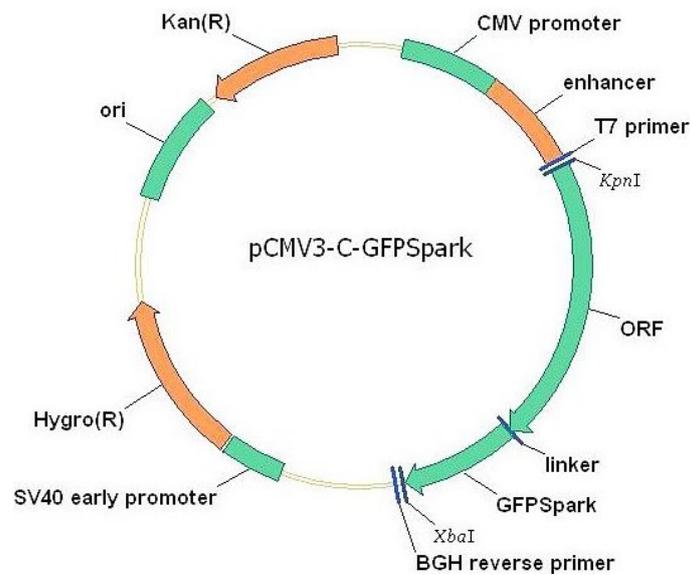


Abbildung 55: Vektorkarte des pCMV3-CAPG-c-GFPSpark-Konstruktes.

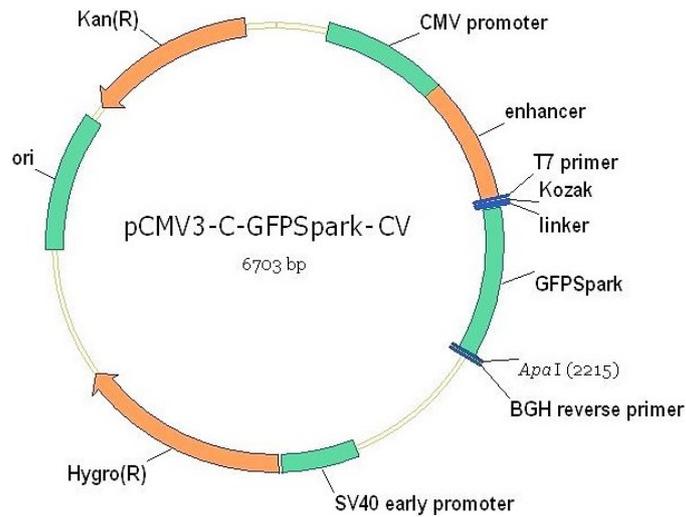


Abbildung 56: Vektorkarte des pcMV3-c-GFPSpark-Kontrollkonstruktes.

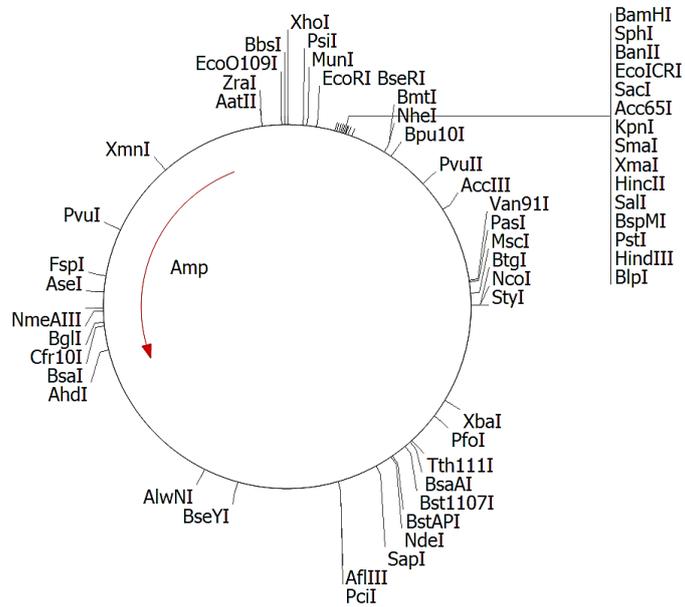
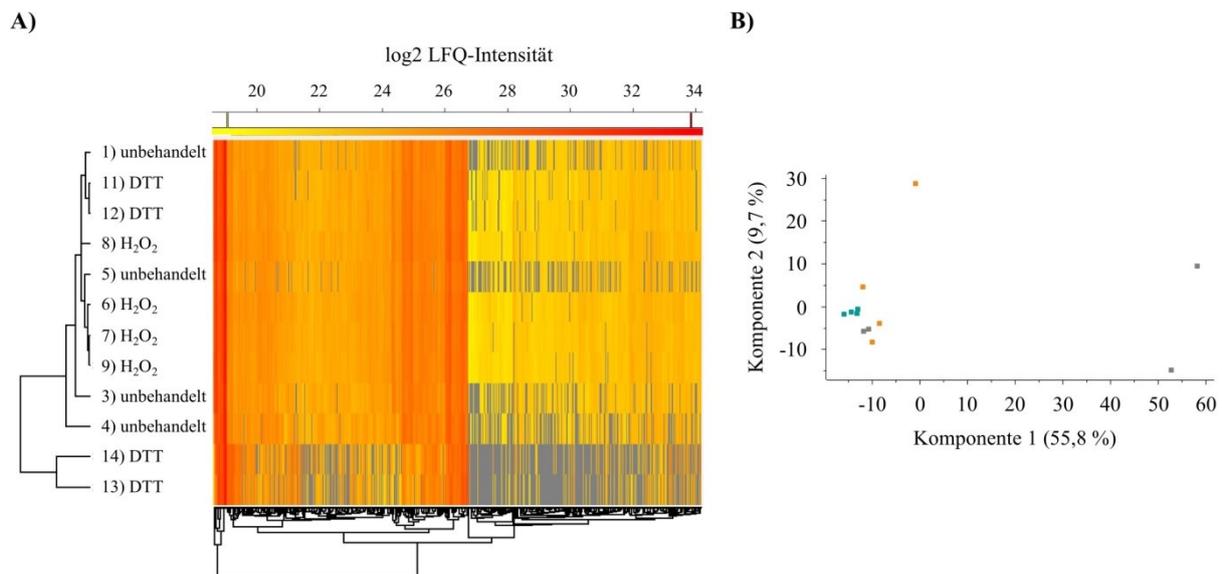
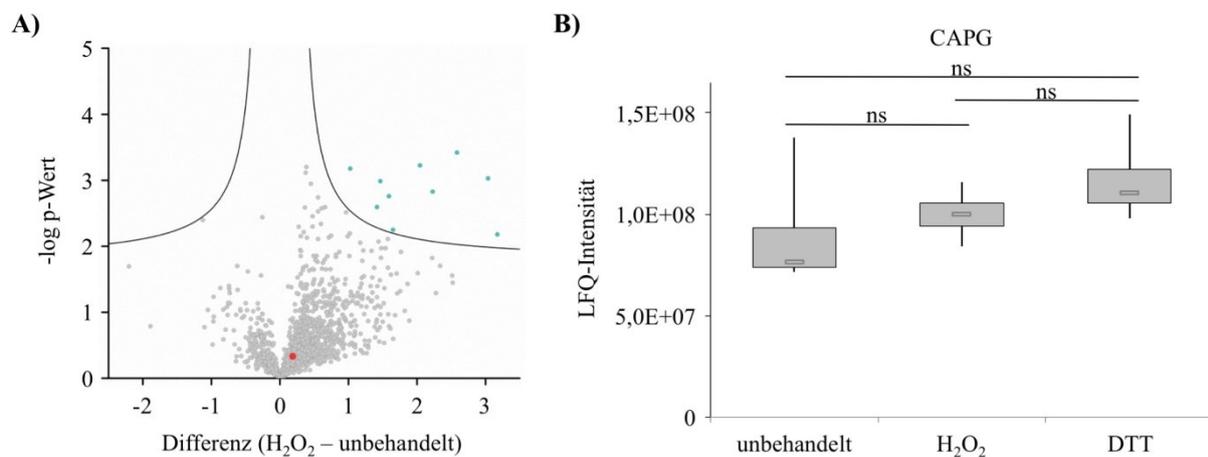


Abbildung 57: pQE30-Vektorkarte.

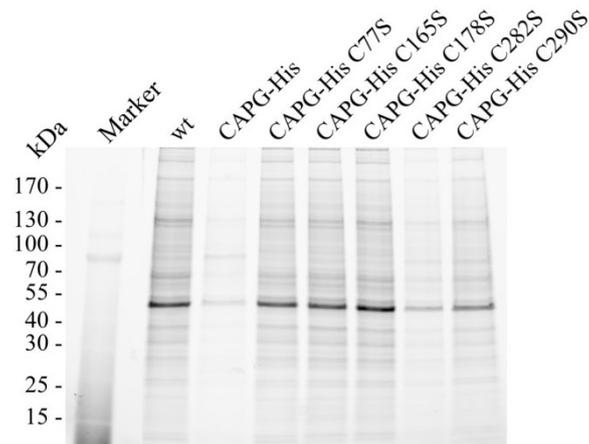
## 10.3 Abbildungen



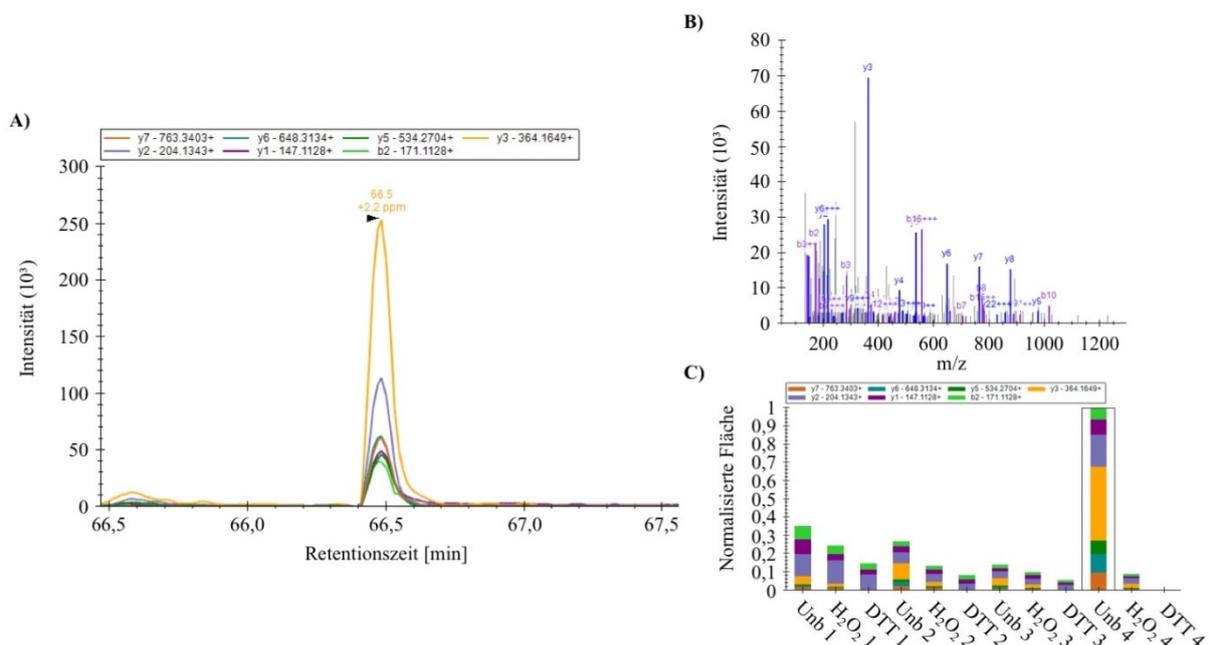
**Abbildung 58: Einfluss der Wasserstoffperoxidbehandlung auf das Proteom der A172-Zellen.** Ein Teil der A172-Zellen im unbehandelten Zustand (unbehandelt), für 10 Minuten bei RT mit 250  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid- ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und für 10 Minuten bei 37  $^\circ\text{C}$  mit 20 mM DTT- (DTT) behandelte A172-Zellen wurde vor der Anreicherung über die TPS-Matrix für die differenzielle Proteomanalyse zurückbehalten ( $n = 4$ ). In **A**) ist das hierarchische euklidische Cluster für die 2053 quantifizierten Proteine und in **B**) das Ergebnis der Komponentenanalyse dargestellt. Die Proteine gruppieren entsprechend der jeweiligen Gruppe in Abhängigkeit von der Behandlung. [unbehandelt = Orange;  $\text{H}_2\text{O}_2$  = Grün; DTT = Grau]



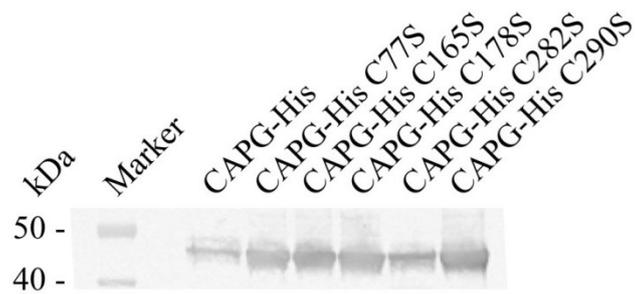
**Abbildung 59: Differenzielle Analyse von reversiblen oxidativen posttranslationalen Cysteinmodifikationen im Proteom von A172-Zellen.** In **A**) ist ein *Volcano*-Plot basierend auf den Vorläuferionenintensitäten für die unbehandelten und mit Wasserstoffperoxid-behandelten A172-Zellen gezeigt. In Grün sind die Proteine dargestellt, die eine erhöhte Abundanz infolge der Wasserstoffperoxidbehandlung gezeigt haben. In Rot ist CAPG hervorgehoben. In **B**) ist ein Box-Plot der LFQ-Intensitäten für CAPG in den unbehandelten, in den mit Wasserstoffperoxid- und mit DTT-behandelten Proben dargestellt. CAPG zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Proteinabundanz zwischen den unterschiedlichen Proben. 50 % der Werte befinden sich innerhalb der Box, die *Whiskers* geben das Minimum und Maximum der erhaltenen Signalintensitäten an. Der Median wird durch  $\square$  repräsentiert und eine Varianzanalyse (ANOVA) wurde durchgeführt. [ns = nicht signifikant]



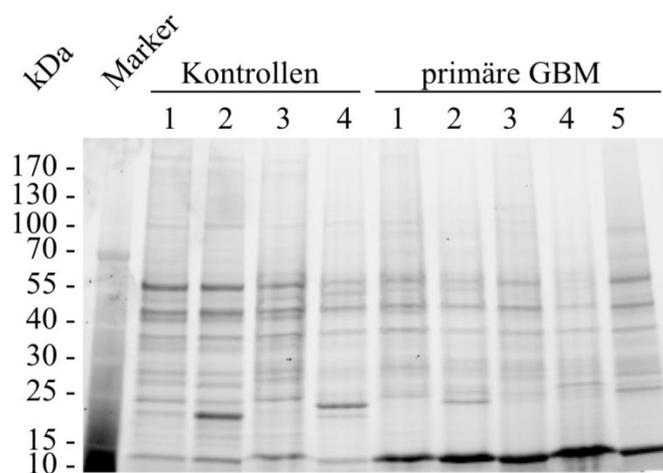
**Abbildung 60: *Stain-free* Blot als Ladekontrolle zu der Analyse der Überexpression der einzelnen Cysteinmutanten von CAPG in LN18-Zellen.** Nach mechanischem Aufschluss im Lysepuffer wurden je 5  $\mu\text{g}$  der jeweiligen Probe auf das Gel aufgetragen und die Proteine über ein 4-15 %-iges *Stain-free* Gel unter denaturierenden Bedingungen analysiert. Die im *Stain-free* Gel enthaltene Trihalogenverbindung reagiert in einer 1-minütigen UV-induzierten Reaktion mit den Tryptophanresten von Proteinen, um ein Fluoreszenzsignal zu liefern. Die Fluorophore bleiben während des Blotting Verfahrens kovalent an die Proteine gebunden, werden im Anschluss bei der Aufnahme des Blotes sichtbar gemacht und dienen als Gesamtprotein-Ladekontrolle. [wt = wild typische LN18 Zellen]



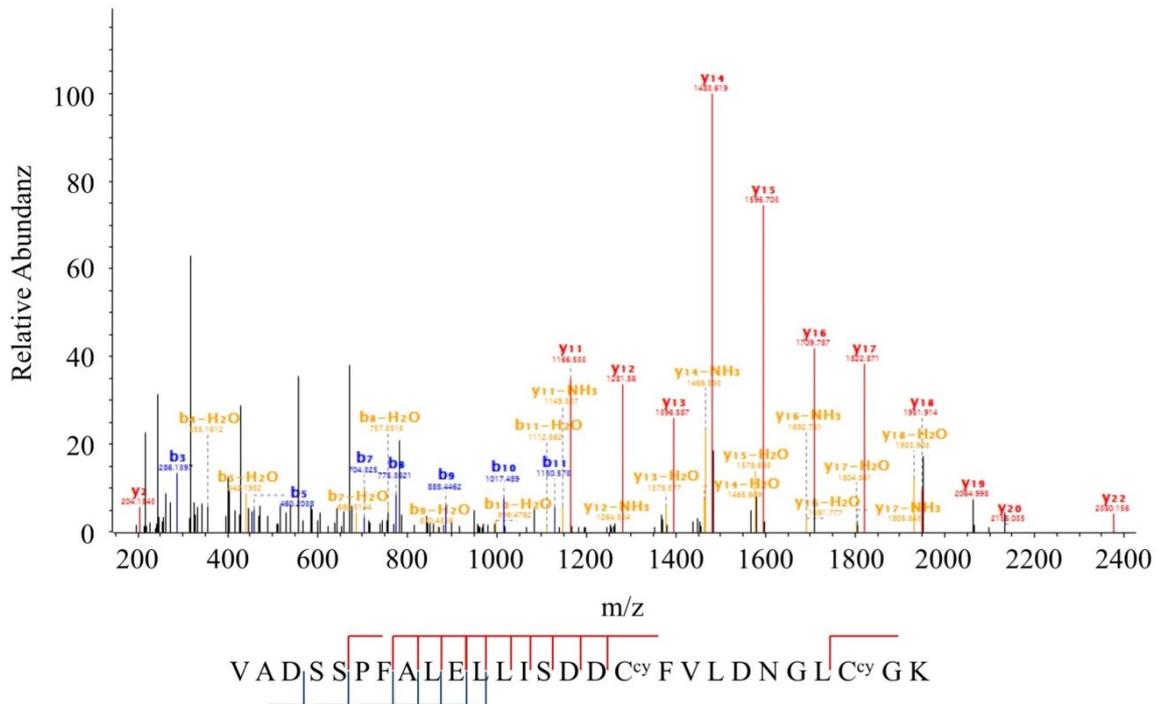
**Abbildung 61:** In **A)** ist exemplarisch ein *Transition*-Chromatogramm und in **B)** ein MS<sup>2</sup>-Spektrum für das CAPG-Peptid VADSPFALELLISDDCFVLDNGLCGK, bei dem an Cysteine C290 eine Trioxidation identifiziert wurden, dargestellt. Das Balkendiagramm in **C)** zeigt die integrierten Flächen, die auf den maximalen Wert normalisiert sind.



**Abbildung 62: Western Blot Analyse der Eluatfraktionen nach affinitätschromatographischer Aufreinigung aus *E. coli*.** Es wurden je 5 µg des jeweiligen Eluates auf ein Gel aufgetragen. Die Proteine wurden in einer 4-12 %-igen Bis-Tris SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen analysiert und das humane Protein CAPG mit dem anti-CAPG (1)-Antikörper in einer Western Blot Analyse nachgewiesen.



**Abbildung 63: *Stain-free* Gelbild als Ladekontrolle zu der Analyse der CAPG-Menge in humanen Cerebellumproben im Vergleich zu primären humanen GBM-Proben.** Die Proteine wurden über ein 4-15 %-iges *Stain free* Gel unter denaturierenden Bedingungen analysiert und das Gel aktiviert. Dabei reagiert die im *Stain free* Gel enthaltene Trihalogenverbindung in einer 1-minütigen UV-induzierten Reaktion mit den Tryptophanresten von Proteinen, um ein Fluoreszenzsignal zu liefern, wodurch die Gesamtproteinmenge sichtbar gemacht wird und sowohl als Ladekontrolle, als auch zur Normalisierung diente. [Kontrollen = Proben aus dem Cerebellum; primäre GBM = primäre Glioblastomproben]



**Abbildung 64: MS-Spektrum des CAPG-Peptids VADSSPFALELLISDDCFVLDNGLCGK.** Auf der x-Achse wurde m/z gegen die relative Abundanz (y-Achse) aufgetragen. In Rot ist die y-Ionenserie dargestellt und in Blau die b-Ionenserie. Unterhalb des Spektrums ist die entsprechende Peptidsequenz dargestellt und die gefundenen Modifikationen annotiert. [cy = Disulfid]

## 10.4 Tabellen

**Tabelle 25: Proteinliste, der 382 potenziellen redox-sensitiven Proteine, die eine höhere Proteinabundanz in den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Proben nach Aufarbeitung mittels TPS-Matrix gezeigt haben.**

Proteinname	Gencode	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
Aspartyl aminopeptidase	DNPEP	A0A024R442	0.0368	1.10
Vigilin	HDLBP	A0A024R4E5	0.0052	0.43
Large proline-rich protein BAG6	BAT3;BAG6	A0A024RCR6	0.0028	1.47
Magnesium transporter protein 1	MAGT1	A0A087WU53	0.0000	3.25
Signal peptidase complex subunit 2	SPCS2	A0A087WUC6	0.0000	3.67
Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial	MTHFD1L	A0A087WVM4	0.0127	2.04
Lethal(2) giant larvae protein homolog 1	LLGL1	A0A087WW77	0.0059	0.75
	TPM3	A0A087WWU8	0.0034	3.61
Transcription factor p65	RELA	Q2TAM5	0.0057	1.58
Nodal modulator 1	NOMO1	A0A0G2JN29	0.0136	1.21
Protein CIP2A	KIAA1524	A0A087X211	0.0423	0.74
E3 ubiquitin-protein ligase HECTD1	HECTD1	A0A087X2H1	0.0182	0.52
Uncharacterized protein FLJ45252	AAK1	A0A096LP25	0.0101	1.46
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	VDAC2	A0A0A0MR02	0.0001	1.08
Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase;Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	PCMT1	A0A0A0MRJ6	0.0002	3.21
Unconventional myosin-VI	MYO6	A0A0A0MRM8	0.0258	1.50
Aldo-keto reductase family 1 member C3	AKR1C3	A0A0A0MSS8	0.0025	0.55
Transcription activator BRG1	SMARCA4	A0A2R8Y7S2	0.0592	1.43
E3 ubiquitin-protein ligase RNF213	RNF213	A0A0A0MTR7	0.0399	1.07
Integrin-linked protein kinase	ILK	A0A0A0MTH3	0.0325	1.45
TATA-binding protein-associated factor 172	BTAF1	A0A0A0MTH9	0.0539	0.95
Coronin;Coronin-7	CORO7-PAM16;CORO7	A0A0A6YYL4	0.0475	1.05
Translationally-controlled tumor protein	TPT1	Q5W0H4	0.0084	2.53
40S ribosomal protein SA	RPSA	C9J9K3	0.0071	0.45
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4;Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 5	CHD4;CHD5	A0A2R8Y425	0.0361	0.89
Deoxyuridine 5-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial	DUT	A0A0C4DGL3	0.0049	1.50
Protein scribble homolog	SCRIB	A0A0G2JNZ2	0.0031	1.65
Protein canopy homolog 4	CNPY4	A0A0J9YYJ0	0.0293	0.96
Matrin-3	MATR3	A0A0R4J2E8	0.0039	0.67
CLIP-associating protein 2	CLASP2	E3W994	0.0175	0.83

Proteinname	Gename	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
Matrin-3	MATR3	A0A0R4J2E8	0.0039	0.67
CLIP-associating protein 2	CLASP2	E3W994	0.0175	0.83
Transcriptional repressor p66-beta	GATAD2B	A0A0U1RRM1	0.0478	0.85
Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	ALDH7A1	A0A1B0GTG2	0.0149	1.57
Tight junction protein ZO-2	TJP2	A0A1B0GTW1	0.0457	0.97
Protein unc-45 homolog A	UNC45A	A0A1W2PNX8	0.0178	0.67
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	DDX17	A0A1X7SBZ2	0.0061	0.51
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	A0A286YF22	0.0024	0.96
Golgin subfamily A member 2	GOLGA2	A0A2Q2TH77	0.0049	1.05
Leukocyte surface antigen CD47	CD47	A0A2R8Y484	0.0392	2.05
Tuberin	TSC2	A0A2R8Y5F1	0.0247	1.56
ATP-dependent 6-phosphofruktokinase, muscle type	PFKM	A0A2R8Y891	0.0201	0.64
Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	SAMHD1	A0A2R8YCS7	0.0303	1.26
Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial;Dynamin-like 120 kDa protein, form S1	OPA1	A0A2R8YE78	0.0059	0.47
ADP-sugar pyrophosphatase	NUDT5	A6NFX8	0.0238	1.22
Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1	SMCHD1	A6NHR9	0.0373	1.34
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase;Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	USP14	A6NJA2	0.0165	0.72
RNA-binding protein EWS	EWSR1	B0QYK0	0.0222	1.84
Copine-1	CPNE1	B0QZ18	0.0058	0.95
Ribosomal protein S6 kinase alpha-3	RPS6KA3	B4DG22	0.0005	2.62
Cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic	CARS	B4DKY1	0.0034	0.83
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	HNRNPLL;HNRPLL	B7WPG3	0.0220	0.90
Ran-binding protein 3	RANBP3	B7Z7F3	0.0364	1.37
Endophilin-B2	SH3GLB2	B7ZC38	0.0030	1.74
MICOS complex subunit MIC60	IMMT	B9A067	0.0065	0.37
RNA-binding protein 12B	RBM12B	B9ZVT1	0.0123	1.17
DNA-directed RNA polymerase;DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2	POLR2B	C9J2Y9	0.0285	0.79
Choline-phosphate cytidyltransferase A	PCYT1A	C9JEJ2	0.0001	2.35
39S ribosomal protein L39, mitochondrial	MRPL39	C9JG87	0.0020	1.31
Ras-associated and pleckstrin homology domains-containing protein 1	RAPH1	C9K0J5	0.0040	1.14
60S ribosomal protein L32	RPL32	D3YTB1	0.0767	1.76
Metastasis-associated protein MTA3	MTA3	E7EQY4	0.0291	1.52

Proteinname	Gename	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
Microtubule-associated protein;Microtubule-associated protein 4	MAP4	E7EVA0	0.0287	1.47
Histone-binding protein RBBP7	RBBP7	E9PC52	0.0649	1.84
Nuclear pore complex protein Nup155	NUP155	E9PF10	0.0102	0.59
Microtubule-associated protein 1A;MAP1A heavy chain;MAP1 light chain LC2	MAP1A	E9PGC8	0.0608	1.76
Condensin complex subunit 2	NCAPH	E9PHA2	0.0005	2.41
Puromycin-sensitive aminopeptidase	NPEPPS	E9PLK3	0.0110	0.53
	LMO7	E9PMS6	0.0003	0.97
ATP synthase subunit g, mitochondrial	ATP5L	E9PN17	0.0590	1.23
V-type proton ATPase subunit d 1	ATP6V0D1	J3QL14	0.0082	1.80
G-rich sequence factor 1	GRSF1	H0Y8R1	0.0649	1.32
2,5-phosphodiesterase 12	PDE12	F6T1Q0	0.0077	0.81
Polymerase delta-interacting protein 3	POLDIP3;PDIP46	F6VRR5	0.0609	1.26
Tetraspanin;CD63 antigen	CD63	F8VV56	0.0001	2.37
Myosin light polypeptide 6	MYL6	F8W1R7	0.0009	2.92
Protein NDRG3	NDRG3	F8WBF9	0.0013	1.75
LIM domain only protein 7	LMO7	F8WD26	0.0204	0.91
SNW domain-containing protein 1	SNW1	G3V3A4	0.0489	1.35
Cyclin-dependent kinase 2;Cyclin-dependent kinase 3	CDK2;CDK3	G3V5T9	0.0311	1.44
Profilin	PFN2	G5E9Q6	0.0000	1.47
AMP deaminase 2	AMPD2	H0Y360	0.0005	2.59
Remodeling and spacing factor 1	RSF1	H7C306	0.0181	1.44
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial;Long-chain enoyl-CoA hydratase;Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	HADHA	H0YFD6	0.0003	0.66
Pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1	PDXDC1	H3BND4	0.0094	0.70
Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5	MACF1	H3BPE1	0.0406	0.93
Serine/arginine-rich splicing factor 2	SRSF2	J3QL05	0.0483	1.67
Tubulin-specific chaperone D	TBCD	J3KR97	0.0022	0.63
Mitotic checkpoint protein BUB3	BUB3	J3QT28	0.0757	1.75
Lon protease homolog, mitochondrial	LONP1	K7EJE8	0.0229	0.69
39S ribosomal protein L4, mitochondrial	MRPL4	K7EKI4	0.0264	1.18
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	EIF3K	K7ERF1	0.0023	2.70
Serine--tRNA ligase, mitochondrial	SARS2	M0QWZ7	0.0109	1.30
Rho guanine nucleotide exchange factor 1	ARHGEF1	M0QZR4	0.0063	2.02
SURP and G-patch domain-containing protein 2	SUGP2	M0R3F6	0.0482	1.43
Kinesin-like protein KIF2A	KIF2A	O00139	0.0232	0.59

Proteinname	Gename	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
AH receptor-interacting protein	AIP	O00170	0.0267	1.46
Syntaxin-binding protein 3	STXBP3	O00186	0.0395	1.16
AP-3 complex subunit beta-1	AP3B1	O00203	0.0097	0.61
Transcription elongation factor SPT5	SUPT5H	O00267	0.0141	1.17
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	IGF2BP3	O00425	0.0343	0.89
Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit alpha	PIK3C2A	O00443	0.0020	0.54
Importin subunit alpha-3	KPNA4	O00629	0.0417	1.80
Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	SLC9A3R1	O14745	0.0129	2.00
Phosphoribosylformylglycinamidin e synthase	PFAS	O15067	0.0005	0.76
Protein phosphatase 1G	PPM1G	O15355	0.0143	2.40
Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2	INPPL1	O15357	0.0229	0.99
U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3	PRPF3	O43395	0.0305	0.90
AP-1 complex subunit gamma-1	AP1G1	O43747	0.0000	0.51
Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha	SGTA	O43765	0.0363	1.12
Striatin	STRN	O43815	0.0054	1.20
Putative adenosylhomocysteinase 2;Adenosylhomocysteinase;Putative adenosylhomocysteinase 3	AHCYL1;AHCYL2	O43865	0.0005	2.40
C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4	SPAG9	O60271	0.0167	0.92
Protein O-GlcNAcase	MGEA5	O60502	0.0197	0.98
General vesicular transport factor p115	USO1	O60763	0.0005	0.91
Rho-associated protein kinase 2	ROCK2	O75116	0.0001	1.29
Vacuolar protein sorting-associated protein 26A	VPS26A	O75436	0.0711	1.70
Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	PMPCB	O75439	0.0000	1.59
Serine/arginine-rich splicing factor 10	SRSF10;FUSIP1	Q5JRI1	0.0158	1.45
Cold shock domain-containing protein E1	CSDE1	O75534	0.0120	0.79
GTPase Era, mitochondrial	ERAL1	O75616	0.0018	2.25
TIP41-like protein	TIPRL	O75663	0.0186	1.81
Triple functional domain protein	TRIO	O75962	0.0043	1.77
Carboxypeptidase D	CPD	O75976	0.0179	1.20
Phospholipase DDHD2	DDHD2	O94830	0.0168	1.31
LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1, mitochondrial	LETM1	O95202	0.0005	1.10
Kinesin-like protein KIF20A	KIF20A	O95235	0.0087	0.85
6-phosphogluconolactonase	PGLS	O95336	0.0027	2.11
Structural maintenance of chromosomes protein 2	SMC2	O95347	0.0016	0.65

Proteinname	Gename	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1;DNA-directed RNA polymerase	POLR1A	O95602	0.0151	0.62
Serum deprivation-response protein	SDPR	O95810	0.0224	1.16
BAG family molecular chaperone regulator 3	BAG3	O95817	0.0079	2.36
Glutathione reductase, mitochondrial	GSR	P00390	0.0251	2.05
Prelamin-A/C;Lamin-A/C	LMNA	P02545	0.0006	0.82
Annexin A1;Annexin	ANXA1	P04083	0.0007	0.71
Heat shock protein beta-1	HSPB1	P04792	0.0012	1.46
Thymidylate synthase	TYMS	P04818	0.0406	1.84
Protein S100-A6;Protein S100	S100A6	P06703	0.0000	4.83
Nucleophosmin	NPM1	P06748	0.0008	1.72
Cathepsin L1;Cathepsin L1 heavy chain;Cathepsin L1 light chain	CTSL	P07711	0.0599	1.25
Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase;Glutamate--tRNA ligase;Proline--tRNA ligase	EPRS	P07814	0.0036	0.55
Signal recognition particle receptor subunit alpha	SRPR	P08240	0.0013	0.75
Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	ASNS	P08243	0.0049	0.52
Galectin-1	LGALS1	P09382	0.0014	2.38
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1;Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	UCHL1	P09936	0.0161	1.15
Thioredoxin	TXN	P10599	0.0048	2.00
Laminin subunit gamma-1	LAMC1	P11047	0.0268	0.73
DNA topoisomerase 1	TOP1	P11387	0.0005	2.97
Histidine--tRNA ligase, cytoplasmic	HARS	P12081	0.0014	0.58
Inosine-5-monophosphate dehydrogenase 2	IMPDH2	P12268	0.0147	0.81
Nucleoprotein TPR	TPR	P12270	0.0303	1.45
Annexin A3;Annexin	ANXA3	P12429	0.0579	1.04
Alpha-actinin-1	ACTN1	P12814	0.0014	0.62
Xaa-Pro dipeptidase	PEPD	P12955	0.0287	1.13
Ribonuclease inhibitor	RNH1	P13489	0.0038	0.61
Plastin-3	PLS3	P13797	0.0104	0.57
cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	PRKAR2A	P13861	0.0258	0.79
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRNPL	P14866	0.0036	0.95
Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A	GSPT1	P15170	0.0043	1.83
Desmoplakin	DSP	P15924	0.0176	2.42
Filamin-A	FLNA	P21333	0.0230	0.64
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	TGM2	P21980	0.0383	0.73
Oxysterol-binding protein 1	OSBP	P22059	0.0059	1.21
Tubulin gamma-1 chain;Tubulin gamma-2 chain;Tubulin gamma chain	TUBG1;TUBG2	P23258	0.0370	0.81

Proteinname	Gename	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A	GSPT1	P15170	0.0043	1.83
Desmoplakin	DSP	P15924	0.0176	2.42
Filamin-A	FLNA	P21333	0.0230	0.64
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	TGM2	P21980	0.0383	0.73
Oxysterol-binding protein 1	OSBP	P22059	0.0059	1.21
Tubulin gamma-1 chain;Tubulin gamma-2 chain;Tubulin gamma chain	TUBG1;TUBG2	P23258	0.0370	0.81
Cofilin-1	CFL1	P23528	0.0001	2.11
Elongation factor 1-beta	EEF1B2	P24534	0.0151	1.26
Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	ACP1	P24666	0.0066	1.80
40S ribosomal protein S12	RPS12	P25398	0.0026	1.18
Protein S100-A4	S100A4	P26447	0.0030	2.55
Valine--tRNA ligase	VAR5	P26640	0.0087	0.40
NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	NDUFS1	P28331	0.0168	0.68
SHC-transforming protein 1	SHC1	P29353	0.0021	0.77
Protein PML	PML	P29590	0.0009	1.83
Flavin reductase (NADPH)	BLVRB	P30043	0.0039	2.09
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	PPP2R1A	P30153	0.0017	0.71
Heme oxygenase 2	HMOX2	P30519	0.0085	1.74
Rab GDP dissociation inhibitor alpha	GDI1	P31150	0.0437	1.44
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	UQCRC1	P31930	0.0382	2.24
ATP-binding cassette sub-family D member 1	ABCD1	P33897	0.0575	1.15
DNA replication licensing factor MCM4	MCM4	P33991	0.0346	0.94
Catenin alpha-1	CTNNA1	P35221	0.0013	0.69
Replication factor C subunit 4	RFC4	P35249	0.0284	1.08
Protein DEK	DEK	P35659	0.0093	1.52
ADP-ribosylation factor-like protein 3	ARL3	P36405	0.0036	1.52
Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	CPOX	P36551	0.0146	1.00
Electron transfer flavoprotein subunit beta	ETFB	P38117	0.0400	1.74
V-type proton ATPase catalytic subunit A	ATP6V1A	P38606	0.0002	1.28
Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	P38646	0.0035	0.61
Macrophage-capping protein	CAPG	P40121	0.0452	0.83
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 7	UBA7	P41226	0.0277	1.31
Tyrosine-protein kinase CSK	CSK	P41240	0.0552	1.01
Glycine--tRNA ligase	GARS	P41250	0.0043	0.76

Proteinname	Gename	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial	ECI1;DCI	P42126	0.0202	1.10
Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta;Signal transducer and activator of transcription	STAT1	P42224	0.0082	0.59
Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	PI4KA	P42356	0.0471	0.82
Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	LRPPRC	P42704	0.0003	0.63
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	GPD2	P43304	0.0254	1.51
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	USP5	P45974	0.0008	1.25
Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase	NOP2	P46087	0.0024	0.53
Prolyl endopeptidase	PREP	P48147	0.0075	1.58
Nestin	NES	P48681	0.0506	1.12
CD97 antigen;CD97 antigen subunit alpha;CD97 antigen subunit beta	CD97	P48960	0.0250	0.67
Protein phosphatase 1F	PPM1F	P49593	0.0476	1.37
GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	GMPS	P49915	0.0005	1.40
DNA ligase 3	LIG3	P49916	0.0343	1.20
Vasodilator-stimulated phosphoprotein	VASP	P50552	0.0034	1.84
Methionine aminopeptidase 2	METAP2	P50579	0.0016	2.11
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	FXR1	P51114	0.0011	0.99
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	FXR2	P51116	0.0186	0.81
Dual specificity protein phosphatase 3	DUSP3	P51452	0.0000	3.47
Galactokinase	GALK1	P51570	0.0163	1.21
Host cell factor 1;HCF N-terminal chain 1;HCF N-terminal chain 2;HCF N-terminal chain 3;HCF N-terminal chain 4;HCF N-terminal chain 5;HCF N-terminal chain 6;HCF C-terminal chain 1;HCF C-terminal chain 2;HCF C-terminal chain 3;HCF C-terminal chain 4;HCF C-terminal chain 5;HCF C-terminal chain 6	HCFC1	P51610	0.0047	0.96
Hepatoma-derived growth factor	HDGF	P51858	0.0005	2.76
Importin subunit alpha-1	KPNA2	P52292	0.0004	0.91
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, N-terminally processed	HNRNPF	P52597	0.0055	1.36
Signal transducer and activator of transcription 2	STAT2	P52630	0.0316	1.35
DNA mismatch repair protein Msh6	MSH6	P52701	0.0014	0.42
Thimet oligopeptidase	THOP1	P52888	0.0060	0.70
Diphosphomevalonate decarboxylase	MVD	P53602	0.0022	1.45

Proteinname	Gename	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
Coatomer subunit beta	COPB1	P53618	0.0023	0.48
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase;Glutamate 5-kinase;Gamma-glutamyl phosphate reductase	ALDH18A1	P54886	0.0117	0.45
Eukaryotic translation initiation factor 5	EIF5	P55010	0.0041	1.59
Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	ADAR	P55265	0.0125	0.58
Protein SEC13 homolog	SEC13	P55735	0.0174	1.28
Eukaryotic translation initiation factor 6	EIF6	P56537	0.0148	0.53
Dextrin	DSTN	P60981	0.0261	1.15
Transforming growth factor beta-2;Latency-associated peptide	TGFB2	P61812	0.0357	0.77
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	P61978	0.0059	0.60
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, N-terminally processed;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	PPIA	P62937	0.0380	0.81
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a;Ubiquitin;40S ribosomal protein S27a;Ubiquitin-60S ribosomal protein L40;Ubiquitin;60S ribosomal protein L40;Polyubiquitin-B;Ubiquitin;Polyubiquitin-C;Ubiquitin	RPS27A;UBB;UBC;UBA52	P62979	0.0106	0.57
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1;Eukaryotic translation initiation factor 5A;Eukaryotic translation initiation factor 5A-1-like	EIF5A;EIF5AL1	P63241	0.0000	1.83
Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4;TPM1	P67936	0.0055	2.91
Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	P68371	0.0329	0.98
T-complex protein 1 subunit beta	CCT2	P78371	0.0001	0.88
Cyclin-dependent kinase 6	CDK6	Q00534	0.0220	0.65
Cyclin-dependent-like kinase 5	CDK5	Q00535	0.0030	1.09
Exosome component 10	EXOSC10	Q01780	0.0239	1.15
DNA topoisomerase 2-beta;DNA topoisomerase 2	TOP2B	Q02880	0.0183	0.48
1,4-alpha-glucan-branching enzyme	GBE1	Q04446	0.0079	0.43
Folylpolyglutamate synthase, mitochondrial	FPGS	Q05932	0.0152	0.99
Apoptosis regulator BAX	BAX	Q07812	0.0006	1.70
tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase	NSUN2	Q08J23	0.0387	1.27
Heat shock 70 kDa protein 14	HSPA14	Q0VDF9	0.0093	1.10
Secernin-1	SCRN1	Q12765	0.0118	1.31
Tumor suppressor p53-binding protein 1	TP53BP1	Q12888	0.0102	1.62
Protein flightless-1 homolog	FLII	Q13045	0.0133	0.59

Proteinname	Gename	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
Bifunctional coenzyme A synthase;Phosphopantetheine adenylyltransferase;Dephospho-CoA kinase	COASY	Q13057	0.0185	0.58
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 4;Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	USP4	Q13107	0.0074	0.58
Serine/threonine-protein kinase PAK 2;PAK-2p27;PAK-2p34	PAK2	Q13177	0.0194	2.49
Chromobox protein homolog 3	CBX3	Q13185	0.0001	3.24
Transcription intermediary factor 1-beta	TRIM28	Q13263	0.0045	0.67
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	UBE2V1;TMEM189-UBE2V1	Q13404	0.0631	2.47
Sequestosome-1	SQSTM1	Q13501	0.0018	1.77
Serine/threonine-protein kinase ATR	ATR	Q13535	0.0249	0.91
Dynactin subunit 2	DCTN2	Q13561	0.0081	2.00
NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit	NAE1	Q13564	0.0384	0.85
Cullin-4A	CUL4A	Q13619	0.0094	1.72
Filamin-C	FLNC	Q14315	0.0356	0.91
Caprin-1	CAPRIN1	Q14444	0.0174	1.87
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10	USP10	Q14694	0.0002	1.00
Nuclear mitotic apparatus protein 1	NUMA1	Q14980	0.0048	1.59
Cullin-7	CUL7	Q14999	0.0197	1.59
GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1	GAPVD1	Q14C86	0.0123	0.99
Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3	SART3	Q15020	0.0002	2.32
Condensin complex subunit 1	NCAPD2	Q15021	0.0002	0.51
Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit	RAB3GAP1	Q15042	0.0058	1.38
Eukaryotic translation initiation factor 4H	EIF4H	Q15056	0.0356	2.01
Early endosome antigen 1	EEA1	Q15075	0.0029	1.58
Poly(rC)-binding protein 1	PCBP1	Q15365	0.0008	1.42
Scaffold attachment factor B1	SAFB	Q15424	0.0159	1.94
Helicase SKI2W	SKIV2L	Q15477	0.0036	0.58
Myosin light chain kinase, smooth muscle;Myosin light chain kinase, smooth muscle, deglutamylated form	MYLK	Q15746	0.0083	0.93
Drebrin	DBN1	Q16643	0.0009	1.46
Inverted formin-2	INF2	Q27J81	0.0005	0.55
AP2-associated protein kinase 1	AAK1	Q2M2I8	0.0101	0.57
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	TIMM50	Q3ZCQ8	0.0134	0.68
Protein YIF1B	YIF1B	Q5BJH7	0.0153	1.18
Presequence protease, mitochondrial	PITRM1	Q5JRX3	0.0072	1.22
Alanine--tRNA ligase, mitochondrial	AARS2	Q5J TZ9	0.0069	0.96

Proteinname	Gename	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
Vacuolar protein sorting-associated protein 53 homolog	VPS53	Q5VIR6	0.0387	2.01
Annexin A8-like protein 2;Annexin;Annexin A8	ANXA8L2;ANXA8L1;ANXA8	Q5VT79	0.0009	1.36
E3 ubiquitin-protein ligase BRE1A	RNF20	Q5VTR2	0.0063	1.32
TBC1 domain family member 9B	TBC1D9B	Q66K14	0.0265	0.84
Microtubule-associated protein 1S;MAP1S heavy chain;MAP1S light chain	MAP1S	Q66K74	0.0012	1.13
Tensin-3	TNS3	Q68CZ2	0.0155	0.53
Anamorsin	CIAPIN1	Q6FI81	0.0016	2.06
Coiled-coil and C2 domain-containing protein 1A	CC2D1A	Q6P1N0	0.0003	2.12
BRCA1-associated ATM activator 1	BRAT1	Q6PJG6	0.0140	0.59
Myosin phosphatase Rho-interacting protein	MPRIP	Q6WCQ1	0.0022	1.82
Dynamin-binding protein	DNMBP	Q6XZF7	0.0190	0.82
Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	DHX30	Q7L2E3	0.0224	0.60
Trafficking protein particle complex subunit 11	TRAPPC11	Q7Z392	0.0024	1.16
UPF0505 protein C16orf62	C16orf62	Q7Z3J2	0.0211	0.58
Pogo transposable element with ZNF domain	POGZ	Q7Z3K3	0.0040	1.35
HEAT repeat-containing protein 3	HEATR3	Q7Z4Q2	0.0245	0.87
E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	HUWE1	Q7Z6Z7	0.0395	1.06
Pleckstrin homology-like domain family B member 1	PHLDB1	Q86UU1	0.0493	0.93
Liprin-beta-1	PPFIBP1	Q86W92	0.0071	1.51
Nitrilase homolog 1	NIT1	Q86X76	0.0068	1.97
Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 2	ANKLE2	Q86XL3	0.0011	1.56
Mitotic interactor and substrate of PLK1	MISP	Q8IVT2	0.0293	0.93
Protein NOXP20	FAM114A1	Q8IWE2	0.0022	2.08
Ankyrin repeat and KH domain-containing protein 1	ANKHD1	Q8IWZ3	0.0034	1.11
DnaJ homolog subfamily C member 10	DNAJC10	Q8IXB1	0.0234	0.60
Mitochondrial Rho GTPase 1;Mitochondrial Rho GTPase	RHOT1	Q8IXI2	0.0345	1.17
Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1	PELP1	Q8IZL8	0.0079	0.73
Cell cycle and apoptosis regulator protein 2	CCAR2	Q8N163	0.0000	0.38
Cap-specific mRNA (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase 1	CMTR1	Q8N1G2	0.0080	1.16
Leucine-rich repeat-containing protein 47	LRRC47	Q8N1G4	0.0003	1.10
Synaptopodin	SYNPO	Q8N3V7	0.0215	1.28
E3 ubiquitin-protein ligase DTX3L	DTX3L	Q8TDB6	0.0077	1.20
Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 1	PPP4R1	Q8TF05	0.0056	0.62
Filamin-binding LIM protein 1	FBLIM1	Q8WUP2	0.0036	1.96
Ataxin-2-like protein	ATXN2L	Q8WWM7	0.0639	1.43

Proteinname	Gename	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
Immunity-related GTPase family Q protein	IRGQ	Q8WZA9	0.0021	2.19
Heat shock protein 105 kDa	HSPH1	Q92598	0.0040	0.78
Far upstream element-binding protein 2	KHSRP	Q92945	0.0006	2.13
Rho guanine nucleotide exchange factor 2	ARHGEF2	Q92974	0.0045	0.80
Protein Spindly	SPDL1	Q96EA4	0.0037	2.10
Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	SUCLG2	Q96I99	0.0218	1.89
Solute carrier family 35 member E1	SLC35E1	Q96K37	0.0589	1.17
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47	USP47	Q96K76	0.0006	2.18
Zinc finger RNA-binding protein	ZFR	Q96KR1	0.0510	1.21
Arf-GAP with Rho-GAP domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	ARAP1	Q96P48	0.0170	0.82
Elongation factor G, mitochondrial	GFM1	Q96RP9	0.0266	0.70
RUN and FYVE domain-containing protein 1	RUFY1	Q96T51	0.0241	1.87
Nuclear pore complex protein Nup88	NUP88	Q99567	0.0060	1.24
DnaJ homolog subfamily C member 7	DNAJC7	Q99615	0.0069	1.55
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	HSD17B10	Q99714	0.0326	0.81
Endophilin-A2	SH3GL1	Q99961	0.0001	2.17
Condensin complex subunit 3	NCAPG	Q9BPX3	0.0165	0.65
Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2	ELAC2	Q9BQ52	0.0025	0.79
Myb-binding protein 1A	MYBBP1A	Q9BQG0	0.0061	0.91
Thioredoxin domain-containing protein 17	TXNDC17	Q9BRA2	0.0022	2.02
Extended synaptotagmin-1	ESYT1	Q9BSJ8	0.0006	0.78
Mini-chromosome maintenance complex-binding protein	MCMBP	Q9BTE3	0.0148	1.84
Dual specificity protein phosphatase 23	DUSP23	Q9BVJ7	0.0209	1.75
RNA-binding protein 4;RNA-binding protein 4B	RBM4;RBM4B	Q9BWF3	0.0485	1.01
N-alpha-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit	NAA15	Q9BXJ9	0.0080	0.52
Serrate RNA effector molecule homolog	SRRT	Q9BXP5	0.0066	1.32
Inosine triphosphate pyrophosphatase	ITPA	Q9BY32	0.0066	1.90
TBC1 domain family member 2A	TBC1D2	Q9BYX2	0.0155	0.76
Ras-related protein Rab-34	RAB34	Q9BZG1	0.0257	1.33
Protein Niban	FAM129A	Q9BZQ8	0.0532	1.06
182 kDa tankyrase-1-binding protein	TNKS1BP1	Q9C0C2	0.0072	2.26
5-3 exoribonuclease 2	XRN2	Q9H0D6	0.0040	0.80
Activity-dependent neuroprotector homeobox protein	ADNP	Q9H2P0	0.0378	1.20

Proteinname	Gename	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
ATP-dependent RNA helicase DHX36	DHX36	Q9H2U1	0.0104	1.16
Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2	EPS8L2	Q9H6S3	0.0023	0.98
Leucine-rich repeat-containing protein 40	LRRC40	Q9H9A6	0.0013	1.05
TBC1 domain family member 17	TBC1D17	Q9HA65	0.0007	1.27
Arsenite methyltransferase	AS3MT	Q9HBK9	0.0017	1.51
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	MCCC2	Q9HCC0	0.0209	1.01
Pre-mRNA-splicing factor SYF1	XAB2	Q9HCS7	0.0021	1.80
Sialic acid synthase	NANS	Q9NR45	0.0155	0.62
Aladin	AAAS	Q9NRG9	0.0306	0.88
L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-	AASDHPPT	Q9NRN7	0.0090	0.87
phosphopantetheinyl transferase E3 ubiquitin-protein ligase RAD18	RAD18	Q9NS91	0.0390	1.48
Isoleucine--tRNA ligase, mitochondrial	IARS2	Q9NSE4	0.0151	1.06
Structural maintenance of chromosomes protein 4;Structural maintenance of chromosomes protein	SMC4	Q9NTJ3	0.0058	0.43
Phosphatidylinositide phosphatase SAC1	SACM1L	Q9NTJ5	0.0176	0.59
Protein lin-7 homolog C	LIN7C	Q9NUP9	0.0069	2.48
OCIA domain-containing protein 1	OCIAD1	Q9NX40	0.0048	2.35
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX56	DDX56	Q9NY93	0.0476	1.25
Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	FAM120A	Q9NZB2	0.0168	1.00
Opioid growth factor receptor	OGFR	Q9NZT2	0.0001	2.37
Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase, mitochondrial;Lysine ketoglutarate reductase;Saccharopine dehydrogenase	AASS	Q9UDR5	0.0038	1.38
V-type proton ATPase subunit H	ATP6V1H	Q9UII2	0.0095	0.47
Tyrosine-protein kinase BAZ1B	BAZ1B	Q9UIG0	0.0130	0.66
Drebrin-like protein	DBNL	Q9UJU6	0.0079	1.51
Dynactin subunit 4	DCTN4	Q9UJW0	0.0607	1.23
Anaphase-promoting complex subunit 7	ANAPC7	Q9UJX3	0.0059	0.38
Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 1	PPP6R1	Q9UPN7	0.0035	2.21
Serine/arginine repetitive matrix protein 2	SRRM2	Q9UQ35	0.0112	1.79
Nck-associated protein 1	NCKAP1	Q9Y2A7	0.0098	0.47
Thyroid hormone receptor-associated protein 3	THRAP3	Q9Y2W1	0.0127	1.42
Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial	ACOT9	Q9Y305	0.0294	0.58
Rab GTPase-activating protein 1	RABGAP1	Q9Y3P9	0.0023	1.73
Talin-2	TLN2	Q9Y4G6	0.0032	2.11
Rab GTPase-activating protein 1	RABGAP1	Q9Y3P9	0.0023	1.73

Proteinname	Genname	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
Rab GTPase-activating protein 1	RABGAP1	Q9Y3P9	0.0023	1.73
Talin-2	TLN2	Q9Y4G6	0.0032	2.11
Protein phosphatase methylesterase 1	PPME1	Q9Y570	0.0046	0.70
Mitochondrial carrier homolog 2	MTCH2	Q9Y6C9	0.0151	0.93
Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	DYNC1LI1	Q9Y6G9	0.0058	1.26
Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	SQRDL	Q9Y6N5	0.0278	1.18
SEC23-interacting protein	SEC23IP	Q9Y6Y8	0.0359	1.24

**Tabelle 26: Proteinliste, der 29 differenziell regulierten Proteine, die eine höhere Proteinabundanz in den unbehandelten Proben nach Aufarbeitung mittels TPS-Matrix gezeigt haben.**

Proteinname	Genname	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
Haptoglobin;Haptoglobin alpha chain;Haptoglobin beta chain;Haptoglobin-related protein	HP;HPR	A0A087WU08	0.0000	-4.55
NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial	ME2	A0A1W2PQT3	0.0138	-0.56
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, N-terminally processed	HNRNPA1	F8W6I7	0.0180	-0.49
Reticulon	RTN4	F8W914	0.0324	-1.79
Proteasome subunit alpha type;Proteasome subunit alpha type-6	PSMA6	G3V5Z7	0.0043	-0.75
Mannose-P-dolichol utilization defect 1 protein	MPDU1	J3KSI4	0.0592	-1.69
Torsin-1B	TOR1B	O14657	0.0103	-0.53
Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2	O15144	0.0292	-1.38
Cartilage-associated protein	CRTAP	O75718	0.0179	-0.55
3(2),5-bisphosphate nucleotidase 1	BPNT1	O95861	0.0493	-1.12
Fructose-bisphosphate aldolase C;Fructose-bisphosphate aldolase	ALDOC	P09972	0.0134	-0.78
Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	ACAT1	P24752	0.0211	-0.50
Peroxiredoxin-6	PRDX6	P30041	0.0430	-0.78
Flap endonuclease 1	FEN1	P39748	0.0229	-0.75
Malate dehydrogenase, mitochondrial;Malate dehydrogenase	MDH2	P40926	0.0086	-0.59
40S ribosomal protein S10	RPS10	P46783	0.0328	-0.81
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	PSMD8	R4GMR5	0.0259	-0.78
Translocon-associated protein subunit delta	SSR4	P51571	0.0109	-0.58
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	UBE2N	P61088	0.0013	-1.15
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1;Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1, N-terminally processed	GNB2L1	P63244	0.0421	-0.74
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	YBX1	P67809	0.0142	-0.46

Proteinname	Genname	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
Unhealthy ribosome biogenesis protein 2 homolog	URB2	Q14146	0.0277	-1.03
Histone H2A type 2-C;Histone H2A type 2-A	HIST2H2AC;HIST2H2AA3	Q16777	0.0226	-0.85
Membrane primary amine oxidase	AOC3	Q16853	0.0000	-4.16
OCIA domain-containing protein 2	OCIAD2	Q56VL3	0.0327	-0.63
TBC1 domain family member 15	TBC1D15	Q8TC07	0.0002	-1.55
Myeloid-derived growth factor	MYDGF	Q969H8	0.0175	-0.58
Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1	ERGIC1	Q969X5	0.0771	-2.11
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	VAT1	Q99536	0.0191	-0.61

**Tabelle 27: Proteinliste, der 10 Proteine, die eine höhere Proteinabundanz nach Wasserstoffperoxidbehandlung im A172-Proteom gezeigt haben.**

Proteinname	Genname	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
Basigin	BSG	A0A087X2B5	0.0066	3.17
60S acidic ribosomal protein P2	RPLP2	P05387	0.0026	1.42
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS	P29966	0.0009	3.04
Signal recognition particle 14 kDa protein	SRP14	P37108	0.0010	1.47
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	PSMD7	P51665	0.0007	1.03
Protein SEC13 homolog	SEC13	P55735	0.0056	1.65
Transmembrane glycoprotein NMB	GPNMB	Q14956	0.0015	2.23
Nucleoporin Nup43	NUP43	Q8NFH3	0.0006	2.05
AP-3 complex subunit sigma-1	AP3S1	Q92572	0.0017	1.59
Coiled-coil domain-containing protein 124	CCDC124	Q96CT7	0.0004	2.58

**Tabelle 28: Proteinliste der 93 potenziellen Interaktionspartner von CAPG, die eine höhere Proteinabundanz nach Wasserstoffperoxidbehandlung im Vergleich zu den unbehandelten Proben gezeigt haben.**

Proteinname	Genname	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
Unconventional myosin-Ic	MYO1C	O00159-3	0.0098	0.71
[3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase [lipoamide]] kinase, mitochondrial	BCKDK	O14874	0.0053	1.31
Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	DHX15	O43143	0.0030	0.55
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	HNRNPR	O43390	0.0273	1.61
Alpha-actinin-4	ACTN4	O43707	0.0159	0.46
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	NUDT21	O43809	0.0166	0.64
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	PLOD3	O60568	0.0020	0.82
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial;Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial	GLUD1;GLUD2	P00367-3	0.0033	1.76
Prelamin-A/C;Lamin-A/C	LMNA	P02545	0.0226	0.53

Proteinname	Gencode	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
Transferrin receptor protein 1; Transferrin receptor protein 1, serum form	TFRC	P02786	0.0012	0.62
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	P04406	0.0000	3.65
Calpain small subunit 1	CAPNS1	P04632	0.0101	1.10
Plasminogen activator inhibitor 1	SERPINE1	P05121-2	0.0187	0.66
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	EIF2S1	P05198	0.0132	0.42
Transcription factor AP-1	JUN	P05412	0.0214	1.03
Nuclear factor 1 C-type	NFIC	P08651-4	0.0235	2.19
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	LAMP1	P11279	0.0519	0.88
Polyadenylate-binding protein 1; Polyadenylate-binding protein 3	PABPC1; PABPC3	P11940-2	0.0073	0.50
Alpha-actinin-1	ACTN1	P12814-2	0.0099	0.68
Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	LAMP2	P13473-2	0.0308	0.58
Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A; Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3B	GSPT1; GSPT2	P15170-2	0.0137	0.45
POU domain, class 3, transcription factor 2	POU3F2	P20265	0.0190	0.74
Cyclin-dependent kinase 11A; Cyclin-dependent kinase 11B	CDK11A; CDK11B	Q9UQ88-4	0.0013	1.48
E3 ubiquitin-protein ligase CBL	CBL	P22681	0.0009	0.92
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	SFPQ	P23246	0.0105	1.00
Moesin	MSN	P26038	0.0208	1.36
Erythrocyte band 7 integral membrane protein	STOM	P27105-2	0.0137	1.27
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	PRDX3	P30048-2	0.0004	0.94
DnaJ homolog subfamily A member 1	DNAJA1	P31689	0.0030	0.42
Stress-induced-phosphoprotein 1	STIP1	P31948-3	0.0112	1.05
Catenin alpha-1	CTNNA1	P35221	0.0186	0.57
RNA-binding protein FUS	FUS	P35637-2	0.0116	0.95
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	PPP1CC	P36873	0.0152	0.81
Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDH2	P40926	0.0166	2.16
Paxillin	PXN	P49023-2	0.0361	0.60
4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	ALDH9A1	P49189	0.0250	1.37
Cytosolic purine 5-nucleotidase	NT5C2	P49902-2	0.0057	1.28
Zinc finger protein 143	ZNF143	P52747-2	0.0234	0.55
Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96; Nuclear pore complex protein Nup98; Nuclear pore complex protein Nup96	NUP98	P52948-4	0.0026	0.74
Small ubiquitin-related modifier 2; Small ubiquitin-related modifier 4; Small ubiquitin-related modifier 3	SUMO2; SUMO4; SUMO3	P61956-2	0.0463	2.37
DDB1- and CUL4-associated factor 7	DCAF7	P61962	0.0173	0.67

Proteinname	Gencode	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
14-3-3 protein gamma;14-3-3 protein gamma, N-terminally processed	YWHA3	P61981	0.0456	0.95
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	PPP1CA	P62136	0.0004	0.93
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	PLOD1	Q02809	0.0269	1.35
Peroxiredoxin-1	PRDX1	Q06830	0.0002	2.38
Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	AHNAK	Q09666	0.0191	0.47
Splicing factor 3A subunit 3	SF3A3	Q12874	0.0000	0.94
Peroxiredoxin-4	PRDX4	Q13162	0.0057	0.57
Dynactin subunit 2	DCTN2	Q13561	0.0141	1.29
Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A	DYRK1A	Q13627-2	0.0055	0.67
Lysosome membrane protein 2	SCARB2	Q14108	0.0291	1.14
Ubiquitin-associated protein 2-like	UBAP2L	Q14157-4	0.0127	0.77
Caprin-1	CAPRIN1	Q14444-2	0.0213	1.72
Semaphorin-3A	SEMA3A	Q14563	0.0123	0.57
Clathrin interactor 1	CLINT1	Q14677-2	0.0229	1.73
Nuclear factor 1 X-type	NFIX	Q14938-6	0.0003	0.90
Non-POU domain-containing octamer-binding protein	NONO	Q15233	0.0040	0.72
Splicing factor 3B subunit 4	SF3B4	Q15427	0.0134	0.56
Splicing factor 3A subunit 1	SF3A1	Q15459	0.0106	0.52
Drebrin	DBN1	Q16643	0.0023	0.31
Protein LSM12 homolog	LSM12	Q3MHD2	0.0216	0.73
Ubiquitin-associated protein 2	UBAP2	Q5T6F2	0.0164	0.84
Protein FAM117B	FAM117B	Q6P1L5	0.0000	5.04
WD repeat-containing protein 82	WDR82	Q6UXN9	0.0248	0.88
Dipeptidyl peptidase 9	DPP9	Q86TI2	0.0067	0.85
ATP-dependent RNA helicase DDX42	DDX42	Q86XP3	0.0026	1.19
DnaJ homolog subfamily C member 10	DNAJC10	Q8IXB1	0.0005	1.04
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 7	CPSF7	Q8N684-2	0.0158	0.66
Prenylcysteine oxidase-like	PCYOX1L	Q8NBM8	0.0007	0.59
Protein FAM98A	FAM98A	Q8NCA5-2	0.0001	1.19
E3 ubiquitin-protein ligase RNF169	RNF169	Q8NCN4	0.0186	1.62
Transmembrane protein 263	TMEM263	Q8WUH6	0.0548	1.27
Pleckstrin homology-like domain family A member 1	PHLDA1	Q8WV24	0.0132	1.46
Ataxin-2-like protein	ATXN2L	Q8WWM7	0.0040	0.88
Paraspeckle component 1	PSPC1	Q8WXF1	0.0005	1.34
Far upstream element-binding protein 2	KHSRP	Q92945	0.0045	1.54
Ataxin-2	ATXN2	Q99700-2	0.0235	0.89
Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2	ELAC2	Q9BQ52-4	0.0521	1.20
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	ANP32E	Q9BTT0-3	0.0127	2.88
Multiple myeloma tumor-associated protein 2	MMTAG2	Q9BU76-4	0.0334	0.84
pre-mRNA 3 end processing protein WDR33	WDR33	Q9C0J8	0.0032	0.65

Proteinname	Genname	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
UPF0687 protein C20orf27	C20orf27	Q9GZN8	0.0053	0.48
Negative elongation factor A	NELFA	Q9H3P2	0.0371	1.58
E3 ubiquitin-protein ligase SMURF2	SMURF2	Q9HAU4	0.0105	1.84
Protein FAM114A2	FAM114A2	Q9NRY5	0.0002	1.02
Notchless protein homolog 1	NLE1	Q9NVX2	0.0145	0.78
Prenylcysteine oxidase 1	PCYOX1	Q9UHG3	0.0410	1.26
Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1	BAIAP2L1	Q9UHR4	0.0021	2.18
Suppressor of fused homolog	SUFU	Q9UMX1	0.0189	0.79
Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	G3BP2	Q9UN86	0.0019	0.90
UPF0568 protein C14orf166	C14orf166	Q9Y224	0.0058	0.47
GDP-fucose protein O-fucosyltransferase 2	POFUT2	Q9Y2G5	0.0232	0.57
Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial	ACOT9	Q9Y305-2	0.0417	0.81

**Tabelle 29: Proteinliste der 58 potenziellen Interaktionspartner von CAPG, die im Vergleich zu den mit Wasserstoffperoxid-behandelten Proben in den unbehandelten Proben eine höhere Proteinabundanz gezeigt haben.**

Proteinname	Genname	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	O00299	0.0201	-0.97
Nucleolar protein 56	NOP56	O00567	0.0423	-0.70
Tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	O14773-2	0.0088	-0.40
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44	TIMM44	O43615	0.0001	-1.68
Bromodomain-containing protein 4	BRD4	O60885	0.0019	-1.13
Filamin-B	FLNB	O75369-2	0.0279	-0.59
Vesicle-trafficking protein SEC22b	SEC22B	O75396	0.0258	-0.55
Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	GLS	O94925-3	0.0228	-0.49
Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	P00558	0.0060	-0.63
Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1	P00568	0.0013	-0.64
Annexin A1	ANXA1	P04083	0.0008	-0.92
Calpain-1 catalytic subunit	CAPN1	P07384	0.0069	-0.56
Annexin A6	ANXA6	P08133	0.0010	-1.02
Glutathione S-transferase P	GSTP1	P09211	0.0017	-0.65
Annexin A4	ANXA4	P09525-2	0.0439	-0.84
ATP-dependent 6-phosphofruktokinase, liver type	PFKL	P17858	0.0047	-0.63
60S ribosomal protein L35a	RPL35A	P18077	0.0462	-0.98
60S ribosomal protein L17	RPL17	P18621	0.0082	-0.40
Filamin-A	FLNA	P21333-2	0.0188	-0.49
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	P22314-2	0.0101	-0.47
CAD protein;Glutamine-dependent carbamoyl-phosphate synthase;Aspartate carbamoyltransferase;Dihydroorotase	CAD	P27708	0.0252	-0.74
Peroxiredoxin-6	PRDX6	P30041	0.0108	-0.98
UMP-CMP kinase	CMPK1	P30085	0.0249	-0.61

Proteinname	Gencode	Uniprot-ID	p-Wert	Differenz
60S ribosomal protein L4	RPL4	P36578	0.0128	-0.48
Macrophage-capping protein	CAPG	P40121	0.0178	-0.58
26S protease regulatory subunit 6B	PSMC4	P43686	0.0126	-0.40
60S ribosomal protein L27a	RPL27A	P46776	0.0269	-0.66
40S ribosomal protein S10;Putative 40S ribosomal protein S10-like	RPS10;RPS10P5	P46783	0.0135	-0.42
B-cell receptor-associated protein 31	BCAP31	P51572	0.0683	-2.01
Host cell factor 1;HCF N-terminal chain 1;HCF N-terminal chain 2;HCF N-terminal chain 3;HCF N-terminal chain 4;HCF N-terminal chain 5;HCF N-terminal chain 6;HCF C-terminal chain 1;HCF C-terminal chain 2;HCF C-terminal chain 3;HCF C-terminal chain 4;HCF C-terminal chain 5;HCF C-terminal chain 6	HCFC1	P51610	0.0004	-0.48
Biliverdin reductase A	BLVRA	P53004	0.0129	-0.63
Myosin light polypeptide 6	MYL6	P60660-2	0.0229	-0.72
60S ribosomal protein L26;60S ribosomal protein L26-like 1	RPL26;RPL26L1	P61254	0.0009	-0.77
40S ribosomal protein S18	RPS18	P62269	0.0235	-0.66
40S ribosomal protein S26;Putative 40S ribosomal protein S26-like 1	RPS26;RPS26P11	P62854	0.0128	-0.83
60S ribosomal protein L31	RPL31	P62899	0.0274	-0.72
60S ribosomal protein L11	RPL11	P62913	0.0147	-0.62
60S ribosomal protein L38	RPL38	P63173	0.0056	-1.00
Actin, cytoplasmic 2;Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed	ACTG1	P63261	0.0004	-0.35
General transcription factor II-I	GTF2I	P78347-2	0.0195	-0.57
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1;Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 85 kDa subunit;Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 515 kDa subunit;Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 intracellular domain	LRP1	Q07954	0.0134	-0.76
FACT complex subunit SSRP1	SSRP1	Q08945	0.0051	-0.38
Secernin-1	SCRN1	Q12765	0.0014	-0.62
Transcription intermediary factor 1-beta	TRIM28	Q13263	0.0113	-0.48
Serum paraoxonase/arylesterase 2	PON2	Q15165-1	0.0625	-1.31
Prostaglandin E synthase 3	PTGES3	Q15185-4	0.0083	-1.50
Myosin light chain kinase, smooth muscle;Myosin light chain kinase, smooth muscle, deglutamylated form	MYLK	Q15746-6	0.0198	-0.59
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	HADH	Q16836	0.0277	-0.63
UPF0505 protein C16orf62	C16orf62	Q7Z3J2	0.0247	-1.18
Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1	CCAR1	Q8IX12-2	0.0248	-0.67
Cell cycle and apoptosis regulator protein 2	CCAR2	Q8N163-2	0.0007	-0.55
Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1	PBXIP1	Q96AQ6	0.0200	-0.53

---

<b>Proteinname</b>	<b>Gencode</b>	<b>Uniprot-ID</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Differenz</b>
Ubiquitin thioesterase OTUB1	OTUB1	Q96FW1	0.0040	-0.66
Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	LUC7L2	Q96HJ9-2	0.0084	-0.66
Endoplasmic reticulum resident protein 44	ERP44	Q9BS26	0.0052	-0.73
Endophilin-B2	SH3GLB2	Q9NR46	0.0351	-0.74
Ribosome-binding protein 1	RRBP1	Q9P2E9-3	0.0355	-0.94
SUMO-activating enzyme subunit 2	UBA2	Q9UBT2	0.0137	-0.65

---

## 10.5 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Kai Stühler für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie die vielen lehrreichen Diskussionen und hervorragenden Anregungen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Peter Jahns und Herrn Prof. Dr. Georg Groth, möchte ich für die Vertretung meiner Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der HHU und die freundliche Übernahme der Gutachten herzlich danken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Arbeitsgruppenleiter Dr. Gereon Poschmann für die fachliche und organisatorische Betreuung während des gesamten Zeitraums meiner Promotion, die stets offene Tür und die vielen hilfreichen Ratschläge. Vielen Dank für die ausgezeichnete Betreuung!

Frau Dr. Christiane Knobbe-Thomsen danke ich für Ihre gute Zusammenarbeit und die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Für die Hilfe und die Durchführung bei den MD-Simulationen bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. Holger Gohlke und Dr. Markus Dick.

Dr. Sebastian Hänsch, sowie den anderen Mitarbeitern vom CAi, danke ich für die Unterstützung bei der Aufnahme der konfokal mikroskopischen Bilder und bei der Durchführung der Lebendzell-Mikroskopie.

Für die gute Zusammenarbeit, die stete Unterstützung und die konstruktiven Vorschläge möchte ich mich bei meinen Kollegen des Molecular Proteomics Laboratory bedanken. Eva Bruns danke ich für die kompetente Einarbeitung in den Laboralltag am MPL. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Leonie Grube, Nina Overbeck, Maike Langini, Omid Etemad-Parishanzadeh und Christin Hafermann für den Austausch an Ideen, unsere vielen Gespräche und die lustigen Momente am MPL. Dr. Anja Stefanski danke ich für die vielen Ratschläge und ihre Diskussionsbereitschaft. Das tolle Arbeitsklima in der Arbeitsgruppe und die gute Zusammenarbeit haben entscheidend zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Zusätzlich möchte ich mich noch bei den Mitgliedern der Studienstiftung des deutschen Volkes für ihre tolle Unterstützung und bei der Stiftung für meine Finanzierung, als auch für die großartige ideelle Förderung während meiner Promotion bedanken. Ihre Hilfe hat es mir ermöglicht so weit zu kommen!

Bei meiner Familie möchte ich mich für die bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken, ohne euch wäre das nicht möglich gewesen. Der allergrößte Dank gebührt meiner Mama für alles, was du für mich getan hast!

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Freunden bedanken, die stets für mich da waren und hinter mir gestanden haben. Ein besonderer Dank gilt Vanessa für das Zuhören und aufhellen meiner Stimmung.

Und zum Schluss möchte ich mich noch bei meinem Mann Martin bedanken. Du stehst immer an meiner Seite, hast all meine schlechten Launen tapfer ertragen, mich bei allen Vorhaben grenzenlos unterstützt und ermuntert weiterzumachen. Ich weiß, dass ich immer auf dich zählen kann!

## 10.6 Eidesstaatliche Erklärung

Ich, Nina Prescher, 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

---

Nina Prescher