Aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
(Prof. Dr. rer. nat. habil. Uwe Lendeckel)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema: Der Einfluß von Glucose und Docosahexaensäure auf das Proteom von BRIN-BD11-Insulinomazellen

Inaugural - Dissertation

zur
Erlangung des akademischen
Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der
Universitätsmedizin
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

2017

vorgelegt von: Wenke Wichmann
geboren am: 1. April 1990
in: Rostock

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. M. P. Baur

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil U. Lendeckel
2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. M. Elsner

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum O 0.65 der Klinik für Innere A
Tag der Disputation: 27.11.2017

I. Verzeichnisse

I. Inhaltsverzeichnis

I. Verzeichnisse I

I. Inhaltsverzeichnis I

II. Abbildungsverzeichnis III

III. Tabellenverzeichnis IV

IV. Abkürzungsverzeichnis V

1 Einleitung 8

1.1 Das Metabolische Syndrom 8

1.2 Insulin, Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 Entstehung 14

1.3 Renin-Angiotensin Sytem (RAS) 18

1.4 BRIN-BD11 Zelllinie 21

2 Zielstellung 24

3 Material und Methoden 25

3.1 Material 25

3.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien 25

3.1.2 Puffer 31

3.1.3 Primer 36

3.1.4 Software und Datenbanken 37

3.2 Methoden 38

3.2.1 Zellkultur 38

3.2.2 Bestimmung der RNA Konzentration 40

3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration 40

3.2.4 Eindimensionale (1D-) Gelelektrophorese 41

3.2.5 Zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese 41

3.2.6 Coomassie Färbung 44

3.2.7 2D-Differenzial-Fluoreszenz-Gelelektrophorese (DIGE) 44

3.2.8 Scannen von 2D-Gelen 45

3.2.9 Auswertung der 2D-DIGE-Gele 46

3.2.10 Massenspektrometrische Analyse 46
3.2.11 Ingenuity Pathway Analysis (IPA-Analyse) 47
3.2.12 Quantitative Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion 47
3.2.13 Western Blot 49
4 Ergebnisse 52
4.1 ACE2 mRNA Expressionsveränderung 52
4.2 DIGE Analyse von BRIN-BD11 Zellen 53
4.2.1 Differentielle Expression von Proteinen der BRIN-BD11 Zellen 54
4.2.2 Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF-TOF 58
4.3 IPA - Analyse 61
4.4 Verifizierung der Daten anhand ausgewählter Kandidaten auf mRNA- und Proteinebene 64
4.4.1 mRNA-Analyse 65
4.4.2 Western Blot Analyse 72
5 Diskussion 75
5.1 Cathepsin D, ERLIN2 und Melanocyte proliferating gene 1 77
5.2 Thioredoxin Reduktase 1 und Dihydropyrimidinase-Like 2 79
5.3 Glutamat-Cystein-Ligase 80
5.4 IPA Analyse 82
6 Zusammenfassung 85
7 Literaturverzeichnis 86
8 Eidesstattliche Erklärung 95
9 Danksagung 966
10 Anhang 977

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Interaktionen zwischen erhöhtem Blutdruck, Glucose-, Fettsäure-Konzentrationen und der Insulinwirkung 10
Abbildung 2: Histologische Bilder des Pankreas 15
Abbildung 3: Aktuelles Verständnis des Renin–Angiotensin–Systems 20
Abbildung 4: BRIN-BD11 Zellen 21
Abbildung 5: Wachstumskurve der BRIN-BD11 Zellen 22
Abbildung 6: Glucoseinduzierte Insulinsekretion von BRIN-BD11 im Vergleich zu RINm5F Zellen. 22
Abbildung 7: Aufbau des Semi-Dry-Blottes 50
Abbildung 8: links: veränderte mRNA-Menge von ACE2 rechts: RT-qPCR Daten für ACE 2 52
Abbildung 9: Übersichtsbild aller 1487 detektierten Spots im DIGE-Projekt 53
Abbildung 10: Venndiagramm zur Darstellung der Verteilung der 90 signifikant regulierten Spots 54
Abbildung 11: Übersichtsbild aller signifikant regulierten Spots im DIGE Projekt 55
Abbildung 12: Übersicht aller 949 ausgestochenen Proteinspots 58
Abbildung 13: regulierte und identifizierte Spots der BRIN-BD11 Zellen 61
Abbildung 14: Symbol-Legende für die IPA-Netzwerke 62
Abbildung 15: IPA-Netzwerk 1: "Nucleic Acid Metabolism, Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry" 62
Abbildung 16: IPA-Netzwerk 2: "DNA Replication, Recombination and Repair, Nucleic Acid Metabolism, Small Molecule Biochemistry" 63
Abbildung 17: IPA-Netzwerkt 3: "Carbohydrate Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry" 63
Abbildung 18: IPA-Analyse: Aufschlüsselung der 45 Proteine nach Lokalisation und Funktionstyp 64
Abbildung 19: Gegenüberstellung von Kontroll-, Glucose-, DHA-, Glucose+DHA-Fusionsbildern anhand ausgewählter Spots, Ergebnisse von Einzelspots nach Identifizierung mittels MALDI-TOF-TOF 65
Abbildung 20: Primerprodukte aufgetragen in 1,5%-igem Agarosegel 66
Abbildung 21: Schmelzpeaks der verwendeten Primer 66
Abbildung 22: links: veränderte mRNA-Menge von CTSD rechts: RT-qPCR Daten für CTSD 67
Abbildung 23: links: veränderte mRNA-Menge von ERLIN2 rechts: RT-qPCR Daten für ERLIN2 68
Abbildung 24: links: veränderte mRNA-Menge von MYG1 rechts: RT-qPCR Daten für MYG1 69
Abbildung 25: links: veränderte mRNA-Menge GCLM rechts: RT-qPCR Daten für GCLM 70
Abbildung 26: links: veränderte mRNA-Menge von TXNRD1 rechts: RT-qPCR Daten für TXNRD1 70
Abbildung 27: links: veränderte mRNA-Menge von CRMP2 rechts: RT-qPCR Daten für CRMP2 71
Abbildung 28: Western Blot Analyse von Thioredoxin-Reduktase 1 – Tubulin alpha-1A 72
Abbildung 29: links: relative Proteinexpressionsveränderung von TRXR1 auf Western Blot Ebene 72
Abbildung 30: Western Blot Analyse von Dihydropyrimidinase-related protein 2 – Tubulin alpha-1A 73
Abbildung 31: links: relative Proteinexpressionsveränderung von DPYL 2 auf Western Blot Ebene 74

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kriterien zur Definition des Metabolischen Syndroms 9
Tabelle 2: Behandlungsschema 39
Tabelle 3: Pipettierschema der Standardreihe für die Proteinbestimmung nach Bradford 40
Tabelle 4: Zusammensetzung der Acrylamidlösung für zwei Trenn- und Sammelgele 41
Tabelle 5: IEF Programm 42
Tabelle 6: Zusammensetzung der 12%-igen SDS-Trenngele 43
Tabelle 7: Beladung der DIGE Gele 44
Tabelle 8: Scaneinstellungen für DIGE-Gele 45
Tabelle 9: Pipettierschema zur cDNA Synthese 48
Tabelle 10: verwendetes PCR-Protokoll - Gradienten-RT-PCR 48
Tabelle 11: verwendetes PCR-Protokoll - quantitative-RT-PCR 49
Tabelle 12: Verdünnungsfaktoren der verwendeten Antikörper 50
Tabelle 13: RT-qPCR-Datenauswertung für ACE2 52
Tabelle 14: Verteilung der 90 signifikant regulierten Spots auf die Behandlungsgruppen 54
Tabelle 15: Differenziell exprimierte DIGE-Spots in den Behandlungsgruppen 56
Tabelle 16: Übersicht der detektierten, identifizierten und in ihrer Intensität differenzielle expri einemierten Spots 59
Tabelle 17: Auflistung der 36 identifizierten und regulierten Proteinspots aus dem DIGE Experiment, sortiert nach Funktionsklassen 59
Tabelle 18: Delta2D Relationen ausgewählter Proteinspots 65
Tabelle 19: RT-qPCR-Datenauswertung für CTSD 67
Tabelle 20: RT-qPCR Datenauswertung für ERLIN2 68
Tabelle 21: RT-qPCR-Datenauswertung für MYG1 69
Tabelle 22: RT-qPCR-Datenauswertung für GCLM 69
Tabelle 23: RT-qPCR Datenauswertung für TXNRD1 71
Tabelle 24: RT-qPCR Datenauswertung für CRMP2 71
Tabelle 25: Western Blot Datenauswertung für TRXR1 73
Tabelle 26: Western Blot Datenauswertung für DPYL2 73

IV. Abkürzungsverzeichnis

2D-LP	2D Lysispuffer
% (v/v)	Volumenprozent (ml/100 ml)
% (w/v)	Gewichtsprozent (g/100 ml)
1D	Eindimensional
1xLP	Einfach-Laufpuffer
2D	zweidimensional
A. bidest.	Aqua bidestillata (zweifach destilliertes Wasser)
A. deion.	Aqua deionisata
A. dest	Aqua destillata (einfach destilliertes Wasser)
ACE	*Angiotensin Converting Enzyme*
ACE 2	*Angiotensin Converting Enzyme 2*
AGE	*Advanced Glycation Endproduct*
AMP	Aminopeptidase
Ang IV	*Angiotensin IV*
Ang-(1-7)	*Angiotensin-Peptide 1-7*
ÄP	Äquilibrierungspuffer
APA	*Aminopeptidase A*
APN	*Aminopeptidase N*
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
AT1bR	*Angiotensin II Type 1b Receptor*
AT2R	*Angiotensin II Type 2 Receptor*
ATP	*Adenosintriphosphat*
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
BSA	*Bovin serum albumine* (Rinderserumalbumin)
CATD	Cathepsin D (Protein),
CBPE	Carboxypeptidase E (EC 3.4.17.10)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CRMP2	*Dihydropyrimidinase-related protein 2* (Gen)
CTSD	*Cathepsin D* (Gen)
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DHA	Docosahexaensäure
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DPBS	*Dulbecco's phosphate buffered saline*
Dpi	*Dots per inch* (Punkte pro Inch)
DTT	Dithiothreitol
DYPL2	*Dihydropyrimidinase-related protein 2* (Protein)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMAU	Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
ERLIN2	*Endoplasmic reticulum lipid raft-associeted protein 2*
et al.	Et alii (und andere)
FSC	*Fetal calf serum* (Fetales Kälberserum)
g	Erdbeschleunigung

GCL	Glutamat-Cystein-Ligase
GCLM	*Glutamate-cysteine ligase, modfier subunit* (Gen)
GFAT	Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Amidotransferase
G-Protein	Guanidinenukleotid-Bindungsprotein
GSH0	*Glutamate-cysteine ligase, modfier subunit* (Protein)
IAA	Iodacetamid
IDF	International Diabetes Federation
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG-Stip	*Immobilized pH gradient strip* (Streifen mit festgelegtem pH-Gradienten)
IRAP	*Insulin-regulated Aminopeptidase*
IRAP	Insulin-regulierende Aminopeptidasen
KDa	Kilodalton
M	Molar
mA	Miliampere
MALDI	*Matrix assisted Laser Desorption/Ionisation*
Mas	*Mas-Rezeptor*
MG	Molekulargewicht
M-MLV-RTase	*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*
MS	Massenspektrometrie
MYG1	Melanocyte proliferating gene 1
n	Anzahl
NCEP ATP III	Nationale Centers für Environmental Prediction – Adult Treatment Panel III
NEP	Neutral-Endopeptidase = Membran Metallo Endopeptidase (EC 3.4.24.11)
ns	Nicht signifikant
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	*Phosphate buffered saline*
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEP	Prolyl-Endopeptidase
pI	Isoelektrischer Punkt
PPP	Protein-Probenpuffer
RH	Rehydratisierungspuffer für DIGE-Gele
RHB	Rehydratisierungspuffer
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies / *reactive oxygen species*
rpm	*Revolutions per minute* (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	*Sodium dodecyl sulfate* (Natriumdodecylsulfat)
SGP	Sammelgelpuffer
SMB	*Small Molecule Biochemistry* (IPA-Analyse)
Strep	Streptomycin
TBS	*Tris Buffered Saline* (Trisgepufferte Lösung)
TBST	*Tris Buffered Saline mit Tween*
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	*Transforming growth factor*
TGP	Trenngelpuffer

TOF	*Time of flight* (Flugzeit)
Tris	*Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan*
Tris-HCl	*2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol, Hydrochlorid*
TRXR1	Thioredoxin-Reduktase (Protein)
Tween 20	Polyethylenoxidsorbitanmonolaurat
TXNRD1	Thioredoxin-Reduktase (Gen)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UT	Harnstoff-Thioharnstoff
WHO	Weltgesundheitsorganisation
σ	Standardabweichung

1 Einleitung

In dieser Arbeit werden die Auswirkungen des Zustands von Hyperglykämie und erhöhten Fettwerten auf pankreatische β-Zellen der BRIN-BD11 Zellline genauer untersucht. Damit werden zwei der definierten Risikofaktoren des Metabolischen Syndroms betrachtet.

1.1 Das Metabolische Syndrom

Das Metabolische Syndrom definiert sich über das Zusammentreffen entscheidender Risikofaktoren für Kardiovaskuläre-Erkrankungen und umfasst Abdominales Übergewicht, Diabetes oder seine Vorstufen, Bluthochdruck und erhöhte Blutfettwerte.

Nach Angaben der International Diabetes Federation (IDF) erkranken Personen mit Metabolischem Syndrom im Vergleich zu Personen ohne Metabolischem Syndrom dreifach so häufig an einem Herzinfarkt oder Schlaganfall. Diese Gruppe der Erkrankten ist des Weiteren durch eine doppelt so hohe Mortalitätsrate gekennzeichnet. Jeder vierte Erwachsene auf der Welt leidet an dieser Zivilisationskrankheit (International Diabetes Federation, 2013).

Es existieren drei verschiedene Diagnosedefinitionen für das Metabolische Syndrom. In Deutschland wird vornämlich die Definition der IDF verwendet, welche das Übergewicht als Hauptkriterium ansieht, neben dem noch mindestens zwei der Nebenkriterien vorliegen müssen. Daneben besagt die Definition des *National Cholesterol Education Program – Third Adult Treatment Panel* (NCEP ATP III), dass ein Metabolisches Syndrom vorliegt, sobald drei der fünf definierten Kriterien erfüllt sind (Grundy, Brewer, Cleeman, Smith, & Lenfant, 2004). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat in ihrer Definition die Insulinresistenz als Hauptkriterium festgelegt und in den Nebenkriterien andere Grenzwerte definiert sowie die Nierenfunktion zusätzlich als mögliches Kriterium aufgenommen. Die jeweiligen Kriterien sind in Tabelle 1 gegenübergestellt. Weiterhin ist hinlänglich bekannt, dass sich die Variablen des Metabolischen Syndroms gegenseitig beeinflussen. Langanhaltende Hyperglykämie bzw. hyperkalorische Ernährung führt unter anderem zu einer Vermehrung des Fettgewebes. Die Fettleibigkeit erhöht wiederum die Wahrscheinlichkeit für das erstmalige Auftreten oder eine Verschlechterung einer breits existiernden peripheren Insulinresistenz (H. G. Joost, Giesen, Kluge, Ortlepp, & Plum, 2000). Von McGarry (2002) ist zudem festgestellt worden, dass eine Insulinresistenz zu einer Veränderung des Gleichgewichtes zwischen Lipolyse und Antilipolyse führt, die in eine erhöhte Plasmakonzentration von freien Fettsäuren mündet. Dass ein Gewichtsverlust von einem Kilogramm Körpergewicht einen Blutdruckabfall von 1,05 mmHg systolisch und 0,92 mmHg diastolisch bewirkt, wird in der Metaanalyse von Neter, Stam, Kok, Grobbee, & Geleijnse

(2003) gezeigt und damit die Interaktion zwischen Übergewicht und arteriellem Hypertonus belegt. Außerdem ist bei Yuan, Li, Li, Li, & Cheng (2010) nachzulesen, dass Ratten unter Gabe von Hoch-Fett-Diät, einen 1,19-fach erhöhten Nüchtern-Plasmainsulin-Spiegel zeigten und dass sich bei diesen Tieren die Kurve der Insulinfreisetzung veränderte. Die Behandlung der Fett-stimulierten Ratten mit Telmisartan (Angiotensin II Typ 1 Rezeptor-Blocker) bzw. Perindopril (ACE-Hemmer) konnte zu einer Verbesserung der Werte führen, jedoch nicht die Normalwerte der Kontrollgruppe erreichen. Über welche molekularen Mechanismen genau Fettleibigkeit, Bluthochdruck, Hyperglykämie und erhöhte Blutfettwerte auf die Zellen des Körpers wirken und in diesen pathologische Zustände hervorrufen, ist nach wie vor Gegenstand der aktuellen Forschung. Parallel entwickelten am gleichen Institut andere Wissenschaftler nachstehende Grafik (Abbildung 1) zur Veranschaulichung der möglichen Interaktion des metabolischen Syndroms mit reaktiven Sauerstoffspezies und Angiotensin.

Tabelle 1: Kriterien zur Definition des Metabolischen Syndroms

	Definition der		
	IDF	**NCEP ATP III**	**WHO**
Hauptkriterium	Übergewicht BMI > 30 kg/m² */oder* Taillenumfang Männer ≥ 94 cm Frauen ≥ 80 cm (Angaben für Europäer)		Insulinresistenz Typ 2 Diabetes mellitus oder pathologische Nüchtern-Blutzucker-Werte oder gestörte Glucose-Toleranz oder Insulinresistenz
	Plus zwei weitere der folgenden Kriterien:	Vorliegen von 3 der folgenden Kriterien	Plus zwei weitere der folgenden Kriterien:
Triglyceride	≥ 1,7 mmol/L *oder* bestehende spezifische Therapie	≥ 1,7 mmol/L *oder* bestehende spezifische Therapie	≥ 1,7 mmol/L *oder* bestehende spezifische Therapie
HDL-Cholesterin	Männer < 1,04 mmol/L Frauen < 1,29 mmol/L *oder* bestehende spezifische Therapie	Männer < 2,22 mmol/l Frauen < 2,77 mmol/l *oder* bestehende spezifische Therapie	Männer < 0,9 mmol/L Frauen < 1,0 mmol/L *oder* bestehende spezifische Therapie
Blutdruck	Systolisch ≥ 130 mmHg Diastolisch ≥ 85 mmHg *oder* bestehende antihypertensive Therapie	Systolisch ≥ 130 mmHg Diastolisch ≥ 85 mmHg *oder* bestehende antihypertensive Therapie	Systolisch ≥ 140 mmHg Diastolisch ≥ 90 mmHg *oder* bestehende antihypertensive Therapie
Nüchtern-glucose	≥ 5,6 mmol/L *oder* bekannter Typ 2 Diabetes mellitus	≥ 5,55 mmol/l *oder* bekannter Typ 2 Diabetes mellitus	*siehe Hauptkriterium*
Übergewicht	*siehe Hauptkriterium*	Taillenumfang: Männer > 102 cm Frauen > 88 cm	BMI > 30 kg/m² *und /oder* Taillen-Hüftumfang-Quotient: Männer > 0,9 Frauen > 0,85
Nierenfunktion			Albumin im Urin ≥ 20 µg/min *oder* Albumin/Kreatinin Verhältnis ≥ 30 mg/g

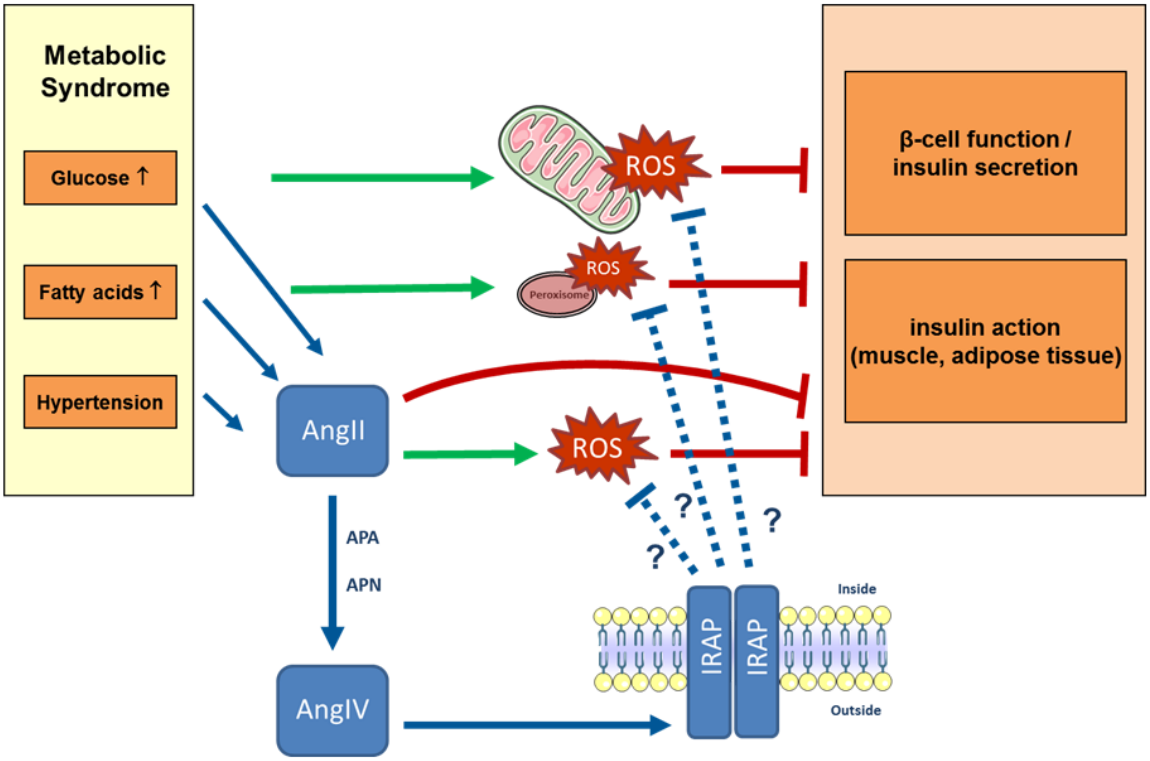


Abbildung 1: Interaktionen zwischen erhöhtem Blutdruck, Glucose-, Fettsäure-Konzentrationen und der Insulinwirkung

„Oxidativer Stress“ und reaktive Sauerstoffspezies

Wie in der Abbildung 1 ersichtlich, stellen die reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) einen zentralen Punkt dar. ROS kann „oxidativen Stress“, welcher ein entscheidender Mediator von Zellschäden ist, hervorrufen. ROS entstehen durch die Reduktion des Sauerstoffmoleküls oder durch Oxidation von Wasser, indem Superoxidanionen, Hydrogenperoxide oder Hydroxylradikale gebildet werden. Reaktive Sauerstoffspezies kommen auch unter physiologischen Bedingungen vor, da sie unter anderem für die Gentranskription und Mitochondrienfunktion notwendig sind. Die Gefahr zu hoher ROS-Level besteht in der Schädigung von verschiedenen Biomolekülen, wie etwa der DNA, Lipiden und Proteinen (Du, Zhang, Lu, & Holmgren, 2012) sowie der Funktionsminderung von Enzymen (Stadtman & Berlett, 1998). Des Weiteren ist bekannt, dass „oxidativer Stress“ verschiedene Signalkaskaden aktivieren kann, zum Beispiel den NF-κB, den JNK/SAPK oder den p38 MAPK-Signalweg (Rains & Jain, 2011). Ein Hauptteil der reaktiven Sauerstoffspezies wird im Mitochondrium durch die NADPH-Oxidase gebildet (Brownlee, 2001). Bei dauerhaft erhöhten Glucosekonzentrationen kann ROS zusätzlich aus folgenden Stoffwechselwegen entstehen: Glykolyse, oxidative-Phosphorylierung,

Methylglyoxal-Formierung, Glykosylierung, α-Ketoaldehyd-Formierung, Diacylglycerol-Bildung, Protein-Kinase C-Aktivierung, Glukosamin-Bildung, Hexosamin- und Sorbitol-Metabolismus (Valko et al., 2007). Pi et al. (2007) sind der Annahme, dass geringe physiologische, im Glucosemetabolismus entstandene, Mengen an H_2O_2 die Sekretion von Insulin anregen und damit die Glucose-Aufnahme stimulieren. Hohe Konzentrationen an ROS gehen im Gegensatz dazu mit einer Zerstörung des Signalweges und daher mit hohen Blut-Glucose-Konzentrationen einher, vergleiche Pitocco et al. (2010). Die negativen Effekte, die ROS auf die Insulinsensibilität der Zelle hervorrufen, können mittels Antioxidantien wie α-Liponsäure oder Tempol gehemmt werden. Dies ist anhand von normalisierten Blutglucosetoleranz-Werten und verbesserten Glucose-Transporten belegt worden (Wei et al. 2006). Interessant ist die Beobachtung von Maris et al. (2011), dass reaktive Sauerstoffspezies unter der alleinigen Behandlung mit freien Fettsäuren (Oleate) abnehmen, wohin gegen die kombinierte Stimulation (Glucose + Oleaten) zu einem Anstieg der ROS-Konzentrationen führt. Pankreatische Inselzellen scheinen besonders sensitiv gegenüber „oxidativem Stress“ zu sein, da sie nur wenig antioxidative Enzyme exprimieren (Robertson, 2006). Dementsprechend kann es frühzeitig zu einem Ungleichgewicht zwischen Reduktionen und Oxidationen kommen. Dass mitochondrale Dysfunktionen im Pankreas durch „oxidativen Stress“ hervorgerufen werden und diese mit Insulinresistenzen und Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert sind, beschreiben Kim, Wei, & Sowers (2008) in ihrem Review.

Hyperlipidämie – Lipotoxizität

„Hyperlipidämien sind Störungen des Lipidstoffwechsels, die zu einer messbaren Vermehrung der Lipidkomponenten im Blut führen“ (Stallmach, Th.; Klöppel, G.; Roth, J.; Spinas, 2008, Seite 1138).

Dass eine große Anzahl von Enzymen, die an dem Fettsäurestoffwechsel beteiligt sind, in menschlicher Pankreaszellen vorkommen, wurde von Metz et al. (2006) in seiner Proteomanalyse nachgewiesen. In den Studien von Opara, Garfinkel, Hubbard, Burch, & Akwari, 1994 und Stein et al. (1997) wurde gezeigt, dass der Einfluss von Fettsäuren auf die Glucose-induzierte Insulinfreisetzung mit der Länge der Fettsäure steigt und mit dem Grad der ungesättigten Bindungen sinkt.

Auf der einen Seite braucht die Inselzelle Fettsäuren, um Glucose-stimuliert Insulin sekretieren zu können, wie Boden, Chen, & Iqbal (1998) nachwiesen. Auf der anderen Seite zeigen diverse Studien, dass erhöhte Fettsäurekonzentrationen gestörte Glucose-stimulierte Insulinsekretion hervorrufen, sowie eine reduzierte Genexpression von Insulin bedingen (Biden, Robinson, Cordery, Hughes, & Busch, 2004; Lupi et al., 2002; Maedler et al., 2001; Maedler, Oberholzer, Bucher, Spinas, & Donath, 2003; Paolisso et al., 1995; Poitout et al.,

2006; Unger & Zhou, 2001; Y. Zhou & Grill, 1995). Weiterhin beschreiben Bollheimer, Skelly, Chester, McGarry, & Rhodes (1998), dass erhöhte Fettsäurekonzentrationen eine basale Übersekretion von Insulin hervorrufen können. Diese wird durch die Beobachtung, dass das Verhältnis von Proinsulin zu Insulin unter erhöhten Fettkonzentrationen ansteigt, untermauert (Furukawa, Carroll, Swift, & Steiner 1999; Prentki & Nolan, 2006). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass Palmitate die Fähigkeit besitzt, die Aktivität des PDX-1-Gens zu hemmen (Hagman, Hays, Parazzoli, & Poitout, 2006; Manco, Calvani, 2004; Yoshikawa et al., 2001) und dass diese Abnahme der Expression des PDX-1-Gens zu einer gesteigerten β-Zell-Apoptose führt (Johnson et al., 2006).

Des Weiteren ist bekannt, dass ER-Stressoren, wie zum Beispiel CHOP, in β-Zellen durch Palmitate aktiviert werden (Araki, Oyadomari, & Mori, 2003; Kharroubi et al., 2004; Y. P. Zhou et al., 1998). Dieser Palmitate induzierter ER-Stress bewirkte eine signifikante Verminderung des Enzyms Carboxypeptidase E (CBPE, EC 3.4.17.10), das unter anderem an der Entstehung von Insulin beteiligt ist (Jeffrey et al., 2008). Dass CBPE für die Funktionsfähigkeit der β-Zelle bedeutsam ist, wird an Hand von Carboxypeptidase E-Gen (CPE)-Knockout-Mäusen, die einen diabetischen und übergewichtigen Phänotyp aufweisen, belegt (Naggert JK, Fricker LD, Varlamov O, Nishina PM, Rouille Y, Steiner DF, Carroll RJ, Paigen BJ, 1995; Shen & Loh, 1997). Zusätzlich zeigte Jeffrey et al. (2008), dass CPE-Mangel-Mäuse, die mit Palmitaten gefüttert werden, eine fehlerhafte Glucose-stimulierte Insulinsekretion und eine Hyperproinsulinämie entwickeln. Zudem führt der Abbau von CPE in MIN6 Zellen zu ER-Stress und β-Zellen-Tod (Jeffrey et al., 2008).

Hyperglykämie -Glukotoxizität

Beim Menschen liegt eine Hyperglykämie im Sinne eines Diabetes mellitus vor, wenn der Nüchternblutzucker größer/gleich 7,0 mmol/l ist (Greten, Rinninger, & Greten, 2010, Seite 664). Eine gestörte Glucosetoleranz existiert bereits bei Nüchternblutzuckerwerten größer/gleich 5,6 mmol/l (Greten, Rinninger, & Greten, 2010, Seite 664). Bei hohen Glucosekonzentrationen kommt es zur Überproduktion von Superoxiden in den Mitochondrien (Pop-Busui, Sima, & Stevens, 2006). Dadurch wird ein Überschuss an reaktiven Sauerstoffspezies begünstigt, der zu einer Steigerung des „oxidativen Stresses“ in der Zelle führt (Vincent, Russell, Low, & Feldman, 2004).

Bei den Ursachen der Glukotoxizität unterscheidet Brownlee (2001) vier Komponenten: die vermehrte Nutzung der Polyol- und Hexosamine-Wege, die nicht enzymatische Proteinglykosylierung sowie die Aktivierung der Proteinkinase C.

Der Polyol-Weg

Die extrahepatische Bildung von Fruktose aus Glucose erfolgt über den Polyol-Weg. Dafür wird Glucose unter Verbrauch von $NADPH/H^+$ von der Aldolasereduktase zu Sorbitol reduziert. Sorbitol wird in einem zweiten Schritt durch die Sorbitoldehydrogenase NAD^+-abhängig zu Fruktose oxidiert. Die Aldolasereduktase hat eine geringe Affinität für Glucose, weshalb der Polyolweg im nicht-diabetischen Organismus eine untergeordnete Rolle spielt (Heinrich, Müller, & Graeve, 2014, Seite 188,189). Unter Hoch-Glucose Bedingungen wird jedoch vermehrt Glucose über den Polyol-Weg verstoffwechselt (Brownlee, 2001). Dies bringt einen gesteigerten Verbrauch von $NADPH/H^+$ mit sich, was für den Selbstschutz der Zelle nachteilig ist, da diese für die Reduktion von Glutathion ebenfalls $NADPH/H^+$ benötigt (A. Y. W. Lee & Chung, 1999).

Hexosamin Signalweg

Mittels des Hexosamin-Signalweges entsteht aus Fruktose-6-Phosphat und Glutamin mit Hilfe des Enzyms Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Amidotransferase (GFAT) Glucosamin-6-Phosphat. Aus Glucosamin-6-Phosphat wird unter Verbrauch von Acetyl-CoA und UTP UDP-N-Acetylglucosamin gebildet (Heinrich et al., 2014, Seite 456), welches für die Synthese von Proteoglykanen oder Glykoproteinen benötigt wird (Brownlee, 2001).

Durch Hemmung des Schlüsselenzymes GFAT konnte eine Abnahme der Transkription von TGF-α, TGF-β1 und PAI-1 bewirkt werden (Brownlee, 2001). *Transforming growth factors* (TGFs) sind wichtig für die Differenzierung von Zellen und Geweben und unter hyperglykämischen Bedingungen konnte eine vermehrte Bildung von TGF-α, TGF-β1 und PAI-1 belegt werden (Hawkins et al., 1997; Kolm-Litty, Sauer, Nerlich, Lehmann, & Schleicher, 1998; Marshall, Bacote, & Traxinger, 1991).

Nicht enzymatische Proteinglykosylierung

Ein weiteres Resultat von langanhaltenden hyperglykämischen Bedingungen ist die nicht-enzymatische Proteinglykosylierung. Diese tritt zwischen reduzierenden Kohlenhydraten und einer terminalen- oder einer α-Aminogruppe in Lysin-, Guanidin- oder Arginresten auf. Durch die Glykosylierung wird die Struktur der Proteine gravierend verändert und ihre Funktion eingeschränkt; es entstehen *advanced glycation end products* (AGE) (Brunner, Schvartz, Priego-Capote, Couté & Sanchez, 2009). Bei diabetischen Stoffwechsellagen kann es zur Autooxidation von Glucose kommen. Dabei entstehen reaktive Carbonyl-Zwischenprodukte wie etwa Glyoxal und Methylglyoxal, die ebenfalls *advanced glycation end products* (AGE) verursachen (Brownlee, 2001).

AGE-Produkte können mit metabolischen Enzymen interagieren (Ulrich & Cerami, 2001) und den RAGE-Zelloberflächenrezeptor aktivieren (Rains & Jain, 2011), wodurch die NADPH-

Oxidase aktiviert wird und es damit zur ROS Produktion kommt. Die reaktiven Sauerstoffspezies führen zur Aktivierung des NF-κB-Signalweges, was unter anderem pathologische Veränderungen in der Genexpression bewirkt (Brownlee, 2001).
Überdies schreiben Ulrich & Cerami (2001) der AGE-Bildung Veränderungen im Aufbau und den Funktionen von Strukturproteinen wie Collagen, Fibronektin, Tubulin oder Aktin zu.

Aktivierung der Proteinkinase C

Zudem führt eine diabetische Stoffwechsellage über eine vermehrte Freisetzung von Diacylglycerin (DAG) zur Aktivierung der Proteinkinase C, welche mit den α- und δ-Untereinheiten die NADPH-Oxidase aktiviert und damit die Bildung von ROS im Mitochondrium fördert (Brownlee, 2001). Kuboki et al. (2000) berichten, dass die Proteinkinase C zu einer verminderten Expression der endothelialen NO-Synthase und damit zu Gefäßschädigungen führt. Brunner et al. (2009) beschreiben, dass die Proteinkinase C im Gefäßendothel auch das Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) aktiviert.

1.2 Insulin, Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 Entstehung

Insulin - Synthese, Wirkungen, Abbau

Wei et al., bezeichnete 2006 die verminderte Antwort von Zielstrukturen auf ihr Hormon Insulin als Kennzeichen für das Metabolische Syndrom.
Insulin ist ein anaboles, endokrines Hormon, das in der Bauchspeicheldrüse gebildet wird. Die Bauchspeicheldrüse (Pankreas) ist ein unpaares, retroperitoneales Organ, das sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu Magen, Milz, Leber und Zwölffingerdarm befindet. Das Pankreas ist sowohl eine exokrine, als auch eine endokrine Drüse. Die exokrinen Drüsenzellen liegen in Läppchen zusammen und sezernieren Verdauungsenzyme in die Azini (Drüsengänge). Die endokrinen Zellen liegen, umgeben von exokrinem Pankreas, in Langerhans'schen Inseln zusammen, die sich über das gesamte Pankreas erstrecken. Zu den endokrinen Zellen werden die α-Zellen (ca. 20% der Inselzellen, verantwortlich für die Glucagonbiosynthese), β-Zellen (ca. 70-80% der Inselzellen, produzieren Insulin), δ-Zellen (ca. 5% der Inselzellen, produzieren Somatostatin) sowie die PP-Zellen (ca. 2% der Inselzellen, bilden Pankreatisches Polypeptid) gezählt (Lüllmann-Rauch, 2015, Seite 458).
Erwähnenswert ist, dass das arterielle Blut zuerst die β-Zellen erreicht und erst danach die anderen Zelltypen. Dadurch wird eine schnelle, humorale Antwort auf Änderungen in der Blut-Glucosekonzentration gewährleistet (Heinrich, Müller, & Graeve, 2014, Seite 443).

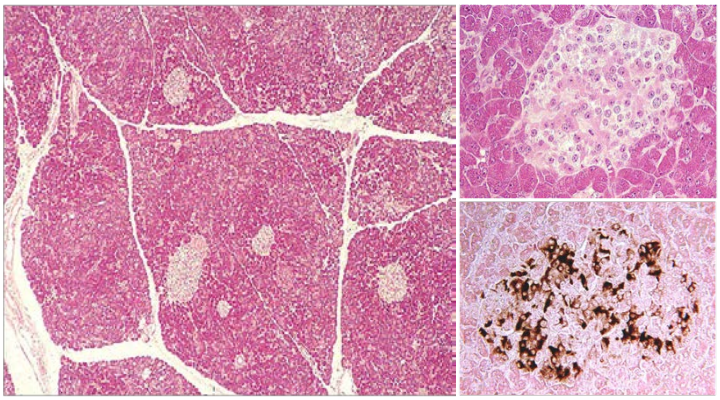


Abbildung 2: Histologische Bilder des Pankreas

links: Exokriner Pankreas mit Inseln HE.

rechts oben: Langerhans‘sche Insel HE.

rechts unten: Langerhans‘sche Insel, Glucose immunochemisch angefärbt.

Aus den Online Kurspräparaten der mikroskopische Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover (Medizinische Hochschule Hannover, 2012)

Das Insulingen des Menschen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 kodiert und enthält zwei Introns. Als translatiertes Produkt entsteht das 11,5 kDa große Prä-Pro-Insulin. Dieses besteht vom N- zum C-Terminus aus einer Signalsequenz mit 24 Aminosäuren (AS), der B-Kette, dem 35 AS langen C-Peptid und der A-Kette. Im Lumen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (rER) erfolgt die weitere Prozessierung zum 9 kDa großen Pro-Insulin. Dieses wird zum Golgi Apparat transportiert, wo spezifische Proteasen das C-Peptid entfernen und eine Carboxypeptidase E die B-Kette um 2 Argininreste am C-Terminus verkürzt. Insulin wird nach der Biosynthese in Sekretgranula gespeichert (Heinrich et al., 2014, Seite 443).

Zu den schnellen Wirkungen von Insulin zählen seine Effekte auf die Skelettmuskelzellen, das Fettgewebe und die Leber. Insulin führt zu einer vermehrten Translokation des GLUT4-Rezeptors in die Plasmamembran von Fett- und Skelettmuskelzellen. Dadurch kommt es zu einer erleichterten Diffusion von Glucose in Zellen, was einen Abfall der Blutglucosekonzentration mit sich bringt. In Skelettmuskelzellen steigert Insulin die Glycogensynthese und Glycolyse. In Fettzellen bewirkt Insulin eine vermehrte Triacylglycerinsynthese sowie den Glucoseabbau über den Hexosemonophosphatweg, aus dem NADPH/H+ erzeugt wird. Der in den Mitochondrien lokalisierte Pyruvatdehydrogenase-Komplex wird durch Insulin aktiviert und kann damit vermehrt Acetyl-CoA für die Fettsäurebiosynthese generieren. Insulin ist zudem in der Lage, über die Aktivierung einer Phosphodiesterase die cAMP-Konzentration zu senken. Damit können über die Aktivität der Adenylatzyklase katabole Enzyme gehemmt werden. Im Fettgewebe wird ein antilipolytischer Effekt beobachtet. In der Leber wird die Gluconeogenese gehemmt, die Glycolyse und Glycogensynthese stimuliert. Zusätzlich wird durch Insulin die Ketonkörperproduktion in der Leber gehemmt (Heinrich et al., 2014, Seite 447-448).

Zu den nach Stunden oder Tagen eintretenden Reaktionen zählen die Wirkungen auf Wachstumshormone, auf die Transkription von Genen sowie die Förderung der Proteinbiosynthese (Heinrich et al., 2014, Seite 447-448).

Der Abbau von Insulin erfolgt über sehr aktive, enzymatische Systeme in der Leber und Niere. Die Glutathion-Insulin-Transhydrogenase katalysiert die reduktive Spaltung der Disulfidbrücken zwischen der A- und B-Kette. Die dadurch isolierten Ketten werden anschließend proteolytisch abgebaut. In Insulin-empfindlichen Geweben können die Zellen den gesamten Insulin-Insulinrezeptor-Komplex internalisieren und mit lysosomalen Enzymen abbauen.
Durch die Summe der genannten Mechanismen ergibt sich für Insulin eine Halbwertszeit im Serum von 7 – 15 Minuten (Heinrich et al., 2014, Seite 447).

Insulinregulation und molekularer Mechanismus der Sekretion

Bei Eintreffen eines sekretorischen Reizes erfolgt unter Beteiligung des mikrotubulären Systems der Granulatransport an die Membranoberfläche der β-Zellen. Die Sekretgranula werden mittels regulierter Exozytose in den perikapillären Raum entleert.
Ein adäquater Reiz zur Insulinsekretion liegt ab einer Glucosekonzentration von zwei bis drei Millimol pro Liter vor. Die Insulinsekretion nimmt proportional zur steigenden Glucosekonzentration bis zu einem Schwellenwert von 15 mM Blutglucose zu. Dadurch ist die Dosis-abhängige Insulinfreisetzung und der damit verbundene Anstieg der Insulinkonzentration im peripheren Blut unter physiologischen Bedingungen stets gewährleistet (Heinrich et al., 2014, Seite 445). Bei einer akuten, kurzzeitigen Stimulation der Betazelle mit hohen Glucose- und hohen Fett-Konzentrationen kommt es zu einem erheblichen Anstieg der Insulinsekretion. Im Unterschied dazu führt eine chronische Exposition mit diesen Stimulanzien zu einer Desensibilisierung und Unterdrückung der Insulinsekretion (Maris et al., 2010; Yuan et al., 2013).
Somatostatin aus den benachbarten δ-Zellen sowie Noradrenalin und Adrenalin, über α2-Adrenorezeptoren wirkend, hemmen die Insulinsekretion (Heinrich et al., 2014, Seite 446).
Das Insulingen gehört zu einer Gruppe sehr schnell regulierter Gene („*immediate early genes*“). Der wirkungsvollste Regulator der Insulingenexpression ist Glucose. Innerhalb von 30 Minuten nach einem extrazellulären Hoch-Glucose-Reiz wird die mRNA des Prä-Pro-Insulins vermehrt synthetisiert. Diese schnelle Regulation zeigt sich als besonders sinnvoll, damit die intrazellulären Insulinvorräte schnell wieder aufgefüllt werden können. Gleichzeitig kann auch extrazelluläres Insulin die Insulinsynthese anregen, wohingegen längerfristige, hohe Glucosekonzentrationen die Insulinexpression hemmen (Heinrich et al., 2014, Seite 445).
Die β-Zelle verfügt über GLUT2-Transporter, um die Glucose aufnehmen zu können. In der Zelle wird die Glucose der Glykolyse zugeführt. Das aus der ablaufenden Glykolyse entstehende Adenosintriphosphat (ATP) hemmt den in der Zellmembran lokalisierten Kaliumkanal Kir6.1/SUR1. Dadurch kommt es zur Depolarisation der Zelle, die zur Öffnung

eines spannungsabhängigen Calciumkanales (L-Typ) führt. Durch den Calciumeinstrom steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration. Dieser Anstieg löst daraufhin die mikrotubuliassoziierte Exozytose der Insulingranula aus (Heinrich et al., 2014, Seite 445-446). Die Insulinkonzentration des Blutes schwankt beim stoffwechselgesunden Menschen zwischen 69-690 pM (Heinrich et al., 2014, Seite 447).

Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2

„[…] Diabetes mellitus beruht auf einer Störung der Insulinproduktion und/oder –wirkung mit nachfolgender Störung des Glucose- und Lipidstoffwechsels“ (Stallmach, Th.; Klöppel, G.; Roth, J.; Spinas, 2008, Seite 1135).

Chronische Hyperglykämie aktiviert im Endoplasmatischen Retikulum zwei ER-Stress-Antwort-Proteine: CHOP und GADD34 (Elouil et al., 2007), welche die Apoptose fördern (Hollander, Zhan, Bae, & Fornace, 1997; Ma & Hendershot, 2003; Zinszner et al., 1998). Für periphere Gewebe wie Leber, Skelettmuskeln und Fettzellen wurde bereits nachgewiesen, dass die Aktivierung von ER-Stress an der Entwicklung einer Insulinresistenz beteiligt ist (Gregor & Hotamisligil, 2007; Miller, Diaczok, & Cooke, 2007; Ozcan et al., 2004; Yki-Jarvinen & Makimattila, 1997). Durch die zunehmende Insulinresistenz wird in den peripheren Organen nur unzureichend Glucose aufgenommen, aus diesem Grund senden diese Signale zur Aktivierung der Gluconeogenese aus. Daraus resultiert eine Hyperglykämie im Blut, die bei Diabetikerin so hohe Glucosekonzentrationen aufweisen kann, dass es zu glukotoxischen Effekten kommt.

Zu Beginn einer peripheren Insulinresistenz werden die Inselzellen ständig zur Insulinsynthese und -ausschüttung angeregt. Dieser Dauerstress sowie das glukotoxische Milieu schädigen die β-Zellen und münden in einer gesteigerten Apoptoserate. Dies kann bei ständigem Auftreten zu einem Diabetes mellitus Typ 2 führen. Dubois et al. (2007) zeigten, dass diverse Proteine, die an der Regulation der Insulinsekretion beteiligt sind, bei langzeitiger Hyperglykämie vermindert exprimiert werden.

Der Diabetes mellitus gehört in den westlichen Ländern zu den häufigsten Erkrankungen. Im Jahr 2014 hatten weltweit 386,7 Millionen Menschen Diabetes, bis 2035 werden es voraussichtlich 592 Millionen sein (International Diabetes Federation, 2014). Diabetes mellitus verursacht weltweit Kosten von 548 Billionen US Dollar in Jahr, was 11% der gesamten Gesundheitssystemausgaben ausmacht (International Diabetes Federation: Diabetes Atlas sixth edition, 2013). Am Diabetes und seinen Folgen sterben jedes Jahr 4,9 Millionen Menschen, womit statistisch weltweit alle 7 Sekunden ein Mensch an den Folgen von Diabetes stirbt (International Diabetes Federation, 2014). Die Inzidenzrate der älteren deutschen Bevölkerung (55-74 Jahre) wurde für 2011 auf 270.000 Neuerkrankungen

pro Jahr bestimmt (Meisinger et al., 2010). Die Prävalenz des Diabetes mellitus in Deutschland lag im Jahr 1998 bei 5,9 Prozent und ist seitdem kontinuierlich gestiegen - auf 8,9 Prozent im Jahr 2007 (H. Joost, Pollack, Reuter, & Schnellbächer, 2011) und auf 11,95% im Jahr 2013 (International Diabetes Federation: Diabetes Atlas sixth edition, 2013).

An Hand der Ätiologie schlägt die American Diabetes Association (2010) folgende Klassifikation des Diabetes vor: Typ-1-Diabetes mellitus, ausgehend von einer β-Zell-Zerstörung durch idiopathische oder immunologische Ursachen. Typ-2-Diabetes mellitus, bei dem eine Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis hin zu einem Insulinsekretionsdefekt mit Insulinresistenz vorliegen kann. Als dritte Gruppe werden weiter spezifische Typen genannt. Darunter fallen unter anderem genetische Defekte z.B. auf den Chromosomen 7, 12, 20, die eine funktionelle Beeinträchtigung der β-Zelle bedingen oder Pankreaserkrankungen wie etwa die zystische Fibrose oder die chronische Pankreatitis. Aber auch Infektionen, Medikamente oder Endokrinopathien wie das Phäochomozytom können einen Diabetes mellitus hervorrufen. Als letzte Gruppe wird der Schwangerschaftsdiabetes genannt.
Das Krankheitsbild des Diabetes mellitus bringt eine Reihe von Komplikationen und Folgeerkrankungen mit sich. So ist beispielhaft bekannt, dass die Hyperglykämie zu diabetischen Nephropathien führt oder dass durch die Insulinresistenz bedingte Dyslipidämie, Endotheldysfunktion und Störungen des Gerinnungssystems eine wichtige Rolle in der Entstehung von Makroangiopathien spielen (Stallmach, Th.; Klöppel, G.; Roth, J.; Spinas, 2008).
Diese Fakten zeigen, wie wichtig eine detailiere Aufklärung der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2 und die Entstehung seiner Folgeerkrankung ist.

1.3 Renin-Angiotensin Sytem (RAS)

Lokale RAS-Systeme gewannen hinsichtlich der Beeinflussung von Diabetes mellitus, Adipositas, Bluthochdruck und erhöhten Blutfettwerten – also den Schlüsselerkrankungen des Metabolischen Syndroms – in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung.
Dass das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System unter verschiedenen Situationen wie etwa Übergewicht, Hyperglykämie, dem Bluthochdruck, einer Nierenarterienstenose oder einem kongestiven Herzfehler aktiviert ist, zeigten Luther & Brown (2011) und Skov et al. (2014). Tahmasebi, Puddefoot, Inwang, & Vinson wiesen bereits 1999 nach, dass sich in menschlichen β-Zellen sowie in Endothelzellen des insulären Gefäßsystems (Pro)renin und AT1-Rezeptoren befinden. In den für diese Forschungsarbeit verwendeten BRIN-BD11 Zellen werden wichtige Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems ebenso exprimiert (Härdtner et al., 2013). Nachgewiesen wurden: *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE),

Angiotensin II Type 1b Receptor (AT1bR), *Angiotensin II Type 2 Receptor* (AT2R), *Aminopeptidase A* (APA), *Aminopeptidase N* (APN), *Angiotensin IV* (Ang IV), *Insulin-regulated Aminopeptidase* (IRAP), *Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2), Angiotensin-Peptide 1-7* (Ang (1-7)) und der *Mas-Rezeptor* (Mas).
Nach kurzer Hoch-Glucose-Stimulation wurde in den Achsen ACE/Ang (1-7)/Mas und der APA-APN-IRAP eine Vermehrung der mRNA, Protein-Level und Enzymaktivität registriert, wohingegen die Elemente des klassischen RAS (Ang II, AT1R, AT2R) unter Hoch-Glucose weitgehend unverändert blieben (Härdtner et al., 2013).
In der Literatur wird ein Zusammenhang des Metabolischen Syndroms mit erhöhtem Plasmaspiegel von Angiotensin II (Ang II) beschrieben (Skov, Persson, Frøkiær, & Christiansen, 2014). Dass eine medikamentöse Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf Angiotensin II Ebene eine Reduktion des Auftretens von Diabetes mellitus Typ 2 bei Bluthochdruckpatienten bedingt, konnte in verschiedenen Studien bestätigt werden, wie Scheen (2004) im Review zusammenfasst.
Leung (2010) nennt Vorgänge auf zellulärer Ebene wie etwa Apoptose und ROS-Bildung sowie Blutfluss, Entzündung, Fibrose, Zellproliferation und Hormonsekretion als potenziell durch das lokale Pankreas-Renin-Angiotensin-System beeinflussbar.

Das klassische Renin-Angiotensin System (RAS) ist in der Niere lokalisiert und für die Steuerung des Blutdrucks und des Elektrolythaushaltes auf endokrinem Weg zuständig. Die Ausschüttung von Renin aus der Niere führt zu einer Spaltung von Angiotensinogen zu Angiotensin I. Dieses kann durch das *Angiotensin-converting enzyme (ACE)* zu Angiotensin II umgewandelt werden. Angiotensin II wirkt über den AT1-Rezeptor vasokonstriktiv oder über den AT2-Rezeptor vasodilatativ, Abbildung 3 (eingerahmter Teil).

Das erweiterte Renin-Angiotensin System baut auf dem zuvor beschriebenen Renin-Angiotensin System auf und ergänzt es um neu entdeckte Peptide und Rezeptoren wie etwa die *Angiotensin-converting enzyme2 – Angiotensin-(1-7) – Mas Achse*. Zudem wurde mittlerweile nachgewiesen, dass auch Chymase und Cathepsin A in der Lage sind, Angiotensin I zu Angiotensin II zu spalten. Desweiteren können Cathepsin G, Tonin und die Proteinkinase 3 zusammen mit dem *tissue plasminogen activator* Angiotensinogen direkt zu Angiotensin II spalten. Das momentane Verständnis des Renin-Angiotensin Systems, welches von der Forschung auch in der Leber, dem Herzen, den Gefäßen und der Lunge nachgewiesen worden ist, ist in Abbildung 3 zusammen gestellt.

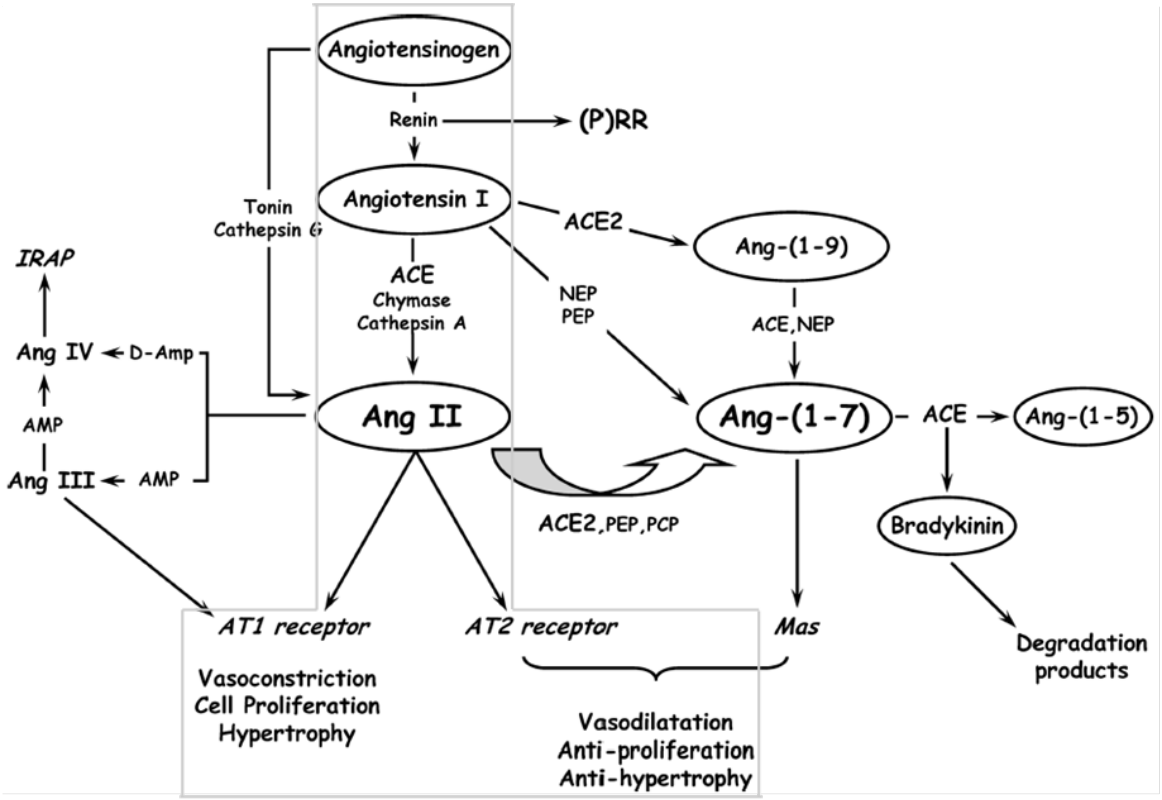


Abbildung 3: Aktuelles Verständnis des Renin–Angiotensin–Systems

In Anlehnung an die Abbildung von Santos, Ferreira, & Simões E Silva (2008)
ACE, angiotensin-converting enzyme; Ang, angiotensin; AMP, aminopeptidase; AT1, Ang II type 2 receptor; Mas, Ang(1–7) receptor Mas; D-Amp, dipeptidyl-aminopeptidase; IRAP, insulin-regulated aminopeptidase; PCP, prolyl-carboxypeptidase; PEP, prolyl-endopeptidase; NEP, neutralendopeptidase 24,11; (P)RR, Renin/prorenin receptor

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Ang-(1-7) sowohl aus Angiotensin I als auch aus Angiotensin II gebildet werden kann. Eine entscheidende Rolle kommt dabei dem *Angiotensin-converting enzyme2* (ACE2) zu. Dieses bindet hochaffin an Angiotensin II und spaltet aus seinem Substrat Angiotensin-(1-7). Ebenso können Prolyl-Endopeptidasen und Prolyl-Carboxypeptidasen aus Angiotensin II Ang-(1-7) bilden. ACE2 hat gleichzeitig Angiotensin I als Substrat, bindet dies jedoch mit 400-fach niedriger Affinität. Aus Angiotensin I kann unter zu Hilfenahme von ACE2 Angiotensin-(1-9) entstehen. Aus Ang-(1-9) kann unter Beteiligung der Enzyme ACE und/oder NEP wiederum Ang-(1-7) gebildet werden. Die neutrale Endopeptidase (NEP = Membran-Metallo-Endopeptidase) und die Prolyl-Endopeptidase (PEP) sind außerdem in der Lage, direkt aus Angiotensin I Ang-(1-7) zu erzeugen. Angiotensin-(1-7) agiert über den Mas-Rezeptor, der gemeinsam mit dem AT2 Rezeptor zu der protektiven RAS-Achse gehört (Villela D, Leonhardt J, Patel N, Joseph J, Kirsch S, Hallberg A, Unger T, Bader M, Santos RA, Sumners C, 2015). Das heißt, es kommt zu einer Vasodilatation, zu antiproliferativen und antihypertrophen Effekten. Es wird angenommen, dass zwischen den Mas- und AT2-Rezeptoren eine funktionale Interaktion stattfindet (Villela D, Leonhardt J, Patel N, Joseph J, Kirsch S, Hallberg A, Unger T, Bader M, Santos RA, Sumners C, 2015).

Angiotensin-(1-7) wird vom ACE zu Angiotensin-(1-5) abgebaut, von dem bisher keine biologische Wirkung bekannt ist.
Belegt ist, dass Angiotensin II zu Angiotensin III und Angiotensin IV umgebaut werden kann. Die Aminopeptidase A (APA) katalysiert die Bildung von Ang III, welches über den AT1-Rezeptor vasokonstriktorisch, zellproliferierend und hypertroph wirkt. Ang III kann aber auch über eine weitere Aminopeptidase, die APN, zu Ang IV umgebaut werden. Angiotensin IV, welches zusätzlich direkt über Dipeptidyl-Aminopeptidasen gebildet wird, hat wiederum einen Einfluss auf die Aktivität der Insulin-regulierten Aminopeptidase (IRAP) und wirkt natriuretisch sowie gefäßerweiternd (Albiston et al., 2001; Hamilton, Handa, Harding, & Wright, 2001; Handa et al., 1998). Zusammenfassend kann das erweiterte Renin-Angiotensin System als zwei-Funktions-System betrachtet werden, in welchem die vasokonstriktiven und proliferativen oder vasodilatativen und antiproliferativen Prozesse hauptsächlich durch die ACE-ACE2 Balance gesteuert wird (Santos et al., 2008).

1.4 BRIN-BD11 Zelllinie

Um die zellbiologischen und biochemischen Abläufe in β-Zellen genauer zu untersuchen, wurde die pankreatische β- Zell-Insulinomazellline, BRIN-BD11, für die Analysen ausgewählt. Sie wurde durch Elektrofusion von NEDH-Ratten-Inselzellen des New England Deaconess Hospitals mit RINm5F Zellen, die sich ursprünglich von NEDH Ratten-Insulinoma Zellen ableiten, gewonnen (McClenaghan et al., 1996).

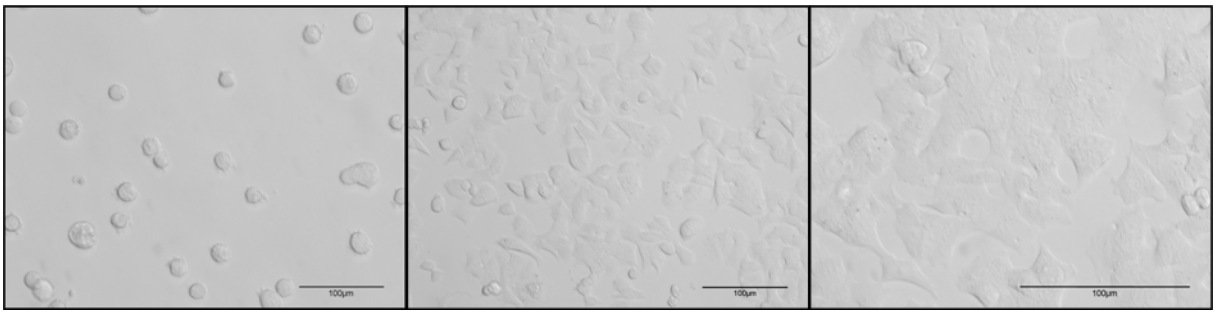


Abbildung 4: BRIN-BD11 Zellen

Links: frisch ausgesät, 200-fache Vergrößerung Mittig: lockerer Zellrasen, 200-fache Vergrößerung
Rechts: dichter Zellrasen, 400-fache Vergrößerung

BRIN-BD11 Zellen wachsen einlagig mit epitheloidem Charakter (siehe Abbildung 4). Das Zellwachstum folgt einer logarithmischen Kurve, sodass innerhalb der ersten 72 Stunden von einer Verdopplung der Zellzahl pro 24 Stunden ausgegangen werden kann, vergleiche Abbildung 5. Es wird empfohlen, 20 000 bis 40 000 Zellen pro Quadratzentimeter auszusäen (Health Protection Agency Culture Collections, 2011).

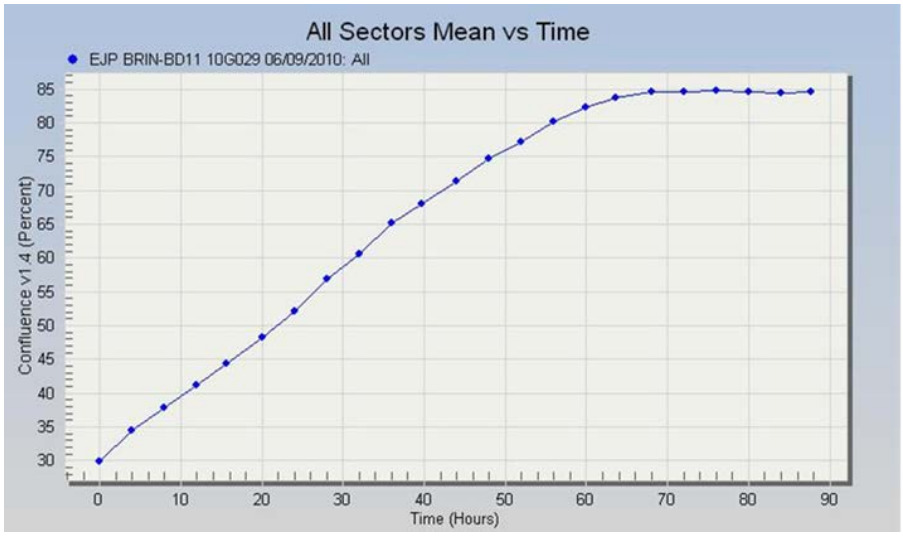


Abbildung 5: Wachstumskurve der BRIN-BD11 Zellen

(Health Protection Agency Culture Collections, 2011)

Die Zellen haben einen 58 Chromosomen umfassenden Karyotyp und wurden als bis über die 50. Passage hinaus stabil beschrieben (Health Protection Agency Culture Collections, 2011). McClenaghan et al. (1996) konnten eine dynamische Insulin-Ausschüttung bei einer Stimulation mit 16,7 mM Glucose aufzeigen, sowie eine 2 – 3-fach gesteigerte Insulinausschüttung bei Glucosekonzentrationen zwischen 4,2 – 16,7 mM, siehe Abbildung 6. Härdtner, Mörke, Walther, Wolke, & Lendeckel (2013) bestätigten in ihrer Arbeit die Glucose-Konzentration (11 – 25 mM) abhängige Insulin-Sekretion der BRIN-BD11 Zellen.

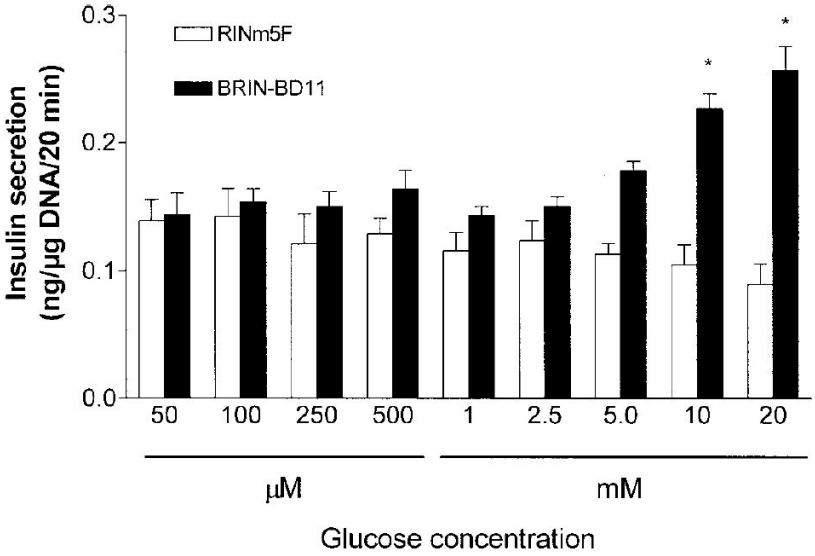


Abbildung 6: Glucoseinduzierte Insulinsekretion von BRIN-BD11 im Vergleich zu RINm5F Zellen.

*p<0,01 im Vergleich zu 50µM Glucose (McClenaghan, Elsner, Tiedge, & Lenzen, 1998)

Die Expression des GLUT2-Glucose-Transporters für BRIN-BD11 Zellen wurde von McClenaghan, Elsner, Tiedge, & Lenzen (1998) nachgewiesen. Ein weiteres Ergebnis ihrer

Forschung ist der Nachweis der Glukokinase-Aktivität in BRIN-BD11 Zellen sowie des Vorhandenseins von KIR6.2 (*ATP-sensitive K+-selective pore*) und SUR1 (*sulphonylurea-senistive-regulator of KIR6.2*), woraus der ATP-abhängige Kalium-Kanal der β-Zelle besteht. Zudem konnte in BRIN-BD11 Zellen ein relativer Anstieg der Expression von ACE2 unter Stimulation mit Glucose sowie ungesättigten Fettsäuren auf mRNA-Ebene in Experimenten am gleichen Institut gezeigt werden.

2 Zielstellung

In der Literatur gibt es diverse Hinweise darauf, dass dauerhaft hohe Konzentrationen an Glucose, Triglyzeriden oder Fettsäuren zu einer Steigerung des „oxidativen Stresses“, der Entzündungsmediatoren und schlussendlich zu einer vermehrten Apoptose führen (Luther & Brown, 2011; Saitoh, Hongwei, Ueno, Mizuta, & Nakazato, 2010; Yuan et al., 2013).

Inwiefern Hyperglykämie und Hyperlipidämie auf zellulären und molekularen Ebenen die β-Zelle schädigen, ist nach wie vor nicht vollständig entschlüsselt worden.

In dieser Arbeit soll mittels der Proteomanalyse ein Überblick über Veränderungen und Regulationen des Zellmetabolismus der β-Zelle unter glukotoxischen und/oder lipotoxischen Einflüssen erarbeitet werden. Dafür sollen BRIN-BD11 Zellen mit Glucose und Docosahexaensäure (DHA) stimuliert und das Proteom analysiert werden. Als besondere Methode findet hierfür die 2D-Differenzial-Fluoreszenz-Gelelektrophorese (DIGE) Anwendung. Eine Verifizierung gewonnener Erkenntnisse für ausgewählte Kandidaten durch weitere Methoden (RT-qPCR, Western Blot) wird angestrebt.

Die Auswertung der qualitativen und quantitativen Proteomdaten ermöglicht die Identifizierung putativer Regulatoren und erlaubt Aussagen über Reaktionen der BRIN-BD11 Zelle auf Stressoren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Verwendetes Gerät	Hersteller
4800 MALDI-TOF/TOF™ Analyzer	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Agaraosegel-Kamm mit Zubehör	Biometra GmbH, Göttingen
Agaraosegel-Kammer Midi 450.000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Any Gel™ Stand	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
CEA RP New Medical X-Ray Screen Film Blue Sensitive	AGFA-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
CFX96 Real-Time System C100 Thermal Cycler	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
CO_2 Cell Incubator	MMM Münchner Medizin Mechanik GmbH, München
Elektrophorese-Kammer- Protean plus - Dodecan cell	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Ettan Spot Handling Workstation	GE Healthcare GmbH, Solingen
Färbeschalen, lichtundurchlässig	Eigenbau Medizintechnik, Greifswald
Feinwaage BP 160 P	Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finnland
Flüssigkeitsabsaugsystem	Vacuubrand GmbH & Co KG, Wertheim
Olympus IX70 Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Center Valley, USA
Gel iX Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Gelgieß Zylinder Model 495 Gradient Former	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Gel-Gieß-Platten	Biometra GmbH, Göttingen
Gel-Gieß-Stand Protean plus Multi-casting Chamber	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Grant-Heizblock QBT4	CLFanalytische Laborgeräte GmbH, Emersacker
Haake DC 10 Kühlpumpe	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Heizblock Grant BT1	CLFanalytische Laborgeräte GmbH, Emersacker

Verwendetes Gerät	Hersteller
IPGphor	GE Healthcare GmbH, Solingen
Laminiergerät Folio	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sunden
Leuchttisch 2017 Macroread Sonic Digitzer, LKB Bromma	LabX, Midland, Canada
Lichtmikroskop im Zellkulturlabor	Zeiss, Jena
Magnetrührer Variomag	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Mastercycler personal	Eppendorf AG, Hamburg
Mehrkanalpipetten 50-200µl	VWR International GmbH, Darmstadt
Microtek scanMaker i800, Digital ICE technology	EPSON Deutschland GmbH, Meerbusch
Minigel Laufkammersystem	Biometra GmbH, Göttingen
Mixer 5432	Eppendorf AG, Hamburg
Monomixer	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Monomixer	Biometra GmbH, Göttingen
MR 1822 Zentrifuge Jouan	LabX, Midland, ON, Canada
NanoDrop 2000c Spectrophometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
NanoQuant infinite M200	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Pipettierhilfe accu-jet pipeo	VITLAB GmbH, Grossostheim
Power-Pac 200	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Protean i12^{TM} IEF Cell und Zubehör	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Rehydratisierungskammer	Eigenbau Medizintechnik, Greifswald
Reinstwasseranlage Milli-Q-Synthesis A10	Merck KGaA, Darmstadt
Rollinkubator RM5	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim
Röntgenkasette Ortho regular curix screens	AGFA-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
rt-PCR-Platten Zentrifuge Perfect Spin P	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Schüttler Unitwist-RT	UniEquip Laborgerätebau- und Vertrieb GmbH, Planegg
Semidry-Blotter	Armin Baack Labor- und Medizintechnik, Schwerin
Sterilwerkbank Hera Safe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Tayphoon TRIO Variable mode image	GE Healthcare GmbH, Solingen
Tecan Infinite M200	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz

Verwendetes Gerät	Hersteller
Thoma-Zählkammer	Zeiss, Jena
UniPack 250 Power Supply	UniEquip Laborgerätebau- und Vertrieb GmbH, Planegg
Verstellbare Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Verstellbare Pipetten	Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finnland
Waage PT 1200	Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finnland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg

Verwendetes Verbrauchsmaterial	Hersteller
24cm-IEF Strips, pH 3-10	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
96 well Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96 well MS-Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Micro Amp Adhesive Optical Film - BZO Seal Film	Life Technologies GmbH - A Thermo Fisher Scientific Brand , Darmstadt
Whatman Chromatographie-Papier, 3 mm	GE Healthcare GmbH, Solingen
Deckgläser, 24 x 80 mm	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Einmal-Stabpipetten, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Falcon-Röhrchen, 15 vml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Falcon-Röhrchen, 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Flächendesinfektionsmittel	Antiseptica chem.-pharm. Produkte GmbH, Pulheim/Brauweiler
Glaspasteurpipetten	VWR International GmbH, Darmstadt
Klebefolie für MS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Whatman Nitrozellulose-Transfer-Membran	GE Healthcare GmbH, Solingen
PCR Soft-Tubes 0,2 mk	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
PCR-96 well TWMT-Platten, weiß	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Petrischalen 100x20 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Petrischalen 35x10 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Pipettenspitzen ohne Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße, 2,0 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturflaschen 175 cm^2	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Verwendete Chemikalie	Hersteller
10xTrypsin-EDTA	PAA Laboratories, Piscataway, USA
30% steriles BSA	PAA Laboratories, Piscataway, USA
40% Glucose (=2200mM)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Aceton	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Acrylamid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Agarose	PeqLab - VWR International GmbH, Darmstadt
Ampholyte	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
APS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BioLyte® ampholytes 3-10, 100x, 20%	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau	Kallies Feinchemie AG, Sebnitz
BSA	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
CHAPS	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Colloidales Coomassie	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Coomassie Brillian Blue G-250 für Bradford-Messungen	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Cover Fluid	GE Healthcare GmbH, Solingen
DEPC	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Destreak	GE Healthcare GmbH, Solingen
DHA	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA
DIGE-Farbstoff, Refraction-2D™ labeling kit	NH DyeAgnostics GmbH, Halle
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
dNTP's	Promega Corporation, Madison, USA
DTT	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories, Piscataway, USA
EDTA - Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Ethanol, unvergällt	Universitätsapotheke Greifswald
Ethanol, vergällt	Universitätsapotheke Greifswald
Fetales Rinderserum (FCS)	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Verwendete Chemikalie	Hersteller
GeneRuler - DNA Ladder Mix (0,5µg/µl)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Glycerol	GE Healthcare GmbH, Solingen
Glycin	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Guanidinhydrochlorid	AppliChem, Inc., St. Louis, USA
Harnstoff	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Iodacetamid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
IPG-Puffer	GE Healthcare GmbH, Solingen
Isopropanol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Kaluiumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Luminol sodium salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
M-MLV 1xRTase	Promega Corporation, Madison, USA
M-MLV 5xRTase	Promega Corporation, Madison, USA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Oligo-dT	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PageRuler - Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phosphorsäure	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
RNAsin RNase Inhibitor	Promega Corporation, Madison, USA
Saccharose	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
SDS	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Sensimix SYBR-Hi-ROX	BioLine GmbH, Luckenwalde
Super Signal Dura West	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
TEMED	Gibco® Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Thioharnstoff	Merck KGaA, Darmstadt
TriFast®	PeqLab - VWR International GmbH, Darmstadt
Tris	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Tween 20	AppliChem, Inc., St. Louis, USA
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe

3.1.2 Puffer

Zellkultur-Medien

1xTrypsin	5,0 ml 10xTrypsin 45,0 ml PBS
Nährmedium für BRIN-BD11	1000 ml DMEM low Glucose 1 g/l (5,5 mM) 50,0 ml FCS 5,0 ml Penicillin (100 Units/ml) / Streptomycin (0,1
2% BSA Medium	463,33 ml DMEM low Glucose Nährmedium 36,33 ml 30%iges BSA 50,0 ml FCS 5,0 ml Penicillin/Streptomycin

Protein- und RNA-Extraktion

Tris-Sucrose-Puffer	10 mM Tris-HCl 250 mM Surcose
0,3 M Tris/HCl pH 7,6 - Proteinwaschpuffer	7,165 g Guanidinium-HCl ad 250 ml Ethanol
2D-Lysis-Puffer (2D-LP)	144,2 g Thioharnstoff 20,0 g CHAPS 242,0 mg Tris 10,0 g DTT ad 1000 ml A. bidest.
DEPC-Wasser	2000 ml A. bidest. 2 ml DEPC 24 Stunden bei RT, anschließend autoklavieren

Proteinkonzentrationsbestimmung

BSA-Stammlösung	200,0 µg BSA ad 1 ml 2D-Lysispuffer
Bradford-Lösung	100,0 mg Coomassie Brilliant Blue - G-250 50 ml Ethanol 100 ml Phosphorsäure ad 900 ml A. bidest.

Eindimensionale (1D-) Gelelektrophorese

Trenngelpuffer (TGP) pH 8,8	181,71 g Tris ad 1000 ml A. bidest. pH mit konzentrierter HCl einstellen
Sammelgelpuffer (SGP) pH 6,8	60,57 g Tris ad 1000 ml A. bidest. pH mit konzentrierter HCl einstellen
SDS (10%)	10,0 g SDS ad 100 ml A. bidest.
APS (10%)	1,0 g APS ad 10 ml A. bidest.
1xLaufpuffer (1xLP)	3,0 g Tris 14,4 g Glycin 1,0 g SDS ad 1000 ml A. bidest.
4x Proteinprobenpuffer	2 ml SGP 1,80 ml 98% Glycerol 1,60 ml 20% SDS 1,53 ml A. bidest. 770 µl 1M DTT 1 Spatelspitze Bromphenolblau

Zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese

Rehydratisierungspuffer (RHB)	24,0 g Harnstoff 7,6 g Thioharnstoff 1,0 g CHAPS Spuren Bromphenolblau ad 50 ml A. bidest. kurz vor Gebrauch komplettieren mit: 14,0 mg DTT/ 5,0 ml RHB
Äquilibrierungspuffer	72 g Harnstoff 50 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 46 ml Glycerol 4,0 g SDS ad 200 ml A. bidest.
Äquilibrierungspuffer + Iodacetamid	10 ml Äquilibrierungspuffer 0,10 g DTT
Äquilibrierungspuffer + DTT	10 ml Äquilibrierungspuffer 0,25 g DTT
blaue 1%ige Agarose	1,0 g Agarose 100 ml Laufpuffer ohne SDS 1 Spatelspitze Bromphenolblau

Coomassie Färbung

Fixierlösung	200 ml Methanol 50 ml Essigsäure ad 500 ml A. bidest.
Colloidales Coomassie - Färbelösung	100 ml Colloidales Coomassie (Carl Roth) 80 ml Methanol ad 500 ml A. bidest.

Entfärbelösung	100 ml Methanol ad 500 ml A. bidest.

DIGE-Experiment

Arbeitslösung (*working solution*)	5 nmol Farbstoff 12,5 µl Dimethylformamid
Harnstoff-Thioharnstoff (1xUT)	1,92 g Harnstoff (Urea) 0,61 g Thioharnstoff ad 4,0 ml HPLC-Wasser
10-facher Rehydratisierungspuffer (10x RHB)	80,0 mg CHAPS 48 µl Destreak 52,5 µl Pharmalyte 3-10 ad 400,0 µl 1xUT

cDNA Synthese

Reaktionsansatz	4,0 µl 5x M-MLV-Puffer 1,0 µl 10 mM dNTP's 0,5 µl RNAsin 1,0 µl M-MLV-RTase

Agarose-Gele

50xTEA	484,56 g Tris 37,2 g EDTA 114,0 ml Essigsäure ad 2000 ml A. bidest.
1xTEA	40 ml 50xTAE ad 1000 ml A. bidest.

6x Proteinprobenpuffer	2 ml SGP 1,80 ml 98% Glycerol 1,60 ml 20% SDS 1,53 ml A. bidest. 770 µl 1M DTT 1 Spatelspitze Bromphenolblau

Western Blot

NP40-Puffer pH 7,5	1,4 µl 1,8 M Tris/HCl 200 µl 0,5 M EDTA 0,438 g NaCl 50 µl NP40 ad 50 ml A. bidest. pH mit konzentrierter HCl einstellen
Anodenpuffer pH 10,4	100 ml Roti®Blot A 10x 200 ml Methanol ad 1000 ml A. bidest.
Kathodenpuffer pH 7,6	100 ml Roti®Blot K 10x 200 ml Methanol ad 1000 ml A. bidest.
Ponceau S - Lösung	0,5 g Ponceau S 7,5 g Trichloressigsäure ad 250 ml A. bidest.
1x Roti®Block	1 ml 10x Roti®Block ad 10 ml A. bidest.
Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween® 20 (TBST) pH 7,6	2,42 g Tris 8,00 g NaCl ad 1.000 ml A. bidest. pH mit konzentrierter HCl einstellen 1,00 ml Tween® 20
ECL-Gebrauchslösung	2,0 ml ECL-Solution A 0,6 µl H_2O_2 (30%)

	200 µl ECL-Solution B
ECL-Solution A	200 ml 0,1 M Tris/HCl (pH 8,6) 50 mg Luminol
ECL-Solution B	10 ml DMSO 11 mg para-Hydroxycoumarinsäure
Entwickler	1250 ml A. bidest. 1000 ml Developer G 153 - Substanz A 250 ml Developer G 153 - Substanz B
Fixierer	2000 ml A. bidest. 500 ml Fixierer

3.1.3 Primer

Genname	Genkürzel	Nukleotid-Code	GC Gehalt	Annealing Temperatur	Produkt-länge
Cathepsin D	*rCathe1D forward*	CGG CAC TGA CTC CAG ATA CTA C	54%	57°C	199 bp
	rCathe1D reverse	GGC CTT CTG TAG TTC CTT CAC C	54%	57°C	199 bp
Thioredoxin Reduktase 1	*rTxnrd1 forward*	GGT GAA CAC ATG GAA GAG CA	50%	55°C	290 bp
	rTxnrd1 reverse	CAA ATG GCG TAG ATG TAA GG	50%	53°C	290 bp
Glutamate Cysteine ligase modfier subunit	*rGclm forward*	CTT GCC TCC TGC TGT GTG ATG	57%	58°C	195 bp
	rGclm reverse	CAC GAT GAC CGA GTA CCT CAG	57%	57°C	195 bp
ER lipid raft associated 2	*rERLIN2 forward*	GGC AAT CCG CAG GAA CTA TGA G	54%	58°C	276 bp
	rERLIN2 reverse	GCG ATC TTC AGA GCA GTG TAG C	54%	58°C	276 bp
Angiotensin converting enzyme 2	*ACE2 forward*	ATG CGT ATG AAT GGA CCG AC	50%	55°C	382 bp
	ACE2 reverse	ACA ATG CCA ACC ACT ACC GT	50%	57°C	382 bp
60S Ribosomal Protein L13a	*rRPL13a forward*	CTG GTA CTT CCA CCC GAC CTC	61%	59°C	131 bp
	rRPL13a reverse	GGA TCC CTC CAC CCT ATG ACA	57%	57°C	131 bp
Dihydropyrimidinase-like 2	*rDPYL2 forward*	AGC AAG ACC AGC TAA GGG ATT	48%	59°C	271bp
	rDPYL2 reverse	TAT TTG CTT GAT CAA CCC ATC TTC	38%	57°C	271bp
Melanocyte proliferating gen 1	*rMYG1 forward*	TAC TGC CCG AGT ACA GGA ATG	52%	59°C	231bp
	rMYG1 reverse	GCA GAT AGA CAA GTC CCG CA	55%	60°C	231bp

3.1.4 Software und Datenbanken

Software

CFX Managner	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Delta 2D 4.5 final	Decodon GmbH, Greifswald
i-control 1.9	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Image J	Wayne Rasband (National Institutes of Health)
Ingenuity Pathway Analysis	QIAGEN GmbH, Hilden
MS Office Excel	Microsoft®Corporation, Unterschleißheim
MS Office Power Point	Microsoft®Corporation, Unterschleißheim
MS Office Word	Microsoft®Corporation, Unterschleißheim
Photoshop® CS 2	Adobe® Systems GmbH, München
Primer Designer 2.0	Scientific & Educational Software, Morrisville NC, USA
Prism 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
ScanWizard ProV7.132	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath
typhoon scanner control v5.0	GE Healthcare GmbH, Solingen

Datenbanken

MS Datenbank - SwissProt 56.1	ExPasy Bioinformatics Resource Portal
Primer-BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Kultivieren der Zelllinie BRIN-BD11

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 in Zellkulturflaschen mit Filter-Schraubverschluss (Wachstumsfläche 75 cm^2) inkubiert. Jegliche Nährmedien, Stimulationslösungen und Trypsin wurden vorher im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Pro Flasche wurden 35 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) low Glucose (1 g/l; 5,5mM) Nährmedium eingesetzt, das alle zwei bis drei Tage abgesaugt und durch frisches ersetzt wurde. Die Zellen wurden lichtmikroskopisch nach morphologischen Kriterien und der Zelldichte beurteilt. Abhängig davon wurden die Zellen alle drei bis vier Tage 1:3, 1:4 oder 1:5 passagiert. Dazu wurde das alte Nährmedium abgesaugt, der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 5 ml 1xTrypsin zwei bis drei Minuten im Brutschrank inkubiert, um sie anschließend von der Zellkulturflasche zu lösen. Die Enzymwirkung wurde durch die Zugabe von 20 ml DMEM gestoppt. Mittels mehrmaligem Auf- und Abpipettieren über den Zellrasen ist sichergestellt worden, dass sich alle Zellen vom Flaschenboden gelöst haben. Die gesamte Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falconröhrchen überführt.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension luftblasenfrei in die Zählkammer pipettiert. Während die 25 ml Zellsuspension bei 1500 U/min für vier Minuten bei Raumtemperatur zentrifugierte, konnte die Zellzahl bestimmt werden. Dafür wurden alle vier Quadrate, jeweils aus 16 Unterquadraten bestehend, ausgezählt. Als Zellzahl wurde der Durchschnittswert aus den vier Quadraten zu Grunde gelegt. Die Zelldichte konnte dann aus dem Verdünnungsfaktor nach Formel 1 errechnet werden.

Formel 1: Berechnung der Zelldichte einer Suspension nach Zählung in einer 0,1 mm hohen Thoma-Kammer

Zelldichte [ml^{-1}] = Zellzahl * 10000 * Verdünnungsfaktor

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abnommen und das Zellpellet mit einer von der Zellzahl abhängigen Menge DMEM (6 ml oder 8 ml) resuspendierte.

Für Stimulationsversuche wurden drei Millionen Zellen in 11 ml Nährmedium pro Zellkulturschale (58 cm^2, 10 cm im Durchmesser) ausgesät. Zum Erhalt der Zelllinie wurden 2,5 bis 5 Millionen Zellen in 35 ml Nährmedium in eine neue Zellkulturflasche (75 cm^2) ausgesät. Zellkulturschalen und -flaschen wurden bis zur Stimulation bzw. bis zur nächsten Passage im Brutschrank inkubiert.

Stimulationsversuche

Die Stimulation der BRIN-BD11-Zellen erfolgte 48 Stunden nach dem Aussäen von drei Millionen Zellen in Zellkulturschalen (58 cm²). Zu Beginn wurde jede Schale lichtmikroskopisch auf die Vitalität, Morphologie und Dichte der Zellen hin begutachtet. Das Nährmedium wurde entfernt und 10 ml BSA-Medium auf jede Schale gegeben. Abhängig von der jeweiligen Behandlung wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Stimulanzien dazugegeben. Pro Versuchsdurchgang wurde immer eine Kontrolle mitgeführt.

Tabelle 2: Behandlungsschema

Name	**Beschreibung**	**Bedingung**
Ko	Kontrolle (Ko)	unvergällter Ethanol (Lösungsmittel für Stimulierungen)
Gluc	Glucose - Stimulierung (St. I)	unvergällter Ethanol + 25 mM Glucose
DHA	DHA - Stimulierung (St. II)	0,1 mM Docosahexaensäure (Stock in Ethanol)
Gluc+DHA	Glucose + DHA Stimulierung (St. III)	0,1 mM Docosahexaensäure + 25 mM Glucose

Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Probenpräparation aus der Zellkultur

Die Ernte der Zellen mit TriFast ™ (peqlab) erfolgte nach erneuter lichtmikroskopischer Begutachtung. Entsprechend der beobachteten Zelldichte wurden die Zellkulturschalen mit 4 bzw. 5 ml TriFast ™ (peqlab) geerntet.

Zu Beginn wurden die Schalen zweimal mit 3 ml 10 mM Tris/250 mM Sucrose Puffer gewaschen. Anschließend wurden 4 oder ggf. 5 ml TriFast ™ auf jede Schale gegeben und die Probenpräparation nach Herstellerprotokoll aufgeführt.

Die unter dem Abzug getrockneten RNA-Pellets wurden abhängig von ihrer Größe in 10-50 µl DEPC-Wasser gelöst, ihre Konzentration bestimmt und Aliquotes bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

Die getrockneten Protein-Pellets wurden abhängig von ihrer Größe in 100-150 µl 2D-Lysispuffer auf dem Schüttler gelöst. Die Proteinkonzentration konnte im Anschluss nach der Methode von Bradford bestimmt werden, siehe 3.2.3 auf Seite 40.

3.2.2 Bestimmung der RNA Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der gelösten RNA erfolgte spektralphotometrisch am Nanodrop (Spectrophotometer). Basis jeder Messung war die Definition des Leerwertes durch Messung von 2 µl DEPC-Wasser. Anschließend wurden 2 µl der Probe auf die Messoberfläche pipettiert. Die Messung der durch Oberflächenspannung erzeugten Flüssigkeitssäule erfolgte bei 230 nm, 260 nm und 280 nm.

Nukleotide haben ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine ihres bei 280 nm. Der Quotient aus 260 / 280 nm bestimmt die Reinheit der RNA-Probe und sollte Werte zwischen 1,8 und 2,0 annehmen. Anderenfalls ist die Probe verunreinigt. Der 260 / 230 nm Quotient sollte zwischen 2,0 und 2,2 liegen.

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (Formel 2) kann die Konzentration (c) aus der gemessenen Extinktion berechnet werden. Dabei ist der RNA-spezifische dekadische Extinktionsfaktor Faktor (ε_λ) gleich 40.

Formel 2: Lambert-Beersches Gesetz

Extinktion bei der Wellenlänge $E_\lambda = \lg_{I1}^{Io} = c\ d\ \varepsilon_\lambda$

RNA-Konzentration $= c = \frac{lg_{I1}^{Io}}{d * \varepsilon_\lambda}$

3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mittels einer modifizierten Methode nach Bradford unter Verwendung einer 96 Well Mikrotiterplatte bestimmte. Dazu wurden die in 2D-Lysispuffer (2D-LP) gelösten Proteine 1:5 mit 2D-LP verdünnt. Anschließend wurden 2 µl der Proteinverdünnung (1:5) sowie 18 µl 2D-LP in jedes Well pipettierte. Die Zusammensetzung der Standardreihe ist dem Schema in Tabelle 3 zu entnehmen. Für alle Messwerte wurden mindestens Duplikate angefertigt.

Tabelle 3: Pipettierschema der Standardreihe für die Proteinbestimmung nach Bradford

BSA-Menge in [µg]	[0,2µg/µl] BSA-Stamm in [µl]	2D Lysis-puffer in [µl]	Bradford-lösung in [µl]	BSA-Menge in [µg]	[0,2µg/µl] BSA-Stamm in [µl]	2D Lysis-puffer in [µl]	Bradford-lösung in [µl]
0,00[1]	0	20	300	**0,06**	6	14	300
0,02	2	18	300	**0,08**	8	12	300
0,03	3	17	300	**0,10**	10	10	300
0,04	4	16	300	**0,20**	20	0	300
0,05	5	15	300				

[1] Entspricht dem Leerwert

Nach der Zugabe von 300 µl Bradford-Lösung pro Well erfolgte die Inkubation für zehn Minuten. Anschließend wurde die Absorption der einzelnen Wells bei 595 nm gegen die Referenzwellenlänge von 360 nm am Tecan Infinite M 200 gemessen.
Mit Hilfe der Regressionsgeradengleichung der Standardreihe von BSA wurde die Proteinkonzentration der Proben ermittelt.

3.2.4 Eindimensionale (1D-) Gelelektrophorese

In der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Laemmli werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu wurde ein 12%iges SDS-Trenngel mit 4%igem Sammelgel verwendet (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Zusammensetzung der Acrylamidlösung für zwei Trenn- und Sammelgele

Trenngel (12%)		**Sammelgel (4%)**	
Aqua deion.	6,6 ml	Aqua deion.	2,8 ml
1,5M Tris/HCl pH 9,3 (Trenngelpuffer)	5,0 ml	0,5M Tris pH 6,8 (Sammelgelpuffer)	1,25 ml
Acrylamid/Bis-Acrylamid	8,0 ml	Acrylamid/Bis-Acrylamid	750 µl
10% SDS	200 µl	10% SDS	50 µl
10% APS	100 µl	10% APS	50 µl
TEMED	10 µl	TEMED	5 µl

Während das Sammelgel polymerisierte, wurden die aufzutragenden Proben vorbereitet. Pro Tasche wurden 20 - 30 µg Protein und entsprechende Volumina an 4x – bzw. 6x Probenpuffer zu einem Endvolumen von 30 µl mit NP40-Puffer aufgefüllt und aufgetragen. Als Größen-Marker-Spur kamen 4 µl Proteinmarker, 5 µl 6x Probenpuffer und 21 µl NP40-Puffer zum Einsatz. Die Trennung in der 1. Dimension erfolgte bis zum Erreichen des Trenngels bei 120 V, danach bei Spannungen bis zu 160 V. War die Bromphenolblau-Front aus dem SDS-Gel herausgelaufen, wurde der Lauf beendete.

3.2.5 Zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese

Die Methode der 2D-Gelelektrophorese setzt sich aus zwei gesonderten Elektrophorese-Schritten zur Trennung von Proteingemischen zusammen. In der 1. Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt, um anschließend in einer SDS-PAGE nach ihrer Molekülgröße, der 2. Dimension, separiert zu werden.

Rehydratisierung der Gelstreifen

Um die intrazellulären Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufzutrennen, wurden 24 cm Gelstreifen pH 3-10 NL verwendet.

Analytische Gele wurden mit 150 µg und präparative Gele mit 450 µg Protein pro Gel-Streifen beladen. Für die Rehydratisierung von 24 cm Streifen wurde ein Gesamtvolumen von 450 µl verwendet. Diese Gesamtlösung setzte sich aus 2% Ampholyt, den gelösten Proteinen und Rehydratisierungspuffer (RHB) zusammen, vergleiche Formel 3.

Formel 3: Berechnung der benötigten RHB-Menge

$$\text{RHB-Menge} = 450\ \mu l_{(\text{Endvolumen})} - 4{,}5\ \mu l_{\text{Ampholyte}} - X\ \mu l_{\text{Proteinprobe (gelöste 150-450 µg Protein)}}$$

Die 450 µl Probensuspension wurde mittels Pipette in die Rehydratisierungskammer aufgetragen. Auf diese wurde anschließend der Streifen mit der Gelfläche nach unten plaziert. Dabei wurde akribisch darauf geachtet, dass die gesamte Gelfläche Kontakt zur Probensuspension hat und sich keine Luftblasen gebildet haben. Anschließend wurde jeder Streifen mit 2,5 ml *Cover Fluid* überschichtet. Die Rehydratisierung fand über Nacht bei 20°C statt.

Isoelektrische Fokussierung

Für die isoelektrische Fokussierung der im Gelstreifen befindlichen Proteine wurden pro verwendetem Gelstreifen zwei Elektrodenpapiersteifen in Aqua deionisata getränkt und als Kontakt auf die Elektroden der Elektrophorese-Apparatur gelegt. Danach wurden die Gelstreifen vorsichtig, entsprechend ihrer Polarität aus der Rehydratisierungskammer in die Elektrophorese-Apparatur mit der Gelseite nach unten überführt. Zum Schluss wurde jeder Gelstreifen mit 4 ml *Cover Fluid* bedeckt und die Apparatur nach Herstellerangabe für die IEF komplettiert.

Pro Lauf konnten zwölf Streifen gleichzeitig fokussiert werden. Das verwendete isoelektrische Fokussierungsprogramm ist in unten stehender Tabelle abzulesen (Tabelle 5).

Tabelle 5: IEF Programm

Schritt	Spannung	Max. Stromstärke/ Gelstreifen	Zeitspanne bzw. Volt-Stunden
1	250 V	50 µA	15 min.
2	10000 V	50 µA	4 Stunden
3	10000 V	50 µA	bis 55000 Vhr
4	500 V	50 µA	~

Nach abgeschlossener Fokussierung wurden die Gelstreifen mit der Gelseite nach oben in die Äquilibrierungskammer überführt und entweder mit einer Folie bedeckt bei -20°C eingefroren oder direkt für die 2. Dimension äquilibriert.

Äquilibrierung der Gelstreifen

Der Äquilibrierungsschritt dient dem Aufspalten von Disulfidbrücken und der Alkylierung von Thiolen, wodurch vollständig linearisierte Proteine erzeugt werden. Dem ersten Äquilibrierungspuffer (ÄP) wurde DTT zugesetzt. In 3,5 ml dieses Puffers schwenkte jeder Streifen 15 Minuten, um anschließend nochmals 15 Minuten in 3,5 ml Äquilibrierungspuffer 2, mit Iodacetamid versetzt, zu schwenken. Direkt daran anschließend wurden die Gelstreifen auf die SDS-Gele aufgetragen.

SDS-PAGE - Trenngele

Die 24 cm großen 2D-Gele bestanden nur aus 12%-igen SDS-Trenngelen, siehe Tabelle 6.

Tabelle 6: Zusammensetzung der 12%-igen SDS-Trenngele

Verwendete Chemikalien	12 Gele	4 Gele
Acrylamid	484 ml	161 ml
Trenngelpuffer	303 ml	101 ml
Aqua deionisata	424 ml	141 ml
APS	6 ml	2 ml
TEMED	300 µl	100µl

Jedes Gel wurde direkt nach dem Gießen mit 1 ml 66%(v/v)-Isopropanol überschichtet, um einen geraden Gelrand zu gewährleisten. Nach fünf bis sechs Stunden waren die SDS-Gele verfestigt und konnten im Kühlschrank aufbewahrt oder direkt verwendet werden.

Zweite Dimension

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde das Isopropanol von den SDS-Gelen abgespült und die Glasplatten am Gelrand vorsichtig mit Filterpapier getrocknet. Anschließend wurden die äquilibrierten Gelstreifen in 1x Laufpuffer kurz ab abgespült und vorsichtig auf den SDS-Gelen platziert. Nach dem Überschichten der Streifen mit 3,5 ml Agarose wurden die Glasplatten in die mit 1xLP gefüllte Laufkammer eingesetzt. Die Auftrennung der Proteine nach der 2. Dimension erfolgte bei 80-120 V über Nacht. Da die Agarose mit Bromphenolblau versetzt war, konnte die Lauffront der Proteine nachvollzogen und die Gele entsprechend am Ende des Laufes aus der Laufkammer genommen werden.

3.2.6 Coomassie Färbung

Coomassie-Brillant-Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich an die basischen Seitenketten von Aminosäuren anlagert und für die massenspektrometrische (MS) Auswertung geeignet ist. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 200 - 400 ng pro Bande (Rehm & Letzel, 2010, Seite 15).

Für die Färbung wurden die SDS-Gele mindestens 30 Minuten in 500 ml 40% Methanol / 10% Essigsäure fixierte. Die Gebrauchsfärbelösung wurde aus der Rotiblue-Stocklösung durch 1:5 Verdünnung mit 20% Methanol hergestellt. Die Färbung der Gele erfolgte über Nacht unter leichtem Schwenken in 400-500 ml Färbelösung. Zur Reduktion der Hintergrundfärbung wurden die Gele drei Mal in 500 ml 20%igen Methanol gewaschen. Anschließend konnten die Gele digitalisiert und in Klarsichtfolie laminiert werden.

3.2.7 2D-Differenzial-Fluoreszenz-Gelelektrophorese (DIGE)

Die 2D-Differential-Fluoreszenz-Gelelektrophorese ist eine spezielle Form der 2D-Gelelektrophorese. Dabei werden die zu vergleichenden Proben vor dem Auftragen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die jeweiligen Probenpaare werden dann im gleichen Gel aufgetrennt und sind über den mitgeführten, internen Standard vergleichbar. Dadurch wird die Gel-zu-Gel-Varianz verhindert und eine bessere Vergleichbarkeit bewirkt.

Das DIGE-Experiment Design erfolgte so, dass auf jedem Gel eine Probe mit *G-Dye 200*, eine andere Probe mit *G-Dye 300* und der interne Standard mit *G-Dye 100* aufgetragen wurden. Das Proteingemisch des internen Standards entstand aus gleichen Teilen aller aufgetragenen Proteinproben (Ko, Gluc, DHA, Gluc+DHA).

Tabelle 7: Beladung der DIGE Gele

	G-Dye 100	*G-Dye 200*	*G-Dye 300*	
Gel 1 und 2	50 µg Interner Standard	50 µg Kontrolle	50 µg Gluc (St. I)	Zusätzlich zu jedem Gel: 100 µl RH und mit 1xUT auf 500 µl Gesamtvolumen ausfüllen
Gel 3 und 4	50 µg Interner Standard	50 µg Gluc (St. I)	50 µg DHA (St. II)	
Gel 5 und 6	50 µg Interner Standard	50 µg DHA (St. II)	50 µg Gluc+DHA (St. III)	
Gel 7 und 8	50 µg Interner Standard	50 µg Gluc+DHA (St. III)	50 µg Kontrolle	

Um Färbeartefakte auszuschließen, wurden die Proben einem *Dye Swap* unterzogen. Das heißt, dass jede Proteinprobe einmal mit dem *G-Dye 200* und einmal mit dem *G-Dye 300* markiert wurde. Es wurden technische Replikate angefertigt.

Für die Markierung der Proben wurden diese auf eine gleiche Konzentration durch Zugabe von 2D-LP gebracht und für alle Proben der gleiche pH-Wert mittels Natriumhydroxidzugabe eingestellt. Pro 50 µg Protein wurde 1 µl Farbstofflösung (400 pMol) verwendet. Nachdem der Farbstoff 30 Minuten lang reagiert hatte, wurde die Reaktion durch Zugabe von Lysin gestoppt. Nach weiteren 10 Minuten wurden die Lösungen für die Rehydratisierung der einzelnen IPG-Strips zusammenpipettiert. Pro Streifen gab man 50 µg Probe A (G-*Dye 200),* 50 µg Probe B (G-*Dye 300)* sowie 50 µg interner Standard (*G-Dye 100)* zu 100 µl 10x Rehydratisierungspuffer (RH) und 1x Harnstoff-Thioharnstoff (UT), vergleiche Tabelle 7. Mit 1x UT wurde die aufzutragende Lösung auf 500 µl aufgefüllt.
Für präparative Gele wurde ein 500 µg großer Protein-Pool, bestehend zu gleichen Teilen aus den vier zu untersuchenden Proteinproben, 50 µg internem Standard sowie 100 µl 10x RH und 1x UT, eingesetzt.
Anschließend wurden alle aufzutragenden Lösungen 30 Minuten lang auf dem Schüttler gut durchmischt und 5 - 15 Minuten bei 13000 g zentrifugiert. Danach wurden die Lösungen aufgetragen und die Rehydratisierung der IPG-Streifen erfolgte nach zuvor auf Seite 42 beschriebenem Prinzip. Daran schlossen sich die isoelektrische Fokussierung, Äquilibrierung und der Lauf in der 2. Dimension an. Folgend konnten die Gele-Daten an einem Typhoon™- TRIO Variable mode image Scanner digitalisiert werden. Über den internen Standard konnten zudem gelspezifische Laufunterschiede festgestellt und bei der Auswertung berücksichtigt werden.

3.2.8 Scannen von 2D-Gelen

Die DIGE-Gele wurden direkt in den niedrig-fluoreszierenden Glasplatten mit dem Typhoon™ TRIO Variable mode image gescannt. Dazu erfolgte eine entsprechende Anpassung in der *Typhoon scanner control v5.0*-Software (focal +3 mm, plane). Die Auflösung betrug 100 microns (entspricht 127 dpi). Die weiteren Einstellungen für den jeweiligen Farbstoff sind exemplarisch Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Scaneinstellungen für DIGE-Gele

	Laser	**Anregungswellenlänge**	**Filter**	**PMT**
G-Dye 100 – Cy2	Blue	488 nm	520BP40	650
G-Dye 200 – Cy3	Green	532 nm	580BP30	635
G-Dye 300 – Cy5	Red	633 nm	670BP30	625

Die PMT-Spannung wurde für jedes Gel individuell angepasst. Coomassie gefärbte Gele wurden mit Hilfe des Microtek i800 digitalisiert. Das Abspeichern der entstandenen Bilder erfolgte im Dateiformat *.tif*.

3.2.9 Auswertung der 2D-DIGE-Gele

Die Auswertung des Proteinmusters der BRIN-BD11 Zellen in den 2D-Gelen erfolgte mit Hilfe der Delta2D-Software (Decodon). Dazu wurde ein neuer Gel-Pool in Delta2D erstellt, in den alle Farbkanäle der Gele geladen und passend aufeinander gelegt (*warping*) wurden. Über den internen Standard, der Bestandteil aller Gele ist, konnte ein Vergleich aller Proben untereinander erreicht werden.

Es erfolgte eine Zuordnung zu den Versuchsgruppen (Ko – Gluc – DHA – Gluc+DHA) sowie die Erstellte eines Fusionsgels aus allen Gelen. In dem Fusionsgel wurde eine Spotdetektion durchgeführt und die detektierten Spots anschließend auf alle Gele übertragen. Als Kontrolle dienten die nur mit Ethanol behandelten Proben. Die Quantifizierung der Spots funktionierte automatisch mit Delta2D.

Die Intensität jedes Spots wurde in Volumenprozent (Vol%) angegeben, was der Intensität jedes einzelnen Spots in Bezug auf die Gesamtintensität aller Spots auf dem jeweiligen Gel entspricht. Aus allen Replikaten einer Situation ermittelte Delta2D das durchschnittliche Spotvolumen sowie die Standardabweichung für jeden Spot. Der Vergleich zu dem ermittelten Spotvolumen in der Kontrolle (Ethanol) ergab den Verhältnis-Wert.

Die Bestimmung von signifikant veränderten Proteinspots resultierte aus der Anwendung eines *Student's*-T-Test. Alle Spots die ein p-Value größer als 0,05 hatten, wurden aus nachfolgenden Untersuchungen ausgeschlossen. Bei den DIGE-Gelen lang ein Fokus auf den Schwankungen der Spots zwischen den jeweiligen Replikaten. Wenn ein Spot um mehr als 30% in seinen technischen Replikaten variierte, entfiel für diesen die weitere Betrachtung. Abschließend konnten die Spots herausgefiltert werden, deren Intensität im Verhältnis zur Kontrolle mindestens 1,5-fach erhöht oder erniedrigt waren. Diese signifikanten Spots wurden in dem Programm gekennzeichnet und mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert.

3.2.10 Massenspektrometrische Analyse

Die detektierten Proteinspots wurden manuell aus präparativen, Coomassie gefärbten 24 cm Gelen ausgestochen. In Kooperation mit dem Interfakultären Institut für Genetik und funktionelle Genomforschung (EMAU Greifswald) wurden die Proteinspots für die Massenspektrometrie (MS) vorbereitet. Die Peptidanalyse erfolgte unter Verwendung einer Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS). Über das Abgleichen der MS-Messdaten mit Rattenproben-Datenbanken erfolgte die Identifikation der Proteine in den untersuchten Spots.

3.2.11 Ingenuity Pathway Analysis (IPA-Analyse)

Die webbasierte Analyse ermöglicht eine Interpretation der erhobenen Daten auf Basis der Ingenuity Datenbank, dadurch können Kenntnisse zu Mechanismen, Interaktionen und Signalwegen mit den experimentellen Daten korreliert werden.

Für signifikant veränderte und mittels Massenspektrometrie identifizierte Proteine fand die IPA-Analyse in Kooperation mit dem Institut für Genetik und funktionelle Genomforschung, EMAU Greifswald statt. Die Proteine (SwissProt-Accession Nummern) wurden mit Informationen zur differentiellen Änderung (Vielfachem) in die Analyse geladen. Für Proteine, die in mehreren Spots nachgewiesen waren, erfolgte nur das einmal Einladen. Es resultierten Informationen zur zellulären Lokalisation, Funktion und zu vorhandenen Interaktionen. Diese wurden in Netzwerken zusammengefasst und entsprechend der Wertigkeit aufgelistet.

3.2.12 Quantitative Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion

Designen von Primern für RNA-Analyse

Passende Primersequenzen entstanden mit Hilfe der Software *PrimerDesigner* (Scientific & Educational Software). Dazu wurde der mRNA-Code des entsprechenden Proteins von BRIN-BD11 Zellen in PubMed herausgesucht und in das Programm PrimerDesigner geladen. Beim Generieren eines Primer-Paares war die Zielstellung, dass der Guanin-Cytosin-Gehalt für *forward*- und *reverse*-Primer möglichst gleichen ist, die Primer 18-25 Nukleotide lang sind und deren *Annealing*-Temperaturen nah beieinander liegen. Des Weiteren sollten der *forward*- und der *reverse*-Primer nach Möglichkeit nicht mehr als 300 Nukleotid-Positionen voneinander entfernt sein, aber einen Mindestabstand von 150 Nukleotiden haben. Wenn die oben genannten Bedingungen erfüllt waren, schloss sich die Überprüfung der Primer über den *Primer-Blast (basic local alignment search tool)* in PubMed an. Nach der Lieferung der entworfenen Primer durch Invitrogen wurden die Primer nach Vorschrift auf 100µM verdünnt sowie 5 µl des *forward*-Primers mit 5 µl des *reverse*-Primers zu 90 µl Aqua deion. pipettiert, um eine 5 µM Gebrauchslösung zu erhalten.

cDNA Synthese

Bei der cDNA Synthese wird mittels des Enzyms Reverse-Transkriptase die zur RNA komplementäre cDNA gebildet. Für diese spezifische, RNA-abhängige DNA-Polymerase diente pro Ansatz (1,5 µg RNA) 1 µl Oligo-dT(15)-Nukleotid [0,5 µg/µl] als Primer. Das Gemisch aus RNA und Oligo-dT(15) wurde auf ein Volumen von 13,5 µl mit Aqua deion. aufgefüllt, für 3-5 Minuten bei 65°C im Heizblock denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Zu dieser Probe wurden 6,5 µl des Reaktionsansatzes hinzugefügt. Der

Reaktionsansatz setzt sich aus 4 µl 5x M-MLV-Puffer, 1 µl 10 mM dNTP´s, 0,5 µl RNAsin sowie 1 µl M-MLV-RTase (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) zusammen. Das Pipettierschema ist in Tabelle 9 zusammengestellt. Anschließend erfolgte die Überführung des 20 µl - Probengemisch in PCR-Tubes und die Plazierung im PCR-Cycler, in dem die Proben 1 Stunde mit 42°C und für 10 min. mit 70°C behandelt wurden, um danach gekühlt zu werden. Nach Beendigung des Programmes wurde die entstandene cDNA mit 180 µl Aqua deion. aufgefüllt, verwendet und / oder bei -20°C gelagert.

Tabelle 9: Pipettierschema zur cDNA Synthese

Substanz	**Eingesetzte Menge**
RNA	1,5 µg in x µl
Oligo-dT(15)Nukleotid [0,5 µg/µl]	1 µl
Aqua deion.	13,5 µl – 1 µl – x µl
3-5 min. bei 65°C denaturiert, danach sofort auf Eis **Zugabe von 6,5 µl Reaktionsansatz, bestehen aus:**	
5x M-MLV-Puffer	4 µl
10 mM dNTP	1 µl
RNAsin	0,5 µl
M-MLV-RTase	1 µl

Quantitative Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-qPCR)

Für die RT-qPCR wurde der Mastermix, der aus 10 µl Sensi-Mix-dT, 4 µl Aqua deion. und 2 µl *forward*- und *reverse*-Primer (5 µM) besteht, entsprechend für jedes Primer-Paar angesetzt und gemäß dem Plattendesign zu 4 µl vorgelegter cDNA pipettiert. Bei jeder RT-qPCR erfolgte pro Mastermix-Ansatz das Mitführen von zwei Negativkontrollen mit Aqua deion.. Alle Messungen wurden mindestens in Duplikaten pipettiert und gegen das *House-keeping*-Gen *rRPL13a* durchgeführt. Die genutzten RT-qPCR-Protokolle sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 dargestellt. Das *Sample-Volumen* betrug jeweils 20 µl.

Tabelle 10: verwendetes PCR-Protokoll - Gradienten-RT-PCR

Step	**Temperatur in °C**	**Zeitdauer**
1 - Enzymaktivierung	95	10 min.
2 - Denaturierung	95	10 sec
3 - Gradient	58,0 – 63,0	15 sec
4 - Primerhybridisierung	72	20 sec
5	Read Plate	
6	39 x Wiederholen von Schritt 2-5	
7 - Denaturieren	95	10 sec
8 - Schmelzkurve	von 65 – 95°C in 0,5°C Schritten alle 5 sec	

Tabelle 11: verwendetes PCR-Protokoll - quantitative-RT-PCR

Step	Temperatur in °C	Zeitdauer
1 - Enzymaktivierung	95	10 min.
2 - Denaturierung	95	10 sec
3 - Primerhybridisierung	60	15 sec
4 - Elongation	72	20 sec
5	Read Plate	
6	39 x Wiederholen von Schritt 2-5l	
7 - Denaturieren	95	20 sec
8 - Schmelzkurve	von 65 – 95°C in 0,5°C Schritten alle 5 sec	

Mittels der für das Primer-Paar spezifischen Schmelzkurve wurde die Reinheit der Probe kontrolliert, um damit gegebenenfalls fehlerhafte Proben von dem weiteren Verfahren auszuschließen. Nach dem Zyklus wurde die PCR-Platte im Kühlschrank aufbewahrt, um bei Bedarf die Proben auf ein Agarose-Gel auftragen zu können.

Agarose-Gele

Mit Hilfe der Agarose-Gele konnte überprüft werden, ob die synthetisierten Primer-Paare spezifisch binden und das gewünschte Produkt mit der richtigen Größe entsteht. Dazu wurden die RT-qPCR-Proben in einem 1,5% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dafür wurden 0,75 g Agarose mit 50ml 1xTAE aufgefüllt und in der Mikrowelle unter leichtem Schwenken bis zum vollständigen Lösen der Agarose erwärmt. Nach ca. fünf Minuten wurden 2,5 µl Red-Safe hinzugegeben. Nachdem die Flüssigkeit auf 65°C abgekühlt war, wurde das Agarose-Gel luftblasenfrei gegossen. Während der Verfestigung konnten die aufzutragenden Proben vorbereitet werden.

Die Proben setzten sich aus 10 µl der entsprechenden RT-qPCR-Probe und 2 µl 6x Ladepuffer zusammen. Von diesem Probengemisch wurden 10 µl in die Geltasche pipettiert. Als Marker diente *GeneRuler-DNA Ladder Mix* (0,5µg/µl). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V für ca. 30 Minuten.

Anschießend erfolgte unter Verwendung von ultraviolettem Licht die Visualisierung der Reaktionsprodukte und die Dokumentation des Gelbildes mit dem INTAS-System. Die sichtbaren Banden der jeweiligen PCR-Produkte wurden auf ihre zu erwartende Größe und eventuelle Nebenbanden hin überprüft.

3.2.13 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine mittels Elektrophorese vom SDS-Gel auf Nitrozellulose-Membranen übertragen, wo sich spezifische Primärantikörper an das zu untersuchende Protein binden. Die Proteinquantität ist anschließend über Sekundärantikörper nachweisbar.

Zu Beginn wurde ein 1D-SDS-PAGE-Gel, wie unter Eindimensionale (1D-) Gelelektrophorese beschrieben, erzeugt. Nach Beendigung des Laufs wurde das 12%ige SDS-PAGE-Gel für ca. 5 Minuten in Kathodenpuffer gelegt. Des Weiteren tränkte man 4 Whatman-Filter in Kathodenpuffer sowie 4 Whatman-Filter in Anodenpuffer. Die Nitrozellulose-Membran wurde ebenfalls in Anodenpuffer gelegt. Anschließend wurde der *Semidry-Blot* in folgender Reihenfolge aufgebaut: Anode (+) – 4 x Whatman-Filter – Nitrozellulose-Membran – das SDS Gel – 4 x Whatman-Filter – Kathode (-) (Abbildung 7). Die Stromstärke (I), bei der für 60 Minuten geblottet wurde, ließ sich über Formel 4 ermitteln.

Formel 4: Bestimmung der anzulegenden Stromstärke für Semidry-Blot

$I_{[mA]}$ = Gelfläche (in cm²) ∗ 1 mA

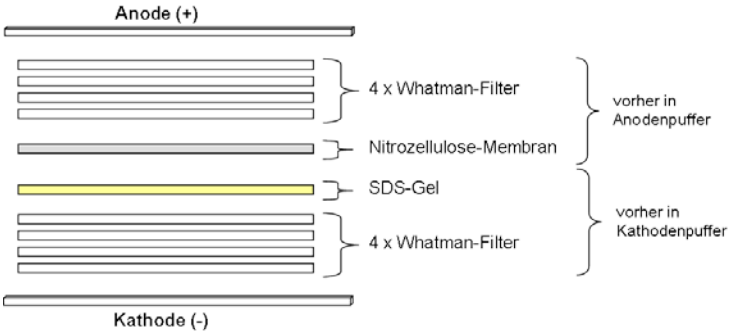


Abbildung 7: Aufbau des Semi-Dry-Blottes

Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulose-Membran zur Kontrolle der Transfereffizienz für zwei Minuten in Ponceau-S-Lösung geschwenkt. Die Membran wurde anschließend mit Aqua deion. entfärbt und für ½ - 1 Stunde in 10 ml 1×Roti® - Block inkubiert. Nach fünf minütigem Waschen mit TBST wurden 10 ml Primärantikörperlösung in TBST / 5% BSA / NaN_3 auf die Membran gegeben. Die Arbeitskonzentrationen der Antikörper sind Tabelle 12 zu entnehmen. Der Primärantikörper reagierte bei 4°C über Nacht mit den Proteinen.

Tabelle 12: Verdünnungsfaktoren der verwendeten Antikörper

Antikörpername	Hersteller	Verdünnung
Anti-Thioredoxin-Reduktase1, rabbit	Institutseigen	1:7500
Anti-Dihydropyrimidinase-related protein 2, rabbit	Sigma	1:10000
Anti-Tubulin alpha 1A, mouse	Abcam	1:10000
Anti-Rabbit-HRP	Cell Signaling	1:5000
Anti-Mouse-HRP	Cell Signaling	1:10000

Am nächsten Tag wurde die Nitrozellulosemembran durch 3 x 5-minütige TBST-Waschschritte von überschüssigen, nicht gebundenen Primärantikörpern gereinigt. Anschließend wirkte die hinzugegebene Sekundärantikörperlösung (10 ml) für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln auf die Proben ein. Daran schloss sich erneut 3 x 5-minütiges Waschen mit TBST an.
Die Entwicklung des Blottes erfolgte mit Hilfe von Chemilumineszenzsubstraten (ECL-Lösung bzw. DURA-West) auf Röntgenfilmen nach definierten Zeiten von 0,5 - 10 Minuten.
Für die Auswertung und zur Dokumentation wurde der Röntgenfilm nach Kennzeichnung der Markerbanden digitalisiert.

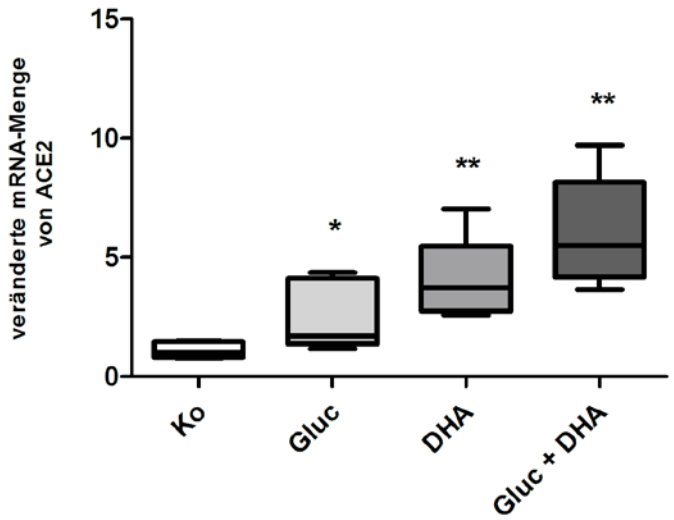
Auswerten von Western Blots

Zur quantitativen Auswertung von Western Blots wurde die Software *Image J* genutzt. Dieses Programm ermöglicht Angaben über den Pixelwert eines ausgewählten Bereichs (Bande) anhand von Graustufen-Intensitäten. Normalisiert man die Banden des zu untersuchenden Proteins (Thioredoxin-Reduktase 1 bzw. Dihydropyrimidinase-related protein 2) durch Division mit den Banden der Ladekontrolle (Tubulin alpha-1A), konnten Aussagen über die Quantität des Proteins in den jeweiligen Situationen getroffen werden.
Die ermittelten Quotienten wurden in Graph Pad Prism 5 geladen und mittels des Mann-Whitney Testes (95%iges Konfidenzintervall, *two-tailed-P-value*) auf Signifikanz untersucht. Hochsignifikante Werte ($p<0,001$) wurden mit ***, sehr signifikante Werte ($p<0,01$) mit ** und signifikante Werte ($p<0,05$) mit * gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 ACE2 mRNA Expressionsveränderung

Zu Beginn der Versuche wurde die Expression von *Angiotensin-Converting-Enzyme2* (ACE2) auf mRNA-Ebene in BRIN-BD11 Zellen untersucht. Es wurde eine signifikante Erhöhung der Expression unter allen drei Stimulationen beobachtet (Abbildung 8). Bei der Kontroll-Behandlung lag der Median bei 1,00 unter Glucose Behandlung lag er bei 1,69. Als Folge von DHA-Stimulation kam es zu einem Anstieg des Medianes auf 3,71 und bei der kombinierten Stimulation mit Glucose und DHA lag der Median bei 5,51. Somit konnten die Ergebnisse aus vorherigen Experimenten der Arbeitsgruppe zu den ACE2-mRNA Veränderungen als Funktion des Glucose- und DHA-Gehaltes reproduziert werden.



RT-qPCR Daten für ACE2

ACE2	Ko	Gluc	DHA	Gluc+ DHA
n	5	5	5	5
Median	1,00	1,69	3,71	5,51
σ (SD)	0,29	1,47	1,77	2,32

Abbildung 8: links: veränderte mRNA-Menge von ACE2 rechts: RT-qPCR Daten für ACE 2

Mann-Whitney-Test: n = 5; p<0,001 ≙ ***; p<0,01 ≙**; p<0,05 ≙*

Die statistischen Daten der RT-qPCR für ACE2 sind in Tabelle 13 zusammengestellt.

Tabelle 13: RT-qPCR-Datenauswertung für ACE2

ACE2	Gluc zu Ko	DHA zu Ko	Gluc+DHA zu Ko	DHA zu Gluc	Gluc+DHA zu Gluc	Gluc+DHA zu DHA
Quotient der Mediane	**1,69**	**3,17**	**5,51**	**2,20**	**3,26**	**1,49**
p-Wert	0,032	0,008	0,008	0,310	0,032	0,222
Signifikanz MW-Test	*	**	**	ns	*	ns

4.2 DIGE Analyse von BRIN-BD11 Zellen

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Proteine von BRIN-BD11 Zellen. Dafür wurden die Zellen nach der jeweiligen Stimulation (Ethanol, Glucose, DHA oder die Kombination von Glucose und DHA) mit TriFast™ aufgeschlossen, die Proteine präpariert, in der ersten Dimension in einem pH-Gradienten von 3-10 NL separiert und dann in einem 12%igem SDS-Gel nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Färbung der Proteine erfolgte mit DIGE und Coomassie. Als Kontrolle wurden die mit Ethanol stimulierten Proben verwendet.

Die Auswertung der eingescannten Gelbilder geschah mit Hilfe der Delta2D Software.

Für jede Stimulationssituation wurden im DIGE Experiment 4 technische Replikate erzeugt und analysiert. Im Zuge dieses Verfahrens wurden 1487 Proteinspots im DIGE-Projekt detektiert.

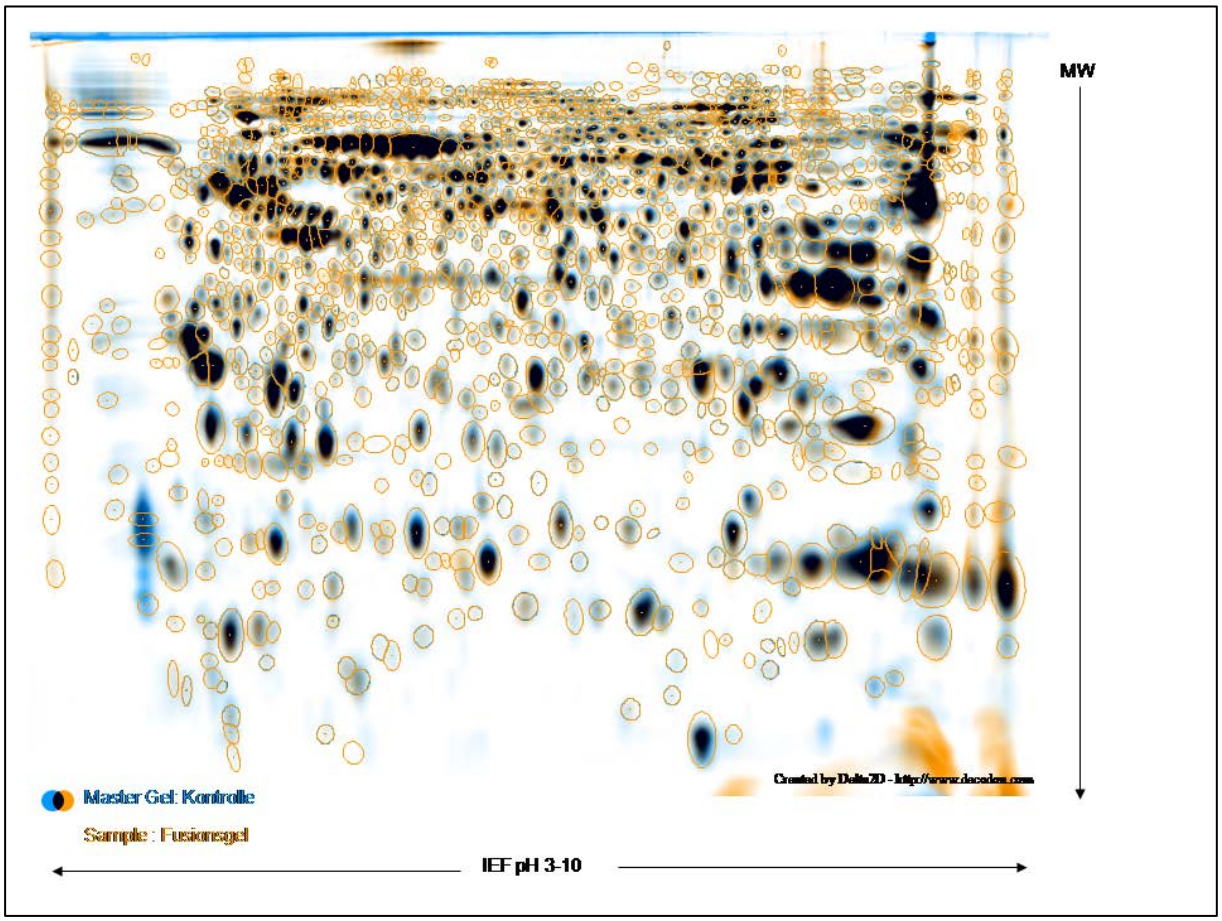


Abbildung 9: Übersichtsbild aller 1487 detektierten Spots im DIGE-Projekt

150 µg Protein der BRIN-BD11 Zellen; 1. Dimension: IPG-Streifen, pH 3-10 NL; 2. Dimension: 12% SDS PAGE; DIGE-Färbung

4.2.1 Differentielle Expression von Proteinen der BRIN-BD11 Zellen

Die Quantifizierung der Intensität der detektierten 1487 Proteinspots erfolgte mittels Delta2D. Dazu wurde nach allen Spots gefiltert, die mindestens eine 1,5-fache Veränderung in der Spotintensität aufwiesen, deren *Student's*-T-Test p-Value kleiner 0,05 war und deren Koeffizient der Variation innerhalb einer Stimulationsgruppe kleiner als 30% war. Waren diese drei Kriterien unter einer Stimulation erfüllt, wurde der Proteinspot als signifikant reguliert definiert. Bezogen auf die Kontrollen waren 9 Spots unter Glucosestimulation erhöht und ein Spot vermindert exprimiert. Bei 64 Spots war unter Docosahexaensäure (DHA) eine erhöhte Spotintensität zu registrieren und bei 17 Spots nahm deren Intensität ab. 10 Spots hatten bei gleichzeitiger Gabe von Glucose und DHA eine erhöhte- und vier eine erniedrigte Spotintensität. In der Summe waren insgesamt 70 Spots vermehrt und 20 Spots vermindert exprimiert, wobei 12 Spots unter mehr als einem Stimulanz signifikant verändert waren. Die Verteilung der signifikant regulierten Spots auf die vorgenommenen Stimulationen ist in Tabelle 14 gegenübergestellt und in Abbildung 10 an Hand eines Venndiagrammes visualisiert. Der Abbildung 11 kann die Lokalisation der 90 regulierten Proteinspots auf den DIGE-Gelen entnommen werden.

Tabelle 14: Verteilung der 90 signifikant regulierten Spots auf die Behandlungsgruppen

	Glucose Stimulation	DHA Stimulation	Glucose + DHA Stimulation	über alle Stimulationen
Erhöhte Spotintensität	9	64	10	70
Erniedrigte Spotintensität	1	17	4	20
Σ	10	81	14	

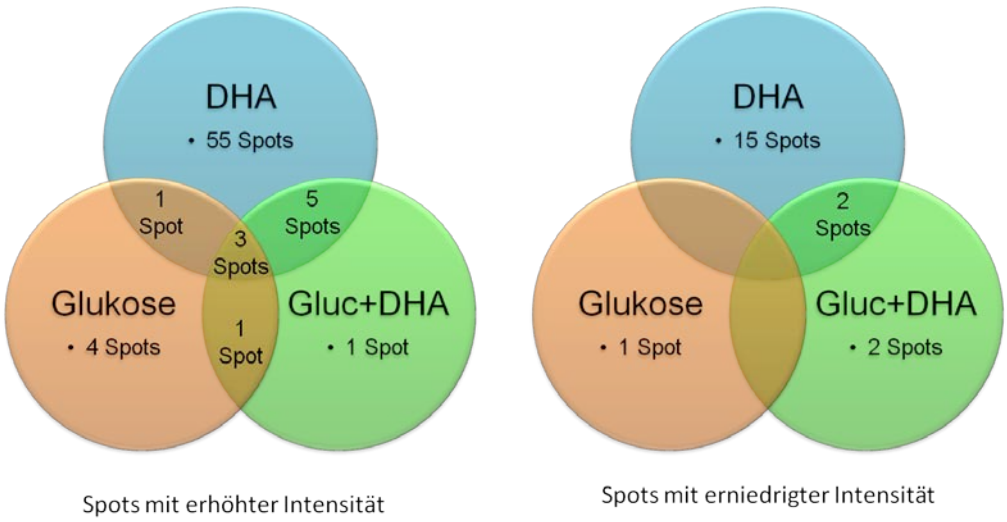


Abbildung 10: Venndiagramm zur Darstellung der Verteilung der 90 signifikant regulierten Spots

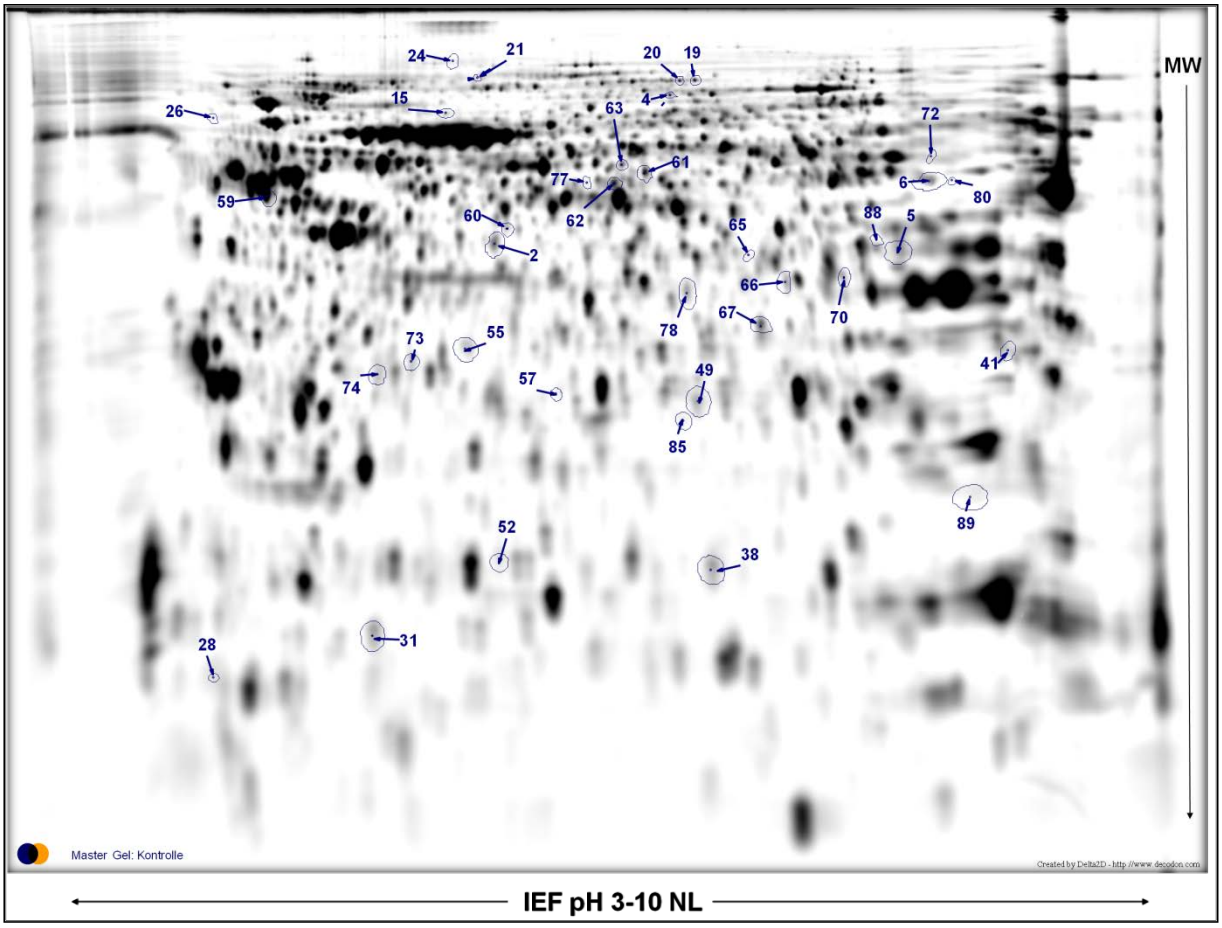


Abbildung 11: Übersichtsbild aller signifikant regulierten Spots im DIGE Projekt

150 µg Protein der BRIN-BD11 Zellen; 1. Dimension: IPG-Streifen, pH 3-10 NL; 2. Dimension: 12% SDS PAGE; DIGE-Färbung

In Tabelle 15 sind die signifikant veränderten Spots, sortiert nach der Stimulationssituation, aufgelistet. Dabei gibt der jeweilige Ratio-Wert eines Spots das Verhältnis des durchschnittlichen, normalisierten Volumens in den Gelen der entsprechenden Stimulation zu dem durchschnittlichen, normalisierten Volumen dieses Spots in den Kontrollgelen an. In der letzten Spalte wird veranschaulicht, unter welchen Stimulationen der Spot signifikant verändert ist. Ein rot hinterlegter, nach oben gerichteter Pfeil gibt an, dass alle drei Signifikanz-Kriterien (min. 1,5-fache Veränderung in der Spotintensität, *Student's*-T-Test p-Value < 0,05, Koeffizient der Variation innerhalb der Stimulationsgruppe < 30%) erfüllt sind. Der Spot ist hochreguliert. Ein grün hinterlegter, nach unten gerichteter Pfeil signalisiert, dass der Spot alle Signifikanz-Kriterien unter der jeweiligen Situation erfüllt und vermindert exprimiert ist. Die nicht farblich hinterlegten Pfeile zeigen an, dass der Spot unter einer anderen Stimulation ebenfalls einen mindestens 1,5-fach veränderten Ratio-Wert aufweist. Ein Minusstrich wurde gesetzt, wenn der Ratio-Wert nicht 1,5-fach reguliert war und oder der *Student's*-T-Test ein p-Value größer 0,05 ausgab.

Tabelle 15: Differenziell exprimierte DIGE-Spots in den Behandlungsgruppen

Spot Nummer	Ratio Gluc /Ko	Ration DHA /Ko	Ratio (Gluc+ DHA) /Ko	Visualisierung der Regulation		
1	-1,719	-3,693	-1,799	↓	↓	–
2	1,557	1,374	1,424	↑	–	–
3	1,673	2,817	2,394	↑	↑	↑
4	1,667	1,037	1,327	↑	–	–
5	1,553	1,377	1,596	↑	–	↑
6	1,866	2,896	1,836	↑	↑	↑
7	1,695	3,188	1,579	↑	↑	↑
8	1,520	1,899	1,381	↑	↑	–
9	2,820	7,081	2,829	↑	↑	↑
10	2,411	2,336	4,633	↑	–	–
11	-1,228	-1,685	-1,384	–	↓	–
12	-1,227	-1,797	-1,244	–	↓	–
13	-1,320	-1,512	-1,175	–	↓	–
14	-1,028	-1,691	-1,293	–	↓	–
15	-1,186	-1,504	1,135	–	↓	–
16	-1,070	-1,522	1,130	–	↓	–
17	-1,158	-1,527	-1,039	–	↓	–
18	1,001	-1,554	-1,258	–	↓	–
19	-1,115	-1,714	-1,432	–	↓	–
20	-1,061	-1,508	-1,274	–	↓	–
21	-1,186	-1,501	-1,044	–	↓	–
22	-1,275	-1,576	-1,526	–	↓	↓
23	-1,409	-1,790	-1,567	–	↓	↓
24	-1,320	-1,538	-1,292	–	↓	–
25	-1,719	-3,693	-1,799	↓	↓	–
26	1,081	-2,309	-1,100	–	↓	–
27	-1,619	-2,281	-2,152	–	↓	–
28	1,213	1,517	1,241	–	↑	–
29	1,158	1,526	1,186	–	↑	–
30	1,171	1,531	1,235	–	↑	–
31	1,081	1,509	1,303	–	↑	–
32	1,192	1,567	1,165	–	↑	–
33	1,117	1,907	1,359	–	↑	–
34	1,207	1,976	1,355	–	↑	–
35	1,192	1,639	1,380	–	↑	–
36	1,402	1,849	1,474	–	↑	–
37	1,316	1,748	1,331	–	↑	–
38	1,432	1,988	1,521	–	↑	↑
39	1,458	1,800	1,529	–	↑	–
40	1,232	1,528	1,140	–	↑	–
41	1,304	1,984	1,450	–	↑	–
42	1,298	1,677	1,391	–	↑	–
43	1,313	1,633	1,420	–	↑	–
44	1,214	1,693	1,339	–	↑	–

Spot Nummer	Ratio Gluc /Ko	Ration DHA /Ko	Ratio (Gluc+ DHA) /Ko	Visualisierung der Regulation		
45	1,251	1,721	1,327	–	↑	–
46	1,190	1,610	1,188	–	↑	–
47	1,124	1,589	1,172	–	↑	–
48	1,161	1,763	1,218	–	↑	–
49	1,053	1,755	1,184	–	↑	–
50	1,229	1,642	1,290	–	↑	–
51	1,174	1,598	1,231	–	↑	–
52	1,361	1,757	1,440	–	↑	–
53	-1,064	1,679	1,080	–	↑	–
54	1,159	1,647	1,214	–	↑	–
55	1,179	1,552	1,153	–	↑	–
56	1,199	1,669	1,219	–	↑	–
57	1,237	1,867	1,322	–	↑	–
58	1,222	1,946	1,335	–	↑	–
59	1,331	1,636	1,292	–	↑	–
60	1,309	1,746	1,259	–	↑	–
61	1,198	1,582	1,145	–	↑	–
62	1,176	1,535	1,208	–	↑	–
63	-1,092	1,613	1,146	–	↑	–
64	1,045	1,621	1,189	–	↑	–
65	1,270	1,590	1,476	–	↑	–
66	1,079	1,607	1,133	–	↑	–
67	1,156	1,754	1,199	–	↑	–
68	1,520	1,899	1,381	↑	↑	–
69	1,385	1,761	1,278	–	↑	–
70	1,264	1,949	1,371	–	↑	–
71	1,261	1,635	1,229	–	↑	–
72	1,089	1,520	1,145	–	↑	–
73	1,192	1,576	1,245	–	↑	–
74	1,128	2,059	1,205	–	↑	–
75	1,135	2,431	1,243	–	↑	–
76	1,427	2,418	1,347	–	↑	–
77	1,673	2,817	2,394	↑	↑	↑
78	1,350	2,347	1,292	–	↑	–
79	1,060	2,367	1,381	–	↑	–
80	2,536	7,616	1,607	–	↑	–
81	1,300	2,184	1,587	–	↑	↑
82	1,442	2,533	1,427	–	↑	–
83	1,488	2,450	1,536	–	↑	↑
84	-1,008	2,425	1,557	–	↑	↑
85	1,289	2,038	1,290	–	↑	–
86	-1,012	3,218	1,342	–	↑	–
87	1,447	2,101	1,478	–	↑	–
88	-1,171	-1,303	-1,557	–	–	↓
89	1,048	-1,126	-1,592	–	–	↓
90	1,166	1,278	1,529	–	–	↑

4.2.2 Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF-TOF

In einem nächsten Schritt wurde ein präparatives Gel mit 500 µg Protein-Pool (bestehend aus Kontroll-, Glucose-, DHA, Glucose+DHA-Stimulationsproben) angefertigt und mit Coomassie gefärbt. Alle sichtbaren Spots des Gels wurden ausgestochen und für die MS-Analyse in 96-Well-Platten überführt. Eine Übersicht der 949 ausgestochenen Spots ist in Abbildung 12 zu sehen.

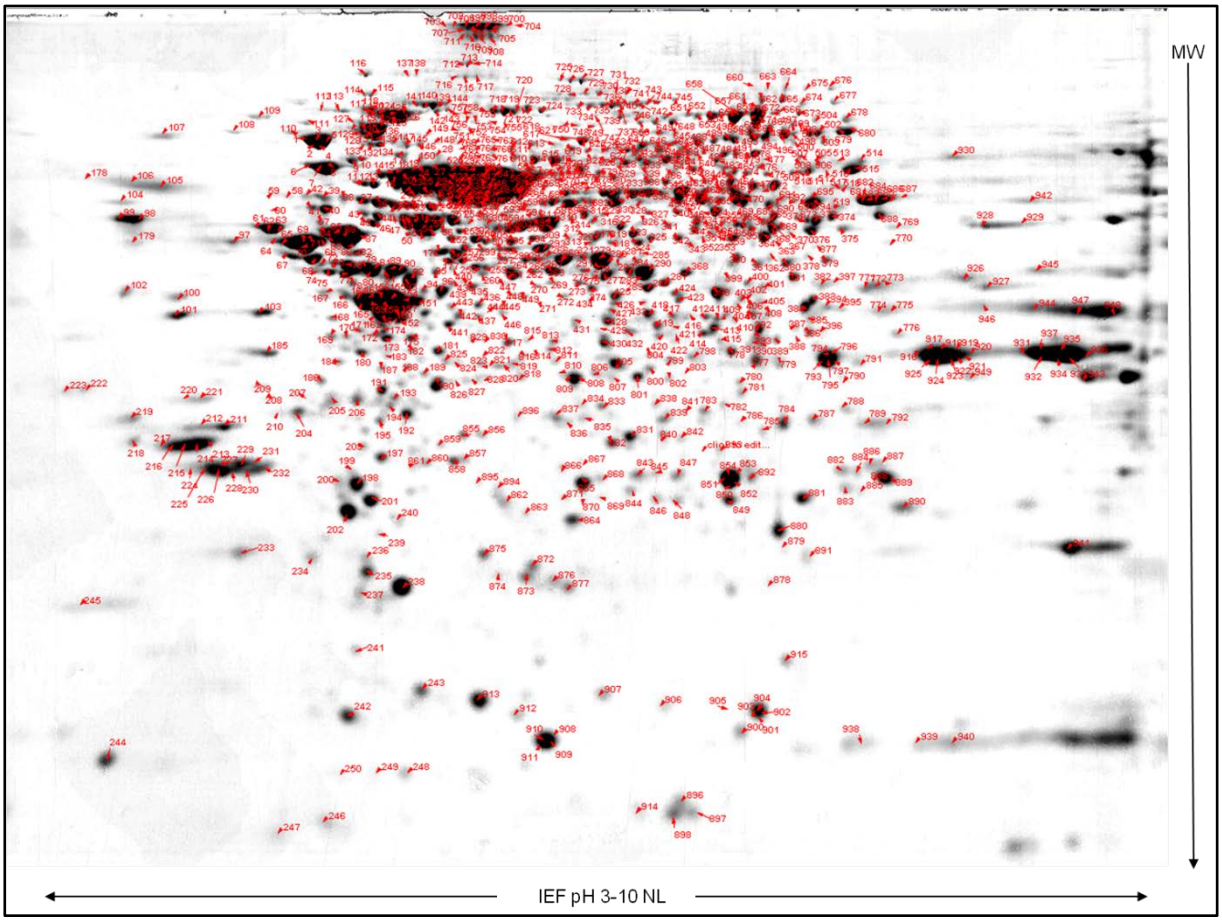


Abbildung 12: Übersicht aller 949 ausgestochenen Proteinspots

500 µg Protein der BRIN-BD11 Zellen; 1. Dimension: IPG-Streifen, pH 3-10 NL; 2. Dimension: 12% SDS-PAGE; Coomassie-Färbung

Mittels der MALDI-TOF-TOF und der Datenbankanalyse konnten 1101 Proteine aus dem präparativen Gel identifiziert werden. Von den 90 signifikant regulierten Spots aus den DIGE gefärbten Gelen konnten 36 eindeutig identifiziert werden. Die Datenbankanalyse erbrachte den Nachweis über 63 Proteine (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Übersicht der detektierten, identifizierten und in ihrer Intensität differenzielle expri einemierten Spots

detektierte Spots (DIGE)	1487	regulierte Spots (DIGE)	90
MS Analyse (präparatives Gel)	949	MS Analyse (DIGE-Gel)	90
identifizierte Spots	786	identifizierte, regulierte Spots	36
identifizierte Proteine	1101	Identifizierte, regulierte Proteine	63

In Tabelle 17 sind die identifizierten regulierten Proteine nach Funktionsklassen sortiert mit ihrem Molekulargewicht, isoelektrischen Punkt und Protein-Score aufgelistet. Ihre Verteilung auf dem 2D-Gel ist der Abbildung 13 zu entnehmen. Eine Liste aller gefundenen Proteine befindet sich im Anhang.

Tabelle 17: Auflistung der 36 identifizierten und regulierten Proteinspots aus dem DIGE Experiment, sortiert nach Funktionsklassen

Nr.= Nummer; Acc.= Datenbank Accession; MW= theoretisches Molekulargewicht, in kDa; pI= theoretischer, isoelektrischer Punkt; Anz.Pep.= Anzahl gefundener Peptide; Protein Score= Identifikationspunktzahl, der Schwellenwert war 51

Nr.	Acc.	Proteinname	MW in kDa	pI	Anz. Pep.	Prot. Score	Visualisierung der Regulation		
Glykogenstoffwechsel									
4	PYGB	Glycogen phosphorylase, brain form (Fragment)	96,11	6,2	32	540	↑	–	–
19	PYGB	Glycogen phosphorylase, brain form (Fragment)	96,11	6,2	7	57	–	↓	–
19	PYGL	Glycogen phosphorylase, liver form	97,42	6,8	5	51	–	↓	–
Glykoloyse									
15	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	44,51	8,0	15	297	–	↓	–
5	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	39,33	8,3	20	365	↑	–	↑
6	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	39,33	8,3	7	100	↑	↑	↑
59	KPYM	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57,78	6,6	9	158	–	↑	–
77	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	39,33	8,3	8	191	↑	↑	↑
21	ENOA	Alpha-enolase	47,10	6,2	12	106	–	↓	–
21	ENOB	Beta-enolase	46,98	7,1	4	51	–	↓	–
62	ENOA	Alpha-enolase	47,10	6,2	9	69	–	↑	–
Zitronsäurezyklus									
20	ODO1	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochondrial	116,22	6,3	26	134	–	↓	–
60	SUCB1	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	50,08	6,6	16	307	–	↑	–
67	FUMH	Fumarate hydratase, mitochondrial	54,43	9,1	5	68	–	↑	–
Atmungskette									
6	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	59,72	9,2	11	208	↑	↑	↑
26	ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	56,32	5,2	9	322	–	↓	–
41	ATPG	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	30,17	8,9	7	70	–	↑	–
59	ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	23,58	5,2	5	381	–	↑	–
74	ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	56,32	5,2	4	53	–	↑	–
78	ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	56,32	5,2	5	251	–	↑	–
80	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	59,72	9,2	3	47	–	↑	–

Nr.	Acc.	Proteinname	MW in kDa	pI	Anz. Pep.	Prot. Score	Visualisierung der Regulation		
85	ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	56,32	5,2	24	573	–	↑	–
88	DHSA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	71,57	6,8	28	599	–	–	↓
Pentosephosphatweg									
66	TALDO	Transaldolase	37,44	6,6	19	256	–	↑	–
Fettstoffwechsel									
65	ACADS	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	44,74	8,5	14	116	–	↑	–
Transkription/Translation / Nukleotidmetabolismus									
19	TRUA	tRNA pseudouridine synthase A	47,49	8,9	10	49	–	↓	–
21	PAIRB	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	44,73	8,6	9	87	–	↓	–
24	ABCF1	ATP-binding cassette sub-family F member 1	95,19	6,3	5	55	–	↓	–
52	NDKB	Nucleoside diphosphate kinase B	17,27	6,9	3	59	–	↑	–
89	NDKB	Nucleoside diphosphate kinase B	17,27	6,9	3	68	–	–	↓
Reperaturmechnismen /Schutzfunktionen									
61	PRP19	Pre-mRNA-processing factor 19	55,20	6,1	18	794	–	↑	–
63	TRXR1	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	54,35	6,0	21	579	–	↑	–
74	GSH0	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	30,53	5,4	5	69	–	↑	–
Zellzykluskontrolle / Apotosis									
72	PDC6I	Programmed cell death 6-interacting protein	96,57	6,2	13	89	–	↑	–
88	CSK21	Casein kinase II subunit alpha	45,04	7,3	19	495	–	–	↓
Abbauende Enzyme									
2	CATD	Cathepsin D	44,65	6,7	9	113	↑	–	–
2	Erlin2	Endoplasmic reticulum lipid raft-associerted protein 2	37,85	5,4	15	262	↑	–	–
15	THOP1	Thimet oligopeptidase	78,34	5,6	22	284	–	↓	–
73	PSME2	Proteasome activator complex subunit 2	26,84	5,5	15	396	–	↑	–
Strukturproteine/Chaperone									
31	TBCA	Tubulin-specific chaperone A	12,74	5,4	13	246	–	↑	–
62	TCPB	T-complex protein 1 subunit beta	57,42	6,0	22	384	–	↑	–
Differenzierung									
52	NDKA	Nucleoside diphosphate kinase A	17,18	6,0	4	71	–	↑	–
63	DPYL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	62,24	6,0	19	175	–	↑	–
89	NDKA	Nucleoside diphosphate kinase A	17,18	6,0	4	80	–	–	↓
Sonstige									
2	MYG1	UPF0160 protein MYG1	42,70	6,5	8	307	↑	–	–
15	KCRU	Creatine kinase, ubiquitous mitochondrial	47,00	8,7	8	50	–	↓	–
24	ALBU	Serum albumin	69,25	5,8	19	427	–	↓	–
28	PDIA4	Protein disulfide-isomerase A4	72,67	5,0	11	85	–	↑	–
38	GDIR1	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	23,39	5,1	12	235	–	↑	↑
49	GDIR1	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	23,39	5,1	4	102	–	↑	–
55	CDV3	Protein CDV3 homolog	24,30	5,7	8	59	–	↑	–
57	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	17,86	8,3	8	207	–	↑	–
59	ANXA4	Annexin A4	35,83	5,3	4	50	–	↑	–
67	1433Z	14-3-3 protein zeta/delta	27,75	4,7	8	197	–	↑	–
67	1433G	14-3-3 protein gamma	28,28	4,8	2	56	–	↑	–
67	1433F	14-3-3 protein eta	28,19	4,8	2	56	–	↑	–
67	1433B	14-3-3 protein beta/alpha	28,04	4,8	1	51	–	↑	–
70	AK1A1	Alcohol dehydrogenase [NADP+]	36,48	6,8	18	474	–	↑	–

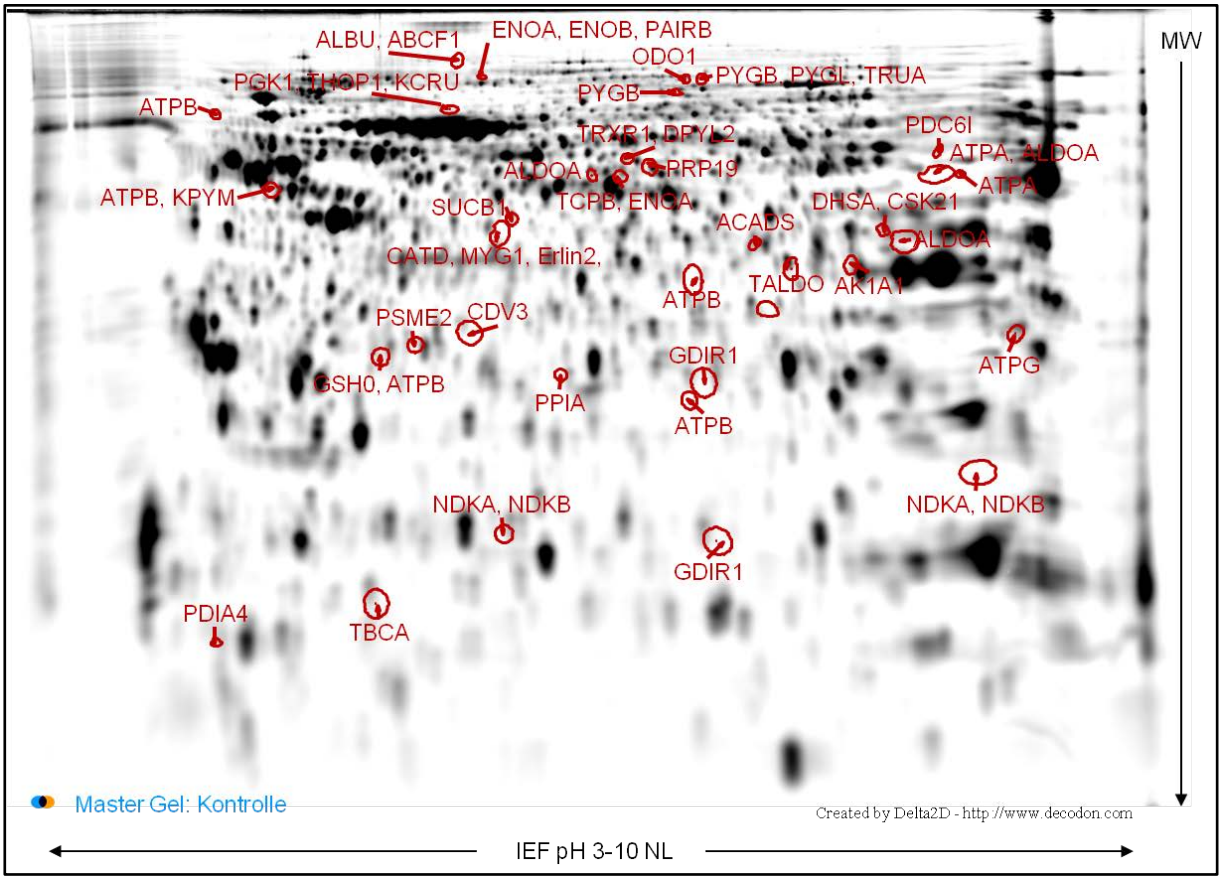


Abbildung 13: regulierte und identifizierte Spots der BRIN-BD11 Zellen

1. Dimension: IPG-Streifen, pH 3-10 NL; 2. Dimension: 12% SDS-PAGE; DIGE-Färbung

4.3 IPA - Analyse

Um Zusammenhänge zwischen den signifikant regulierten und identifizierten Proteinen zu ermitteln, wurden diese einer IPA-Analyse unterzogen. In der Summe wurden durch die Filterbedingung 45 Proteine betrachtet. Die *Ingenuity Pathway Analysis* erzeugte fünf Netzwerke, wobei im Folgenden nur drei abgebildet werden, da die anderen zwei eine zu geringe Aussagekraft haben.

In den Schemata werden hochregulierte Proteine rot und herunter regulierte Proteine grün dargestellt. Gestrichelte Linien stehen für indirekte Beeinflussung. Bei durchgehenden Linien liegt eine direkte Interaktion vor. Linien mit Pfeil stehen für eine Aktivierung, Kausalität, Expression, Lokalisation, Mitgliedschaft, Modifizierung, Molekulare-Spaltung, Phosphorylierung, Protein-DNA-/RNA-Interaktion, Regulierung der Bindung oder Transkription. Linien ohne Pfeil hingegen symbolisieren Chemikalien-Interaktion, Chemikalie-Protein-Interaktion, Korrelation, Protein-Protein- oder RNA-RNA-Interaktionen. Die IPA-Software verwendet für ihre Netzwerke die Kürzel der Gen-Namen der jeweiligen Proteine. In Abbildung 14 sich die Bedeutungen der in den IPA-Netzwerken verwendeten Symbole aufgeführt.

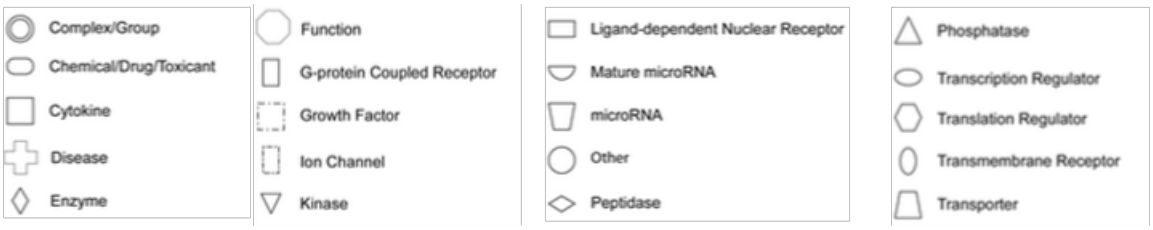


Abbildung 14: Symbol-Legende für die IPA-Netzwerke

In dem *Nucleic Acid Metabolism, Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry (SMB)* – Netzwerk, dass 35 Proteine umfasst, wurden 15 Proteine aus unserem DIGE-Projekt gefunden und ein Score von 30 errechnet (vergleiche
Abbildung 15).

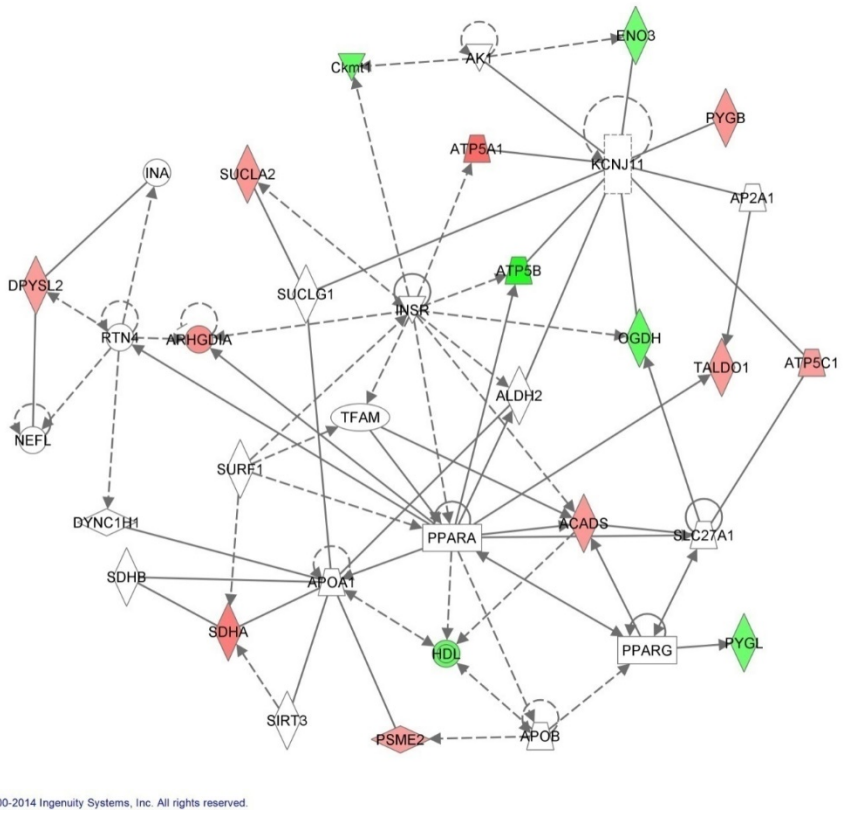


Abbildung 15: IPA-Netzwerk 1: "Nucleic Acid Metabolism, Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry"

Das *DNA Replication, Recombination, and Repair, Nucleic Acid Metabolism, Small Molecule Biochemistry* – Netzwerk (Abbildung 16), umfasst ebenfalls 35 Proteine, wovon 14 zu unseren signifikant regulierten Proteinen zählen. Der Score wurde für das zweite Netzwerk mit 27 angegeben. Im dritten Netzwerk, *Carbohydrate Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry*, das wiederum aus 35 Proteinen besteht, wurden 20 unserer veränderten Proteine wiedergefunden und ein Score von 20 ermittelt (Abbildung 17).

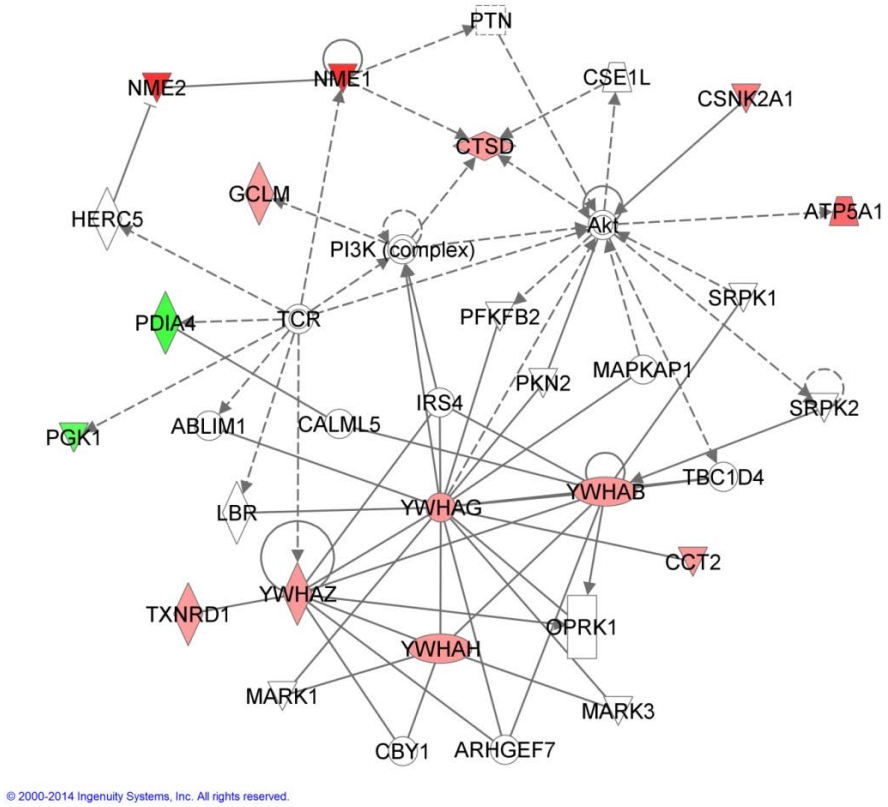


Abbildung 16: IPA-Netzwerk 2: "DNA Replication, Recombination and Repair, Nucleic Acid Metabolism, Small Molecule Biochemistry"

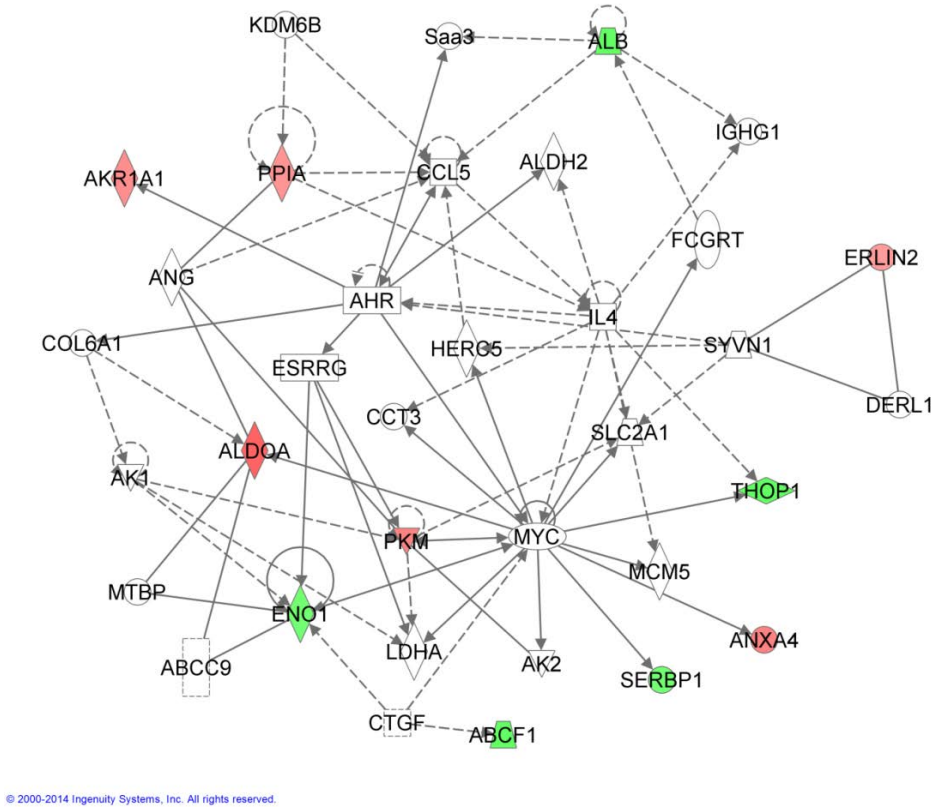


Abbildung 17: IPA-Netzwerkt 3: "Carbohydrate Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry"

Die IPA Analyse ermöglichte weiterhin eine Zuordnung der identifizierten Proteine zu ihrer subzellulären Lokalisation. Dabei wurden von den 45 untersuchten Proteinen 37 dem Zytoplasma, 4 dem Zellkern und 2 der Plasmamembran zugeordnet. Bei 2 Proteinen war eine exakte Zuordnung nicht möglich.

In einem nächsten Schritt clusterte das Programm die eingeladenen Proteine nach ihren Funktionstypen. 20 der 45 Proteine gehören der Gruppe der Enzyme an, 7 der Gruppe der Kinasen, 5 der Gruppe der Transporter, 3 gehören zu den Peptidasen, 2 zu den Transportregulatoren und 8 Proteinen konnte kein eindeutiger Funktionstyp zugeordnet werden. Diese Daten sind in Abbildung 18 veranschaulicht.

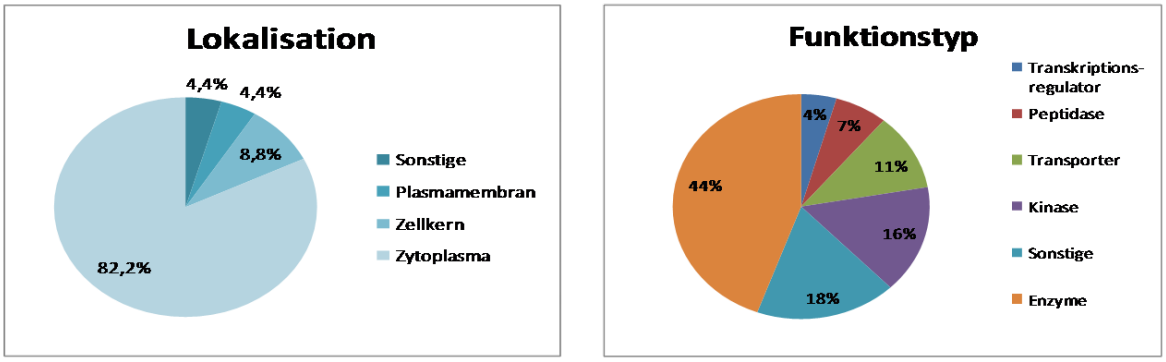


Abbildung 18: IPA-Analyse: Aufschlüsselung der 45 Proteine nach Lokalisation und Funktionstyp

4.4 Verifizierung der Daten anhand ausgewählter Kandidaten auf mRNA- und Proteinebene

Im Zusammenhang mit „oxidativem Stress“ unter Behandlung mit Glucose und oder DHA waren die Proteine Thioredoxin-Reduktase (TRXR1), Glutamat-Cystein-Ligase, modifier subunit (GSH0) und Cathepsin D (CATD) von weiterem Interesse. Da in den entsprechenden Spots weitere Proteine nachgewiesen wurden, erfolgte zudem die Untersuchung von Endoplasmic reticulum lipid raft-associeted protein 2 (ERLIN2), Melanocyte proliferating gene 1 (MYG1) und Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DYPL2). Zur Bestätigung der Expressionsänderung wurden die Proteine auf mRNA-Ebene per RT-qPCR untersucht. Parallel wurden TRXR1 und DYPL2 auf Proteinebene per Western Blot überprüft.

Nachfolgend sind ihre Spotintensitätswerte und Spotbilder gesondert in Tabelle 18 und Abbildung 19 dargestellt. Ein rot hinterlegter nach oben gerichteter Pfeil signalisiert, dass der Spot alle Signifikanz-Kriterien unter der jeweiligen Situation erfüllt und das jeweilige Protein vermehrt exprimiert ist. Ein Minusstrich wurde gesetzt, wenn der Ratio-Wert nicht 1,5-fach reguliert war und oder der *Student‘s*-T-Test ein p-Value größer 0,05 ausgab.

Tabelle 18: Delta2D Relationen ausgewählter Proteinspots

Protein-name	Gen-Name	Spot Nr.	Ratio Gluc /Ko	Ratio DHA /Ko	Ratio (Gluc+ DHA) /Ko	Visualisierung der Regulation		
CATD	CTSD	2	1,557	1,374	1,424	↑	–	–
Erlin 2	ERLIN2	2	1,557	1,374	1,424	↑	–	–
MYG1	MYG1	2	1,557	1,374	1,424	↑	–	–
TRXR1	TXNRD1	63	-1,092	1,613	1,146	–	↑	–
DYPL2	CRMP2	63	-1,092	1,613	1,146	–	↑	–
GSH0	GCLM	74	1,128	2,059	1,205	–	↑	–

Für die Spotdarstellung wurden Fusionsgele aus den jeweiligen Kontroll- und Stimulationsgelen des DIGE-Projektes erzeugt.

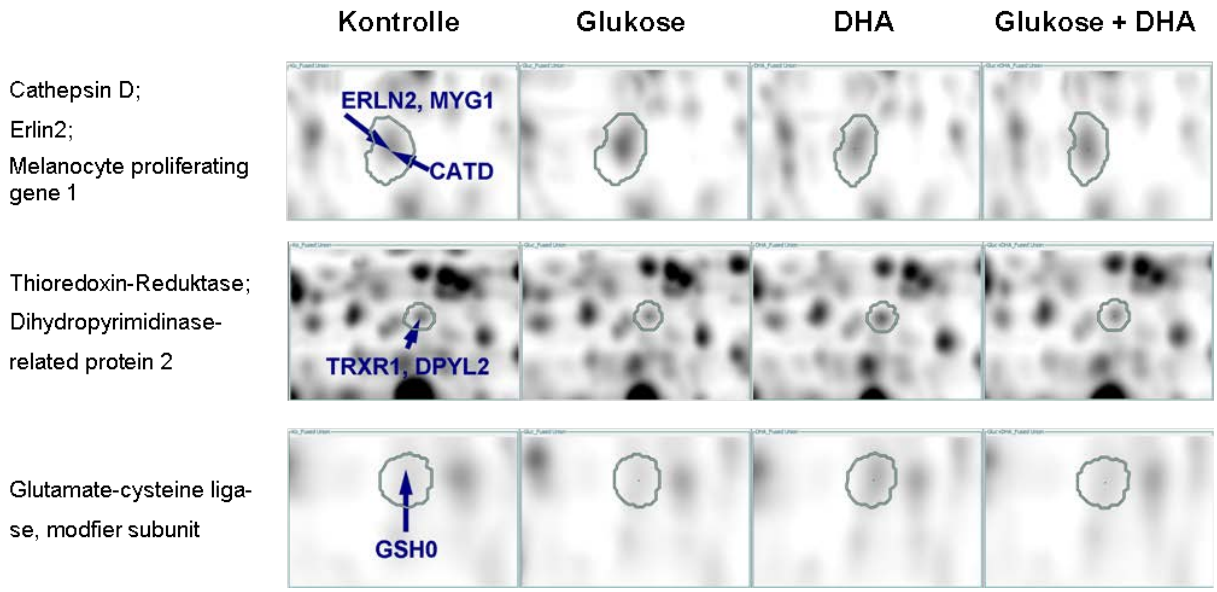


Abbildung 19: Gegenüberstellung von Kontroll-, Glucose-, DHA-, Glucose+DHA-Fusionsbildern anhand ausgewählter Spots, Ergebnisse von Einzelspots nach Identifizierung mittels MALDI-TOF-TOF

4.4.1 mRNA-Analyse

Die in den 2D-Gelen detektierte Überexpression von Thioredoxin-Reduktase1, ERLIN2, Cathepsin D, Glutamat-Cystein-Ligase-Modifikator-Untereinheit, Dihydropyrimidinase-related protein 2 und Melanocyte proliferating gene 1 wurde mit einer weiteren Methode - der quantitative-real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) - untersucht.

Zur Überprüfung der Primerspezifität wurden die RT-qPCR-Produkte mit einem DNA-Marker in einem Agarosegel aufgetragen. Die Agarosegele sind in Abbildung 20 gezeigt.

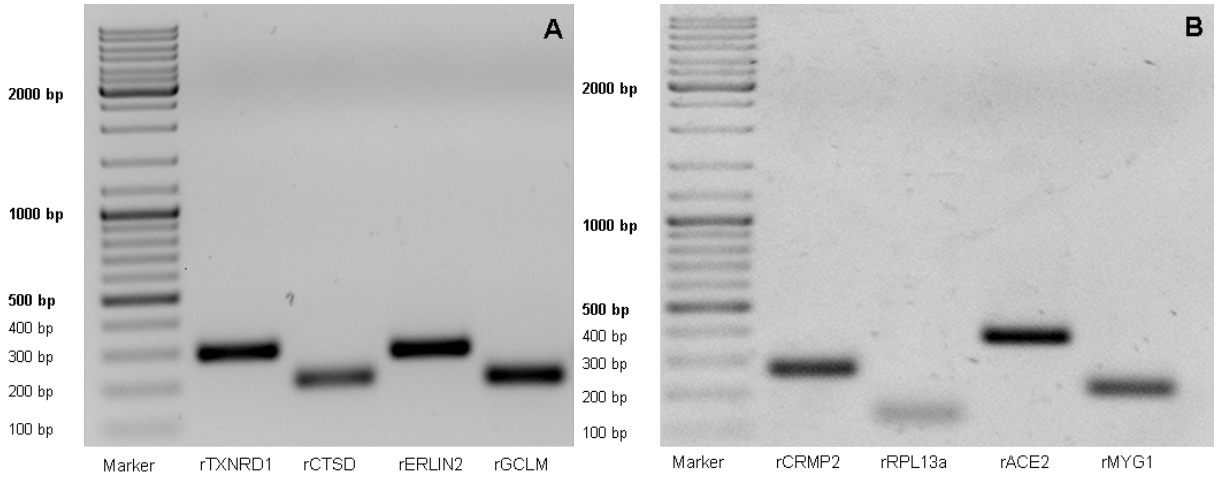


Abbildung 20: Primerprodukte aufgetragen in 1,5%-igem Agarosegel

Die RT-qPCR-Produkte zeigten im Agarosegel eine einzelne Bande der erwarteten Größe. Als weiteres Qualitätsmerkmal sind in Abbildung 21 die Schmelzpeaks der Schmelzkurven der verwendeten Primerpaare darstellen.

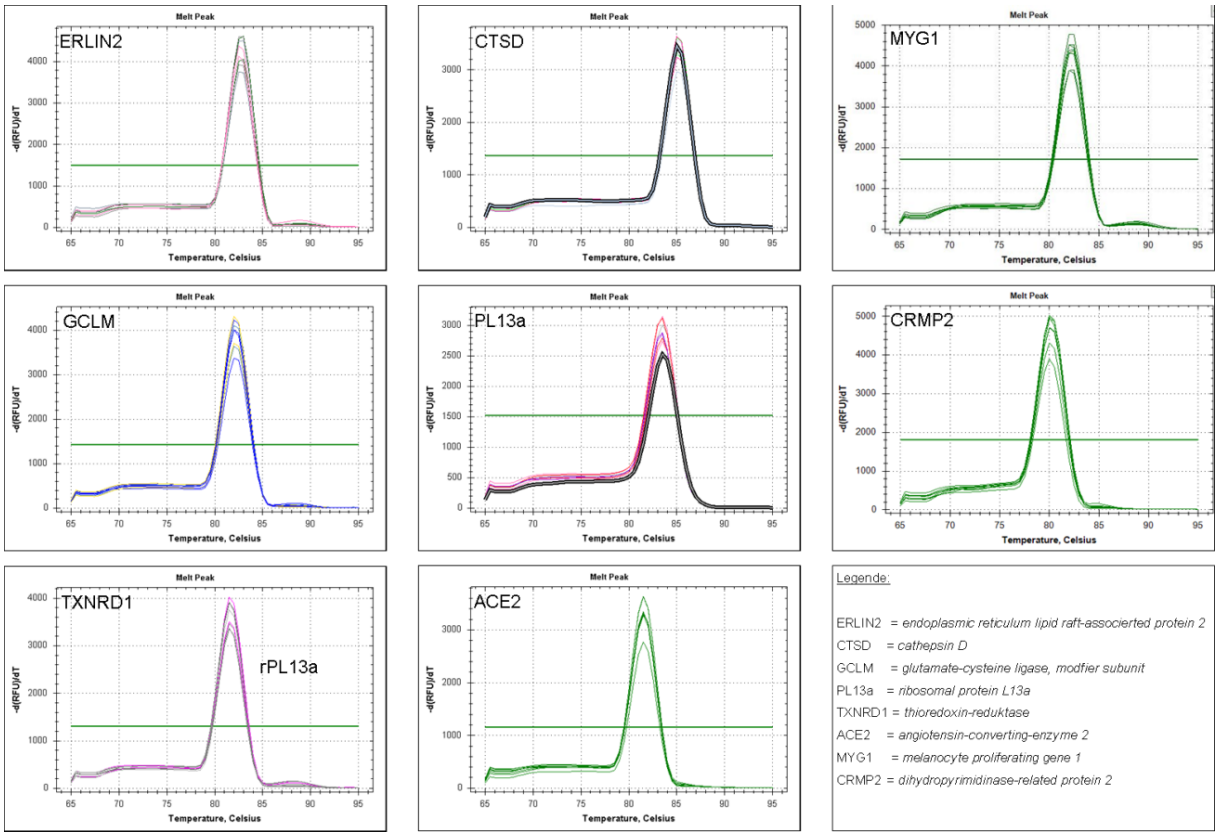


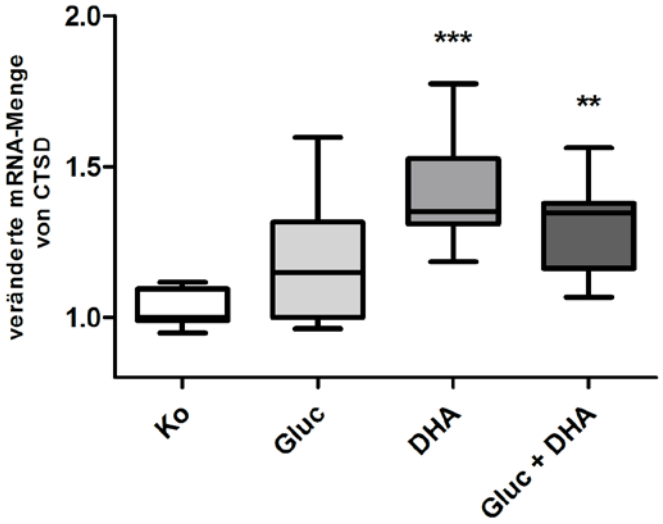
Abbildung 21: Schmelzpeaks der verwendeten Primer

Die RT-qPCR Messungen biologischer Replikate wurden für alle vier Situationen (Ko, Gluc, DHA, Gluc+DHA) vorgenommen. Es erfolgte eine Normalisierung der Werte auf das House-keeping Gen 60S-ribosomales-Protein-L13a (rRPL13A).

In dem DIGE-Spot Nummer 2 wurden drei verschieden Proteine mittels MALDI-TOF-TOF bestimmt. Die RT-qPCR Daten von Cathepsin D, ER lipid raft associated 2 und Melanocyte proliferating gene 1 sind nachfolgend in Abbildung 22, Abbildung 23 und Abbildung 24 dargestellt.

Veränderungen der mRNA-Menge von CTSD

Cathepsin D wies auf mRNA-Niveau unter Glucosestimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe eine 1,15 fache Erhöhung auf. Der 1,35-fache Anstieg unter Zugabe von DHA, ist mit p<0,001 signifikant in Relation zur Kontrolle. Unter Stimulation III (Gluc + DHA) kam es ebenfalls zu einer 1,35-fachen signifikanten Erhöhung (p<0,01).



RT-qPCR Daten für CTSD

CTSD	Ko	Gluc	DHA	Gluc+ DHA
n	7	7	7	7
Median	1,00	1,15	1,35	1,35
σ (SD)	0,06	0,22	0,19	0,16

Abbildung 22: links: veränderte mRNA-Menge von CTSD rechts: RT-qPCR Daten für CTSD

Mann-Whitney-Test: n = 7; p<0,001 ≙ ***; p<0,01 ≙**; p<0,05 ≙*

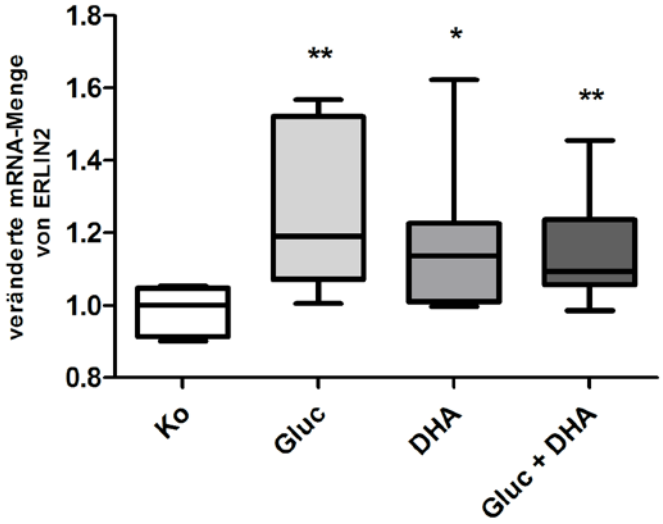
Die weiteren Verhältnisse zwischen den einzelnen Stimulationen sind Tabelle 19 zu entnehmen.

Tabelle 19: RT-qPCR-Datenauswertung für CTSD

CTSD	Gluc zu Ko	DHA zu Ko	Gluc+DHA zu Ko	DHA zu Gluc	Gluc+DHA zu Gluc	Gluc+DHA zu DHA
Quotient der Mediane	**1,15**	**1,35**	**1,35**	**1,17**	**1,17**	**1,00**
p-Wert	0,1649	0,0006	0,0023	0,0379	0,1282	0,4557
Signifikanz MW-Test	ns	***	**	*	ns	ns

Veränderungen der mRNA-Menge von ERLIN2

Die mRNA für *ERLIN2* ist unter Glucosegabe 1,19-fach signifikant (p<0,01) zur Kontrolle hochreguliert. Die Stimulation mit DHA bewirkt einen 1,14-fachen Anstieg mit p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle. Die kombinierte Glucose + DHA-Stimulation bewirkte einen 1,09-fachen Anstieg der ERLIN2 mRNA-Mengen, in BRIN-BD11-Zellen (p<0,01) (vergleiche Tabelle 20).



RT-qPCR Daten für ERLIN2

ERLIN2	Ko	Gluc	DHA	Gluc+ DHA
n	7	7	7	7
Median	1,00	1,19	1,14	1,09
σ (SD)	0,06	0,23	0,21	0,16

Abbildung 23: links: veränderte mRNA-Menge von ERLIN2 rechts: RT-qPCR Daten für ERLIN2

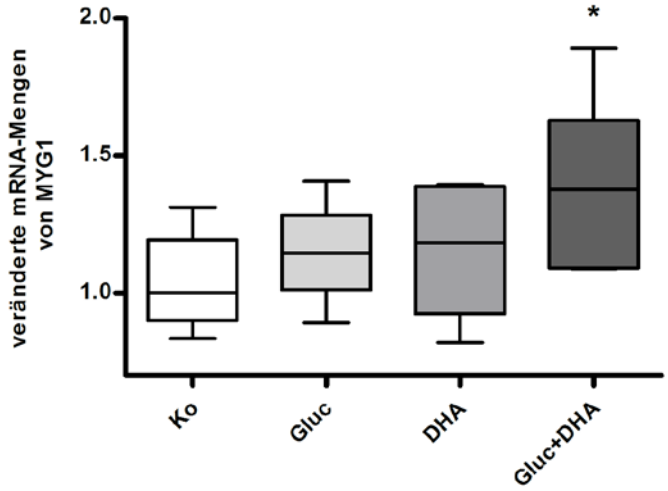
Mann-Whitney-Test: n = 7; p<0,001 ≙ ***; p<0,01 ≙**; p<0,05 ≙*

Tabelle 20: RT-qPCR Datenauswertung für ERLIN2

ERLIN2	Gluc zu Ko	DHA zu Ko	Gluc+DHA zu Ko	DHA zu Gluc	Gluc+DHA zu Gluc	Gluc+DHA zu DHA
Quotient der Mediane	**1,19**	**1,14**	**1,09**	**0,96**	**0,92**	**0,96**
p-Wert	0,0041	0,0262	0,0070	0,6031	0,3759	0,7791
Signifikanz MW-Test	**	*	**	ns	ns	ns

Veränderungen der mRNA-Menge von MYG1

Die mRNA-Menge des Melanocyte proliferating gene 1 zeigte unter Glucosebehandlung einen 1,15-fachen Anstieg und unter DHA-Behandlung einen 1,18-fachen Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Bei gleichzeitiger Zugabe von Glucose und DHA kam es zu einer 1,38-fachen Zunahme der mRNA, was mit p<0,05, bezogen auf die Kontrolle, signifikant ist (Tabelle 21).



RT-qPCR Daten für MYG1

MYG1	Ko	Gluc	DHA	Gluc+DHA
n	6	6	6	6
Median	1,00	1,15	1,18	1,38
σ (SD)	0,174	0,178	0,252	0,305

Abbildung 24: links: veränderte mRNA-Menge von MYG1 rechts: RT-qPCR Daten für MYG1

Mann-Whitney-Test: n = 6; p<0,001 ≙ ***; p<0,01 ≙**; p<0,05 ≙*

Tabelle 21: RT-qPCR-Datenauswertung für MYG1

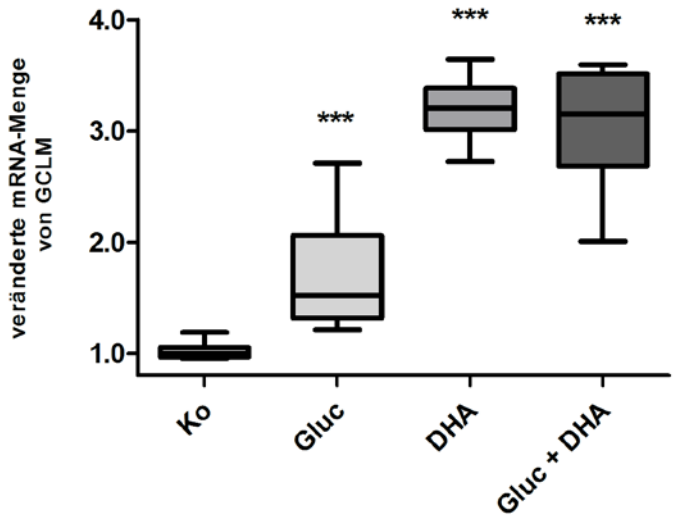
MYG1	Gluc zu Ko	DHA zu Ko	Gluc+DHA zu Ko	DHA zu Gluc	Gluc+DHA zu Gluc	Gluc+DHA zu DHA
Quotient der Mediane	**1,15**	**1,18**	**1,38**	**1,03**	**1,20**	**1,17**
p-Wert	0,3358	0,3939	0,0411	0,3939	0,3939	0,1797
Signifikanz MW-Test	ns	ns	*	ns	ns	ns

Veränderungen der mRNA-Menge von GCLM

Im Weiteren wurde die modifizierende Untereinheit der Glutamat-Cystein-Ligase, die mittels Massenspektrometrie im DIGE-Spot 74 nachgewiesen wurde, bezüglich ihres mRNA-Niveaus untersucht. GCLM wies eine 1,52-fache Erhöhung der mRNA-Menge unter Glucose-Gabe mit p<0,01 auf, sowie einen 3,21-fachen Anstieg bei Stimulation mit DHA, p<0,01. Unter gleichzeitiger Glucose- und DHA-Gabe wurde eine 3,15-fache Steigerung der mRNA-Menge registriert, p<0,01 (Abbildung 25). Die statistischen Daten der GCLM RT-qPCR sind in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: RT-qPCR-Datenauswertung für GCLM

GCLM	Gluc zu Ko	DHA zu Ko	Gluc+DHA zu Ko	DHA zu Gluc	Gluc+DHA zu Gluc	Gluc+DHA zu DHA
Quotient der Mediane	**1,52**	**3,21**	**3,15**	**2,11**	**2,07**	**0,98**
p-Wert	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006	0,0041	0,6894
Signifikanz MW-Test	***	***	***	***	**	ns



RT-qPCR Daten für GCLM

GCLM	Ko	Gluc	DHA	Gluc+ DHA
n	7	7	7	7
Median	1,00	1,52	3,21	3,15
σ (SD)	0,08	0,52	0,29	0,56

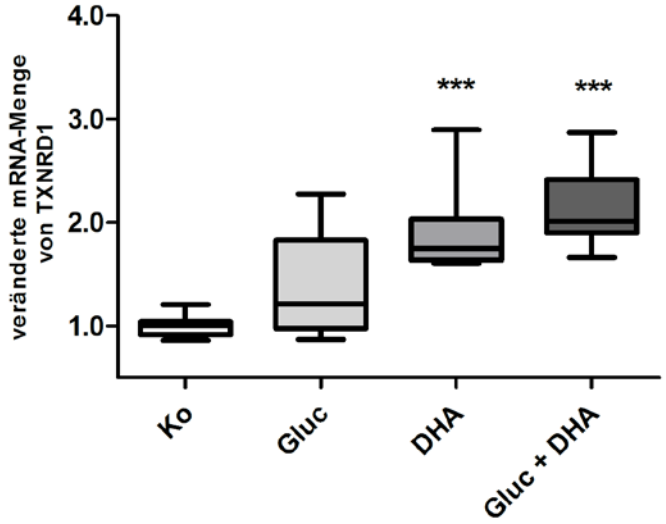
Abbildung 25: links: veränderte mRNA-Menge GCLM rechts: RT-qPCR Daten für GCLM

Mann-Whitney-Test: n = 7; p<0,001 ≙ ***; p<0,01 ≙**; p<0,05 ≙*

Veränderungen der mRNA-Menge von TXNRD1

In dem DIGE-Spot 63 fand die MALDI-TOF-TOF-Analyse die Thioredoxin-Reduktase1 und das Dihydropyrimidinase-related protein 2, deren mRNA-Veränderungen nachfolgend visualisiert sind. Bei der Thioredoxin-Reduktase1 konnte ebenfalls ein Anstieg der mRNA-Menge beobachtet werden, siehe Abbildung 26 und p<0,001 ≙ ***; p<0,01 ≙**; p<0,05 ≙*

Tabelle 23. Bei der Glucose-Stimulation kam es zu einer 1,22-fachen Erhöhung der TXNRD1-mRNA-Mengen. Unter DHA-Gabe war die mRNA signifikant 1,76-fach hochreguliert mit einem p-Value von 0,01. In der Kombinationsbehandlung kam es sogar zu einer 2,02-fachen Vermehrung der mRNA, p<0,01.



RT-qPCR Daten für TXNRD1

TXNRD1	Ko	Gluc	DHA	Gluc+ DHA
n	7	7	7	7
Median	1,00	1,21	1,75	2,01
σ (SD)	0,11	0,50	0,45	0,40

Abbildung 26: links: veränderte mRNA-Menge von TXNRD1 rechts: RT-qPCR Daten für TXNRD1

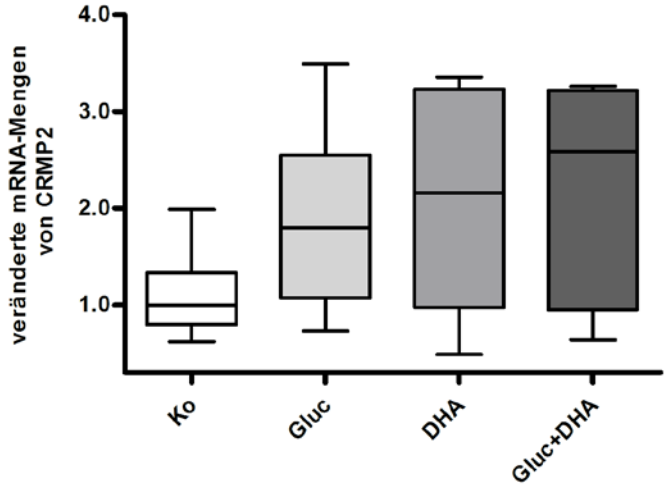
Mann-Whitney-Test: n = 7; p<0,001 ≙ ***; p<0,01 ≙**; p<0,05 ≙*

Tabelle 23: RT-qPCR Datenauswertung für TXNRD1

TXNRD1	Gluc zu Ko	DHA zu Ko	Gluc+DHA zu Ko	DHA zu Gluc	Gluc+DHA zu Gluc	Gluc+DHA zu DHA
Quotient der Mediane	**1,21**	**1,75**	**2,01**	**1,45**	**1,66**	**1,15**
p-Wert	0,1276	0,0006	0,0006	0,0728	0,0111	0,2069
Signifikanz MW-Test	ns	***	***	ns	*	ns

Veränderungen der mRNA-Menge von CRMP2

Bei dem Dihydropyrimidinase-related protein 2 konnte unter Glucose ein 1,8-facher Anstieg der mRNA-Menge beobachtet werden. Unter DHA kam es zu einer 2,16-fachen Hochregulierung und unter kombinierter Stimulation (Glucose + DHA) zu einem 2,59-fachen Anstieg des mRNA-Niveaus, jeweils bezogen auf die Kontrolle. In Tabelle 24 sind die statistischen Daten der RT-qPCR von CRMP2 aufgelistet.



RT-qPCR Daten für CRMP2

CRMP2	Ko	Gluc	DHA	Gluc+ DHA
n	6	6	6	6
Median	1	1,801	2,161	2,586
σ (SD)	0,47	0,96	1,14	1,13

Abbildung 27: links: veränderte mRNA-Menge von CRMP2 rechts: RT-qPCR Daten für CRMP2

Mann-Whitney-Test: n = 6 p<0,001 ≙ ***; p<0,01 ≙**; p<0,05 ≙*

Tabelle 24: RT-qPCR Datenauswertung für CRMP2

CRMP2	Gluc zu Ko	DHA zu Ko	Gluc+DHA zu Ko	DHA zu Gluc	Gluc+DHA zu Gluc	Gluc+DHA zu DHA
Quotient der Mediane	**1,801**	**2,161**	**2,586**	**1,20**	**1,44**	**1,20**
p-Wert	0,0931	0,1320	0,0931	0,9372	0,6991	0,9372
Signifikanz MW-Test	ns	ns	ns	ns	ns	ns

4.4.2 Western Blot Analyse

Expressionsänderungen von TRXR1

Da die Thioredoxin-Reduktase 1 ein entscheidendes Protein im System von „oxidativen Stress“ und Redox-Systemen ist, wurde die Expressionsveränderung von TRXR1 auch auf Western Blot Ebene untersucht. In Abbildung 28 ist exemplarischer ein Blot mit der entsprechenden Tubulin-Kontrolle dargestellt.

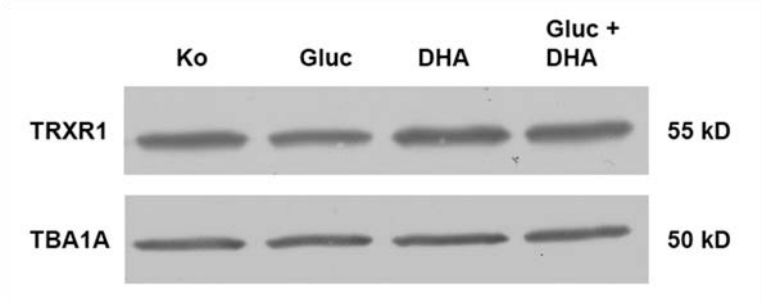
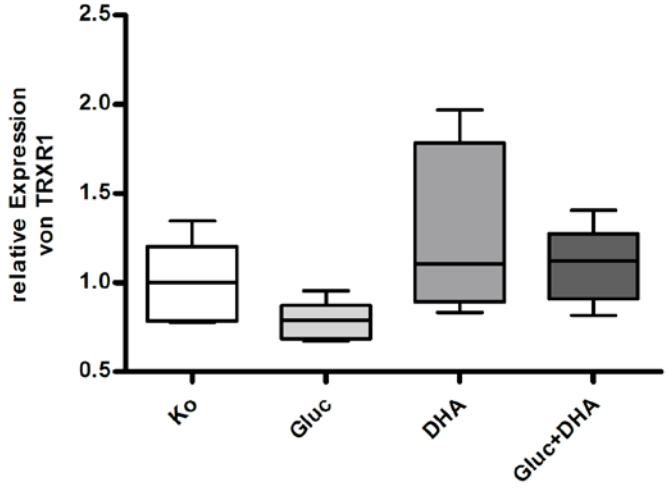


Abbildung 28: Western Blot Analyse von Thioredoxin-Reduktase 1 – Tubulin alpha-1A

Die Auswertung der Western Blots zeigte eine 0,79-fache Abnahme der Thioredoxin-Reduktase 1 unter Glucose-Stimulation. Bei reiner DHA-Behandlung nahm die Expression um das 1,11-Fache zu. In der dritten Stimulation (Gluc+DHA) kam es zu einem 1,12-fachen Anstieg der Proteinmenge. Signifikant ist der Proteinunterschied (1,4-fach) zwischen der DHA- und Glucose-Stimulation mit $p<0,05$. Auch der Vergleich der Gluc+DHA-Gruppe zur reinen Glucose-Gruppe zeigt einen signifikanten, 1,42-fachen Anstieg ($p<0,1$), der TRXR1-Menge. Verglich man das Thioredoxin-Reduktase 1-Niveau nach Gluc+DHA-Stimulation mit der nach reiner DHA-Stimulation, war nur eine minimale Änderung des Medians der Proteinmenge zu ermitteln (siehe Abbildung 29).



Western Blot Daten für TRXR1

TRXR1	Ko	Gluc	DHA	Gluc+ DHA
n	5	5	5	5
Median	1,00	0,79	1,11	1,12
σ (SD)	0,23	0,11	0,48	0,22

Abbildung 29: links: relative Proteinexpressionsveränderung von TRXR1 auf Western Blot Ebene
rechts: Western Blot Daten für DPYL2

Mann-Whitney-Test: n = 5; $p<0,001$ ≙ ***; $p<0,01$ ≙**; $p<0,05$ ≙*

Tabelle 25: Western Blot Datenauswertung für TRXR1

TRXR1	Gluc zu Ko	DHA zu Ko	Gluc+DHA zu Ko	DHA zu Gluc	Gluc+DHA zu Gluc	Gluc+DHA zu DHA
Quotient der Mediane	**0,79**	**1,11**	**1,12**	**1,41**	**1,42**	**1,01**
p-Wert	0,1732	0,3095	0,3095	0,0317	0,0159	0,8413
Signifikanz des Mann-Whitney-Tests	ns	ns	ns	*	*	ns

Expressionsänderung von DPYL2

Da in dem DIGE-Spot Nummer 63 neben TRXR1 auch das Dihydropyrimidinase-related protein 2 nachgewiesen wurde und durch das DIGE-Experiment allein keine Aussage darüber möglich ist, welches der Proteine zu der Expressionsänderung geführt hat, wurde DPYL2 auch auf Protein-Ebene untersucht.

Die Auswertung der Western Blots zeigte eine nur geringfügige, 1,03-fache Erhöhung des Dihydropyrimidinase-related protein 2 unter Glucose-Stimulation. Bei reiner DHA-Behandlung verringerte sich die DPYL2-Menge um das 0,87-fache. In der dritten Stimulation (DHA + Gluc) wurde ebenfalls eine Verringerung der Proteinmenge um das 0,91-fache erreicht. Weitere statistische Daten sind Tabelle 26 zu entnehmen. In Abbildung 31 ist die relative Proteinexpression von DPYL2 im Western Blot mittels eines Box-Plots veranschaulicht.

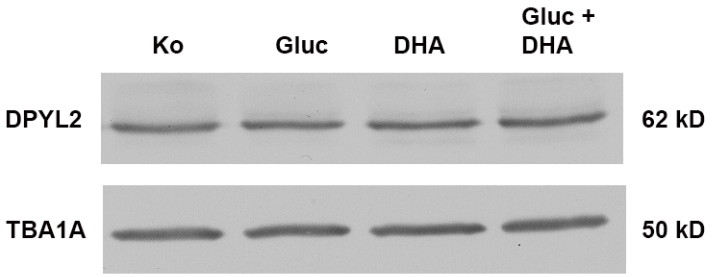
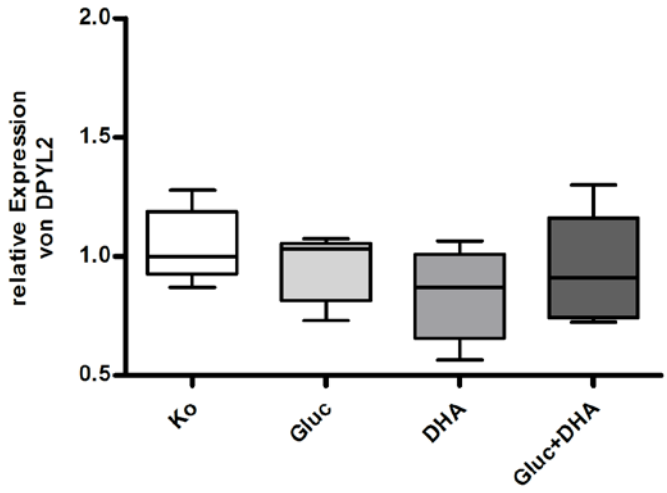


Abbildung 30: Western Blot Analyse von Dihydropyrimidinase-related protein 2 – Tubulin alpha-1A

Tabelle 26: Western Blot Datenauswertung für DPYL2

DPYL2	Gluc zu Ko	DHA zu Ko	Gluc+DHA zu Ko	DHA zu Gluc	Gluc+DHA zu Gluc	Gluc+DHA zu DHA
Quotient der Mediane	**1,03**	**0,87**	**0,91**	**0,84**	**0,88**	**1,05**
p-Wert	0,6667	0,0952	0,5476	0,4206	0,6905	0,6905
Signifikanz MW-Test	ns	ns	ns	ns	ns	ns



Western Blot Daten für DPYL2

DPYL2	Ko	Gluc	DHA	Gluc+ DHA
n	5	5	5	5
Median	1,00	1,03	0,87	0,91
σ (SD)	0,15	0,14	0,19	0,23

Abbildung 31: links: relative Proteinexpressionsveränderung von DPYL 2 auf Western Blot Ebene rechts: Western Blot Daten für DPYL2

Mann-Whitney-Test: n = 5; $p<0{,}01 \triangleq$ ***; $p<0{,}05 \triangleq$**; $p<0{,}1 \triangleq$*

5 Diskussion

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) stellen einen zentralen Punkt in der Entstehung von „oxidativem Stress“ dar. Shin et al. wiesen 2001 eine fünffache Verstärkung des „oxidativen Stresses“ bei diabetischen Patienten im Vergleich zu Gesunden nach. Du et al. (2012) fassen in ihrem Review zusammen, dass der Haupteffekt von vermehrten ROS-Konzentrationen darin liegt, dass sie die Integrität diverser Biomoleküle, einschließlich DNA, Proteinen und Fetten, bedrohen. Stadtman & Berlett (1998) zeigten in ihrem Review, dass ROS mit verschiedensten Aminosäureresten interagieren und damit die Funktion vieler Enzyme und Proteine vermindern oder sogar komplett aufheben.

Guerra et al. (2005) beschrieben, dass die Verwendung von antioxidativen Medikamenten eine Verbesserung der Insulinsekretions-Kapazität sowie der mRNA-Insulin Expression bewirkt. Dass β-Zellen, die mit hohen Glucosekonzentrationen (25 mM) inkubiert wurden, eine verminderte Glucose-stimulierte Insulinausschüttung haben sowie niedrige basale Insulinsekretionen aufweisen – jeweils im Vergleich zu Zellen, die mit 11 mM Glucose gehalten wurden – belegten Maris et al. (2010) anhand ihrer Versuche mit INS-1E Zellen.
Maris et al. wiesen des Weitern 2011 nach, dass (auch) ungesättigte Fettsäuren [Eloate] die Glucose-stimulierte Insulinsekretion der β-Zelle hemmen, wobei die basale Insulinsekretion von der Fettsäurestimulation nicht beeinträchtigt war. Weiterhin kam die Forschungsgruppe um Maris et al. (2011) zu dem Ergebnis, dass eine kombinierte Stimulation mittels freien Fettsäuren und Glucose (25 mM) sowohl die basale, als auch die glucosestimulierte Insulinsekretion vermindert. Zusätzlich stellte sich heraus, dass Oleate in INS-1E zu einer mäßig gesteigerten Apoptoserate führen, welche unter gleichzeitiger Zugabe von 25 mM Glucose weiter anstieg (Maris et al., 2011). Wenn man an die lipo- und glukotoxischen Eigenschaften dieser Stimulanzien denkt, erscheinen diese Beobachtungen schlüssig. Jedoch deuten die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit auf eine Regulation im Sinne einer Kompensation der Stressoren - durch gesteigerte Expression/Aktivität antioxidativer Systeme, wie Glutathion und Thioredoxin - hin.

Am Anfang der Experimente konnte belegt werden, dass der bereits in unserer Forschungsgruppe beobachtete mRNA Anstieg von ACE2 in BRIN-BD11 Zellen reproduzierbar ist. Interessant ist, dass die Fettsäure (DHA) einen stärkeren Stimulus (3,7-fach) zur ACE2 Transkription setzte als die Hoch-Glucose-Gabe (1,7-fach). Hervorzuheben ist der registrierte additive Effekt bei gleichzeitiger Gabe beider Stimulantien (Glucose + DHA) auf die mRNA-Menge von ACE2 (5,5-fach).

Da ACE2 als Membranprotein verfahrensbedingt mittels der DIGE-Technik nicht im 2D-Gel erfassbar ist, konnten keine Zusammenhänge zwischen der jeweiligen Behandlungsgruppe und der ACE2-Regulation auf Proteinebene ermittelt werden.

Mithilfe der Delta2D-Software wurden auf den DIGE gefärbten Gelen 1487 Proteinspots detektiert, wovon 90 Spots eine differentielle Expression aufwiesen. 70 Spots konnten mit erhöhten- und 20 Spots mit verminderter Intensitäten detektiert werden. 12 Spots waren dabei unter mehr als einer Situation signifikant verändert.
Mit insgesamt 81 differentiell auftretenden Spots ist dabei der Einfluss von DHA auf die BRIN-BD11 Zellen am größten (90%). Anders als erwartet, waren unter Glucosezugabe nur 10 Spots (11%) und unter Glucose-DHA-Zugabe nur 14 Spots signifikant reguliert, dies sind 15% aller regulierten Spots. Es kam zu keinem synergetischen Effekt der Kombination beider Stimulantien. Die geringe Überlappung von veränderten Spots zwischen den Situationen lässt auf unterschiedliche Wege als Reaktion auf die Stimulation schließen. Nur 3 Spots waren unter allen Stimulationssituationen hochreguliert. Davon konnte nur 1 Spot mit 2 Proteinen (ATPA, mitochondriale Untereinheit alpha der ATP Synthase; ALDOA, Fruktose-Bisphosphat Aldolase A) identifiziert werden.

Ein umfassendes Proteinmuster der BRIN-BD11 Zellen ist bis dato nicht in der Literatur beschrieben, weshalb die Bestimmung von 1101 Proteinen aus dem präparativen, Coomassie-gefärbten Gel für nachfolgende Forschungsthemen durchaus aufschlussreich und hilfreich sein kann. Eine Liste aller nachgewiesenen Proteine ist dem Anhang zu entnehmen.
Die differentiell exprimierten, identifizierten Proteine sind verschiedenen Bereichen der molekularen Signalwege, der Differenzierung, der Zellzykluskontrolle, den Reparatur- und Schutzmechanismen, der Transkription / Translation oder dem Fett- und Glucosestoffwechsel, der Atmungskette oder Enzymen, die am Abbau von Zellbestandstandteilen beteiligt sind, zuzuordnen.

Aus den differentiell exprimierten und identifizierten Proteinen wurden Cathepsin D (CATD), Protein ER *lipid raft accosiated 2* (ERLIN2), *Melanocyte proliferating gene 1* (MYG1), Thioredoxin Reduktase 1 (TRXR1), Dihydropyrimidinase-LikE 2 (DPYL2) und die Glutamat-Cystein-Ligase (GCLM) für weitere Verifizierungsexperimente ausgewählt. Dabei waren CATD, ERLIN2 und MYG1 sowie TRXR1 und DPYL2 jeweils im gleich 2D-Gelspot mittels Massenspektrometrie identifiziert worden. Um eine Diskriminierung des Einflusses auf die beobachtete differentielle Expression auf Proteinebene zu ermöglichen, wurden für alle Kandidaten zunächst Experimente auf RT-qPCR Ebene durchgeführt. Von besonderem

Interesse in Bezug auf die Beeinflussung des metabolischen Syndroms sind hierbei CATD, GCLM und TRXR1.

5.1 Cathepsin D, ERLIN2 und Melanocyte proliferating gene 1

Cathepsin D ist auf mRNA-Ebene unter allen drei Stimulationen vermehrt exprimiert, wobei es unter DHA- und kombinierter (Gluc + DHA) Stimulation zu einer signifikaten Regulation kam. Auf Proteinebene konnte eine signifikante Regulation jedoch nur unter Glucose-Stimulation nachgewiesen werden. Die Hauptaufgabe der Asparagin-Peptidase der A1-Familie besteht im Verdau von Proteinen und Peptiden innerhalb des sauren Milieus von Lysosomen. Damit ist Cathepsin D an der Rekombination der Aminosäure-Verbindungen im Zytoplasma sowie der Prozessierung von Antigenen, Hormonen und Neuropeptiden beteiligt. Hah et al. (2012) nennen zusätzlich die Aktivierung von Cysteinproteasen, der Proliferation von Krebszellen sowie der Angiogenese als Funktionen der Asparagin-Peptidase.
Fusek & Vetvicka (2005) weisen Cathepsin D eine Apoptose-fördernde Eigenschaft zu, wohin gegen von Hah et al. (2012) beschrieben wird, dass durch Cathepsin D die Autophagie in Krebszellen aktiviert wird und dadurch der mittels „oxidativen Stress“ induzierte Zelltod verhindert wird. Weiterhin wird berichtet, dass eine Cathespin D-Überexpression den von H_2O_2-abhängigen Zelltod hemmt (Hah et al., 2012). Dass es zu einer vermehrten Autophagie in diabetischen β-Zellen des Pankreas kommt, beobachteten Masini et al. (2009). Sie zeigten jedoch gleichzeitig, dass es in diabetischen Inselzellen zu einer reduzierten Transkription von Cathepsin D kam. Diesen scheinbaren Widerspruch lösen Sie dadurch auf, dass Sie eine Änderung in späteren zellzyklischen Prozessen der Autophagie bei Typ 2 Diabetikern postulierten.
Cathepsin D ist zudem in der Lage, Angiotensionogen zu Angiotensin I zu spalten und hat damit Renin-like-Aktivitäten (Fusek & Vetvicka, 2005; Karlsson et al., 1998). Feron, Piot, & Fruitier-Arnaudin (2010) stellten desweitern fest, dass Cathepsin D den β-Arm des Hämoglobins zu Hemorphin (7)-Peptid abbaut, welches wiederum in der Lage ist, ACE zu hemmen sowie hochaffin an den Angiotensin IV-Rezeptor zu binden. Dazu fügen sich die Experimente von Lavrentyev, Estes, & Malik (2007), die mit siRNA Cathepsin D in glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten ausschalteten und dadurch eine Verminderung von Angiotensin I und II sowohl bei normalen Glucosebedingungen als auch bei Glucosestimulation mit 23 mmol/l Glucose herbeiführten. Diese Daten legen nahe, dass Cathespin D als Regulator in lokale Renin-Angiotensin-Systeme eingreifen kann.

ERLIN2 ist ebenfalls auf mRNA-Ebene unter allen drei Stimulationen signifikant verstärkt exprimiert. Auf Proteinebene im DIGE-Experiment konnte dies wie bei Cathepsin D nur unter Glucose-Stimulation bestätigt werden. ERLIN2 wird zu der Familie der Prohibitine gezählt

und gehört der Typ II Membranglykoprotein-Gruppe an. ERLIN2 befindet sich in homo- und heterooligomeren Ringstrukturen an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und vermittelt dort die ER-assoziierte Degeneration (ERAD Pathway) des Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptors (IP3R) (Browman, Resek, Zajchowski, & Robbins, 2006).
Wang, Liu, et al. (2012) demonstrierten, dass eine ERLIN2-Überexpression in Brustdrüsenzelllinien (MCF10A-Zellen) zu einem *Insulin-like-growth factor* unabhängigem Wachstum führt. Gleichzeitig resultierte ein *knockdown* von ERLIN2 in verlangsamten Proliferationsraten. Weiterhin zeigte oben genannte Forschungsgruppe, dass MCF10A-Zellen, die ohne Insulin inkubiert wurden, vermehrt endogenes ERLIN2 aufweisen.
Für Leberzellen konnte unter Insulin sowie LDPS (Lipoprotein-Mangel-Serum) Stimulation ebenfalls eine Hochregulierung von ERLIN2 auf mRNA Ebene beobachtet werden (Wang, Zhang, et al., 2012). In einem nächsten Schritt konnten Wang, Zhang, et al. (2012) nachweisen, dass durch die Interaktion von ERLIN2 mit INSIG1, die *de novo Lipobiosynthese* und SREBP (*sterol regulatory element-binding protein*) angeschaltet werden. In Übereinstimmung mit diesem Befund wurde eine signifikante Erhöhung der Lipid-Akkumulation unter ERLIN2 Überexpression in Huh-7-Zellen nachgewiesen (Wang, Zhang, et al., 2012). Wohingegen sich durch einen transienten ERLIN2-*knock-down* das SREBP1c-Niveau (*sterol regulatory element-binding protein1c*) erniedrigte und von ihm regulierte Lipogenesegene vermindert abgelesen wurden (Wang, Zhang, et al., 2012). Damit konnte bestätigt werden, dass ERLIN2 die Aktivität von SREBP1c moduliert. Zusätzlich postulierten (Wang, Liu, et al., 2012), dass der ER-Stress-Signalweg die ERLIN2 Expression über IREα-aktiviertes *X-Box-binding-protein 1* (XBP1) reguliert und die ERLIN2-Überexpression die Anpassung der Zelle an ER-Stress durch die Förderung von Zellwachstum erleichtert.

Neben Cathepsin D und ERLIN2 wurde in dem DIGE-Gel-Spot auch das Melanocyte proliferating gene 1 (MYG1) massenspektrometrisch nachgewiesen. In der RT-qPCR wies MYG1 seinen höchsten und einzig signifikanten mRNA Expressionsanstieg (1,4-fach) unter kombinierter Stimulation von Glucose und DHA im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Die Funktion des ubiquitären MYG1 ist nach wie vor Gegenstand der Forschung.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die im DIGE-Gel gefundene 1,6-fache differentielle Proteinexpression unter Glucosestimulation anhand der RT-qPCR-Daten nicht mit Sicherheit auf eines der identifizierten Proteine (CATD, ERLIN2, MYG1) zurückzuführen ist. Literaturdaten zu CATD und ERLIN2 lassen am ehesten Einflüsse auf die Zustände beim metabolischen Syndrom vermuten.

5.2 Thioredoxin Reduktase 1 und Dihydropyrimidinase-Like 2

In einem anderen Spot wurde unter DHA-Stimulation eine 1,6-fache Proteinexpressions-steigerung registriert. Als Proteine wurden die cytosolische Thioredoxin Reduktase 1 (TRXR1) und Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DPYL2) identifiziert. Auf mRNA Ebene zeigte TXNRD1 einen signifikanten, 1,75-fachen Anstieg unter DHA und einen 2-fachen Anstieg unter simultaner Gabe von Glucose und DHA. Dies belegt die mit Hilfe des 2D-Geles gefundenen Werte. Auf Western Blot Ebene im 1D-Gel zeigte TRXR1 keine signifikante Regulation. Auffällig ist, dass TRXR1 sowohl im DIGE-Experiment, als auch im Western Blot unter Glucose eine verminderte Proteinexpression hat.

Die TRXR1 reduziert Thioredoxin. Das Gen der Thioredoxin Reduktase 1 (*TXNRD1*) wird auf dem Chromosom 3 im Bereich p11-p12 kodiert und besteht aus 5 Exons und 4 Introns. Bisher wurden 2 Promotoren beschrieben, einer für die basale, konstitutive Transkription und ein zweiter für regulierte und induzierte Transkription. Dieser Promotor wird unter anderem über „oxidativen Stress“ und *antioxidant responsive elements* (ARE) aktiviert.

Bezüglich der Regulation gibt es verschiedene Angriffspunkte. Zum einen ist TRXR1 auf transkriptioneller Ebene steuerbar. Als eine weitere Ebene ist die posttranslationale Regulation anzuführen. TRXR1 wird sehr rasch durch ROS inaktiviert (Sun et al., 1999). Jedoch konnten diese Beobachtungen nicht in *in vitro* Modellen belegt werden, (Björnstedt, Hamberg, Kumar, Xue, & Holmgren, 1995; Zhong & Holmgren, 2000) womit der genaue Mechanismus unklar bleibt. Eine mögliche posttranslationale Modifikation könnte Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse aus den 2D-Gelen (Regulation um 1,6) und der Western Blot Analyse auf 1D-Ebene (keine signifikante Änderung) sein.

TRXR1 hat eine breite Substratspezifität, wodurch z.B. auch Fettsäuren von TRXR1 reduziert werden können (Arnér, Nordberg, & Holmgren, 1996). Weitere Substrate der TRXR1 sind die Disulfidreduktase Trx-like 1 (Lee, 1998) oder das Protein Nucleoredoxin (Nrx), welches im Zentrum eine Thioredoxin Domaine mit einem CPPC-Motiv enthält und aktiv in der Reduktion von Insulin sowie möglicherweise an der Redox-Regulation von Transkriptionsfaktoren beteiligt ist (Kurooka et al., 1997).

Die in dieser Forschungsarbeit beobachtete Erhöhung der Thioredoxin Reduktase 1 ist als eine zelluläre Antwort auf den „oxidativen Stress“ zu verstehen. Rundlöf & Arnér (2004) sehen die Thioredoxin Reduktase 1 in der Rolle eines Redoxsensors, der reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) und die daraus resultierenden Signalkaskaden verbindet.

Das Protein Dihydropyrimidinase-Like 2 (DPYL2) gehört zur Familie der *Collapsin Response Mediator Proteine (CRMP)*. DPYL2 ist bisher in der Literatur im Zusammenhang mit neuronalem Wachstum und Polarität sowie axonaler Leitung beschrieben worden (Hensley, Venkova, Christov, Gunning, & Park, 2011; Poon, Vaishnav, Getchell, Getchell, & Butterfield, 2006). DPYL2 interagiert mit Calcium-Kanälen am synaptischen Spalt und fördert Mikrotubuli-Zusammenschlüsse sowie die Zellwanderung. Dihydropyrimidinase-Like 2 scheint bei vielen neuronalen Erkrankungen eine Rolle zu spielen. Zusätzlich konnte Gellert et al. (2013) zeigen, dass das DPYL2 von Thioredoxin 1 reduziert werden kann. Dies ist besonders interessant, da DPYL2 und das Enzym, dass Thioredoxin in seinem reduzierten Zustand hält -TRXR1- in demselben Spot nachgewiesen wurden. Dihydropyrimidinase-Like 2 (CRMP2) zeigte auf mRNA-Ebene einen deutlichen Anstieg der relativen mRNA-Expression unter allen drei Stimulationsgruppen, am deutlichsten unter Glucose mit DHA (2,59-fach). Da die mRNA-Werte zwischen den einzelnen Zellkultur-Experimenten stark schwankten, ist keine der Hochregulationen signifikant. Im 1D Western Blot hingegen ist keine signifikante Regulation zu registrieren. Was zu oben genannten mRNA-Änderungen von CRMP2 führte und welchen Einfluss DPYL2 auf β-Zellen hat, bleibt Gegenstand der aktuellen Forschung.

Die verwendeten Methoden zur Diskriminierung der Einflüsse der einzelnen, identifizierten Proteine sind bis dato nicht ausreichend und bedingen weitere Untersuchungen, z.B. mit Hilfe von 2D Western Blot Analysen. Anhand der Literatur lassen sich regulatorische Einflüsse auf intrazelluläre Signalkaskaden erkennen, jedoch mit den hier vorliegenden Daten nicht genauer differenzieren.

5.3 Glutamat-Cystein-Ligase

Die regulierende Untereinheit der Glutamat-Cystein-Ligase (GCLM) wurde unter DHA Stimulation im DIGE-Gel-Spot als 2-fach hochreguliert identifiziert. Auf mRNA Ebene konnte unter allen 3 Situationen ein signifikanter Anstieg der GCLM verzeichnet werden. Unter Glucose kam es zu einem 1,52-fachen Anstieg, unter DHA zu einer 3,21-fachen Erhöhung der GCLM Konzentration und unter gleichzeitiger Gabe von Glucose und DHA konnte ein 3,15-facher Anstieg der GCLM beobachtet werden.

Die Glutamat-Cystein-Ligase (GCL) ist das geschwindigkeitslimitierende Enzym der Glutathion-Synthese. Glutathion (GSH) ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt, wie etwa der Protein-Synthese, der DNA-Synthese und –Reparatur, der Zellproliferation, der Apoptose, dem Redox-Signaling sowie dem Abbau von ROS, RNS und anderen freien Radikalen (Franklin et al., 2009). In welcher Konzentration die Untereinheiten der Glutamat-

Cystein-Ligase (GCL) vorliegen, wird primär durch die Aktivität der GCL in der Zelle sowie durch die Transkription und posttranskriptionelle Prozesse, die unter anderem vom „oxidativen Stress“ abhängig sind, bestimmt (Franklin et al., 2009; Griffith, 1999; Leung, 2003; Sekhar et al., 1997). Die Aktivität der Glutamat-Cystein-Ligase kann sehr schnell (10 Minuten – 1 Stunde) durch posttranslationale Modifikation von schon existierenden GCLM und oder GCLC beeinflusst werden (Franklin et al., 2009).

Dass die regulierende Untereinheit der Glutamat-Cystein-Ligase (GCLM) unter DHA Stimulation im DIGE Gel 2-fach erhöht vorlag, fügt sich in unsere Theorie, dass 0,1 mM DHA auf die BRIN-BD11 Zellen Stress ausüben. Als Antwort auf den lipotoxischen Stoff regulieren die β-Zellen ihre Antioxidantien. Auf RT-qPCR-Ebene konnte dieses Ergebnis gesichert werden, da die mRNA unter DHA um mehr als das 3-fache anstieg. Dass es unter Glucose auf RT-qPCR -Ebene ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme der GCLM kam, bestätigt unsere Arbeitshypothese, dass 25 mM Glucose glukotoxische Eigenschaften auf BRIN-BD11 Zellen haben und diese auf entstehenden (oxidativen) Stress mit vermehrter Produktion von schützenden Stoffen reagieren. Die RT-qPCR Ergebnisse zeigen einen moderaten Anstieg unter Glucose, einen sehr starken Anstieg unter DHA und einen ähnlich starken Anstieg bei gleichzeitiger Zugabe beider Stoffe. Dies zeigt, dass die BRIN-BD11 Zellen in einem gewissen Rahmen auf verschieden starke Stimulanzien reagieren können. Ab einem gewissen Grad scheinen die β-Zellen nicht mehr in der Lage zu sein, adäquat auf den Reiz reagieren zu können. Bei gleichzeitiger Zugabe von Glucose und DHA blieb ein weiterer Anstieg der GCLM mRNA aus. Die glucoseabhängige Regulation der GCLM Untereinheit konnte auf 2D-Proteinebene nicht nachgewiesen werden.

Lee, Kang, & Stipanuk belegten bereits (2006), dass die Überexpression der regulierenden Untereinheit der Glutamat-Cystein-Ligase einen entscheidenden Einfluss auf die Gesamtaktivität der GCL hat. Zu erwarten war demnach, dass auch die katalytische Untereinheit der GCL hochreguliert wird. Die GCLC wurde jedoch während unserer Experimente in keinem Spot nachgewiesen. So kann nur gemutmaßt werden, dass die katalytische Untereinheit der GCL in ausreichenden Mengen im Cytosol der BRIN-BD11 Zellen vorlag, sodass es weder unter gluko- noch unter lipotoxischen Stimulanzien zu einer differentiellen Expression kam. In diesem Fall würde die GCLM der limitierende Faktor zur Bildung des enzymatisch aktiven Holoenzyms sein. Dazu passen die Ergebnisse von Ochi (1995), der beschrieb, dass subtoxische Konzentrationen von oxidativen Stoffen zu vorübergehenden Aktivierung der GCL führen, ohne dass sich die Konzentration an GCL Untereinheiten ändert. Dieser Umstand legt die Vermutung nahe, dass die beiden Untereinheiten der GCL abhängig vom Redox-Status separat oder als Holoenzym in der Zelle vorliegen. Franklin et al. (2009) beschreiben, dass oxidative Zellzustände den Zusammenschluss der beiden Untereinheiten der Glutamat-Cystein-Ligase fördern,

wohingegen reduzierende Bedingungen eine Dissoziation der Untereinheiten bedingen (Huang, Chang, Anderson, & Meister, 1993).

Polymorphismen der Promotoren der katalytischen Untereinheit (GCLC) werden im Zusammenhang mit dem Erkrankungsalter von Typ-1-Diabetikern gebracht (Bekris et al., 2007). Auch wenn sich unsere Arbeit auf die Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2 konzentriert, unterstreichen die Untersuchungen von Bekris et al. (2007) die hohe Bedeutung von Antioxidantien wie etwa Glutathion für die Zellhomöostase und die Konsequenzen einer Störung des Oxidantien/Antioxidantien-Gleichgewichtes. Die 24-stündige Behandlung isolierter Pankreasinseln von Typ 2 Diabetikern mit Glutathion verbesserte die Glucose-induzierte Insulinfreisetzung signifikant und erlaubt eine partielle Regenerierung der Insulinexpression auf mRNA Ebene (Guerra et al., 2005). Dieses Forschungsergebnis lässt klar erkennen, dass die Hemmung von „oxidativem Stress“ in β-Zellen einen zukünftigen therapeutischen Ansatz für Typ 2 Diabetiker darstellen kann.

Funktionelle Aspekte zur GCLM konnten hier nur exemplarisch anhand von Sekundärdaten dargestellt werden. Für die vorliegenden Proben sollten noch Nachweise mittels Antikörper auf 1D- bzw. 2D-Ebene durchgeführt werden, um eine Verifizierung der Daten eindeutig zu gewährleisten.

5.4 IPA Analyse

Dass die signifikant regulierten, identifizierten Proteine zu über 80% dem Zytoplasma entstammen überrascht nicht, da die TriFast Präparation auf den Aufschluss dieser Proteine ausgerichtet ist und nur zu einem kleinen Teil Proteine des Zellkernes oder der Plasmamembran erfasst. Fernandez et al. (2008) untersuchten mittels Gas-Chromatografie und MS-Analyse, welche Metaboliten und Proteine sich nach 48 Stunden unter 16,7 mM Glucosestimulation im Vergleich zu 2,8 mM Glucoselösung in INS-1 832/13 β-Zellen verändern. Dabei stellten sich unter Hoch-Glucose-Einfluss Metabolite des Zitronensäurezykluses und des Ribose-5-Phosphatweges in erhöhter Konzentration dar. Zudem wurde die Alpha-Enolase als verstärkt exprimiert gefunden. Dieses Enzym konnte auch in unseren Experimenten als reguliert identifiziert werden, allerdings unter Fettsäurestimulation sowohl hoch- als auch herunterreguliert (verschiedenen Spots). Die ATP Synthase subunit beta wurde sowohl als hoch- als auch herunterreguliert unter Glucosestimulation von Fernandez et al. (2008) beschrieben. Unsere Daten zeigen ebenfalls in diversen Spots eine verstärkte Expression und in einem Spot eine Verminderung, jedoch jeweils unter DHA Stimulation. Das gleiche gilt für die Transaldolase, auch sie ist bei

Fernandez et al. (2008) unter Glucose, in unseren Experimenten unter DHA, in größeren Mengen zu finden.

Von Bedeutung für die Interpretation unserer Forschung sind die Untersuchungen von Nielsen et al. (2004) zu den Veränderungen der Proteinexpression unter der β-Zellreifung. Dafür wurde das Proteinprofil der *glucagon-producing pre-beta-cell phenotype* (NHI-glu) mit dem der *insulin-producing beta-cell phenotype* (NHI-ins) verglichen. Dabei fanden sich die ATP Synthase α-chain, die Transaldolase, Endolase α und die Fruktose-Bisphosphat Aldolase A nach Abschluss der β-Zellreifung signifikant erhöht (Nielsen et al., 2004). Diese Proteine waren in unseren Experimenten ebenfalls unter Stimulanzien signifikant erhöht. In wie weit die verstärkte Expression dieser Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels im Zusammenhang mit der Entwicklung eines Metabolischen Syndroms stehen, ist bisher noch ungeklärt und sollte mit weiteren Experimenten untersucht werden.

Bei Maris et al. (2011) ist die mitochondriale ATP-Synthase Alpha unter alleiniger Zugabe von Oleat 1,65-fach stärker exprimiert. Dieses Ergebnis passt zu unseren Daten, in denen die Spotintensität der mitochondrale ATP-Synthase Alpha ebenfalls unter Fett-Stimulation erhöht war. Dass ATP-Synthasen, die Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette sind, hochreguliert waren, könnte einerseits darauf zurückgeführt werden, dass die Zellen unter der Fett-Zugabe einen erhöhten Energiebedarf signalisieren, andererseits aber auch darauf, dass die Energie, die in Form der Fett-Stimulation den Zellen zugeführt wurde, von diesen direkt verstoffwechselt wird.

Zusätzlich beobachteten Maris et al. (2011), dass die ATP-Synthase Alpha bei gleichzeitiger Zugabe von 25 mM Glucose und 0,1 mM Oleaten in zwei Spots vermehrt und in drei anderen Spots vermindert exprimiert war. Die ATP-Synthase Alpha wurde in unseren Experimenten unter Glucose-Stimulation als nicht signifikant reguliert eingestuft. Beide Beobachtungen lassen schlussfolgern, dass kein reproduzierbarer Einfluss auf die ATP-Synthase Alpha vorliegt.

Die BRIN-BD11 Zellen scheinen auf die hier eingesetzten Stimulanzien mittels verminderter Proteinbiosynthese zu reagieren, da alle Proteine, die der Transkription/Translation zugeschrieben werden können, vermindert vorlagen.

Ahmed & Bergsten (2005) fanden die Superoxidedismutase 4,3-fach erhöht und Peroxiredoxin 6 2,2-fach vermehrt. Dass diese Antioxidantien unter 11 mM Glucose hochreguliert wurden, passt zu unseren Ergebnissen, in denen mit der Thioredoxin Reduktase 1 und der regulierenden Untereinheit der Glutamat-Cystein-Ligase ebenfalls Antioxidantien als Reaktion auf die Stressoren (Glucose und DHA) als hochreguliert werden.

Zusammenfassend erwies sich die 2D-Gelelektrophorese erneut als ein geeignetes Instrument zur Erfassung der Proteinmuster in Zellen unter den dargestellten Bedingungen. Optimale, standardisierte Experimente können in ausreichendem Maße mit Hilfe der DIGE Technik analysiert werden. Dabei spielt die Quantifizierung mit Fluoreszenzfarbstoffen eine zentrale Rolle. Hier konnten durch Verwendung verschiedener Farbstoffe auf gleichen Gelen Zeit und Material gespart werden, ohne die Quantifizierbarkeit negativ zu beeinflussen. Optimale Stimulationsbedingungen konnten erfolgreich angepasst werden, so dass eine gute Vergleichbarkeit gewährleistet wurde. Die sich anschließende Identifizierung der Proteine mit massenspektrometrischen Methoden kann als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dienen, die eine Diskriminierung und / oder Verifizierung der Daten ermöglichen. Anhand der vorliegenden Analysen konnte eine umfangreiche Proteinliste zu BRIN-BD11 Zellen erstellt werden. Drei regulierte Spots fanden dabei vermehrtes Interesse, da sich die Proteine CATD, TRXR1 und GCLM in den Kontex der Einflussnahme auf das metabolische Syndrom einordnen lassen. Weitere Interaktionen der genannten Proteine in dem Symptomkomplex des metabolischen Syndroms bieten sich für zukünftige Untersuchungen an.

Eine Ausdehnung zur Untersuchung von Apoptoseraten der BRIN-BD11 Zellen unter den einzelnen Stimulationen ist ebenfalls möglich (immunzytometrische Bestimmung). Damit könnte herausgearbeitet werden, inwieweit die Zellen in der Lage sind, sich über die Hochregulation von Schutzmechanismen gegen die toxischen Eigenschaften von 25 mM Glucose und 0,1 mM DHA zu wehren.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Forschungsarbeit wurde untersucht, zu welchen Veränderungen es im Proteom der pankreatischen β-Zelle durch Erzeugung von Hyperglykämie und/oder Hyperlipidämie kommt, die z.B. im Rahmen des Metabolischen Syndroms auftreten können.
Für die Experimente wurde die Zelllinie BRIN-BD11 verwendet. Eine Behandlung erfolgte vergleichend mit Glucose (25 mM) und/oder Docosahexaensäure (DHA 0,1 mM) für 24 Stunden.
Das Proteom der BRIN-BD11 Zellen wurde mit Hilfe von 2D-Differenzial-Fluoreszenz-Gelelektrophorese (DIGE) analysiert und die Proteine unter Verwendung der Massenspektrometrie identifiziert. Es konnten insgesamt 1101 Proteine in 1487 detektierten Spots bestimmt werden. Darunter stellten sich 90 Spots unter den oben genannten Stimulationen als signifikant reguliert dar. Aus diesen wurden 63 regulierte Proteine identifiziert, die sich verschiedenen Bereichen des Stoffwechsels zuordnen lassen, u.a. dem Glucosestoffwechsel, der Atmungskette, katabolen Prozessen oder den Reparatur- und Schutzmechanismen.
Eine *Ingenuity Pathway* Analyse anhand der regulierten Proteine ergab Zuordnungen zu 3 Netzwerken:
1 Nukleinsäuremetabolismus, Lipidmetabolismus und Biochemie kleiner Moleküle,
2 DNA -Replikation, -Rekombination und -Reparatur, Nukleinsäuremetabolismus und Biochemie kleiner Moleküle,
3 Kohlenhydratmetabolismus, molekularer Transport und Biochemie kleiner Moleküle.
Weiterhin konnte eine funktionelle Einteilung sowie die Verteilung der Proteine nach Zellkompartimenten dargestellt werden.
Eine Verifizierung der Ergebnisse mittels RT-qPCR erfolgte für *Cathepsin D, Endoplasmic reticulum lipid raft-associated protein 2, Melanocyte proliferating gene 1, Glutamat-Cystein-Ligase* sowie für die *Thioredoxin-Reduktase* und das *Dihydropyrimidinase-related protein 2*. Desweiteren wurden Western Blot Analysen zu Thioredoxin-Reduktase und das Dihydropyrimidinase-related protein 2 durchgeführt.
Die Ergebnisse weisen auf eine Regulation im Sinne einer Kompensation der Stressoren hin, die durch gesteigerte Expression/Aktivität antioxidativer Systeme wie Glutathion und Thioredoxin erklärbar wären. Zudem konnte ein Proteommuster der BRIN-BD11 Zellen erstellt werden und bildet mit der massenspekrometrischen Identifizierung der Proteine eine Grundlage für weitere Untersuchungen an der Zelllinie.

7 Literaturverzeichnis

Ahmed, M., & Bergsten, P. (2005). Glucose-induced changes of multiple mouse islet proteins analysed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Diabetologia*, *48*(3), 477–485.

Albiston, A. L., McDowall, S. G., Matsacos, D., Sim, P., Clune, E., Mustafa, T., … Chai, S. Y. (2001). Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(52), 48623–48626.

American Diabetes Association. (2010). *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus* (Vol. 33).

Araki, E., Oyadomari, S., & Mori, M. (2003). Review: Endoplasmic Reticulum Stress and Diabetes Mellitus. *Internal Medicine*, *42*, 7–14.

Arnér, E. S. J., Nordberg, J., & Holmgren, A. (1996). Efficient Reduction of Lipoamide and Lipoic Acid by Mammalian Thioredoxin Reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *225*(1), 268–274.

Bekris, L., Shephard, C., Janer, M., Graham, J., McNeney, B., Shin, J., … Lernmark, A. (2007). Glutamate cysteine ligase catalytic subunit promoter polymorphisms and associations with type 1 diabetes age-at-onset and GAD65 autoantibody levels. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, *115*(4), 221–228.

Biden, T. J., Robinson, D., Cordery, D., Hughes, W. E., & Busch, A. K. (2004). Chronic effects of fatty acids on pancreatic beta-cell function: new insights from functional genomics. *Diabetes*, *53*(1), 159–165.

Björnstedt, M., Hamberg, M., Kumar, S., Xue, J., & Holmgren, A. (1995). Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(20), 11761–11764.

Boden, G., Chen, X., & Iqbal, N. (1998). Acute lowering of plasma fatty acids lowers basal insulin secretion in diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes*, *47*(10), 1609–1612.

Bollheimer, L. C., Skelly, R. H., Chester, M. W., McGarry, J. D., & Rhodes, C. J. (1998). Chronic exposure to free fatty acid reduces pancreatic beta cell insulin content by increasing basal insulin secretion that is not compensated for by a corresponding increase in proinsulin biosynthesis translation. *The Journal of Clinical Investigation*, *101*(5), 1094–1101.

Browman, D. T., Resek, M. E., Zajchowski, L. D., & Robbins, S. M. (2006). Erlin-1 and erlin-2 are novel members of the prohibitin family of proteins that define lipid-raft-like domains of the ER. *Journal of Cell Science*, *119*(Pt 15), 3149–3160.

Brownlee, M. (2001). Review: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, *414*(December), 813–820.

Brunner, Y., Schvartz, D., Priego-Capote, F., Couté, Y., & Sanchez, J.-C. (2009). Review: Glucotoxicity and pancreatic proteomics. *Journal of Proteomics*, *71*(6), 576–591.

Du, Y., Zhang, H., Lu, J., & Holmgren, A. (2012). Glutathione and glutaredoxin act as a backup of human thioredoxin reductase 1 to reduce thioredoxin 1 preventing cell death by aurothioglucose. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(45), 38210–38219.

Dubois, M., Vacher, P., Roger, B., Huyghe, D., Vandewalle, B., Kerr-Conte, J., … Lang, J. (2007). Glucotoxicity inhibits late steps of insulin exocytosis. *Endocrinology*, *148*(4), 1605–1614.

Elouil, H., Bensellam, M., Guiot, Y., Vander Mierde, D., Pascal, S. M. a, Schuit, F. C., & Jonas, J. C. (2007). Acute nutrient regulation of the unfolded protein response and integrated stress response in cultured rat pancreatic islets. *Diabetologia*, *50*(7), 1442–1452.

Fernandez, C., Fransson, U., Hallgard, E., Spégel, P., Holm, C., Krogh, M., … Mulder, H. (2008). Metabolomic and Proteomic Analysis of a Clonal Insulin-Producing -Cell Line (INS-1 832 / 13). *Journal of Proteome Research*, *7*(1), 400–411.

Feron, D., Piot, J.-M., & Fruitier-Arnaudin, I. (2010). Proteolytic degradation by cathepsin D of glycated hemoglobin from diabetes patients gives rise to hemorphin-7 peptides. *Peptides*, *31*(5), 956–961.

Franklin, C. C., Backos, D. S., Mohar, I., White, C. C., Forman, H. J., & Kavanagh, T. J. (2009). Review: Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Molecular Aspects of Medicine*, *30*(1-2), 86–98.

Furukawa, H., Carroll, R. J., Swift, H. H., & Steiner, D. F. (1999). Long-term elevation of free fatty acids leads to delayed processing of proinsulin and prohormone convertases 2 and 3 in the pancreatic beta-cell line MIN6. *Diabetes*, *48*(7), 1395–1401.

Fusek, M., & Vetvicka, V. (2005). Review: Dual role of cathepsin D: ligand and protease. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, *149*(1), 43–50. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16170387

Gellert, M., Venz, S., Mitlöhner, J., Cott, C., Hanschmann, E.-M., & Lillig, C. H. (2013). Identification of a dithiol-disulfide switch in collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) that is toggled in a model of neuronal differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(49), 35117–35125.

Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. (2007). Review: Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *Journal of Lipid Research*, *48*(9), 1905–1914.

Greten, H., Rinninger, F., & Greten, T. (2010). Innere Medizin. In A. Hamann (Ed.), *Innere Medizin* (13. Auflag., p. 664). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

Griffith, O. W. (1999). Review: Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology & Medicine*, *27*(9/10), 922–935.

Grundy, S. M., Brewer, H. B., Cleeman, J. I., Smith, S. C., & Lenfant, C. (2004). Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*, *109*(3), 433–438. doi:10.1161/01.CIR.0000111245.75752.C6

Guerra, S. Del, Lupi, R., Marselli, L., Masini, M., Bugliani, M., Sbrana, S., … Marchetti, P. (2005). Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes*, *54*(March), 727–735.

Hagman, D. K., Hays, L. B., Parazzoli, S. D., & Poitout, V. (2006). Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(37), 32413–32418.

Hah, Y.-S., Noh, H. S., Ha, J. H., Ahn, J. S., Hahm, J. R., Cho, H. Y., & Kim, D. R. (2012). Cathepsin D inhibits oxidative stress-induced cell death via activation of autophagy in cancer cells. *Cancer Letters*, *323*(2), 208–214.

Hamilton, T. a, Handa, R. K., Harding, J. W., & Wright, J. W. (2001). A role for the angiotensin IV/AT4 system in mediating natriuresis in the rat. *Peptides*, *22*(6), 935–944. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390024

Handa, R. K., Handa, S. E., Elgemark, M. K. S., Schwacke, J. H., Spainhour, J. C. G., Ierardi, J. L., … Physiol, R. (2001). Autoradiographic analysis and regulation of angiotensin receptor subtypes AT(4), AT(1), and AT((1-7)) in the kidney. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, *281*(5), F936–F947.

Handa, R. K., Krebs, L. T., Harding, J. W., Handa, S. E., Ellis, B., Li, X. C., … Bie, P. (1998). Angiotensin IV AT4-receptor system in the rat kidney. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, *274*(2), F290–F299.

Härdtner, C., Mörke, C., Walther, R., Wolke, C., & Lendeckel, U. (2013). High glucose activates the alternative ACE2/Ang-(1-7)/Mas and APN/Ang IV/IRAP RAS axes in pancreatic β-cells. *International Journal of Molecular Medicine*, *32*(4), 795–804.

Health Protection Agency Culture Collections. (2011). General Cell Collection: BRIN-BD11. Retrieved from http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=10033003&collection=ecacc_gc

Heinrich, P. C., Müller, M., & Graeve, L. (2014). Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie (9. vollstä.). Berlin, Heidelberg: Springer.

Hensley, K., Venkova, K., Christov, A., Gunning, W., & Park, J. (2011). Collapsin Response Mediator Protein-2: An Emerging Pathologic Feature and Therapeutic Target for Neurodisease Indications. *Molecular Neurobiology*, *43*(3), 180–191.

Hollander, M. C., Zhan, Q., Bae, I., & Fornace, a J. (1997). Mammalian GADD34, an apoptosis- and DNA damage-inducible gene. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(21), 13731–13737.

Huang, C., Chang, L., Anderson, M. E., & Meister, A. (1993). Catalytic and Regulatory Properties of the Heavy Subunit of Rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(26), 19675–19680.

International Diabetes Federation. (2013). IDF Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome. Retrieved from http://www.idf.org/metabolic-syndrome

International Diabetes Federation, I. F. D. (2014). *IDF Diabetes Atlas 6th Edition revision 2014*. Retrieved from http://www.idf.org/sites/default/files/attachments/2014-11-13-IDF-Diabetes-Atlas-rv.pptx

International Diabetes Federation: Diabetes Atlas sixth edition. (2013). Retrieved from http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf

Jeffrey, K. D., Alejandro, E. U., Luciani, D. S., Kalynyak, T. B., Hu, X., Li, H., … Johnson, J. D. (2008). Carboxypeptidase E mediates palmitate-induced beta-cell ER stress and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(24), 8452–8457. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2448857&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Johnson, J. D., Ahmed, N. T., Luciani, D. S., Han, Z., Tran, H., Fujita, J., … Polonsky, K. S. (2003). Increased islet apoptosis in Pdx1 + /– mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *111*(8), 1147–1160.

Johnson, J. D., Bernal-mizrachi, E., Alejandro, E. U., Han, Z., Kalynyak, T. B., Li, H., … Polonsky, K. S. (2006). Insulin protects islets from apoptosis via Pdx1 and specific changes in the human islet proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(51), 19575–19580.

Joost, H. G., Giesen, K., Kluge, R., Ortlepp, J., & Plum, L. (2000). Insulinresistenz und metabolisches Syndrom. *Zeitschrift Für Kardiologie*, *89*(5), 377–382.

Joost, H., Pollack, A., Reuter, M., & Schnellbächer, E. (2011). *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2011*. (G. Nuber, Ed.). Berlin: Kirchheim + Co GmbH. Retrieved from http://diabetesstiftung.de/uploads/media/Gesundheitsbericht_2011.pdf

Karlsson, C., Lindell, K., Ottosson, M., Sjöström, L., Carlsson, B., & Carlsson, L. M. (1998). Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *83*(11), 3925–3929.

Kharroubi, I., Ladriere, L., Cardozo, A. K., Dogusan, Z., Cnop, M., & Eizirik, D. L. (2004). Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology*, *145*(11), 5087–5096.

Kim, J., Wei, Y., & Sowers, J. R. (2008). Review: Role of Mitochondrial Dysfunction in Insulin Resistance. *Circulation Research*, *102*(4), 401–414.

Kuboki, K., Jiang, Z. Y., Takahara, N., Ha, S. W., Igarashi, M., Feener, E. P., … King, G. L. (2000). Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation*, *101*(6), 676–681.

Kurooka, H., Kato, K., Minoguchi, S., Takahashi, Y., Ikeda, J., Habu, S., … Honjo, T. (1997). Cloning and characterization of the nucleoredoxin gene that encodes a novel nuclear protein related to thioredoxin. *Genomics*, *39*(3), 331–9.

Lavrentyev, E. N., Estes, A. M., & Malik, K. U. (2007). Mechanism of high glucose induced angiotensin II production in rat vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, *101*(5), 455–64. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17626897

Lee, A. Y. W., & Chung, S. S. M. (1999). Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *13*(1), 23–30.

Lee, J.-I., Kang, J., & Stipanuk, M. H. (2006). Differential regulation of glutamate-cysteine ligase subunit expression and increased holoenzyme formation in response to cysteine deprivation. *The Biochemical Journal*, *393*(Pt 1), 181–190.

Lee, K.-K. (1998). Purification, Molecular Cloning, and Characterization of TRP32, a Novel Thioredoxin-related Mammalian Protein of 32 kDa. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(30), 19160–19166.

Leung, P. S. (2003). Review: Pancreatic Renin-Angiotensin System : A Novel Target for the Potential Treatment of Pancreatic Diseases ? *Journal of Pancreas*, *4*(2), 89–91.

Leung, P. S. (2010). Review: The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas, *690*, 89–105.

Lüllmann-Rauch, R. (2015). *Taschenlehrbuch Histologie* (5. vollstä.). Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag KG.

Lupi, R., Dotta, F., Marselli, L., Guerra, S. Del, Masini, M., Santangelo, C., … Marchetti, P. (2002). Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes*, *51*(5), 1437–1442.

Luther, J. M., & Brown, N. J. (2011). Review: The renin-angiotensin-aldosterone system and glucose homeostasis. *Trends in Pharmacological Sciences*, *32*(12), 734–739.

Ma, Y., & Hendershot, L. M. (2003). Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(37), 34864–34873.

Maedler, K., Oberholzer, J., Bucher, P., Spinas, G. a, & Donath, M. Y. (2003). Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes*, *52*(3), 726–733.

Maedler, K., Spinas, G. A., Dyntar, D., Moritz, W., Kaiser, N., & Donath, M. Y. (2001). Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes*, *50*(1), 69–76.

Manco, M., Calvani, M., & Mingrone, G. (2004). Review: Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, *6*(6), 402–413.

Maris, M., Ferreira, G. B., Hertog, W. D., Cnop, M., Waelkens, E., Overbergh, L., & Mathieu, C. (2010). High Glucose Induces Dysfunction in Insulin Secretory Cells by Different Pathways : A Proteomic Approach research articles. *Journal of Proteome Research*, *9*(12), 6274–6287.

Maris, M., Waelkens, E., Cnop, M., D'Hertog, W., Cunha, D. a, Korf, H., … Mathieu, C. (2011). Oleate-induced beta cell dysfunction and apoptosis: a proteomic approach to glucolipotoxicity by an unsaturated fatty acid. *Journal of Proteome Research*, *10*(8), 3372–85.

Masini, M., Bugliani, M., Lupi, R., del Guerra, S., Boggi, U., Filipponi, F., … Marchetti, P. (2009). Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells. *Diabetologia*, *52*(6), 1083–6.

McClenaghan, N. H., Barnett, C. R., Ah-Sing, E., Abdel-Wahab, Y. H., O'Harte, F. P., Yoon, T. W., … Flatt, P. R. (1996). Characterization of a novel glucose-responsive insulin-secreting cell line, BRIN-BD11, produced by electrofusion. *Diabetes*, *45*(8), 1132–40.

McClenaghan, N. H., Elsner, M., Tiedge, M., & Lenzen, S. (1998). Molecular characterization of the glucose-sensing mechanism in the clonal insulin-secreting BRIN-BD11 cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *242*(2), 262–6.

McGarry, J. D. (2002). Dysregulation of Fatty Acid Metabolism in the Etiology of Type 2 Diabetes. *Diabetes*, *Jan;51*((1)), 7–18.

Medizinische Hochschule Hannover, U. (2012). Kurspräperate: Endokr. Pankreas. Retrieved from http://www.mh-hannover.de/19175.html

Meisinger, C., Strassburger, K., Heier, M., Thorand, B., Baumeister, S. E., Giani, G., & Rathmann, W. (2010). Prevalence of undiagnosed diabetes and impaired glucose regulation in 35 – 59-year-old individuals in Southern Germany : the KORA F4 Study. *DIABETIC Medicine*, *Mar;27*((3)), 360–362.

Metz, T. O., Jacobs, J. M., Gritsenko, M. A., Fonte, G., Qian, W., Ii, D. G. C., … Smith, R. D. (2006). Characterization of the Human Pancreatic Islet Proteome by Two-Dimensional LC / MS / MS research articles. *Journal of Proteome Research*, *5*(12), 3345–3354.

Miller, R. S., Diaczok, D., & Cooke, D. W. (2007). Repression of GLUT4 expression by the endoplasmic reticulum stress response in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *362*(1), 188–92.

Naggert, J., Fricker, L., Varlamov, O., Nishina, P., Rouille, Y., Steiner, D., … Leiter, E. (1995). Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nature Genetics*, *10*(2), 135–142.

Neter, J. E., Stam, B. E., Kok, F. J., Grobbee, D. E., & Geleijnse, J. M. (2003). Influence of weight reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Hypertension*, *42*(5), 878–84.

Nielsen, K., Sparre, T., Larsen, M. R., Nielsen, M., Fey, S. J., Mose Larsen, P., … Karlsen, a E. (2004). Protein expression changes in a cell system of beta-cell maturation reflect an acquired sensitivity to IL-1beta. *Diabetologia*, *47*(1), 62–74.

Ochi, T. (1995). Hydrogen peroxide increases the activity of gamma-glutamylcysteine synthetase in cultured Chinese hamster V79 cells. *Archives of Toxicology*, *70*(2), 96–103.

Opara, E. C., Garfinkel, M., Hubbard, V. S., Burch, W. M., & Akwari, O. E. (1994). Effect of fatty acids on insulin release: role of chain length and degree of unsaturation. *The American Journal of Physiology*, *266*(4 Pt 1), E635–E639.

Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., … Hotamisligil, G. S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science (New York, N.Y.)*, *306*(5695), 457–461.

Paolisso, G., Gambardella, A., Amato, L., Tortoriello, R., D'Amore, A., Varricchio, M., & D'Onofrio, F. (1995). Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects. *Diabetologia*, *38*(11), 1295–1299.

Pi, J., Bai, Y., Zhang, Q., Wong, V., Floering, L. M., Daniel, K., … Collins, S. (2007). Reactive Oxygen Species as a Signal in Glucose- Stimulated Insulin Secretion. *Diabetes*, *56*(July), 1783–1791.

Pitocco, D., Zaccardi, F., Di Stasio, E., Romitelli, F., Santini, S. a, Zuppi, C., & Ghirlanda, G. (2010). Review: Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *The Review of Diabetic Studies: RDS*, *7*(1), 15–25.

Poitout, V., Hagman, D., Stein, R., Artner, I., Robertson, R. P., & Harmon, J. S. (2006). Review: Regulation of the Insulin Gene by Glucose and Fatty Acids. *The Journal of Nutrition*, *136*(4), 873–876.

Poon, H. F., Vaishnav, R. a., Getchell, T. V., Getchell, M. L., & Butterfield, D. A. (2006). Quantitative proteomics analysis of differential protein expression and oxidative modification of specific proteins in the brains of old mice. *Neurobiology of Aging*, *27*(7), 1010–1019. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.05.006

Pop-Busui, R., Sima, A., & Stevens, M. (2006). Review: Diabetic neuropathy and oxidative stress. *Diabetes/metabolism Research and Reviews*, *22*(4), 257–273.

Prentki, M., & Nolan, C. J. (2006). Review: Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, *116*(7), 1802–1812.

Rains, J. L., & Jain, S. K. (2011). Review: Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology & Medicine*, *50*(5), 567–575.

Rehm, H., & Letzel, T. (2010). Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics. In *Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics* (6. Auflage., pp. 13–22). Heidelberg: Spectrum, Akademischer Verlag (Imprint von Springer).

Robertson, R. P. (2006). Review: Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes. *Current Opinion in Pharmacology*, *6*(6), 615–619.

Rundlöf, A.-K., & Arnér, E. S. J. (2004). Review: Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events. *Antioxidants & Redox Signaling*, *6*(1), 41–52.

Saitoh, Y., Hongwei, W., Ueno, H., Mizuta, M., & Nakazato, M. (2010). Candesartan attenuates fatty acid-induced oxidative stress and NAD(P)H oxidase activity in pancreatic beta-cells. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *90*(1), 54–59.

Santos, R. a S., Ferreira, A. J., & Simões E Silva, A. C. (2008). Review: Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Experimental Physiology*, *93*(5), 519–527.

Scheen, A. J. (2004). Review: Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the Renin-Angiotensin system. *Drugs*, *64*(22), 2537–2565.

Sekhar, K., Long, M., Long, J., Xu, Z., Summar, M., & Freeman, M. (1997). Alteration of transcriptional and post-transcriptional expression of c- glutamylcysteine synthetase by diethyl maleate. *Radiation Research*, *147*(5), 592–597.

Shen, F. S., & Loh, Y. P. (1997). Intracellular misrouting and abnormal secretion of adrenocorticotropin and growth hormone in cpefat mice associated with a carboxypeptidase E mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(10), 5314–5319.

Shin, C., Moon, B., Park, K., Kim, S., Park, S., Chung, M., & Lee, H. (2001). Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients. *Diabetes Care*, *24*(4), 733–737.

Silbernagel, Klinke, Pape, & Kurtz. (2010). *Physiologie* (6. Auflage.). Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag KG.

Skov, J., Persson, F., Frøkiær, J., & Christiansen, J. S. (2014). Review: Tissue Renin-Angiotensin Systems: A Unifying Hypothesis of Metabolic Disease. *Frontiers in Endocrinology*, *5*(23), 1–7.

Stadtman, E. R., & Berlett, B. S. (1998). Review: Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metabolism Reviews*, *30*(2), 225–243.

Stallmach, Th.; Klöppel, G.; Roth, J.; Spinas, G. A. (2008). Stoffwechselerkrankungen. In W. Böcker, H. Denk, U. Heitz, & H. Moch (Eds.), *Pathologie* (4. Auflage., pp. 1133–1139). München: ElsevierGmbH, Urban & Fischer Verlag.

Stein, D. T., Stevenson, B. E., Chester, M. W., Basit, M., Daniels, M. B., Turley, S. D., & McGarry, J. D. (1997). The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *The Journal of Clinical Investigation*, *100*(2), 398–403.

Sun, Q.-A., Wu, Y., Zappacosta, F., Jeang, K.-T., Lee, B. J., Hatfield, D. L., & Gladyshev, V. N. (1999). Redox Regulation of Cell Signaling by Selenocysteine in Mammalian Thioredoxin Reductases. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(35), 24522–24530.

Tahmasebi, M., Puddefoot, J. R., Inwang, E. R., & Vinson, G. P. (1999). The tissue renin-angiotensin system in human pancreas. *The Journal of Endocrinology*, *161*(2), 317–322.

Ulrich, P., & Cerami, A. (2001). Review: Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Progress in Hormone Research*, *56*, 1–21.

Unger, R., & Zhou, Y. (2001). Review: Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. *Diabetes*, *50*(1), 118–121.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Review: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *39*(1), 44–84.

Villela D, Leonhardt J, Patel N, Joseph J, Kirsch S, Hallberg A, Unger T, Bader M, Santos RA, Sumners C, S. U. (2015). Angiotensin type 2 receptor (AT2R) and receptor Mas: a complex liaison. *Clinical Science (London, England 1979)*, *128*(4), 227–34.

Vincent, A. M., Russell, J. W., Low, P., & Feldman, E. L. (2004). Review: Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine Reviews*, *25*(4), 612–628.

Wang, G., Liu, G., Wang, X., Sethi, S., Ali-Fehmi, R., Abrams, J., … Yang, Z.-Q. (2012). ERLIN2 promotes breast cancer cell survival by modulating endoplasmic reticulum stress pathways. *BMC Cancer*, *12*(1), 225.

Wang, G., Zhang, X., Lee, J.-S., Wang, X., Yang, Z.-Q., & Zhang, K. (2012). Endoplasmic reticulum factor ERLIN2 regulates cytosolic lipid content in cancer cells. *The Biochemical Journal*, *446*(3), 415–425.

Wei, Y., Sowers, J. R., Nistala, R., Gong, H., Uptergrove, G. M.-E., Clark, S. E., … Stump, C. S. (2006). Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(46), 35137–35146.

Yki-Jarvinen, H., & Makimattila, S. (1997). Review: Insulin resistance due to hyperglycaemia: an adaptation protecting insulin-sensitive tissues. *Diabetologia*, *40*(2), 141–144.

Yoshikawa, H., Tajiri, Y., Sako, Y., Hashimoto, T., Umeda, F., & Nawata, H. (2001). Effects of free fatty acids on beta-cell functions: a possible involvement of peroxisome proliferator-activated receptors alpha or pancreatic/duodenal homeobox. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *50*(5), 613–618.

Yuan, L., Li, X., Li, J., Li, H.-L., & Cheng, S.-S. (2013). Effects of renin-angiotensin system blockade on the islet morphology and function in rats with long-term high-fat diet. *Acta Diabetologica*, *50*(4), 479–488.

Zhong, L., & Holmgren, A. (2000). Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(24), 18121–18128.

Zhou, Y., & Grill, V. (1995). Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *80*(5), 1584–1590.

Zhou, Y. P., Teng, D., Dralyuk, F., Ostrega, D., Roe, M. W., Philipson, L., & Polonsky, K. S. (1998). Apoptosis in insulin-secreting cells. Evidence for the role of intracellular Ca2+ stores and arachidonic acid metabolism. *The Journal of Clinical Investigation*, *101*(8), 1623–1632.

Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., … Ron, D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & Development*, *12*(7), 982–995.

8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Ort, Datum Unterschrift

9 Danksagung

Besonders herzlich danke ich Herrn Professor Uwe Lendeckel für die vertrauensvolle Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.
Mein ausdrücklicher Dank gilt meiner Betreuerin, Frau Dr. Simone Venz. Sie gewährte mir jederzeit bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit außerordentlich sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung. Dabei bedanke ich mich auch für die Freiheit und Geduld, die sie mir während der gesamten Promotionszeit gewährte.
Für ihre konstruktiven Ideen und ihr Feedback danke ich auch Frau Dr. Heike Junker. Mit großem Engagement hat sie jederzeit tatkräftig geholfen, spezielle Probleme der Proteomics zu lösen.
Dankbar bin ich desweiteren für die immer freundliche und geduldige Bereitschaft von Robert Beyer, mir sein großes praktisches Wissen über die verschiedensten Labor-Methoden weiterzugeben.
Auch den Doktorantinnen Frau Carmen Härdtner und Frau Anika Sahr danke ich für ihren kompetenter Rat und ihre Hilfe, die mir in zahlreichen Angelegenheiten sehr zugute kamen.
Ein großer Dank geht an Frau Dipl. Katrin Darm und an Herrn Dr. Christian Scharf dafür, dass ich im HNO-Forschungslabor die DIGE-Experimente durchführen durfte und stets bei Fragen eine schnelle und äußerst kompetente Antwort erhielt.
Weiterhin möchte ich meinen besonderen Dank dem INTERFAKULTÄREN INSTITUT FÜR GENETIK UND FUNKTIONELLE GENOMFORSCHUNG für das Bereitstellen des DIGE-Gele-Scanners und das Ermöglichen der MS-Analysen aussprechen.

Meiner ehemaligen Mitbewohnerin und Apothekerin, Frau Susanne Reuter möchte ich für das tapfere Gegenlesen meiner aller ersten Textentwürfe sowie für ihre Geduld danken, mit der sie meinen Laboralltagsschildungen zuhörte.
Meinem Komillitonen, Herrn Martin Feig danke ich dafür, dass er mir nach ernüchternden Tagen stets zur Seite stand, mich immer wieder aufgemuntert hat und mir Durchhaltevermögen zusprach.

Meinen Eltern möchte ich ganz besonders für die regelmäßige Motivation zum Schreiben der Doktorarbeit sowie für die finanzielle Unterstützung während meines gesamten Studiums danken.

10 Anhang

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
1	1	ADPRH_RAT	[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase	39,94	5,6	10	212
2	1	1433B_RAT	14-3-3 protein beta/alpha	28,04	4,8	13	143
2	2	1433F_RAT	14-3-3 protein eta	28,19	4,8	12	134
2	3	1433G_RAT	14-3-3 protein gamma	28,28	4,8	9	110
2	4	1433Z_RAT	14-3-3 protein zeta/delta	27,75	4,7	6	81
3	1	1433E_RAT	14-3-3 protein epsilon	29,16	4,6	22	418
4	1	1433E_RAT	14-3-3 protein epsilon	29,16	4,6	19	366
5	1	1433E_RAT	14-3-3 protein epsilon	29,16	4,6	7	229
6	1	1433E_RAT	14-3-3 protein epsilon	29,16	4,6	18	326
7	1	1433E_RAT	14-3-3 protein epsilon	29,16	4,6	13	296
8	1	1433G_RAT	14-3-3 protein gamma	28,28	4,8	4	58
9	1	1433Z_RAT	14-3-3 protein zeta/delta	27,75	4,7	16	268
9	2	1433G_RAT	14-3-3 protein gamma	28,28	4,8	14	248
9	3	1433F_RAT	14-3-3 protein eta	28,19	4,8	9	195
9	4	1433B_RAT	14-3-3 protein beta/alpha	28,04	4,8	13	192
9	5	1433T_RAT	14-3-3 protein theta	27,76	4,7	17	172
10	1	1433Z_RAT	14-3-3 protein zeta/delta	27,75	4,7	18	446
10	2	1433G_RAT	14-3-3 protein gamma	28,28	4,8	9	209
10	3	1433F_RAT	14-3-3 protein eta	28,19	4,8	7	193
10	4	1433B_RAT	14-3-3 protein beta/alpha	28,04	4,8	10	185
10	5	1433T_RAT	14-3-3 protein theta	27,76	4,7	13	77
11	1	1433Z_RAT	14-3-3 protein zeta/delta	27,75	4,7	15	296
11	2	1433G_RAT	14-3-3 protein gamma	28,28	4,8	10	169
11	3	1433F_RAT	14-3-3 protein eta	28,19	4,8	8	154
11	4	1433B_RAT	14-3-3 protein beta/alpha	28,04	4,8	10	154
11	5	1433T_RAT	14-3-3 protein theta	27,76	4,7	11	53
12	1	1433Z_RAT	14-3-3 protein zeta/delta	27,75	4,7	15	120
12	2	1433G_RAT	14-3-3 protein gamma	28,28	4,8	13	92
12	3	1433F_RAT	14-3-3 protein eta	28,19	4,8	9	54
13	1	DHB13_RAT	17-beta hydroxysteroid dehydrogenase 13	33,47	9,5	9	48
14	1	PRS7_RAT	26S protease regulatory subunit 7	48,54	5,6	24	347
14	2	GNAS2_RAT	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	45,63	5,7	15	148

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
14	3	GNAS1_RAT	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	122,81	4,7	16	105
14	4	GDIB_RAT	Rab GDP dissociation inhibitor beta	50,50	5,9	11	57
15	1	PRS7_RAT	26S protease regulatory subunit 7	48,54	5,6	26	491
15	2	GNAS2_RAT	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	45,63	5,7	15	159
15	3	GDIB_RAT	Rab GDP dissociation inhibitor beta	50,50	5,9	18	157
15	4	GNAS1_RAT	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	122,81	4,7	17	119
15	5	GDIA_RAT	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	50,50	5,0	9	89
16	1	PRS8_RAT	26S protease regulatory subunit 8	45,60	7,1	28	538
17	1	PRS8_RAT	26S protease regulatory subunit 8	45,60	7,1	23	140
18	1	PRS10_MOUSE	26S protease regulatory subunit S10B	44,15	7,1	25	596
19	1	PSD13_MOUSE	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	42,78	5,5	15	382
20	1	PSD7_HUMAN	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	37,00	6,3	14	545
21	1	PSMD9_RAT	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	24,81	6,4	13	229
22	1	HAP28_RAT	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein	20,59	6,8	8	295
23	1	ODO1_RAT	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochondrial	116,22	6,3	20	374
24	1	ODO1_RAT	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochondrial	116,22	6,3	18	241
25	1	ODO1_RAT	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochondrial	116,22	6,3	28	497

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
26	1	ODO1_RAT	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochondrial	116,22	6,3	21	407
27	1	ODO1_RAT	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochondrial	116,22	6,3	26	319
28	1	ODO1_RAT	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochondrial	116,22	6,3	26	134
29	1	RM38_RAT	39S ribosomal protein L38, mitochondrial	44,81	7,7	21	522
30	1	PPID_RAT	40 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	40,74	6,7	15	374
31	1	RS12_RAT	40S ribosomal protein S12	14,52	6,8	6	77
32	1	RSSA_RAT	40S ribosomal protein SA	32,80	4,8	12	631
33	1	CH60_RAT	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	60,92	5,9	7	196
34	1	CH60_RAT	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	60,92	5,9	7	225
35	1	CH60_RAT	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	60,92	5,9	6	236
36	1	CH60_RAT	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	60,92	5,9	7	168
37	1	CH60_RAT	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	60,92	5,9	7	247
37	2	PERI_RAT	Peripherin	53,52	5,4	5	72
38	1	CH60_RAT	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	60,92	5,9	4	225
38	2	PERI_RAT	Peripherin	53,52	5,4	7	222
39	1	RLA0_RAT	60S acidic ribosomal protein P0	34,19	5,9	16	331
40	1	RLA0_RAT	60S acidic ribosomal protein P0	34,19	5,9	21	532
41	1	RLA0_RAT	60S acidic ribosomal protein P0	34,19	5,9	18	631
42	1	RLA0_RAT	60S acidic ribosomal protein P0	34,19	5,9	14	246
43	1	RLA2_RAT	60S acidic ribosomal protein P2	11,68	4,4	6	363
44	1	K6PP_RAT	6-phosphofructokinase type C	85,67	7,0	24	641
45	1	K6PP_RAT	6-phosphofructokinase type C	85,67	7,0	6	84
46	1	K6PP_RAT	6-phosphofructokinase type C	85,67	7,0	27	478

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
46	2	ACON_RAT	Aconitate hydratase, mitochondrial	85,38	7,9	19	77
47	1	K6PL_RAT	6-phosphofructokinase, liver type	85,28	7,1	26	433
48	1	K6PL_RAT	6-phosphofructokinase, liver type	85,28	7,1	28	488
49	1	6PGD_RAT	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	53,20	6,6	18	564
50	1	GRP78_RAT	78 kDa glucose-regulated protein	72,30	5,1	18	473
51	1	GRP78_RAT	78 kDa glucose-regulated protein	72,30	5,1	23	539
52	1	GRP78_RAT	78 kDa glucose-regulated protein	72,30	5,1	27	629
53	1	GRP78_RAT	78 kDa glucose-regulated protein	72,30	5,1	3	132
54	1	AACS_RAT	Acetoacetyl-CoA synthetase	74,99	6,1	8	61
55	1	AACS_RAT	Acetoacetyl-CoA synthetase	74,99	6,1	25	540
55	2	DHSA_RAT	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	71,57	6,8	17	65
56	1	ACON_RAT	Aconitate hydratase, mitochondrial	85,38	7,9	27	590
57	1	ACON_RAT	Aconitate hydratase, mitochondrial	85,38	7,9	32	650
58	1	ACON_RAT	Aconitate hydratase, mitochondrial	85,38	7,9	30	607
59	1	ACON_RAT	Aconitate hydratase, mitochondrial	85,38	7,9	26	661
60	1	ACON_RAT	Aconitate hydratase, mitochondrial	85,38	7,9	31	633
61	1	AFAP1_RAT	Actin filament-associated protein 1	80,70	8,8	1	55
62	1	ACTB_RAT	Actin, cytoplasmic 1	41,71	5,3	5	292
62	2	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2	41,77	5,3	4	281
62	3	ACTC_RAT	Actin, alpha cardiac muscle 1	41,99	5,2	3	221
63	1	ACTB_RAT	Actin, cytoplasmic 1	41,71	5,3	3	187
63	2	ACTC_RAT	Actin, alpha cardiac muscle 1	41,99	5,2	3	186
63	3	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2	41,77	5,3	2	180
64	1	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2	41,77	5,3	4	137
65	1	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2	41,77	5,3	7	192

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
65	2	ACTA_RAT	Actin, aortic smooth muscle	41,98	5,2	7	63
65	3	ACTC_RAT	Actin, alpha cardiac muscle 1	41,99	5,2	6	56
66	1	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2	41,77	5,3	6	132
67	1	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2	41,77	5,3	6	142
68	1	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2	41,77	5,3	5	149
69	1	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2	41,77	5,3	4	142
70	1	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2	41,77	5,3	5	155
70	2	ACTA_RAT	Actin, aortic smooth muscle	41,98	5,2	3	148
71	1	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2	41,77	5,3	4	101
72	1	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2	41,77	5,3	6	138
73	1	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2	41,77	5,3	6	145
74	1	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2	41,77	5,3	6	165
75	1	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2	41,77	5,3	3	115
76	1	ARP2_RAT	Actin-related protein 2	44,71	6,3	16	464
77	1	ARPC2_RAT	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	34,37	6,8	19	646
78	1	ARPC2_RAT	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	34,37	6,8	24	530
78	2	M2GD_RAT	Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial	95,99	6,9	14	49
79	1	ARP3_RAT	Actin-related protein 3	47,33	5,6	23	533
80	1	ARP3_RAT	Actin-related protein 3	47,33	5,6	15	135
80	2	PRS7_RAT	26S protease regulatory subunit 7	48,54	5,6	13	52
81	1	NECP1_RAT	Adaptin ear-binding coat-associated protein 1	29,77	6,0	8	244
82	1	ADK_RAT	Adenosine kinase	40,11	5,7	11	235
82	2	NDUS2_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	52,53	6,5	19	100
83	1	KAD2_RAT	Adenylate kinase isoenzyme 2, mitochondrial	26,36	6,3	16	270
83	2	CLIC6_RAT	Chloride intracellular channel 6	64,65	4,3	2	53
84	1	CAP1_RAT	Adenylyl cyclase-associated protein 1	51,56	7,2	15	317
84	2	CV028_RAT	UPF0027 protein C22orf28 homolog	55,21	6,8	8	101

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
85	1	CAP1_RAT	Adenylyl cyclase-associated protein 1	51,56	7,2	14	374
86	1	CAP1_RAT	Adenylyl cyclase-associated protein 1	51,56	7,2	19	387
87	1	ARL3_RAT	ADP-ribosylation factor-like protein 3	20,44	6,7	6	89
88	1	AK1A1_RAT	Alcohol dehydrogenase [NADP+]	36,48	6,8	16	495
89	1	AK1A1_RAT	Alcohol dehydrogenase [NADP+]	36,48	6,8	18	474
90	1	A16A1_RAT	Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	85,36	5,8	17	331
90	2	MYH4_RAT	Myosin-4	222,74	5,6	28	52
91	1	ALDH2_RAT	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	56,45	6,6	13	256
91	2	AL7A1_RAT	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase (Fragment)	25,14	7,7	13	99
92	1	ALDR_RAT	Aldose reductase	35,77	6,3	17	357
93	1	ALD2_MOUSE	Aldose reductase-related protein 2	36,10	6,0	8	196
93	2	KCRU_RAT	Creatine kinase, ubiquitous mitochondrial	47,00	8,7	8	50
94	1	ADAS_RAT	Alkyldihydroxyacetonephosphate synthase, peroxisomal	71,54	7,0	16	375
94	2	TKT_RAT	Transketolase	67,60	7,2	9	122
95	1	FETUA_BOVIN	Alpha-2-HS-glycoprotein	38,39	5,3	5	117
96	1	AMRP_RAT	Alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein	42,01	6,9	23	575
97	1	AMRP_RAT	Alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein	42,01	6,9	12	101
98	1	AL7A1_RAT	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase (Fragment)	25,14	7,7	13	99
99	1	ENOA_RAT	Alpha-enolase	47,10	6,2	25	439
99	2	METK1_RAT	S-adenosylmethionine synthetase isoform type-1	43,67	5,6	11	211
100	1	ENOA_RAT	Alpha-enolase	47,10	6,2	7	78
101	1	ENOA_RAT	Alpha-enolase	47,10	6,2	20	503
102	1	ENOA_RAT	Alpha-enolase	47,10	6,2	20	440

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
103	1	ENOA_RAT	Alpha-enolase	47,10	6,2	7	51
104	1	ENOA_RAT	Alpha-enolase	47,10	6,2	24	469
105	1	ENOA_RAT	Alpha-enolase	47,10	6,2	17	167
106	1	ENOA_RAT	Alpha-enolase	47,10	6,2	10	226
107	1	ENOA_RAT	Alpha-enolase	47,10	6,2	14	97
107	2	EF1G_RAT	Elongation factor 1-gamma	50,03	6,3	9	58
107	3	SPTA2_RAT	Spectrin alpha chain, brain	284,46	5,2	29	52
108	1	ENOA_RAT	Alpha-enolase	47,10	6,2	11	235
109	1	SNAA_RAT	Alpha-soluble NSF attachment protein	33,17	5,3	15	181
110	1	ACY1A_RAT	Aminoacylase-1A	45,78	6,0	24	615
110	2	ACY1B_RAT	Aminoacylase-1B	45,79	5,6	8	368
110	3	HSP7C_RAT	Heat shock cognate 71 kDa protein	70,83	5,4	15	60
110	4	ARHG7_RAT	Rho guanine nucleotide exchange factor 7	73,09	6,7	15	59
111	1	ANXA2_RAT	Annexin A2	38,65	7,6	20	253
111	2	IDH3A_RAT	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	39,59	6,5	11	135
112	1	ANXA4_RAT	Annexin A4	35,83	5,3	28	601
113	1	ANXA5_RAT	Annexin A5	35,72	4,9	27	569
113	2	SFRS2_RAT	Splicing factor, arginine/serine-rich 2	25,46	11,9	8	88
114	1	ANXA5_RAT	Annexin A5	35,72	4,9	7	125
115	1	AP1M1_RAT	AP-1 complex subunit mu-1	48,53	6,8	24	420
115	2	FLOT1_RAT	Flotillin-1	47,47	6,7	19	99
116	1	ASNS_RAT	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	64,21	6,0	14	127
116	2	PGM1_RAT	Phosphoglucomutase-1	61,36	6,3	8	72
117	1	ASNS_RAT	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	64,21	6,0	24	393
118	1	AATC_RAT	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	46,40	6,7	23	661
119	1	AATC_RAT	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	46,40	6,7	5	61
120	1	AATC_RAT	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	46,40	6,7	16	480

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
121	1	DNPEP_MOUSE	Aspartyl aminopeptidase	52,13	6,7	16	373
122	1	SYDC_RAT	Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	57,09	6,0	20	503
122	2	TCPB_RAT	T-complex protein 1 subunit beta	57,42	6,0	13	64
123	1	SYDC_RAT	Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	57,09	6,0	37	789
124	1	SYDM_RAT	Aspartyl-tRNA synthetase, mitochondrial	73,91	6,7	16	63
125	1	ATPA_RAT	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	59,72	9,2	34	965
125	2	CASP6_RAT	Caspase-6	31,54	6,5	2	53
125	2	MESD2_RAT	Mesoderm development candidate 2	25,20	5,5	10	59
126	1	ATPA_RAT	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	59,72	9,2	35	737
126	2	CAN10_RAT	Calpain-10	74,48	7,0	12	52
127	1	ATPA_RAT	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	59,72	9,2	30	757
127	2	CBR1_RAT	Carbonyl reductase [NADPH] 1	30,56	8,2	16	220
128	1	ATPB_RAT	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	56,32	5,2	4	264
129	1	ATPB_RAT	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	56,32	5,2	11	381
130	1	ATPB_RAT	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	56,32	5,2	8	348
131	1	ATAD1_RAT	ATPase family AAA domain-containing protein 1	40,69	6,4	12	61
131	2	CLIP2_RAT	CAP-Gly domain-containing linker protein 2	115,41	6,1	19	55
132	1	ACLY_RAT	ATP-citrate synthase	120,56	7,0	34	371
133	1	ACLY_RAT	ATP-citrate synthase	120,56	7,0	21	281
134	1	ACLY_RAT	ATP-citrate synthase	120,56	7,0	33	358
135	1	DDX1_RAT	ATP-dependent RNA helicase DDX1	82,44	6,8	20	521
135	2	DJC10_RAT	DnaJ homolog subfamily C member 10	90,69	6,8	11	86
136	1	DDX1_RAT	ATP-dependent RNA helicase DDX1	82,44	6,8	25	427
136	2	DJC10_RAT	DnaJ homolog subfamily C member 10	90,69	6,8	11	89

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
137	1	DDX39_RAT	ATP-dependent RNA helicase DDX39	49,08	5,5	27	488
137	2	UAP56_RAT	Spliceosome RNA helicase Bat1	49,00	5,4	20	370
138	1	DDX3X_MOUSE	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	73,06	6,7	9	236
138	2	DDX3L_MOUSE	Putative ATP-dependent RNA helicase Pl10	73,10	6,7	9	235
138	4	KIF11_MOUSE	Kinesin-like protein KIF11	117,95	5,7	9	69
139	1	DDX3X_MOUSE	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	73,06	6,7	22	597
139	3	DDX3L_MOUSE	Putative ATP-dependent RNA helicase Pl10	73,10	6,7	18	469
139	4	DDX3Y_MOUSE	ATP-dependent RNA helicase DDX3Y	73,38	7,2	15	429
140	1	DDX3X_MOUSE	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	73,06	6,7	28	428
140	3	DDX3Y_MOUSE	ATP-dependent RNA helicase DDX3Y	73,38	7,2	24	373
140	4	DDX3L_MOUSE	Putative ATP-dependent RNA helicase Pl10	73,10	6,7	22	356
141	1	BECN1_RAT	Beclin-1	51,52	4,9	7	48
142	1	SNAB_RAT	Beta-soluble NSF attachment protein	33,45	5,3	15	160
143	1	PAPS1_MOUSE	Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthetase 1	70,75	6,3	21	247
143	4	FUBP1_MOUSE	Far upstream element-binding protein 1	68,50	7,7	17	75
144	1	PUR9_RAT	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	64,17	6,7	29	851
144	2	LMNA_RAT	Lamin-A	74,28	6,5	18	71
144	3	DPYL1_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 1	62,16	6,6	13	53
145	1	PUR9_RAT	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	64,17	6,7	6	164
145	2	LMNA_RAT	Lamin-A	74,28	6,5	11	114
146	1	PUR9_RAT	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	64,17	6,7	9	94

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
147	1	PUR9_RAT	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	64,17	6,7	26	814
148	1	C1TC_RAT	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	100,93	7,1	5	130
149	1	CAD23_RAT	Cadherin-23	365,23	4,5	7	49
150	1	CAD23_RAT	Cadherin-23	365,23	4,5	7	52
151	1	CYBP_RAT	Calcyclin-binding protein	26,52	7,6	8	304
151	2	KAD2_RAT	Adenylate kinase isoenzyme 2, mitochondrial	26,36	6,3	11	168
151	2	DEST_RAT	Destrin	18,52	8,2	11	173
151	2	ERP29_RAT	Endoplasmic reticulum protein ERp29	28,56	6,2	13	94
151	2	PPIA_RAT	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	17,86	8,3	10	190
152	1	CALR_RAT	Calreticulin	47,97	4,3	9	167
153	1	CALU_MOUSE	Calumenin	37,04	4,5	1	99
154	1	CAPR1_RAT	Caprin-1	78,07	5,1	3	110
155	1	CAPR1_RAT	Caprin-1	78,07	5,1	4	131
156	1	CBR1_RAT	Carbonyl reductase [NADPH] 1	30,56	8,2	2	110
156	2	HNRPD_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	38,17	7,6	3	59
157	1	CPT2_RAT	Carnitine	74,06	6,9	14	172
158	1	CPT2_RAT	Carnitine	74,06	6,9	24	517
159	1	CSK21_RAT	Casein kinase II subunit alpha	45,04	7,3	19	495
160	1	CSK21_RAT	Casein kinase II subunit alpha	45,04	7,3	19	590
161	1	CASP3_RAT	Caspase-3	31,47	5,9	9	90
161	2	NDKA_RAT	Nucleoside diphosphate kinase A	17,18	6,0	11	191
161	2	NDKB_RAT	Nucleoside diphosphate kinase B	17,27	6,9	8	165
162	1	CASP3_RAT	Caspase-3	31,47	5,9	14	316
163	1	CATA_RAT	Catalase	59,72	7,1	24	546
163	2	KPYM_RAT	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57,78	6,6	16	69
164	1	CATA_RAT	Catalase	59,72	7,1	14	237
164	2	KPYM_RAT	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57,78	6,6	17	237
165	1	CATD_RAT	Cathepsin D	44,65	6,7	9	185
166	1	CATD_RAT	Cathepsin D	44,65	6,7	9	113

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
166	2	PURB_RAT	Transcriptional activator protein Pur-beta	33,40	5,4	7	63
167	1	CHM4B_MOUSE	Charged multivesicular body protein 4b	24,92	4,8	9	352
168	1	CLIC1_MOUSE	Chloride intracellular channel protein 1	27,00	5,1	6	210
169	1	CLIC4_RAT	Chloride intracellular channel protein 4	28,61	5,9	14	219
170	1	CBX5_MOUSE	Chromobox protein homolog 5	22,17	5,7	16	291
170	3	CBX3_MOUSE	Chromobox protein homolog 3	20,84	5,1	4	100
171	1	CISY_RAT	Citrate synthase, mitochondrial	51,83	8,5	6	53
171	2	IF4E_RAT	Eukaryotic translation initiation factor 4E	25,04	5,8	4	58
171	2	NDKA_RAT	Nucleoside diphosphate kinase A	17,18	6,0	11	188
172	1	CLH_RAT	Clathrin heavy chain 1	191,48	5,5	34	231
173	1	CLH_RAT	Clathrin heavy chain 1	191,48	5,5	42	455
174	1	CLCA_RAT	Clathrin light chain A	26,96	4,4	11	182
175	1	CSTF1_RAT	Cleavage stimulation factor 50 kDa subunit	48,35	6,1	20	575
175	2	ENOA_RAT	Alpha-enolase	47,10	6,2	19	152
176	1	COPB_RAT	Coatomer subunit beta	106,94	5,7	21	139
177	1	COPD_RAT	Coatomer subunit delta	57,16	5,9	28	413
177	2	TCPG_RAT	T-complex protein 1 subunit gamma	60,61	6,2	19	317
177	3	DPYL2_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 2	62,24	6,0	14	62
178	1	COF1_RAT	Cofilin-1	18,52	8,2	12	153
179	1	CSDE1_RAT	Cold shock domain-containing protein E1	88,84	6,0	29	549
180	1	CSDE1_RAT	Cold shock domain-containing protein E1	88,84	6,0	21	240
180	2	OPA1_RAT	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	111,24	7,2	25	191
181	1	CSDE1_RAT	Cold shock domain-containing protein E1	88,84	6,0	31	495
182	1	CSN1_RAT	C	53,39	6,4	14	53
183	1	CSN1_RAT	C	53,39	6,4	26	356
184	1	HEM6_RAT	Coproporphyrinogen III oxidase, mitochondrial	49,25	8,8	25	359
184	2	SPTA2_RAT	Spectrin alpha chain, brain	284,46	5,2	24	54

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
185	1	COR1B_RAT	Coronin-1B	53,81	5,7	10	54
186	1	KCRU_RAT	Creatine kinase, ubiquitous mitochondrial	47,00	8,7	18	228
186	2	CISY_RAT	Citrate synthase, mitochondrial	51,83	8,5	7	114
186	3	PUR6_RAT	Multifunctional protein ADE2	47,07	7,9	13	55
187	1	KCRU_RAT	Creatine kinase, ubiquitous mitochondrial	47,00	8,7	15	124
187	2	CCNE1_RAT	G1/S-specific cyclin-E1	47,45	6,0	11	50
187	2	MDHC_RAT	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	36,46	6,2	3	72
187	2	PGK1_RAT	Phosphoglycerate kinase 1	44,51	8,0	6	74
187	2	OSGEP_RAT	Probable =Osialoglycoprotein endopeptidase (Fragment)	34,63	5,8	9	74
187	2	PP1G_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	36,96	6,1	16	306
188	1	KCRU_RAT	Creatine kinase, ubiquitous mitochondrial	47,00	8,7	19	157
188	2	CAZA1_RAT	F-actin-capping protein subunit alpha-1	32,89	5,4	3	77
188	2	HNRPD_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	38,17	7,6	3	73
188	2	PGK1_RAT	Phosphoglycerate kinase 1	44,51	8,0	9	81
188	2	PGAM2_RAT	Phosphoglycerate mutase 2	28,74	8,9	8	113
188	2	PRPS2_RAT	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2	34,79	6,2	10	314
188	2	PP1G_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	36,96	6,1	10	178
189	1	PYRG1_MOUSE	CTP synthase 1	66,64	6,1	20	224
189	2	SYG_MOUSE	Glycyl-tRNA synthetase	81,83	6,2	12	222
189	3	PYRG1_CRIGR	CTP synthase 1 (Fragment)	50,71	5,9	14	156
190	1	CCNH_RAT	Cyclin-H	37,59	6,7	11	60
190	2	SFRS7_HUMAN	Splicing factor, arginine/serine-rich 7	27,35	11,8	4	84
191	1	QCR1_RAT	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	52,82	5,6	3	58

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
192	1	ACOC_RAT	Cytoplasmic aconitate hydratase	98,07	6,7	30	439
192	2	EF2_RAT	Elongation factor 2	95,22	6,4	21	68
193	1	ACOC_RAT	Cytoplasmic aconitate hydratase	98,07	6,7	22	526
194	1	ACOC_RAT	Cytoplasmic aconitate hydratase	98,07	6,7	20	74
194	2	EF2_RAT	Elongation factor 2	95,22	6,4	19	55
195	1	AMPL_RAT	Cytosol aminopeptidase	56,11	6,8	25	365
196	1	5NT3L_RAT	Cytosolic 5'-nucleotidase III-like protein	33,67	6,3	19	415
197	1	BACH_RAT	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	42,71	8,8	19	291
198	1	BACH_RAT	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	42,71	8,8	14	181
199	1	ECH1_RAT	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	36,15	8,1	15	187
199	2	PGAM2_RAT	Phosphoglycerate mutase 2	28,74	8,9	5	53
199	2	PIR_RAT	Pirin	32,16	6,2	13	165
199	2	PP1A_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	37,49	5,9	13	234
200	1	DENR_CHICK	Density-regulated protein	22,14	5,1	2	152
201	1	DLDH_RAT	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	54,00	8,0	23	588
202	1	DPYL1_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 1	62,16	6,6	15	68
203	1	DPYL1_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 1	62,16	6,6	24	660
203	2	PUR9_RAT	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	64,17	6,7	14	68
204	1	DPYL1_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 1	62,16	6,6	4	66
204	2	DPYL3_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 3	61,93	6,0	2	56
205	1	DPYL1_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 1	62,16	6,6	13	54
206	1	DPYL1_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 1	62,16	6,6	13	109
206	2	DNM1L_RAT	Dynamin-1-like protein	83,86	6,6	15	62
206	3	MKLN1_RAT	Muskelin	84,78	5,9	17	52

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
207	1	DPYL2_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 2	62,24	6,0	29	938
207	2	PGM1_RAT	Phosphoglucomutase-1	61,36	6,3	13	54
208	1	DPYL2_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 2	62,24	6,0	22	362
208	2	STIP1_RAT	Stress-induced-phosphoprotein 1	62,53	6,4	19	141
209	1	DPYL2_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 2	62,24	6,0	25	663
209	2	KIF5C_RAT	Kinesin heavy chain isoform 5C (Fragment)	27,15	5,9	9	50
210	1	DPYL2_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 2	62,24	6,0	18	328
210	2	COPD_RAT	Coatomer subunit delta	57,16	5,9	24	265
211	1	DPYL2_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 2	62,24	6,0	18	874
212	1	DPP9_HUMAN	Dipeptidyl peptidase 9	98,20	6,0	8	92
212	3	SYMC_MOUSE	Methionyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	101,37	6,8	8	70
213	1	MSH2_RAT	DNA mismatch repair protein Msh2	103,96	5,8	25	206
214	1	MCM7_BOVIN	DNA replication licensing factor MCM7	81,26	5,8	9	99
215	1	MCM7_BOVIN	DNA replication licensing factor MCM7	81,26	5,8	10	277
216	1	DNJA1_RAT	DnaJ homolog subfamily A member 1	44,84	6,7	16	367
217	1	DNJA1_RAT	DnaJ homolog subfamily A member 1	44,84	6,7	20	484
217	2	LIS1_RAT	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	46,64	7,0	5	75
218	1	DJB11_RAT	DnaJ homolog subfamily B member 11	40,47	5,9	17	323
219	1	DJB11_RAT	DnaJ homolog subfamily B member 11	40,47	5,9	11	87
220	1	DNJB6_RAT	DnaJ homolog subfamily B member 6	38,90	9,4	6	157
221	1	DNJC9_MOUSE	DnaJ homolog subfamily C member 9	30,04	5,8	9	75
222	1	MRE11_RAT	Double-strand break repair protein MRE11A	80,07	5,7	10	56
223	1	DNM1L_RAT	Dynamin-1-like protein	83,86	6,6	12	162
223	3	DDX3Y_MOUSE	ATP-dependent RNA helicase DDX3Y	73,38	7,2	8	222

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
224	1	DNM1L_RAT	Dynamin-1-like protein	83,86	6,6	8	69
225	1	DNM1L_RAT	Dynamin-1-like protein	83,86	6,6	18	121
225	2	LRRC7_RAT	Leucine-rich repeat-containing protein 7	167,38	6,1	22	52
226	1	EMAL2_RAT	Echinoderm microtubule-associated protein-like 2	70,67	5,9	13	286
226	2	DDAH1_RAT	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	31,41	5,8	11	57
227	1	ENPP1_RAT	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 1	102,88	6,1	11	74
228	1	ETFD_RAT	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	68,15	7,3	22	430
228	2	ARFG2_RAT	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 2	56,52	8,1	16	72
228	3	PERI_RAT	Peripherin	53,52	5,4	13	56
229	1	EF1G_RAT	Elongation factor 1-gamma	50,03	6,3	18	421
230	1	EF1G_RAT	Elongation factor 1-gamma	50,03	6,3	15	400
231	1	EF1G_RAT	Elongation factor 1-gamma	50,03	6,3	20	447
232	1	EF2_RAT	Elongation factor 2	95,22	6,4	19	232
233	1	EF2_RAT	Elongation factor 2	95,22	6,4	13	53
234	1	EF2_RAT	Elongation factor 2	95,22	6,4	32	483
235	1	EF2_RAT	Elongation factor 2	95,22	6,4	27	529
236	1	EF2_RAT	Elongation factor 2	95,22	6,4	27	608
237	1	EF2_RAT	Elongation factor 2	95,22	6,4	31	578
238	1	EF2_RAT	Elongation factor 2	95,22	6,4	34	678
239	1	EF2_RAT	Elongation factor 2	95,22	6,4	38	793
240	1	EF2_RAT	Elongation factor 2	95,22	6,4	33	585
240	2	DYN2_RAT	Dynamin-2	98,17	7,0	16	49
241	1	EF2_RAT	Elongation factor 2	95,22	6,4	8	268
241	2	ACOC_RAT	Cytoplasmic aconitate hydratase	98,07	6,7	11	60
242	1	EF2_RAT	Elongation factor 2	95,22	6,4	24	555
243	1	EF2_RAT	Elongation factor 2	95,22	6,4	26	697
244	1	EF2_RAT	Elongation factor 2	95,22	6,4	38	737
245	1	EF2_RAT	Elongation factor 2	95,22	6,4	29	759

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
246	1	EF2_RAT	Elongation factor 2	95,22	6,4	16	537
247	1	EFG1_RAT	Elongation factor G 1, mitochondrial	83,72	7,0	18	208
247	2	MOES_RAT	Moesin	67,70	6,2	10	65
248	1	EFTU_RAT	Elongation factor Tu, mitochondrial	49,49	7,2	31	716
249	1	ELP2_RAT	Elongator complex protein 2	91,69	5,5	8	153
249	2	TFP11_RAT	Tuftelin-interacting protein 11	96,09	5,6	21	87
249	3	ABRA_RAT	Actin-binding Rho-activating protein	42,84	8,6	14	54
250	1	ELP2_RAT	Elongator complex protein 2	91,69	5,5	13	300
251	1	ELP2_RAT	Elongator complex protein 2	91,69	5,5	8	64
252	1	ERP29_RAT	Endoplasmic reticulum protein ERp29	28,56	6,2	19	441
252	2	NDKA_RAT	Nucleoside diphosphate kinase A	17,18	6,0	4	114
252	2	PSME1_RAT	Proteasome activator complex subunit 1	28,56	5,8	13	165
253	1	ENPL_RAT	Endoplasmin	92,71	4,7	25	455
254	1	ERLN2_MOUSE	Erlin-2	37,85	5,4	17	298
254	4	SUCB2_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	46,81	6,6	12	162
254	8	ERLN1_MOUSE	Erlin-1	38,91	6,7	6	93
255	1	ERLN2_MOUSE	Erlin-2	37,85	5,4	7	108
256	1	ERO1A_RAT	ER O1-like protein alpha	53,98	5,8	21	431
256	2	PP2BA_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform	58,61	5,6	15	93
257	1	IF1A_RAT	Eukaryotic translation initiation factor 1A	16,49	5,1	4	251
258	1	IF2B_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	38,07	5,6	20	392
258	5	IF2BL_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2-like protein	37,76	6,0	15	341
259	1	EIF3E_RAT	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	52,19	5,7	20	567
260	1	EIF3H_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	39,81	6,2	17	501

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
260	4	RFC4_HUMAN	Replication factor C subunit 4	39,66	8,3	13	147
261	1	EIF3M_PONAB	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	42,49	5,4	14	253
262	1	IF4E_RAT	Eukaryotic translation initiation factor 4E	25,04	5,8	6	301
262	2	TCPD_RAT	T-complex protein 1 subunit delta	58,06	8,2	18	110
263	1	IF4H_RAT	Eukaryotic translation initiation factor 4H	27,31	6,7	9	84
264	1	IF4H_RAT	Eukaryotic translation initiation factor 4H	27,31	6,7	8	140
265	1	IF5A1_RAT	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	16,82	5,1	10	320
266	1	EXOC7_RAT	Exocyst complex component 7	75,00	6,3	17	72
267	1	EZRI_RAT	Ezrin	69,35	5,8	14	240
267	2	MOES_RAT	Moesin	67,70	6,2	11	213
268	1	EZRI_RAT	Ezrin	69,35	5,8	8	156
268	2	MOES_RAT	Moesin	67,70	6,2	7	155
268	3	ABCF3_RAT	ATP-binding cassette sub-family F member 3	79,81	6,1	17	67
269	1	CAZA1_RAT	F-actin-capping protein subunit alpha-1	32,89	5,4	4	198
270	1	CAZA2_RAT	F-actin-capping protein subunit alpha-2	32,95	5,6	15	180
271	1	CAPZB_RAT	F-actin-capping protein subunit beta	30,61	5,7	16	144
271	2	NDKA_RAT	Nucleoside diphosphate kinase A	17,18	6,0	9	166
271	2	U2AF4_RAT	Splicing factor U2AF 26 kDa subunit	25,82	8,4	9	51
271	2	TYDP1_RAT	Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1	68,59	7,7	4	62
272	1	FUBP1_MOUSE	Far upstream element-binding protein 1	68,50	7,7	20	200
272	2	SYFB_MOUSE	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	65,63	6,7	9	199
272	3	FUBP1_HUMAN	Far upstream element-binding protein 1	67,52	7,2	18	178
273	1	FUBP2_RAT	Far upstream element-binding protein 2	74,18	6,4	21	595
274	1	FUBP2_RAT	Far upstream element-binding protein 2	74,18	6,4	24	717

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
275	1	FABP5_RAT	Fatty acid-binding protein, epidermal	15,05	6,7	8	50
276	1	ALDOA_RAT	Fructose-bisphosphate aldolase A	39,33	8,3	4	76
277	1	ALDOA_RAT	Fructose-bisphosphate aldolase A	39,33	8,3	21	312
277	3	IAH1_RAT	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	27,99	5,6	12	75
278	1	ALDOA_RAT	Fructose-bisphosphate aldolase A	39,33	8,3	18	324
279	1	ALDOA_RAT	Fructose-bisphosphate aldolase A	39,33	8,3	20	299
280	1	ALDOA_RAT	Fructose-bisphosphate aldolase A	39,33	8,3	22	337
281	1	ALDOA_RAT	Fructose-bisphosphate aldolase A	39,33	8,3	10	56
282	1	ALDOA_RAT	Fructose-bisphosphate aldolase A	39,33	8,3	20	365
283	1	ALDOA_RAT	Fructose-bisphosphate aldolase A	39,33	8,3	20	402
284	1	GMDS_CRIGR	GDP-mannose 4,6 dehydratase	41,95	6,8	19	623
285	1	GFPT1_RAT	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	76,78	6,4	27	572
285	2	FUBP2_RAT	Far upstream element-binding protein 2	74,18	6,4	19	87
286	1	G6PD_RAT	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	59,34	6,0	31	370
286	2	TRXR1_RAT	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	54,35	6,0	16	248
287	1	G6PI_RAT	Glucose-6-phosphate isomerase	62,79	7,4	19	276
287	2	UGDH_RAT	UDP-glucose 6-dehydrogenase	54,86	7,5	17	79
288	1	G6PI_RAT	Glucose-6-phosphate isomerase	62,79	7,4	26	370
289	1	G6PI_RAT	Glucose-6-phosphate isomerase	62,79	7,4	22	349
290	1	DHE3_RAT	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	61,38	8,1	13	57
290	2	GLSK_RAT	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	73,98	8,1	7	56

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
291	1	DHE3_RAT	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	61,38	8,1	23	525
292	1	DHE3_RAT	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	61,38	8,1	11	69
293	1	DHE3_RAT	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	61,38	8,1	28	633
294	1	DHE3_RAT	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	61,38	8,1	17	564
295	1	GSH0_RAT	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	30,53	5,4	5	69
296	1	GLSK_RAT	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	73,98	8,1	10	267
296	2	COR1A_RAT	Coronin-1A	51,03	6,1	16	156
297	1	SYQ_HUMAN	Glutaminyl-tRNA synthetase	87,74	6,7	20	145
298	1	GLRX3_RAT	Glutaredoxin-3	37,83	5,5	19	415
299	1	GSHR_RAT	Glutathione reductase (Fragment)	46,27	8,1	7	111
299	2	DHE3_RAT	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	61,38	8,1	16	109
300	1	GSTM5_RAT	Glutathione S-transferase Mu 5	26,61	6,3	14	123
301	1	GSTT4_RAT	Glutathione S-transferase theta-4	27,95	7,1	11	58
301	3	PP1B_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	37,16	5,8	10	256
302	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	14	315
303	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	10	289
304	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	18	565
305	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	16	440
306	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	18	505
306	3	PRS8_RAT	26S protease regulatory subunit 8	45,60	7,1	12	54

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
307	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	18	428
308	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	18	435
308	3	NDKA_RAT	Nucleoside diphosphate kinase A	17,18	6,0	6	122
309	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	17	379
310	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	18	497
311	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	11	77
312	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	18	367
313	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	17	456
314	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	17	380
315	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	17	488
316	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	18	505
317	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	17	594
318	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	16	200
319	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	17	397
320	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	17	427

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
321	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	16	369
322	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	12	116
322	2	PP1B_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	37,16	5,8	7	191
322	2	SFRS7_HUMAN	Splicing factor, arginine/serine-rich 7	27,35	11,8	3	73
322	3	PP1A_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	37,49	5,9	9	188
322	3	RU17_HUMAN	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	51,53	9,9	10	97
323	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	17	481
324	1	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	18	466
324	3	PP1B_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	37,16	5,8	8	166
324	4	TALDO_RAT	Transaldolase	37,44	6,6	12	60
325	1	PYGB_RAT	Glycogen phosphorylase, brain form (Fragment)	96,11	6,2	35	550
325	2	PYGL_RAT	Glycogen phosphorylase, liver form	97,42	6,8	17	149
325	3	PYGM_RAT	Glycogen phosphorylase, muscle form	97,21	6,9	18	61
326	1	PYGB_RAT	Glycogen phosphorylase, brain form (Fragment)	96,11	6,2	33	494
326	2	PYGL_RAT	Glycogen phosphorylase, liver form	97,42	6,8	17	188
326	3	PYGM_RAT	Glycogen phosphorylase, muscle form	97,21	6,9	15	81
327	1	PYGB_RAT	Glycogen phosphorylase, brain form (Fragment)	96,11	6,2	32	540
327	2	PYGL_RAT	Glycogen phosphorylase, liver form	97,42	6,8	14	186
327	3	PYGM_RAT	Glycogen phosphorylase, muscle form	97,21	6,9	14	78
327	4	CNOTA_RAT	CCR4-N	81,77	7,8	14	56

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
328	1	PYGB_RAT	Glycogen phosphorylase, brain form (Fragment)	96,11	6,2	22	106
328	2	PYGL_RAT	Glycogen phosphorylase, liver form	97,42	6,8	14	55
329	1	GT251_MOUSE	Glycosyltransferase 25 family member 1	71,02	6,8	5	77
330	1	NMT1_RAT	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	56,82	8,0	10	170
331	1	SYG_MOUSE	Glycyl-tRNA synthetase	81,83	6,2	19	444
332	1	SYG_MOUSE	Glycyl-tRNA synthetase	81,83	6,2	19	559
333	1	GUAA_RAT	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	76,71	6,2	21	379
334	1	GUAA_RAT	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	76,71	6,2	29	595
335	1	GUAA_RAT	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	76,71	6,2	23	388
336	1	GUAA_RAT	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	76,71	6,2	21	410
337	1	GRB2_RAT	Growth factor receptor-bound protein 2	25,19	5,9	15	297
338	1	GRPE1_RAT	GrpE protein homolog 1, mitochondrial	24,28	8,6	8	81
339	1	GNAI2_RAT	Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subunit	40,47	5,3	5	160
340	1	GBB2_RAT	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	37,31	5,6	4	191
341	1	GBLP_RAT	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	35,05	7,6	14	369
342	1	GBLP_RAT	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	35,05	7,6	11	357
342	3	PP1G_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	36,96	6,1	13	231
343	1	HSP74_RAT	Heat shock 70 kDa protein 4	94,00	5,1	12	141
344	1	HS74L_MOUSE	Heat shock 70 kDa protein 4L	94,32	5,5	24	290
344	3	FXR2_HUMAN	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	74,18	6,0	17	101

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
345	1	HS74L_MOUSE	Heat shock 70 kDa protein 4L	94,32	5,5	22	252
346	1	TRAP1_RAT	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	80,41	6,6	28	641
347	1	TRAP1_RAT	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	80,41	6,6	32	814
348	1	TRAP1_RAT	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	80,41	6,6	17	413
348	2	AACS_RAT	Acetoacetyl-CoA synthetase	74,99	6,1	14	126
348	3	GPDM_RAT	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	80,92	6,2	19	77
349	1	HS90B_RAT	Heat shock protein HSP 90-beta	83,23	5,0	4	111
349	2	HS90A_RAT	Heat shock protein HSP 90-alpha	84,76	4,9	4	111
350	1	HS90B_RAT	Heat shock protein HSP 90-beta	83,23	5,0	11	62
351	1	HS90B_RAT	Heat shock protein HSP 90-beta	83,23	5,0	9	127
352	1	ROAA_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	30,81	7,7	17	395
353	1	ROAA_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	30,81	7,7	17	304
354	1	HNRDL_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	35,27	9,1	9	282
355	1	HNRDL_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	35,27	9,1	8	200
356	1	HNRH1_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49,16	5,7	16	431
356	2	HNRPF_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	45,70	5,3	11	195
356	3	HNRH2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	49,26	5,9	14	164
356	4	ENOA_RAT	Alpha-enolase	47,10	6,2	15	126
357	1	HNRH1_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49,16	5,7	22	724
357	2	HNRH2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	49,26	5,9	25	374
357	3	HNRPF_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	45,70	5,3	7	160
358	1	HNRH1_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49,16	5,7	22	604

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
358	2	HNRH2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	49,26	5,9	24	359
358	3	HNRPF_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	45,70	5,3	5	142
359	1	HNRH1_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49,16	5,7	16	253
359	2	HNRPF_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	45,70	5,3	8	165
359	3	HNRH2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	49,26	5,9	15	66
359	4	PRS6A_RAT	26S protease regulatory subunit 6A	49,13	5,1	13	53
360	1	HNRH1_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49,16	5,7	18	769
360	2	HNRH2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	49,26	5,9	17	305
360	3	HNRPF_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	45,70	5,3	6	147
361	1	HNRH2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	49,26	5,9	14	56
361	2	K2C7_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 7	50,68	5,7	13	55
361	3	HNRH1_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49,16	5,7	13	54
362	1	HNRH3_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	36,90	6,4	16	315
363	1	HNRPL_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	60,09	6,7	12	286
364	1	HNRPQ_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	59,67	8,9	13	250
364	2	MCCB_RAT	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	61,48	8,6	18	187
364	3	G6PI_RAT	Glucose-6-phosphate isomerase	62,79	7,4	10	83
365	1	ROA2_BOVIN	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	35,98	8,7	22	534
366	1	ROA2_BOVIN	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	35,98	8,7	17	269

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
367	1	ROA2_BOVIN	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	35,98	8,7	19	367
368	1	HXK1_RAT	Hexokinase-1	102,34	6,3	31	214
369	1	HAT1_RAT	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	49,21	5,6	23	380
370	1	HIP1R_MOUSE	Huntingtin-interacting protein 1-related protein	119,41	6,1	25	215
371	1	HPRT_RAT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	24,46	6,1	15	203
372	1	HYOU1_RAT	Hypoxia up-regulated protein 1	111,22	5,1	16	277
373	1	IMB1_RAT	Importin subunit beta-1	97,06	4,7	9	151
374	1	IMDH2_HUMAN	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	55,77	6,4	24	358
375	1	INO1_RAT	Inositol-3-phosphate synthase	60,85	5,7	16	291
375	2	VATB2_RAT	Vacuolar ATP synthase subunit B, brain isoform	56,51	5,6	14	64
376	1	INO1_RAT	Inositol-3-phosphate synthase	60,85	5,7	14	222
377	1	IDE_RAT	Insulin-degrading enzyme	117,64	6,2	29	427
377	2	VIME_RAT	Vimentin	53,70	5,1	13	48
378	1	IDE_RAT	Insulin-degrading enzyme	117,64	6,2	25	393
379	1	IDE_RAT	Insulin-degrading enzyme	117,64	6,2	23	220
379	2	ODO1_RAT	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochondrial	116,22	6,3	23	171
379	3	ERAP1_RAT	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	106,35	6,1	17	106
380	1	IDH3A_RAT	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	39,59	6,5	17	319
381	1	IDH3A_RAT	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	39,59	6,5	16	224
381	2	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35,81	8,1	11	65
381	2	PP1A_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	37,49	5,9	9	64

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
382	1	IDHC_RAT	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	46,70	6,5	10	125
382	2	IDHP_RAT	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	50,93	8,9	1	56
383	1	K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	59,47	5,1	6	196
383	3	TBCB_MOUSE	Tubulin folding cofactor B	27,37	5,1	11	142
384	1	K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	62,09	5,2	11	75
385	1	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	65,98	8,2	9	171
385	2	K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	59,47	5,1	7	146
385	4	K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	65,83	8,1	9	96
386	1	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	65,98	8,2	8	169
387	1	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	65,98	8,2	16	451
387	3	K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	62,09	5,2	15	82
388	1	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	65,98	8,2	17	160
388	2	K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	62,09	5,2	14	84
389	1	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	65,98	8,2	4	113
389	2	K2C1_CANFA	Keratin, type II cytoskeletal 1	63,75	7,7	3	102
390	1	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	65,98	8,2	6	128
391	1	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	65,98	8,2	5	247
391	2	K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	59,47	5,1	2	179
392	1	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	65,98	8,2	15	160
392	2	RU17_BOVIN	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	51,39	9,9	15	134
393	1	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	65,98	8,2	13	282
393	3	K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	59,47	5,1	8	139
393	5	K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	65,83	8,1	12	107

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
394	1	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	65,98	8,2	12	165
394	2	DHX15_MOUSE	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	90,95	7,1	19	156
394	4	K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	59,47	5,1	12	120
395	1	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	65,98	8,2	9	257
396	1	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	65,98	8,2	14	230
397	1	K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	65,83	8,1	13	200
397	2	K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	59,47	5,1	7	165
398	1	K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	65,83	8,1	7	166
398	2	K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10	59,47	5,1	10	152
399	1	K2C6A_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 6A	59,21	8,1	9	63
400	1	K2C7_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 7	50,68	5,7	10	72
400	2	K2C73_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 73	60,35	8,2	11	62
401	1	K2C8_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 8	53,99	5,8	36	723
401	2	K2C7_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 7	50,68	5,7	11	129
401	3	K2C73_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 73	60,35	8,2	7	106
401	4	K2C5_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 5	61,79	7,6	7	101
401	5	K2C75_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 75	58,99	8,2	7	99
401	6	K2C72_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 72	56,82	7,1	7	99
401	7	K2C6A_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 6A	59,21	8,1	4	95
401	8	K2C1B_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1b	57,22	5,5	4	95
401	9	K2C4_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 4	57,63	7,5	4	95
401	10	K2C1_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 1	64,79	8,0	2	89

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
402	1	K2C8_RAT	Keratin, type II cytoskeletal 8	53,99	5,8	17	168
402	2	VIME_RAT	Vimentin	53,70	5,1	15	62
403	1	KINH_RAT	Kinesin-1 heavy chain	109,46	6,1	21	73
404	1	KINH_RAT	Kinesin-1 heavy chain	109,46	6,1	27	181
405	1	LGUL_RAT	Lactoylglutathione lyase	20,81	5,1	12	376
406	1	LMNA_RAT	Lamin-A	74,28	6,5	17	232
407	1	LMNA_RAT	Lamin-A	74,28	6,5	24	566
408	1	LMNA_RAT	Lamin-A	74,28	6,5	30	513
409	1	LPPRC_RAT	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	156,55	6,2	35	444
410	1	LPPRC_RAT	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	156,55	6,2	38	726
411	1	LRC40_MOUSE	Leucine-rich repeat-containing protein 40	68,03	6,4	24	419
412	1	LKHA4_RAT	Leukotriene A-4 hydrolase	69,13	5,7	16	444
413	1	LASP1_RAT	LIM and SH3 domain protein 1	29,95	6,6	9	230
414	1	LDHB_RAT	L-lactate dehydrogenase B chain	36,59	5,7	19	201
415	1	LONM_RAT	Lon protease homolog, mitochondrial	105,73	6,2	11	111
415	2	TSG10_RAT	Testis-specific gene 10 protein	82,96	5,7	11	50
416	1	LONM_RAT	Lon protease homolog, mitochondrial	105,73	6,2	25	536
417	1	ACADL_RAT	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	47,84	7,6	21	438
418	1	MVP_RAT	Major vault protein	95,74	5,4	8	50
419	1	MVP_RAT	Major vault protein	95,74	5,4	21	87
419	2	HS105_RAT	Heat shock protein 105 kDa	96,36	5,4	20	63
420	1	MDHC_RAT	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	36,46	6,2	8	241
421	1	MDHC_RAT	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	36,46	6,2	11	242
422	1	MDHC_RAT	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	36,46	6,2	11	250
423	1	MDHC_RAT	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	36,46	6,2	8	229

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
424	1	MARE1_RAT	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	29,99	5,1	4	325
425	1	MPPA_RAT	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha	58,57	8,3	14	102
426	1	MK01_RAT	Mitogen-activated protein kinase 1	41,25	6,5	22	677
426	2	MK03_RAT	Mitogen-activated protein kinase 3	43,05	6,2	14	283
426	3	MK04_RAT	Mitogen-activated protein kinase 4 (Fragment)	31,14	7,8	4	95
426	4	MK06_RAT	Mitogen-activated protein kinase 6	82,22	5,0	5	94
427	1	MK01_RAT	Mitogen-activated protein kinase 1	41,25	6,5	16	290
427	2	MK03_RAT	Mitogen-activated protein kinase 3	43,05	6,2	7	141
427	3	MK06_RAT	Mitogen-activated protein kinase 6	82,22	5,0	4	67
427	4	MK04_RAT	Mitogen-activated protein kinase 4 (Fragment)	31,14	7,8	4	66
428	1	MK03_RAT	Mitogen-activated protein kinase 3	43,05	6,2	13	326
428	2	MK01_RAT	Mitogen-activated protein kinase 1	41,25	6,5	4	79
429	1	BUB3_BOVIN	Mitotic checkpoint protein BUB3	36,93	6,4	17	505
430	1	MOES_RAT	Moesin	67,70	6,2	13	195
430	2	EZRI_RAT	Ezrin	69,35	5,8	10	173
430	3	GUAA_RAT	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	76,71	6,2	11	103
431	1	MOES_RAT	Moesin	67,70	6,2	11	81
431	2	EZRI_RAT	Ezrin	69,35	5,8	10	79
431	3	ABCF3_RAT	ATP-binding cassette sub-family F member 3	79,81	6,1	19	77
432	1	MOES_RAT	Moesin	67,70	6,2	26	324
432	2	EZRI_RAT	Ezrin	69,35	5,8	14	192
433	1	MOES_RAT	Moesin	67,70	6,2	6	116
433	2	EZRI_RAT	Ezrin	69,35	5,8	5	111
434	1	MOES_RAT	Moesin	67,70	6,2	25	463
434	2	EZRI_RAT	Ezrin	69,35	5,8	12	181
435	1	MOES_RAT	Moesin	67,70	6,2	26	560
435	2	EZRI_RAT	Ezrin	69,35	5,8	15	221

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
436	1	PUR6_RAT	Multifunctional protein ADE2	47,07	7,9	18	629
437	1	MYH4_RAT	Myosin-4	222,74	5,6	24	48
438	1	RENBP_RAT	N-acylglucosamine 2-epimerase	48,36	5,6	8	187
439	1	RENBP_RAT	N-acylglucosamine 2-epimerase	48,36	5,6	13	117
440	1	NDUAA_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	40,47	7,6	13	438
441	1	NDUV1_GORGO	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	50,81	8,5	15	125
442	1	NDUV1_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	50,80	8,5	14	186
443	1	NDUS2_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	52,53	6,5	21	460
444	1	NDUS3_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	30,13	6,7	14	363
445	1	GANAB_MOUSE	Neutral alpha-glucosidase AB	106,84	5,7	19	199
446	1	GANAB_MOUSE	Neutral alpha-glucosidase AB	106,84	5,7	17	263
447	1	GANAB_MOUSE	Neutral alpha-glucosidase AB	106,84	5,7	20	126
448	1	GANAB_MOUSE	Neutral alpha-glucosidase AB	106,84	5,7	11	66
449	1	NAMPT_RAT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	55,40	6,7	11	153
449	2	GLSK_RAT	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	73,98	8,1	7	64
450	1	NAMPT_RAT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	55,40	6,7	19	291
450	2	GSHR_RAT	Glutathione reductase (Fragment)	46,27	8,1	7	100
451	1	NAMPT_RAT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	55,40	6,7	9	137

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
451	2	GSHR_RAT	Glutathione reductase (Fragment)	46,27	8,1	6	86
452	1	NIT2_RAT	Nitrilase homolog 2	30,68	6,9	16	604
453	1	NSF1C_RAT	NSFL1 cofactor p47	40,66	5,0	4	123
454	1	ARD1B_RAT	N-terminal acetyltransferase complex ARD1 subunit homolog B	27,61	5,1	8	152
455	1	NASP_RAT	Nuclear autoantigenic sperm protein	84,15	4,3	6	322
456	1	HCC1_RAT	Nuclear protein Hcc-1	23,59	6,3	12	159
457	1	NDKA_RAT	Nucleoside diphosphate kinase A	17,18	6,0	11	259
458	1	NDKB_RAT	Nucleoside diphosphate kinase B	17,27	6,9	13	339
458	2	NDKA_RAT	Nucleoside diphosphate kinase A	17,18	6,0	9	233
459	1	NDKB_RAT	Nucleoside diphosphate kinase B	17,27	6,9	13	353
460	1	NDKB_RAT	Nucleoside diphosphate kinase B	17,27	6,9	12	329
461	1	NDKB_RAT	Nucleoside diphosphate kinase B	17,27	6,9	12	252
462	1	NDKB_RAT	Nucleoside diphosphate kinase B	17,27	6,9	5	119
463	1	NDKB_RAT	Nucleoside diphosphate kinase B	17,27	6,9	11	199
464	1	OLA1_HUMAN	Obg-like ATPase 1	44,72	7,6	18	345
465	1	OTU6B_MOUSE	OTU domain-containing protein 6B	33,74	5,4	6	215
466	1	PDLI1_RAT	PDZ and LIM domain protein 1	35,56	6,8	17	548
467	1	GIPC2_RAT	PDZ domain-containing protein GIPC2	34,18	6,6	10	244
468	1	PPIA_RAT	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	17,86	8,3	10	381
469	1	PPIA_RAT	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	17,86	8,3	11	391
470	1	PERI_RAT	Peripherin	53,52	5,4	5	128
471	1	PRDX1_RAT	Peroxiredoxin-1	22,10	8,3	3	100
472	1	PRDX1_RAT	Peroxiredoxin-1	22,10	8,3	17	591
473	1	PRDX2_RAT	Peroxiredoxin-2	21,77	5,3	10	549
474	1	ACOX1_RAT	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	74,63	8,6	19	455

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
475	1	PBLD_RAT	Phenazine biosynthesis-like domain-containing protein	31,67	5,9	14	324
476	1	SYFA_RAT	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain	57,68	8,3	21	216
477	1	SYFB_MOUSE	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	65,63	6,7	13	134
477	2	CSTFT_MOUSE	Cleavage stimulation factor 64 kDa subunit, tau variant	65,82	6,8	20	131
477	3	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	65,98	8,2	6	101
478	1	PEBP1_RAT	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	20,79	5,5	3	59
479	1	PIPNA_RAT	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	31,89	6,0	14	366
480	1	PIPNB_RAT	Phosphatidylinositol transfer protein beta isoform	31,43	6,4	14	85
480	2	PRPS2_RAT	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2	34,79	6,2	9	84
480	2	SFRS7_HUMAN	Splicing factor, arginine/serine-rich 7	27,35	11,8	3	88
480	3	PRPS1_RAT	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	34,81	6,5	8	73
481	1	PIPNB_RAT	Phosphatidylinositol transfer protein beta isoform	31,43	6,4	9	109
482	1	PGM1_RAT	Phosphoglucomutase-1	61,36	6,3	17	197
483	1	PGM1_RAT	Phosphoglucomutase-1	61,36	6,3	26	510
483	2	ASNS_RAT	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	64,21	6,0	15	141
484	1	PGM1_RAT	Phosphoglucomutase-1	61,36	6,3	24	438
484	2	DPYL1_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 1	62,16	6,6	12	146
484	3	EHD1_RAT	EH domain-containing protein 1	60,56	6,4	15	64
484	4	DPYL3_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 3	61,93	6,0	3	51
485	1	PGM1_RAT	Phosphoglucomutase-1	61,36	6,3	21	433
485	2	ASNS_RAT	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	64,21	6,0	12	61
486	1	PGK1_RAT	Phosphoglycerate kinase 1	44,51	8,0	13	52

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
487	1	PGK1_RAT	Phosphoglycerate kinase 1	44,51	8,0	19	402
488	1	PGK1_RAT	Phosphoglycerate kinase 1	44,51	8,0	15	297
489	1	PGAM1_RAT	Phosphoglycerate mutase 1	28,81	6,7	13	267
490	1	PGAM1_RAT	Phosphoglycerate mutase 1	28,81	6,7	13	153
491	1	PGAM1_RAT	Phosphoglycerate mutase 1	28,81	6,7	12	346
492	1	PGAM1_RAT	Phosphoglycerate mutase 1	28,81	6,7	11	195
493	1	PGAM1_RAT	Phosphoglycerate mutase 1	28,81	6,7	15	474
494	1	PGAM1_RAT	Phosphoglycerate mutase 1	28,81	6,7	11	352
495	1	PGAM1_RAT	Phosphoglycerate mutase 1	28,81	6,7	12	322
496	1	PLAP_RAT	Phospholipase A-2-activating protein	87,03	5,7	20	141
496	2	GSTM1_RAT	Glutathione S-transferase Mu 1	25,90	8,3	10	55
496	3	THOP1_RAT	Thimet oligopeptidase	78,34	5,6	16	53
497	1	KPRA_RAT	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 1	39,41	6,7	12	62
498	1	LIS1_RAT	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	46,64	7,0	14	282
499	1	PA1B2_RAT	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	25,57	5,6	6	321
500	1	PCBP1_HUMAN	Poly(rC)-binding protein 1	37,47	6,7	14	487
500	2	PCBP3_MOUSE	Poly(rC)-binding protein 3	35,89	8,2	5	155
500	3	PCBP2_MOUSE	Poly(rC)-binding protein 2	38,20	6,3	4	146
501	1	PQBP1_RAT	Polyglutamine-binding protein 1	30,51	5,9	6	200
502	1	PRP19_RAT	Pre-mRNA-processing factor 19	55,20	6,1	18	794
503	1	PCYOX_RAT	Prenylcysteine oxidase	56,25	6,6	5	139
504	1	PCYOX_RAT	Prenylcysteine oxidase	56,25	6,6	17	485
504	2	NUP54_RAT	Nucleoporin p54	55,71	6,5	24	255
505	1	PCYOX_RAT	Prenylcysteine oxidase	56,25	6,6	14	347

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
505	2	DLDH_RAT	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	54,00	8,0	19	228
506	1	PLOD3_RAT	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	85,01	5,8	15	57
507	1	PDC6I_RAT	Programmed cell death 6-interacting protein	96,57	6,2	24	296
508	1	PDC6I_RAT	Programmed cell death 6-interacting protein	96,57	6,2	31	422
509	1	PDCD5_MOUSE	Programmed cell death protein 5	14,27	5,6	6	208
510	1	PCNA_RAT	Proliferating cell nuclear antigen	28,73	4,6	24	421
511	1	PCNA_RAT	Proliferating cell nuclear antigen	28,73	4,6	20	318
512	1	PA2G4_MOUSE	Proliferation-associated protein 2G4	43,67	6,4	18	281
513	1	P4HA1_RAT	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	60,86	5,6	19	227
514	1	PCCA_RAT	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial (Fragment)	77,66	6,3	11	203
514	2	MOES_RAT	Moesin	67,70	6,2	4	76
514	3	EZRI_RAT	Ezrin	69,35	5,8	3	75
515	1	TEBP_RAT	Prostaglandin E synthase 3	18,71	4,4	7	67
516	1	PSME1_RAT	Proteasome activator complex subunit 1	28,56	5,8	16	276
517	1	PSME2_RAT	Proteasome activator complex subunit 2	26,84	5,5	15	369
518	1	PSA1_RAT	Proteasome subunit alpha type-1	29,50	6,2	17	343
519	1	PSA3_RAT	Proteasome subunit alpha type-3	28,40	5,3	10	246
520	1	PSA3_RAT	Proteasome subunit alpha type-3	28,40	5,3	17	467
521	1	PSA4_RAT	Proteasome subunit alpha type-4	29,48	7,6	12	214
522	1	PSA4_RAT	Proteasome subunit alpha type-4	29,48	7,6	13	236
523	1	PSA6_RAT	Proteasome subunit alpha type-6	27,38	6,3	13	571
524	1	PSB2_RAT	Proteasome subunit beta type-2	22,90	7,0	7	120

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
525	1	PSB7_RAT	Proteasome subunit beta type-7	29,91	8,1	8	178
526	1	CDV3_RAT	Protein CDV3 homolog	24,30	5,7	8	59
527	1	PDIA3_RAT	Protein disulfide-isomerase A3	56,59	5,9	20	185
527	2	PAK2_RAT	Serine/threonine-protein kinase PAK 2	57,92	5,6	20	171
528	1	PDIA3_RAT	Protein disulfide-isomerase A3	56,59	5,9	25	604
529	1	PDIA3_RAT	Protein disulfide-isomerase A3	56,59	5,9	16	263
529	2	SUOX_RAT	Sulfite oxidase, mitochondrial	60,77	6,4	10	251
529	3	DNJC3_RAT	DnaJ homolog subfamily C member 3	57,53	5,6	13	53
530	1	PDIA3_RAT	Protein disulfide-isomerase A3	56,59	5,9	30	957
531	1	PDIA3_RAT	Protein disulfide-isomerase A3	56,59	5,9	35	835
532	1	PDIA3_RAT	Protein disulfide-isomerase A3	56,59	5,9	28	944
532	2	PRS4_RAT	26S protease regulatory subunit 4	49,15	5,9	18	98
533	1	PDIA3_RAT	Protein disulfide-isomerase A3	56,59	5,9	32	1050
534	1	PDIA3_RAT	Protein disulfide-isomerase A3	56,59	5,9	25	418
534	2	TRXR1_RAT	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	54,35	6,0	15	119
535	1	PDIA3_RAT	Protein disulfide-isomerase A3	56,59	5,9	9	149
536	1	PDIA3_RAT	Protein disulfide-isomerase A3	56,59	5,9	26	430
536	2	PPP5_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase 5	56,88	5,8	14	312
537	1	PDIA4_RAT	Protein disulfide-isomerase A4	72,67	5,0	13	84
538	1	PDIA1_RAT	Protein disulfide-isomerase	56,92	4,8	7	99
539	1	PDIA1_RAT	Protein disulfide-isomerase	56,92	4,8	4	62
540	1	IMPCT_RAT	Protein IMPACT	35,97	5,1	5	133
541	1	MEMO1_RAT	Protein MEMO1	33,66	6,7	14	269
542	1	NDRG1_RAT	Protein NDRG1	42,93	5,8	11	226
543	1	PPME1_MOUSE	Protein phosphatase methylesterase 1	42,23	5,7	8	437

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
543	4	TADBP_MOUSE	TAR DNA-binding protein 43	44,52	6,3	5	174
544	1	RED_RAT	Protein Red	65,55	6,3	8	166
545	1	SC23B_MOUSE	Protein transport protein Sec23B	86,38	6,5	15	108
546	1	CRK_RAT	Proto-oncogene C-crk	33,82	5,4	10	65
547	1	DHX15_MOUSE	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	90,95	7,1	25	358
548	1	ODPA_RAT	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	43,20	8,5	21	243
549	1	KPYM_RAT	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57,78	6,6	32	640
550	1	KPYM_RAT	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57,78	6,6	28	526
551	1	KPYM_RAT	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57,78	6,6	15	250
552	1	KPYM_RAT	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57,78	6,6	28	483
553	1	KPYM_RAT	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57,78	6,6	22	519
554	1	KPYM_RAT	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57,78	6,6	20	349
555	1	KPYM_RAT	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57,78	6,6	24	364
556	1	KPYM_RAT	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57,78	6,6	28	533
557	1	KPYM_RAT	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57,78	6,6	19	277
557	2	CLPB_RAT	Caseinolytic peptidase B protein homolog	75,66	8,6	13	153
558	1	KPYM_RAT	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57,78	6,6	20	456
559	1	KPYM_RAT	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57,78	6,6	29	527
559	2	CATA_RAT	Catalase	59,72	7,1	17	84
560	1	GDIB_RAT	Rab GDP dissociation inhibitor beta	50,50	5,9	17	361
560	2	GDIA_RAT	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	50,50	5,0	7	197
561	1	RANG_MOUSE	Ran-specific GTPase-activating protein	23,58	5,2	7	113

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
562	1	RANG_MOUSE	Ran-specific GTPase-activating protein	23,58	5,2	5	127
563	1	GDIR1_RAT	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	23,39	5,1	12	229
564	1	PRPS1_RAT	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	34,81	6,5	21	509
565	1	RBM8A_MOUSE	RNA-binding protein 8A	19,88	5,5	10	269
566	1	RUVB1_RAT	RuvB-like 1	50,18	6,0	22	464
567	1	RUVB1_RAT	RuvB-like 1	50,18	6,0	29	543
567	2	AL9A1_RAT	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	53,62	6,6	15	145
568	1	METK2_RAT	S-adenosylmethionine synthetase isoform type-2	43,69	5,9	11	324
568	2	METK1_RAT	S-adenosylmethionine synthetase isoform type-1	43,67	5,6	4	123
568	3	AASD1_RAT	Alanyl-tRNA synthetase domain-containing protein 1	45,07	6,1	11	67
568	4	PERI_RAT	Peripherin	53,52	5,4	9	51
569	1	SLMAP_RAT	Sarcolemmal membrane-associated protein	98,16	5,1	20	52
570	1	SEPT2_RAT	Septin-2	41,57	6,2	19	626
571	1	SEPT5_RAT	Septin-5	42,82	6,3	21	365
571	2	ARP2_RAT	Actin-related protein 2	44,71	6,3	12	169
572	1	SEPT9_RAT	Septin-9	63,75	8,7	17	266
573	1	SEPT9_RAT	Septin-9	63,75	8,7	28	653
574	1	GLYM_BOVIN	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	55,57	7,6	13	273
574	2	ANX11_BOVIN	Annexin A11	53,98	7,5	17	241
575	1	GLYM_HUMAN	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	55,96	8,8	23	293
575	3	GLYM_RABIT	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	55,87	8,8	20	268
576	1	PP2AB_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	35,55	5,2	9	142
577	1	PPP5_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase 5	56,88	5,8	11	170
578	1	PPP6_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase 6	35,14	5,4	9	151

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
579	1	PP1A_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	37,49	5,9	22	550
580	1	PP1A_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	37,49	5,9	14	272
581	1	PP1B_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	37,16	5,8	20	460
582	1	PP1G_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	36,96	6,1	11	200
583	1	STRAP_RAT	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	38,43	5,0	2	107
584	1	TRFE_BOVIN	Serotransferrin	77,70	6,8	23	407
584	2	TRFL_CAPHI	Lactotransferrin	77,31	8,3	7	90
585	1	TRFE_BOVIN	Serotransferrin	77,70	6,8	27	519
585	5	TRFL_HORSE	Lactotransferrin (Fragment)	75,94	8,3	5	83
586	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	14	104
587	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	4	70
588	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	7	125
588	2	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1	65,98	8,2	11	99
589	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	7	400
590	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	16	678
591	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	33	721
592	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	10	554
593	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	20	545
594	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	9	446
595	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	10	420
596	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	12	580
597	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	7	538
598	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	26	591
599	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	8	573
600	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	34	746
601	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	15	523
602	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	6	88
603	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	10	329
604	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	11	579
605	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	6	384
606	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	25	792
607	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	24	641

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
608	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	21	729
609	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	19	711
610	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	13	657
611	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	16	597
612	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	11	588
613	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	13	672
614	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	13	479
615	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	3	343
616	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	8	260
616	2	ALBU_SHEEP	Serum albumin	69,14	5,8	4	83
617	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	21	697
618	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	16	700
619	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	9	150
620	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	32	662
621	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	15	542
622	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	15	334
623	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	22	584
624	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	20	545
625	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	24	519
626	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	32	561
627	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	17	397
628	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	8	218
629	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	25	478
630	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	3	146
631	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	16	569
632	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	17	613
633	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	12	520
634	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	21	569
635	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	32	704
636	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	26	442
637	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	15	602
638	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	22	659
639	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	28	691
640	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	29	673
641	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	20	673
642	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	12	351
643	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	18	589
644	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	7	163
645	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	21	574
646	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	19	580
647	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	28	616
648	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	22	539

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
649	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	24	595
650	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	23	596
651	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	22	562
652	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	12	522
653	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	16	601
654	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	31	618
655	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	23	429
656	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	21	360
657	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	2	141
658	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	28	589
659	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	17	156
660	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	12	165
661	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	19	427
662	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	17	244
663	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	13	180
664	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	7	140
665	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	15	199
666	1	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69,25	5,8	23	381
667	1	SYSC_RAT	Seryl-tRNA synthetase, cytoplasmic	58,55	5,9	17	81
667	2	ASNS_RAT	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	64,21	6,0	11	56
668	1	SYSC_RAT	Seryl-tRNA synthetase, cytoplasmic	58,55	5,9	28	532
669	1	SYSC_RAT	Seryl-tRNA synthetase, cytoplasmic	58,55	5,9	19	359
669	2	TCPA_RAT	T-complex protein 1 subunit alpha	60,32	5,9	14	53
670	1	ACADS_RAT	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	44,74	8,5	14	116
671	1	SIAS_HUMAN	Sialic acid synthase	40,28	6,3	14	253
672	1	STAT1_MOUSE	Signal transducer and activator of transcription 1	87,14	5,4	24	480
673	1	STAT1_MOUSE	Signal transducer and activator of transcription 1	87,14	5,4	20	405
674	1	DHSO_RAT	Sorbitol dehydrogenase	38,21	7,1	17	334
674	2	ALDOA_RAT	Fructose-bisphosphate aldolase A	39,33	8,3	12	126
674	3	AATC_RAT	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	46,40	6,7	13	66

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
675	1	SAM50_RAT	Sorting and assembly machinery component 50 homolog	51,93	6,3	26	424
675	2	EI2BG_RAT	Translation initiation factor eIF-2B subunit gamma	50,40	6,5	19	76
676	1	SNX5_HUMAN	Sorting nexin-5	46,79	6,3	23	653
677	1	UAP56_RAT	Spliceosome RNA helicase Bat1	49,00	5,4	27	413
677	2	ERF1_RAT	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	49,00	5,5	18	305
677	3	DDX39_RAT	ATP-dependent RNA helicase DDX39	49,08	5,5	14	214
678	1	SFRS1_HUMAN	Splicing factor, arginine/serine-rich 1	27,73	10,4	23	360
679	1	SFRS2_RAT	Splicing factor, arginine/serine-rich 2	25,46	11,9	8	145
679	2	COPD_RAT	Coatomer subunit delta	57,16	5,9	14	51
680	1	SFRS3_HUMAN	Splicing factor, arginine/serine-rich 3	19,32	11,6	4	318
681	1	SFRS3_HUMAN	Splicing factor, arginine/serine-rich 3	19,32	11,6	4	216
682	1	SFRS3_HUMAN	Splicing factor, arginine/serine-rich 3	19,32	11,6	4	308
683	1	STABP_RAT	STAM-binding protein	48,48	6,4	4	54
684	1	STABP_RAT	STAM-binding protein	48,48	6,4	4	51
685	1	SND1_RAT	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	101,89	6,8	35	535
686	1	SND1_RAT	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	101,89	6,8	39	555
687	1	SND1_RAT	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	101,89	6,8	37	688
687	2	MARK3_RAT	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	88,70	9,5	15	54
688	1	STMN1_RAT	Stathmin	17,28	5,8	10	189
689	1	STMN1_RAT	Stathmin	17,28	5,8	6	91
690	1	STMN1_RAT	Stathmin	17,28	5,8	7	203
691	1	STMN1_RAT	Stathmin	17,28	5,8	3	95
692	1	STIP1_RAT	Stress-induced-phosphoprotein 1	62,53	6,4	29	480
693	1	STIP1_RAT	Stress-induced-phosphoprotein 1	62,53	6,4	26	410

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
694	1	STIP1_RAT	Stress-induced-phosphoprotein 1	62,53	6,4	24	327
695	1	STIP1_RAT	Stress-induced-phosphoprotein 1	62,53	6,4	14	211
696	1	STRN_RAT	Striatin	86,17	5,1	6	158
696	2	AP1B1_RAT	AP-1 complex subunit beta-1	104,52	5,0	12	86
697	1	SDF2L_MOUSE	Stromal cell-derived factor 2-like protein 1	23,63	6,9	8	275
698	1	DHSA_RAT	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	71,57	6,8	24	119
698	2	WDR1_RAT	WD repeat-containing protein 1	66,14	6,2	14	56
699	1	DHSA_RAT	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	71,57	6,8	24	252
699	2	NPL4_RAT	Nuclear protein localization protein 4 homolog	68,01	6,0	10	198
700	1	DHSA_RAT	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	71,57	6,8	28	599
700	2	NPL4_RAT	Nuclear protein localization protein 4 homolog	68,01	6,0	13	127
701	1	SUCB1_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	50,08	6,6	16	307
701	2	TADBP_MOUSE	TAR DNA-binding protein 43	44,52	6,3	8	197
702	1	SCOT_RAT	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial	56,17	8,7	25	728
703	1	SAE1_RAT	SUMO-activating enzyme subunit 1	38,49	5,0	16	370
704	1	SODC_RAT	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	15,90	5,9	11	255
705	1	SODC_RAT	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	15,90	5,9	9	443
706	1	SODC_RAT	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	15,90	5,9	10	448
707	1	SUGT1_RAT	Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog	38,07	5,2	6	81
708	1	STXB1_RAT	Syntaxin-binding protein 1	67,53	6,5	24	578
709	1	STXB1_RAT	Syntaxin-binding protein 1	67,53	6,5	16	61

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
710	1	STXB1_RAT	Syntaxin-binding protein 1	67,53	6,5	29	657
711	1	STXB2_RAT	Syntaxin-binding protein 2	66,65	6,3	22	241
712	1	TCPA_RAT	T-complex protein 1 subunit alpha	60,32	5,9	31	507
713	1	TCPA_RAT	T-complex protein 1 subunit alpha	60,32	5,9	28	450
713	2	MYH4_RAT	Myosin-4	222,74	5,6	26	52
714	1	TCPB_RAT	T-complex protein 1 subunit beta	57,42	6,0	22	384
714	2	SYWC_RAT	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	54,11	6,0	16	250
715	1	TCPG_RAT	T-complex protein 1 subunit gamma	60,61	6,2	20	377
715	2	LIPA4_RAT	Liprin-alpha-4 (Fragment)	117,93	6,6	20	53
716	1	TTC35_RAT	Tetratricopeptide repeat protein 35	34,85	6,4	16	222
717	1	THOP1_RAT	Thimet oligopeptidase	78,34	5,6	34	851
718	1	THOP1_RAT	Thimet oligopeptidase	78,34	5,6	19	214
719	1	THOP1_RAT	Thimet oligopeptidase	78,34	5,6	24	394
720	1	THOP1_RAT	Thimet oligopeptidase	78,34	5,6	22	284
721	1	TXND4_MOUSE	Thioredoxin domain-containing protein 4	46,82	5,1	1	94
722	1	THIO_RAT	Thioredoxin	11,67	4,8	7	120
722	2	TIM8A_RAT	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A	11,04	5,1	6	51
723	1	TRXR1_RAT	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	54,35	6,0	21	579
724	1	TXNL1_RAT	Thioredoxin-like protein 1	32,23	4,8	4	213
725	1	SYTC_RAT	Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	80,52	6,5	21	80
726	1	SYTC_RAT	Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	80,52	6,5	20	351
727	1	TYSY_RAT	Thymidylate synthase	34,99	6,0	9	196
728	1	TALDO_RAT	Transaldolase	37,44	6,6	19	256
728	2	BACH_RAT	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	42,71	8,8	15	74
729	1	TALDO_RAT	Transaldolase	37,44	6,6	19	235
729	2	VP26A_RAT	Vacuolar protein sorting-associated protein 26A	38,09	6,1	11	58
730	1	TALDO_RAT	Transaldolase	37,44	6,6	14	80
731	1	BTF3_MOUSE	Transcription factor BTF3	22,02	9,5	11	244

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
732	1	TERA_RAT	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	89,29	5,1	12	50
733	1	TERA_RAT	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	89,29	5,1	12	333
734	1	TERA_RAT	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	89,29	5,1	12	439
735	1	TKT_RAT	Transketolase	67,60	7,2	17	656
736	1	TKT_RAT	Transketolase	67,60	7,2	22	683
737	1	TKT_RAT	Transketolase	67,60	7,2	10	274
738	1	TKT_RAT	Transketolase	67,60	7,2	21	640
739	1	TCTP_RAT	Translationally-controlled tumor protein	19,45	4,8	5	92
740	1	TNPO1_MOUSE	Transportin-1	101,25	4,8	6	77
741	1	ECHA_RAT	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	82,61	9,2	14	49
742	1	PUR2_MOUSE	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	107,33	6,3	15	208
743	1	TPIS_RAT	Triosephosphate isomerase	26,83	6,9	14	366
744	1	TPIS_RAT	Triosephosphate isomerase	26,83	6,9	14	348
745	1	TPIS_RAT	Triosephosphate isomerase	26,83	6,9	16	419
746	1	TRUA_RAT	tRNA pseudouridine synthase A	47,49	8,9	10	49
747	1	TRNT1_MOUSE	tRNA-nucleotidyltransferase 1, mitochondrial	49,86	8,7	18	547
748	1	TPM3_RAT	Tropomyosin alpha-3 chain	28,99	4,8	16	266
748	2	TPM4_RAT	Tropomyosin alpha-4 chain	28,49	4,7	5	99
748	3	TPM2_RAT	Tropomyosin beta chain	32,82	4,7	4	95
748	4	TPM1_RAT	Tropomyosin alpha-1 chain	32,66	4,7	3	95
749	1	TPM4_RAT	Tropomyosin alpha-4 chain	28,49	4,7	14	147
749	2	TPM3_RAT	Tropomyosin alpha-3 chain	28,99	4,8	13	127
749	3	TPM2_RAT	Tropomyosin beta chain	32,82	4,7	8	89
749	4	TPM1_RAT	Tropomyosin alpha-1 chain	32,66	4,7	3	76

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
750	1	SYWC_RAT	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	54,11	6,0	19	297
750	2	HEXB_RAT	Beta-hexosaminidase subunit beta	61,49	8,0	9	72
751	1	TBG1_RAT	Tubulin gamma-1 chain	51,07	5,7	17	400
751	2	DNJA2_RAT	DnaJ homolog subfamily A member 2	45,74	6,1	14	143
751	3	PRS7_RAT	26S protease regulatory subunit 7	48,54	5,6	14	58
752	1	TBCA_RAT	Tubulin-specific chaperone A	12,74	5,4	13	246
753	1	TWF1_RAT	Twinfilin-1	40,07	6,2	18	658
754	1	PTN11_RAT	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	68,42	6,9	16	315
754	2	HNRPQ_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	59,67	8,9	13	133
755	1	PTN11_RAT	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	68,42	6,9	21	359
755	2	ADAS_RAT	Alkyldihydroxyacetonephosphate synthase, peroxisomal	71,54	7,0	17	74
756	1	PTN11_RAT	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	68,42	6,9	13	194
756	2	ACON_RAT	Aconitate hydratase, mitochondrial	85,38	7,9	10	92
757	1	SYYC_RAT	Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	59,08	6,6	29	422
757	2	CSN1_RAT	C	53,39	6,4	15	62
758	1	SYYC_RAT	Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	59,08	6,6	28	470
759	1	PRP4_MOUSE	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4	58,33	6,9	16	474
760	1	UBP5_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	95,73	4,9	22	92
761	1	UFD1_HUMAN	Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog	34,48	6,3	19	477
762	1	OTUB1_RAT	Ubiquitin thioesterase OTUB1	31,25	4,9	15	317
763	1	UBA1_MOUSE	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	117,73	5,4	1	65
764	1	KCY_RAT	UMP-CMP kinase	22,16	5,7	12	333

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
765	1	CR054_RAT	Uncharacterized protein C18orf54 homolog	40,82	6,8	4	48
766	1	CV028_RAT	UPF0027 protein C22orf28 homolog	55,21	6,8	20	372
767	1	MYG1_MOUSE	UPF0160 protein MYG1	42,70	6,5	8	307
767	3	MYG1_BOVIN	UPF0160 protein MYG1	42,94	6,3	7	215
768	1	K0776_MOUSE	UPF0555 protein KIAA0776	89,46	6,2	15	87
769	1	K0776_MOUSE	UPF0555 protein KIAA0776	89,46	6,2	18	176
770	1	CN166_PONAB	UPF0568 protein C14orf166 homolog	28,05	6,2	11	176
771	1	UGPA_MOUSE	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	56,94	7,2	27	546
771	2	UGPA_CRIGR	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	56,89	7,2	25	524
771	6	GLYM_BOVIN	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	55,57	7,6	17	89
772	1	VATB2_RAT	Vacuolar ATP synthase subunit B, brain isoform	56,51	5,6	33	859
773	1	VATB2_RAT	Vacuolar ATP synthase subunit B, brain isoform	56,51	5,6	13	62
774	1	VATB2_RAT	Vacuolar ATP synthase subunit B, brain isoform	56,51	5,6	5	112
775	1	VATC1_RAT	Vacuolar proton pump subunit C 1	43,87	7,0	27	709
775	2	VATC2_RAT	Vacuolar proton pump subunit C 2	48,21	6,3	3	60
776	1	VATG1_MOUSE	Vacuolar proton pump subunit G 1	13,72	7,8	6	150
777	1	NSF_RAT	Vesicle-fusing ATPase	82,60	6,6	32	585
777	2	SYCP1_RAT	Synaptonemal complex protein 1	116,44	5,6	23	54
778	1	VINC_RAT	Vinculin	116,54	5,8	30	126
779	1	VDAC2_RAT	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	31,73	7,4	6	155
780	1	VDAC2_RAT	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	31,73	7,4	15	457
781	1	WDR1_RAT	WD repeat-containing protein 1	66,14	6,2	8	288

D2D Nr.	Rank	Accession Number	Protein Name	MW in kDa	pI	Anz. Peptide	Protein Score
782	1	WDR1_RAT	WD repeat-containing protein 1	66,14	6,2	30	680
782	2	DHSA_RAT	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	71,57	6,8	23	112
783	1	TBL3_HUMAN	WD repeat-containing protein SAZD	56,01	8,4	3	71
784	1	SMU1_RAT	WD40 repeat-containing protein SMU1	57,51	6,7	17	268
784	2	DLDH_RAT	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	54,00	8,0	17	200
785	1	SMU1_RAT	WD40 repeat-containing protein SMU1	57,51	6,7	21	558
785	2	DLDH_RAT	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	54,00	8,0	11	57
786	1	XYLB_RAT	Xylulose kinase	57,93	6,0	13	56