

Proteomanalytik der Adaption tierischer Zelllinien an Suspensionswachstum und optimierte Medien im Kontext der Impfstoffproduktion

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

von Dipl.-Biol. Sabine Pech, geb. Kluge
geb. am 03.04.1986 in Leipzig

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Promotionskommission:

PD Dr. rer. nat. Yvonne Genzel (Vorsitz)

Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl (Gutachter)

Prof. Dr. rer. nat. Klaus Scharfenberg (Gutachter)

Prof. Dr. rer. nat. Katharina Riedel (Gutachter)

Eingereicht am: 08.01.2016

Promotionskolloquium am: 26.05.2016

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Lehrstuhl Bioprozesstechnik der Otto-von-Guericke-Universität und am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme unter der Leitung von Herrn Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl angefertigt.

Mein Dank gilt Herr Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl für die Möglichkeit meine Dissertation in dem anwendungsnahen Themenbereich der Impfstoffproduktion anzufertigen. Weiterhin bedanke ich mich für die kritischen Fragen und wertvollen Ratschläge, die eine Unterstützung für meine wissenschaftlichen Ausarbeitungen waren. Auch möchte ich mich für die gewährte wissenschaftliche Freiheit bedanken.

Ich bedanke mich für die vertrauensvolle und konstruktive Zusammenarbeit bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Klaus Scharfenberg, Frau Prof. Ph.D. Hela Kallel und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Albert Sickmann, die die vorliegende Arbeit ermöglicht hat.

Mein Dank gilt weiterhin Herr Dr. rer. nat. Erdmann Rapp für die vermittelte Motivation, die Hilfestellungen bei wissenschaftlichen Ausarbeitungen und alle Möglichkeiten der Vernetzung mit anderen Wissenschaftlern. Weiterhin bedanke ich mich für die Möglichkeiten mit technischen Großgeräten selbstständig zu arbeiten und das entgegengebrachte Vertrauen.

Herr Dr. rer. nat. Dirk Benndorf danke ich für anregende Diskussionen und kreative Ideen, welche in diese Arbeit eingeflossen sind. Mein Dank gilt auch Frau PD Dr. rer. nat. Yvonne Genzel für die wertvollen Ratschläge auf dem Weg zur Promotion und die Möglichkeit spannenden Themen in der Zellkulturtechnik selbstständig nachzugehen.

Für die sehr gute Zusammenarbeit und die Motivation im Labor bedanke ich mich bei Marcus Hoffmann. Anja Serve danke ich für die produktive und herzliche Arbeitsatmosphäre im Büro. Ich bedanke mich bei Barbara Köhler für die große Unterstützung im Labor. Für die bioinformatische Hilfestellungen bedanke ich mich bei Thilo Muth und Markus Rehberg. Martin Pech, Kim Herche und Edgar Mattias danke ich für die sehr gut durchgeführten Projektarbeiten.

Vielen Dank an die Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik für die gute Zusammenarbeit und den kollegialen Umgang. Einen speziellen Dank an das Analytik-Team für den offenen und freundlichen Umgang, welcher die meisten Probleme leicht bewältigen ließ.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für den nötigen Halt, die vermittelte Kraft und den durch sie gegebenen Blick für das Wesentliche im Leben.

Inhaltsverzeichnis

Summary	VII
Zusammenfassung	XI
Abkürzungsverzeichnis	XV
Symbolverzeichnis	XXIII
1. Einleitung	1
<hr/>	
2. Theoretische Grundlagen	3
<hr/>	
2.1. Virale Impfstoffe	3
2.1.1. Impfstoffe gegen Influenzaviren	3
2.1.2. Impfstoffe gegen Tollwutviren	7
2.2. Tierische Zellkultur für die Impfstoffproduktion	8
2.2.1. Tierische Zelllinien: MDCK und Vero Zellen	9
2.2.2. Nährmedien für die tierische Zellkultur	10
2.2.3. Adaption von adhärentem Wachstum an Suspensionswachstum	11
2.2.4. Virus-Wirtszellinteraktionen tierischer Zelllinien	12
2.3. Proteinanalytik	14
2.3.1. Massenspektrometrie	15
2.3.2. Massenspektrometrische Proteinidentifizierung	19
2.3.3. Protein- und Peptidseparation	21
2.3.4. Relative Proteinquantifizierung	25
2.3.5. Bioinformatische Datenauswertung	27
3. Material und Methoden	33
<hr/>	
3.1. Geräte, Materialien und Chemikalien	33

3.2. Zellkulturtechnik	34
3.2.1. Zelllinien und Virusstämme	34
3.2.2. Kultivierungssysteme, Medien und Zellanzucht	35
3.2.3. Adaption der adhärennten MDCK Zelllinie an Suspensionswachstum in chemisch definiertem Medium	35
3.2.4. Vergleich der adhärennten MDCK Zellen mit MDCK Suspensionszellen . .	38
3.2.5. Replikation von Influenzaviren in MDCK Zellen	40
3.2.6. Replikation von Tollwutviren in Vero Zellen	41
3.3. Prozessanalytik	42
3.3.1. Bestimmung der Zellkonzentration und Vitalität	42
3.3.2. Bestimmung extrazellulärer Metaboliten	44
3.3.3. HA-Assay	44
3.3.4. Bestimmung der Infektiösität von Influenzaviren und Tollwutviren	45
3.3.5. Durchflusszytometrische Quantifizierung infizierter Zellen	45
3.3.6. Quantifizierung der viralen mRNA	45
3.4. Proteomanalytik	46
3.4.1. Probenvorbereitung	47
3.4.2. Separationsmethoden	51
3.4.3. Tryptische Proteinspaltung	54
3.4.4. Massenspektrometrische Analytik	56
3.4.5. Datenbanksuchen	58
3.4.6. Proteinquantifizierung	59
3.4.7. Verifizierung zellulärer Proteinantworten	63
4. Ergebnisse	65
<hr/>	
4.1. Qualität der optimierten Methoden der zellulären Proteomanalytik	65
4.1.1. Zellaufschluss für die Proteinextraktion	65
4.1.2. 2-D DIGE Proteomanalytik	67
4.1.3. <i>Label free</i> Proteomanalytik	77
4.2. Untersuchung der Zelllinien für die Virusreplikation	84
4.2.1. MDCK Zelllinien für die Influenzavirusreplikation	84
4.2.2. Vero Zelllinien für die Tollwutvirusreplikation	87
4.3. Zelladaption an Suspensionswachstum in chemisch definiertem Medium	89
4.3.1. Reproduzierbarkeit der Zelladaption	89
4.3.2. Effekte der Zelladaption auf die Proteomantwort	90

4.4. Vergleich einer adhärenen Zelllinie mit ihrer verwandten Suspensionszelllinie . . .	98
4.5. Medienbedingte Proteomveränderungen während der Virusinfektionsphase . . .	110
4.6. Einfluss der Zelladaption auf die virusinduzierte Proteinexpression	116
4.6.1. Vergleich der virusinduzierten Zellantwort einer adhärenen MDCK Zell- linie mit ihrer verwandten Suspensionszelllinie	116
4.6.2. Einfluss der medienbedingten Zelllinienadaption auf die virusinduzierte Zellantwort bei Vero Zellen	126
5. Diskussion	131

5.1. Qualität der optimierten Methoden der zellulären Proteomanalytik	131
5.1.1. Zellaufschluss für die Proteinextraktion	131
5.1.2. 2-D DIGE Proteomanalytik	133
5.1.3. <i>Label free</i> Proteomanalytik	135
5.1.4. Vergleichende Betrachtung der 2-D DIGE und der <i>label free</i> Proteomanalytik	136
5.2. Untersuchung der Zelllinien für die Virusreplikation	138
5.3. Zelladaption an Suspensionwachstum in chemisch definiertem Medium	139
5.4. Vergleich einer adhärenen MDCK Zelllinie mit ihrer verwandten Suspensions- zelllinie	143
5.5. Medienbedingte Proteomveränderungen während der Virusinfektionsphase . . .	147
5.6. Einfluss der Zelladaption auf die virusinduzierte Proteinexpression	150
5.6.1. Vergleich der influenzainduzierten Zellantwort einer adhärenen MDCK Zelllinie mit ihrer verwandten Suspensionszelllinie	150
5.6.2. Einfluss der medienbedingten Zelladaption auf die virusinduzierte Zellantwort in Vero Zellen	153
6. Schlussfolgerungen und Ausblick	155

Literaturverzeichnis	161
Abbildungsverzeichnis	187
Tabellenverzeichnis	191

Anhang	i
A. Zusatzmaterial	ii
A.1. Versuchsaufbau für die 2-D DIGE Analytik	ii
A.2. Übersicht aller identifizierten Proteine	iv
A.3. Überrepräsentationsanalyse in Reaktom für die Zelllinienadaption	xlvii
A.4. Differenzielle Proteinexpression zwischen einer adhärennten MDCK Zelllinie und ihrer verwandten Suspensionszelllinie	1
A.5. Expressionsprofile der differenziell exprimierten Proteine nach Tollwutinfektion in Vero Zellen im 2L-BR.	lv
A.6. Übersicht mehrfach detektierter differenziell exprimierter Proteine	lvii
A.7. Involvierte Proteine und zelluläre Mechanismen für weiterführende Untersuchungen	lx
B. Tabellarischer Lebenslauf	lxii
C. Wissenschaftliche Arbeiten	lxiv
D. Liste der verwendeten Geräte und Anlagen	lxvii
E. Liste der verwendeten Software	lxix
F. Liste der Verbrauchsmaterialien	lxx
G. Liste der verwendeten Chemikalien	lxxii
H. Zusammensetzung verwendeter Standardpuffer	lxxv
I. Arbeitsanweisungen	lxxvii

Summary

Proteome analysis of animal cell line adaption to suspension growth and optimized medium for vaccine production

Adaptation of animal cell cultures to changed cultivation conditions has a major impact on the successful use of cell-based production processes in the pharmaceutical industry. During the last decade, process operation and cell culture media were improved to optimize the cultivation of continuous cell lines for the production of monoclonal antibodies, recombinant proteins and viruses. Modern cell-based processes are carried out with suspension cell lines in chemically defined media. However, cell lines for vaccine production grow preferably adherent in serum-containing media. An important aim is to adapt these cells to suspension growth in chemically defined medium. Up to now, the cellular changes required to reach this cell line adaptation are unclear. After adaptation, the new phenotype appears with altered gene expression that can be analyzed at the proteomic level. The advantage of proteomics is that it offers the possibility to study gene expression at the functional level. For this work, protein analytical methods were established in the department of Professor Reichl (Bioprocess Engineering, Max Planck Institute, Magdeburg, Germany) to detect physiological changes of the cells during adaptation to changed cultivation conditions.

For vaccine production, Madin Darby dog kidney cell lines (MDCK) are suited for the replication of influenza viruses whereas nephritic cell lines of a green long-tailed monkey (Vero) are suited for the replication of rabies viruses. Both cell lines show stable adherent growth in serum-containing media. In this study, a MDCK cell line was adapted to suspension growth in a chemically defined medium. Furthermore, a Vero cell line adaptation to an optimized animal component-free medium was analyzed. The influence of cell line adaptation on the cellular proteome and on the virus-induced proteome response were examined. For an in-depth insight into the protein expression patterns, two untargeted proteomic approaches were applied: a gel-based approach by means of two-dimensional difference gel electrophoresis and a label-free and gel-free approach at the peptide level. The proteins were identified by matrix-assisted laser

desorption / ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and by electrospray ionization orbital ion trap mass spectrometry (ESI-Q/Orbitrap-MS). The proteome data set of the MDCK cell lines resulted in 238 proteins (corresponding to 908 protein spots) and 976 proteins identified, respectively, by the gel-based and the gel-free approaches. For the Vero cells, 68 differentially expressed proteins were identified by use of the gel-based approach. For protein identification following the gel-based approach, a reliable high throughput method was developed so that a gel map of all identified proteins could be provided for both cell lines. The differential expression patterns of selected proteins were verified at the protein level by Western blots and at the RNA level by quantitative real time polymerase chain reaction.

Two repetitions of MDCK cell line adaptation were examined each of which contained two adaptation steps (serum depletion, suspension growth). A 95% match of the proteomes was detectable for the comparison between the last adaptation stages of each repetition. Within 138 differentially expressed proteins of both cell line adaptations, 132 proteins showed differential expression by the first adaptation step (serum depletion). Serum depletion induced cellular networks of metabolism, cytoskeleton, protein turn-over, pre mRNA processing, and membrane biogenesis. The remaining differentially expressed proteins were exclusively detected during the second adaptation step (suspension growth) and represented oncogene-associated proteins, such as sulfotransferase 1A1 and lactoylglutathionylase. Within another proteome comparison between an adherent MDCK cell line and its resultant suspension cell line, increased expression of glycolytic enzymes were observed for the adherent cells and the suspension cells showed an increased expression of proteins associated with the citric acid cycle and respiratory chain. The adaptation of the Vero cell line to animal component-free medium induced a changed protein expression affecting cellular structure, membrane function, stress response, metabolism, protein folding in the endoplasmic reticulum, and protein turn-over in comparison to serum-containing Vero cell cultures.

The adapted MDCK cells as well as the adapted Vero cells showed comparable growth rates and virus titers before and after adaptation. For MDCK cells, a changed virus-induced proteome response was observed after cell line adaptation. Ezrin and various heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (HNRNP K, U, M, H1) showed a clear change of protein expression in suspension cells after Influenza infection. Moreover, in contrast to infected adherent MDCK cells, influenza-infected MDCK suspension cells showed an increased differential expression of apoptosis-associated proteins, such as aconitase, glucose-adjusted protein 78, and nucleolin. Both Vero cell lines, however, manifested differential expression of proteins in different functional classes after rabies infection, such as processes affecting cellular structure, metabolism, and stress response. For both Vero cells, the same expression of the central signaling proteins (e.g. 14-3-3-proteins) and proteins involved in calcium balance were detected.

By means of both untargeted proteomic approaches, physiological changes associated with MDCK and Vero cell line adaptations to optimized cultivation conditions were demonstrated. The work here offers many avenues for future investigation to extend our understanding of cell adhesion (e.g. Galectin-1, Galectin-3), metabolism (e.g. HIF-1, Mdm2-p53), induction of apoptosis (e.g. CCAR2, Bit-1), and virus replication (e.g. Ezrin, HNRNPs). Future work should focus on the influence of targeted protein expression levels on suspension growth and virus titer increase.

Zusammenfassung

Die Adaption tierischer Zelllinien an veränderte Kultivierungsbedingungen ist von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Anwendung zellbasierter Produktionsprozesse in der pharmazeutischen Industrie. In den letzten Jahren wurden für die Kultivierungen kontinuierlicher Zelllinien die Prozessführung und die Zellkulturmedien optimiert, um die Produktion monoklonaler Antikörper, rekombinanter Proteine und Viren zu verbessern. Moderne zellbasierte Prozesse werden mit Suspensionszelllinien in chemisch definierten Medien durchgeführt. Jedoch wachsen einige, für die Impfstoffproduktion geeignete, Zelllinien am besten adhärent und in serumhaltigen Medien. Ziel ist es auch diese Zelllinien an Wachstum in Suspension und in chemisch definiertem Medium zu adaptieren. Bei der Adaption blieb bisher weitgehend unklar, welche Veränderungen in einer Zelle notwendig sind, um diese Anpassungen zu erreichen. Zur Erzeugung eines stabilen, in Suspension wachsenden Phänotypen sind Änderungen in der Genexpression notwendig, die sich auf der Ebene des zellulären Proteoms nachweisen lassen. Die Proteomanalytik bietet dabei die Möglichkeit relevante Veränderungen der Genexpression auf funktioneller Ebene zu identifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden zur Proteomanalytik etabliert, die es gestattet physiologische Änderungen der Zellen bei der Anpassung an veränderte Kultivierungsbedingungen zu entschlüsseln.

Bei der Impfstoffproduktion eignen sich Madin-Darby-Hundenierenzelllinien (MDCK) für die Replikation von Influenzaviren und Nierenzelllinien einer Grünen Meerkatze (Vero) für die Replikation von Tollwutviren. Beide Zelllinien zeigen stabiles adhärentes Wachstum in serumhaltigem Medium. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine MDCK Zelllinie an das Suspensionswachstum in einem chemisch definierten Medium adaptiert. Weiterhin wurde eine Adaption der Vero Zelllinie an ein optimiertes Medium, frei von tierischen Produkten, analysiert. Es wurde der Einfluss der Zelladaption auf das zelluläre Proteom und auf die virusinduzierte Proteomantwort untersucht. Ein detaillierter Einblick in die Proteinexpression erfolgte über die Anwendung zweier *untargeted* (nicht zielgerichteter) Proteomanalysen. Diese beinhalteten einen gelbasierten Ansatz mittels zweidimensionaler differenzieller Gelelektrophorese auf Proteinebene sowie einen gel- und markierungsfreien Ansatz auf Peptidebene. Die Proteine wurden über matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation Flugzeitanalysator Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF-MS) und durch die Elektrospray-Ionisation Orbital Ionenfallen Massenspektrometrie (ESI-Q/Orbitrap-MS) identifiziert. In den Proteomdatensätzen der MDCK Zell-

linien konnten insgesamt 238 Proteine (entsprechen 908 Proteinspots) mit dem gelbasierten und 976 Proteine mit dem gelfreien Ansatz identifiziert werden. Für die Vero Zellen wurden 68 differenziell exprimierte Proteine mit Hilfe des gelbasierten Ansatzes identifiziert. Für die gelbasierten Identifizierungen wurde eine verlässliche Hochdurchsatzmethode etabliert, sodass für beide Zelllinien Gelkarten aller identifizierten Proteine erstellt werden konnte. Die Genexpression ausgewählter differenziell exprimierter Proteine wurde auf Proteinebene mit Hilfe des Western Blots und auf RNA-Ebene mit der quantitativen *real-time* Polymerase-Kettenreaktion verifiziert.

Die MDCK Zelladaption wurde in zwei Wiederholungen, die zwei Adaptionsschritte (Serumentzug, Suspensionswachstum) enthielten, untersucht. Der Vergleich der jeweils letzten Adaptionstadien beider Wiederholungen ergab eine 95%ige Übereinstimmung des Proteoms. Von 138 differenziell exprimierten Proteinen beider Zelladaptionen wurden 132 innerhalb des ersten Adaptionsschritts (Serumentzug) detektiert. Serumentzug induzierte zelluläre Netzwerke des Metabolismus, des Cytoskeletts, des Proteinauf- und abbaus, der pre-mRNA-Prozessierung und der Zellmembran. Für die restlichen, ausschließlich während des zweiten Adaptionsschritts (Suspensionswachstum) detektierten sechs differenziell exprimierten Proteine, wurden krebszellenassoziierte Proteine, wie die Sulfotransferase 1A1 und die Lactoylglutathionlyase, identifiziert. Bei einer weiteren Proteomanalyse die eine adhärente MDCK Zelllinie mit der aus ihr hervorgegangenen Suspensionszelllinie verglich, konnte in den adhären MDCK Zellen eine gesteigerte Expression von Proteinen der Glykolyse und in den Suspensionszellen von Proteinen des Citratzyklus sowie der Atmungskette beobachtet werden. Die Adaption der Vero Zelllinie an Medium frei von tierischen Produkten induzierte im Vergleich zu serumhaltigen Vero Zellkulturen eine veränderte Proteinexpression in der zellulären Strukturierung, der Membranfunktion, der Stressantwort, des Metabolismus, der Proteinfaltung im endoplasmatischen Retikulum und des Proteinabbaus.

Sowohl die MDCK Zellen als auch die Vero Zellen zeigten vor und nach Adaption vergleichbares Zellwachstum und vergleichbare Virustiter. Für die MDCK Zellen wurde eine veränderte virusinduzierte Proteomantwort nach Zelladaption beobachtet. Sowohl Ezrin als auch verschiedene heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (HNRNP K, U, M, H1) zeigten eine deutliche Veränderung der Proteinexpression in Suspensionszellen nach Influenzainfektion. Überdies wiesen influenzainfizierte MDCK Suspensionszellen im Gegensatz zu infizierten adhären MDCK Zellen eine vermehrte differenzielle Expression apoptoseassoziiierter Proteine, wie die Aconitase, das Glucose-regulierte Protein 78 kDa und das Nucleolin, auf. In beiden Vero Zelllinien hingegen manifestierte sich die differenzielle Expression von Proteinen verschiedenster funktioneller Ebenen, wie zelluläre Strukturierung, Metabolismus und Stressantwort nach Tollwutinfektion. Für beide Vero Zellen konnte die gleiche Expression zentraler Signalproteine der 14-3-3-

Proteinfamilie und im Kalziumionenhaushalt involvierter Proteine detektiert werden.

Mit Hilfe der zwei *untargeted* Proteomanalysen konnte gezeigt werden, dass die MDCK und Vero Zelladaptionen an optimierte Kultivierungsbedingungen physiologische Veränderungen induzierten. Diese Ergebnisse bieten Ansatzpunkte um die gezielte Veränderungen der Zell-Matrix Interaktion (z. B. Galectin-1, Galectin-3), des Metabolismus (z. B. HIF-1, Mdm2-p53), der Apoptoseinduktion (z. B. CCAR2, Bit-1) und der Virusreplikation (z. B. Ezrin, HNRNP) über eine Manipulation der Genexpression zu beeinflussen. In zukünftigen Arbeiten sollte näher untersucht werden, welchen Einfluss das Expressionslevel der detektierten Proteine auf Suspensionswachstum und Virusvermehrung hat.

Abkürzungsverzeichnis

In der wissenschaftlichen Literatur werden englische Begriffe verwendet, die teilweise nicht eindeutig in die deutsche Sprache übersetzt werden können. Markierte Abkürzungen (*) wurden im Text in englischer Sprache genannt, um einen einfachen Abgleich mit der Literatur zu ermöglichen.

Abkürzung	Beschreibung
2-D	Zweidimensional
14-3-3	14-3-3 <i>zeta</i> Protein
26S PnR	26S Proteasomen, ATPase unabhängig (26S proteasome non ATPase regulatory)*
26S PR	26S Proteasomen reguliert (26S protease regulatory)*
28S RP	28S ribosomales Protein S22 (28S ribosomal protein S22)*
40S RP	40S ribosomales Protein SA (40S ribosomal protein SA)*
1L-BR	1 L Bioreaktor
2L-BR	2 L Bioreaktor
+S	Serumzugabe
A	Acetylierung
ABC	Ammoniumbicarbonat
AC	Stadium der MDCK _{ADH} Zellen adaptiert an SMIF8+S Medium
Activator	Proteasomenaktivator (proteasome - prosome, macropain - activator)*
AHC	Adenosylhomocysteinase
AHNAK	Neuroblast-Differenzierung assoziiertes Protein
AKAP	A-Kinase Ankerproteinfamilie
ANOVA	Analyse der Varianzen
Anx	Annexin
AT	Adenin Thymin
ATCC	Amerikanische Zellbank (American Type Culture Collection)*
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase SU	ATPase Protonenuntereinheit Typ V D1 (V type proton ATPase

	subunit d 1)*
BCA	Bicinchoninsäure
BCL2	B-Zellymphoma 2 Protein
BiP	Bindeprotein der schweren Kette des Immunoglobulins (immunoglobulin heavy chain binding protein)*
Bit-1	Bcl-2 Inhibitor der Transkription 1
BLAST	Programm zur Analyse biologischer Sequenzdaten (basic local alignment search tool)*
BPT	Bioprozesstechnik
BR	Biologische Replikate
BRCA	Brustkrebsprotein 1 (Breast Cancer 1 Protein)*
Ca ²⁺	Kalziumionen
Cbl	Uronkogen des Lymphoms, Casitas B-Abstammung (casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene)*
CCAR2	Zellzyklus-Apoptose Regulatorprotein 2
CDC	Zellzyklusprotein
CDM	Chemisch definiertes Medium
CE	Kapillarelektrophorese
CHO	Hamsteroovar-Zelllinie
CL	Stadium der MDCK _{ADH} Zellen adaptiert an SMIF8 Medium
CP 55	Zentrosomales Protein, 55 kDa (centrosomal protein of 55 kDa)*
CoA	Coenzym A
CoA isomerase	<i>Delta(3,5)-delta(2,4)-dienoyl-CoA Isomerase (delta(3,5)-delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase)*</i>
DC	Stadium abgelöster MDCK Zellen nach Adaption an SMIF8 Medium
DIGE	Differenzielle Gelelektrophorese
DIP	Fehlerhafte und störende Partikel (defektive interfering particles)*
DH	Dehydrogenase
DFZ	Durchflusszytometrie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Faktor für die Bindungssteigerung an Immunoglobulin (immunoglobulin enhancer-binding factor)*
ECACC	Europäische Zellbank (European Collection of Cell Cultures)*
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
Eno 1	Enolase 1

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK2	Extrazelluläre, signalregulierte Kinase 2
ERM	Ezrin, Radixin und Moesin
ERp29	Endoplasmatisches Retikulum Protein 29 (endoplasmic reticulum protein 29)*
ESI	Elektrospray-Ionisation
Ezr	Ezrin
FA	Ameisensäure
FASP	Filterbasierte Probenvorbereitung
FDR	Falsch-Positiv-Rate
FBP Aldolase	Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase
FFU	Einheit für die Fluoreszenzfokussierung (fluorescent focus units)*
G	Glykosylierung
GATA	Promotorregion
GDP	Guanosindiphosphat
Gluc AB	Neutrale <i>alpha</i> Glukosidase AB (neutral <i>alpha</i> glucosidase AB)*
GO	Genontologie (Gene Ontologie)*
GRP78	Glucose-reguliertes Protein 78 kDa
GST	Gluthathion-S-Transferase
GSTP	Gluthathion-S-Transferase P (glutathione S transferase P)*
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
HCD	Kollisionsinduzierte Dissoziation mit hoher Energie (High energy collision dissociation)*
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor (hepatocyte growth factor)*
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HIV-1	Humanes Immunodefizienz-Virus Typ 1
HNRNP	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
HPE	Hochleistungs-Elektrophorese
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HSB1	Hitzeschockprotein <i>beta</i> 1 (heat shock protein <i>beta</i> 1)*
HSPx	Hitzeschockprotein x kDa (x = 60, 70, 90, 100)
IAA	Iodacetamid
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
ig-h	Wachstumsfaktor- <i>beta</i> -induziertes, transformierendes Protein

	(transforming growth factor- <i>beta</i> -induced protein)*
IPG	Immobilisierte pH-Gradienten
IQGAP	Ras GTPase-aktivierendes Protein
ISD	Zerfall in der Quelle (in source decay)*
IT	Ionenfalle
K	Lysin
Ker 10	Keratin Typ I, cytoskelettal 10 (keratin, type I cytoskeleton 10)*
Ker 8	Keratin Typ II, cytoskelettal 8 (keratin, type II cytoskeleton 8)*
Lam A/C	Lamin A/C
LC	Flüssigchromatographie
LC-MS	Flüssigchromatographie gekoppelt an die Massenspektrometrie
LF	Ohne Markierung (label free)*
LIM	Zweifaches Zinkfingermotiv
LSM14	RNA-bindendes Protein
M	Methylierung
MAD	Median der absoluten Abweichung
MALDI	Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation
MCM	Minichromosomale Instandhaltung
MDCK	Madin-Darby-Hundenierenzelllinie
MDCK _{ADH}	Adhärente MDCK Zelllinie
MDCK _{SUS}	MDCK Suspensionszelllinie
MMP	Matrixmetalloproteinase (matrix metalloproteinases)*
MOI	Virus:Zell-Verhältnis
MS	Massenspektrometrie
MVP	Cytoskelettales Protein (major vault protein)*
MW	Molekulargewicht
N	Nitrierung
N40	N-terminal trunkierte Version eines Polypeptids
NA	Neuraminidase
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCBI _{Inr}	Redundanzfreie Datenbank des nationalen Informationszentrums für Biotechnologie
NF κ B	Nukleärer Faktor <i>kappa</i> B
NMT-1	Glycylpeptid N-Tetradecanoyl Transferase 1
NP	Nukleoprotein

OAT	Ornithin Aminotransferase
P	Phosphorylierung
PB1-F2	Basisches Protein 1 der Polymerase im zweiten Leserahmen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDCD5	Programmierter Zelltod Protein 5
PDCD6IP	Programmierter Zelltod interagierendes Protein 6
PDI A6	Proteindisulfidisomerase A6 (protein disulfide isomerase A6)*
PDS	PolySUMO-abhängige Separation
PH	Prohibitin
pI	Isoelektrischer Punkt
PI	Phosphoinositide
p.i.	Nach der Infektion
PIR	Protein-Informationsressource (Protein Information Resource)*
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PKI M1/M2	Pyruvatkinase Isomerase M1/M2
PLC	Phospholipase C
PLK	Serine/Threonin-Proteinkinase
PMF	Fingerabdruck der Peptidmassen (peptid mass fingerprint)*
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
POR	Peroxidreduktase
PP	Phosphoprotein M1
Pr	Prenylierung
Prx	Thioredoxin-abhängige Peroxidreduktase (thioredoxin dependent peroxide reductas)*
PSD	Zerfall nach der Quelle (post source decay)*
PSM	Treffer der Suchalgorithmen
pt	Peptide
Q	Quadrupol
qRT-PCR	Quantitative <i>real time</i> Polymerase Kettenreaktion
R	Arginin
RC	Reticulocalbin 1
RDZ	Rührerdrehzahl
RF850	Rollerflasche 850 cm ²
RFFIT	Schnelltest über FFU-Inhibition (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test)*
RG	RapiGest

RIPA	Radioimmunopräzipitations Assay
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäuren
– tRNA	Transfer RNA
– mRNA	Messenger RNA
– snRNA	Small nuclear RNA
RP	Umkehrphase (reversed phase)*
RP/EB	Proteinbindene Proteinfamilie
RT	Raumtemperatur
S	Alternatives Splicing
S100a6	S100a6 Protein
SC	Stadium langsam wachsender MDCK Suspensionszellen
SCM	Serumhaltiges Medium
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	Größenausschlusschromatographie
SEC14	Sekretorisches Protein 14
Serum P/A	Serum-Paraoxonase/Arylesterase 2 (serum paraoxonase/ arylesterase 2 like isoform 1)*
SFM	Serumfreies Medium
SH	Src homologe Domäne
SIP	Smad interacting protein
SMC	Strukturelle Instandhaltung der Chromosomen
SOP	Arbeitsanweisung
SPF27	RNA-Splicingfaktor SPF27 (pre-mRNA-splicing factor SPF27)*
Spinner _{PA}	Spinnerflasche mit Paddelrührer
Spinner _{PE}	Spinnerflasche mit Pendelrührer
SRC	Zelluläres Sarcoma (cellular sarcoma)*
SU alpha	Proteasomenuntereinheit <i>alpha</i> (proteasome subunit <i>alpha</i>)*
SV	Vakuolenbildendes Simianvirus (simian vacuolating virus)*
T175	T-Flasche mit 175 cm ²
TapERp57	Tapasin endoplasmatisches Retikulumprotein 57
TC	T-complex protein 1
TCA	Trichloressigsäure
TCID ₅₀	Gewebekultur infektiöse Dosis 50 (tissue culture infectious dose 50)*
TFA	Trifluoressigsäure

TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor)*
TIMP	Gewebeinhibitor der Metalloproteinase (tissue inhibitor of metalloproteinase)*
TNF	Tumornekrosefaktor
TOF	Flugzeitanalysator (time-of-flight)*
TOI	Infektionsstart
TPI 1	Triosephosphatisomerase 1 (triosephosphate isomerase 1)*
TrEMBL	Übersetzung der europäischen Institution für Molekularbiologie (Translated European Molecular Biology Laboratories)*
Trypsin _Z	Trypsin für die Zellpassagierung
TUNEL	Biotinvermittelte Färbung von DNA-Strangbrüchen (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)*
UniProt KB	Wissensdatenbank für umfassende Proteinressourcen
V	Virusreplikation
Vero	Nierenzelllinie der Grünen Meerkatze
VerO _{SCM/AFM}	Adhärenente Vero Zelllinien kultiviert in serumhaltigem Medium
VerO _{IPT-AFM}	Adhärenente Vero Zelllinien kultiviert in Medium frei von tierischen Produkten
Vim	Vimentin
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)*
YWHA	Monooxygenase-aktivierendes Protein (Tyrosine 3 monooxygenase/tryptophan 5 monooxygenaseactivation protein)*
Z	Zellwachstum
ZO	Protein der Zell-Zellverbindung (zona occludens protein)*

Symbolverzeichnis

Variable	Beschreibung
α	Selektivität
$\sigma(x_i)$	Varianz
a	Anstieg der Kalibriergeraden
b	Achsenschnittpunkt
Ct	Zykluszahl des signifikanten Fluoreszenzsignals
c_{Virus}	Konzentration der Viruspartikel
c_{RBC}	Konzentration der RBC
d	Bilddateien
D	Fluoreszenzfärbungen
e	Elementarladung
F_{RT}	Verdünnungsfaktor der reversen Transkription
$G_D(x_i)$	Gesamtheit der Graustufenwerte
g_j	Gel
HA	HA-Titer
$\bar{I}(x_i)$	Mittelwert einer Intensität über alle betrachteten Messpunkte
$I_{g_j,F}(x_i)$	Normalisierte Spotintensität
$I_k(x_i)$	Intensität einer Kontrolle
$I_p(x_i)$	Intensität einer Probe
k	Retentionsfaktor
L_{Basen}	Fragmentlänge
m	Masse
m_{340}	Mittlere Masse der Basen (340 Da)
n_{RNA}	Anzahl der RNA-Moleküle
n_{Zellen}	Zellzahl
N	Anzahl theoretischer Trennböden
N_A	Avogadro-Konstante
R	Auflösung

$R(x_i)$	Verhältnis
$R_{LF}(x_i)$	Verhältnis für die LF-Quantifizierung
s	Flugstrecke
SQ_{Probe}	Virale mRNA pro Zelle
t	Flugzeit
T	Menge des Fragmentes
U	Beschleunigungsspannung
$V_D(x_i)$	Relativer Anteil eines detektierten Spots
V_{Eluat}	Probenvolumen
x_i	Detektierter Spot
z	Ladung
$Z(x_i)$	Standardisierung der Spotintensitäten
$Z_{LF}(x_i)$	Standardisierung der Intensitäten eines <i>features</i>

1. Einleitung

Im letzten Jahrzehnt hat die Anwendung der Zellkultur für den Herstellungsprozess von Impfstoffen zunehmend an Bedeutung gewonnen. Im Vergleich zu herkömmlichen, beispielsweise auf bebrüteten Hühnereiern oder Vogelembryonen beruhenden Verfahren, lässt sich der Produktionsmaßstab zellbasierter Prozesse schneller an den medizinischen Bedarf anpassen (Genzel and Reichl 2009). Die Anwendung von Zellkulturen zur Herstellung von Impfstoffen ermöglicht somit mehr Flexibilität und bringt eine nahezu unbegrenzte Kapazität mit sich.

Für den Prozess der Impfstoffproduktion werden unter anderem tierische Zelllinien verwendet, vielversprechend sind zum Beispiel kontinuierlich wachsende Madin-Darby-Hundenierenzelllinien (MDCK) und Nierenzelllinien der Grünen Meerkatze (Vero) (Barrett et al. 2009, Genzel and Reichl 2009). Diese Zelllinien wachsen meist adhärent und die Wachstumsphase vor der Infektionsphase erfolgt in serumhaltigen Medien. Moderne Prozesse mit tierischen Zelllinien zur Herstellung pharmazeutischer Wirkstoffe wie monoklonaler Antikörper basieren auf in Suspension und in chemisch definiertem Medium wachsenden Zellen (Bandaranayake and Almo 2014). Um diesen Standard zu erreichen, wurden in der Vergangenheit Zelllinien kultiviert und Versuche vorgenommen, diese durch Adaption schrittweise an die gewünschte Kultivierungsbedingung anzupassen.

Das Vorgehen der schrittweisen Zelladaption ist zeitaufwendig und nicht immer erfolgreich. Daher wäre es wünschenswert, gezielt eine Anpassung der Zelllinien zu erreichen. Dies kann durch eine Veränderung der Prozessführung, der Medienzusammensetzung oder der zellulären Eigenschaften erfolgen (Behrens et al. 1989, Chu et al. 2009, Lohr et al. 2010, Schoenenberger et al. 1991, Tsutsumi et al. 2006, van Wielink et al. 2011). Die Komplexität des zellulären Netzwerks erschwert bis heute eine gezielte Manipulation der Genexpression der Zellen. Während das komplexe Genom tierischer Zellen (Hund: 78 Chromosomen, Grüne Meerkatze: 60 Chromosomen) überwiegend statisch ist, zeigt die Genexpression einen hohen Grad an Flexibilität. Mit den exprimierten Proteinen wird wiederum eine funktionelle Vielfalt des zellulären Netzwerks erzeugt. Die Proteomanalytik gibt somit einen Einblick in zellulärere Netzwerke auf der funktionellen Ebene.

Die Proteomanalytik nutzt das Konzept von Perturbationsversuchen aus der Physik. Dabei wird ein System gestört und die induzierten Effekte betrachtet. Solche Versuche sind annahmefrei, eignen sich für die Untersuchung komplexer Systeme und bergen das Potenzial, unerwartete Zusammenhänge zu entdecken und durch die Perturbation verursachte Veränderungen verständlich zu machen. Die Proteomanalytik stellt ein Methodenspektrum bereit, diese Effekte auf sowohl qualitativer als auch quantitativer Ebene zu erfassen. Verschiedene Ansätze zur gelbasierten oder gelfreien Separation, zur fluoreszenzbasierten oder nicht markierenden Quantifizierung und zur massenspektrometrischen Identifizierung von Proteinen wurden in den letzten Jahren entwickelt.

Das Ziel vorliegender Arbeit ist es, den Einfluss veränderter Kultivierungsbedingungen auf das Proteom tierischer Zelllinien zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden zwei Strategien der Proteomanalytik angewandt. Die qualitativen und quantitativen Änderungen der Proteinexpression wurden mit einer gelbasierten und einer gelfreien Proteomanalytik durchgeführt, die Veränderungen des Proteoms nach Anpassung der Zelllinien an Suspensionswachstum und verändertes Medium betrachtet, wobei eine MDCK Zelllinie für die Replikation von Influenzaviren und eine Vero Zelllinie für die Replikation von Tollwutviren untersucht wurden. Die Versuche beider tierischer Zelllinien sollen eine Identifizierung zelllinienspezifischer und übergreifender Effekte ermöglichen. Die Proteomanalytik kann Ansatzpunkte für Prozesskontrollmechanismen offenlegen. Das neu gewonnene Verständnis über das zelluläre Netzwerk soll eine Grundlage für zukünftige molekularbiologische Experimente für Studien des *loss of function* (Funktionsverlust) und *gain of function* (Funktionsgewinn) bilden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Virale Impfstoffe

Impfungen gegen virale Infektionen gelten in der heutigen Zeit als eine der erfolgreichsten human- und veterinärmedizinischen Maßnahmen. Virale Impfstoffe haben das Ziel, Immunität gegen virusspezifische Antigene hervorzurufen. Diese Antigene werden dem Immunsystem in inaktiver Form, wie aufgereinigte virale Proteine (Totimpfstoffe), oder in aktiver Form, wie abgeschwächte (attenuierte) Viren (Lebendimpfstoffe), präsentiert. Abgeschwächte lebende Viren rufen eine natürliche Immunität hervor und können, im Vergleich zu anderen Varianten viraler Impfstoffe, in geringen Dosen verabreicht werden (Belshe et al. 2007). Lebendimpfstoffe sind jedoch komplizierter in der Herstellung und bergen die Gefahr unerwünschte Neukombinationen mit zirkulierenden Virusstämmen zu erzeugen. Weiterhin besteht die Möglichkeit einer Immunisierung über die Injektion von Gensequenzen für die Expression viraler Antigene in der Wirtszelle in Form von Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA) (Weiss et al. 2012).

Eine stetige Herausforderung ist es, die Impfstoffe an modifizierte Virusstämmen anzupassen und neue Impfstoffe für neue bisher unbekannte Virustämme zu entwickeln (Horzinek 1999). Neue Virusstämmen entstehen durch Mutationen und molekulare Neukombinationen aus bekannten Virusstämmen. Die mit der viralen Evolution verbundene Gefahr eines flächendeckenden Krankheitsausbruchs treibt die Forschung und Entwicklung von Impfstoffen voran, um einen anhaltenden Schutz vor viralen Erkrankungen zu erreichen. In diesem Kapitel wird näher auf die viralen Impfstoffe gegen Influenza- und Tollwutviren für die humane Anwendung eingegangen.

2.1.1. Impfstoffe gegen Influenzaviren

Influenzaviren gehören zu der Familie der *Orthomyxoviridae* und werden, abhängig vom antigenen Effekt ihrer Proteine, in die Klassen A, B und C unterteilt. Eine weitere Klassifikation von Influenza A Viren in Subtypen erfolgt anhand der antigenen Eigenschaften der Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) (17 HA und 9 NA bisher bekannt, Bezeichnung z. B. H1N1). Ein aus der Umwelt isolierter Virusstamm erhält seine Bezeichnung nach folgender Nomenklatur: Gattung/ Land/ Stammnummer/ Jahr der Isolation

(Subtyp). Wichtige Eigenschaften der Influenzaviren sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Die Viren haben ein weites Wirtsspektrum von Vögeln zu Säugetieren, wobei bisher nur Influenza A Viren für ausgelöste Pandemien verantwortlich sind.

Das Immunsystem des Wirts übt einen starken Selektionsdruck auf den Virus aus und begünstigt Punktmutationen der Virusoberflächenproteine. Somit können Influenzaimpfungen keinen anhaltenden Schutz durch die adaptive Immunantwort generieren. Die Influenzaviren modifizieren ihre antigenen Eigenschaften durch Antigen shift und Antigen drift (Medina and García-Sastre 2011). Die saisonale Grippewelle entsteht überwiegend durch kontinuierlichen Antigen drift. Dabei generiert die virale RNA-Polymerase ca. einen Fehler pro repliziertes Virusgenom (Drake 1993).

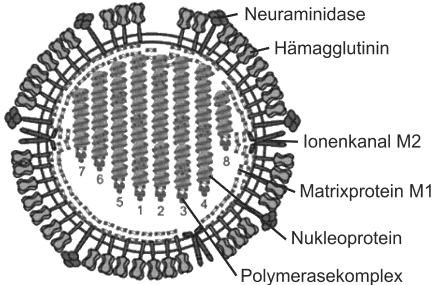
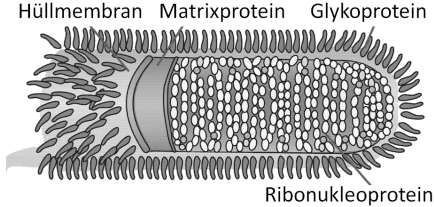
Der humane Impfstoff gegen Influenzaviren besteht aus einer Kombination der Oberflächenantigene HA und NA. Antigene von zwei Influenza A Virusstämmen werden mit Antigenen von ein bis zwei Influenza B Virusstämmen kombiniert (Reed et al. 2012). Der Impfstoff wird jährlich nach Empfehlungen der *World Health Organization* (WHO) modifiziert. Die vorbeugenden Impfungen schützen individuell vor der Erkrankung und können gleichzeitig die Ausbreitung des Virus in der Bevölkerung verhindern.

Trotz vorbeugender Impfungen können Pandemien durch Influenzaviren in kurzen Zeiträumen von unter einem halben Jahr auftreten. Insbesondere die Koinfektion durch zwei Virusstämme kann zum Austausch viraler Genomsegmente führen (Medina and García-Sastre 2011). Der Prozess wird als Reassortierung bezeichnet und führt zum Antigen shift. Durch Neukombinationen von RNA-Segmenten entstanden 1918 die spanische Grippe (H1N1), 1957 die asiatische Grippe (H2N2), 1968 die Hongkong Grippe (H3N2) und 2009 die Schweinegrippe (H1N1) (Simonsen et al. 2011). Weiterhin geht eine potentielle Pandemiegefahr von bislang nur in Vögeln zirkulierenden H5N1-Stämmen aus. Es konnte gezeigt werden, dass vier Mutationen innerhalb eines H5 HA eine erfolgreiche Transmission von Vögeln auf Frettchen ermöglichten (Imai et al. 2012). Es wurden bereits auch vereinzelte Fälle der Transmission von H5N1-Stämmen vom Vogel auf den Menschen beobachtet und die Erkrankungen verliefen zu 50% tödlich (Friede et al. 2011). Deshalb sucht die pharmazeutische Forschung nach Verfahren Impfstoffe schnell in großen Maßstäben verfügbar zu machen.

Im Jahr 1945 begann die industrielle Produktion von Grippeimpfstoffen, mit der USA-Zulassung eines in Hühnereiern hergestellten Impfstoffs. Der damalige Prozess wurde im Laufe der Zeit optimiert und ist robust und kostengünstig (Lee and Hu 2012). Die Viren werden in der Allantois eines 11 Tage alten, befruchteten Eies vermehrt. Im Durchschnitt werden ca. 1 bis 2 Eier pro Impfdosis benötigt (Bardiya and Bae 2005), aber nicht alle Saatviren replizieren mit entsprechend hohen Ausbeuten.

Beim klassischen Impfstoffherstellungsverfahren in Hühnereiern werden die hergestellten Saat-

Tab. 2.1.: Fakten zum Influenza- und Tollwutvirus. Aufgeführt sind die Klassifizierung der Viren, der Aufbau der Viren und Informationen zur viralen Erkrankung (Ivanov et al. 2011, Leyrat et al. 2011, Medina and García-Sastre 2011, WHO 2009, Wise et al. 2009).

	Influenzavirus	Tollwutvirus
Familie	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Rhabdoviridae</i>
Gattung	<i>Influenza</i>	<i>Lyssavirus</i>
Klassen	A, B, C	–
Genom	Negative RNA, 8 Segmente, 13-14 kb	Negative RNA, nicht segmentiert, 12 kb
Exprimierte Proteine	Hämagglutinin, Neuraminidase, Nukleoprotein, Ionenkanal M2, Matrixprotein M1, Nuclear Export Protein, Polymerasekomplex (3 Untereinheiten), N40, Nonstructural Protein 1, PB1-F2	Nukleoprotein, Matrixprotein, Phosphoprotein, RNA Polymerase, Glykoprotein
Größe	Ø 80 - 120 nm	180 nm x 90 nm
Aufbau		
Wirtsspektrum	Genzel et al. (2013) Vögel, Säugetiere	Rupprecht et al. (2002) Raubtiere, Fledertiere, Menschen
Ausbreitung	Weltweit	Asien, Afrika, Südamerika
Tote im Jahr	250 000 - 500 000	50 000
Übertragbarkeit	Tröpfcheninfektion	Bissverletzung
Krankheitsbild	Atemwegsinfektion und tödliche sekundäre Erkrankungen	Tödliche Enzephalitis

RNA - Ribonukleinsäure, N40 - N-terminal trunkeierte Version eines Polypeptids, PB1-F2 - basisches Protein 1 der Polymerase im zweiten Leserahmen.

viren im Vorfeld auf ihre Produktionsraten getestet. Für die Erhöhung der Ausbeuten wird die Reassortierung von Viruspartikeln durchgeführt, bei der die Oberflächenantigene der zirkulierenden Stämme erhalten bleiben. Dabei werden die RNA-Segmente durch Koinfektion oder reverse Genetik neu kombiniert (Subbarao and Katz 2004). Letztere beschreibt die Transfektion von Zellen mit speziell hergestellten RNA-Segmenten gebunden in Ribonukleoproteinen oder mit DNA-Plasmiden die virale RNA (vRNA) kodieren.

Die Herstellung der Impfstoffe in Hühnereiern weist einige Limitationen auf. So wird durch die Adaption der Virusstämme an die Eiproduktion das Glykosylierungsmuster der Oberflächenantigene verändert. Dies kann die Wirksamkeit des Impfstoffes beeinträchtigen (An et al. 2013). Außerdem werden nach Herstellung von Viren in Hühnereiern Spuren von Hühnerproteinen im finalen Produkt detektiert, die allergische Reaktionen in Patienten hervorrufen können. Weiterhin wird die Produktionskapazität der Impfstoffe durch die Verfügbarkeit von Eiern begrenzt und dies kann im Fall einer Pandemie zu Engpässen in der Herstellung führen.

Im Fall einer Pandemie gilt es, schnell zu reagieren und wirksamen, sicheren Impfstoff in kurzer Zeit herzustellen. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, gewann die alternative Herstellung von Impfstoffen gegen Influenzaviren in kontinuierlichen Zelllinien (Abschnitt 2.2.1) im letzten Jahrzehnt zunehmend an Bedeutung. Durch die Verfügbarkeit der geeigneten Zelllinien sowie der möglichen Skalierbarkeit eines zellkulturbasierten Prozesses eignen sich Zellkulturen besonders für die Produktion im industriellen Maßstab. Bestimmte tierische Zelllinien, wie MDCK und Vero, eignen sich sehr gut für die Replikation verschiedener Influenzavirusstämme (Tab. 2.2). Im Jahr 2009 wurde der erste, von der Firma Novartis in MDCK Zellen hergestellte, humane Impfstoff OPTAFLU[®] gegen Influenzaviren (Doroshenko and Halperin 2009) zugelassen. Vier Jahre später erhielt ein weiterer Impfstoff, FLUCELVAX[®], die Zulassung in den USA und Europa. Weiterhin kann Influenzaimpfstoff rekombinant in Insektenzellen mit Hilfe des Bakulovirus Expressionsvektor hergestellt werden (Flublok[™], Protein Sciences, Cox et al. 2015). Eine interessante Form eines in tierischen Zellen hergestellten Grippeimpfstoffes ist der Lebendimpfstoff. Diese Impfstoffe zeigten gegenüber Totimpfstoffen eine gesteigerte Effizienz (Gasparini et al. 2011). Speziell bei Influenza Virusstämmen kann diese Form den Antigenshift begünstigen, da bei Koinfektionen Neukombinationen von viralen RNA-Segmenten entstehen können. Es gibt Lebendimpfstoffe gegen Influenzaviren, die über Adaption an 25 °C in ihrer Infektiosität beeinträchtigt sind (z. B. Fluenz[™], Medimmune, Scott et al. 2012, Maassab and Bryant 1999) und somit das Risiko eines Antigenshifts minimieren. Der Impfstoff wird über ein Nasenspray dem Patienten dosiert.

Tab. 2.2.: Influenzavirusausbeuten kontinuierlicher Zelllinien. Die Kultivierungen der Zelllinien wurden in gerührten Bioreaktoren durchgeführt (Genzel and Reichl 2009).

Zelllinie	Virusstamm	HA-Titer ¹
Adhärende MDCK (ECACC)	A/PR/8/34	2,9
MDCK.SUS2 ²	A/PR/8/34/Malaysia	3,0
Vero (WHO)	A/Texas/36/91	2,4
Vero CCL-81 (ATCC)	A/Sydney/5/97	2,8

1 – Log₁₀ HA-Einheiten/100 µL (Abschnitt 3.3.3), 2 – Prof. Dr. rer. nat. Klaus Scharfenberg (Fachhochschule Emden/Leer, Fachbereich Technik, Emden, Deutschland); ECACC – *European Collection Of Cell Cultures*, WHO – *World Health Organization*, ATCC – *American Type Culture Collection*.

2.1.2. Impfstoffe gegen Tollwutviren

Die Tollwutviren werden der Familie der *Rhabdoviridae* zugeordnet. Das Virus repliziert sich im zentralen Nervensystem und breitet sich schließlich im ganzen Körper aus. Nach Ausbruch der Krankheit verläuft sie in allen Fällen tödlich. Nach der Infektion können bis zum Ausbruch 10 Tage bis drei Monate vergehen. Auf Grund dieser Zeitspanne kann eine Impfung vor oder nach einer Infektion mit Tollwutviren erfolgen. Wichtige Eigenschaften des Tollwutvirus sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Tollwut wird hauptsächlich über Bissverletzungen durch Raubtiere und Fledertiere auf den Menschen übertragen. Die Ausbreitung des Tollwutvirus konnte in Europa durch die Massenimpfungen von wildlebenden Tieren mit Hilfe von Ködern stark eingedämmt werden. Tollwut ist jedoch in Entwicklungsländern mit begrenzter medizinischer Vorsorge immer noch eine ernst zu nehmende Erkrankung. Die heutige Forschung ist aus diesem Grund bestrebt, den Impfstoff und dessen Herstellung sicherer und ökonomischer zu gestalten.

Der Impfstoff gegen Tollwutviren wurde erstmals 1885, als historisch dritter nach den Impfstoffen gegen Pocken und Hühnercholera, beschrieben. Eine detaillierte Zusammenfassung der Impfstoffproduktion gegen Tollwutviren wurde von Wu et al. verfasst (Wu et al. 2011). Louise Pasteur (1822 – 1895) behandelte einen Jungen nach einer Tollwutinfektion erfolgreich mit einer vorbehandelten Rückenmarksprobe eines infizierten Tieres. Pasteurs Impfstoff gegen Tollwutviren stellte eine Mischung aus inaktiven und lebenden Viren dar, der immer frisch hergestellt werden musste. Nachdem das Wildtypvirus von Hase zu Hase passagiert wurde und stabile Infektionseigenschaften (Inkubationszeit, Symptome, Virustiter) aufwies, wurde es als fixierter Stamm bezeichnet (Wu et al. 2011). Das isolierte Nervengewebe des Hasen wurde 14 Tage luftgetrocknet und dem infizierten Patienten zur Behandlung gespritzt. Durch kürzere Trocknungszeiten des Gewebes wurde die Aktivität des Viruspräparates gesteigert. Die Patienten wurden final mit frisch hergestelltem, infektiösem Nervengewebe behandelt.

Noch ein halbes Jahrhundert nach Louis Pasteurs Entdeckungen wurde eine Behandlung tollwutinfizierter Menschen mit vorbehandeltem Rückenmark infizierter Tiere durchgeführt. Das darin enthaltene Myelin verursachte Hirnentzündungen. Um dieser Nebenwirkung entgegen zu wirken, begann die Entwicklung myelinfreier Herstellungssysteme, wie zum Beispiel in Vogelembryonen und neonatalen Nagerhirnen. Für die daraus hergestellten Impfstoffe wurden eine geringe, antigene Immunantwort und verschiedene nachteilige Reaktionen beschrieben (Wu et al. 2011).

Ein weiterer Meilenstein in der Tollwutimpfstoffproduktion wurde mit der Verwendung von tierischen Zellkulturen Mitte der 60er Jahre erreicht. Dazu zählt ein, in Zellkultur hergestellter, inaktivierter Impfstoff aus dem Jahr 1964. Bereits zwei Jahre später stellten sich humane diploide Zelllinien als geeignete Wirtszelllinien heraus. Daraus resultierte die erste Zulassung dieses Impfstoffes (Imovax™, Sanofi Pasteur, Pichon et al. 2013) 1974 in Frankreich. Im industriellen Maßstab ist dieser Impfstoff schwierig und teuer zu produzieren, da diese Zelllinien eine begrenzte Passagenzahl aufweisen (Hayflick-Grenze) (Wu et al. 2011). Kontinuierliche Zelllinien, wie Vero Zellen, gaben neue Möglichkeiten zur Herstellung im industriellen Maßstab (Abschnitt 2.2). Ein Impfstoff, hergestellt in Vero Zellen, wurde erstmals 1985 in Frankreich zugelassen und anschließend in mehr als 100 Ländern (Verorab™, Sanofi Pasteur, Pichon et al. 2013) verkauft.

2.2. Tierische Zellkultur für die Impfstoffproduktion

Enders und Kollegen machten Mitte des 20. Jahrhunderts eine weitreichende Entdeckung (Enders et al. 1949). Sie konnten das Poliovirus in menschlichen Zelllinien, die nicht aus dem Nervengewebe stammen, vermehren und erhielten dafür 1954 den Nobelpreis. Der akute Bedarf einer Behandlung gegen Kinderlähmung stützte die Akzeptanz für den ersten zellkulturbasier-

ten Impfstoff (Merten 2006). Seither wurden verschiedene Zelllinien isoliert (Pflanzenzelllinien, Insektenzelllinien, tierische Zelllinien) und finden verschiedenste Anwendung in der Biotechnologie (Merten 2006). Die derzeit, in der pharmazeutischen Produktion, am häufigsten verwendete Zelllinie, ist die Hamsteroovar-Zelllinie (CHO). Diese wird überwiegend für die Produktion monoklonaler Antikörper eingesetzt. Vielversprechende Beispiele für die Impfstoffproduktion sind MDCK und Vero Zelllinien (Barrett et al. 2009, Genzel and Reichl 2009). In diesem Kapitel werden diese tierischen Zelllinien, ihre Nährmedien und ihr Wachstum auf Oberflächen und in Suspension im Kontext der Impfstoffproduktion näher erläutert.

2.2.1. Tierische Zelllinien: MDCK und Vero Zellen

Zelllinien können in verschiedene Gruppen unterteilt werden (Hess et al. 2012):

- Primäre Zelllinie: Die Zellen werden direkt aus Flüssigkeiten oder Geweben von Organismen entnommen und durch Zugabe von Nährmedien in Kultur gehalten.
- Diploide Zelllinien: Die Zellen wurden von menschlichen oder tierischen Feten isoliert. Sie weisen eine begrenzte Passagenzahl auf (Hayflick-Grenze) (Hayflick and Moorhead 1961).
- Kontinuierliche Zelllinien: Die Zellen können sich nahezu unbegrenzt in Kulturen vermehren. Ausgehend von primären Zellkulturen kann eine Immortalisierung durch Transfektion, Transformation, induzierter Mutation, UV-Bestrahlung oder spontan erfolgen.
- Designer Zelllinien: Die Zellen werden mit Hilfe genetischer Veränderungen speziell für die biotechnologische Produktion entwickelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit den kontinuierlichen tierischen Zelllinien MDCK und Vero gearbeitet, da sie geeignete Wirtszellen für die Replikation verschiedener Virusstämme sind (Barrett et al. 2009, Genzel and Reichl 2009). Einen Grundstein dafür legten 1958 die Wissenschaftler Madin und Darby mit der Isolation primärer Zellkulturen aus dem Nierengewebe verschiedener Tiere (Rind, Schaf und Hund, Madin et al. 1957, Madin and Darby 1958, Gauth et al. 1966). Das Gewebe des Nierenkortex eines adulten weiblichen Cocker Spaniels (*Canis familiaris*) wurde mechanisch und enzymatisch zerkleinert und diente anschließend als Inokulum für die Zellkultur. Die parentale MDCK Zelllinie wurde 1964 mit Passage 49 zertifiziert (Omeir et al. 2011). Daraus sind heute eine Vielzahl verschiedener Zelllinien hervorgegangen, die über verschiedene Zellbanken erhältlich sind (Dukes et al. 2011). Empirische Versuche zeigten das MDCK Zellen geeignete Wirtszellen für Influenzaviren mit hohen Virusausbeuten sind. Die WHO empfahl 1995 unter anderem, MDCK Zellen zur Herstellung von Impfstoff gegen Influenzaviren zu nutzen (WHO 1995).

Die Vero Zelllinie wurde 1962 aus dem Nierengewebe einer adulten afrikanischen Grünen Meerkatze (*Chlorocebus*) von Yasumura und Kawikata isoliert (Barrett et al. 2009). Nach der erfolgreichen Herstellung von Polioviren in Vero Zellen 1980 wurde die Zelllinie für die Produktion verschiedener Lebend- und Totimpfstoffe verwendet (Barrett et al. 2009). Die WHO generierte 1987 eine Vero Zellbank der Passage 124, die den Bestimmungen der WHO, für die Verwendung von kontinuierlichen Zelllinien in der Produktion biologischer Substanzen erfüllte. Für Tollwutviren, japanische Enzephalitis-Viren, Rotaviren, Vaccinia und Influenzaviren wurde die Herstellung in Vero Zellen genehmigt. Forschungs- und Entwicklungsprozesse laufen für die Impfstoffproduktion gegen Dengue-Viren, West-Nil-Viren, Ross-River-Viren, Chikungunya-Viren und Pockenviren. Seit mehr als 30 Jahren werden Produktionsprozesse mit Vero Zellen verbessert. Die dabei gewonnenen Erfahrungen waren wegberreitend für die Verwendung weiterer kontinuierlicher Zelllinien für die Impfstoffproduktion.

2.2.2. Nährmedien für die tierische Zellkultur

Die Kultivierung von Zelllinien ist fast ausschließlich in komplexen Medien möglich. Die Nährlösungen enthalten neben Metaboliten und Kofaktoren auch Hormone, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsfaktoren, Radikalfänger, Lipide oder Substanzen gegen Scherstress. Die erfolgreiche *in vitro* Kultivierung von Fibroblastzellen der Maus im Nährmedium durch Earle et al. (1954) gilt als Beginn der Zellkulturtechnik. Seither wurde die Zusammensetzung der Nährmedien mit empirischen Ansätzen verbessert. Es wurde die Verwendung verschiedener Medienkomponenten (z. B. Serum, Pflanzenlysate) getestet und nach einfachen Substanzen, die komplexe Bestandteile ersetzen können, gesucht (Tsao and Gould 2000).

Anfangs gelang es nur dann Zellen zu vermehren, wenn tierische Seren für die Kultivierung zugegeben wurden. Dabei bildete ein Basalmedium, auch Minimalmedium genannt, die Grundlage für die Herstellung serumhaltiger Medien (SCM, 1 - 10 % Serum). Seit den 90er Jahren gibt es Bestrebungen serumfreie Medien (SFM) zu verwenden (van der Valk et al. 2004), da durch Serumzugabe Zellkulturen mit Viren, Mykoplasmen oder anderen Krankheitserregern kontaminiert werden können. Des Weiteren ist die Serumherstellung aus Feten sehr kostspielig und birgt die Gefahr von Schwankungen in der Zusammensetzung verschiedener Serumchargen welche die Zellkulturprozesse beeinflussen können.

Das Ziel der Medienentwicklung ist die Verwendung von Medien ohne tierische Produkte, bis hin zu vollständig chemisch definierten Medien (CDM). CDM enthalten keine Hydrolysate oder andere Komponenten unbekannter Zusammensetzung. Nur hoch aufgereinigte Substanzen oder rekombinante Proteine werden den Kulturen zugegeben (van der Valk et al. 2010). Ein kritischer Faktor für die Medienentwicklung ist die Substratverfügbarkeit der Zellen zum Beispiel für

Cholesterol, essentielle Lipide oder Eisen (Tsao and Gould 2000). Je mehr über die spezifischen Bedürfnisse der Zelllinie bekannt ist, desto besser kann das CDM angepasst werden.

2.2.3. Adaption von adhärentem Wachstum an Suspensionswachstum

Die Herstellung pharmazeutischer Wirkstoffe in Zellkultur erfolgt heute in 1 000 bis 10 000 Liter Bioreaktoren (Merten et al. 2014). Die dabei verwendeten Zelllinien sind an Suspensionswachstum adaptiert. Vielversprechende Zelllinien für die Impfstoffproduktion wachsen jedoch meist adhärent. Diese Zellen in Suspensionskulturen zu halten ist eine Herausforderung für die Bioprozesstechnik. Nach den Entdeckungen von Enders et al. (1949), war die Nutzung von kleinen Partikeln (Microcarrier) durch van Wenzel (1973) zur Vergrößerung der Wachstumsoberfläche, für adhärent wachsende Zellen im Bioreaktor, eine der ersten wichtigen Weiterentwicklungen für die industrielle Produktion von Impfstoffen in Zellkultur. Der Einsatz von Microcarriern ermöglichte erstmals die Kultivierungen adhärenter Zellen im 1 000-Liter-Maßstab.

Eine weitere wesentliche Prozessverbesserung ist der Übergang von adhärentem Zellwachstum zu Suspensionswachstum (Merten et al. 2014). Das Suspensionswachstum ermöglicht einen einfacheren Transfer in größere Produktionsmaßstäbe (*up-scaling*) und wird generell in der zellkultur-basierten Impfstoffherstellung angestrebt. Weitere Vorteile der Suspensionskultur sind die Einsparung von Kultivierungszeit, durch den Wegfall von Anheftungs- und Ablösungsschritten sowie die in der Regel geringere Scherkraftbelastung der Zellen. Nachteilig sind die im Vergleich zu adhärenter Zellkulturen komplizierteren Schritte des Medienwechsels und der Zellgewinnung. Die Neigung zur Zellaggregatbildung in Suspensionskulturen kann durch die Optimierung des Zellkulturmediums reduziert werden (van Wielink et al. 2011).

Wissenschaftler untersuchten den Übergang von adhärentem Wachstum zu Suspensionswachstum in verschiedenen Forschungsbereichen: 1) Metastasierung von Krebs, 2) zelluläre epitheliale-mesenchymale Transition (EMT), 3) Kultivierung von Zellen für der Biotechnologie und 4) zelluläre Anoikis (Form der Apoptose durch Ablösung der Zelle vom Substrat, Grossmann 2002). Der Übergang einer Epithelzelle zur mesenchymalen Zelle wurde zu Beginn dieses Jahrhunderts mit der Metastasierung von Krebszellen verknüpft (Arias 2001). Die EMT wird seitdem umfassend erforscht. Für MDCK Zellen, das Modellsystem für EMT, wurden viele molekulare Zusammenhänge, wie zum Beispiel die Anoikis, als essentieller Mechanismus kontrollierter Gewebebildung, erstmals beschrieben (Mathias et al. 2010, 2009) und sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst (Frisch and Francis 1994). Speziell der Zellausschluss aus einem Epithel wurde von Rosenblatt et al. (2001) näher betrachtet. Die Kontraktion des Zytoskeletts (Aktin-Myosin-Ring) der apoptotischen und ihrer benachbarten Zellen, ermöglicht den naht-

losen Ausschluss. Die Signalwege für den Zellausschluss werden noch vor den apoptotischen Signalen induziert (Marinari et al. 2012, Rosenblatt et al. 2001).

Die hier verwendeten Vero und MDCK Zelllinien weisen in ihrer parentalen Form ein epitheliales und adhärentes Wachstum auf. Die Zelladhäsion und der Zellzyklus sind in beiden Zelllinien eng verbundene Mechanismen. Da sie aus tierischem Gewebe isoliert wurden, können vielfältige Interaktionen auf der Zell-Zell-Ebene und der Zell-Matrix-Ebene vermutet werden (Saltzman et al. 2000). Die Zellablöstung aus einem Epithel ist eine häufige Eigenschaft entarteter bzw. tumorogener Zellen (Assoian 1997). Die Adaption einer adhärent wachsenden Zelllinie an Suspensionswachstum birgt das Risiko unerwünschte Zelleigenschaften hervorzubringen, wie zum Beispiel verlangsamtes Wachstum (Sinacore and Adamson 2000), ein veränderter Chromosomengehalt (Cassio 2013, Gaush et al. 1966) oder Änderungen der Tumorigenität (Boerner et al. 1985, Liu et al. 2010, Omeir et al. 2011).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden MDCK Zellen an das Wachstum in Suspension angepasst. Die Adaption von Vero Zellen an Suspensionswachstum ist soweit bekannt bisher nicht in der Literatur beschrieben. Die Entwicklung von MDCK Suspensionszellen wurde durch genetische Manipulation, die Optimierung des Zellkulturmediums und die schrittweise Zellpassagierung gezeigt. Für die genetische Manipulation sind in der Literatur zwei Beispiele benannt. Die virale Transformation von MDCK Zellen mit rekombinanten Viren (Behrens et al. 1989, Schoenenberger et al. 1991) führte zu einer gesteigerten Expression des Ras Proteins, einer EMT und dem Verlust der Zelladhäsion (Mathias et al. 2010). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Transfektion mit dem humanen *siat7e* Gen, welches die Sialyltransferase ST6GalNac V kodiert, MDCK Zellen in Suspension wachsen ließ (Chu et al. 2009). Neben der invasiven Methode der genetischen Manipulation konnte das Suspensionswachstum ebenfalls durch, eine Kultivierung von MDCK Zellen in Anwesenheit von Metalloproteinase erreicht werden (Tsutsumi et al. 2006). Weiterhin konnten MDCK Zellen auch durch schrittweise Passagierung und Selektion von Subpopulationen an Suspensionswachstum adaptiert werden (Lohr et al. 2010, van Wierlink et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen durch schrittweise Passagierung adaptiert, dieser Vorgang wird als Zelladaption bezeichnet.

2.2.4. Virus-Wirtszellinteraktionen tierischer Zelllinien

Eine entscheidende Rolle bei der Replikation von Viren in tierischen Zelllinien spielt die Interaktion des Virus mit der Wirtszelle. Die Ziele der Forschung in den Bereichen der Virus-Wirtszellinteraktion für die Impfstoffproduktion in Zellkultur oder für die Untersuchung viraler Erkrankungen sind divergent. In der Impfstoffproduktion wird nach Wegen zur effektiven Virusreplikation und gesteigerten Virusausbeute gesucht. Es ist vorstellbar, dass durch eine Be-

Tab. 2.3.: Molekulare Mechanismen der MDCK Zelllinie während epithelial-mesenchymaler Transition. Die Informationen wurden aus den Referenzen Gotzmann et al. (2004) und Mathias et al. (2010) entnommen.

Molekulare Induktion	Signalmoleküle	Proteinregulation (z. B.)
Snail, SIP-1, SV40-large T, E12/E47, PDZ-Domäne des ZO-1, HGF, Cbl	Ras, PI3 Kinase, Tyrosinkinase Src, PLC γ , TGF β	<i>reprimiert:</i> E-Cadherin, Desmocollin 2, Clusterin, Kollagen XVII, ig-h3 <i>induziert:</i> N-Cadherin, Vimentin, Fibronectin, MMP-1, Kallikrein 6, TIMP-1, Metastasin

SIP - smad interacting protein, SV - simian vacuolating virus, E - immunoglobulin enhancer-binding factor, ZO - zona occludens protein, HGF - hepatocyte growth factor, Cbl - casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene, PI - phosphoinositide, SRC - cellular sarcoma, PLC - phospholipase C, TGF - transforming growth factor, ig-h - transforming growth factor- β -induced protein, TIMP - tissue inhibitor of metalloproteinase, MMP - matrix metalloproteinases

schleunigung von Teilschritten der Virusreplikation oder eine Verzögerung der virusinduzierten zellulären Apoptose eine gesteigerte Virusausbeute erzielt werden kann. Das Grundlagenwissen über molekulare Zusammenspiele und die Lebenszyklen der Viren ist dabei von Nutzen (für Influenzaviren Bouvier and Palese (2008) und Tollwutviren, Schnell et al. 2010). Die Interaktion des Virus mit der Wirtszelle ist eine Balance zwischen der viralen Pathogenität und der zellulären Abwehr. Die mögliche Beeinflussung dieses Gleichgewichts in verschiedenen Infektionsstadien und auf verschiedenen molekularen Ebenen wird zunehmend detaillierter erforscht. Der folgende Abschnitt beschreibt Mechanismen, die in dieser Arbeit betrachtet werden.

Zellen werden bei einer Virusinfektion durch die angeborene Immunantwort in einen antiviralen Zustand versetzt. RNA-Viren werden von tierischen Zellen durch RNA-Helikasen und durch *retinoic acid inducible gene-1* (RIG-I) ähnlichen Rezeptoren detektiert. Über diesen Mechanismus wird der Interferonsignalweg (Interferon Typ I, IFN) aktiviert (de Faria et al. 2013). Exprimiertes IFN bindet an IFN-Rezeptoren, die den antiviralen Status der Zelle etablieren und mittels des Jak/STAT-Signalwegs mehr als 300 Gene regulieren (Der et al. 1998). Diese Genexpression greift im Falle des Influenzavirus auf jede Ebene des Replikationszykluses ein (García-Sastre 2011). Vero Zellen können infolge eines genetischen Defekts kein IFN exprimieren (Diaz et al. 1988) und nutzen alternative antivirale Mechanismen wie z.B. die Regulation über den *interferon regulatory factor 3* (IRF-3) (Chew et al. 2009).

Viren können während der Infektion über verschiedene Mechanismen die zelluläre Apoptose manipulieren (Benedict et al. 2002). Die Signalprozesse der Apoptose stellen ein komplexes Netzwerk dar, das zellspezifische Unterschiede aufweist. Generell sind drei Wege der zellulären Apoptoseinduktion bekannt: 1) Extrinsischer Weg über Caspase 8, 2) Intrinsischer (mitochondrialer) Weg über Caspase 9 und 3) Signalweg über Granzym B (Elmore 2007). Alle Wege induzieren die Spaltung von Caspase 3 und führen zu einem apoptotischen Phänotyp, der durch DNA-Fragmentierung, Membranauflösung und die Bildung von Apoptosekörperchen gekennzeichnet ist. Apoptose kann wie im Falle eines H5N1 Influenzavirus zellspezifisch ausgelöst werden (Yang et al. 2009). Viren sind in der Lage sowohl pro- als auch antiapoptotische zelluläre Signalwege zu beeinflussen. Für H3N8 Influenzaviren wurde gezeigt, dass proapoptotische Proteine (z. B. Deoxyribonuklease, Bcl2-bindendes Protein) durch die Infektion induziert wurden. Im Gegensatz aktiviert die Infektion mit einem H7N7 Stamm zusätzlich antiapoptotische Faktoren (z. B. Bcl-2 Homologe) (Rozek et al. 2013). Pathogene Tollwutviren scheinen keine Apoptose auszulösen (Schnell et al. 2010). Im Gegensatz dazu unterstützen bei der Impfstoffproduktion die viralen Glykoproteine der attenuierten Tollwutvirusstämme die zelluläre Apoptose (Faber et al. 2002).

2.3. Proteinanalytik

Proteinanalytik kann sich auf einzelne Proteine, Proteinmodifikationen oder die Gesamtheit aller Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt und definierten Bedingungen, bekannt als Proteom, beziehen. In der vorliegenden Arbeit wurden explorative Messungen unter Betrachtung des zellulären Proteoms durchgeführt. Das Ziel war dabei, den Zustand der Zelle über ihr Proteom zu charakterisieren, um verschiedenste Einflussfaktoren auf den Impfstoffproduktionsprozess zu evaluieren. Mit Hilfe der Proteomanalytik kann das Prozessverständnis gesteigert werden und Ansatzpunkte für Prozesskontrollmechanismen offengelegt werden.

Zur Proteinanalytik wurde die Massenspektrometrie (MS, Abschnitt 2.3.1) eingesetzt, die sich in den letzten Jahren zur zentralen Analytik bei der Untersuchung des Proteoms entwickelte. Für eine umfangreiche massenspektrometrische Proteinidentifizierung (Abschnitt 2.3.2) war daher die Separation der Probe im Vorfeld essentiell (Abschnitt 2.3.3). Durch vergleichende quantitative Betrachtungen (Abschnitt 2.3.4) wurden differenziell exprimierte Proteine identifiziert und basierend auf ihren funktionalen Eigenschaften in den Kontext des zellulären Netzwerkes gesetzt. Da die Grenzen der manuellen Auswertung bei der Datenerhebung in der Proteomics schnell erreicht sind, halfen bioinformatische Programme bei der Datenprozessierung und -evaluierung (Abschnitt 2.3.5).

2.3.1. Massenspektrometrie

Die Erfindung neuer Ionisationsmethoden mit geringer Ionisationsenergie (10 - 14 eV) Ende der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts war der Schlüssel für die Entwicklung der MS als zentrales Element der Proteinanalytik. Die Arbeiten von Fenn (Fenn et al. 1989, Whitehouse et al. 1985) führten zur Entwicklung der Elektrospray-Ionisation (ESI) aus der gelösten Probe. Ungefähr zur gleichen Zeit wurde die matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation (MALDI) der Probe aus der festen Phase parallel von Hillenkamp und Karas sowie durch Tanaka entwickelt (Karas and Hillenkamp 1988, Tanaka et al. 1988). Mittlerweile werden vielfältige Fragestellungen im Bereich der Proteinidentifizierung, der Proteinquantifizierung, des Proteinnachweises und der Strukturaufklärung mit Hilfe der MS analysiert.

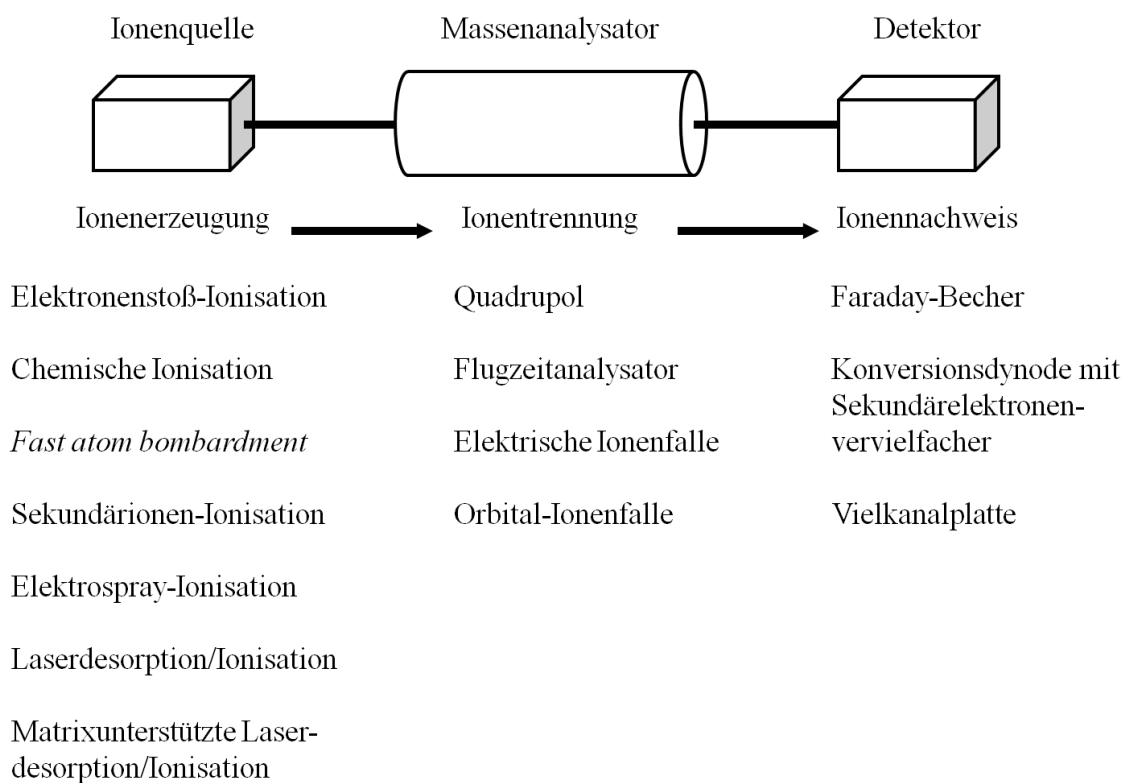


Abb. 2.1.: Aufbau eines Massenspektrometers. Dargestellt sind die entwickelten Techniken der Hauptkomponenten: Ionenquelle, Massenanalysator und Detektor (Lottspeich and Engels 2012). Sie ermöglichen die Ionenerzeugung, -trennung und den -nachweis. Die Pfeile zeigen die Richtung des Ionenflugs.

Das Grundprinzip der MS ist es, aus anorganischen oder organischen Substanzen mit einer geeigneten Methode Ionen zu erzeugen, diese nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis ($\frac{m}{z}$) zu trennen und durch Detektion nach dem $\frac{m}{z}$ -Wert und Häufigkeit (qualitativ und quantitativ)

zu erfassen (Kienitz 1968). Die Ionisation der Substanzen kann thermisch, durch elektrische Felder oder durch Beschuss der Probe mit Elektronen, Ionen, Photonen, neutrale Atome oder Clusterionen erfolgen. Die Ionen können einzelne ionisierte Atome, Clusterionen, ionisierte Moleküle, deren Bruchstücke oder Assoziate sein. Die Ionentrennung erfolgt durch elektrische und magnetische (statische oder dynamische) Felder oder im feldfreien Raum (z. B. Flugzeitanalysator, Kienitz 1968, Gross 2004).

Die Hauptkomponenten eines Massenspektrometers sind die Ionenquelle, der Massenanalysator und der Detektor (Abb. 2.1). Verschiedene Ionisationsmethoden und Massenanalysatoren wurden entwickelt und auf unterschiedlichste Weise kombiniert. Der folgende Abschnitt beschreibt die technischen Spezifikationen der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Ionisationsmethoden

Die MALDI wird durch intensive Pulse kurzweiliger Laserstrahlen auf das Präparat ermöglicht. Nach Kokristallisation von Matrix (kleine organische Moleküle, wie zum Beispiel α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (HCCA), Abbildung 2.2), und dem Analyt auf einem Träger (z. B. Edelstahlplatten) kann die Übertragung der für die Ionisation notwendigen Energie über elektrische Resonanz erfolgen.

Es wird vermutet, dass in extrem kurzer Zeit die Anregungsenergie in das Festkörpergitter relaxiert, was zu einer explosiven Auflösung der Oberfläche führt. Die dabei entstehenden radikalen Matrixmoleküle sorgen durch Protonentransfer für eine hohe Ausbeute an elektrisch geladenen Probenmolekülen, die im Falle von Peptiden hauptsächlich einfach geladen sind (Lottspeich and Engels 2012).

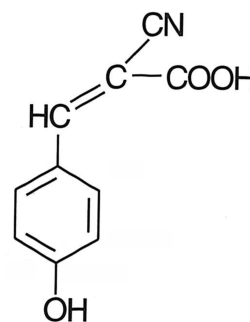


Abb. 2.2.: Strukturformel von α -Cyano-4-

hydroxyzimtsäure. Während der Analyt für MALDI in fester Phase vorliegt, benötigt ESI einen kontinuierlichen Fluss des Analyten in gelöster Form. An der Spitze einer Kapillare wird ein elektrostatisches Feld angelegt, das im Fall der Peptidanalytik meist eine positive Ladung an der Spitze erzeugt. Positive Ionen werden an die Oberfläche gezogen und es entsteht ein Flüssigkeitskonus (Taylor-Konus). Dieser endet in einem filamentartigen Flüssigkeitsstrom, der nahe der Anode seine Stabilität verliert und in viele kleine Tröpfchen dispergiert. Durch Verdampfen der Flüssigkeit erhöht sich die Ladungsdichte an der Tropfenoberfläche, worauf ein explosionsartiger Zerfall der Tropfen (Coulomb Explosion) folgt. Bei der Peptidionisation mit ESI entstehen meist mehrfach geladene Moleküle. Die ESI

erzeugt energetisch kalte Ionen (thermische Energie entzogen) und ist damit schonender als MALDI (Lottspeich and Engels 2012).

Massenanalytoren

Nach der Ionisation erfolgt die Separation der geladenen Probenmoleküle entlang ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses im Hochvakuum in elektrischen oder magnetischen Feldern sowie im feldfreien Raum. Im Flugzeitanalysator (TOF, *time-of-flight*) werden erzeugte Ionen mit unterschiedlichem $\frac{m}{z}$ -Wert durch die Potentialdifferenz einer angelegten Spannung (U) unterschiedlich beschleunigt und in eine feldfreie Driftstrecke (s) entlassen. Im Hochvakuum bleibt die Geschwindigkeit der Ionen konstant und durch der Messung der Flugzeit (t) bis zum Detektor kann mit der folgenden Gleichung (2.1) der $\frac{m}{z}$ -Wert bestimmt werden (Gross 2004).

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \times e \times U \times t^2}{s^2} \quad e = \text{Elementarladung} \quad (2.1)$$

TOF-Analysatoren werden häufig in Verbindung mit MALDI eingesetzt. Neben technischen Schwierigkeiten, im Bereich von Nanosekunden präzise zu messen, kommt es im Fall der MALDI durch den Laserimpuls zu energetischer Inhomogenität der ionisierten Probenmoleküle. Eine Lösung ist der Einbau von Reflektoren (Ionenspiegel, elektrisches Feld entgegengesetzter Polarität) gegenüber der Ionisationsquelle, welche eine Richtungsumkehr der Ionen verursachen. Dabei dringen Moleküle mit höherer kinetischer Energie bei gleichem $\frac{m}{z}$ -Wert tiefer in das elektrische Gegenfeld ein und legen eine längere Strecke zurück, bevor sie den Detektor erreichen. Eine zweite Lösung ist die *delayed extraction* (verzögerte Extraktion), wobei das elektrische Feld über der Probe zeitversetzt zum Laserpuls eingeschaltet wird. Von der Probe weiter entfernte Ionen erfahren dadurch eine geringere kinetische Energie.

Ein weiteres Prinzip der Massenanalyse beruht auf der kontrollierten Bewegung von Ionen zwischen vier symmetrisch angeordneten Stabelektroden eines Quadrupols (Q). Die Ionen erfahren durch ein elektrisches Feld an der Quelle eine Beschleunigung. Anschließend gelangen sie entlang der z-Achse (Beschleunigungsrichtung) zwischen die vier Stabelektroden und können auf Grund ihrer Trajektorien (Flugbahnen) in einem kombinierten Wechsel- und Gleichspannungsfeld gefiltert werden. Die Wirkungsweise ist im Vergleich zur mathematischen Berechnung basierend auf der Mathieuschen Gleichung (Gross 2004) relativ einfach zu erläutern: Aufgrund eines sinusförmigen Wechselspannungsfeldes zwischen zwei gegenüberliegenden Stabelektroden resultiert eine sinusförmige Flugbahn der Ionen. Zusätzlich führt die Gleichspannung identischer Polarität an den beiden anderen Stäben zu einer Fokussierung der Ionen in der z-Achse des Analysators. In Abhängigkeit des $\frac{m}{z}$ -Wertes folgen die Ionen einer größeren (kleine, leichte Ionen) oder kleineren (große, schwere Ionen) Auslenkung ihrer spiralförmigen Flugbahn. Beim

Massenbereichsscan werden beide Spannungen gleichzeitig, mit konstantem Verhältnis zueinander und konstanter Frequenz (Radiofrequenzbereich), erhöht. Dadurch werden die Ionen verschiedener $\frac{m}{z}$ -Werte nacheinander in eine stabile Flugbahn im Quadrupolfeld überführt und können am Detektor gemessen werden (Lottspeich and Engels 2012).

Bei einer weiteren Methode können mit Hilfe elektrischer Felder Ionen zur Separation beschleunigt, gefiltert und in Ionenfallen (IT, *ion trap*) eingefangen werden. Eine drei-dimensionale IT besitzt eine Ringelektrode und zwei Endkappenelektroden. Beide werden mit Wechselspannung betrieben. Die Bewegung der Ionen im quadrupolaren Feld der Ringelektrode kann ebenfalls mit der Mathieuschen Gleichung berechnet werden. Sie beschreibt eine geschlossene Bahn, welche durch die beiden Endkappen mit erhöhtem Potential erzielt wird. Durch resonante Anregung werden gefangene Ionen in Schwingung gebracht und in Abhängigkeit vom $\frac{m}{z}$ -Wert aus der Falle entlassen. Auch die 2-D IT (ebenfalls bekannt als lineare IT) erzeugt in ihrem Zentrum ein quadrupolares Feld. Jedoch werden die Endbereiche durch Sperrpotentiale begrenzt. Beim Instabilitätsscan ermöglichen die beidseitig angebrachten Detektoren eine hohe Ausbeute (Lottspeich and Engels 2012).

Ionenfallen können auch mit einem anderen physikalischen Prinzip funktionieren. In der Orbital IT (auch bekannt als Orbitrap) werden Ionen auf stabilen Kreisbahnen (Orbitale) um eine in der IT zentral angeordnete, spindelförmige Elektrode eingefangen (Zubarev and Makarov 2013). Dabei gleicht die Zentrifugalkraft die Anziehung der Ionen hin zur zentralen Elektrode durch das elektrostatische Feld aus. An beiden Enden begrenzen Endkappenelektroden die Falle und erzeugen geschlossene Ionenflugbahnen. Die Schwierigkeit, dass bei kontinuierlichem Ionenstrom eine zu hohe Beschleunigung der Ionen beim Eintreffen in die Falle vorliegt, ist technisch gelöst wurden. Eine vorgeschaltete C-förmige IT, welche Ionenpakete weitergibt und die Spannung an der Zentralelektrode der Orbitrap zum Zeitpunkt der Ionenübergabe absenkt, ermöglicht die Erzeugung stabiler Orbitale. Die Orbitale haben eine radiale Oszillation, welche nur vom $\frac{m}{z}$ -Wert abhängt. Die äußere Elektrode ist durch einen Keramikring in der Mitte unterteilt. Die Ionenoszillation in der Falle induziert in ihr einen Strom, welcher als Sinusschwingung detektiert und durch Fourier-Transformation zu einem Massenspektrum verrechnet wird.

Ionendetektoren

Die einfachste Form eines Detektors ist der Faraday Becher. Die geladenen Ionen treffen auf einen Metallbecher. Dabei verursachen sie am angeschlossenen Widerstand einen Spannungsabfall, der als Ionenstrom detektiert wird. Diese Form eines Detektors ist sehr zuverlässig und robust, hat jedoch eine geringe Empfindlichkeit und lange Reaktionszeiten (Lottspeich and Engels 2012). Für die schnelle und sensitive Aufnahme von Massenspektren wurden deshalb

Sekundärelektronenvervielfacher entwickelt. Nach Aufprall energetisch geladener Ionen auf eine Elektrodenoberfläche (Metall oder Halbleitermaterialien) werden Sekundärelektronen emittiert. Die gegenüberliegende Elektrode hat ein höheres Potential und die emittierten Elektronen werden, bevor sie auftreffen, zusätzlich beschleunigt. Das gesamte Bauelement mit 12 bis 18 Elektroden heißt Dynode und erzeugt eine elektrisch detektierbare Ladung. Die Form der Elektronenvervielfachung kann auch in einem kontinuierlichen Röhrchen erzeugt werden und wird Kanalelektronenvervielfacher genannt. Millionen miniaturisierter Kanalelektronenvervielfacher bilden eine Mikrokanalplatte. Eine leichte Neigung der Mikrokanalplatteneinheiten ermöglicht einen schrägen Ioneneinfall für den direkten Aufprall auf die emittierende Oberfläche. Wegen hoher Luftsensitivität der Emissionsschichten und um Überschlüge durch die angelegte Spannung zu vermeiden, muss die Detektion unter Hochvakuum stattfinden.

2.3.2. Massenspektrometrische Proteinidentifizierung

Zur Proteinidentifizierung und -quantifizierung (Abschnitt 2.3.4) wurde in dieser Arbeit die MS verwendet. Dabei ist die Bestimmung der exakten Molekülmassen essentiell. Die Massenspektrometer der Proteinanalytik zeichnen sich in Abhängigkeit der Massenanalytoren durch verschiedene Messgenauigkeit (Differenz zwischen dem experimentellen Wert und der theoretisch errechneten Masse) und Präzision (Standardabweichung von Wiederholungsmessungen) aus. Für die Proteinanalytik mit der MS finden das *top-down* und das *bottom-up* Verfahren Verwendung. Das *top-down* Verfahren analysiert intakte Proteine. Die Proteine können dabei in ihrer Zusammensetzung und Struktur analysiert werden. Große Proteine (>10 kDa) sind jedoch im Massenspektrometer komplizierter zu ionisieren und daher schwer zugänglich (Eidhammer et al. 2007).

Bei der *bottom-up* Methode werden Proteine in Peptide gespalten, bevor sie mit der MS analysiert werden (Eidhammer et al. 2007). Eine besondere Form des *bottom-up* ist die *shot-gun* Methode, bei der ein komplexes Proteingemisch in Peptide gespalten und die Peptide vor der massenspektrometrischen Analyse separiert werden (Matthiesen 2013). Die Spaltung von Proteinen zu Peptiden kann auf chemischer oder enzymatischer Ebene durchgeführt werden. Weit verbreitet ist die Verwendung der Protease Trypsin, welche 1876 von Wilhelm Kühne im Sekret der Bauchspeicheldrüse von Rindern entdeckt wurde. Sie spaltet Aminosäuresequenzen am C-Terminus von Arginin (R) und Lysin (K), wenn kein Prolin (P) folgt. Die entstehenden Peptide bestehen aus durchschnittlich 9 bis 14 Aminosäuren (Burkhart et al. 2012, Vandermarliere et al. 2013).

Speziell bei der *shot-gun* Methode mit anschließender Quantifizierung ist sicher zu stellen, dass die Proteine effektiv und reproduzierbar enzymatisch gespalten werden. Zur Qua-

litätskontrolle der Reaktionseffizienz erfolgte eine Separation der generierten Peptide und der nicht gespaltenen Proteine mittels Monolithen und anschließende UV-Detektion (214 nm). Dies ermöglichte die Auftrennung von Proteinen und Peptiden in einem Lauf (Burkhart et al. 2012, Abschnitt 2.3.3). Um eine vollständige Aufspaltung zu erreichen, sind die Versuchsbedingungen für jede Probe zu optimieren. In dieser Arbeit wurde die Auswirkung des Enzym-zu-Substratverhältnisses, die Zugabe von enzymatischen Cofaktoren, die Inkubation mit Detergenzien zur besseren Substratverfügbarkeit (z. B. RapiGest™ (Waters)), die Zugabe des Reduktionsmittels Dithioerythritol (DTT) und des Alkylierungsreagenz Iodacetamid (IAA) sowie die Inkubationsdauer der enzymatischen Spaltung untersucht.

Nach der enzymatischen Spaltung ist das Ergebnis der MS Analyse ein *peptid mass fingerprint* (PMF, "Fingerabdruck" der Peptidmassen). Dieser setzt sich sequenzabhängig aus den spezifischen Peptidmassen zusammen. Die Auswertung muss bioinformatisch erfolgen (Abschnitt 2.3.5), da das MS eine sehr hohe Zahl an Spektren generiert, was eine manuelle Auswertung unmöglich macht.

Für eine eindeutige Proteinidentifizierung reichen massenspektrometrisch generierte PMFs meist nicht aus. Das liegt zum einen an gleichen Peptidmassen verschiedener Proteine und zum anderen liegen die Proteine bei der Analyse meist nicht in reiner Form vor. Daher werden die tryptischen Peptide durch MS/MS (auch tandem MS) weiter fragmentiert. Dabei werden Peptidmassen innerhalb des PMFs selektiert. Diese werden Vorläufer-Ionen (*precursor ions*) genannt, und anschließend zu Produkt-Ionen (*product ions*) fragmentiert.

Für die Fragmentierung wird Energie auf den Analyten übertragen. Die Energieübertragung kann auf verschiedenen Wegen erfolgen und variiert in ihrer Intensität. Häufig werden in die Analysatoren neutrale kleine Teilchen (Edelgase wie z. B. Helium) eingeleitet, um mit den Ionen zu kollidieren. Durch die energetischen Stöße fragmentieren die Vorläufer-Ionen (kollisionsinduzierte Dissoziation). Die entstehenden Produkt-Ionen können in einer IT, nach erneuter Selektion, weiter fragmentiert werden und bis zu maximal zehn MS-Zyklen durchlaufen (MSⁿ). Weiterhin können Vorläufer-Ionen bereits in der Ionenquelle fragmentieren, was als *in source decay* (ISD, Zerfall in der Quelle) bezeichnet wird. Bei der MALDI wird durch die vom

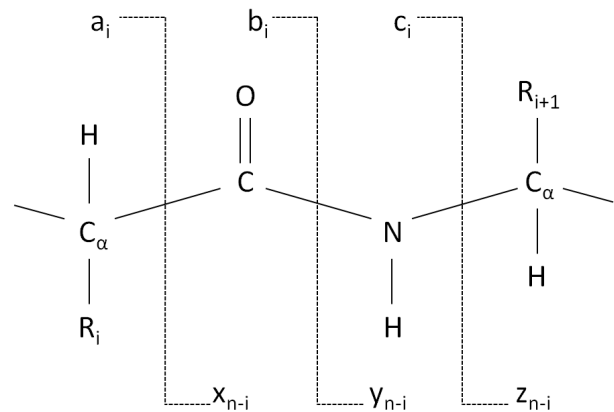


Abb. 2.3.: Formen der Fragmentierung eines Vorläufer-Ions (Eidhammer et al. 2007).

Laser erzeugte Matrixwolke viel Energie auf die Analyten übertragen. Während anschließender Beschleunigung im elektrischen Feld können daher weitere Fragmentierungen hervorgerufen werden, auch bekannt als *post source decay* (PSD, Zerfall nach der Quelle). Anschließend erfahren die entstehenden Produkt-Ionen im elektrischen Feld die gleiche Beschleunigung wie ihr Vorläufer-Ion. Daher lassen sie sich im linearen TOF Analysator nicht detektieren. Der Einbau von Reflektoren für die Richtungsumkehr der Ionen separiert die Fragmente, da die Produkt-Ionen, durch die geringere Masse, eine geringere kinetische Energie aufweisen (Lottspeich and Engels 2012). Es wurden weitere Fragmentierungsmethoden entwickelt (Guthals and Bandeira 2012), welche in dieser Arbeit nicht angewendet wurden.

Peptide fragmentieren hauptsächlich im Bereich der Peptidbindung (Abb. 2.3). Je nachdem an welcher Stelle innerhalb einer Peptidbindung das Vorläufer-Ion fragmentiert, entstehen a- und x-Ionen, b- und y-Ionen oder c- und z-Ionen. Bei MALDI entstehen hauptsächlich b- und y-Ionen. Ein vollständiges Fragmentmassenspektrum entsteht, wenn die Vorläufer-Ionen an jeder Peptidbindung einmal fragmentieren. Für ein Vorläufer-Ionen mit vier Aminosäuren entstehen dann b- und y-Ionen mit ein, zwei und drei Aminosäuren. Der Abstand zwischen den Fragmentmassen entspricht der Masse einer Aminosäure und die Peptidsequenz kann bestimmt werden. Die Spektren können daher auch zur *denovo* Sequenzierung verwendet werden (Eidhammer et al. 2007).

2.3.3. Protein- und Peptidseparation

Vor oder nach der enzymatischen Spaltung können Proteine bzw. Peptide separiert werden. Es werden meist nichtselektive Verfahren verwendet, die auf chemischen und physikalischen Eigenschaften der Moleküle basieren (Twyman 2004). Dafür wurden verschiedene Trennmethode entwickelt, deren Trennkapazität in Abb. 2.4 dargestellt ist. Während die 2-D Elektrophorese die höchste Trennkapazität für Proteine erreicht, erhält man mit *reversed phase* (RP, Umkehrphase) Flüssigchromatographie (LC) die höchste Trennkapazität für Peptide. Die Detektionsprinzipien des Analyten für qualitative und quantitative Auswertungen sind vielfältig und können unter anderen auf Lichtabsorption, Änderung der Leitfähigkeit, Fluoreszenz und Lichtstreuung beruhen.

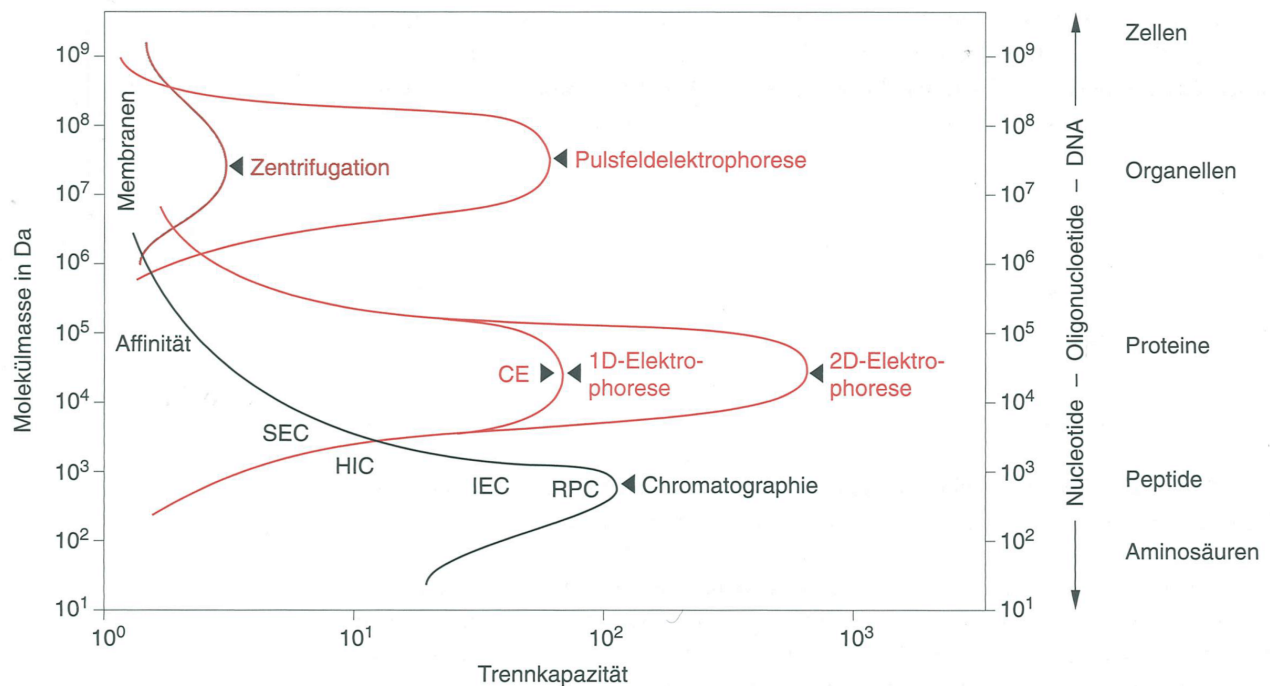


Abb. 2.4.: Spektrum der Trennmethode für Biomoleküle. Aufgeführt sind die Trennkapazität (x-Achse), die Molekülmasse der Analyten (y-Achse). Im rechten Teil der Abbildung wurden zelluläre Bestandteile der Molekülmasse zugeordnet. SEC, Größenausschlusschromatographie; HIC, Hydrophobe Interaktionschromatographie; IEC, Ionenaustauschchromatographie; RPC, *reversed phase* Chromatographie; CE, Kapillarelektrophorese (Lottspeich and Engels 2012).

Proteinseparation mittels 2-D Elektrophorese

Die Elektrophorese beschreibt die Wanderung von geladenen Teilchen im elektrischen Feld. Die Ladung und die Größe der Teilchen bestimmen deren charakteristische Transportgeschwindigkeit in einem Trennmedium. Der Beschleunigung der Teilchen im elektrischen Feld wirkt die Reibungskraft entgegen. Es können bei der Elektrophorese drei Verfahren unterschieden werden: 1) Zonelektrophorese in einem homogenen Puffersystem, 2) Isotachophorese in einem diskontinuierlichen Puffersystem und 3) isoelektrische Fokussierung (IEF) in einem pH-Gradienten (Lottspeich and Engels 2012).

Die 2-D Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) erstmals 1975 von Klose und O'Farrell beschrieben (Klose 1975, O'Farrell 1975). Sie ist die Methode mit der größten Trennleistung für Proteingemische, da durch die Trennung nach dem isoelektrischen Punkt (pI) und dem Molekulargewicht (MW) der Proteine eine hohe Auflösung erreicht werden kann. Dabei können bis zu 2500 Proteinvarianten separiert werden (Penque 2009).

Proteine mit gleichen Eigenschaften sammeln sich am gleichen Koordinatenpunkt im 2-D Gel (Spot). Die Gesamtheit aller Spots ergibt eine Gelkarte. Die Ausrichtung nach pI und

MW kann basierend auf der Primärsequenz der Proteine theoretisch berechnet werden. Im Auftrennungsbereich einer Standard 2-D PAGE (pH 3-11 und 15 bis 200 kDa) sollten sich 76% aller bekannten Proteine (gelistete Sequenzen in der Wissensdatenbank für umfassende Proteinressourcen (UniProt KB, Abschnitt 2.3.5) von *Canis familiaris* befinden (Abb. 2.5). Proteinmodifikationen können dazu führen, dass sich Proteinvarianten einer Proteinfamilie in verschiedenen Spots auf der Gelkarte sammeln. Die Trenneigenschaften der Proteine können durch posttranslationalen Modifikationen (PTM), wie alternatives *Splicing*, Proteinfragmentierungen oder Aminosäuremodifikationen (Oxidationen, Phosphorylierungen), verändert werden. Für die Steigerung der Auflösung und der Reproduzierbarkeit wurden immobilisierte pH-Gradienten (IPG) (Bjellqvist et al. 1982) sowie horizontale Gelsysteme mit standardisierten Gelen auf Trägerfolien (HPETM (Serva), Moche et al. 2013) eingesetzt. Des Weiteren wurde für die Gelauswertung quantitativer Ansätze komplexe Software entwickelt, mit deren Hilfe unbegrenzt (in Abhängigkeit der Rechnerleistung) Gele verknüpft werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde die Delta2DTM-Software (Decodon) für die quantitative Auswertung verwendet.

Peptidseparation mittels RP-LC

Das Grundprinzip bei der LC ist die Auftrennung eines in einer mobilen Phase gelösten Substanzgemisches über dessen Interaktionen mit einer stationären Phase. Diese Interaktion ist entsprechend der physikochemischen Eigenschaften der Analyten unterschiedlich stark. Daher eluieren die Analyten nach spezifischen Retentionszeiten. Über Parameter wie Retentionsfaktor k , Selektivität α , Anzahl theoretischer Trennböden N und Auflösung R wird das Adsorptionsverhalten mit der stationären Phase definiert (Lottspeich and Engels 2012). Die stationäre Phase kann in Form gepackter Partikel oder als poröser Festkörper (Monolith) vorliegen. Die monolithische Form der stationären Phase ermöglicht eine 5-10 fach höhere Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase, da das Material einen höheren Säulengegendruck ausgesetzt werden kann (Cabrera 2004). Mit Hilfe der van Deemter-Gleichung kann die Trennleistung einer chromatographischen Säule physikalisch beschrieben werden. Sie definiert sich über die theoretische Trennbodenhöhe H , welche sowohl durch die Fließgeschwindigkeit als auch durch Diffusionsprozesse beeinflusst wird. Je niedriger H , desto höher ist die Trennleistung der Säule (van Deemter et al. 1956).

Durch die Miniaturisierung von LC-Systemen konnte die chromatographischen Trennleistung verbessert werden. Neben Pumpen, welche Flussraten im Nanoliter-Maßstab erzeugen und unter sehr hohem Druck (bis zu 1000 bar) arbeiten, wurden Mischkammern, Detektoren und entsprechende Flusszellen entwickelt. Parallel wurden die Partikeldurchmesser verringert (1,7

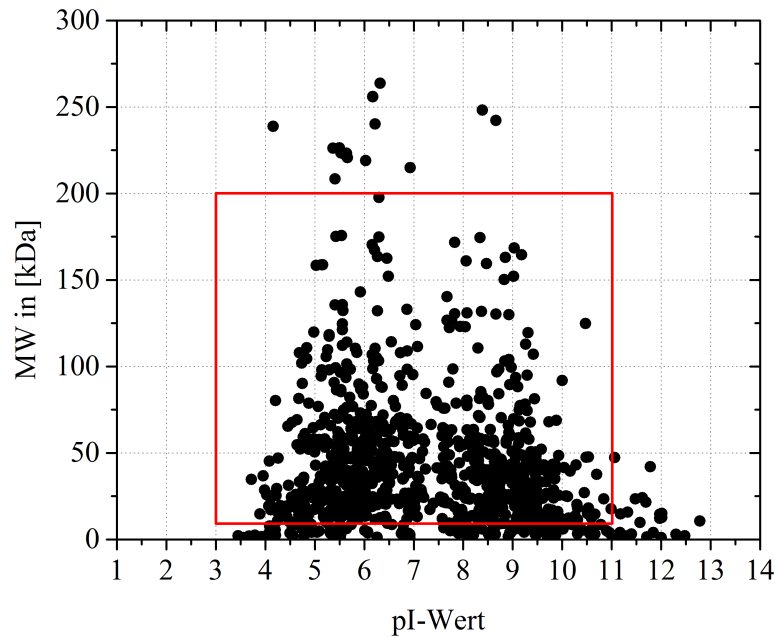


Abb. 2.5.: Theoretischen Auftrennung von Proteinen der Art *Canis familiaris* nach **pI** und **MW**. Der rote Rahmen hebt den Bereich der Proteinauftrennung 2D-PAGE hervor und entspricht 76% aller Datenpunkte. Die Primärsequenzen für die 1088 Datenpunkte wurden von der Uniprot KB extrahiert (Stand: 29.07.2014, Consortium 2014). Es wurden nur Sequenzen von geprüften Datenbankeinträgen verwendet. Zur Berechnung wurden die Daten mit Hilfe des *Compute pI/MW tool* von ExPASy prozessiert (Bjellqvist et al. 1993). (Mit den Datenpunkten werden keine Intensitäten dargestellt.)

- 5 μm), die Packungsdichte der stationären Phase erhöht und der Säuleninnendurchmesser (25 - 100 μm) der Trennsäulen verkleinert. Dadurch konnten verkürzte Retentionszeiten, intensivere Signale mit niedrigeren Peakhalbwertsbreiten und Separation unter stark erhöhten Druckbedingungen erreicht werden (Mitulovic and Mechtler 2006). Die Kombination dieser Hochleistungs-LC (HPLC) im Nanoliter-Maßstab mit der MS ermöglicht die Detektion von Proteinen und Peptiden im Femtomol- bis Attomol-Bereich (Wilm et al. 1996).

Für die Auftrennung von Peptiden findet häufig die RP-LC Anwendung. Dabei wird für die Retardierung des Analyten dessen hydrophobe Wechselwirkung mit Kohlenwasserstoffketten der stationäre Phase genutzt. Die polaren Gruppen der Analyten werden durch Zugabe eines Ionenpaarreagenzes (z.B. Trifluoressigsäure, TFA) maskiert und ihre Hydrophobizität gesteigert. Für die Auftrennung werden die Analyten im wässrigen Milieu auf die stationäre Phase geladen. Anschließend erfolgt die Elution durch einen binären Gradienten mit Hilfe des steigenden Anteils eines organischen Lösungsmittels (z.B. Acetonitril). Eine Kombination der LC mit einem UV-Detektor bei 214 nm (Detektion der Peptidbindungen) oder 280 nm (Detektion aromatischer Seitenketten) ermöglicht die Detektion eluierender Peptide. Die bei der RP-LC

verwendeten Lösungsmittel ermöglichen eine direkte Kopplung mit ESI für die MS Analytik (Fenn et al. 1989).

2.3.4. Relative Proteinquantifizierung

In der Proteomics kann die Quantifizierung auf der Ebene der Proteine und auf der Ebene ihrer Peptide erfolgen. Heutige Methoden erlauben die Quantifizierung über einen dynamischen Bereich von fünf Größenordnungen (Ishihama et al. 2005, Burkhardt et al. 2012). Beide Quantifizierungen setzen die Separation der Proteine oder Peptide voraus.

Die Kombination der 2-D PAGE mit drei fluoreszierenden Cyanin-Farbstoffen (Cy2/ Cy3/ Cy5 von GE Healthcare, G100/ G200/ G300 von NH-Dyeagnostics), die kovalent die Aminosäure Lysin binden, ermöglichte einen sensitiven und reproduzierbaren Vergleich mehrerer Proben in einem Ansatz (Unlü et al. 1997). Die Methode wird als 2-D differenzielle Gelelektrophorese (DIGE) bezeichnet und ermöglicht *multiplexing* von bis zu drei Proben. Der dritte Farbstoff wird meist für den Referenzstandard verwendet, um die Vergleichbarkeit innerhalb mehrerer Gele zu erreichen. Der Referenzstandard ist ein Gemisch aller Proben eines Vergleiches. Das Detektionslimit der Farbstoffe ist unter 1 ng und damit sensitiver als Silber-Färbungen die bei 1 ng liegt (Marouga et al. 2005).

Für die Auswertung der gescannten Gelbilder wird komplexe Software verwendet (z. B. Delta2D, von Decodon), welche sowohl die Spotdetektion als auch die relative Quantifizierung mit statistischer Auswertung durchführt. Die Quantifizierungsstrategie basiert auf dem Unterschied zweier Proben in der relativen Proteinkonzentration, normalisiert über den Referenzstandard, ohne die zugrundeliegenden Proteine zu identifizieren. Mit Hilfe der MS werden die Proteine erst nach in-Gel tryptischer Spaltung identifiziert. Komigration von Proteinen in einem Spot verursacht eine Unschärfe in der 2-D DIGE Quantifizierung (Yang et al. 2007). Für 70% der detektierten Proteinspots einer 2-D Gelelektrophorese eines HeLA Zellysates konnte jedoch ein dominantes Protein (relative Quantität $\geq 70\%$) detektiert werden (Thiede et al. 2013).

Die MS (Abschnitt 2.3.2) ermöglicht die Detektion von Peptiden in komplexen Gemischen, ist jedoch per Definition nicht quantitativ. Das detektierte Signal ist nicht allein von der Konzentration, sondern zusätzlich von den physikochemischen Eigenschaften der Analyten, insbesondere von deren Ionisierbarkeit, abhängig. Durch den Einsatz stabiler Isotope und deren Variation (^{13}C , ^{15}N und ^{18}O) können massenspektrometrisch relative Quantifizierungen durchgeführt werden. Die Markierung mit stabilen Isotopen hat keinen Einfluss auf die chromatographische Trennung und identische Peptide mit verschiedener Markierung (verschiedenen Isotopenmassen) eluieren zur gleichen Zeit (Becker 2008). Durch die Massendifferenz der Isotope können verschieden markierte Proben miteinander verglichen werden. Das Verfahren erlaubt *multiple-*

ring von bis zu acht Proben und minimiert dadurch den Messaufwand (Christoforou and Lilley 2012). Entscheidende Nachteile sind die Zunahme der Probenkomplexität und hohe Kosten für die Reagenzien.

Die Quantifizierung komplexer Peptidgemische mittels Flüssigchromatographie gekoppelt an die MS (LC-MS) kann auch *label free* (LF, ohne Markierung) erfolgen. Einen näherungsweisen Überblick über die quantitative Verteilung eines Proteingemisches wird mit dem Verfahren *spectral counting* (Spektrenzählung) erzielt. Unter Berücksichtigung der Anzahl detektierbarer Peptide eines Proteins (emPAI-Index, Ishihama et al. 2005) oder der bekannten Proteinlänge (NSAF-Index, Paoletti et al. 2006) wird im SC Verfahren quantifiziert. Eine weitere relative Quantifizierungsmethode der MS ist die *accurate mass and time tag* (genaue Masse zur spezifischen Zeit). Die LC-MS Messung beschreibt detektierte Peptide dreidimensional nach ihrem $\frac{m}{z}$ -Wert mit der dazugehörigen Isotopenverteilung, nach ihrer Retentionszeit und nach der Signalintensität. Spezielle Software (z.B. Progenesis, Nonlinear Dynamics) wird dazu verwendet, die 3-D *features* (Eigenschaften) zu erkennen und die gemeinsame Analyse unabhängiger LC-MS Messungen zu ermöglichen (Abb. 2.6). Da die LF Quantifizierung auf dem relativen Vergleich identischer Signale in unabhängigen Messungen beruht, spielt die Reproduzierbarkeit der Massengenauigkeit, der Retentionszeit und der Sensitivität der Analyse eine entscheidende Rolle.

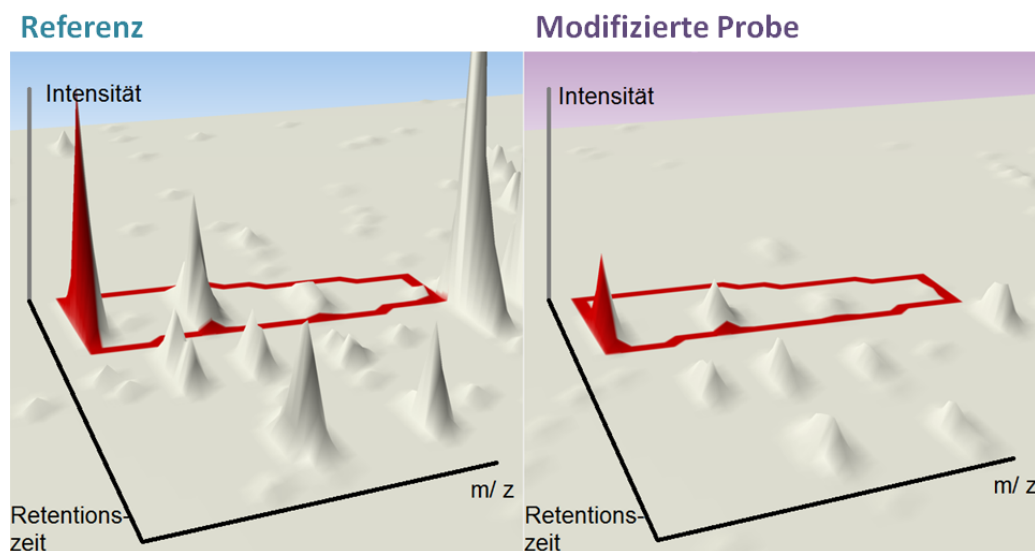


Abb. 2.6.: Prinzip der LF-Quantifizierung basierend auf dem Vergleich von 3-D Eigenschaften. Auszug aus der Software Progenesis (Nonlinear Dynamics). Die Informationen $\frac{m}{z}$ -Wert, Intensität und Retentionszeit werden in einem LC-MS-Lauf aufgenommen und bilden die Grundlage für die relative Quantifizierung.

2.3.5. Bioinformatische Datenauswertung

Aktuelle biologische Analyseverfahren, wie z. B. Proteomics und Transcriptomics, erzeugen große Datenmengen mit hoher Komplexität, so dass die manuelle durch die bioinformatische Datenauswertung abgelöst werden musste. Damit wurde die Informatik zum festen Bestandteil biologischer Forschung. Mit Hilfe von Software wird Wissen über biologische Systeme generiert und neue Zusammenhänge werden erschlossen. Darüber hinaus erleichterten sie die Prozessierung der Rohdaten (z. B. Datennormalisierung), das Zusammenführen der Daten, die Überprüfung der Signifikanz der Analysen und die graphische Darstellung der Ergebnisse. Bioinformatische Hilfsmittel unterstützen in dieser Arbeit die Identifizierung und Quantifizierung der Proteine.

Die experimentell bestimmten Molekülmassen der Vorläufer-Ionen und Produkt-Ionen (Abschnitt 2.3.2) werden mit den theoretisch errechneten Massen durch *in silico* (lat., im Computer ablaufend) Spaltung von Proteineinträgen einer Datenbank verglichen. Die Qualität der Identifizierung hängt hauptsächlich von der Auflösung der Spektren (abhängig vom Massenspektrometer und der Probenkomplexität), den Einträgen in der Datenbank und der verwendeten Suchalgorithmen ab.

Proteinsequenzdatenbanken

Die Wahl der Datenbank ist für die Proteinidentifizierung entscheidend. Wenn zu wenige Proteineinträge in einer Datenbank existieren, können nicht alle Proteine identifiziert werden. Wenn zu viele Proteineinträge in einer Datenbank sind, kann es zu falsch-positiven Identifizierungen kommen. Beides mindert die Qualität des Suchergebnisses. Die am meisten verwendeten Proteinsequenzdatenbanken sind die UniProt KB, die redundanzfreie Datenbank des nationalen Informationszentrums für Biotechnologie (NCBIInr) und die Datenbank des Internationalen Proteinindex (IPI) (Eidhammer et al. 2007). Die Datenbanken UniProtKB und NCBIInr wurden in dieser Arbeit verwendet.

Die UniProt KB setzt sich aus folgenden Datenbanken zusammen (Mulder et al. 2008):

- PIR: 1984; älteste, geprüfte Proteinsequenzdatenbank; *Protein Information Resource*
- Swiss-Prot: 1986; geprüfte Proteinsequenzdatenbank
- TrEMBL: 1996; Übersetzung der Nucleotidsequenzdatenbank der *European Molecular Biology Laboratories* (EMBL) mit dem Ziel neue Sequenzen schnell verfügbar zu machen; nicht manuell geprüft

Die geprüften Proteinsequenzdatenbanken wurden durch manuelle Kontrollen erzeugt. Ihre Einträge sind mit einem hohen Arbeitsaufwand verbunden. Die Forschung erzeugt hingegen

fortwährend neue Sequenzdaten. Mit Hilfe der TrEMBL Einträge werden neue Sequenzen schneller verfügbar. Die meisten Proteineinträge der Art *Canis familiaris*, welche für die Identifizierung von MDCK Zellproteinen relevant sind, wurden in den letzten Jahren über die TrEMBL-Datenbank bei UniProt KB ein gepflegt (z. B. 96% Stand: 2013/11). Ende 2010 und Mitte 2011 wurden große Datenmengen der TrEMBL-Datenbank über die UniProt KB verfügbar.

Die Proteineinträge erhalten den Namen *uncharacterized protein* (nicht charakterisiertes Protein), wenn die Existenz der Proteine bisher nur durch Orthologe nahverwandter Arten nachgewiesen werden konnte oder außer den Gensequenzdaten keine experimentellen Belege für das Protein existieren (*predicted*, vorhergesagt). Für den größten Anteil der Einträge für *Canis familiaris* gibt es keine zusätzlichen Belege (Tab. 2.4). Die Verbindung zwischen der Gensequenz und dem Protein wird mit Hilfe bioinformatischer Annotation durchgeführt. Die Vorgehensweise für *Canis familiaris* ist im Bericht *Ensembl gene annotation project (e!68) Canis lupus familiaris (dog, CanFam3.1 assembly)* (Ensembl 2012) zusammengefasst.

Tab. 2.4.: UniProt KB Datenbankeinträge für *Canis familiaris* und ihre Nachweisebene. Datenbanksuche vom 30.01.2014.

Nachweisebene	Protein	Transkript	Orthologe	Vorausbestimmt
Swiss-Prot	214	453	138	2
TrEMBL	78	1266	5345	20883

Die NCBI nr Datenbank bezieht sich nur auf Sequenzdaten (Wheeler et al. 2006) und enthält keine zusätzlichen Annotationen. Der manuelle Aufwand wird minimal gehalten und neue Sequenzen sind schnell verfügbar. Die Datenbank enthält auf Grund der fehlenden Kontrolle der Einträge Redundanzen und es können keine zusätzlichen Proteininformationen entnommen werden.

Suchalgorithmen für die Identifizierung der Spektren

Suchalgorithmen, die auf Datenbanken zugreifen, müssen verschiedene Aufgaben erfüllen:

- Generierung theoretischer Massen unter Einbezug von Suchkriterien (z. B. Proteinmodifikationen) und Addition vom Wasserstoffmolekül am N-Terminus (+1 Da) und der Hydroxygruppe am C-Terminus (+17 Da) von der Peptidsequenz
- Vergleich von theoretischen Massen mit den experimentellen Daten
- Test auf Signifikanz

Die Suchkriterien, wie Art der enzymatischen Spaltung, Ionenladungen, Proteinmodifikationen, fehlende Spaltstellen und die Massentoleranz, werden vom Nutzer festgelegt. Je mehr Möglichkeiten angegeben werden, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, falsch-positive Identifizierungen zu erhalten.

Es gibt verschiedene Suchalgorithmen, von denen die folgenden in dieser Arbeit verwendet wurden: die kommerziell erhältliche Suchmaschine Mascot (Perkins et al. 1999) und die frei verfügbaren (*open source*) Suchmaschinen OMSSA (Geer et al. 2004) und X!Tandem (Fenyö and Beavis 2003). Berechnungen zur Bewertung (*score*) der Treffer der Suchalgorithmen (PSM, *peptide to spectrum matches*) repräsentieren die Qualität der Identifizierung. Die drei Suchmaschinen verwenden verschiedene Bewertungsrechnungen. Eine Kombination von Suchalgorithmen kann die Anzahl an PSMs steigern und zu verbesserten Ergebnissen führen. Mit Hilfe der Software SearchGUI können z. B. die Suchmaschinen OMSSA und X!tandem kombiniert werden (Vaudel et al. 2011).

Datenanalyse

Datenbanksuchen bergen das Risiko einer falsch-positiven oder falsch-negativen PSM. Bioinformatische Werkzeuge implementieren daher statistische Einschätzungen für das Auftreten dieser falschen Zuordnung (Nesvizhskii 2010). Es wurde unter anderem die Falsch-Positiv-Rate (FDR) entwickelt (Elias et al. 2005). Dafür wird neben der normalen Peptidsuche auch eine Suche des Datensatzes gegen rückwärts gelesene oder randomisierte Proteinsequenzdaten

(decoy) durchgeführt. Die Anzahl an decoy-PSM wird als Maß für zufällige Treffer der normalen Peptidsuche verwendet.

Quantitative Auswertung

Die gelbasierte Proteinquantifizierung mittels 2-D DIGE (Abschnitt 2.3.4) wurde mit der Software Delta2DTM (Decodon) analysiert. Eine Übersicht zur derzeit verfügbaren Gelauswertesoftware wurde von Berth et al. (2007) veröffentlicht. Die Software Delta2DTM zeichnet sich durch folgende Besonderheiten aus:

- *Warping*: Übereinanderlegen der Gelbilder durch das Setzen von Verbindungsvektoren (Verbindung gleicher Spots auf zwei Gelen) für den Ausgleich von Laufunterschieden bei der 2-D PAGE.
- *Consensus Spotmuster*: Proteinspoterkennung auf einem künstlichen Gelbild, das durch Fusion aller Gele erzeugt wird.
- *100% Spot Matching*: Generiert für jeden Spot im Consensus Spotmuster ein komplettes Expressionsprofil was eine vollständige Rechengrundlage bildet.
- *Multivariate Datenauswertung*: Implementierung des frei verfügbaren MultiExperiment Viewer (MeV) für die statistische Datenauswertung.

Die gelfreie LF Quantifizierung über die Peptide (Abschnitt 2.3.4) wurde durch die Software Progenesis (Nonlinear Dynamics) ausgeführt. Die Software zeichnet sich durch folgende Besonderheiten aus:

- Quantifizierung alle Peaks der ionisierten Peptide basierend auf ihrer Signalintensität im Massenspektrometer
- Quantifizierung der Proteine basierend auf spezifischen Peptiden

Beide Softwares sind kommerziell erhältlich und haben sich für die Forschung bewährt (Dautel et al. 2011, Trinh et al. 2013).

Proteinfunktion im zellulären Netzwerk

Die Proteomanalyse generiert eine Liste an differenziell exprimierten Proteinen, die einen Ausgangspunkt für weitere Studien darstellt. Bioinformatische Programme helfen bei der Visualisierung von Proteinen in funktionalen Netzwerken (z. B. BioCyc Caspi et al. 2014, KEGG Du et al. 2014, STRING Szklarczyk et al. 2011). Die gewonnenen Erkenntnisse aus dieser Datenprozessierung sind nur so gut wie die Qualität ihrer Datenbankeinträge. Im Falle des MDCK Zellproteoms und des Vero Zellproteoms existieren weder vollständige DNA-Sequenzdaten noch umfangreiche Proteomstudien. Daher erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Proteinidentifizierung über nahverwandte Arten wie *Canis familiaris* für MDCK Zellen und *Macaca mulatta* für Vero Zellen. Weiterhin wurden homologe Proteinsequenzen menschlichen Ursprungs für die Proteinfunktionsanalyse als auch die Netzwerkanalyse (z. B. Reaktome Croft et al. 2014) herangezogen. Die Übereinstimmung homologer Sequenzen wurde mit Hilfe des *basic local alignment search tool* (BLAST) Algorithmus ermöglicht (Altschul et al. 1997).

3. Material und Methoden

Zur Untersuchung des Einflusses der Zelllinienadaption auf die Impfstoffproduktion wurden zwei Zelllinien betrachtet:

1. MDCK Zellen für die Replikation von Influenzaviren und ihre Adaption an CDM und Suspensionswachstum zur Charakterisierung von:
 - Proteomveränderungen während der zellulären Adaption an CDM und Suspensionswachstum (Kluge et al. 2015)
 - Unterschiede des Proteoms zwischen der adhärennten Zelllinie und ihrer verwandten Suspensionszelllinie
 - Proteomveränderungen während der Virusinfektion
2. Vero Zellen für die Replikation von Tollwutviren und ihre Adaption an proteinfreies Medium (Kluge et al. 2013) zur Charakterisierung von:
 - Medienbedingten Proteomveränderungen während der Virusproduktionsphase
 - Proteomveränderungen während der Virusinfektion

Im Rahmen der Untersuchungen wurden die Proteome von Zellkulturen zur Influenza- und Tollwutimpfstoffproduktion auf verschiedenen Ebenen verglichen. Die Kooperationen mit den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Klaus Scharfenberg (Fachhochschule Emden/Leer, Fachbereich Technik, Emden, Deutschland), Frau Prof. Ph.D. Hela Kallel (Institut Pasteur, *Viral Vaccine Research and Development Unit*, Tunis, Tunesien) und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Albert Sickmann (Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften - ISAS - e.V., Arbeitsgruppe Systemanalyse, Dortmund, Deutschland) unterstützten die durchgeführten Untersuchungen. Die Beiträge der externen Kooperationspartner zu den Versuchen werden an den entsprechenden Stellen im Text genannt.

3.1. Geräte, Materialien und Chemikalien

Die vollständigen Listen aller verwendeten Anlagen und Geräte (Anhang D), Software (Anhang E), Materialien (Anhang F) und Chemikalien (Anhang G) sowie eine Auflistung der

Zusammensetzung verwendeter Standardpuffer (Anhang H) sind im Anhang zu finden. Für die Herstellung wässriger (aq) Lösungen wurde deionisiertes, ultrareines Wasser verwendet, das aus einem Reinstwassersystem entnommen wurde. Die Raumtemperatur (RT) betrug konstant 21 °C. Die Probenlagerung aller im Rahmen dieser Arbeit generierten Proben erfolgte bei -80 °C.

3.2. Zellkulturtechnik

Der zellkulturbasierte Impfstoffproduktionsprozess ist in eine Wachstums- und eine Infektionsphase unterteilt. Zur Verbesserung dieses Prozesses wurden MDCK Zellen an Suspensionswachstum in CDM und Vero Zellen an ein Medium frei von tierischen Produkten adaptiert. Der Einfluss dieser modifizierten Prozessbedingungen auf das zelluläre Proteom wurde, wenn nicht anders beschrieben, in drei unabhängigen biologischen Replikaten analysiert. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Im Folgenden werden die Versuchsbedingungen zur Analyse der Proteome aufgeführt und näher beschrieben.

3.2.1. Zelllinien und Virusstämme

Die adhärent wachsende MDCK Zelllinie (MDCK_{ADH}, *European Collection of Cell Cultures* (ECACC), Nummer: 84121903) wurde in Kryogefäßen bei -135 °C in der Gasphase eines Flüssigstickstofftanks gelagert. Die Passagierung der Zelllinie, bis maximal Passage 20, erfolgte in der Abteilung der Bioprozesstechnik (BPT) des Max-Planck-Institutes nach Arbeitsanweisung (SOP, Anhang I) durchgeführt. Die nach Adaption an das Wachstum in Suspension hervorgegangene MDCK Suspensionzelllinie (MDCK_{SUS}) wurde von Herrn Prof. Scharfenberg (Fachhochschule Emden/Leer, Fachbereich Technik, Emden, Deutschland) zur Verfügung gestellt (Lohr et al. 2010) und für die Versuche maximal bis Passage 50 kultiviert (Anhang I).

Die adhärent wachsende Vero Zelllinie (Vero_{SCM/SFM}, *American Type Culture Collection* (ATCC), Nummer: CCL-81, Passage 121) wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Kallel (Institut Pasteur, *Viral Vaccine Research and Development Unit*, Tunis, Tunesien) kultiviert und über mehrere Passagen an das Wachstum in Medium frei von tierischen Produkten adaptiert. Aus dieser Adaption ging die Vero_{IPT-AFM} Zelllinie hervor (Rourou et al. 2007, 2009a, 2009b).

Das Virus Influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) wurde vom Robert-Koch-Institut (RKI, Berlin) bestellt. Der Virusgehalt und die Infektiosität wurden mittels Hämagglutinations Assay (HA-Assay) (Abschnitt 3.3.3) und *tissue culture infectious dose 50* (TCID₅₀) (Abschnitt 3.3.4) bestimmt. Die Herstellung des Saatvirus erfolgte in der Abteilung BPT in MDCK Zellen nach SOP (Anhang I) und zeigte eine Infektiosität von 5×10^8 aktive Viruspartikel je mL (TCID₅₀). Den Tollwutvirus stellte das Institut Pasteur (Paris, Frankreich) bereit. Es handelte sich um

den, an Vero Zellen adaptierten, humanen Louis Pasteur 2061 attenuierten Virusstamm. Die Infektiösität des Tollwutvirus wurde mit dem *Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test* (RFFIT) bestimmt (Abschnitt 3.3.4). Das verwendete Saatvirus zeigte eine Infektiösität von 5×10^7 *Fluorescent Focus Units* je mL (FFU/mL).

3.2.2. Kultivierungssysteme, Medien und Zellanzucht

Für die Zellkultivierung, Virusreplikation und Zelladaption kamen verschiedene Medien zum Einsatz, die in Tabelle 3.1 aufgeführt sind. In Abhängigkeit vom Ziel des Versuches, von der Versuchsdurchführung und von den Probenahmen wurden verschiedene statische und dynamische Kultivierungssysteme genutzt (Tab. 3.2). Alle Kultivierungen erfolgten bei 37°C und einer CO_2 -Sättigung von 5% im Brutschrank (Ausnahme sind Bioreaktorkultivierungen).

Für die Durchführung eines biologischen Replikates wurde immer eine Vorkultur verwendet. Angepasst an den Kulturmaßstab wurden die Vorkulturen der MDCK_{ADH} Zellen in T-Flasche mit 175 cm^2 (T175-Flaschen) für einzelne Spinnerflaschen und in Rollerflaschen 850 cm^2 (RF850) für parallele Spinnerflaschen (z. B. Virus- und Scheininfection) und Bioreaktoren angezogen. Bei MDCK_{SUS} Zellen bestand nach der Anzucht in T175-Flaschen (für Suspensionszellen, T175_{SUS}-Flaschen) die Schwierigkeit, die Zellen aus einem statischen in ein dynamisches System zu überführen. Daher wurden die Zellen nach dem Transfer aus den T175-Flaschen in Spinnerflaschen oder in Schüttelkolben über drei bis fünf Passagen an die neue Bedingung adaptiert, bis sie stabiles Wachstum zeigten. Die Vitalität der Zellen betrug in allen Vorkulturen $\geq 80\%$.

3.2.3. Adaption der adhärennten MDCK Zelllinie an Suspensionswachstum in chemisch definiertem Medium

Die MDCK_{ADH} Zelllinie wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Klaus Scharfenberg (Fachhochschule Emden/Leer, Fachbereich Technik, Emden, Deutschland) an Suspensionswachstum und CDM adaptiert (Lohr et al. 2010). Zunächst erfolgte die Anpassung der Zelllinie an die Kultivierung in SMIF8 Medium mit 5% FCS (SMIF8+S) innerhalb von drei Passagen, anschließend begann der Adaptionprozess (Abb. 3.1). Die Adaption wurde, abhängig von den Probenahmen, in vier Stadien untergliedert (Tab. 3.3).

Der Adaptionstart mit der an SMIF8+S adaptierten MDCK_{ADH} Zellkultur erfolgte in T175-Flaschen bei 15% CO_2 -Atmosphäre (Stadium AC). Im ersten Adaptionsschritt wurde innerhalb von zwei bis drei Wochen mindestens $\frac{4}{5}$ des verbrauchten Mediums mit frischem, vorgewärmtem SMIF8 Medium ersetzt (Stadium CL). In Folge der Serumreduktion begannen die Zellen sich von der Oberfläche abzulösen (Stadium DC). In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat.

Tab. 3.1.: Verwendete Medien für die Kultivierung von MDCK und Vero Zelllinien.

Zelllinie	Medium	Prozessschritt	Medienzusammensetzung und -herstellung
Vero	SCM	Zellwachstum	Trabelsi et al. (2006)
	SFM	Virusreplikation	Trabelsi et al. (2006)
	IPT-AFM	Zellwachstum und Virusreplikation	Rourou et al. (2009a, 2009b)
MDCK _{ADH}	Z-Medium	Zellwachstum	Anhang I, Zugabe von Serum ¹
	V-Medium	Virusreplikation	siehe Z-Medium, ohne Zugabe von Serum
	SMIF8 ² +S	Zelladaption	siehe SMIF8, Zugabe von Serum ¹
MDCK _{SUS}	SMIF8 ²	Zellwachstum und Virusreplikation	Anhang I

SCM – serumhaltiges Medium, SFM – serumfreies Medium, Z – Zellwachstum, V – Virusreplikation, +S – Serumzugabe.

1 – 10% (v/v) foetales Kälberserum, Gibco Invitrogen, Karlsruhe

2 – SMIF8 Medium erhältlich über Kontakt zu Prof. Dr. rer. nat. Klaus Scharfenberg (Fachhochschule Emden/Leer, Fachbereich Technik, Emden, Deutschland); enthält 10% verbrauchtes Medium der Vorpassage

Tab. 3.2.: Kultivierungssysteme. Aufgeführt sind alle Systeme, die in der vorliegenden Arbeit für die Kultivierung von MDCK und Vero Zelllinien verwendet wurden.

Bezeichnung	Kultivierungssysteme	Name, Firma
T175-Flasche	T-Flasche 175 cm ²	Cellstar [®] , Greiner Bio One
T175 _{SUS} -Flasche	T-Flasche 175 cm ²	Cellstar [®] , Greiner Bio One oder der Firma BD Biosciences für Suspensionszellen
RF850	Rollerflasche 850 cm ²	Cell Master [®] , Greiner Bio One
Schüttel- kolben	250 mL Erlenmayerkolben mit Schikanen und Entlüftungs- deckel (0,2 μm)	Corning Incorporated
Spinner _{PE}	Spinnerflaschen mit Pendel- rührer ¹	250 mL Cell Culture Vessels, Techne
Spinner _{PA}	Spinnerflaschen mit Paddel- rührer ²	250 mL Celstir, Wheaton
1L-BR	1 L Bioreaktor	Advanced Spinner 400-1200 mL, DasGip
2L-BR	2 L Bioreaktor	Discovery 100, Inceltech

1 – In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Klaus Scharfenberg (Fachhochschule Emden/Leer, Fachbereich Technik, Emden, Deutschland) wurde ein Pendelrührer verwendet. 2 – In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Reichl (Abteilung BPT, Max-Planck-Institut, Magdeburg, Deutschland) wurde ein Paddelrührer verwendet.

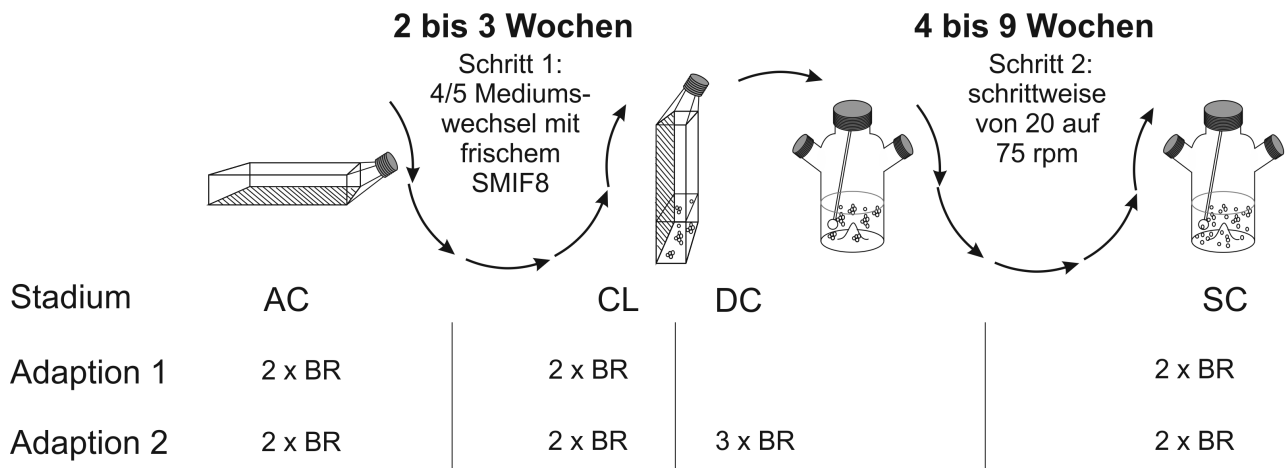


Abb. 3.1.: Schema des Adaptionsprozesses einer MDCK_{ADH} Zelllinie an Suspensionswachstum in CDM. Der Prozess untergliederte sich in vier verschiedene Stadien (Tab. 3.3). Es wurden zwei unabhängige Adaptionen, mit je zwei oder drei parallelen biologischen Replikaten (BR), durchgeführt. AC – MDCK_{ADH} Zellen adaptiert an SMIF8+S Medium, CL – MDCK_{ADH} Zellen adaptiert an SMIF8 Medium, DC – abgelösten Zellen nach Adaption an SMIF8 Medium, SC – langsam wachsende Suspensionszellen.

Klaus Scharfenberg (Fachhochschule Emden/Leer, Fachbereich Technik, Emden, Deutschland) wurden die abgelösten Zellaggregate für den zweiten Adaptionsschritt in Spinnerflaschen mit Pendelrührer (Spinner_{PE}) überführt. Die erste Suspensionskultur wurde in einem Volumen von 40 mL mit gleichen Anteilen von frischem und verbrauchtem SMIF8 Medium gehalten. Es folgten mehrere Mediumswechsel und Zellpassagierungen über vier bis neun Wochen, in denen die Zellen langsam mit dem Wachstum begannen und gleichzeitig die Rührerdrehzahl von 20 rpm auf 75 rpm erhöht wurde.

Es wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Scharfenberg (Fachhochschule Emden/Leer, Fachbereich Technik, Emden, Deutschland) zwei unabhängige, in der Durchführung identische Adaptionen mit parallelen Replikaten durchgeführt (Adaption 1 (2009) und Adaption 2 (2010)). Die Replikate, die für beide Adaptionen analysiert wurden, sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

3.2.4. Vergleich der adhärennten MDCK Zellen mit MDCK Suspensionszellen

Die Vorversuche für das Wachstum der adaptierten MDCK_{SUS} Zelllinie fanden in Spinnerflaschen mit Paddelrührer (Spinner_{PA}) statt. Die Startzellkonzentration betrug 4×10^5 Zellen/mL. Die Zellen wurden in SMIF8 Medium (10% verbrauchtes Medium der vorherigen Passage und

Tab. 3.3.: Stadien des Adaptionsprozesses einer MDCK_{ADH} Zelllinie an Suspensionswachstum in CDM. Die Unterteilung erfolgte abhängig von der Proteomprobenahme (Abschnitt 3.4.1) in 4 verschiedene Stadien.

Stadium	Kultivierungssystem	Erläuterung
AC	T175-Flasche	MDCK _{ADH} Zellen adaptiert an SMIF8+S Medium
CL	T175-Flasche	MDCK _{ADH} Zellen adaptiert an SMIF8 Medium
DC	T175-Flasche/ Spinner _{PE}	Abgelöste Zellen nach Adaption an SMIF8 Medium
SC	Spinner _{PE}	Langsam wachsende Suspensionszellen

Tab. 3.4.: Kultivierungsbedingungen im 1L-BR unter Anwendung des DasGip-Systems.

Bedingung	MDCK _{ADH}	MDCK _{SUS}
Medium	Z-Medium	SMIF8
Rührerdrehzahl (rpm)	50	75
Microcarrier (g/L)	2	–
Sauerstoffpartialdruck	≥ 40%	≥ 40%
pH-Wert	7,3	7,3
Temperatur	37 °C	37 °C

90% frisches Medium) bei 75 rpm kultiviert. Es wurden drei parallele Kulturen mit der gleichen Vorkultur angesetzt. Im Versuch wurde die Zellkonzentration (Abschnitt 3.3.1) an den Tagen 1, 3, 4 und 5 bestimmt.

Der Unterschied der Proteome zwischen MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zellen wurde für die exponentielle Wachstumsphase während Kultivierung im 1 L Bioreaktor (1L-BR) untersucht (Versuchsaufbau Abb. 3.2). Es wurde eine Startzellkonzentration von 3×10^5 Zellen/mL im 1L-BR eingestellt. Die automatisierte Prozesssteuerung des DasGip-Systems garantierte stabile Prozessbedingungen für die Kultivierung beider Zelllinien (Tab. 3.4).

Während des gesamten Versuches wurden die Temperatur, der pH-Wert und der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) im Bioreaktor *online* gemessen und alle zwei Minuten aufgezeichnet. Die Temperierung erfolgte über einen elektrischen Heizmantel. Über ein Tauchrohr wurde mit einem steril gefilterten Gasgemisch aus 20% Sauerstoff, 80% Stickstoff und 5% Kohlendioxid in einer Kaskadenregelung (1. Volumenstrom von einem bis fünf Standardliter je Stunde (sL/h), 2. Zunahme des Sauerstoffgehalts im Gasgemisch) der Sauerstoffpartialdruck auf ≥ 40% Luftsättigung eingestellt. Die konstante Zuleitung von 5% Kohlendioxid führte zu einem stabilen pH-Wert von

7,3. Die Probenahme für *offline* Messungen zur Bestimmung der Zell- und Metabolitkonzentration erfolgte über ein Tauchrohr. Das Funktionsprinzip dieses Tauchrohrs zur Probenahme entsprach einer Abwandlung des Patents von Sann et al. (2004), dass die Entnahme kleiner Probenvolumina ohne Totvolumen ermöglichte. Nach drei Tagen wurde die Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/mL (Standardabweichung $\pm 0,1 \times 10^6$) erreicht und das Probenmaterial für die Proteomanalyse entnommen (Abschnitt 3.4.1). Extrazelluläre Metaboliten wurden an Tag 1 und 3, und die Zellkonzentration zusätzlich an Tag 2 gemessen.

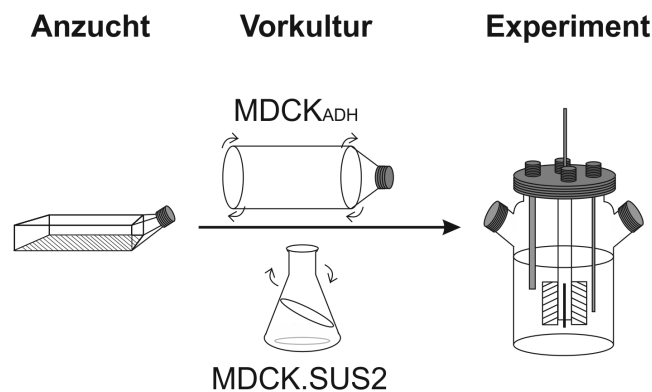


Abb. 3.2.: Versuchsaufbau für den Proteomvergleich von MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zelllinien während der Wachstumsphase. Dargestellt sind die Kulturen von der Anzucht bis zum Experiment. Die Versuchsbedingungen sind in Tab. 3.4 aufgeführt.

3.2.5. Replikation von Influenzaviren in MDCK Zellen

Die virusinduzierte Zellantwort wurde für die MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zelllinien auf der Ebene des Proteoms untersucht. Bei den Kultivierungen in Spinnern_{PA} wurden die Startzellkonzentrationen auf 4×10^5 Zellen/mL in einem Gesamtvolumen von 250 mL eingestellt. Für die Kultivierung adhärenter Zellen wurde Z-Medium, 2 g/L Microcarrier und eine Rührerdrehzahl von 50 rpm verwendet. MDCK_{SUS} Zellen wurden bei 75 rpm gerührt und in SMIF8 Medium (10% verbrauchtes Medium der vorherigen Passage und 90% frisches Medium) kultiviert. Es wurden je zwei parallele Spinnerflaschen aus der gleichen Vorkultur angesetzt und im Anschluss an die Wachstumsphase mit Erreichen einer Zellkonzentration von ca. 2×10^6 Zellen/mL mit der Infektion begonnen (ca. 100 h für MDCK_{ADH} und 70 h für MDCK_{SUS}).

Während bei der MDCK_{SUS} Zelllinie das gleiche Medium für die Wachstums- und Infektionsphase Verwendung fand, wurde für die MDCK_{ADH} Zellen zum Wachstum Z-Medium mit Serum und für die Infektion V-Medium ohne Serum verwendet. Um beide Produktionssysteme gleich zu behandeln, erfolgt bei beiden ein Mediumswechsel vor dem Infektionsstart (TOI). Die Zellen wurden dreimal mit sterilem, vorgewärmtem phosphatgepufferten Salzpuffer (PBS)

Tab. 3.5.: Durchgeführte Infektionsbedingungen im Vergleich zur Standardinfektion der MDCK Zelllinien mit Influenzaviren. Die Standardinfektion ist im Anhang I aufgeführt. In Anlehnung an Versuche von Vester et al. (2009) wurden die Infektionsversuche geplant.

Standardbedingung	Abweichung	Begründung
MOI = 0,025	MOI = 6	Ein Infektionszyklus, 100% Infektion zur TOI
Trypsinzugabe 2×10^{-6} Units/Zelle	Kein Trypsin	Vermeidung von Einflüssen auf Proteinanalytik
Inkubation im Endvolumen	Initiale Inkubation für 30 min im halben Kulturvolumen	Effiziente Infektion

MOI – Virus:Zell-Verhältnis, TOI – Infektionsstart.

gewaschen. Die bewachsenen Carrier sedimentierten innerhalb von fünf Minuten. Die Abtrennung der Suspensionszellen während der Waschschriffe erfolgte mit einem Ausschwingrotor einer großen Tischzentrifuge (150 g, 5 min, Anhang D).

Die Infektion wurde nach SOP (Anhang I) mit einer modifizierten MOI von sechs infektiösen Viren je Zelle durchgeführt. Weitere Abweichungen von der SOP sind in Tabelle 3.5 beschrieben. Die Zugabe von Influenzaviren erfolgte zusammen mit dem frischen vorgewärmten Medium. Parallel wurde ein zweiter Spinner_{PA} für die Scheininfection nur mit Medium befüllt. Auf die Zugabe von Trypsin wurde verzichtet, um Nebeneffekte auf die anschließende Proteomuntersuchungen zu vermeiden. Die initiale 30 minütige Inkubation erfolgte im halben Kulturvolumen (125 mL), um eine effiziente Infektion zu ermöglichen. Über den Versuchszeitraum (32 h nach Infektion, p.i.) wurden Proben für die Bestimmung der Zellkonzentration (Abschnitt 3.3.1; 0, 8, 12, 32 h p.i.), der Virustiter (Abschnitt 3.3.3, 3.3.4; 0, 4, 8, 12, 32 h p.i.) die Quantifizierung der viralen messenger RNA (mRNA) der Segmente 5 und 7 (Abschnitt 3.3.6; 0, 4, 6, 8, 10, 12 h p.i.), für die Durchflusszytometrie (DFZ, Abschnitt 3.3.5 und 3.4.7; 0, 8, 32 h p.i.) und für den Vergleich des zellulären Proteoms (Virus- versus Scheininfection, Abschnitt 3.4.1; 0, 8, 12, 32 h p.i.) entnommen.

3.2.6. Replikation von Tollwutviren in Vero Zellen

Die Infektion von Tollwutviren in Vero Zellen und die Probenahmen wurden von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Ph.D. Hela Kallel (Institut Pasteur, *Viral Vaccine Research and Deve-*

lopment Unit, Tunis, Tunesien) durchgeführt. Die Kultivierungsbedingungen der Vero Zellen wurden durch Rourou et al. (2007, 2009a) beschrieben. Die Kultivierung erfolgte im 2 L Bioreaktor (2L-BR) mit 1,2 L Füllstand ohne Perfusionsmodus während der Wachstumsphase (6 d) und mit Perfusionsmodus während der Infektionsphase (8 d p.i.).

Zum Versuchsstart wurde die Zellkonzentration auf $2,5 \times 10^5$ Zellen/mL, die Temperatur auf 37°C , die Rührerdrehzahl auf 30 rpm im 2L-BR eingestellt und 3 g/L Microcarrier zugegeben. Um die Zellen vor der Infektionsphase an den Perfusionsstrom zu gewöhnen, wurde einen Tag nach dem Versuchsstart die Rezirkulation des Mediums begonnen und täglich gesteigert. Während der Wachstumsphase wurde die Glucosekonzentration im Medium manuell auf 5 mM alle 24 h eingestellt.

Für die Infektionsphase der Ver_{OSCM/SFM} Zellen und der Ver_{OIPT-AFM} Zellen wurde jeweils das Medium SFM (Trabelsi et al. 2006) und IPT-AFM (Rourou et al. 2007, 2009a) verwendet. Nachdem die Zellen eine Konzentration $>4 \times 10^6$ Zellen/mL erreicht hatten (ca. 6 d) wurde die Temperatur von 37°C auf 34°C abgesenkt und die Kulturen mit einer MOI von 0,1 infiziert. Vor der Ver_{OSCM/SFM} Zellinfektion wurde ein Mediumswechsel zu SFM, inklusive eines zweimaligen Waschschrittes mit frischem Medium, durchgeführt. Zwei Stunden nach TOI begann die Perfusion mit einer Flussrate von 0,6 L/d. Die Proteomproben wurden 1, 3, 5 und 8 d p.i. entnommen (Abb. 3.3, Abschnitt 3.4.1). Bei jedem Infektionsversuch wurden zwei Bioreaktorkultivierungen, virusinfiziert und scheininfiziert, durchgeführt. Die Versuche erfolgten in zwei unabhängigen, biologischen Replikaten für die Ver_{OSCM/SFM} und die Ver_{OIPT-AFM} Zelllinie.

3.3. Prozessanalytik

Die Bestimmung der Zellkonzentrationen, der Vitalität und der extrazellulären Metaboliten gaben einen Aufschluss über das Wachstum der Zellkulturen. Die Virusproduktion nach TOI und die finalen Ausbeuten der Prozesse konnte mit verschiedenen Assays (HA-Assay, RFFIT, TCID₅₀, Abschnitte 3.3.3, 3.3.4) bestimmt werden. Für eine Influenzavirusinfektion erfolgte zusätzlich die Bestimmung der Transkription viraler mRNA.

3.3.1. Bestimmung der Zellkonzentration und Vitalität

Die Zellzählungen erfolgten automatisiert mit dem ViCell-System oder manuell mit einem Hemazytometer nach der gültigen SOP (Anhang I). MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zellen wurden, wie bei der Zellpassagierung (Anhang I), zunächst mit Trypsin_Z vereinzelt und anschließend automatisiert gezählt und die Vitalität mittels einer Trypanblau-Färbung bestimmt. Überstandszellen einer Microcarrierzellkultur wurden vor jeder automatischen Messung durch

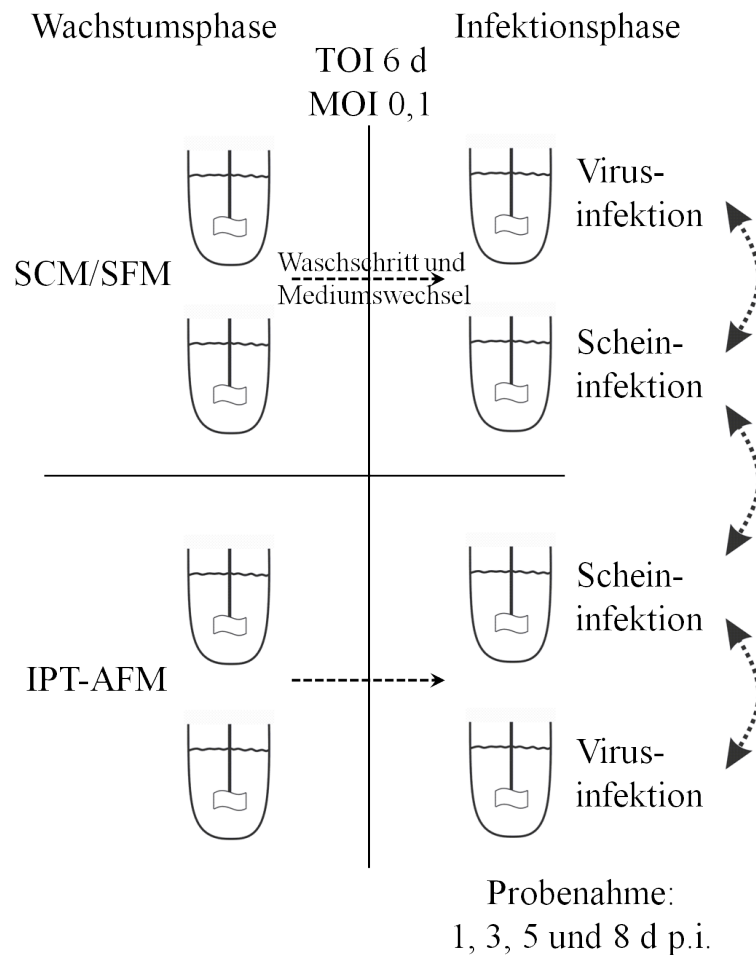


Abb. 3.3.: Versuchsaufbau für den Vergleich der Virusinfektion mit der Scheininfektion für die $Ver_{IPT-AFM}$ und $Ver_{SCM/SFM}$ Zelllinien. Dargestellt sind die Kultivierungen im 2L-BR. Während des Übergangs von der Wachstums- zur Infektionsphase (gestrichelte Pfeile) wurde bei den SCM/SFM-Kultivierungen ein Mediumswechsel durchgeführt. Für den quantitativen Proteomvergleich wurden die Virusinfektionen mit den Scheininfektionen sowie die Scheininfektion der $Ver_{IPT-AFM}$ und $Ver_{SCM/SFM}$ Zelllinien verwendet (gepunktete Pfeile).

einen Microcarrierfilter gegeben. Zur Bestimmung der Zellzahl auf bewachsenen Microcarriern wurden die Zellen manuelle ausgezählt (Anhang I).

3.3.2. Bestimmung extrazellulärer Metaboliten

Die Konzentrationsbestimmung der extrazellulären Metaboliten Glucose, Lactat, Glutamin, Ammonium und Glutamat erfolgte mit einem Enzymsensor (Genzel et al. 2004). Für die Messung wurde ein Probenvolumen von mindestens 0,5 mL bereitgestellt. Die bestimmte Metabolitkonzentration muss innerhalb des validierten Messbereiches sein (Tab. 3.6). Bei Bestimmungen oberhalb des Messbereiches wurde die Probe verdünnt und erneut gemessen.

Tab. 3.6.: Validierte Messbereiche und relative Standardabweichungen des Enzymsensors Bioprofile 100 Plus.

Parameter	Glucose	Laktat	Glutamin	Glutamat	Ammonium
Relative Standardabweichung	1,9	10,5	9,1	2,1	1,8
Validierter Messbereich	1,1 – 41,1	2,3 – 27,3	0,2 – 2,6	0,5 – 2,6	0,2 – 5,2

3.3.3. HA-Assay

Zur Bestimmung der Konzentration von Influenzaviren im Überstand wurde eine Titration durchgeführt, welche auf einer Hämagglutination von Influenzaviren mit Erythrozyten basiert (Anhang I). Der HA-Assay beruht auf der Eigenschaft des viralen HA, Sialinsäuren auf Zelloberflächen zu binden und Hühnererythrozyten (RBC) darüber zu vernetzen (Mahy and Kangro 1996). Bei einer ausreichenden Viruszahl im Verhältnis zu RBC, wurde die Agglutination durch einen roten Ring in der Mikrotiterplatte sichtbar. Mit einer Titration von 100 μ L Probe in einer 96-well Platte wurde die Verdünnungsstufe bestimmt, bei der gerade noch eine Agglutination zu erkennen war. Für diese Stufe wurde angenommen, dass das Virus:RBC-Verhältnis eins ist (Burlison et al. 1992). Unter dieser Annahme konnte die Konzentration der Viruspartikel c_{Virus} im Bezug zur Konzentration der RBC c_{RBC} aus dem HA-Titer nach Gleichung 3.1 berechnet werden. Der Fehler einer Einzelmessung im HA-Assay beträgt 0,149 $\frac{\log HA}{100\mu L}$ (95% Konfidenzintervalls, Kalbfuss et al. 2008).

$$c_{Virus} = 10^{\frac{\log HA}{100\mu L}} \times c_{RBC} \quad (3.1)$$

(5'-3')). Während des ersten Schrittes der reversen Transkription wurden zu 1 μL RNA-Extrakt je 1 μL Primer (10 mM, aq) und 1 μL dNTPs (10 mM, aq) zugegeben, auf 14,5 μL mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt, und bei 65 °C für 5 min inkubiert. Nach der Erwärmung der Reaktionslösung auf 40 °C wurde die Enzymlösung zugegeben (4 μL 5-fach Reaktionspuffer; 0,5 μL Transcriptase; 1 μL nukleasefreies Wasser). Anschließend folgte die Inkubation bei 60 °C für 30 min und die Abstopfung der Reaktion für 5 min bei 85 °C.

Die Konzentration der viralen mRNA wurde mit Hilfe eines *Rotor-Gene SYBR Green PCR* Kits und eines *Rotor-Gene Q real-time PCR* Thermozyklers bestimmt. Zu 4 μL cDNA wurden, 5 μL Reaktionslösung, 1 μL eines vorwärts Primers und 1 μL eines rückwärts Primers zugegeben (1 mM, aq; 1. Primer: Segment 5 vorwärts, GGAAAGTGCAAGACCAGAAGAT (5'-3'); 2. Primer: Segment 7 vorwärts, CATTGGGATCTTGCACCTTGACATT (5'-3'); 3. Primer: Oligo taggedTRT rückwärts, GTAAAACGACGGCCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT (5'-3')). Die quantitative PCR wurde wie folgt programmiert: 1) 5 min Inkubation bei 95 °C, 2) 40 Zyklen je 10 s bei 95 °C und 20 s bei 60 °C, 3) Aufnahme einer Schmelzkurve bei 65 °C bis 90 °C. Im Anschluss an die PCR wurden die Ct-Werte, welcher den Zyklus an dem die Fluoreszenz des SYBR Greens erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt, für die RNA-Standardreihe ermittelt.

Für die absolute Quantifizierung der RNA-Moleküle wurde die Anzahl der RNA-Moleküle n_{RNA} mit Hilfe der Menge des Fragments T , der Fragmentlänge L_{Basen} , der mittleren Masse der Basen (340 Da) m_{340} und der Avogadro-Konstante N_A nach Gleichung 3.2 berechnet. Die lineare Regression der Zykluszahl des signifikanten Fluoreszenzsignals Ct der RNA-Standardreihe aufgetragen gegen die Log10-transformierten n_{RNA} ermöglichte die Bestimmung der absoluten Molekülzahl in der Probe. Dafür wird der Anstieg der Kalibriergeraden a und der Achsenabschnitt b der linearen Regression bestimmt. Die Berechnung der Konzentration viraler mRNA pro Zelle in der Probe SQ_{Probe} mit Einbezug des Probenvolumens V_{Eluat} , des Verdünnungsfaktors der reversen Transkription F_{RT} und der Zellzahl n_{Zellen} ist in Gleichung 3.3 gezeigt.

$$n_{RNA} = \frac{T}{m_{340} \times L_{Basen} \times N_A^{-1} \times 10^9} \quad (3.2)$$

$$SQ_{Probe} = \frac{10^{\frac{Ct-b}{a}} \times F_{RT} \times V_{Eluat}}{n_{Zellen}} \quad (3.3)$$

3.4. Proteomanalytik

Die Versuche für die Proteomvergleiche und die angewandten Methoden sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst. Für alle Proteomvergleiche wurde eine Quantifizierung mittels 2-D DIGE

vorgenommen und vorab die Proteinseparation mit Hilfe der 2-D PAGE realisiert. Eine Proteindentifizierung wurde nach in-Gel Proteinspaltung und Anwendung der MALDI-TOF/TOF-MS erreicht. Zusätzlich zum 2-D DIGE wurde für den Vergleich des Proteoms von MDCK_{ADH} mit MDCK_{SUS} Zellen eine LF-Quantifizierung angewendet. Bevor diese Proteinquantifizierungsmethode ihre Anwendung fand, wurden die Proteine in-Lösung gespalten, die Peptide mit nano-HPLC separiert und anschließender ESI-Q/Orbitrap-MS Analytik identifiziert. Eine signifikante Proteinregulation wurde mit Hilfe von Messwerten aus Western Blots, qRT-PCR und DFZ verifiziert (Abschnitt 3.4.7).

3.4.1. Probenvorbereitung

Eine Übersicht über Probenahmezeitpunkte und Probenvolumen für die verschiedenen Projekte ist in Tabelle 3.8 zusammengefasst. Die Verarbeitung der Zellkulturproben wurde für die entsprechenden Analysemethoden optimiert (Tab. 3.9). Für die Gelseparation bei einer Proteinquantifizierung mittels 2-D DIGE war das Ziel eine gute Auftrennung mit definierten Proteinsignalen (Proteinspots bzw. Spots). Für die LF-Quantifizierung wurde der Zellaufschluss auf eine maximale Proteinausbeute optimiert. Wenn Microcarrier zur Kultivierung Verwendung fanden, wurde die Probe vor dem Zentrifugationsschritt durch einen Microcarrierfilter (50 μm) gegeben. Für den Vergleich der MDCK_{ADH} mit der MDCK_{SUS} Zelllinie (Abschnitt 3.2.4) wurden die Proben der Suspensionszellen ebenfalls mit diesem Filter geklärt.

**Tab. 3.7.: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Methoden zur Proteom-
analytik.**

Projekt	Virusreplikation		Zelllinien- adaption	Zelllinienvergleich	
	Influenza	Tollwut		Vero	MDCK
Abschnitt	(3.2.5)	(3.2.6)	(3.2.3)	(3.2.6)	(3.2.4)
Zelllinien (3.2.1)	MDCK _{ADH} , MDCK _{SUS}	VerO _{SCM/SFM} , VerO _{IPT-AFM}	MDCK _{ADH}	VerO _{SCM/SFM} , VerO _{IPT-AFM}	MDCK _{ADH} , MDCK _{SUS}
Quantifizie- rung (3.4.6)		2-D DIGE			2-D DIGE, LF
Separation (3.4.2)		2-D PAGE			2-D PAGE, nano-HPLC
Proteinspal- tung (3.4.3)		In-Gel			In-Gel, In-Lösung
MS (3.4.4)		MALDI-TOF ESI-Q/TOF			MALDI-TOF, ESI-Q/Orbi- trap
Verifizierung (3.4.7)	DFZ, qRT-PCR	–	Western Blot	–	Western Blot

MDCK – Madin-Darby Hundenierenzelllinie, Vero – Nierenzelllinie der Grünen Meerkatze, DIGE – differenzielle Gelelektrophorese, LF – *label free*, 2-D PAGE – zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese, HPLC – Hochleistungs-Flüssigchromatographie, MALDI – Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation, TOF – Flugzeitanalysator, ESI – Elektrospray-Ionisation, DFZ – Durchflusszytometrie, qRT-PCR – quantitative *real time* Polymerase Kettenreaktion.

Tab. 3.8.: Probenahme für die Proteomuntersuchungen.

Projekt	Zellen lokalisiert	Probenzeitpunkt	Probenvolumen
Virusreplikation Influenza (3.2.5)	Microcarrier, Überstand Suspension	0, 8, 32 h p.i. 0, 8, 32 h p.i.	4 mL 8 mL
Virusreplikation Tollwut (3.2.6)	Microcarrier	1, 3, 5, 8 d p.i.	10 mL
Zelladaption (3.2.3)	Oberfläche Überstand Suspension	AC, CL DC SC	T175-Flasche T175-Flasche 10 mL
Zelllinienvergleich Vero (3.2.6)	Microcarrier	1, 3, 5, 8 d p.i.	10 mL
Zelllinienvergleich MDCK (3.2.4)	Microcarrier, Überstand Suspension	ca. 70 h ca. 70 h	100 mL 100 mL

AC – MDCK_{ADH} Zellen adaptiert an SMIF8+S Medium, CL – MDCK_{ADH} Zellen adaptiert an SMIF8 Medium, DC – abgelösten Zellen nach Adaption an SMIF8 Medium, SC – langsam wachsende Suspensionszellen p.i. – nach der Infektion, T175-Flasche – T-Flasche mit 175 cm².

Mit zunehmender Proteinmenge nimmt auch die Menge an störenden Substanzen für die Proteinseparation (z. B. Salze, Detergenzien) zu. Für die analytischen Gele wurden 150 μ g Protein und für die präparativen Gelen der massenspektrometischen Proteinidentifizierung zwischen 300 und 500 μ g Protein verwendet. Die in Tabelle 3.9 aufgeführten Fällungen waren für eine gute Separation sowohl in den analytischen und präparativen Gele ausreichend. Nur bei dem präparativen Gel für die Zelllinienadaption wurde zusätzlich eine Phenolextraktion für das präparative Gel durchgeführt (Anhang I).

Tab. 3.9.: Probenvorbereitung für die Proteinquantifizierung. Die Pufferzusammensetzung ist im Anhang H und die Protokolle für die Fällungen sind im Anhang I zu finden.

Zelluläres Proteom	Waschschritt ¹	Zellyse- ² puffer	Mechanische, enzymatische Zerkleinerung	Zentrifugation ³	Konzentration, Aufreinigung ⁴
MDCK Zellen Virusreplikation (3.2.5)	3 x Sucrosepuffer	DIGE	2 x Spritzenkanüle ⁵ , Ultraschall ⁶	36 000 g, 30 min	Ethanol-Fällung
Vero Zellen Virusreplikation (3.2.6)	1 x PBS und 2 x Sucrosepuffer	DIGE	10 x Spritzenkanüle ⁵ , Ultraschall ⁶	12 000 g, 10 min	TCA-Fällung
MDCK Zellen Zelladaption (3.2.3)	2 x Sucrosepuffer	DIGE	Homogenisator ⁷	10 000 g, 30 min	-
MDCK Zellen Zelllinienvergleich (3.2.4)	3 x Sucrosepuffer	SDS	2 x Spritzenkanüle ⁵ , Benzonase ⁸	36 000 g, 30 min	LF: FASP 2-D DIGE: Ethanol-Fällung
Vero Zellen Zelllinienvergleich (3.2.6)	1 x PBS und 2 x Sucrosepuffer	DIGE	10 x Spritzenkanüle ⁵ , Ultraschall ⁶	12 000 g, 10 min	TCA-Fällung

1 – Für jeden Waschschritt wurden die Zellen bei Suspensionswachstum durch Zentrifugation (300 - 400 g, 5 min) oder bei bewachsenen Microcarriern mittels Sedimentation (5 min) abgetrennt. 2 – Die Zellyse wurde mit 1 mL Lysepuffer je Probenvolumen (Tab. 3.8) durchgeführt. 3 – Die Abtrennung von Zellbruchstücken nach dem Aufschluss erfolgte durch Zentrifugation. 4 – Die durchgeführten Proteinfällungen erfolgte nach SOP (Anhang I) und wurde je nach notwendiger Proteinmenge angepasst. 5 – Die Proben wurden durch eine Spritzenkanüle gepresst. 6 – Die Proben wurden mit 5 Pulsen Ultraschall mit 40% Intensität behandelt und anschließend 30 min bei RT inkubiert. 7 – Die Proben wurden 5 mal für 2 s homogenisiert. 8 – Die Proben wurden mit 1 μ L Benzonase bei RT inkubiert. DIGE – Differenzielle Gelelektrophorese, FASP – filterbasierte Probenvorbereitung, SDS – Natriumdodecylsulfat, TCA – Trichloressigsäure.

3.4.2. Separationsmethoden

In der vorliegenden Arbeit kamen verschiedene Methoden zur Separation von Protein- und Peptidgemischen zum Einsatz. Die gelbasierte Quantifizierung mit 2-D DIGE (Abschnitt 3.4.6) setzte eine Separation mit einer IEF und einer SDS-PAGE voraus. Der gelfreie Ansatz für die Proteinquantifizierung erfolgte auf der Peptidebene. Dabei wurde die erfolgreiche enzymatische Proteinspaltung in Peptide mit Hilfe der Monolithseparation und UV-Detektion gezeigt. Die massenspektrometrische Proteinidentifizierung mittels ESI-Q/Orbitrap-MS (Abschnitt 3.4.3) setzte eine Peptidseparation mittels nano-HPLC System voraus. Dieses Kapitel enthält die detaillierten Beschreibungen zur Durchführung der verschiedenen Separationsmethoden.

Isoelektrische Fokussierung

Die Proteinproben wurden bei RT aufgetaut und anschließend mit DeStreak (enthält 3% Pharymalyte) auf 500 μL aufgefüllt. Anschließend folgte eine Zentrifugation (30 min, 12 000 rpm, kleine Tischzentrifuge). Für die Analyse von Vero Zellproteomen wurde in der IEF ein pH-Bereich von 4-7 und bei den MDCK Zellproteomen ein pH-Bereich von 3-11 verwendet. Je Probe kam ein IPG-Streifen zum Einsatz, der mit ca. 3 mL Immobiline Dry Cover Fluid bedeckt wurde. Die Rehydrierung erfolgte über Nacht, bei präparativen Gelen ohne angelegte Spannung, im Fall der analytischen Gele mit angelegter Spannung (7 h 30 V, 6 h 60 V, Tab. 3.11).

Der Aufbau der Fokussiereinheit erfolgte nach Herstellerangaben und der Start der Fokussierung mit den in den Tabellen 3.10 und 3.11 aufgeführten Programmen. Nach Erreichen 80 000 Vh konnte die IEF gestoppt werden. Vor der vertikalen SDS-PAGE wurden die Streifen für 15 min in 130 mM DTT-Äquibrierlösung und 15 min in 130 mM IAA-Äquibrierlösung inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Tab. 3.10.: Sequenz für die isoelektrische Fokussierung präparativer Gele. Bei der Rehydrierung der Streifen wurde keine Spannung angelegt.

Schritt	Spannung [V]	Zeit [h]	Modus
1	200	5	Stufe
2	500	1	Stufe
3	1000	1	Stufe
4	8000	0,5	Gradient
5	8000	10	Stufe

Tab. 3.11.: Sequenz für die isoelektrische Fokussierung analytischer Gele. Die Rehydrierung der Streifen wird unter angelegter Spannung durchgeführt.

Schritt	Spannung [V]	Zeit [h]	Modus
1	30	7	Stufe
2	60	6	Stufe
3	200	1	Stufe
4	1000	1	Stufe
5	8000	0,5	Gradient
6	8000	8	Stufe

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die 2-D SDS-PAGE kamen zwei Standardverfahren zum Einsatz. Das erste Verfahren nutzt eine vertikale Ausrichtung der Elektrophorese (GE Healthcare) und fand für die Versuche 3.2.3 und 3.2.6 Verwendung. Das zweite Verfahren besitzt eine horizontale Ausrichtung (Serva) und kam bei den Versuchen 3.2.4 und 3.2.5 zum Einsatz.

Für das Verfahren, mit der vertikalen Ausrichtung, wurden die Gele zunächst nach Herstellerangaben, mit der in Tabelle 3.12 beschriebenen Zusammensetzung, gegossen. Zusätzlich wurde für das automatisierte Spotpicken eine der Glasplatten nach Herstellerangaben mit Bindsilan beschichtet. Die Gele mussten in die mit Laufpuffer befüllte Kammer eingesetzt werden. Die IEF-Streifen wurden luftblasenfrei auf die Geloberkante gelegt. Anschließend wurden die Streifen mit 0,5% Agarosegel (aq) überschichtet. Die Elektrophorese lief bei 2 W und 15 °C über Nacht. Bis zum Gelscan wurden die Gele ein bis zwei Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Beim zweite 2-D SDS-PAGE Verfahren fanden Fertiggele Verwendung und die Gelläufe wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Visualisierung der Proteinspots erfolgte für analytische Gele eines 2-D DIGE Ansatzes mit Hilfe einer Fluoreszenzdetektion (Abschnitt 3.4.6). Präparative Gele wurde entweder wie beim 2-D DIGE mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert oder mit Coomassie eingefärbt (SOP im Anhang I).

Tab. 3.12.: Zusammensetzung 12%-iger Polyacrylamidgele für die vertikale 2-D SDS-PAGE.

Chemikalie	Konzentration	Zugabe
Tris-HCl pH 8,8	0,375 M	1 ¹
SDS-Lösung ²	0,1% (v/v)	2
Acrylamid	12% (v/v)	3
TEMED	0,05% (v/v)	4
Ammoniumperoxodisulfat	0,1% (w/v)	5 ³

1 – Ein Drittel des berechneten Endvolumens wurde mit Wasser vorgelegt, 2 – Die Zugabe wird von einer 10% (w/v) SDS-Lösung durchgeführt, 3 – Die Chemikalie wird vor der Zugabe in Wasser gelöst.

Eine eindimensionale SDS-PAGE für anschließende Western Blot Analysen (Abschnitt 3.4.7) wurde mit NuPAGE Bis-Tris-Gelen nach Herstellerangaben mit dem Gelelektrophoresesystem Xcell SureLock™ durchgeführt. Als Laufpuffer fand der NuPAGE MOPS Natriumdodecylsulfat (SDS) Puffer Verwendung.

Monolithseparation

Die LF-Quantifizierung auf Peptidebene setzt eine vollständige Spaltung aller Proteine in der Probe voraus. Dazu war es nötig eine Qualitätskontrolle nach Burkhardt et al. (2012) mit Hilfe der C18-Monolith-RP-LC durchzuführen. Von der Probe wurden 0,25 μg injiziert (entspricht 2 μL) und zunächst mit einer Flussrate von 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ auf eine Trap-Säule geladen. Anschließend wurde die Probe über die Trennsäule mit einem binären Gradienten der mobilen Phase A (0,05% (v/v, aq) TFA, 2% (v/v, aq) Acetonitril) und B (0,04% (v/v, aq) TFA, 50% (v/v, aq) Acetonitril) aufgetrennt. Die Separation erfolgte mit einer Flussrate von 300 nL/min, einer Temperatur von 60 °C und einem linearen Gradienten von 0% auf 84% der mobilen Phase B innerhalb von 20 min. Die Detektion der Peptide erfolgte über UV-Absorption bei 214 nm. Zur Auswertung der Chromatogramme wurde die Software Chromeleon verwendet.

Nano-HPLC System

Zur Separation von Peptiden nach dem tryptischen Verdau wurden nano-HPLC-Systeme verwendet, welche online an ESI-MS-Systeme gekoppelt wurden. Die Module der HPLC-Systeme werden im Zusammenhang mit dem dazugehörigen Massenspektrometer näher erläutert (Ab-

schnitt 3.4.4). Sie enthielten eine Trap-Säule für die Entsalzung der Proben und eine nachfolgende Trennsäule. Die Flüsse über die Trap-Säule wurden mit Micropumpen ($2 \mu\text{L}/\text{min} - 100 \mu\text{L}/\text{min}$) gesteuert, während die Flüsse von der Trap-Säule über die Trennsäule durch Nanopumpen ($0,3 \mu\text{L}/\text{min} - 3 \mu\text{L}/\text{min}$) eingestellt wurden. Bei der Elution kamen Gradienten mit zunehmender Acetonitril Konzentration zum Einsatz.

3.4.3. Tryptische Proteinspaltung

Für den in-Gel Verdau mussten die Gelspots zunächst manuell oder automatisiert mit dem Spotpicker ausgeschnitten werden. Dafür wurden den selektierten Proteinspots in einer Bilddatei präparativer Gele mit Hilfe der Software Delta2D Koordinaten zugewiesen. Die Liste der Spots mit den zugehörigen Koordinaten konnte im Anschluss in die Software Spot Picker importiert und die Spots, mit dem Spotpicker automatisiert, ausgeschnitten werden. Die Gelspots wurden in 96-Well Platte pipettiert, mit Waschlösung bedeckt und zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Der Verdau für die MALDI-TOF/TOF-MS wurde nach SOP (Anhang I) durchgeführt. Für die ESI-Q/TOF-MS wurde das Verdauprotokoll von Vester et al. (2009) beschrieben.

In-Gel Verdau

Für den in-Gel Verdau wurden die Gelspots zunächst manuell oder automatisiert ausgeschnitten. Die automatisierte Spotisolierung wurde mit dem Spotpicker durchgeführt. Dafür wurden den selektierten Proteinspots auf einer Bilddatei präparativer Gele mit Hilfe der Software Delta2D Koordinaten zugewiesen. Die Liste der Spots mit den zugehörigen Koordinaten wurde in die Software Spot Picker importiert. Mit dieser Software wurde der Spotpicker gesteuert und die Gelspots wurden automatisch "gepickt". Die Gelspots wurden in 96-Well Platte pipettiert und mit Waschlösung bedeckt. So wurden sie bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Das Verdauprotokoll für die MALDI-TOF/TOF-MS befindet sich im Anhang I). Für die ESI-Q/TOF-MS wurde das Verdauprotokoll von Vester et al. (2009) beschrieben. Nach der massenspektrometrischen Identifizierung werden den Spots auf einer Bilddatei der präparativen Gele die Proteine zugeordnet, was in der vorliegenden Arbeit als Gekarte bezeichnet wird.

In-Lösungs Verdau

Die Optimierung des tryptischen Verdau des gesamten Zellproteoms der MDCK Zelllinien wurde in-Lösung durchgeführt. Es wurden drei Protokolle (Tab. 3.13) im Hinblick auf das Enzym:Substrat-Verhältnis (1:100, 1:50 und 1:30 in ABC-Puffer) und die Inkubationszeit (2, 4, 6, 7, 8, 9 und 11 h) getestet. Die Inkubation des Verdau erfolgte mit 1 mM CaCl₂ und mit 5% (v/v) Acetonitril.

Tab. 3.13.: Protokolle für die Optimierung des in-Lösungs Verdau.

Parameter	Protokoll 1	Protokoll 2	Protokoll 3
ABC-Puffer (aq)	50 mM, 0,1% (v/v)	50 mM	50 mM
	Rapigest		
Reduktion mit DTT	5 mM	10 mM	10 mM
Inkubation der Reduktion	30 min – 60 °C	10 min – 99 °C, 60 min – RT	30 min – 56 °C
Alkylierung mit IAA	15 mM	40 mM	30 mM
Inkubation der Alkylierung	30 min – RT, dunkel	60 min – RT, dunkel	30 min – RT, dunkel
Abstoppen der Alkylierung	–	40 mM DTT, 60 min – RT	–
Quelle	WATERS Protokoll	BIOCHEM Protokoll	Burkhart et al. (2012)

ABC – Ammoniumbicarbonat, DTT – Dithiothreitol, RT – Raumtemperatur.

FASP

Die FASP Methode wurde von Wiśniewski et al. (2009) adaptiert. Die Proben mit 50 µg Protein (über BCA bestimmt, Abschnitt 3.4.6) wurden in Harnstofflösung aufgenommen und auf Filtersäulen gegeben. Die Filtration fand bei einer Zentrifugation (14 000 g, 10 min, RT, kleine Tischzentrifuge) statt. Die Reduktion der Proteine mit DTT erfolgte bereits auf der Ebene der Zellyse (Abschnitt 3.4.1). Nach einem Waschschrift mit 200 µL Harnstofflösung folgte die Alkylierung für 20 min im Dunkeln mit IAA-Lösung (50 mM in Harnstofflösung). Anschließend wurde je dreimal mit 100 µL Harnstofflösung und 100 µL ABC-Puffer (50 mM, aq) gewaschen. Danach folgte der tryptische Verdau mit einem Enzym:Substrat-Verhältnis von 1:50 (in ABC-Puffer) für 7 h. Die Filtersäulen wurden auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt, der Verdau

filtriert und die Filtermembran mit 50 μL Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe eines Zentrifugalvakuumverdampfers getrocknet.

3.4.4. Massenspektrometrische Analytik

MALDI-TOF/TOF-MS

Im Anschluss an die tryptische Proteinspaltung folgte die Probenvorbereitung für die MS (Anhang I). Eine detaillierte Beschreibung für die massenspektrometrische Hochdurchsatz-Proteinidentifizierung mit Hilfe der MALDI-TOF/TOF-MS findet sich bei Kluge et al. (2013). Für jede Messung wurde 1 μL der Lösung des tryptischen Verdaus auf einen Spot des MALDI-Targets gegeben. Nachdem die Probe eingetrocknet war, konnte 1 μL Matrixlösung (0,7 mg/mL HCCA in 85% (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA und 1 mM Ammoniumphosphat) darauf pipettiert werden. Die Massenspektren wurden im *reflection mode* des, über die SoftwareFlexControl gesteuerten, MALDI-TOF/TOF-MS aufgenommen. Die externe Kalibrierung der MS- und MS/MS-Messungen erfolgte über den Peptid Kalibrierstandard II. Die Kalibrierung der MS-Messung wurde alle vier MALDI-Targetspot-Messungen durchgeführt. Für jede MS-Messung wurden 4000 Laserschüsse (je achtmal 500er Schusspakete) im Bereich von 700 bis 4000 m/z akkumuliert. Der Laserbeschuss wurde mit je 100 Schuss pro Raster über einen *random walk* gesteuert. Die MS/MS-Spektren wurden über die LIFT Technik (Suckau et al. 2003) und eine Akkumulation von 4000 Laserschüssen (je 16 mal 250er Schusspakete) im Bereich von 40 m/z bis zum m/z des Vorläuferionen aufgenommen. Der Laserbeschuss konnte ebenfalls über einen *random walk*, mit je 100 Schuss pro Raster gesteuert werden. Es wurden maximal 30 Vorläufer-Ionen aus dem MS-Spektrum selektiert (Intensität ≥ 400 , Signal:Rausch-Verhältnis ≥ 4). Die Kalibration der MS/MS-Spektren erfolgte intern über die Detektion von Iminiumionen.

Die Datenprozessierung (Kalibrierung, Peakselektion) erfolgte automatisch über die Software FlexAnalysis. Nach der Kalibrierung wurden Massenlisten mit Hilfe des Peakdetektionsalgorithmus *Snap* generiert. Das gewählte Signal:Rausch-Verhältnis betrug 3 für Vorläuferionen und 1 für Produktionen. Adduktpeaks (Aufnahme eines Natrium- oder Kaliumionen) und Hintergrundpeaks (z.B. Matrixpeaks, Keratin, Trypsin) wurden gefiltert. Anschließend wurden die Massenlisten automatisch in die Software ProteinScape importiert. Die so erhaltenen MALDI-MS/MS-Spektren wurden über eine automatische Datenbanksuche mit Mascot ausgewertet (Perkins et al. 1999).

ESI-Q/TOF-MS

Die Proteinidentifizierung mit Hilfe der ESI-Q/TOF-MS wurde von Vester et al. (2009) beschrieben. Die getrockneten Peptidproben mussten in 10 μL 0,1% (v/v) (aq) TFA-Lösung aufgenommen werden. Die Peptidseparation erfolgte durch ein nano-HPLC System bei der die Probe auf eine Trap-Säule mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ gezogen wurde. Danach konnte die Trap-Säule mittels automatisierter Säulenschaltung vor die Nano-Säule geschaltet werden. Anschließend erfolgte eine Acetonitril-Gradientenelution mit einer Flussrate von 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ (mobile Phase A (aq) - 0,1% (v/v) Ameisensäure, 2% (v/v) Acetonitril, versus mobile Phase B (aq) - 0,1% (v/v) Ameisensäure, 80% (v/v) Acetonitril). Innerhalb von 30 min wurde die mobile Phase B linear im Anteil von 0% auf 50% erhöht. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte direkt durch *online*-Kopplung des nano-HPLC Systems mit dem ESI-Q/TOF-MS. Die so erhaltenen ESI-MS/MS-Spektren wurden über eine automatische Datenbanksuche mit Mascot ausgewertet (Perkins et al. 1999).

ESI-Q/Orbitrap-MS

Die Durchführung der ESI-Q/Orbitrap-MS Methode erfolgte in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Albert Sickmann (Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften - ISAS - e.V., Arbeitsgruppe Systemanalyse, Dortmund, Deutschland). Die nach dem tryptischen Verdau getrockneten Proben wurden in 0,1% (aq) TFA-Lösung aufgenommen. Das Massenspektrometer wurde *online* an ein nano-HPLC System gekoppelt und 1,5 μg Peptidlösung, bezogen auf das Startmaterial von 50 μg (Abschnitt 3.4.3), in 15 μL 0,1% (aq) TFA-Lösung injiziert. Die Beladung der Trap-Säule mit Probe erfolgt bei einem Fluss von 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ in 0,1% (aq) TFA-Lösung. Anschließend wurden die Peptide über eine Trennsäule mit einem binären Gradienten der mobilen Phase A (0,1% (v/v, aq) Ameisensäure) und B (0,1% FA, 84% Acetonitril) aufgetrennt. Die Separation erfolgte bei einer Flussrate von 250 nL/min, einer Temperatur von 60 °C und einem linearen Gradienten von 3% auf 42% der mobilen Phase B innerhalb von 90 min. Das Massenspektrometer wurde in einem *data-dependent acquisition* Modus betrieben und aquirierte MS-Scans im Massenbereich von 300 – 1500 m/z (Auflösung = 70 000), gefolgt von MS/MS-Scans der 15 häufigsten Ionen eines Spektrums (Auflösung = 17 500). Der Ladungszustand der Ionen von +2 bis +5 wurde für die *high energy collision dissociation* (HCD) mit einem dynamischen Ionenausschluss von 12 s und einer Kollisionsenergie von 27% gewählt. Der Füllzustand der Ionenfalle wurde mit 3×10^6 und 120 ms für MS-Scans sowie 5×10^4 und 250 ms für MS/MS-Scans festgelegt.

3.4.5. Datenbanksuchen

Die Identifizierung der Proteine erfolgte über einen Datenbankabgleich. Die generierten Spektren der MALDI-TOF/TOF-MS und der ESI-Q/TOF-MS wurden mit der Datenbank NCBIInr (eingeschränkt auf *Mammalia*) abgeglichen. Die Datenbanksuchen wurden wie von Vester et al. (2009), Kluge et al. (2013) und Kluge et al. (2015) beschrieben, durchgeführt. Die verwendeten Suchkriterien waren: tryptischer Verdau, eine fehlende Schnittstelle, fixe Modifikation - Carbamidomethylierung von Cystein, flexible Modifikation - Oxidation von Methionin, Peptidladung +1, monoisotopische Peptidmassen, Peptidtoleranz von 50 ppm, MS/MS-Toleranz von 0,7 Da. Es mussten mindestens zwei Vorläufer-Ionen auf der Ebene ihrer Fragmentspektren detektiert worden sein, um das Protein zu identifizieren. Das Protein mit dem höchsten Mascot-Score der Arten *Canis familiaris* für MDCK Zellen und *Macaca mulata* für Vero Zellen wurden für die Untersuchung weiter betrachtet. Auch die Identifizierung von verschiedenen Proteinen in einem Spot wurde bei der späteren Auswertung berücksichtigt.

Die Spektren der ESI-Q/Orbitrap-MS wurden zunächst in der Software Progenesis prozessiert. Nach dem Export der Daten folgte die Fraktionierung der Datei in 15 Abschnitte. Mit den Suchalgorithmen OMSSA und X!tandem über die UniProt KB/ Trembel Datenbank (*Canis familiaris*, Juli 2013) konnten die Spektren mit der Software SearchGUI (Vaudel et al. 2011) ausgewertet werden. Die verwendeten Suchkriterien waren: tryptischer Verdau, eine fehlende Schnittstelle, fixe Modifikation - Carbamidomethylierung von Cystein, flexible Modifikation - Oxidation von Methionin, Peptidladung zwischen +2 und +4, monoisotopische Peptidmassen, Peptidtoleranz von 0,3 Da, MS/MS-Toleranz von 0,5 Da. Die Identifizierungsdaten wurden in die Software Peptide-Shaker importiert und nach der FDR mit $p \leq 0,5$ korrigiert (Barsnes et al. 2011, Vaudel et al. 2011).

Für eine zweite Auswertung der MS/MS-Spektren des ESI-Q/Orbitrap-MS der einzelnen Proben wurde die Software Proteome-Discoverer verwendet. Die UniProt KB (Art: *Canis familiaris*) war die Grundlage für die Proteinsuche mit Hilfe des SEQUEST HT Suchalgorithmus. Eine Selektion signifikant identifizierter Proteine erfolgte durch die Funktion *Percolator* (mit den Voreinstellungen, FDR (streng) mit $p \leq 0,01$, FDR (locker) mit $p \leq 0,05$) und durch die Filteranwendung ≥ 2 Peptiden/Protein.

Die gefundenen Proteineinträge in der UniProt KB stellten häufig nicht charakterisierte Proteine dar, welche über einen BLAST homologen Humanproteinen zugeordnet wurden. Die funktionelle Klassifizierung der Proteine erfolgte anhand der UniProt KB Eintragungen. Für die Detektion verstärkt differenziell exprimierter biologischer Prozesse wurde eine Überrepräsentationsanalyse mit dem *overrepresentation analysis tool* von Reactom (Croft et al. 2014) durchgeführt. Bei der Auswertung wurde ein Signifikanzgrenze von $p \leq 0,0006$ gewählt,

um nur signifikante biologische Prozesse zu detektieren und eine überschaubare Liste zu generieren. Viele der Proteine repräsentieren verschiedene biologische Prozesse in Abhängigkeit ihrer Gruppierungsebene. So zählt zum Beispiel ein Enzym der Glykolyse in seiner kleinsten Gruppierungsebene zur Glykolyse (27 Proteine in der Gruppe) und in seiner größten Gruppierungsebene zum Metabolismus (1446 Proteine in der Gruppe).

3.4.6. Proteinquantifizierung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Bicinchoninsäureassays (BCA, Proteinassay Kit) oder Bradford-Reagenz (SOP im Anhang I) nach der Probenahme. Die relative Quantifizierung einzelner Proteine auf Protein- und Peptidebene werden im Folgenden erläutert.

Proteinbasierte Quantifizierung mit 2-D DIGE und Delta2D

Für die Quantifizierung auf Proteinebene fand die 2-D DIGE Methode Verwendung (Unlü et al. 1997). Es wurden je 50 μg Protein einer Probe mit 200 pmol Farbstoff der Firma GE Healthcare oder NH-Dyeagnostics nach Herstellerangaben fluoreszenzmarkiert. Die Proben wurden für 30 min auf Eis mit dem Farbstoff inkubiert und die Reaktion anschließend mit Lysinlösung abgestoppt. Für jede quantitative Messung auf Proteinebene wurden drei Farbstoffe verwendet. Die ersten beiden Farbstoffe markierten die zu vergleichenden Proben. Der dritte Farbstoff wurde für den internen Standard verwendet, welcher eine Mischung der zu vergleichenden Proben eines Ansatzes darstellt. Das experimentelle Design mit den verglichenen Ebenen innerhalb analytischer Gele, die Zusammensetzungen des internen Standards und die Herstellung präparativer Gele für die Proteinidentifizierung sind im Anhang A.1 dargestellt. Es wurde für jede Messung zwei oder vier technische Replikate angefertigt, die den Farbstoffaustausch für die Probenmarkierung enthielten (*dye swab*). Nach der 2-D SDS-PAGE (3.4.2) wurde jedes analytische Gel mit dem Typhoon Scanner bei drei verschiedenen Extinktions- und Emissionseinstellungen gescannt (Tab. 3.14) und die drei Bilddateien gespeichert. Die drei Bilddateien wurden in die Software Delta2D importiert und nach dem vom Hersteller empfohlenen Arbeitsablauf prozessiert (Tab. 3.15).

Tab. 3.14.: 2-D DIGE Extinktions- und Emissionseinstellungen am Typhoon Scanner.

Bezeichnung - Firma 1 ¹ / Firma 2 ²	Laser (Extinktion)	Filter (Emission)
Dye S - Cye 2/ G100	blau (488 nm)	Bandpass 40 nm (520 nm)
Dye 1 - Cye 3/ G200	grün (532 nm)	Bandpass 30 nm (580 nm)
Dye 2 - Cye 5/ G300	rot (633 nm)	Bandpass 30 nm (670 nm)

1 – GE Healthcare. 2 – NH-Dyeagnostics

Tab. 3.15.: Arbeitsschritte in Delta2D. Aufgeführt sind die Arbeitsschritte und die Methode zur Prozessierung der Gelbilder.

Arbeitsschritt	Angewandte Methode
<i>Warping</i> Strategie	<i>In-Gel Standard</i> <i>Warping</i>
<i>Warping</i>	Automatisiert mit manueller Korrektur
Gelfusion	<i>Union</i> Algorithmus
Consensus Spotmuster	Spotdetektion auf dem Fusionsgel, modelliert
Statistische Auswertung	<i>Multi Experiment Viewer</i>

Im Anschluss an die Spotdetektion folgten zwei Datennormalisierungen in der Software Delta2D. Die erste Normalisierung wurde innerhalb einer Bilddatei durchgeführt. Sie berechnete den relativen Anteil $V_D(x_i)$ eines detektierten Spots x_i mit $i \in \mathbb{N}$, bezogen auf die Gesamtheit der Graustufenwerte $G_D(x_i)$ aller Spots (3.4). Diese Normalisierung wurde für alle drei Fluoreszenzfärbungen D (Dye S – interner Standard, Dye 1 und Dye 2 – zu vergleichenden Proben, Tab. 3.14) unabhängig angewandt.

$$V_D(x_i) = \frac{G_D(x_i)}{\sum_{i=1}^n G_D(x_i)} \times 100 \quad D \in \{1, 2, S\}; \quad n \in \mathbb{N} \quad (3.4)$$

Die zweite Normalisierung wurde innerhalb mehrerer Gele durchgeführt. Für jedes Gel g_j mit $j \in \mathbb{N}$ wurde der relative Anteil der Fluoreszenzfärbung Dye 1 $V_1(x_i)$ und Dye 2 $V_2(x_i)$ auf den internen Standard $V_S(x_i)$ bezogen (3.5). Dieser Wert wird als normalisierte Spotintensität $I_{g_j, F}(x_i)$ bezeichnet.

$$I_{g_j, F}(x_i) = \frac{V_F(x_i)}{V_S(x_i)} \quad F \in \{1, 2\} \quad (3.5)$$

Für die relative Quantifizierung wurde das Verhältnis $R(x_i)$ zwischen der mittleren normalisierten Spotintensität über alle Bilddateien d einer Kontrolle $I_k(x_i)$ und einer Probe $I_p(x_i)$ gebildet (3.6, 3.7). Das Verhältnis $R(x_i)$ wurde als differenzielle Proteinexpression beschrieben. Nach einer logarithmischen Transformation zur Basis zwei verhielten sich die Werte mit positiver ($R(x_i) > 1$) und negativer ($0 < R(x_i) < 1$) Ausprägung symmetrisch. In besonderen Fällen, zum Beispiel bei der Auswertung von technischen Replikaten, wurde anstelle des Mittelwerts (3.6) der Median errechnet.

$$\begin{aligned}\bar{I}_k(x_i) &= \frac{\sum_{j=1}^d I_{g_j, k_j}(x_i)}{d} \quad k_j \in \{1, 2\} \\ \bar{I}_p(x_i) &= \frac{\sum_{j=1}^d I_{g_j, p_j}(x_i)}{d} \quad p_j \in \{1, 2\} \setminus k_j\end{aligned}\tag{3.6}$$

$$R(x_i) = \frac{\bar{I}_p(x_i)}{\bar{I}_k(x_i)}\tag{3.7}$$

Für die vergleichende Darstellung mehrerer Verläufe von normalisierten Spotintensitäten $I_{g_j, F}(x_i)$, zum Beispiel in einer Heatmap oder einem Balkendiagramm, wurden für die symmetrische Ausprägung der Werte zunächst eine logarithmische Transformation zur Basis zwei durchgeführt. Anschließend wurde eine Standardisierung der Spotintensitäten $Z(x_i)$ aller betrachteter Werte durchgeführt. Bei der z -Transformation wurde unter Einbezug des Mittelwerts einer Spotintensität über alle betrachteten Messpunkte $\bar{I}(x_i)$ der normalisierten Spotintensitäten $I_{g_j, F}(x_i)$ und deren Varianz $\sigma(x_i)$ standardisiert (3.8).

$$Z(x_i) = \frac{I_{g_j, F}(x_i) - \bar{I}(x_i)}{\sigma(x_i)}\tag{3.8}$$

Peptidbasierte Quantifizierung und Auswertung

Bei der LF-Quantifizierung fand die Software Progenesis Anwendung. Die Auswertung wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Albert Sickmann (Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften - ISAS - e.V., Arbeitsgruppe Systemanalyse, Dortmund, Deutschland) durchgeführt. Die LC-MS Läufe wurden durch ein Alignment an einen automatisch ausgewählten Referenzlauf angeglichen. Nachdem die Peaks analysiert waren, konnte eine Liste an *features* vom generierten Projekt in der Software exportiert werden. Nach erfolgreicher Identifizierung wurden die Daten in die Software Progenesis importiert (Abschnitt 3.4.5). Bei der

LF-Quantifizierung wurde die detektierte Intensität (*normalized abundance*) der *features* für mindestens zwei identifizierte Peptide eines Proteins zwischen den zu betrachtenden Proben verglichen. Als Rechengrundlage galten ebenfalls:

- Formel 3.7 zur Bestimmung des Verhältnisses $R_{LF}(x_i)$ zwischen der mittleren detektierten Intensität einer Probe $\bar{I}_p(x_i)$ und einer Kontrolle $\bar{I}_k(x_i)$
- Formel 3.8 zur Standardisierung der Intensitäten eines *features* $Z_{LF}(x_i)$ für die graphische Darstellung unter Einbezug des Mittelwerts einer Intensität $\bar{I}(x_i)$ über alle betrachteten MS-Läufe und deren Varianz

Signifikanztests für die differenzielle Proteinexpression

Bei dem Vergleich der differenziellen Proteinexpression zweier Gruppen kam der Student's t-Tests zum Einsatz. Bei diesem Test besagt die Nullhypothese, dass der Mittelwert der Probe A und B gleich ist. Für komplexere Vergleiche mehrerer Gruppen wurden die Ergebnisse mit einer Varianzanalyse (ANOVA) auf Signifikanz getestet. Nach einer ANOVA wurde eine Post-Hoc Analyse durchgeführt, die auf dem Student's t-Test beruht. Die Analysen zeigten zwischen welchen Gruppen signifikante Unterschiede anzunehmen sind. Die angewendeten Signifikanztests stellten zwei grundlegende Anforderungen an den zu analysierenden Datensatz. Erstens mussten die zu untersuchenden Daten normalverteilt sein und zweitens sollte der Datensatz homogene Varianzen aufweisen. Der Test auf Normalverteilung wurde in dieser Arbeit mit dem Shapiro-Wilk-Tests durchgeführt (R-Programm, Funktion: `shapiro.test(x)`). Für den Test auf homogene Varianzen fand der Levene-Test Anwendung (R-Programm, Funktion: `levene.test(x)`). In Tabelle 3.16 sind die im Voraus ausgewählten Signifikanzkriterien zu den einzelnen Versuchen aufgelistet.

Zusätzlich zum Signifikanztest wurde ein Schwellenwert von mindestens zweifacher differenzielle Proteinexpression ($0,5 \leq R(x_i) \leq 2$) für alle Analysen festgelegt. Ausnahmen bildete die 2-D DIGE Analyse der Virusreplikation mit Influenzaviren. Die Schwellenwerte von $0,7 \leq R(x_i) \leq 1,4$ wurden für die differenzielle Proteinexpression bei der Influenzavirusinfektion in MDCK Zellen anhand einer Negativkontrolle (0 h p.i.) festgesetzt. Mit den gewählten Signifikanzkriterien zeigte die Negativkontrolle keine differenzielle Proteinexpression. Die gleichen Schwellenwerte von $0,7 \leq R(x_i) \leq 1,4$ wurden auch für die Auswertung der LF-Analyse angewandt, um ein umfassendes Bild der Proteomantwort zu erhalten.

Tab. 3.16.: Signifikanztests für differenzielle Proteinexpression.

Projekt	Student's t-Test	ANOVA	Post-Hoc	p-Wert	Auswertung in
2-D DIGE: Biologische Varianz MDCK _{ADH} – Spinner _{PA} (3.2.5)		x		0,05	Delta2D
2-D DIGE: Biologische Varianz MDCK _{SUS} – Spinner _{PA} (3.2.5)		x		0,05	Delta2D
2-D DIGE: Virusreplikation – Influenza (3.2.5)	x			0,05	Delta2D
2-D DIGE: Virusreplikation – Tollwut (3.2.6)	x			0,005	Delta2D
2-D DIGE: Zelladaption – (3.2.3)		x	x	0,01	Delta2D und R-Programm ¹
2-D DIGE: Zelllinienvergleich – Vero (3.2.6)	x			0,005	Delta2D
2-D DIGE: Zelllinienvergleich – MDCK (3.2.4)	x			0,05	Delta2D
LF: Zelllinienvergleich – MDCK (3.2.4)	x			0,05	R-Programm ²

1 – Durchführung der Post-Hoc Analyse in R-Programm (Funktion: `pairwise.t.test(x)`), 2 – Durchführung des Student's t-Test in R-Programm (Funktion: `t.test(x)`); MDCK – Madin-Darby Hundenierenzelllinie, DIGE – differenzielle Gelelektrophorese, LF – *label free*.

3.4.7. Verifizierung zellulärer Proteinantworten

Western Blot Analytik

Die Auftrennung von Proteinproben erfolgte mittels eindimensionaler SDS-PAGE (Abschnitt 3.4.2), anschließendem Western Blot und Immundetektion (Anhang I). Das Blotmodul der Firma Invitrogen wurde nach Herstellerangaben für ein oder zwei Blots verwendet. Die Proteine wurden auf einer Polyvinylidenfluorid Membran geblottet. Anschließend wurde die Membran mit Milchpulver (5% w/v, in TBS-Puffer) oder BSA (3% w/v, in TBS-Puffer) blockiert. Die verwendeten Antikörper und die zugehörigen Verdünnungen sind in Tabelle 3.17 aufgeführt. Als Ladekontrolle diente ein Antikörper gegen die extrazelluläre, signalregulierte Kinase 2 (ERK2), wie von Heynisch et al. (2010) beschrieben. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte unter Verwendung des Substrates *SuperSignal Western Dura Extended Duration* mit der Kamera Chemocam.

Tab. 3.17.: Antikörper der Firma Biorbyt (GB) für die Western Blot Analytik.

Bezeichnung	Artikelnummer	Verdünnung	Blockierung	2. Antikörper ¹
<i>Catalase antibody</i>	orb19252	1:500	BSA	Ziege
<i>Ezrin antibody</i>	orb19239	1:500	Milch	Ziege
<i>Gelsolin antibody</i>	orb19350	1:500	Milch	Ziege
<i>OAT^t antibody</i>	orb128480	1:500	Milch	Hase

1 – Die Inkubation mit dem 2. Antikörper für die finale Detektion mittels Chemilumineszenz wurde bei einer Verdünnung von 1:10 000 durchgeführt. OAT – Ornithin-Aminotransferase.

Quantifizierung der zellulären Myxovirus-Resistenzprotein-RNA

Die Expression zellulärer RNA für das Myxovirus-Resistenzprotein (Mx1) konnte mit Hilfe einer RT-qPCR, wie von Seitz et al. (2010) beschrieben, analysiert werden. Zur Normalisierung wurde die Expression der 18S rRNA und die Kontrollprobe (Scheininfection) verwendet.

Durchflusszytometrische Bestimmung virusinduzierter Apoptose

Die Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen nach Virusinfektion erfolgte mit Hilfe der DFZ. Dafür wurde die Apoptose über DNA-Strangbrüche (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*, TUNEL) mit Tetramethylrhodamin detektiert und bei einer Extinktion/Emission von 488 nm/ 620 nm gemessen. Die Methode ist detailliert von Schulze-Horsel et al. (2009) für MDCK_{ADH} Zellen und Peschel et al. (2013) für MDCK_{SUS} Zellen beschrieben.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind teilweise veröffentlicht:

- Proteomveränderungen der MDCK Zellen während der zellulären Adaption an CDM und Suspensionswachstum (Kluge et al. 2015)
- Medienbedingte und virusinduzierte Proteomveränderungen der Vero Zellen vor und nach Adaption an optimiertes Medium während der Virusproduktionsphase (Kluge et al. 2013)

4.1. Qualität der optimierten Methoden der zellulären Proteomanalytik

In diesem Abschnitt sollen einige der im Rahmen dieser Arbeit angewandten und optimierten Methoden vorgestellt und ein Eindruck über die Verlässlichkeit der gewonnenen Ergebnisse und deren Bewertungsgrenzen vermittelt werden.

4.1.1. Zellaufschluss für die Proteinextraktion

Der initiale Schritt der Proteinextraktion ist die Zellyse. Die Zellyse wurde für die LF-Proteomanalytik optimiert (Abschnitt 3.4.6), mit dem Ziel Zellen effizient aufzuschließen und störendes Detergenz nur in geringen Mengen zuzugeben. Ein häufig verwendeter Aufschlusspuffer für Zellen und Gewebe ist der Radioimmunopräzipitations Assay (RIPA) Puffer (Ngoka 2008). Die nach Zellaufschluss mit RIPA-Puffer gemessene Proteinkonzentration wurde als Referenzwert für die Zellyse verwendet. Ein häufig verwendetes Detergenz für das Lösen von Proteinen ist SDS, das in verschiedenen Konzentrationen (0,5%, 1%, 2%) für die Zellyse getestet wurde. Ein Schritt in Richtung MS Kompatibilität war die Verwendung des RapiGest (RG) Puffers. Dieser enthält das anionische Tensid (Natrium-3-[(2-Methyl-2-Undecyl-1,3-Dioxolan-4-yl)methoxy]-1-Propansulfonat), welches zur Steigerung der Proteinlöslichkeit führt und unter sauren Bedingungen in zwei für LC-MS unkritische Nebenprodukte zerfällt (Meng et al. 2002, Yu et al. 2003). Um die Effizienz der Zellyse mit verschiedenen Puffern zu testen, wurden je eine Million Zellen der Zelllinien MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} mit verschiedenen Waschpuffern

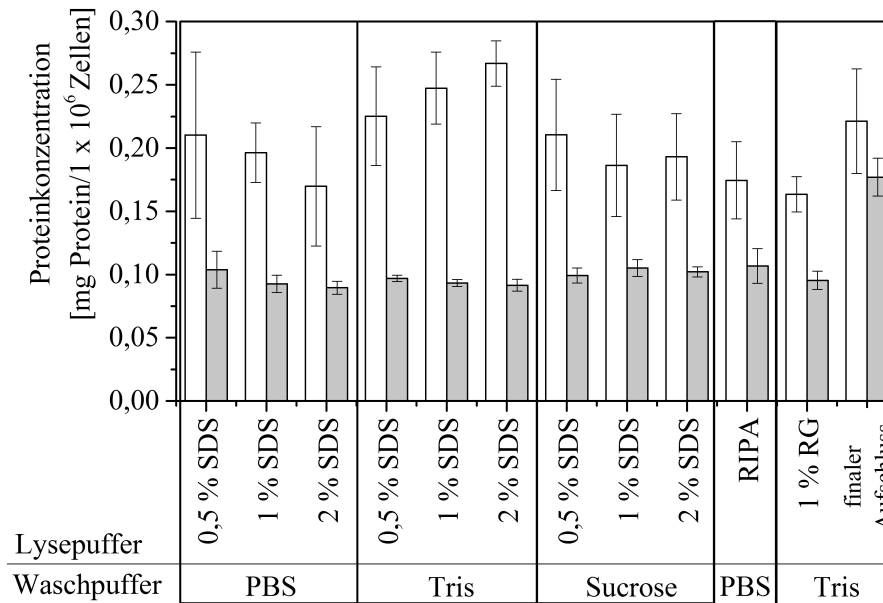


Abb. 4.1.: Effizienz verschiedener Lysepuffer für den Zellaufschluss. □ MDCK_{ADH}, ■ MDCK_{SUS} Zellen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem BCA Assay durchgeführt (Abschnitt 3.4.6). Je 1×10^6 Zellen/mL von Spinnerkulturen der MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zelllinie (Abschnitt 3.2.2) wurden zweimal gewaschen und in Lysepuffer aufgenommen (Abschnitt 3.4.1). Für den Aufschluss zur LF-Proteomanalytik wurden eine zusätzliche Homogenisierung mit einer Einwegspritze sowie ein Einfrier-Auftauschritt durchgeführt. Es sind Mittelwert und Standardabweichung von drei wiederholten Zellaufschlüssen dargestellt. SDS - Natriumdodecylsulfat, PBS - Phosphatgepufferte Salzlösung, RIPA - Radioimmunopräzipitations Assay, RG - RapiGest, Aufschluss - finaler Aufschluss für die LF-Quantifizierung.

behandelt (PBS, Tris, Sucrose) und anschließend mit den Lysepuffern (SDS-basiert, RIPA, RG) inkubiert (Abschnitt 3.4.1). Zur Homogenisierung wurden die Lysate auf- und abpipettiert. Die Bestimmung der mittleren Proteinkonzentration der Proben erfolgte mit Hilfe des BCA Assay von drei Zelllysaten für je drei technische Replikate.

Die ermittelten Proteinkonzentrationen der MDCK_{ADH} Zellen variierten in Abhängigkeit des Lysepuffers (Abb. 4.1). Die Lyse mit RG-Lysepuffer ergab die geringsten Proteinkonzentrationen (0,18 mg Protein/ 1×10^6 Zellen, Tris-Waschpuffer) während der 2%-SDS-basierte Lysepuffer nach einem Waschschriff mit Tris-Waschpuffer die höchsten Proteinkonzentrationen zeigte (0,28 mg Protein/ 1×10^6 Zellen, Tris-Waschpuffer). Für die Lyse von MDCK_{ADH} Zellen ergab sich bei jedem Testansatz eine höhere Proteinkonzentration pro Zelle als für MDCK_{SUS} Zellen. Die Zellaufschlüsse der MDCK_{SUS} Zellen zeigten, mit der Ausnahme des finalen Aufschlusses, keine Unterschiede für die Effizienz der Lysepuffer und die Proteinkonzentrationen wiesen eine kleinere Standardabweichung auf. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die SDS-basierten Puffer und der RG-Puffer keinen Unterschied in der lytische Effizienz im Vergleich zum RIPA-

Puffer zeigten (Abschnitt 4.1.1). Eine Tendenz für einen effizienteren Zellaufschluss konnte für die SDS-basierten Puffer nach dem Waschschrift des Zellpellets mit Tris-Waschpuffer detektiert werden.

Um den Eintrag störender Agenzien gering zu halten wurden für die LF-Quantifizierung die Proben mit 0,5%igem SDS-Puffer aufgeschlossen. Der finale Aufschluss wurde, nach zwei Waschsritten mit Tris-Puffer, mit 0,5%igem SDS-Aufschlusspuffer und zusätzlicher Homogenisierung mit einer Einwegspritze sowie einem Einfrier-Auftauschritt bei -80°C und RT durchgeführt. Im Fall der MDCK_{SUS} Zellen steigerten die zusätzlichen Schritte die extrahierte Proteinkonzentration (Abb. 4.1). Für MDCK_{ADH} Zellen wurde eine Proteinkonzentration von $0,22 \pm 0,04$ mg Protein/ 1×10^6 Zellen und MDCK_{SUS} von $0,18 \pm 0,01$ mg Protein/ 1×10^6 Zellen ermittelt (Abb. 4.1).

4.1.2. 2-D DIGE Proteomanalytik

Bei der 2-D DIGE Proteomanalytik wird auf der Ebene der Proteine quantifiziert. Nach der 2-D PAGE befinden sich Proteine mit gleichen MW und gleichem pI in einem Spot (Abschnitt 3.4.2). In der vorliegenden Arbeit wurden vier Bereiche für die 2-D DIGE Analytik näher betrachtet:

1. Proteinseparation
2. Proteinidentifizierung
3. Proteinquantifizierung
4. Biologische Schwankung

Proteinseparation

Eine optimierte Proteinseparation zeichnet sich bei der 2-D PAGE durch klar definierte Abgrenzung der Proteinspots über die Dimensionen MW und pI aus. Dafür wurde die Probenvorbereitung für jedes Proteom unter Berücksichtigung der Spotqualität optimiert. Eine Übersicht über die Probenvorbereitung für die bearbeiteten Projekte ist in Tabelle 3.9 gezeigt. Besonderer Wert wurde auf die Reduktion von Arbeitsschritten gelegt, um den Einfluss auf die Proteinzusammensetzung möglichst gering zu halten. Final wurden zwei bis drei Waschsritte, die Zellyse, ein bis zwei Schritte für den mechanischen Aufschluss, eine Zentrifugation zum Abtrennen der unlöslichen Probenbestandteile und maximal eine Fällung durchgeführt.

Seit den 70er Jahren existiert die Methode der 2-D PAGE und erfuhr seither zahlreiche Verbesserungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden der pH-Bereich der IEF und die Ausrichtung

der SDS-PAGE für die untersuchten Systeme angepasst. Der Bereich für die pI-Auftrennung kann verschieden gewählt werden. Ein geringerer pH-Bereich erhöht die Auflösung der darin enthaltenen Proteine und ermöglicht eine verbesserte Spotttrennung. Die Proteine außerhalb des gewählten pH-Bereiches werden dann gar nicht oder schlecht separiert. Speziell für die Detektion viraler Proteine (z.B. NP, errechneter pI 9,63, UniProt KB) wurde ein weiterer pH-Bereich von 3-11 gewählt. Auf dem präparativen Gel des MDCK Zellproteoms während der Zelladaption konnten 908 Proteinspots im pH-Bereich 3-11 und 802 Proteinspots im pH-Bereich 4-7 detektiert werden (Abb. 4.2). Innerhalb des pH-Bereiches 4-7 der Proteinseparation mit dem pH-Bereich von 3-11 wurden 647 Proteinspots detektiert. Auf der anderen Seite konnten zusätzlich 261 Proteinspots im Basischen separiert werden (pH-Bereich 7-11), dass die Verwendung des weiten pH-Bereiches 3-11 bei der Untersuchung des MDCK Zellproteoms rechtfertigte (Abschnitt 3.4.2).

Durch eine verbesserte Fokussierung der Proteine in einem Spot kann die Auflösung verbessert werden. Zu Beginn dieser Arbeit wurde ein Elektrophoresesystem mit vertikaler Ausrichtung verwendet (GE Healthcare, verwendet für die Versuche: 3.2.6, 3.2.3). Mit dem Umstieg auf ein anderes Elektrophoresesystem wurde die Auftrennung nach dem MW von der vertikalen Ebene auf die horizontale Ebene verlagert (Serva, verwendet für die Versuche: 3.2.5, 3.2.4). Das horizontale System verwendet außerdem kommerziell erhältliche Gele mit 0,5 mm Dicke, während das vertikale System 1 mm dicke Gele aus manueller Herstellung verwendet (Abschnitt 3.4.2). Es konnte beim Vergleich beider Gelbilder eine Verbesserung der Proteinfokussierung (kleinere Spotflächen) beobachtet werden. Weiterhin zeigte die horizontale Auftrennung eines MDCK_{ADH} Proteoms eine verbesserte Separation im niedermolekularen Bereich (≤ 15 kDa) (Abb. 4.3).

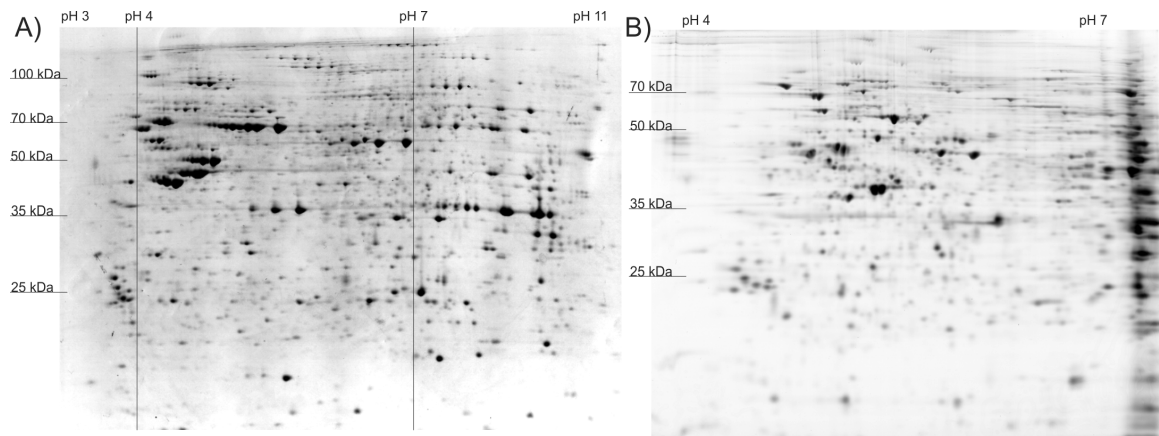


Abb. 4.2.: Vergleich der Gelbilder nach Verkleinerung des pH-Bereichs der Proteinauftrennung mittels IEF. A) pI Bereich pH-Wert 3 bis 11 (nicht linear), B) pI Bereich pH-Wert 4 bis 7 (linear). Als Probenmaterial diente Proteinextrakt der MDCK_{ADH} Zelllinie (Abschnitt 3.2.4). Die Proteine wurden vor der 2-D PAGE mit Dye 1 fluoreszenzmarkiert und im Gel mit Hilfe des Fluoreszenzscanners visualisiert (Abschnitt 3.4.6).

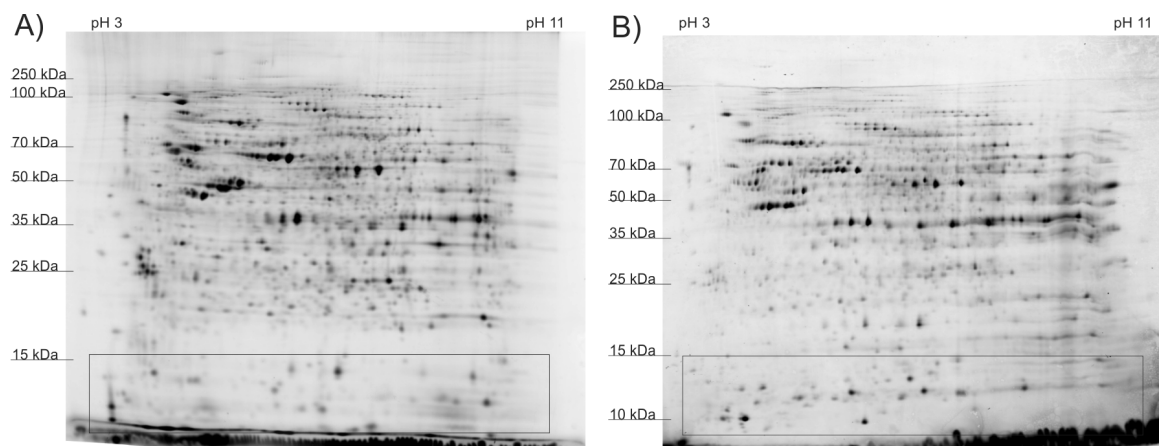


Abb. 4.3.: Vergleich der Gelbilder nach einer vertikalen und einer horizontalen 2-D PAGE. A) Vertikale 2-D PAGE, B) Horizontale 2-D PAGE. Die schwarzen Rechtecke heben den niedermolekularen Bereich (von ≤ 15 kDa bis zur Lauffront) hervor. Als Probenmaterial diente Proteinextrakt der MDCK_{ADH} Zelllinie (Abschnitt 3.2.4). Die Proteine wurden vor der 2-D PAGE mit Dye 1 fluoreszenzmarkiert und im Gel mit Hilfe des Fluoreszenzscanners visualisiert (Abschnitt 3.4.6).

Tab. 4.1.: Übersicht der Proteinidentifikationen der verschiedenen Projekte. Jede Proteinidentifizierung kann einem Proteinspot auf dem präparativen Gelen zugeordnet werden. Für vier der Projekte wurden diese Daten (präparatives Gel und zugehörige Identifizierungen) in der Datenbank GELMAP abgelegt und stellen projektbezogene Gelkarten dar. Die Übersicht aller identifizierten Proteine findet sich im Anhang A.2.

Projekt (Abschnitt)	Spotanzahl ¹	Einträge ²	Gelkarte
Zelladaption der MDCK _{ADH} Zellen (4.3)	908	498	https://gelmap.de/228
Vero Tollwutinfektion (4.2.2)	562	157	https://gelmap.de/1108
MDCK _{ADH} Influenzainfektion (4.6.1)	≈800 ³	266	https://gelmap.de/288
MDCK _{SUS} Influenzainfektion (4.6.1)	≈1000 ³	202	https://gelmap.de/297
MDCK Zelllinienvergleich (3.2.4)	853	65	(nicht erstellt)

1 – Anzahl aller detektierten Spots mit der Software Delta2D (Abschnitt 3.4.6), 2 – In der Datenbank GELMAP (Rode et al. 2011) eingetragene Proteinidentifizierungen, 3 – Gerundete Spotanzahl der drei Consensus Spotmuster der Projekte in der Software Delta2D (0, 8, 32 h p.i.; Abschnitt 3.4.6).

Proteinidentifizierung

Für die Identifizierung der Proteinspots wurde eine Hochdurchsatzanalytik mit der MALDI-TOF/TOF-MS etabliert (Abschnitte 3.4.3, 3.4.4). Diese Analytik ermöglichte auf einem präparativen Gel fast ausschließlich die Identifizierung eines einzigen Proteins pro Spot (Abschnitt 3.4.4). Die projektbezogenen Proteinidentifizierungen wurden in der Datenbank GELMAP als Gelkarten abgelegt (Tab. 4.1). Die Metadaten jedes identifizierten Spots enthalten den Proteinnamen, die Mascot-ID, den Mascot-Score, die Anzahl identifizierter Peptide und die Nummer des Gelspots. Die Gelkarten sind für jedes Proteom individuell und zeigten deutliche Unterschiede in den Gelbildern der Proteome beider Zelllinien (Abb. 4.4).

Fast die Hälfte aller Proteinidentifizierungen der Vero (46,35%) und MDCK Zellen (42,6%) konnten Struktur-, Stress- oder metabolischen Proteinen zugeordnet werden (Abb. 4.5, Abschnitt 3.4.5). Dasselbe spiegelte sich auch in den fünf am stärksten exprimierten Proteinspots des MDCK Zellproteoms (Gelkarte: MDCK Zelladaption, Tab. 4.1) wieder, mit der Zuordnung Keratin ($V_D(x_i) = 1,76\%$), Actin ($V_D(x_i) = 1,35\%$) und Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase ($V_D(x_i) = 1,3\%$, Abschnitt 3.4.6). Mit der niedrigsten Spotintensität ($V_D(x_i) = 0,0002\%$) konnte das Leucine-rich PPR-Motiv enthaltende Protein detektiert werden. Somit deckt die MALDI-TOF/TOF-MS Proteinidentifizierung in Kombination mit der 2-D DIGE bis zu fünf Größenordnungen der Proteinquantifizierung ab.

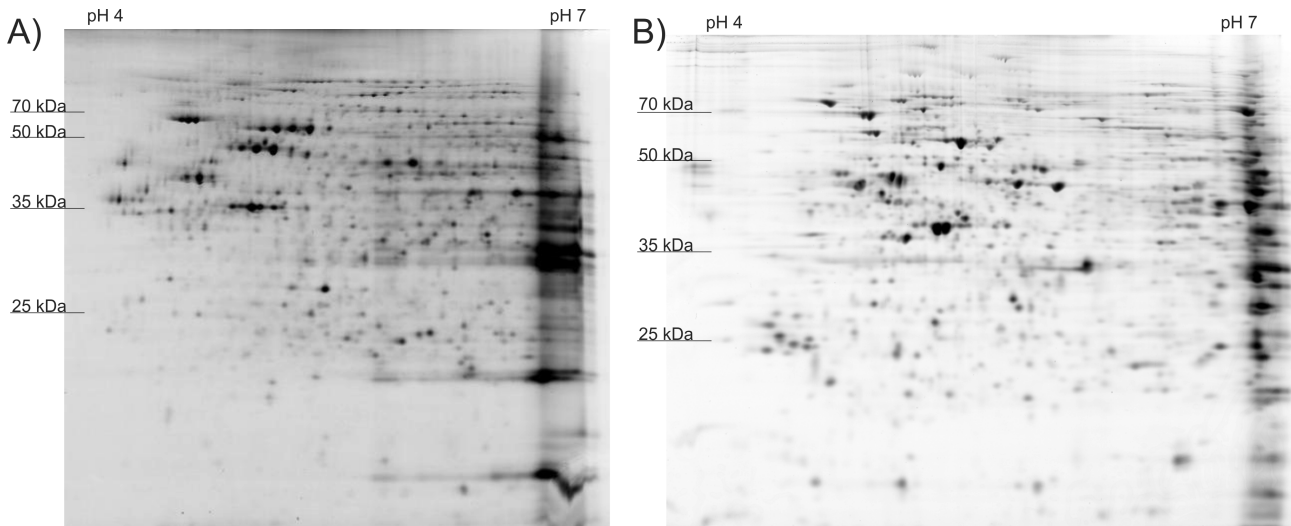


Abb. 4.4.: Vergleich der Gelbilder nach 2-D PAGE eines Vero und MDCK Zellproteoms. A) Vero_{SCM/SFM} Zellen (Abschnitte 3.2.6), B) MDCK_{ADH} Zellen (Abschnitte 3.2.4). Die Proteine wurden vor der 2-D PAGE mit Dye 1 fluoreszenzmarkiert und im Gel mit Hilfe des Fluoreszenzscanners visualisiert (Abschnitt 3.4.6).

Die Gelkarte des MDCK Zellproteoms zeigte, dass einige der Proteine mehrfach identifiziert wurden (Abb. 4.6). Die am häufigsten auftretenden Proteinidentifizierungen waren Keratin mit 33 Spots und Actin mit 15 Spots. Das bedeutet, jeder identifizierte Spot beschreibt eine Isoform einer Proteingruppe. Das wiederum bedeutet, dass die in dieser Arbeit identifizierten Proteine zu Proteingruppen gehören. Jedes Protein, das mehrfach (in mehreren Spots) identifiziert wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit nur einmal als identifiziert aufgeführt und zur Information wurden die Spotnummern der dazugehörigen Gelkarte angegeben.

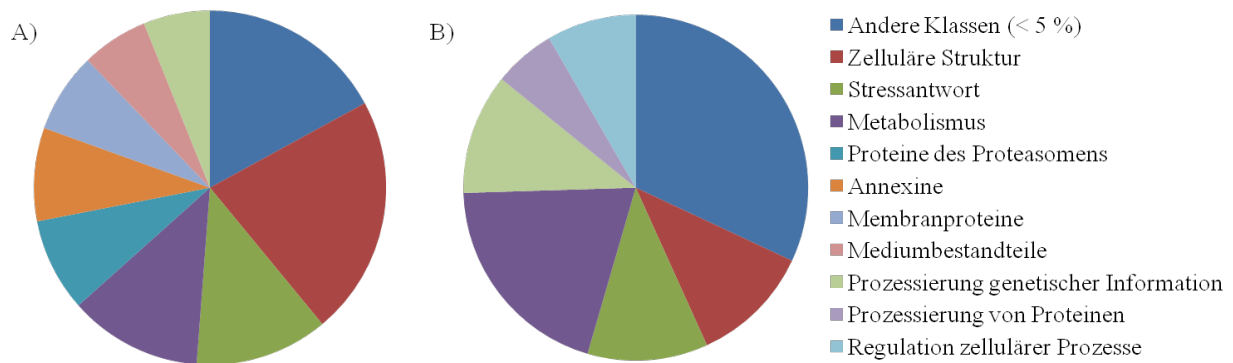


Abb. 4.5.: Funktionelle Klassifizierung der identifizierten Proteine auf den Gelkarten.

A) Gelkarte: MDCK Zelladaptation, B) Gelkarte: Vero Tollwutinfektion (Tab. 4.1). Die Klassifizierung wurde anhand der biologischen Prozesse und im Fall der Membranproteine anhand des zellulären Kompartiments vorgenommen, die in der Uniprot KB (Consortium 2014) hinterlegt sind (Abschnitt 3.4.5). Funktionelle Klassifizierungen, die weniger als 5% aller identifizierten Proteine beinhalteten, wurden bei dieser Betrachtung vernachlässigt.

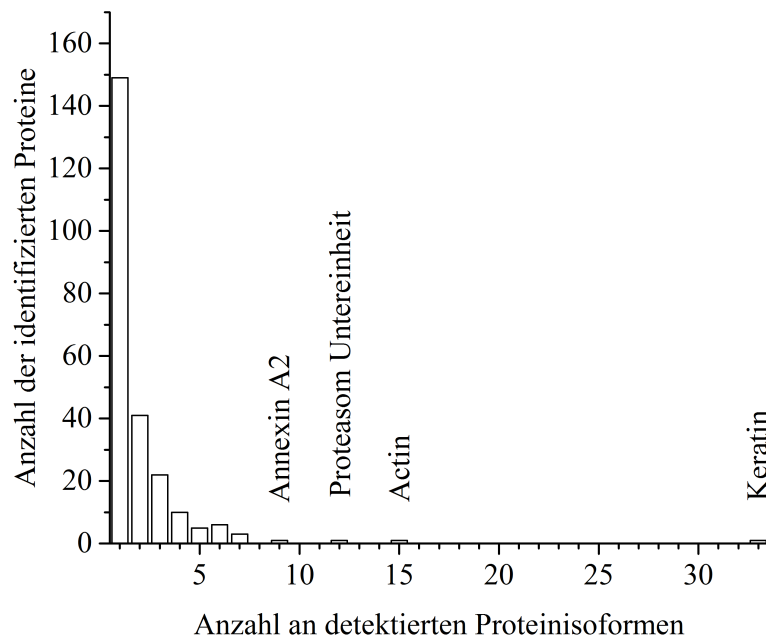


Abb. 4.6.: Verteilung der Anzahl detektierter Proteinisofomen auf der Gelkarte der MDCK Zelladaptation. Nach Identifizierung der Proteine mit Hilfe der MALDI-TOF/TOF-MS (Abschnitt 3.4.4) wurde die Anzahl detektierter Proteinisofomen gezählt.

Proteinquantifizierung

Bei der fluoreszenzbasierten Quantifizierung der Proteine fanden drei Farbstoffe Verwendung. Der interne Standard wurde ausschließlich mit Dye S gefärbt. Die Proben wurden mit Dye 1 und Dye 2 gefärbt. Eine Grundvoraussetzung für den Vergleich zweier Proben (z. B. Scheinin- fektion gegen Virusinfektion) ist die identische Färbefeffizienz der Farbstoffe Dye 1 und 2. Dafür wurde eine Probe der MDCK-Zelllinie je dreimal mit Dye 1 und Dye 2 fluoreszenzmarkiert. Die Mittelwerte der gemessenen 908 normalisierten Spotintensitäten $I_{g_j,F}(x_i)$ für den jeweiligen Farbstoff wurden in einem Streudiagramm aufgetragen (Abb. 4.7). Die lineare Regression wurde in der Software Origin durchgeführt und ergab den Anstieg nahe Eins (1,047) mit einem Pearson-Korrelationskoeffizient von $r = 0,98$. Dies bewies die Abhängigkeit beider Datensätze.

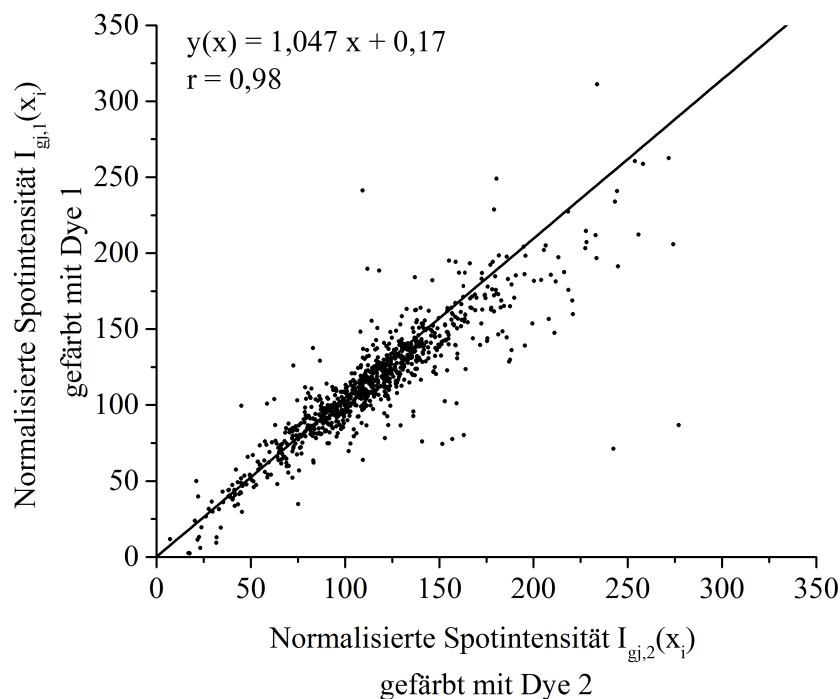


Abb. 4.7.: Streudiagramm der gemessenen Proteinintensitäten $I_{g_j,F}(x_i)$ für die mit Dye 1 und Dye 2 gefärbten Spots. Für den 2-D DIGE Ansatz wurde ein Proteinextrakt der stationär wachsenden MDCK_{ADH} Zelllinie verwendet (Abschnitt 3.2.4). Die Auswertung wurde in Delta2D durchgeführt (Abschnitt 3.4.6). Dargestellt sind die Mittelwerte von drei technischen Replikaten der gemessenen 908 normalisierten Spotintensitäten $I_{g_j,F}(x_i)$ für den jeweiligen Farbstoff. Die lineare Regression und die Bestimmung des Pearson-Korrelationskoeffizienten (r) wurden mit der Software Origin durchgeführt.

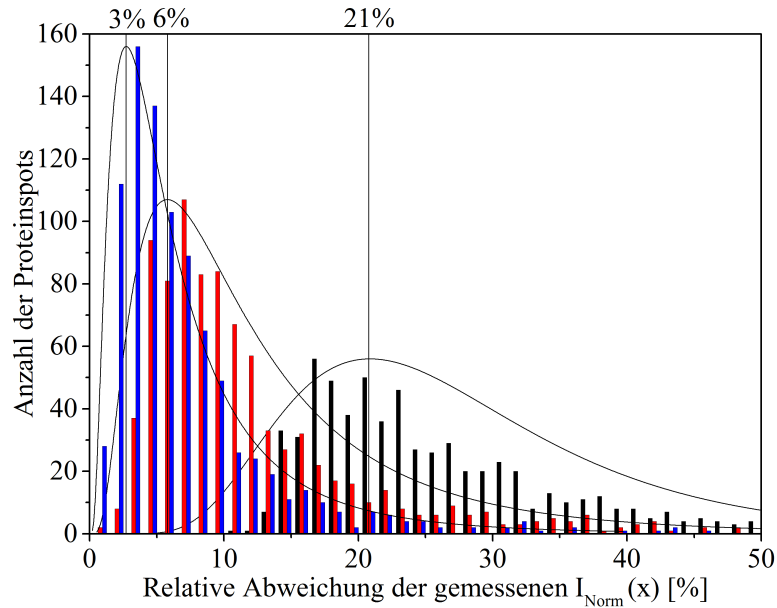


Abb. 4.8.: Verteilung der detektierten Proteinspots einer 2-D PAGE über die prozentuale Abweichung der normalisierten Proteinintensität $I_{Norm}(x)$. Prozentuale Abweichung der technischen Replikate in Bezug auf den ■ Mittelwert (relative Standardabweichung) und auf den ■ Median (relative MAD); ■ Prozentuale Standardabweichung der biologischen Replikate. Es wurden Proteinextrakte der stationär wachsenden MDCK_{ADH} Zelllinie verwendet (Abschnitt 3.2.4) welche für die 2-D DIGE Quantifizierung angefärbt wurden. Die logarithmische Normalverteilungen und ihr Maxima wurden mit der Software Origin bestimmt.

Die technischen Schwankungen, induziert durch unterschiedliche Färbefeffizienzen oder Laufunterschiede der 2-D PAGE, sollten geringer sein als die biologischen Schwankungen. Um beide Schwankung näher zu charakterisieren wurde die Verteilungen der relativen Standardabweichung vom Mittelwert untersucht (Abb. 4.8). Für die Beurteilung der technischen Schwankung wurde eine biologische Probe der MDCK-Zelllinie jeweils dreimal mit Dye 1 und 2 fluoreszenzmarkiert. Zur Bestimmung der biologischen Schwankung wurden drei biologische Replikaten der MDCK-Zelllinie je einmal mit beiden Farbstoffen angefärbt.

Die Histogramme der prozentualen Standardabweichungen vom Mittelwert der normalisierten Spotintensitäten $I_{g_j,F}(x_i)$ wurden in Origin erstellt. Die Verläufe der Histogramme folgten einer logarithmischen Normalverteilung deren Maximum für die technischen Replikate bei 6% und für die biologischen Replikate bei 21% lag. Damit war der Großteil der prozentualen Abweichung der Mittelwerte der technischen Replikate unterhalb der biologischen Abweichung. Von 908 Datenpunkten zeigten 15% der Mittelwerte der technischen Replikate eine höhere relative Standardabweichung als der Großteil der Mittelwerte der biologischen Replikate.

Die gemessene $I_{g_j,F}(x_i)$ hängt stark von der Qualität des Gels, der Proteinseparation und

des Fluoreszenzscans ab. Daher können einzelne Messwerte durch Staubpartikel oder Proteinschmier beeinflusst werden. Der Median und der Median der absoluten Abweichung (MAD) werden weniger stark von Extremwerten des Datensatzes beeinflusst. Um den Effekt für die Gelauswertung zu verdeutlichen, wurde für den gleichen Datensatz der technischen Replikate die Verteilung der relativen MAD vom Median bestimmt. Das Maximum der logarithmischen Normalverteilung lag bei 3% (Abb. 4.8). Von 908 Datenpunkten zeigten damit nur 5% eine höhere prozentuale Abweichung als der Großteil der Mittelwerte der biologischen Replikate mit 21%. In der vorliegenden Arbeit wurde daher bei der manuellen Auswertung (außerhalb der Software Delta2D) mit Hilfe der R Software der Median über die technischen Replikate berechnet (Abschnitt 3.4.6).

Die differenzielle Proteinexpression detektiert mit der 2-D DIGE Analyse wurde mittels eines Student's t-Tests oder einer ANOVA auf Signifikanz geprüft. Beide Testverfahren setzen normalverteilte Daten und Varianzhomogenität voraus. Dazu wurde der Shapiro-Wilk-Test auf die Proteinexpression (657 Datenpunkte) von sechs biologischen Replikaten einer MDCK-Zelllinie angewandt. Er besagt, dass die Nullhypothese (die Daten sind normalverteilt) in der Regel angenommen wird, wenn der errechnete p-Wert größer ist als das festgelegte Signifikanzniveau α . Bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$ kann für mehr als 99% der Daten eine Normalverteilung nicht ausgeschlossen werden (Abb. 4.9).

Der Levene-Test wurde auf die Proteinexpression aller technischen und biologischen Replikate der MDCK-Zelladaption (Abschnitt 3.2.3) angewandt (42 Gelbilder). Er besagt, dass die Nullhypothese (die Daten haben homogene Varianzen) in der Regel angenommen wird, wenn der errechnete p-Wert größer ist als das festgelegte Signifikanzniveau α . Bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$ kann für mehr als 89% der Daten homogene Varianzen angenommen werden (Abb. 4.10). Die Kriterien der Normalverteilung und Varianzhomogenität wurden daher von einem Großteil der Daten erfüllt.

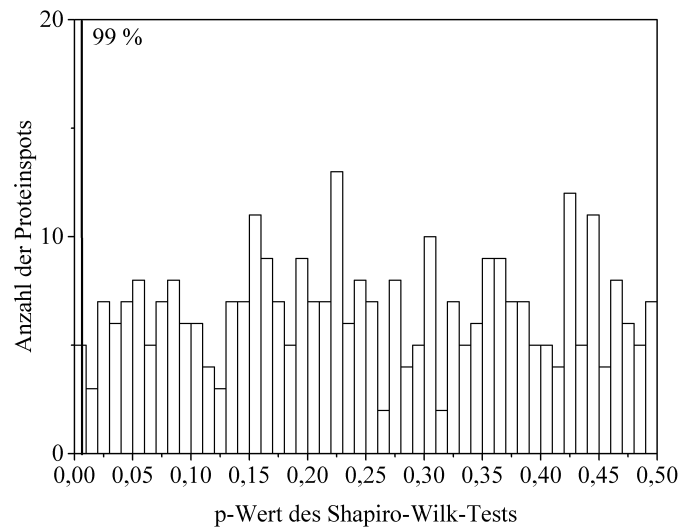


Abb. 4.9.: Verteilung der p-Werte des Shapiro-Wilk-Tests der gemessenen Daten I_{Norm} des Proteoms von MDCK_{SUS} Zellen. □ Gruppierung der Proteinspots nach dem p-Wert, ■ Festgelegtes Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$. Die Abbildung zeigt nur einen Teil der Daten bis p-Wert 0,5. Für die 2-D PAGE wurden Proteinextrakte der MDCK_{SUS} Zelllinie bei einer Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen/mL verwendet (Abschnitt 3.2.4), die mit Dye 1 und Dye 2 angefärbt wurden. Der Test erfolgte über sechs biologische Replikate mit der R-Software (Abschnitt 3.4.6). Bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$ kann für mehr als 99% der Daten eine Normalverteilung nicht ausgeschlossen werden (Abb. 4.9).

Biologische Schwankung

Für die Beurteilung des Ergebnisses ist nicht nur die Wahl des Signifikanztests entscheidend, sondern auch die Berücksichtigung der biologischen Schwankung. Um eine Vorstellung darüber zu bekommen, wie sehr die extrahierten Zellproteome in ihrer Expression schwanken, wurden Proteomlysate der MDCK_{ADH} und der MDCK_{SUS} Zelllinien auf Unterschiede zwischen drei biologischen Replikaten geprüft. Dafür wurden Spinnerkultivierungen untersucht, die anschließend für die Replikation von Influenzaviren verwendet wurden (Abschnitt 3.2.5, zelluläres Proteom 0 h p.i.).

Für die statistische Auswertung wurden die Gelbilder der parallelen Kulturen mit Hilfe von Delta-2D ausgewertet (drei biologische Replikate mit je zwei parallelen Kulturen für die Schein- und Virusinfektion und je zwei technischen Gelläufen für die Quantifizierung, Abschnitt 3.4.6, ANOVA, p-Wert 0,05). Die Auswertung der Gelbilder der MDCK_{ADH} Zellen ergab 49 Spots mit differenziell exprimierten Proteinen innerhalb der drei unabhängigen biologischen Replikate. Die MDCK_{SUS} Zellen zeigten zwei signifikant veränderte Spots.

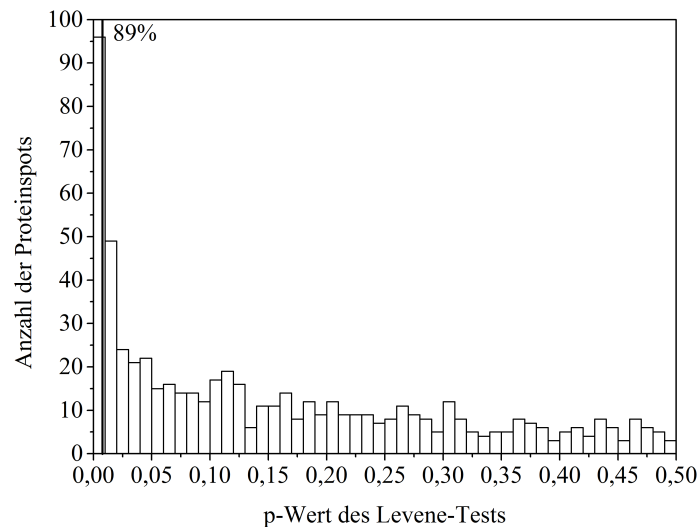


Abb. 4.10.: Verteilung der p-Werte des Levene-Tests der gemessenen Daten I_{Norm} während der MDCK Zelladaption. Gruppierung der Proteinspots nach dem p-Wert, Festgelegtes Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$. Die Abbildung zeigt nur einen Teil der Daten bis p-Wert 0,5. Die Messdaten stammen von den mit 2-D PAGE separierten Proteinextrakten der MDCK Zelladaption (Abschnitt 3.2.3). Der Test wurde über die vier Probenahmezeitpunkte und deren Replikate (42 Gelbilder) mit der R-Software durchgeführt (Abschnitt 3.4.6). Bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$ kann für mehr als 89% der Daten homogene Varianzen angenommen werden (Abb. 4.10).

Der Signifikanztest zur Bestimmung der differentiellen Expression zwischen Schein- und Virusinfektion sollte für das untersuchte Beispiel zur TOI (0 h p.i.) keine signifikante Expression ergeben. Der angewandte Student's t-Test (p-Wert 0,05; 1,3-facher Differenz) bestätigte dieses Ergebnis. Damit ist für das Ziel des Versuches mit dem gewählten Test auf Signifikanz die Durchführung von drei biologischen Replikaten ausreichend.

4.1.3. *Label free* Proteomanalytik

Die Quantifizierung von Proteinen basiert bei der LF-Proteomanalytik auf der Detektion von tryptischen Peptiden, wobei Aminosäuresequenzen mit überlesenen Schnittstellen oder fehlerhaft gespaltenen Peptiden (z.B. semitryptische Peptide) meist von der anschließenden Auswertung ausgeschlossen werden. Daher sind die Reproduzierbarkeit und die Vollständigkeit der proteolytischen Spaltung für eine verlässliche Quantifizierung von Bedeutung. Mit Hilfe der in der Literatur beschriebenen monolithischen Separationsmethode (Burkhart et al. 2012) wurde die Verdaueffizienz der tryptischen Spaltung (Abschnitt 3.4.3) untersucht. Die Methode ermöglicht die parallele Auftrennung von Proteinen und Peptiden innerhalb eines LC-Laufs,

bei der Proteine aufgrund ihrer erhöhten Hydrophobizität zu einem späteren Zeitpunkt von der Trennsäule eluieren als Peptide (Abschnitt 3.4.2).

Der Unterschied einer enzymatisch gespaltenen Probe und eines unverdauten Zellysats zeigte eine klare Separation der Peptide und Proteine (Abb. 4.11, exemplarisch für die MDCK_{ADH} Zelllinie, 7 h Inkubation, 1:50 – Enzym:Substrat). Daran angelehnt wurde eine Unterscheidung der drei Bereiche tryptische, semi-tryptische und nicht tryptische Peptide erzielt. Der semi-tryptische Bereich wurde manuell innerhalb der Überschneidung der Chromatogramme der verdauten und unverdauten Probe gewählt. Die Chromatogramme der unbehandelten Probe (Zellysat von MDCK_{ADH}, Abb. 4.11) ließen auf eine hohe Komplexität der Probe schließen. Für die behandelten Proben konnte nach 12 min ein Anstieg des UV-Signals detektiert werden. Da dieser Anstieg in der unbehandelten Probe nicht detektiert wurde, ist dieser auf eine hohe Anzahl eluierender Peptide zurückzuführen.

Es wurden drei Versuchsprotokolle, das Enzym:Substrat-Verhältnis und die Inkubationszeit für die enzymatische Reaktion getestet (Abschnitt 3.4.3). Während das Enzym:Substrat-Verhältnis und die Inkubationszeit keinen deutlichen Effekt auf die Chromatogramme hatten (Daten nicht gezeigt), zeigten sich Unterschiede zwischen den Versuchsprotokollen (Abschnitt 3.4.3). Protokoll 3 ergab die größte relative Peakfläche im Bereich erwarteter tryptischer Peptide (Abb. 4.12).

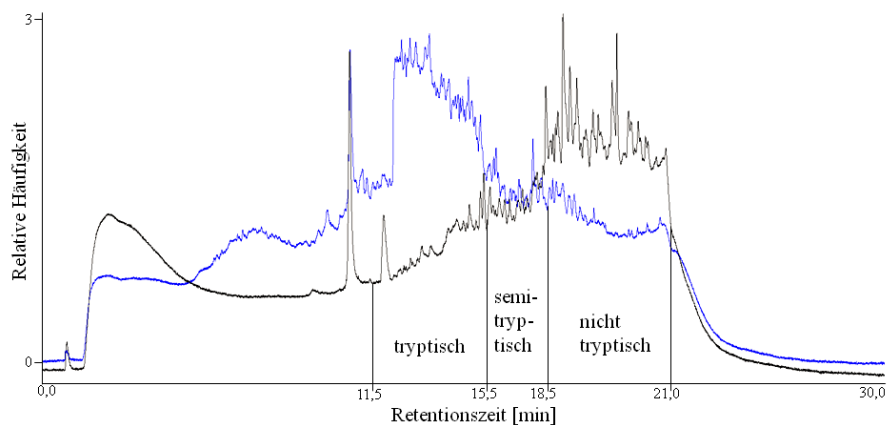


Abb. 4.11.: Kontrolle der enzymatischen Reaktion des Trypsins zur Spaltung von Proteinlysaten mittels monolithischer Auftrennung. Behandeltes (■) und unbehandeltes (■) Proteinlysate der MDCK_{ADH} Zelllinie. Die monolithische Auftrennung wurde mittels UV-Detektion bei 214 nm bestimmt (Abschnitt 3.4.2). Die Auswertung der Peakflächen und der Export der Chromatogramme erfolgte mit der Software Chromeleon.

Für den ersten Durchlauf der MS-Analytik wurde das Protokoll 3 mit einem Enzym:Substrat-Verhältnis von 1:50 und 7 h Inkubationszeit verwendet. Im Kooperationslabor von Prof. Dr. rer. nat. Albert Sickmann traten jedoch Schwierigkeiten bei der LC-Separation auf, die

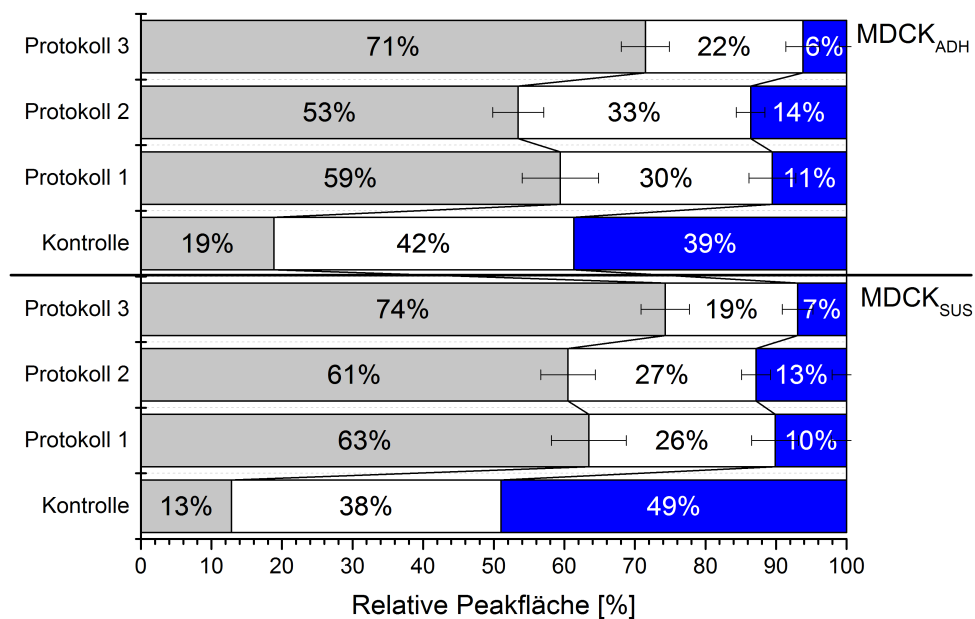


Abb. 4.12.: Optimierung der tryptischen Spaltung zellulärer Proteinlysate mit drei Versuchsprotokollen. ■ Tryptische Peptide, □ semitryptische Peptide, ■ nicht tryptische Peptide. Es wurden drei Versuchsprotokolle durchgeführt (Abschnitt 3.4.3). Die monolithischen Auftrennungen wurde mittels UV-Detektion bei 214 nm bestimmt (Abschnitt 3.4.2) und mit der Software Chromeleon ausgewertet (Vergl. Abb. 4.11). Die Kontrolle entspricht der unbehandelten Probe.

auf Störsubstanzen schließen ließen. Die Chromatogramme der technischen und biologischen Replikate verliefen nach der dritten Probeninjektion nicht reproduzierbar. Daher wurde in einem weiteren Optimierungsschritt für den tryptischen Verdau FASP verwendet (Abschnitt 3.4.3, Manza et al. (2005), Wiśniewski et al. (2009)). Das Einsetzen von Filtern ermöglichte das intensive Waschen der Proben vor der tryptischen Spaltung.

Für den Vergleich der Zelllinien MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} wurden je drei Kultivierungen durchgeführt und die extrahierten Proteome dreimal tryptisch über FASP gespalten. Die neun Wiederholungsmessungen beider Zelllinien zeigten in den LC-UV-Chromatogrammen einen hohen Grad an Vergleichbarkeit (Abb. 4.13). Die Signalintensität der 18 Läufe lässt auch auf vergleichbare Proteinkonzentrationen schließen, die nach Zellyse mit BCA-Assay bestimmt wurden (Abschnitt 3.4.6).

Die hohe Reproduzierbarkeit der Messungen ermöglichte ein Alignment aller 18 Verläufe (neun LC-MS/MS-Läufe je Zelllinie) in der Software Progenesis (Nonlinear Dynamics). Damit wurde die Grundlage für die relative Quantifizierung geschaffen. Bevor auf Proteinebene eine quantitative Aussage getroffen werden kann, müssen die Peptide identifiziert werden und über Datenbankeinträge den Proteinen zugeordnet werden. Die anschließende MS-Analyse und Datenbanksuche resultierte in je $3 - 3,5 \times 10^4$ Peptiden, welche 2×10^3 Proteinen zugeordnet werden konnten (Abb. 4.14). Im Durchschnitt unterschieden sich die biologischen Wiederholungsmessungen (enthalten Messungen von drei tryptischen Spaltungen) in je 250 identifizierten Proteinen. Dies entsprach einer Übereinstimmung von 90% (Abb. 4.15).

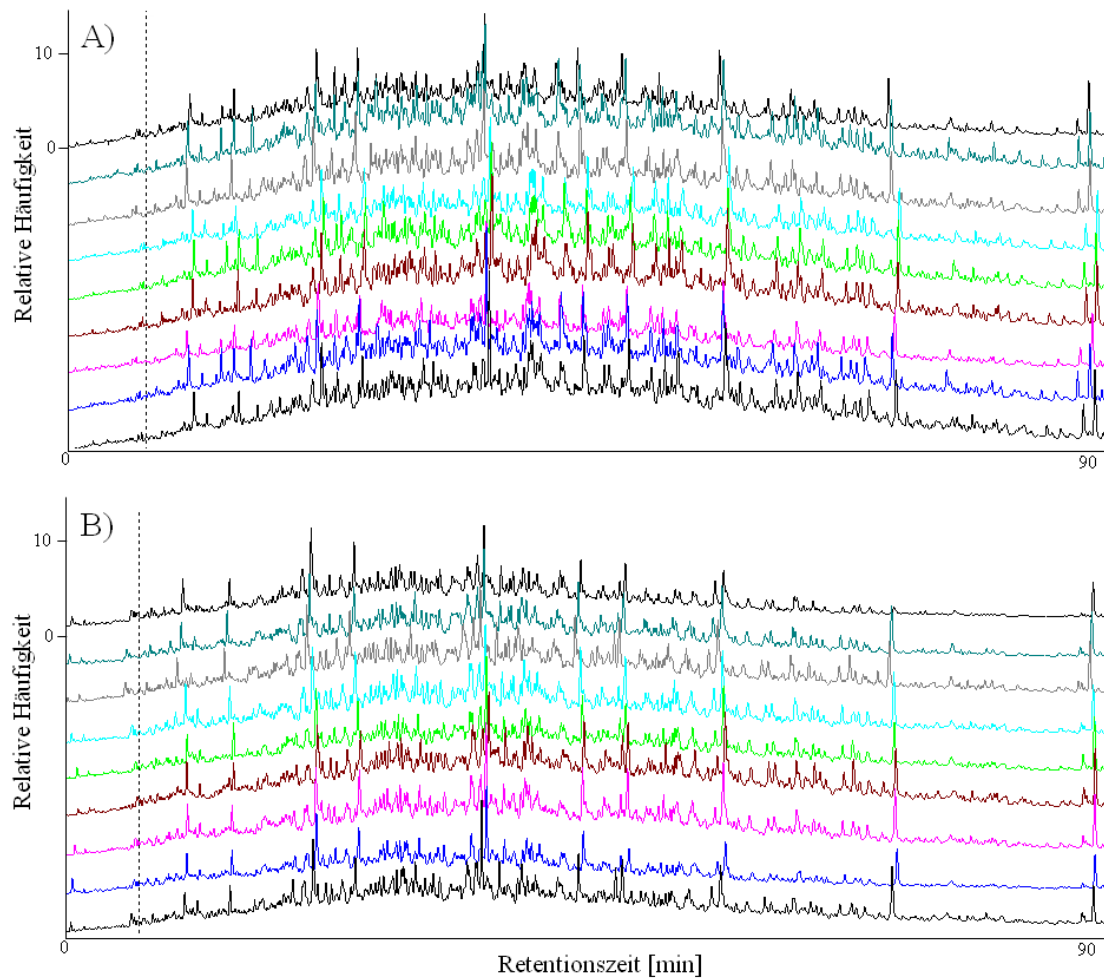


Abb. 4.13.: Qualitätskontrolle mittels nano-HPLC Auftrennung von tryptisch gespaltenen Proteinlysaten. Chromatogramme von neun Replikaten tryptisch gespaltenen Proteinlysate (verschieden farblich markiert) von A) MDCK_{ADH} und B) MDCK_{SUS} Zellen. Die Probenahme erfolgte während der exponentiellen Wachstumsphase (Abschnitt 3.2.4). Nach Ethanol-Fällung wurden die Proteinlysate über FASP enzymatisch gespalten (Abschnitt 3.4.3). Die Chromatogramme wurden von der Software Chromeleon exportiert. Die LC Auftrennung für anschließende MS Analytik wurde mittels UV-Detektion bei 214 nm gemessen (Abschnitt 3.4.2).

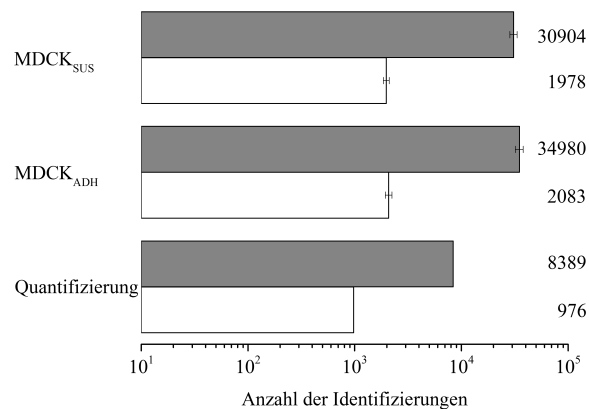


Abb. 4.14.: Anzahl identifizierter Peptide und Proteine der LC-MS/MS-Läufe. ■ Peptide, □ Proteine. Jedes der neun Replikate für die Zelllinien wurde einzeln, mit Hilfe der Software Proteome-Discoverer, analysiert (Abschnitt 3.4.5; n=9). Anschließend wurden die Mittelwerte der Anzahl identifizierter Peptide und Protein gebildet. Ein Filter für ≥ 2 Peptide pro Protein für mindestens eine Zelllinie resultierte in 976 Proteinen (8389 Peptide), welche für die vergleichende Quantifizierung beider Zelllinien verwendet werden konnten.

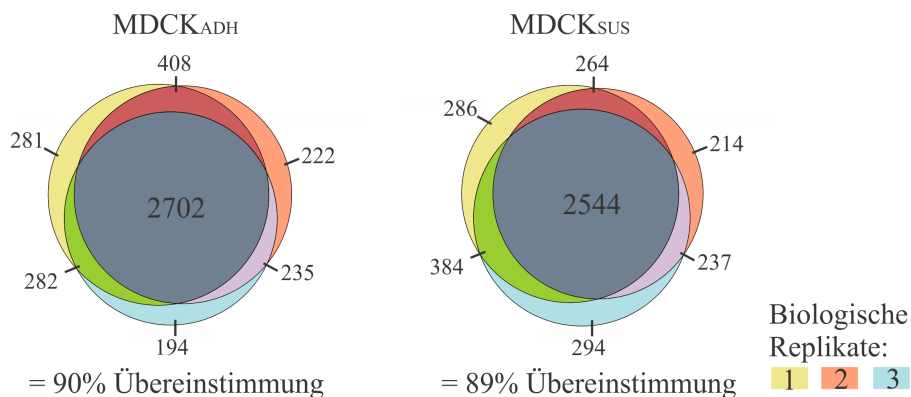


Abb. 4.15.: Übereinstimmung detektierter Proteine bei LC-MS-Messungen von drei biologischen Replikaten der MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zelllinie. ■ Bereich der Übereinstimmung. Die Anzahl der detektierten Proteine für jede der drei durchgeführten Kultivierungen für die MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zelllinie und deren Übereinstimmung untereinander wurde ermittelt. Die Peptidaufbereitung und anschließende LC-MS-Messung wurde für jedes Proteinextrakt dreimal durchgeführt und die Summe der detektierten Proteine mit Hilfe der Software Proteome-Discoverer bestimmt (Abschnitt 3.4.5).

Eine Peptididentifizierung des kompletten Datensatzes mit Hilfe des Suchalgorithmus der SearchGUI (18 LC-MS-Läufe) resultierte in 3183 Proteinen. Ein zusätzlicher Filter für ≥ 2 Peptide pro Protein für mindestens eine Zelllinie resultierte in 976 Proteinen, welche für die vergleichende Quantifizierung beider Zelllinien verwendet werden konnten. Jeweils 101 und 173 Proteini-

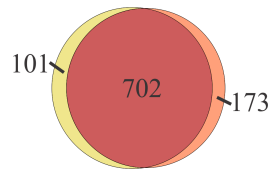


Abb. 4.16.: Übereinstimmung aller identifizierten und quantifizierten Proteine für MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zellen. ■ Bereich der Übereinstimmung, ■ MDCK_{ADH} Zellen, ■ MDCK_{SUS} Zellen. Es wurden alle LC-MS/MS-Daten mit der Progenesis Software kombiniert, die Proteinidentifizierung durchgeführt (Abschnitt 3.4.5) und mit den quantitativen Daten kombiniert (Abschnitt 3.4.6).

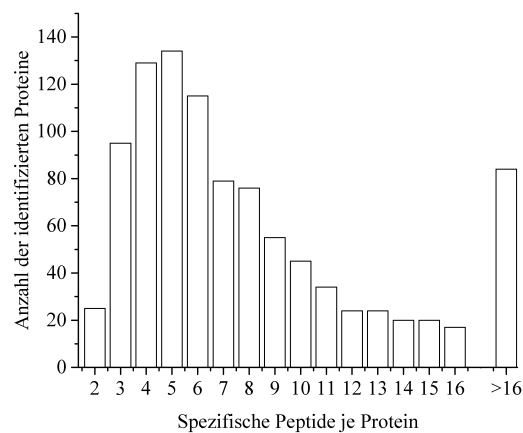


Abb. 4.17.: Verteilung der Proteine über die Anzahl spezifischer Peptide für die Quantifizierung. Es wurden 976 detektierte Proteine für die anschließende Quantifizierung näher betrachtet. Die Uniprot KB (Art: *Canis familiaris*) wurde als Grundlage von der Software Progenesis für die Proteinidentifizierung verwendet und bestimmt das Vorkommen spezifischer Peptide pro Protein.

identifizierungen konnten ausschließlich für die MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zelllinien detektiert werden (Abb. 4.16). Die meisten Proteine wurden mit fünf spezifischen Peptiden identifiziert (Abb. 4.17), was eine robuste LF-Quantifizierung gewährleistete.

4.2. Untersuchung der Zelllinien für die Virusreplikation

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Zelllinien für die Vermehrung zweier Virusarten verwendet: 1) MDCK Zelllinien für die Influenzavirusreplikation und 2) Vero Zelllinien für die Tollwutvirusreplikation. Beide Zelllinien wurden an verbesserte Kultivierungsbedingungen adaptiert. Die Wachstums- und Virusreplikationsverhalten mit den gewählten Kultivierungsbedingungen (Abschnitte 3.2.5 und 3.2.6) wurden vor und nach Adaption für die Zelllinien untersucht (Abschnitt 3.3) und sind in diesem Kapitel näher beschrieben. Als Referenz für jede Virusinfektion wurde parallel eine Scheininfektion durchgeführt.

4.2.1. MDCK Zelllinien für die Influenzavirusreplikation

Die Veränderungen des Proteoms während einer Influenzainfektion wurden sowohl für die MDCK_{ADH} als auch für die MDCK_{SUS} Zelllinien untersucht. Als Bezugspunkt für die virusinduzierte Proteinexpression wurde jeweils eine parallele Kultur im gleichen System mit gleicher Behandlung als Scheininfektion mitgeführt. Beide MDCK Zelllinien wurden weiterhin unter vergleichbaren Bedingungen kultiviert (Abschnitt 3.2.5).

Nach der Wachstumsphase erreichten alle Kulturen eine Zellkonzentration von $1,8 - 2,2 \times 10^6$ Zellen/mL (Abb. 4.18 A). Vor der Viruszugabe wurden die Zellen gewaschen und frisches Medium zugegeben. Die Zellkonzentration der scheininfizierten Spinnerkulturen von MDCK_{ADH} Zellen blieb über den betrachteten Zeitraum stabil. Bei der verwendeten Microcarrierkonzentration von 2 g/L mit einer begrenzten Wachstumsfläche wurde maximal eine Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen/mL erneut erreicht (Bock et al. 2009). Die virusinfizierten MDCK_{ADH} Kulturen zeigten eine Abnahme der Zellkonzentration auf $1,3 \times 10^6$ Zellen/mL (Abb. 4.18 A). Am Ende der Kultivierung wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen/mL im Überstand bestimmt (Daten nicht gezeigt).

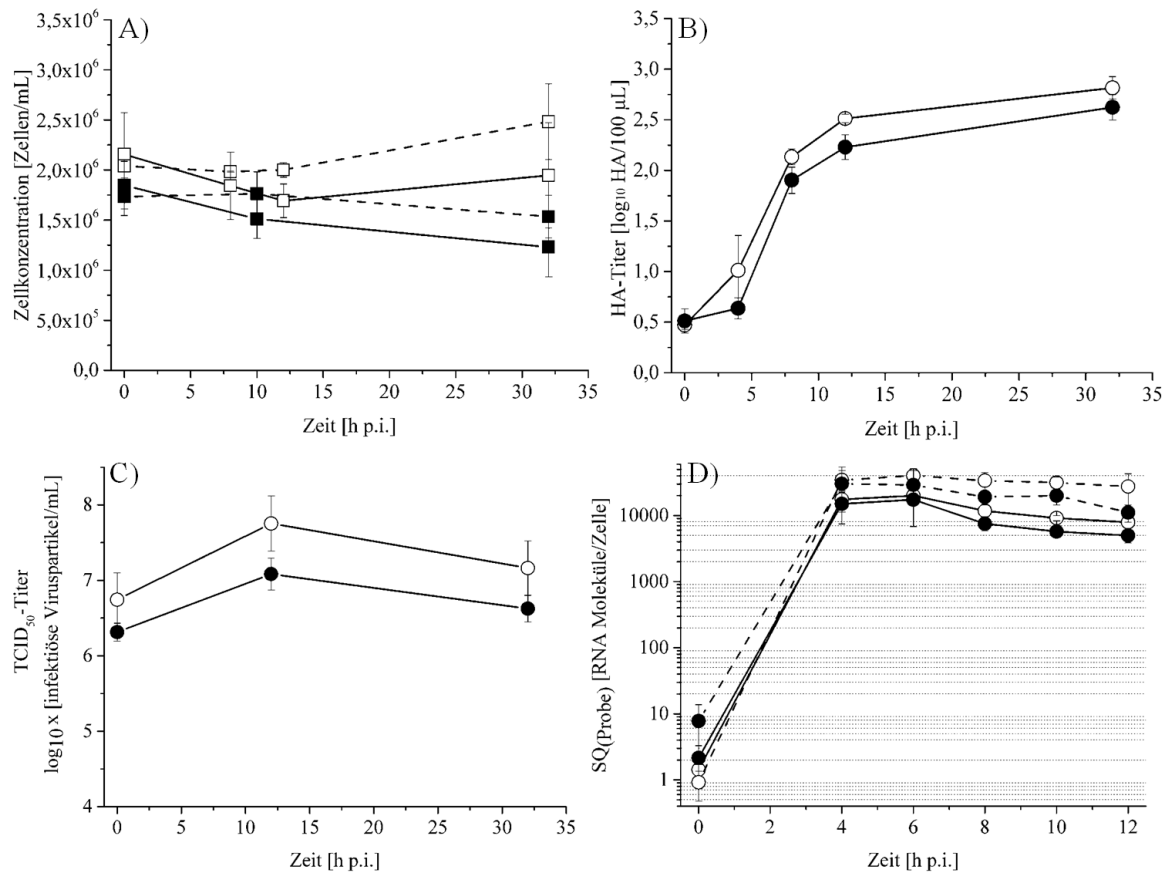


Abb. 4.18.: Zellkonzentration und Influenzavirusvermehrung in 250 mL Spinner_{PA}-Kultivierungen von MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zellen. ■ ● – MDCK_{ADH} Zellen, □ ○ – MDCK_{SUS} Zellen. Dargestellt sind A) die Zellkonzentration (– Virusinfektion, - - Scheininfektion), B) der HA-Titer, C) der TCID₅₀-Titer und D) die Ergebnisse der RT-qPCR (– Segment 5, Nukleoprotein; - - Segment 7, Matrixproteine). Die Infektion wurde mit MOI 6, Mediumswechsel und ohne Zugabe von Trypsin zur TOI für drei biologische Replikate durchgeführt (Abschnitt 3.2.5, Standardabweichung für n=3).

Zu Beginn der Infektionsphase bis 12 h p.i. zeigten die scheininfizierten Kulturen der MDCK_{SUS} Zelllinie eine stabile Zellkonzentration und 32 h p.i. eine Zunahme auf $2,5 \times 10^6$ Zellen/mL. Da Suspensionszellen keine begrenzende Wachstumsoberfläche haben, setzten die Zellen nach Mediumswechsel das Wachstum fort. Die virusinfizierten Kulturen zeigten 12 h p.i. nur eine geringe Abnahme der Zellkonzentration und eine geringe Zunahme 32 h p.i. (Abb. 4.18 A). Die Zellvitalität lag am Ende der Kultivierung bei 70% für die virusinfizierte Kultur.

Die Virusvermehrung gemessen mit HA-Assay, TCID₅₀-Assay und RT-qPCR resultierte in ähnlichen Verläufen mit geringen Unterschieden zwischen beiden Zelllinien (Abb. 4.18 B, C, D). Die letzte Probenahme erfolgte 32 h p.i., da dann das Kulturvolumen erschöpft war (mindestens 100 mL Medium, um effizientes Rühren zu gewährleisten). Da für eine synchrone Infektion eine hohe MOI von 6 eingestellt wurde (Vester et al. 2009), konnte bereits zum TOI ein HA-Signal gemessen werden. Ein erster signifikanter Anstieg des HA-Titers (Student's t-Test, p-Wert $\leq 0,05$) wurde 4 h p.i. für MDCK_{SUS} aber erst 6 h p.i. für MDCK_{ADH} Zellen detektiert (Abb. 4.18 B). Zum Zeitpunkt 12 h p.i. konnte für MDCK_{SUS} ein signifikant höheres Signal (Student's t-Test, p-Wert $\leq 0,05$, $0,3 \log_{10}$ HA/100 μ L höher) als für MDCK_{ADH} gemessen werden. Die höheren Zellkonzentration von MDCK_{SUS} Kulturen könnten eine Ursache für die Unterschiede im HA-Verlauf sein. Um diesen Aspekt auszuschließen, wurden die zellspezifische Virusausbeuten mit Bezug auf die maximale Zellzahl und den maximalen HA-Titer berechnet (Peschel et al. 2013). Diese resultierten in 4600 ± 770 Viren/Zelle für MDCK_{ADH} Zellen und 6200 ± 400 Viren/Zelle für MDCK_{SUS} Zellen. Der finale HA-Titer zeigte $2,6 \log_{10}$ HA/100 μ L für beide Zelllinien (Abb. 4.18 B). Die TCID₅₀ Titerbestimmung resultierte 12 h p.i. in $2,5 \times 10^7$ infektiöse Viruspartikel/mL für MDCK_{ADH} und $7,6 \times 10^7$ infektiöse Viruspartikel/mL für MDCK_{SUS} (Abb. 4.18 C).

Die Expression der viralen mRNA wurde für Segment 5 (NP) und Segment 7 (Matrixproteine) mit Hilfe der RT-qPCR verifiziert (Abschnitt 3.3.6). Beide Virussegmente wurden gewählt, da sie überwiegend frei an *defektive interfering particles* (DIP) sind, welche die Quantifizierung stören könnten (Frensing et al. 2013). Die maximale Anzahl an viralen mRNA Segmenten wurde für beide Zellen zwischen 4 und 6 h p.i. detektiert (Abb. 4.18 D). Es wurden maximal 2×10^4 Moleküle/Zelle für Segment 5 und 4×10^4 Moleküle/Zelle für Segment 7 erreicht. Anschließend nahm die Anzahl an mRNA Segmenten leicht ab. Über den gesamten Verlauf der Infektion zeigten MDCK_{SUS} Zellen eine höhere mittlere Anzahl an mRNA Segmenten als MDCK_{ADH} Zellen (Abb. 4.18 D).

Die maximale virale mRNA Expression des Segments 5 (NP) wurde zwischen 4 und 6 h p.i. für beide Zelllinien erreicht. Folglich sollten 8 h p.i. auch die Proteinexpression für die Zellen, welche bei TOI infiziert wurden, mit NP-Fluoreszenzmarkierung und DFZ detektierbar sein. Für $96 \pm 0,3\%$ (Standardabweichung von $n=3$, biologische Replikate) aller MDCK_{ADH} Zellen

konnte 8 h p.i. ein NP-Signal detektiert werden. Im Gegensatz zeigten die MDCK_{SUS} Zellen nur bei $68 \pm 11\%$ (Standardabweichung von $n=3$, biologische Replikate) ein NP-Signal. Für den späten Infektionszeitpunkt (32 h p.i.) zeigten beide Zelllinien 100% NP-Signal (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse gaben einen Eindruck über die Synchronität aller Spinnerkultivierungen. Weiterhin wurde die Wahl des Probenahmezeitpunkts der frühen Infektionsphase (8 h p.i.) für DFZ- und Proteomanalysen verifiziert.

Die Anwendung des TUNEL Assays auf die hoch MOI Kulturen zum späten Zeitpunkt der Infektion (32 h p.i.) resultierte für MDCK_{ADH} Zellen in $20 \pm 10\%$ (Standardabweichung von $n=3$, biologische Replikate) und für MDCK_{SUS} Zellen in $35 \pm 14\%$ (Standardabweichung von $n=3$, biologische Replikate) apoptotisch, infizierten Zellen (Daten nicht gezeigt).

4.2.2. Vero Zelllinien für die Tollwutvirusreplikation

Für Vero Zellen wurde der Einfluss der Zelladaption an optimiertes Medium frei von tierischen Produkten untersucht. Unter den gewählten Kultivierungsbedingungen (Abschnitt 3.2.6) wurden vor und nach Adaption vergleichbare Zellkonzentrationen von durchschnittlich $4 - 4,7 \times 10^6$ Zellen/mL für SCM/SFM und $4,6 - 5,5 \times 10^6$ Zellen/mL für IPT-AFM erreicht (Abb. 4.19). Die virusinfizierten Kulturen verglichen mit den scheininfizierten Kulturen ließen nach der Vi-

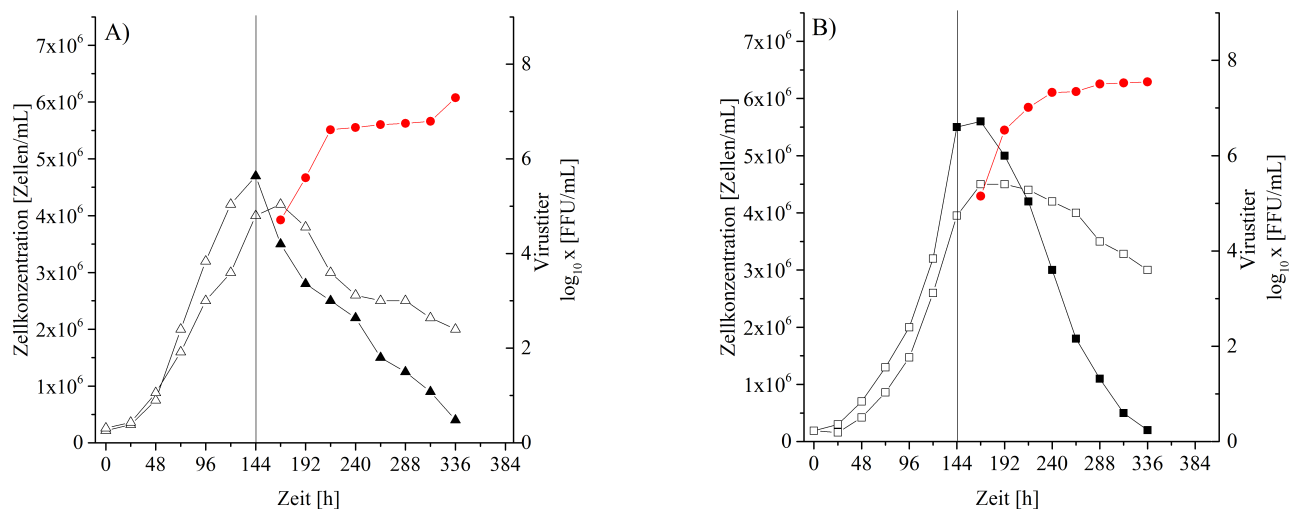


Abb. 4.19.: Zellkonzentration und Tollwutvirusvermehrung in Vero Zellen kultiviert im 2 L Bioreaktor. (▲ △) Zellinfektion in SCM/SFM, (■ □) Zellinfektion in IPT-AFM, volle Symbole – Virusinfektion, leere Symbole – Wachstum und Scheininfektion, (●) Virusiter der infizierten Kultur. Dargestellt ist ein, bestimmt mit dem Hämazytometer, repräsentativer Verlauf der Zellkonzentration von Vero Zellen. Der vertikale Strich zeigt die TOI mit MOI 0,1. Die Infektion wurde in SCM/SFM mit Mediumswechsel und in IPT-AFM ohne Mediumswechsel 144 h nach Inkulturnahme durchgeführt (Abschnitt 3.2.6).

rusinfektion (TOI = 144 h) eine stärkere Abnahme der Zellkonzentration beobachten. Die virusinfizierte Zellkultur nahm mit einer Rate von 22 400 Zellen/(mL h) (ab 144 h) für SCM/SFM und 37 500 Zellen/(mL h) (ab 168 h) für IPT-AFM ab. Die scheininfizierten Kulturen zeigten eine Abnahme von 13 100 Zellen/(mL h) (ab 168 h) für SCM/SFM und 10 400 Zellen/(mL h) (ab 192 h) für IPT-AFM. Die Virusproduktion resultierte in ähnlichen viralen Titern von $1,95 \times 10^7$ FFU/mL für SCM/SFM und $3,54 \times 10^7$ FFU/mL für IPT-AFM (Abb. 4.19).

4.3. Zelladaption an Suspensionswachstum in chemisch definiertem Medium

Im folgenden Kapitel werden die Veränderungen des Proteoms während einer Adaption von MDCK_{ADH} Zellen an Suspensionswachstum in chemisch definiertem Medium beschrieben (Abb. 3.1). Für die Proteinanalytik wurden kritische Zeitpunkte der Adaption, im Folgenden als Stadien bezeichnet, gewählt (Tab. 3.3). Es wurden zwei unabhängige Adaptionen, Adaption 1 und 2 (Abb. 3.1), mit je zwei bis drei biologischen Replikaten näher untersucht. Um globale Effekte der zweiphasigen Zelladaption zu beobachten, wurden beide Adaptionen gemeinsam ausgewertet.

4.3.1. Reproduzierbarkeit der Zelladaption

Vor der gemeinsamen Auswertung für Adaption 1 und 2, sollte festgestellt werden, wie unterschiedlich sich die Adaptionsansätze auf der Ebene der Proteomantwort verhielten. Die statistische Analyse über die Adaptionsstadien in Delta2D (Abschnitt 3.4.6, ANOVA, p-Wert $\leq 0,01$, zwei bis drei biologische Replikate) ergab für Adaption 1 (Adaptionsstadien AC, CL, SC) 597 Spots mit differenziell exprimierten Proteinen und für Adaption 2 (Adaptionsstadien AC, CL, DC, SC) 809 Spots. Die Ursache für die erhöhte detektierte Spotanzahl bei Adaption 2 ist vermutlich das zusätzlich analysierte Stadium DC.

Eine gemeinsame Auswertung für Adaption 1 und 2 über die Adaptionsstadien (AC, CL, DC, SC; ANOVA; p-Wert $\leq 0,01$; *post hoc* Analyse; \geq zweifache differenzielle Expression; drei bis vier biologische Replikate; Abschnitt 3.4.6) resultierte in 318 nicht redundanten Proteinspots mit einer signifikanten Änderung in der Spotintensität (Tab. 4.2). Diese 318 Spots repräsentieren 53% aller veränderten Proteinspots von Adaption 1 und 39% aller veränderten Proteinspots von Adaption 2. Damit zeigen beide Adaptionen eine relativ geringe Übereinstimmung in der Proteomantwort.

Nach der Beobachtung der geringen Übereinstimmung von Adaption 1 und Adaption 2 sollte geprüft werden, ob die gemeinsame Auswertung der Proteomdatensätze einen globalen Einblick in die Zelladaption ermöglicht. Dazu wurde das finale Stadium SC beider Adaptionen auf der Ebene des Proteoms verglichen. Interessanterweise konnten nur 49 Spots mit differenziell exprimierten Proteinen detektiert werden (Student's t-Test, p-Wert $\leq 0,01$, \geq zweifache differenzielle Expression, Tab. 4.3, Abschnitt 3.4.6). Die Proteinidentifizierung resultierte in 24 Proteinen (49% erfolgreiche Identifizierung mit der Gelkarte der MDCK Zelladaption, Tab. 4.1). Sieben dieser Proteine konnten metabolischen Prozessen zugeordnet werden. Darunter zeigten zwei Enzyme der Glykolyse (Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase und Triosephosphatisomera-

se) eine gesteigerte Expression für das Stadium SC von Adaption 1. Auf der anderen Seite zeigte das Stadium SC der Adaption 2 eine gesteigerte Expression dreier Enzyme des Citratzyklus (Malatdehydrogenase, Aconitase 2 und Adenosintriphosphat (ATP) abhängige Citratsynthase). Trotz der Unterschiede in der Expression dieser Enzyme zeigte der Proteomvergleich insgesamt gesehen jedoch eine große Übereinstimmung der Proteinexpression der Stadien SC beider Zelladaptionen. Daher erschien eine gemeinsame Auswertung beider Adaptionen sinnvoll.

Tab. 4.2.: Anzahl differenziell exprimierter Proteinspots im Verlauf der Zelladaption.

Die Proteomdatensätze der Adaption 1 und 2 wurden gemeinsam ausgewertet. Es wurden nur Spots mit signifikant veränderter, normalisierter Intensität betrachtet (ANOVA, p-Wert $\leq 0,01$, *post-hoc* Analyse, \geq zweifache differenzielle Expression, Abschnitt 3.4.6).

Abschnitt	Vergleich ¹	Spotanzahl mit zunehmender Spotintensität	Spotanzahl mit abnehmender Spotintensität	Summe der Spots
I Serum- entzug	AC - CL	89	67	156
	AC - DC	143	97	240
	AC - SC	89	56	145
II Suspensions- wachstum	Cl - DC	32	27	59
	CL - SC	8	11	19
	DC - SC	17	15	32
Summe der nicht redundanten Spots				318

1 – Stadien des Adaptionsprozesses: AC, MDCK_{ADH} Zellen adaptiert an SMIF8+S Medium; CL, MDCK_{ADH} Zellen adaptiert an SMIF8 Medium; DC, abgelöste Zellen nach Adaption an SMIF8 Medium; SC, langsam wachsende Suspensionszellen.

4.3.2. Effekte der Zelladaption auf die Proteomantwort

Die gemeinsame Analyse von Adaption 1 und 2 ergab insgesamt 318 nicht-redundante Spots mit signifikant differenziell exprimierten Proteinen (Abschnitt 3.4.6, ANOVA, p-Wert $\leq 0,01$, *post hoc* Analyse, \geq zweifache differenzielle Expression, Tab. 4.2). Die Spotidentifizierungen (75% erfolgreich identifiziert) resultierten in 138 Proteinen (Tab. 4.1, MDCK Zelladaption). Eine *post hoc* statistische Analyse wurde durchgeführt, um nach der ANOVA spezifische Unterschiede für alle Vergleichsebenen zu identifizieren (Tab. 4.2). Die *post hoc* Analyse

Tab. 4.3.: Differenziell exprimierte Proteine zwischen den Stadien SC der Adaption 1 und 2. Es wurden nur Spots mit signifikant veränderter, normalisierter Intensität betrachtet (Student's t-Test, p-Wert $\leq 0,01$, \geq zweifache differenzielle Expression, Abschnitt 3.4.6).

Gelspots ¹	Identifizierte Proteine ²	$R(x_i)$ ³
Spot_510	Purine nucleoside phosphorylase isoform	0,44
Spot_218	Glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase	0,45
Spot_499	Annexin A5	0,46
Spot_004	Nascent-polypeptide-associated complex α polypeptide	0,46
Spot_509	Annexin A8	0,47
Spot_221	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,48
Spot_388	Annexin A8	0,48
Spot_127	Triosephosphate isomerase	0,50
Spot_268	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	2,01
Spot_440	Malate dehydrogenase	2,10
Spot_254	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribo- nucleotide formyltransferase	2,14
Spot_077	Uridine phosphorylase 1	2,25
Spot_178/179	CDC10 protein variant	2,63
Spot_240	Stress-70 protein, mitochondrial	2,67
Spot_197	Vinculin	2,87
Spot_498	Testin	3,02
Spot_223	Aconitase 2, mitochondrial	3,20
Spot_235	Programmed cell death 6	3,40
Spot_246	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	4,19
Spot_102	Glutathione S-transferase A2	4,29
Spot_508	Aconitase 2, mitochondrial	4,54
Spot_213	Iron-responsive element binding protein 1	5,20
Spot_269	Aconitase 2, mitochondrial	6,01
Spot_495	ATP-citrate synthase	12,28

1 – Bezug zur Gelkarte: MDCK Zelladaption (Tab. 4.1); 2 – NCBI Inr Datenbankeinträge nach MALDI-TOF/TOF-MS Peptidanalytik und Spektrensuche (Abschnitt 3.4.4); 3 – Verhältnis zwischen normalisierter Spotintensität der Kontrolle $I_k(x_i)$ (SC Stadium Adaption 1) und der Probe $I_p(x_i)$ (SC Stadium Adaption 2, Abschnitt 3.4.6); CDC – Zellzyklusprotein, ATP – Adenosintriphosphat.

resultierte in 19 bis 240 Spots mit signifikant differenziell exprimierten Proteinen zwischen zwei Stadien. Die Datenauswertung gliedert sich in: Abschnitt I - Serumentzug (Vergleichsebenen: AC-CL, AC-DC, AC-SC) und Abschnitt II - Suspensionswachstum (Vergleichsebenen: CL-DC, CL-SC, DC-SC, Tab. 4.2).

Abschnitt I - Serumentzug

Die meisten Spots mit differenziell exprimierten Proteinen ergab der Vergleich des Stadiums AC mit den drei Stadien CL, DC und SC (Tab. 4.2). Es wurden 300 der insgesamt 318 Spots innerhalb dieser Vergleichsebenen mit signifikant veränderter Intensität detektiert (Abschnitt I - Serumentzug, Tab. 4.2). Die Expression der 300 Spots wiederum zeigten zwei deutliche Profile. Die Spotintensität war im Stadium AC im Vergleich zu den Stadien CL, DC und SC entweder erhöht oder vermindert. Von den 300 Spots konnten 216 Spots identifiziert (75% erfolgreiche Identifizierung) werden. Die massenspektrometrische Analyse identifizierte 132 Proteine (43 gesteigert und 89 gemindert für Stadium AC).

Innerhalb des Datensatzes wurde mit Hilfe des *overrepresentation analysis tool* von Reaktom (Croft et al. 2014) nach biologischen Prozessen gesucht, denen mehrere identifizierte Proteine zugeordnet werden konnten (Anhang A.3). Zusammenfassend wurden differenziell exprimierte Proteine nach Serumentzug zu biologischen Prozessen des Transmembranglykoproteins L1, des Abbaus im Proteasom und der pre-mRNA Prozessierung zugeordnet (Tab. 4.4). Proteine welche nach Serumentzug ausschließlich mit zunehmender Expression detektiert wurden, konnten spezifisch dem Endostatinabbau durch die Protease Cathepsin, der Rekrutierung des Faktors Dab2 zu den *Junctional Plaques* und dem Purinkatabolismus zugeordnet werden. Die Proteinexpression des Carbonmetabolismus und der cytoskeletalen Organisation zeigten eine Abnahme nach Serumentzug.

Tab. 4.4.: Regulierte zelluläre Prozesse nach Serumentzug. Die biologischen Prozesse wurden mit dem Programm *Overrepresenting analysis tool* (p-Wert $\leq 0,0006$) von Reaktom (Croft et al. 2014) ermittelt (Anhang A.3, Abschnitt 3.4.5). Die Tabelle enthält die biologischen Prozesse und die identifizierten Proteine.

Biologischer Prozess	Identifizierte Proteine ¹
1) Proteinvarianten detektiert mit abnehmender Expression	
Glucosemetabolism	Fructose-bisphosphate aldolase B α -Enolase Phosphoglycerate kinase 1 Malate dehydrogenase, cytoplasmic Phosphoglycerate mutase 1 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Glucose-6-phosphate isomerase
Aktinfaltung CCT/TriC	Actin, cytoplasmic 1 T-complex protein 1 subunit β T-complex protein 1 subunit δ
Ausschleusen von cyto- skelettalen Komponenten	Cofilin-1 Adenylyl cyclase-associated protein 1
2) Proteinvarianten detektiert mit zunehmender Expression	
Endostatin Abbau durch Cathepsin	Cathepsin L1 precursor Cathepsin D precursor
Dab2 Rekrutierung zu den Gap Junctions ³	Actin, cytoplasmic Clathrin light chain A
Purinkatabolismus	Purin nucleosid phosphorylase Glutathion peroxidase 1
3) Proteinvarianten detektiert mit abnehmender und zunehmender Expression	
Verbindung durch L1 mit Treadmilling ² F-Actin	Villin 2 Actin, cytoplasmic 1 Radixin
Destabilisierung der mRNAdurch AUF1	Heat shock 70kDa protein 8 26S protease regulatory subunit 6A Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 Proteasome subunit α Heat shock cognate 71 kDa protein

Proteasome 26S ATPase subunit 2
Proteasome subunit β type-4

1 – NCBI Inr Datenbankeinträge nach MALDI-TOF/TOF-MS Peptidanalytik und Spektrensuche (Abschnitt 3.4.4, Gelkarte: MDCK Zelladaption, Tab. 4.1); 2 – Nettodurchfluss von Aktinmonomeren bei der Polymerisation von Aktinfilamenten im Cytoplasma; 3 – Ansammlungen durchquerender Zell-Zell-Kanäle der Zellmembranen zweier benachbarter Zellen; AUF – RNA-bindendes Protein in einer AU-reichen Sequenz, ATP – Adenosintriphosphat.

Innerhalb der 300 Proteinspots, welche für den Abschnitt I Serumentzug eine differenzielle Expression zeigten, konnte ein Drittel (91 Spots, 47 Proteine) mit signifikant differenzieller Expression in allen drei Vergleichsebenen detektiert werden (Stadien: AC versus CL, AC versus DC, AC versus SC, ANOVA, p -Wert $\leq 0,01$, *post hoc* Analyse, \geq zweifache differenzielle Expression, Abb. 4.20). Die identifizierten Proteine mit zunehmender Intensität von mindestens zwei Spots nach Serumentzug waren Keratin (11 Spots), Cathepsin (sechs Spots), Myosin (zwei Spots), Annexin (Anx) A5 (zwei Spots), Gelsolin (zwei Spots), Endoplasmatisches Retikulum Protein 29 (zwei Spots) und das Hitzeschockprotein (HSP) 1 (zwei Spots). Eine Abnahme in der Spotintensität zeigten heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (HNRNP, drei Spots), der eukaryotische Translations-Initiationsfaktor (drei Spots), die Protein-Disulfid-Isomerase (drei Spots), die Ornithin-Aminotransferase (OAT, zwei Spots) und Keratin (zwei Spots). Auch der Medienbestandteil Serumalbumin resultierte für das Stadium AC in drei starken Proteinspots. Exemplarisch wurde die Proteinexpression von OAT und Gelsolin mit Western Blot Analyse verifiziert (Abb. 4.21). Die Western Blot Analyse von Gelsolin korrelierte mit der 2-D DIGE Analyse und zeigte eine zunehmende Expression nach Serumreduktion (Abb. 4.21). Im Gegensatz dazu zeigte der Western Blot für OAT keine signifikante Proteinexpression. Es konnte nur ein Trend für die Abnahme der Expression nach Serumentzug gezeigt werden (Abb. 4.21). Die massenspektrometrische Proteinidentifizierung detektierte jedoch drei Proteinspots für OAT und nur zwei zeigten eine signifikante Abnahme der Proteinexpression nach Serumreduktion. Diese Tatsache kann erklären, warum bei der 1-D Western Blot Analyse ausschließlich ein Trend zu erkennen war. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen ERK2 verwendet, was den gleichmäßigen Auftrag der Proteinmenge pro Bande bestätigte. Das Signal für ERK2 zeigte eine starke Bande und eine unspezifische schwache Bande wie in der Literatur bereits gezeigt (Heynisch et al. 2010).

Stadien				Gelspots ¹	Identifizierte Proteine ²
AC	CL	DC	SC		
				Spot_027	Myosin regulatory light chain 2, nonsarcomeric
				Spot_404	Heat shock protein beta-1
				Nicht identifiziert 5	-
				Nicht identifiziert 12 - Spot_398	Endoplasmic reticulum resident protein 29
				Spot_399	Keratin, type II cytoskeletal 8
				Nicht identifiziert 13	-
				Spot_415	Glutathione peroxidase 1
				Nicht identifiziert 6 - Spot_443	Keratin, type I cytoskeletal 19-like
				Spot_398	Endoplasmic reticulum resident protein 29
				Spot_410	Keratin, type I cytoskeletal 19
				Nicht identifiziert 9	-
				Spot_030	Calcyphosin
				Nicht identifiziert 11	-
				Spot_403	Heat shock protein beta-1
				Nicht identifiziert 15	-
				Nicht identifiziert 16 - Spot_484	Phosphoglycerate kinase 1
				Spot_193/194	Cathepsin D precursor
				Spot_477	Cathepsin D precursor
				Spot_080	Cathepsin D precursor
				Spot_395	Cathepsin D precursor
				Nicht identifiziert 10 - Spot_201	Gelsolin
				Spot_231	Gelsolin
				Spot_067	Cathepsin L1 precursor
				Spot_464	Keratin, type II cytoskeletal 8
				Nicht identifiziert 14	-
				Spot_292	Keratin, type II cytoskeletal 8
				Nicht identifiziert 3 - Spot_287	Keratin, type II cytoskeletal 8
				Spot_291	Keratin, type II cytoskeletal 8
				Nicht identifiziert 8 - Spot_443	Keratin, type I cytoskeletal 19
				Spot_330	Keratin, type I cytoskeletal 18
				Nicht identifiziert 7	-
				Spot_125	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor
				Nicht identifiziert 1 - Spot_048	Cathepsin L1 precursor
				Spot_287	Keratin, type II cytoskeletal 8
				Nicht identifiziert 2	-
				Nicht identifiziert 4 - Spot_331	Keratin, type I cytoskeletal 18
				Spot_113	Alpha-crystallin B
				Spot_042	Annexin A5
				Spot_114	Alpha-crystallin B
				Spot_010	Tropomyosin alpha-3 chain
				Spot_074	Annexin A5
				Spot_421/422	Glutathione S-transferase P
				Spot_097	Glutathione S-transferase theta-1
				Spot_143	Fructose-bisphosphate aldolase A
				Nicht identifiziert 29	-
				Spot_079	Proteasome subunit alpha type 1
				Spot_327	Elongation factor 1-gamma
				Spot_066	CG1532-PA
				Spot_328	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating
				Spot_174	Beta-galactosides-binding lectin
				Spot_435	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B
				Nicht identifiziert 17 - Spot_200	Villin 2
				Spot_248	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
				Spot_031	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1
				Nicht identifiziert 20 - Spot_073	Hypothetical protein
				Spot_054	Keratin 10
				Spot_219	Serum albumin
				Nicht identifiziert 22	-
				Spot_374	Annexin A1
				Nicht identifiziert 21	-
				Nicht identifiziert 24	-
				Spot_376	LIM and SH3 protein 1
				Spot_234	Villin 2
				Nicht identifiziert 28	-
				Spot_230	Radixin
				Spot_049	14-3-3 protein gamma
				Spot_312	Protein disulfide-isomerase A6 precursor
				Spot_468	Ornithine aminotransferase, mitochondrial
				Spot_262	60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor
				Spot_469	Ornithine aminotransferase, mitochondrial
				Spot_148	Mitochondrial malate dehydrogenase 2
				Nicht identifiziert 19 - Spot_264	Protein disulfide-isomerase A3
				Nicht identifiziert 18	-
				Spot_108	Peroxiredoxin 1
				Spot_268	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14
				Spot_273	Protein disulfide-isomerase A3
				Spot_483	Phosphoglycerate kinase 1
				Spot_491	Keratin 10
				Spot_071	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1
				Spot_475	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1
				Spot_144	NADP-dependent leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase
				Spot_109	Actin, cytoplasmic 2
				Spot_243	Serum albumin
				Spot_416	Serum albumin
				Nicht identifiziert 26	-
				Spot_313	26S protease regulatory subunit 6A
				Nicht identifiziert 23	-
				Spot_332/333	Vesicle amine transport protein 1
				Spot_253	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
				Nicht identifiziert 25	-
				Nicht identifiziert 27	-

Abb. 4.20.: Differenziell exprimierte Proteine der drei Stadienvergleiche: AC versus CL, AC versus DC, AC versus SC. Fortsetzung nächste Seite.

Fortsetzung Abb. 4.20: ■ Starke Spotintensität □ schwache Spotintensität ($1,55 \geq Z(x_i) \leq -1,65$; Abschnitt 3.4.6). Die Expression wurde mit 2-D DIGE detektiert und auf Signifikanz geprüft (Abschnitt 3.4.6). Nicht identifizierte Proteinspots befanden sich teilweise in Spotreihen identifizierter Spots. 1 – Gelspotnummer auf der Gelkarte für die MDCK-Zelladaption (Tab. 4.1), 2 – NCBI Nr Datenbankeinträge nach MALDI-TOF/TOF-MS Peptidanalytik und Spektrensuche (Abschnitt 3.4.4); AC – MDCK_{ADH} Zellen adaptiert an SMIF8+S Medium, CL – MDCK_{ADH} Zellen adaptiert an SMIF8 Medium, DC – abgelöste Zellen nach Adaption an SMIF8 Medium, SC – langsam wachsende Suspensionszellen; CoA – Coenzym A, LIM – zweifaches Zinkfingermotiv, SH – Src homologe Domäne, NADP – Nicotinamidadenindinukleotidphosphat.

Abschnitt II - Suspensionswachstum

Die Vergleichsebenen des Abschnitts II Suspensionswachstum (Tab. 4.2) resultierten in 18 Spots (60% erfolgreiche Identifizierung mit der Gelkarte der MDCK Zelladaption, Tab. 4.1), welche ausschließlich innerhalb der Stadien CL versus DC, CL versus SC und DC versus SC eine signifikante Veränderung in ihrer Intensität zeigten. Die Spots repräsentierten folgende sechs Proteine nach massenspektrometrischer Identifizierung: 1) Sulfotransferase 1A1 (drei Spots, gesteigerte Intensität des Stadiums CL relativ zum Stadium DC); 2) RuvB-ähnliches Protein 2 (ein Spot, gesteigerte Intensität des Stadiums CL relativ zum Stadium SC); 3) Transaldolase (drei Spots) und 4) Galectin-3 (zwei Spots, gesteigerte Intensität des Stadiums DC relativ zum Stadium CL); 5) eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 3 (ein Spot, gesteigerte Intensität des Stadiums SC relativ zum Stadium CL); 6) Lactoylglutathionlyase (ein Spot, gesteigerte Intensität des Stadiums SC relativ zum Stadium DC) (Abb. 4.22). Diese sechs Proteine wurden nicht für den Abschnitt I Serumentzug detektiert (Tab. 4.2).

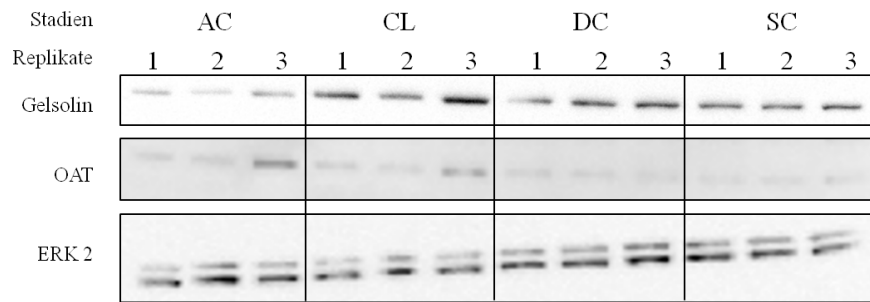


Abb. 4.21.: Western Blot Analyse zweier repräsentativer Proteine während der MDCK-Zelladaption. Dargestellt sind die Gelabschnitte des Western Blots für drei biologische Replikate (Abschnitt 3.4.7). OAT – Ornithin Aminotransferase, ERK2 – extrazelluläre Signale regulierende Kinase 2 (entspricht der Ladekontrolle), AC – MDCK_{ADH} Zellen adaptiert an SMIF8+S Medium, CL – MDCK_{ADH} Zellen adaptiert an SMIF8 Medium, DC – Abgelöste Zellen nach Adaption an SMIF8 Medium, SC – Langsam wachsende Suspensionszellen.

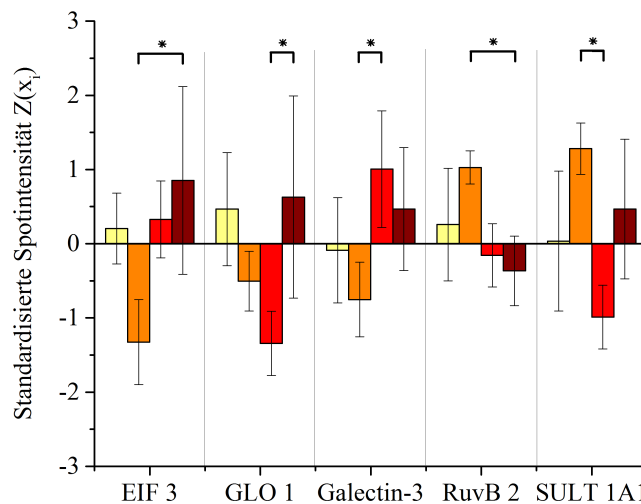


Abb. 4.22.: Expression der Proteinspots mit signifikant verändertem $Z(x_i)$ während der Adaption an Wachstum in Suspension. ■ Stadium AC – MDCK_{ADH} Zellen adaptiert an SMIF8+S Medium, ■ Stadium CL – MDCK_{ADH} Zellen adaptiert an SMIF8 Medium, ■ Stadium DC – Abgelöste Zellen nach Adaption an SMIF8 Medium, ■ Stadium SC – Langsam wachsende Suspensionszellen. $Z(x_i)$ wurde nach der Gleichung 3.8 berechnet. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von drei bis vier biologischen Replikaten dargestellt. EIF2 – eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 3, GLO 1 – Lactoylglutathionlyase, SULT 1A1 – Sulfotransferase 1A1, * – signifikant differenzielle Expression (Student's t-Test, p-Wert $\leq 0,01$).

4.4. Vergleich einer adhärennten Zelllinie mit ihrer verwandten Suspensionszelllinie

Die MDCK_{ADH} Zelllinie ist von der Arbeitsgruppe BPT (Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl, Max-Planck-Institut, Magdeburg, Deutschland) umfassend charakterisiert worden (Bock et al. 2009, Genzel et al. 2005, Janke et al. 2010, Rehberg et al. 2014). Die nach Zelladaption entstandene MDCK_{SUS} Zelllinie (Lohr et al. 2010) wurde für Vorversuchen im Spinner_{PA} kultiviert (Abschnitt 3.2.4). Ziel war es, den Verlauf der Zellkonzentration (Abschnitt 3.3.1) und der extrazellulären Metaboliten (Abschnitt 3.3.2) näher zu bestimmen. Anschließend erfolgte die Identifizierung eines Kultivierungszeitpunkts, der sich für einen Vergleich auf Proteomebene beider MDCK Zelllinien eignete. Die mit Hilfe der 2-D DIGE und der LF-Methode generierten Daten der Proteomanalytik sind nachfolgend zusammenfassend dargestellt.

Die Suspensionszellkultivierungen im Spinner_{PA} erreichten nach drei Tagen eine Zellkonzentration von durchschnittlich $2,1 \times 10^6$ Zellen/mL (Abb. 4.23). Anschließend stagnierte das Wachstum und eine Absterbephase begann, in der die Vitalität von 86% auf 60% abnahm (Abb. 4.23). Die extrazellulären Metaboliten Glucose und Glutamin nahmen über 120 h auf je 6 und 3 mmol/L ab (Abb. 4.24, 4.25). Die Glutamatkonzentration blieb nahezu konstant bei 3 mmol/L. Die Metaboliten Lactat und Ammonium nahmen über die Zeit auf je 21 und 7 mmol/L zu (Abb. 4.24, 4.25) und könnten somit eine wachstumsinhibierende Wirkung verursacht haben (Glacken et al. 1986).

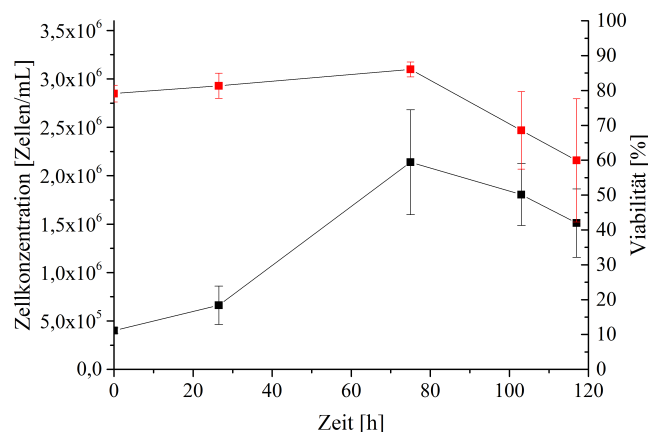


Abb. 4.23.: Zellkonzentration und Vitalität der MDCK_{SUS} Zellkultivierung im Spinner_{PA}. ■ Verlauf der Zellkonzentration, ■ Verlauf der Vitalität (Standardabweichung von n=3, biologische Replikate, Abschnitt 3.2.4).

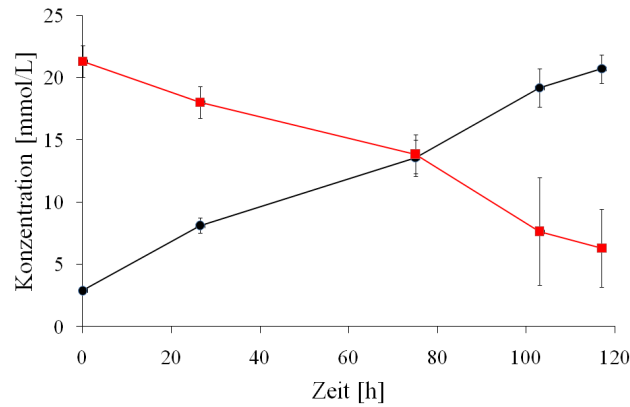


Abb. 4.24.: Glucose- und Lactatkonzentration während der Kultivierung der MDCK_{SUS} Zelllinie im Spinner_{PA}. ■ Glucosekonzentration, ■ Lactatkonzentration (Standardabweichung von n=3, biologische Replikate, Abschnitt 3.2.4).

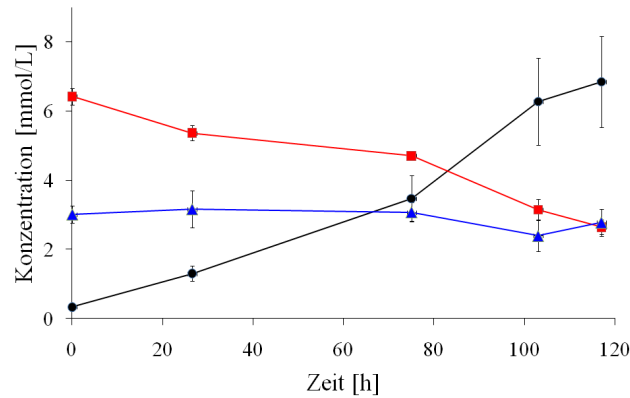


Abb. 4.25.: Glutamin-, Glutamat- und Ammoniumkonzentration während der Kultivierung der MDCK_{SUS} Zelllinie im Spinner_{PA}. ■ Glutaminkonzentration, ■ Glutamatkonzentration, ■ Ammoniumkonzentration (Standardabweichung von n=3, biologische Replikate, Abschnitt 3.3.2).

Eine stationäre Wachstumsphase kann für MDCK_{SUS} Zellen über die Glucose- und Lactatkonzentration im Medium annähernd bestimmt werden. Das Wachstum der MDCK_{ADH} Zellen erreicht eine stationäre Phase wenn die Wachstumsoberfläche limitiert ist. Da verschiedene Limitierungen die stationäre Wachstumsphase auslösen, wurde für den Proteomvergleich zwischen den MDCK_{ADH} und der MDCK_{SUS} Zellen die Wachstumsphase, bei der eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/mL erreicht wurde, als Zeitpunkt für die Probenahme definiert (Abschnitt 3.2.4). Im 1L-BR erreichten die drei biologischen Replikate der MDCK_{ADH} Zellen (Vorkulturen aus der Rollerflasche) und der MDCK_{SUS} Zellen (Vorkulturen aus dem Shaker) nach ca. 70 h die gewünschte Zellkonzentration von $1 \pm 0,1 \times 10^6$ Zellen/mL (Standardabweichung von n=3, biologische Replikate). Die Zellen waren weder über die Glucosekonzentration noch über die Oberfläche im Wachstum limitiert (Daten nicht gezeigt).

Die 2-D DIGE Proteomanalyse (Abschnitt 3.4.6) ergab 76 Spots mit differenziell exprimierten Proteinen (36 Spots mit stärkerer Intensität für MDCK_{ADH} und 40 Spots für MDCK_{SUS}). Es konnten 24 Proteine identifiziert werden (78% erfolgreich identifiziert, Tab. 4.5). Von diesen 24 Proteinen zeigten acht eine gegenläufige Expression verschiedener Spots bzw. Isoformen. Für Anx A1 konnten beispielsweise drei Spots mit differenzieller Proteinexpression detektiert werden, zwei mit gesteigerter Expression für MDCK_{ADH} und einer für MDCK_{SUS} Zellen. MDCK_{ADH} Zellen zeigten überwiegend eine gesteigerte Expression für strukturelle Proteine, wie Ezrin (Ezr), Anx A4 und A8. Die MDCK_{SUS} Zelllinie besaß eine gesteigerte Expression von Proteinen verschiedener funktioneller Gruppen. Darunter zählen zwei Signalproteine, das translational-kontrollierte Tumorprotein 1 (TCTP-1) und der Rho GDP-Dissoziations Inhibitor 1 (Rho-GDI-1). Weiterhin konnten Stressproteine wie das Peroxiredoxin-1 und das glucoseregulierte Protein 78 kDa (GRP78) detektiert werden. Ebenfalls waren die strukturellen Proteine Vimentin und Cofilin-1 hochreguliert.

Tab. 4.5.: Differenziell exprimierte Proteine im Vergleich der MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zellen detektiert mit 2-D DIGE. Die Zellen wurden im IL-BR bis zu einer Zellkonzentration von $1 \pm 0, 1 \times 10^6$ Zellen/mL kultiviert (Abschnitt 3.2.4). Es wurden nur Proteinidentifizierungen mit signifikant veränderten, normalisierten Spotintensitäten im 2-D DIGE Ansatz betrachtet (Student's t-Test, p-Wert $\leq 0,05$, \geq zweifache Differenz, Abschnitt 3.4.6). Für alle nach 2-D DIGE detektierten Proteine sind in der UniProt KB Modifikationen für das humane homologe Protein beschrieben. Mit Hilfe der LF-Methode wurde ein vergleichender Datensatz generiert (Student's t-Test, p-Wert $\leq 0,05$, Abschnitt 3.4.6), der die relative Proteinquantifizierung unabhängig von Isoformen darstellt.

$R(x_i)^1$	$R_{LF}(x_i)^2$	Identifizierte Proteine ³ (Gelspots)	Eintrag ⁴	Peptide ⁵	Peptide _{LF} ⁶	Modifizierung ⁷
Erhöhte Spotintensität für MDCK _{ADH} Zellen (Verhältnis: MDCK _{ADH} zu MDCK _{SUS}) ^{1 2}						
0,34	(0,89)	Annexin A4 (Adh_35)	F1PXG4	7	15 (12)	A, P, S
0,04/(1,69)	0,60	Annexin A8 (Adh_16)	E2R0S6	6/ 8	9 (6)	S
0,48	1,27	ATP synthase subunit α (Adh_08)	E2RNG2	8	18 (14)	A, G, P
0,25/0,07/0,23/ (0,61)	1,19	Ezrin (Adh_01/26/02)	E2RSI6	2/ 3/ 5/ 7	24 (17)	A, P
0,44	2,79	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 (Adh_15)	F1PBZ4	2	8 (5)	S
0,02	0,02	Serum Albumin (Adh_11)	F2Z4Q6	3	4 (3)	P
0,09/0,18	(1,09)	Stress-induced-phosphoprotein 1 (Adh_36/31)	P49822			
			F1P7V6	2/ 4	19 (15)	A, P, S
Erhöhte Spotintensität für MDCK _{SUS} Zellen (Verhältnis: MDCK _{ADH} zu MDCK _{SUS}) ^{1 2}						
2,33	0,31	Vimentin (Sus_11)	F1PLS4	8	42 (34)	G, P
2,18	(1,0)	GRP78 (Sus_18)	F1PIC7	10	30 (23)	A, M, N, P
8,60/3,47/1,82	(1,02)	C-1-tetrahydrofolate synthase,	F1PYV1	6/ 7/ 11	26 (20)	A

		cytoplasmic (Sus_01/25/32)				
2,09	0,59	Calreticulin (Sus_33)	E2QU37	6	13 (11)	A, G
17,31	(0,99)	Cofilin-1 (Sus_04)	F1PQN5	4	14 (10)	A, P
2,6	2,4	High mobility group box 2 (Sus_38)	Q6YKA4	5	11 (7)	A
5,54/1,82	0,87	Peroxiredoxin-1 (Sus_03/32)	E2RHG2	9/ 8	13 (11)	A, P
0,54/1,56/3,43	(1,03)	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 (Sus_22/39)	F1PL93	7/ 8/ 11	11 (8)	A, P, S
2,21	(0,83)	Serotransferrin (Sus_12)	E2QSM8	2	6 (6)	G, M
2,73	0,29	Tumor protein translationally- controlled 1 (Sus_23)	E2RMA1	4	6 (5)	P, S
<hr/>						
Erhöhte Spotintensitäten für Proteinisoformentypen (Verhältnis: MDCK _{ADH} zu MDCK _{SUS}) ^{1 2}						
0,23/0,36/2,56	2,12	Annexin A1 (Adh_03/33; Sus_10)	F1P6B7	4/ 13/ 14	32 (27)	A, P
0,03/(0,63)/2,60/2,34	0,73	Enolase (Adh_10/19; Sus_38/31)	F1PCH3	5/ 11/ 9/ 7	18 (16)	A, P
(1,31)/(1,19)/3,70/ 4,05/(1,78)/0,07	(1,16)	Keratin, type II cytoskeletal 8 (Sus_05/15/35/16/39; Adh_24)	F1PW98	4/ 6/ 6/ 9/ 11/ 12	27 (20)	A, G, P
0,10/0,32/3,55	(0,86)	Laminin-binding protein (Adh_27/29; Sus_20)	E2RJ06	4/ 8/ 8	10 (9)	A, P
0,42/0,15/0,49/0,48/ (1,41)/2,96/2,01	1,18	Prelamin-A/C (Adh_14/22/20/08; Sus_06/24/07)	F1PBJ3	3/ 5/ 6/ 8/ 3/ 5/ 6	36 (27) Pr, S	A, M, P,
0,45/3,41	4,18	Retinal dehydrogenase 1 (Adh_09; Sus_26)	J9P9J4	3/ 9	30 (4)	A
0,18/3,56	1,26	Transketolase (Adh_28; Sus_17)	E2RMX7 F1PE28	3/ 9	20 (17)	A, P, S

Fortsetzung Tab. 4.5: 1 und 2 – Verhältnis zwischen der Kontrolle (MDCK_{ADH}) und der Probe (MDCK_{SUS}, Abschnitt 3.4.6); 3 – UniProt KB Einträge als Ergebnis des Blast homologer humaner Proteine im Anschluss an die Spektrensuche nach MALDI-TOF/TOF-MS und ESI-Qq/Orbitrap-MS Peptidanalytik (Abschnitt 3.4.4); 4 – UniProt KB Einträge im Anschluss an die Spektrensuche nach MALDI-TOF/TOF-MS und ESI-Qq/Orbitrap-MS Peptidanalytik (*Canis familiaris*); 5 und 6 – Identifizierte Peptide nach massenspektrometrischer Analyse; 6 – Angegeben sind die identifizierten Peptide und in Klammern die Peptidanzahl, welche für die Quantifizierung verwendet wurde; 7 – Proteinmodifikationen sind in der UniProt KB aufgeführt für das humane homolog Protein (Stand: 07.02.2015): A – Acetylierung, G – Glykosylierung, M – Methylierung, N – Nitrierung, P – Phosphorylierung, Pr – Prenylierung, S – alternatives Splicing; LF – *labelfree*; ATP – Adenosintriphosphat; GDP – Guanosindiphosphat; GRP78 – glucosereguliertes Protein 78 kDa; NADP(H) – Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrogenphosphat. $R(x_i)$ bzw. $R_{LF}(x_i)$ Werte in Klammern sind nicht signifikant.

Die 2-D DIGE Methode ermöglicht die Separation und Quantifizierung von Proteinisoformen (Maurer et al. 2014). Daher ist es nahezu unmöglich, ein Protein mit all seinen Isoformen in seiner Gesamtheit zu quantifizieren. Die zusätzlich angewandte LF-Quantifizierung (Abschnitt 3.4.6) ist von Proteinisoformen nahezu unabhängig und wurde daher als orthogonale Methode verwendet.

Die LF-Quantifizierung (Abschnitt 3.4.6) hatte zum Ziel: 1) eine relative Quantifizierung der Proteine unabhängig von Isoformen, 2) eine Detektion globaler Unterschiede zwischen den Zelllinien und 3) speziell die relative Quantifizierung von Membranproteinen zu ermöglichen. Die Auswertung der Ergebnisse wurde auf diese drei Zielvorgaben fokussiert. Im Ergebnisvergleich beider Methoden wurden nur zwei Proteine, Serum Albumin (für MDCK_{ADH} Zellen) und High mobility group box 2 (für MDCK_{SUS} Zellen), in Übereinstimmung gefunden (Tab. 4.5). Daher repräsentieren die weiteren mit 2-D DIGE detektierten Proteine voraussichtlich Isoformen mit differenzieller Expression, die in ihrer Gesamtheit bei der LF-Quantifizierung als nicht differenziell exprimiert detektiert wurden.

Es wurde exemplarisch für zwei Proteine, die nicht das gleiche Ergebnis für beide Methoden zeigten, eine Western Blot Analyse durchgeführt (Abschnitt 3.4.7). Zum einen wurde Ezr gewählt, das nach 2-D DIGE Analytik eine gesteigerte Expression für MDCK_{ADH} Zellen und nach LF-Analytik eine konstante Expression zeigte (Tab. 4.5). Im Western Blot konnte keine Zunahme der Expression von Ezr detektiert werden (Abb. 4.26). Für alle mit 2-D DIGE detektierten Proteine sind in der UniProt KB Modifikationen beschrieben, so auch

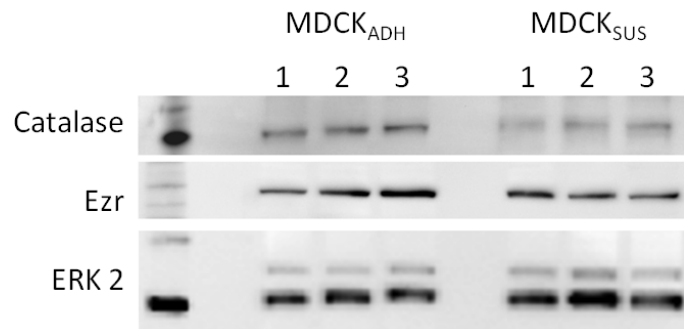


Abb. 4.26.: Western Blot Analyse zweier repräsentativer Proteine für den Vergleich der MDCK-Zelllinien. Dargestellt sind die Gelabschnitte der Western Bots für drei biologische Replikate (Abschnitt 3.4.7). ERK2 – extrazelluläre Signale regulierende Kinase 2 (entspricht der Ladekontrolle), Ezr - Ezrin.

für Ezr (Tab. 4.5). Diese Proteinmodifikationen können mit Hilfe der 2-D PAGE separiert werden und als Proteinisoform eine differenzielle Expression zeigen. Ein zweites mit Western Blot analysiertes Protein war die Catalase, die mittels LF-Quantifizierung aber nicht mit 2-D DIGE detektiert wurde (Anhang Tab. A.4). Die Western Blot Auswertung resultierte in einer Abnahme der Expression zwischen beiden Zelllinien (Abb. 4.26). Die Ladekontrolle bestätigte den gleichmäßigen Auftrag der Proteinmenge pro Bande. Das Signal für ERK2 zeigte erneut eine starke Bande und eine unspezifische schwache Bande wie in der Literatur bereits gezeigt (Heynisch et al. 2010). Die LF-Quantifizierung deckte alle Proteine, die mit 2-D DIGE detektiert wurden, ab und zeigte zusätzliche Proteine auf. Damit ist die 2-D DIGE Methode selektiver und limitiert für die Analyse des Gesamtproteoms.

Bei der LF-Quantifizierung wurden 976 Proteine für den Vergleich des MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Proteoms betrachtet. Davon waren 287 Proteine signifikant differenziell exprimiert (Student's t-Test, p-Wert 0,05), die sich vier funktionellen Gruppen zuordnen ließen (≥ 30 Proteine): 1) Metabolismus, 2) Genexpression, 3) Signaltransduktion und 4) Membranproteine (Abb. 4.27). Mit Hilfe eines weiteren Filters (Proteine mindestens zweifach differenziell exprimiert) konnten 107 Proteine detektiert werden (66 Proteine für MDCK_{ADH} und 41 Proteine für MDCK_{SUS} Zellen, Anhang A.4).

Für die vier funktionellen Gruppen (Abb. 4.27) wurden die signifikant regulierten Proteine (Student's t-Test, p-Wert 0,05) näher betrachtet. Mit Hilfe einer Heatmap erfolgte die übersichtliche Darstellung der Expression metabolischer und an der Genexpression beteiligter Proteine. (Abb. 4.28). MDCK_{SUS} Zellen zeigten für glykolytische Enzyme eine geminderte Expression und für Enzyme des Citratzyklus und der Atmungskette eine gesteigerte Expression im Vergleich zur MDCK_{ADH} Zelllinie. Im Bezug auf die Genexpression wurde eine gesteigerte

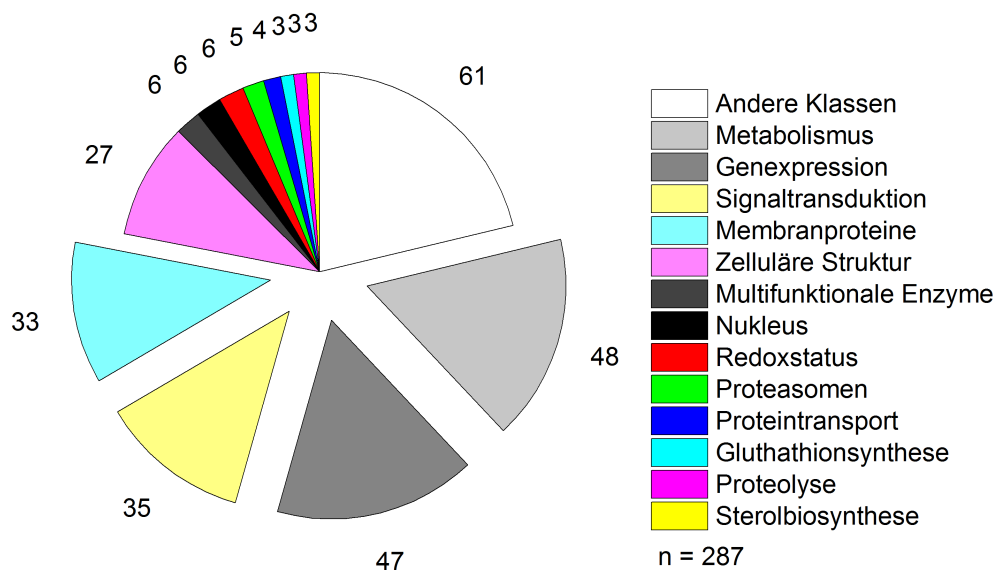


Abb. 4.27.: Funktionelle Klassifizierung der differenziell exprimierten Proteine nach LF-Quantifizierung. Die Klassifizierung wurde anhand der biologischen Prozesse und im Fall der Membranproteine anhand des zellulären Kompartiments vorgenommen, die in der UniProt KB für humane homologe Proteine (Consortium 2014) hinterlegt sind.

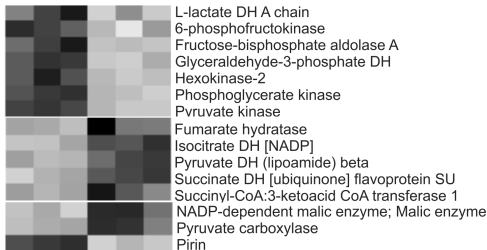
Expression ribosomaler Proteine für MDCK_{SUS} Zellen detektiert. Insgesamt 35 Proteine konnten der Signaltransduktion zugeordnet werden (Abb. 4.27, Tab. 4.6). Drei Proteine mit gesteigerter Expression für MDCK_{SUS} Zellen konnten apoptotischen Signalen zugeordnet werden. In den MDCK_{ADH} Zellen war der überwiegende Anteil an Zellzyklusproteinen und Signalwegproteinen stärker exprimiert. Unter anderen wurden drei Proteine des Ras-Signalwegs detektiert.

Die LF-Quantifizierung detektierte 33 Membranproteine und zeigte für 25 eine gesteigerte Expression für MDCK_{ADH} Zellen (Abb. 4.7). Dazu gehörten drei Integrinvarianten, Galectin-1, Galectin-3 und das L1-Adhäsionsprotein. MDCK_{SUS} Zellen zeigten hingegen eine gesteigerte Expression für drei Anx Varianten und Thrombospondin-1.

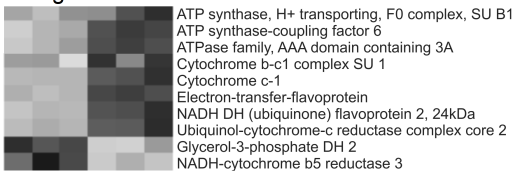
A) Metabolismus

MDCK_{ADH} MDCK_{SUS}

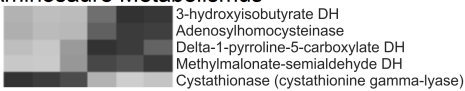
Kohlenstoffwechsel



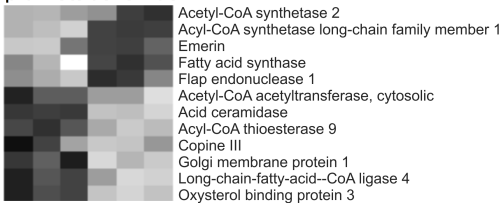
Atmungskette



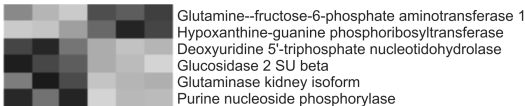
Aminosäure Metabolismus



Lipidmetabolismus



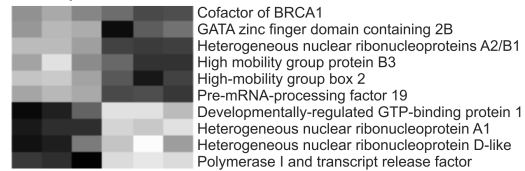
Andere



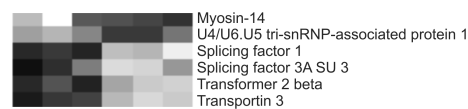
B) Genexpression

MDCK_{ADH} MDCK_{SUS}

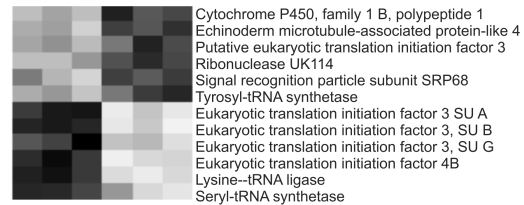
Transkription



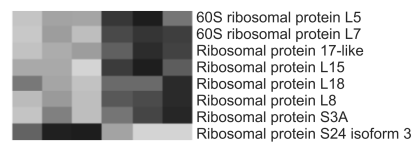
Splicing



Translation



Ribosomale Proteine



Andere

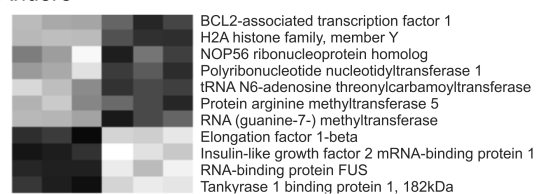


Abb. 4.28.: Differenziell exprimierte Proteine im Stoffwechsel und der Genexpression für den Vergleich von MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zellen. ■ Hohe Proteinexpression, □ schwache Proteinexpression ($1,96 \geq Z(x_i) \leq -1,57$, Abschnitt 3.4.6). Die Expression wurde mit der LF-Methode detektiert und auf Signifikanz geprüft (Student's t-Test, p-Wert $\leq 0,05$, Abschnitt 3.4.6). Die Proteinidentifizierung erfolgte mit ESI-Q/Orbitrap-MS (Abschnitt 3.4.4). ATP – Adenosintriphosphat, NADH – Nicotinamidadeninukleotid, DH – Dehydrogenase, CoA – Coenzym A, SU – Untereinheit, BRCA – Breast Cancer 1 Protein, GATA – Promotorregion, mRNA – messenger Ribonucleinsäure, snRNA – small nuclear Ribonucleinsäure, BCL2 – B-Zelllymphoma 2 Protein.

Tab. 4.6.: Differenziell exprimierte Proteine der Signaltransduktion für den Vergleich von MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zellen.

$R_{LF}(x_i)^1$	Identifizierte Proteine ²	Eintrag ³	Peptide ⁴
Apoptose			
1,44	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	E2RPZ9	6 (3)
1,47	Cell cycle and apoptosis regulator protein 2	E2RKJ1	12 (11)
3,17	Peptidyl-tRNA hydrolase 2	Q9GL24	9 (7)
Zellzyklus			
0,19	Dihydropyrimidinase-related protein 3	F1Q3Y2	14 (7)
0,46	Dihydropyrimidinase-related protein 2	F1P9U4	19 (16)
0,48	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1	E2QZ50	16 (16)
0,52	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	E2QYH4	10 (7)
0,53	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	E2RGJ9	8 (6)
0,58	PDS5, regulator of cohesion maintenance	E2R7R4	10 (9)
0,59	DNA replication licensing factor MCM4	E2QSM6	7 (5)
0,60	Prostaglandin E synthase 3	J9NT37	4 (4)
0,62	Non-SMC condensin I complex	E2RHZ0	12 (8)
0,63	Condensin complex subunit 2	F1Q3I3	4 (4)
0,63	Microtubule-associated protein 4	F1PCX8	32 (23)
0,66	Minichromosome maintenance complex component 3	E2RF73	10 (9)
0,67	Microtubule-actin cross-linking factor 1	F1Q1P4	19 (14)
0,68	Nucleosome assembly protein 1-like 1	F1PRE1	7 (6)
0,68	Mitotic interactor and substrate of PLK1	J9NX80	12 (11)
0,70	Cysteine-rich protein 2	F1PP40	4 (4)
1,50	SEC14-like protein 2	E2RN29	8 (7)
1,61	Presequence protease	F1PQU2	8 (6)
1,74	Emerin	D0VWQ5	6 (4)
1,95	platelet-activating factor acetylhydrolase	E2QY31	8 (4)
2,03	Cell growth-regulating nucleolar protein	E2RHX1	5 (5)
2,17	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B	F1Q0Z0	3 (3)
Andere Signalwege			
0,43	A-kinase anchor protein 12	F1PGL8	40 (34)

0,54	DnaJ homolog subfamily C member 2	E2RS54	5 (5)
0,56	Ras-related protein Rab-21	F1PGI1	6 (4)
0,58	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	F1PJ65	36 (33)
0,59	Ras-related protein Rab-10	F2Z4P9	6 (4)
0,63	Protein LSM14 homolog A	F1PSJ7	4 (4)
0,65	Protein S100-A10	J9NYC2	5 (3)
1,47	14-3-3 protein γ	J9NRH5	7 (3)
1,61	Solute carrier family 9, member 3 regulator 1	E2RGF3	15 (13)
2,28	Adapter molecule Crk	E2QWD3	6 (6)

1 – Verhältnis zwischen der Kontrolle (MDCK_{ADH}) und der Probe (MDCK_{SUS}, Abschnitt 3.4.6); 2 – UniProt KB Einträge als Ergebnis des Blast homologer humaner Proteine im Anschluss an die Spektrensuche nach ESI-Q/Orbitrap-MS Peptidanalytik (Abschnitt 3.4.4); 3 – UniProt KB Einträge im Anschluss an die Spektrensuche nach ESI-Qq/Orbitrap-MS Peptidanalytik (*Canis familiaris*); 4 – Angegeben sind die identifizierten Peptide und in Klammern die Peptidanzahl, welche für die LF-Quantifizierung verwendet wurde; LF – *labelfree*, tRNA – transfer Ribonukleinsäuren, RP/EB – proteinbindende Proteinfamilie, PDS – PolySUMO-abhängige Separation, MCM – Minichromosomale Instandhaltung, SMC – strukturelle Instandhaltung der Chromosomen, PLK – Serine/Threonin-Proteinkinase, SEC14 – sekretorisches Protein, GTP – Guanosintriphosphat, IQGAP – Ras GTPase-aktivierendes Protein, LSM14 – RNA-bindendes Protein.

Tab. 4.7.: Differenziell exprimierte Membranproteine für den Vergleich von MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zellen. Dargestellt ist die gesteigerte Proteinexpression $R_{LF}(x_i)$ für MDCK_{ADH} Zellen mit Bezug auf MDCK_{SUS} Zellen als Kontrolle und für MDCK_{SUS} Zellen mit Bezug auf MDCK_{ADH} Zellen als Kontrolle (Abschnitt 3.4.6).

$R_{LF}(x_i)^1$	Identifizierte Proteine ²	Eintrag ³	Peptide ⁴
Erhöhte Expression für MDCK _{ADH} Zellen (Verhältnis: MDCK _{ADH} zu MDCK _{SUS}) ¹			
10,57	Galectin-1	E2RJL1	4 (4)
8,40	Secreted phosphoprotein 1	E2R161	11 (6)
4,52	Ephrin type-A receptor 1	E2R6A6	4 (4)
3,15	Protein AHNAK2	J9NZV9	15 (13)
2,85	Utrophin	J9P1H1	19 (13)
2,70	Moesin	E2R7F1	20 (10)
2,49	Integrin α -6	E2RL88	4 (3)
2,37	Syndecan-4	J9NZ79	4 (3)
2,35	Epididymis luminal protein 57	E2RKJ6	6 (6)
2,34	Desmoglein-2	F1PGX1	15 (9)
2,28	Agrin	F1Q2Z6	14 (11)

2,13	Myoferlin	F1PZD5	20 (15)
2,13	Integrin β -4A	J9NXR3	10 (9)
2,06	L1 cell adhesion molecule	E2R2V5	12 (8)
1,95	Caveolin-1	P33724	3 (3)
1,91	Galectin-3	E5Q8W5	10 (9)
1,77	Serpin peptidase inhibitor	C7C419	16 (12)
1,72	Plakoglobin	Q6VAH9	7 (5)
1,64	Syntenin-1	F1PKR0	13 (13)
1,59	Annexin A8	E2R0S6	9 (6)
1,56	Integrin β -3	F1PPG5	7 (7)
1,55	Cadherin-1	F1PAA4	4 (3)
1,50	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	J9P969	137 (107)
1,49	Actinin, α 1	E2QY07	29 (13)
1,49	Serpin B6	E2RGP2	8 (7)
Erhöhte Expression für MDCK _{SUS} Zellen (Verhältnis: MDCK _{ADH} zu MDCK _{SUS}) ¹			
0,70	Carnitine O-palmitoyltransferase 1	F1PM56	9 (7)
0,70	Myosin VI	E2QUR8	22 (19)
0,68	AT-rich interactive domain-containing protein 1A	E2RSH9	5 (5)
0,63	Annexin A5	E2RQ14	7 (6)
0,59	Stomatin	B6F250	7 (5)
0,46	Annexin A1	F1PTI7	6 (6)
0,39	Thrombospondin-1	F1PBI6	13 (11)
0,32	Annexin A13	J9P497	11 (8)

1 – Verhältnis zwischen der Kontrolle (MDCK_{ADH}) und der Probe (MDCK_{SUS}, Abschnitt 3.4.6); 2 – UniProt KB Einträge als Ergebnis des Blast homologer humaner Proteine im Anschluss an die Spektrensuche nach ESI-Q/Orbitrap-MS Peptidanalytik (Abschnitt 3.4.4); 3 – UniProt KB Einträge im Anschluss an die Spektrensuche nach ESI-Qq/Orbitrap-MS Peptidanalytik (*Canis familiaris*); 4 – Angegeben sind die identifizierten Peptide und in Klammern die Peptidanzahl, welche für die LF-Quantifizierung verwendet wurde; AHNAK – Neuroblast-Differenzierung assoziiertes Protein, AT – Adenin Thymin, LF - *label free*.

4.5. Medienbedingte Proteomveränderungen während der Virusinfektionsphase

Es wurde eine Prozessverbesserung erreicht indem eine Vero Zelllinie für die Tollwutvirusinfektion von klassischem Medium (SCM/SFM) an ein Medium frei von tierischen Produkten (IPT-AFM) adaptiert wurde (Abschnitt 3.2.6). Die Veränderung des Kultivierungsmediums für den Produktionsprozess von Tollwutviren kann eine veränderte Proteinexpression in der Wirtszelllinie auslösen. Diese Änderung sind in diesem Kapitel beschrieben. Es wurden die Proteome der scheininfizierten Kulturen in den zwei Medien zu den Zeitpunkten 1, 3, 5 und 8 d p.i. miteinander verglichen.

Bei dem Kultivierungsvergleich der Vero Zelllinien konnten 300 Spots mit differenzieller Proteinexpression detektiert werden (Abschnitt 3.4.6). Davon wurden 149 Spots mit Hilfe des präparativen Gels identifiziert (50% erfolgreich identifiziert, 46 Proteine, Gelkarte: Vero Tollwutinfektion, Tab. 4.1). Um den Effekt des Medienwechsels bei den SCM/SFM-Kulturen und des fehlenden Medienwechsels der IPT-AFM-Kulturen auf das zelluläre Proteom für die Detektion differenziell exprimierter Spots zu mindern, wurden die Ergebnisse der vier Zeitpunkte für jedes Medium gemeinsam betrachtet. Nur die Proteinspots, die in allen Zeitpunkten signifikant differenziell exprimiert waren, wurden weiter betrachtet.

Für $\text{Ver}_{\text{SCM/SFM}}$ Zellen zeigten 29 Proteine und für $\text{Ver}_{\text{IPT-AFM}}$ Zellen 17 Proteine eine gesteigerte Expression (Tab. 4.8). Diese differenziell exprimierten Proteine konnten verschiedenen funktionellen Gruppen zugeordnet werden, darunter: Struktur (Cytoskelett, Membran), zelluläre Stressantwort, Metabolismus, Prozessierung genetischer Informationen, Proteinfaltung und -abbau (Tab. 4.8). Die Proteine wurden nach ihrer Zugehörigkeit zu zellulären Kompartimenten in einer schematischen Zelldarstellung abgebildet (basierend auf Eintragungen der UniProt KB, Abb. 4.29).

Proteine des Cytoskeletts repräsentierten auf der Gelkarte die größte Spotanzahl (Gelkarte: Vero Tollwutinfektion, Tab. 4.1). Jedoch konnte eine signifikant differenzielle Expression zwischen beiden Vero Zelllinien nur für vier Proteine detektiert werden. Die $\text{Ver}_{\text{SCM/SFM}}$ Zellen zeigten eine gesteigerte Expression für Actin α . Das Proteom der $\text{Ver}_{\text{IPT-AFM}}$ Zellen resultierte in einem höheren Anteil an Major-Vault Protein (MVP) und jeweils einer Proteinoform von Actin sowie Keratin. Verschiedene membranassoziierte Proteine zeigten ebenfalls eine differenzielle Expression. Vinculin und das apikal lokalisierte Ezr sind dafür bekannt, die Verknüpfen des Cytoskeletts mit der Plasmamembran zu unterstützen (Critchley 2000, Fehon et al. 2010) und zeigten für $\text{Ver}_{\text{IPT-AFM}}$ Zellen eine gesteigerte Expression. Andererseits waren für $\text{Ver}_{\text{SCM/SFM}}$ Zellen Proteine der Anx Proteinfamilie, Anx A1, A2 und A3, vermehrt

exprimiert. Diese sind unter anderem für die Verknüpfung zwischen Membran und Cytoskelett verantwortlich (Burgoyne and Geisow 1989). Weiterhin wurden für die leichte Kette von Clathrin und das Protein Galectin-3 für VerO_{SCM/SFM} Zellen gesteigerte Spotintensitäten detektiert.

Detektierte Proteine, die der zellulären Stressantwort oder dem Redoxstatus zugeordnet wurden, zeigten eine stärkere Expression für VerO_{SCM/SFM} Zellen. Darunter zählten Hitzeschockproteine (HSP) verschiedenen Molekulargewichts, die als Chaperone für die Stabilisierung der Faltung bestimmter Proteine zuständig sind. Weiterhin zählten die Gluthathion-S-Transferase (GST) und eine Peroxidreduktase (POR) zu dieser funktionellen Klassifizierung. Zusätzlich ließ sich für die SCM/SFM-Kulturen ein verstärktes Vorkommen von Proteinen mit Proteaseaktivität erkennen, wie z. B. Calpain und verschiedene Protease Untereinheiten. Im Gegensatz dazu wurden ER-gekoppelte Proteine für VerO_{IPT-AFM} Zellen detektiert.

Metabolische Proteine der Glykolyse, wie z. B. die Pyruvatkinase Isomerase M1/M2 (PKI) und die Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase (FBP Aldolase), wurden stärker während der Kultivierung in SCM/SFM exprimiert. Des Weiteren zeigten ribosomale Proteine und Prohibitin für VerO_{SCM/SFM} Zellen und das HNRNP A1 sowie das Ruv-B-like Protein für VerO_{IPT-AFM} Zellen eine zunehmende Expression.

Tab. 4.8.: Veränderte zelluläre Proteinexpression von scheininfizierten Vero Zellen während der Kultivierung in SCM/SFM und IPT-AFM. Gelistet sind die Proteine, die mit dem präparativen Gel identifiziert wurden und ein signifikant verändertes $Z(x_i)$ zeigten (Student's t-Test, p-Wert ≤ 0.005 , Abschnitt 3.4.6). Die Klassifizierung der Proteine erfolgte mit Hilfe der UniProt KB.

$\log_2 R(x_i)^1$	Trend ²	Identifizierte Proteine (Abkürzung Abb. 4.29) ³	Gelspot
Keine Zuordnung			
2,1	SCM/SFM	Aldose reductase	F_3018, F_3021
-0,51	IPT-AFM	Enolase 1	F_3308
-0,51	IPT-AFM	Centrosomal protein of 55 kDa (CP 55)	F_3559
-0,54	IPT-AFM	Neutral α -glucosidase AB (Gluc AB)	F_3071
Membranproteine			
5,72	SCM/SFM	Annexin A1 (Anx A1)	F_3343
4,99	SCM/SFM	Galectin-3	F_3318, F_3319
2,68	SCM/SFM	Annexin A2 (Anx A2)	F_3020, F_3302
1,96	SCM/SFM	Clathrin light chain B	F_3022
0,93	SCM/SFM	Annexin A3 (Anx A3)	F_3370
0,85	SCM/SFM	Serum paraoxonase/arylesterase 2 (Serum P/A)	F_3446
-0,51	IPT-AFM	Vinculin	F_3060
-1	IPT-AFM	Ezrin-like isoform (Ezr)	F_3107, F_3544
Metabolismus			
1,07	SCM/SFM	V-type proton ATPase subunit d 1 (ATPase SU)	F_3013
3,02	SCM/SFM	Fructose-bisphosphate aldolase A (FBP Aldolase)	F_3361
2,61	SCM/SFM	Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (PKI M1/M2)	F_3171, F_3305, F_3314
0,77	SCM/SFM	Triosephosphate isomerase 1 (TPI 1)	F_3567

1,43	SCM/SFM	$\delta(3,5)\text{-}\delta(2,4)\text{-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial (CoA isomerase)}$	F_3321
-1	IPT-AFM	Ornithine aminotransferase, mitochondrial (OAT)	F_3323
-0,32	IPT-AFM	ATP synthase, mitochondrial	F_3220, F_3272, F_3298
Proteine des endoplasmatischen Retikulums			
3,52	SCM/SFM	Reticulocalbin-1 (RC-1)	F_3016
-0,32	IPT-AFM	Protein disulfide-isomerase A6 (PDI A6)	F_3568
-0,74	IPT-AFM	TapasinERp57 (TapERp57)	F_3504, F_3505, F_3506
-0,74	IPT-AFM	Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29)	F_3569
-1,32	IPT-AFM	Immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP)	F_3570
Proteine des Proteasoms			
3,88	SCM/SFM	Calpain small subunit	F_3141
2,26	SCM/SFM	Proteasome subunit α (SU alpha)	F_3024
1,89	SCM/SFM	Proteasome - prosome, macropain - activator (Activator)	F_3563
1,77	SCM/SFM	26S proteasome non-ATPase regulatory (26S PnR)	F_3305
-0,32	IPT-AFM	26S protease regulatory (26S PR)	F_3007
Prozessierung genetischer Information			
4,19	SCM/SFM	40S ribosomal protein SA (40S RP)	F_3289
3,88	SCM/SFM	28S ribosomal protein S22, mitochondrial (28S RP)	F_3313
3,43	SCM/SFM	Prohibitin	F_3349
-0,15	IPT-AFM	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (HnRNP A1)	F_3149
-0,74	IPT-AFM	RuvB-like	F_3444
Redoxstatus			

1,32	SCM/SFM	Glutathione S transferase P (GSTP)	F_3181
1,14	SCM/SFM	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial (Prx)	F_3564
Stressantwort			
11,08	SCM/SFM	Heat-shock 70-kDa protein (HSP70)	F_3132, F_3456
5,27	SCM/SFM	Heat shock protein 90kDa (HSP90)	F_3561
4,84	SCM/SFM	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSP60)	F_3427, F_3431, F_3471
2,61	SCM/SFM	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial (HSP75)	F_3483, F_3531
2,35	SCM/SFM	Heat shock protein β -1 (HSB1)	F_3565
2,32	SCM/SFM	Stress-70 protein, mitochondrial (HSP70)	F_3466, F_3468, F_3476
Zelluläre Struktur			
2,49	SCM/SFM	Actin, α cardiac muscle	F_3548
-0,51	IPT-AFM	major vault protein (MVP)	F_3061
-0,51	IPT-AFM	Actin-related protein 3 (Actin RP)	F_3566
-2,32	IPT-AFM	Keratin, type II cytoskeleton 8	F_3110

1 – Logarithmische Transformation zur Basis 2 des Verhältnis zwischen $I_{Norm}(x)$ der Kontrolle ($Ver_{SCM/SFM}$) und $I_{Norm}(x)$ der Probe ($Ver_{IPT-AFM}$, Abschnitt 3.4.6); 2 – Kultivierungsbedingung mit gesteigerter Expression; 3 – NCBI Nr Datenbankeinträge nach MALDI-TOF/TOF-MS Peptidanalytik und Spektrensuche (Abschnitt 3.4.4, Gelkarte: Vero Tollwutinfektion, Tab. 4.1).

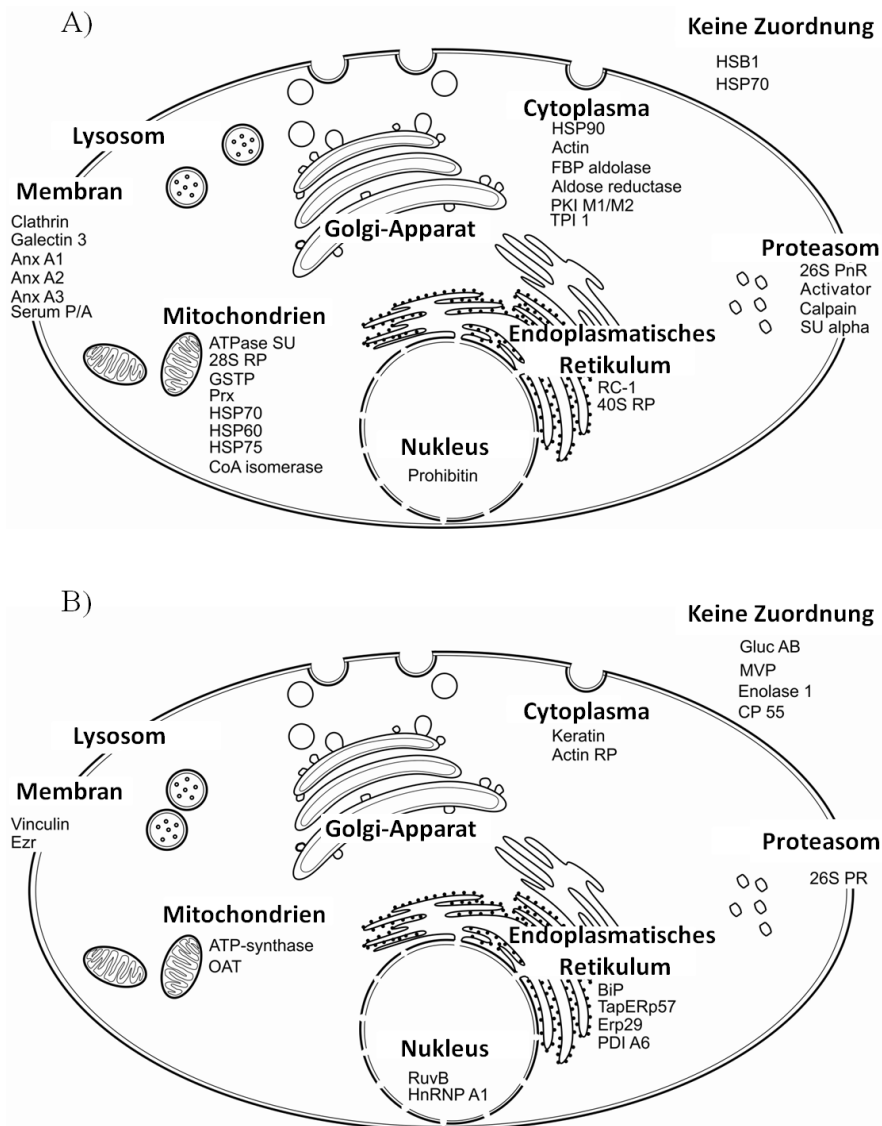


Abb. 4.29.: Veränderte zelluläre Proteinexpression von scheininfizierten Vero Zellen während der Kultivierung in SCM/SFM und IPT-AFM. A) Kultivierung in SCM/SFM, B) Kultivierung in IPT-AFM (Abschnitt 3.2.6). Die Untersuchung der scheininfizierten Proben erfolgte im Infektionszeitraum von 1, 3, 5 und 8 d p.i. (Abschnitt 3.2.6). Es wurden nach 2-D DIGE Analytik Proteine mit signifikant verändertem $Z(x_i)$ (Student's t-Test, p-Wert $\leq 0,005$) berücksichtigt. Aufgeführt sind die zellulären Zuordnungen der identifizierten Proteine (mit Hilfe der UniProt KB). Die identifizierten Proteine zeigten eine stärkere Spotintensität über den Produktionszeitraum im entsprechenden Kultivierungsmedium. Die Abkürzungen sind in Tabelle 4.8 erläutert.

4.6. Einfluss der Zelladaption auf die virusinduzierte Proteinexpression

Die MDCK und Vero Zelllinien zeigten vor und nach Adaption vergleichbares Zellwachstum und vergleichbare Virustiter (Abschnitt 4.2). Nachdem die Veränderungen der Proteinexpression nach den Zelladaptionen untersucht wurden, galt es den Einfluss der Zelladaption auf die virusinduzierte Proteinexpression zu analysieren. In diesem Kapitel werden für die MDCK und Vero Zelllinien vor und nach Adaption die Proteomantworten auf die virale Infektion beschrieben.

4.6.1. Vergleich der virusinduzierten Zellantwort einer adhärennten MDCK Zelllinie mit ihrer verwandten Suspensionszelllinie

Antiviraler Zustand der Zelllinien

Die Proteomstudien von Vester et al. (2009, 2010) zeigten für die MDCK_{ADH} Zelllinie die Aktivierung INF-induzierter Signalwege nach Virusinfektion mit Influenza A/PR/8/34 H1N1 (Stämme des RKI und des *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC)). Im speziellen Fall, dass kein Trypsin zur TOI zugegeben wurde, wird der antivirale Zustand durch INF Ausschüttung verstärkt (Seitz et al. 2012). Das Transkriptionslevel eines bekannten Markerproteins für INF Induktion, bekannt als Myxovirus-Resistenzprotein (Mx1), diente als initialer Vergleich der infizierten Zelllinien MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} (Abb. 4.30). Mit Hilfe einer RT-qPCR (Abschnitt 3.4.7) wurde die Expression des Mx1-Proteins im Vergleich der Schein- zur Virusinfektion quantifiziert. Die Probenahme erfolgte 12 h p.i., wie in früheren Studien von Seitz et al. (2010), um die maximale Mx1-Expression von MDCK_{ADH} Zellen zu detektieren. Im Vergleich des Expressionslevels der Schein- und der Virusinfektion konnte für MDCK_{ADH} Zellen eine 25-fache Zunahme detektiert werden (Abb. 4.30). Seitz et al. (2010) berichtete bei hoher MOI ohne Trypsinzugabe eine 5-fache Zunahme nach Virusinfektion. Infizierte MDCK_{SUS} Zellen resultierten in einer 6-fachen Steigerung des mRNA-Levels für Mx1 (Abb. 4.30). Der Unterschied beider Zelllinien ist nicht signifikant (gepaarter Student's t-Test, p-Wert $\leq 0,05$) aber eine Trend für eine reduzierte Mx1-Expression von infizierten MDCK_{SUS} Zellen ließ sich erkennen.

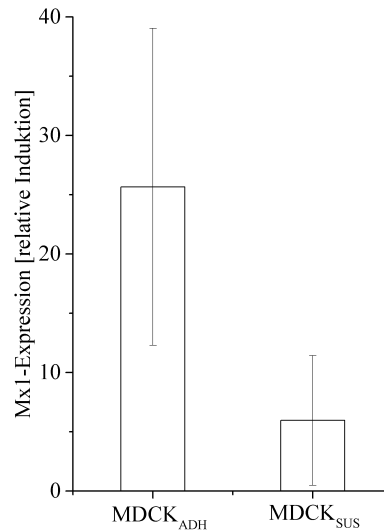


Abb. 4.30.: Relative Induktion von Mx1 während der Influenzavirusinfektion zum Zeitpunkt 12 h p.i. für MDCK Zelllinien analysiert mit RT-pPCR. Die Virusinfektion wurde im Spinner_{PA} bei MOI 6, ohne Trypsin-Zugabe, nach Mediumswechsel mit Influenza A/PR/8/34 (RKI) durchgeführt (Abschnitt 3.2.5). Dargestellt ist der Mittelwert der Mx1-Expression bezogen auf die scheininfizierte Zellkulturprobe und die Standardabweichung der drei Kultivierungen (Abschnitt 3.4.7).

Allgemeine Veränderungen des Proteoms

Die virusinduzierte Zellantwort wurde auf der Ebene des Proteoms mit Hilfe der 2-D DIGE Technologie analysiert (Abschnitt 3.4.6). Jeweils 800 (MDCK_{ADH} Zellen) und 1000 Proteinspots (MDCK_{SUS} Zellen) wurden für die Consensus Spotmuster der Zeitpunkte 0, 8 und 32 h p.i. in der Software Delta2D detektiert (Abschnitt 3.4.6). Zum Zeitpunkt TOI wurde ein 2-D DIGE Ansatz als Negativkontrolle für differenzielle Expression für beide Zelllinien durchgeführt. Mit dem gewählten statistischen Signifikanzlevel (Student's t-Test, p-Wert $\leq 0,05$, $\geq 1,3$ -fache differenzielle Expression) konnte für die Negativkontrolle (TOI) keine differenzielle Expression zwischen den scheininfizierten und virusinfizierten Kulturen detektiert werden. Mit dem präparativen Gel konnten 75% der Spots mit differenziell exprimierten Proteinen identifizierte werden (240 Spots, 104 Proteine, Gelkarten für Influenzainfektion, Tab. 4.1).

Frühe Phase der virusinduzierten Zellantwort

Die Proteomanalyse einer frühen Infektionsphase wurde 8 h p.i. durchgeführt. Der Zeitpunkt wurde auf der Grundlage des Zeitpunktes der maximalen viralen mRNA Expression zwischen 4 und 6 h p.i. (Abschnitt 4.2.1) und in Anlehnung an die Proteomstudien von Vester et al. (2009, 2010). Diese infizierten die MDCK_{ADH} Zelllinie mit Influenza A/PR/8/34 H1N1 (Stämme des

RKI und des NIBSC). Sie konnten 4 h p.i. keine signifikante Proteinexpression mittels 2-D DIGE detektieren, 8 h p.i. zeigten fünf Proteinspots (Infektion mit dem Stamm von RKI) und 20 Proteinspots (Infektion mit dem Stamm von NIBSC) eine differenzielle Expression.

Die 2-D DIGE Analyse detektierte sechs und acht Proteinspots mit gesteigerter Spotintensität für die infizierten Zellen MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} im Vergleich zur scheininfizierten Kontrollprobe. Die Spots konnten nach massenspektrometrischer Proteinidentifizierung viralen Proteinen, wie dem nicht-strukturelle Protein 1 (NS1) und NP (Abb. 4.31), zugeordnet werden. Ein Spot resultierte in zwei signifikanten Proteinidentifizierungen für NS1 und Peroxiredoxin-6 (MDCK_{SUS}). Für das zweite Protein konnte durch die Überlagerung mit einem viralen Protein keine Aussage über dessen Expression getroffen werden. Ein zelluläres Protein (Ezr) wurde mit einer 3-fach stärkeren Spotintensität in virusinfizierter MDCK_{SUS} Zellen detektiert.

Späte Phase der virusinduzierten Zellantwort

Die Proteomanalyse der späten Phase der virusinduzierten Zellantwort wurde 32 h p.i. durchgeführt. Der Zeitpunkt wurde für beide Zelllinien gewählt, da für MDCK_{ADH} Zellen eine Abnahme der adhärennten Zellen um 30% und für MDCK_{SUS} Zellen eine Abnahme der Vitalität um 30% gemessen wurde. Beide Zelllinien zeigten zu diesem Zeitpunkt einen signifikanten Anteil an virusinduziert-apoptotischen Zellen bestimmt mit Hilfe eines Assay für den späten Apoptosemarker DNA-Fragmentierung (TUNEL-Assay, Daten nicht gezeigt, Abschnitt 3.4.7). Im Vergleich der schein- und der virusinfizierten Zellen wurden für MDCK_{ADH} 72 und für MDCK_{SUS} 154 Proteinspots mit differenzieller Expression detektiert. Davon zeigten 13 Spots für MDCK_{ADH} und 65 Spots für MDCK_{SUS} Zellen eine zunehmende Intensität nach Virusinfektion. Die zugehörigen Proteinidentifizierungen konnten strukturellen Proteinen (Keratin, Aktin, Profilin), viralen Proteinen (NS1, Matrixprotein 1, Polymeraseprotein (sauer), NP) und Stressproteinen (HSP 70, 71, 105 und β -1, Tab. 4.9, 4.10) zugeordnet werden.

Der größere Teil der detektierten Proteinspots zeigte nach Virusinfektion eine abnehmende Intensität im Bezug zur scheininfizierten Kontrollprobe. Es handelte sich um 59 Spots (28 identifizierte Proteine) für MDCK_{ADH} und 89 Spots (41 identifizierte Proteine) für MDCK_{SUS} Zellen. Die identifizierten Proteine mit abnehmender Expression wurden funktionellen Klassen zugeordnet (Abb. 4.32). Über die meisten funktionellen Gruppen, wie Proteine des Cytoskeletts, der Membran, des Metabolismus und der zellulären Stressantwort, zeigten beide Zelllinien eine ähnliche Anzahl an Proteinen. Der größte Unterschied war für die funktionelle Gruppe "Prozessierung genetischer Information" zu erkennen (Abb. 4.32), die für MDCK_{ADH} Zellen zwei Proteine und für MDCK_{SUS} Zellen zehn Proteine beinhaltete. Die identifizierten Proteine dieser Gruppe repräsentierten überwiegend verschiedene Proteinspezies der HNRNPs,

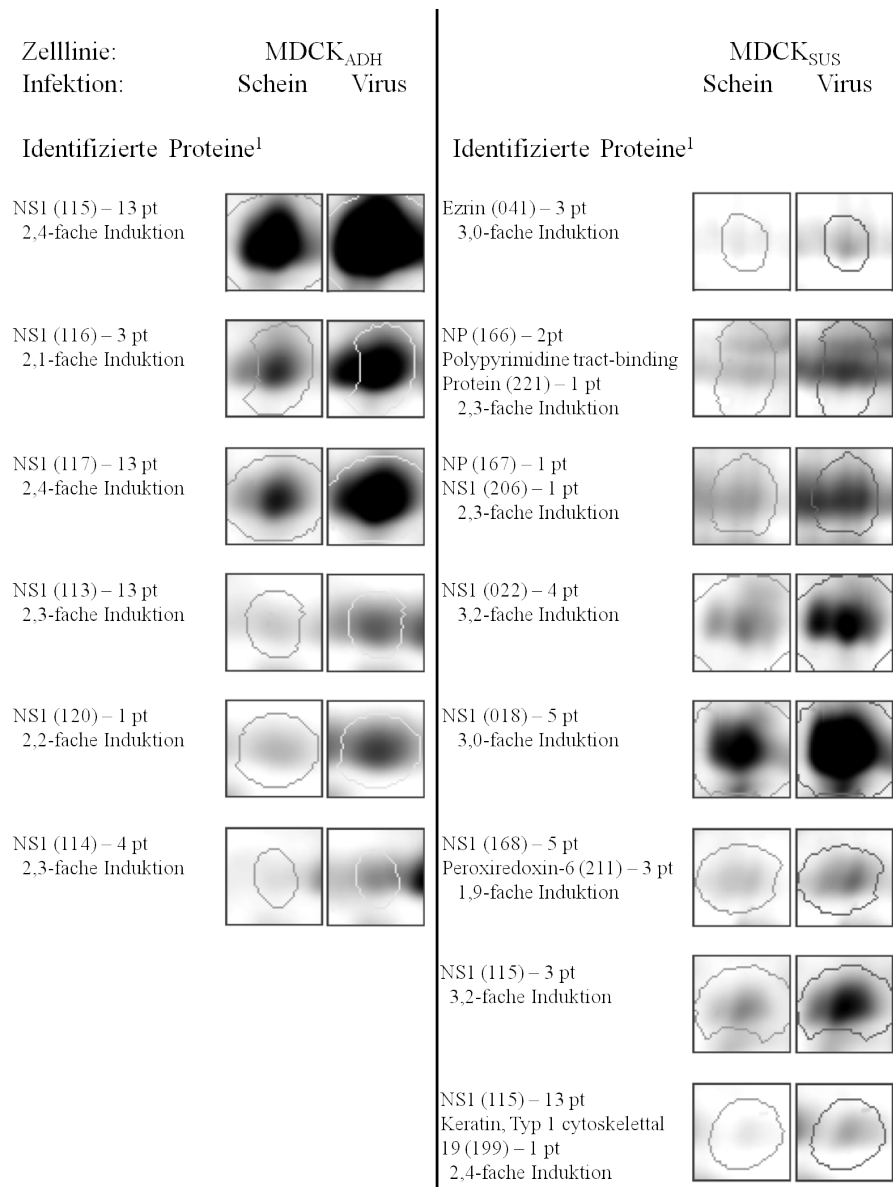


Abb. 4.31.: Differenziell exprimierte Proteinspots für den Vergleich der Schein- mit der Virusinfektion zum Zeitpunkt 8 h p.i. für MDCK Zellen. Die Virusinfektion wurde im Spinner_{PA}, bei MOI 6, ohne Trypsin-Zugabe, nach Mediumswechsel mit Influenza A/PR/8/34 (RKI) für jede Zelllinie in drei Replikaten durchgeführt (Abschnitt 3.2.5). Die Spotintensitäten für die Virusinfektion im Vergleich zur Scheininfektion waren signifikant erhöht (Student's t-Test, p-Wert $\leq 0,05$). Die Proteinidentifizierung (Proteinname, Spotnummer in Klammern, Peptidanzahl) wurde sowohl für die MDCK_{ADH} als auch für die MDCK_{SUS} Zellproteome durchgeführt (Gelkarten Tab. 4.1). Die Bilder wurden für je ein Gel repräsentativ aus der Software Delta2D exportiert. 1 – NCBI Nr Datenbankeinträge nach MALDI-TOF/TOF-MS Peptidanalytik und Spektrensuche (Abschnitt 3.4.4); NS1 - Nicht-strukturelles Protein 1, NP - Nukleoprotein, pt - Peptide.

wie HNRNP K, U, M, A/B und H1. Für eine übersichtliche Darstellung der differentiellen Expression aller HNRNP Spezies wurden von beiden Zellen die Gelausschnitte im Vergleich Schein- gegen Virusinfektion in einer Abbildung zusammengefasst (Abb. 4.33).

Tab. 4.9.: Proteine mit gesteigerter Expression 32 h p.i. für die influenzainfizierte MDCK_{ADH} Zelllinie.

Identifizierte Proteine ¹	$R(x_i)^2$	Gelpots ³
Keratin, type I cuticular Ha1	1,7	249
NS1 – Influenza A	$\geq 2,3$	113, 116, 117
Profilin-1	1,5	081
Protein S100-A11	1,6	042

1 – NCBI Inr Datenbankeinträge nach MALDI-TOF/TOF-MS Peptidanalytik und Spektrensuche (Abschnitt 3.4.4); 2 – Verhältnis zwischen $I_{Norm}(x)$ der Kontrolle (Scheininfektion) und $I_{Norm}(x)$ der Probe (Virusinfektion, Abschnitt 3.4.6); 3 – Bezug zu den Gelkarten der MDCK Influenzainfektion (Tab. 4.1); NS1 - Nicht-strukturelles Protein 1.

Tab. 4.10.: Proteine mit gesteigerter Expression 32 h p.i. für die influenzainfizierte MDCK_{SUS} Zelllinie.

Identifizierte Proteine ¹	$R(x_i)^2$	Gelspot ³
14-3-3 protein β/α	$\geq 1,9$	038, 040
78 kDa glucose-regulated protein	≥ 5	043
Actin, cytoplasmic 1	3,7	132
Calcyphosin	4,6	103
Cytosolic prostaglandin E synthase	2,2	105
Ezrin isoform 1	2,0	041
Heat shock 70 kDa protein 1	$\geq 1,6$	035, 070, 071
Heat shock cognate 71 kDa protein	1,4	226
HSP 105 kDa	$\geq 1,8$	220, 147
HSP β -1	1,4	126
HNRNP K	3,7	118
Keratin, type I cytoskeletal 10	$\geq 1,4$	026, 148
Keratin, type I cytoskeletal 18	$\geq 2,6$	004, 127, 198
Keratin, type I cytoskeletal 19	$\geq 3,0$	021, 025

Keratin, type II cytoskeletal 8	4,2	016
M1 (Influenza)	3,7	194
Myosin-9	1,8	096
NS1 (Influenza)	$\geq 2,4$	134, 018, 020, 024, 102, 022, 208
Nuclear autoantigen RA33, A2 HNRNP homolog	1,9	062
Nucleolin	≥ 5	113
NP (Influenza)	$\geq 3,0$	014, 063, 119, 121, 150
Polymerase acidic protein (Influenza)	3,3	066
Tubulin α -1B chain	4,7	078
Prelamin-A/C	$\geq 2,4$	032, 125, 156
Prohibitin	1,7	099
Proteasome SU α type-3	1,6	101
Protein phosphatase 1 regulatory SU 14B regulatory subunit 14B	3,8	005
T-complex protein 1 SU α	1,7	036
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	$\geq 3,3$	116, 192

1 – NCBI Inr Datenbankeinträge nach MALDI-TOF/TOF-MS Peptidanalytik und Spektrensuche (Abschnitt 3.4.4); 2 – Verhältnis zwischen $I_{Norm}(x)$ der Kontrolle (Scheininfektion) und $I_{Norm}(x)$ der Probe (Virusinfektion, Abschnitt 3.4.6); 3 – Bezug zu den Gelkarten der MDCK Influenzainfektion (Tab. 4.1); HSP – Hitzeschockprotein, HNRNP – heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein, M1 – Matrixprotein 1, NS1 – Nicht-strukturelles Protein 1, NP – Nukleoprotein, SU – Untereinheit.

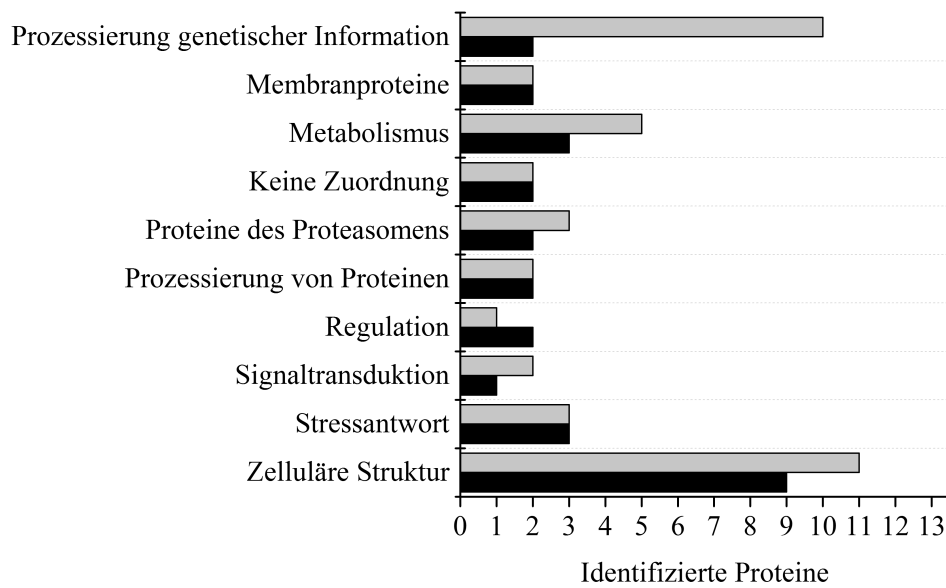


Abb. 4.32.: Funktionelle Klassifizierung differenziell exprimierter Proteine mit abnehmender Expression nach Influenzavirusinfektion zum Zeitpunkt 32 h p.i. für MDCK Zelllinien ■ MDCK_{ADH} Zelllinie, ■ MDCK_{SUS} Zelllinie. Die Virusinfektion wurde im Spinner_{PA}, bei MOI 6, ohne Trypsin-Zugabe, nach Mediumswechsel mit Influenza A/PR/8/34 (RKI) für jede Zelllinie in drei Replikaten durchgeführt (Abschnitt 3.2.5). Die Klassifizierung der Proteine erfolgte anhand der in der UniProt KB dokumentierten zellulären Kompartimente und biologischen Prozesse. Die Proteine während der Virusinfektion zeigten im Vergleich zur Scheininfektion eine signifikante Reduktion der Spotintensitäten (Student's t-Test, p-Wert $\leq 0,05$).

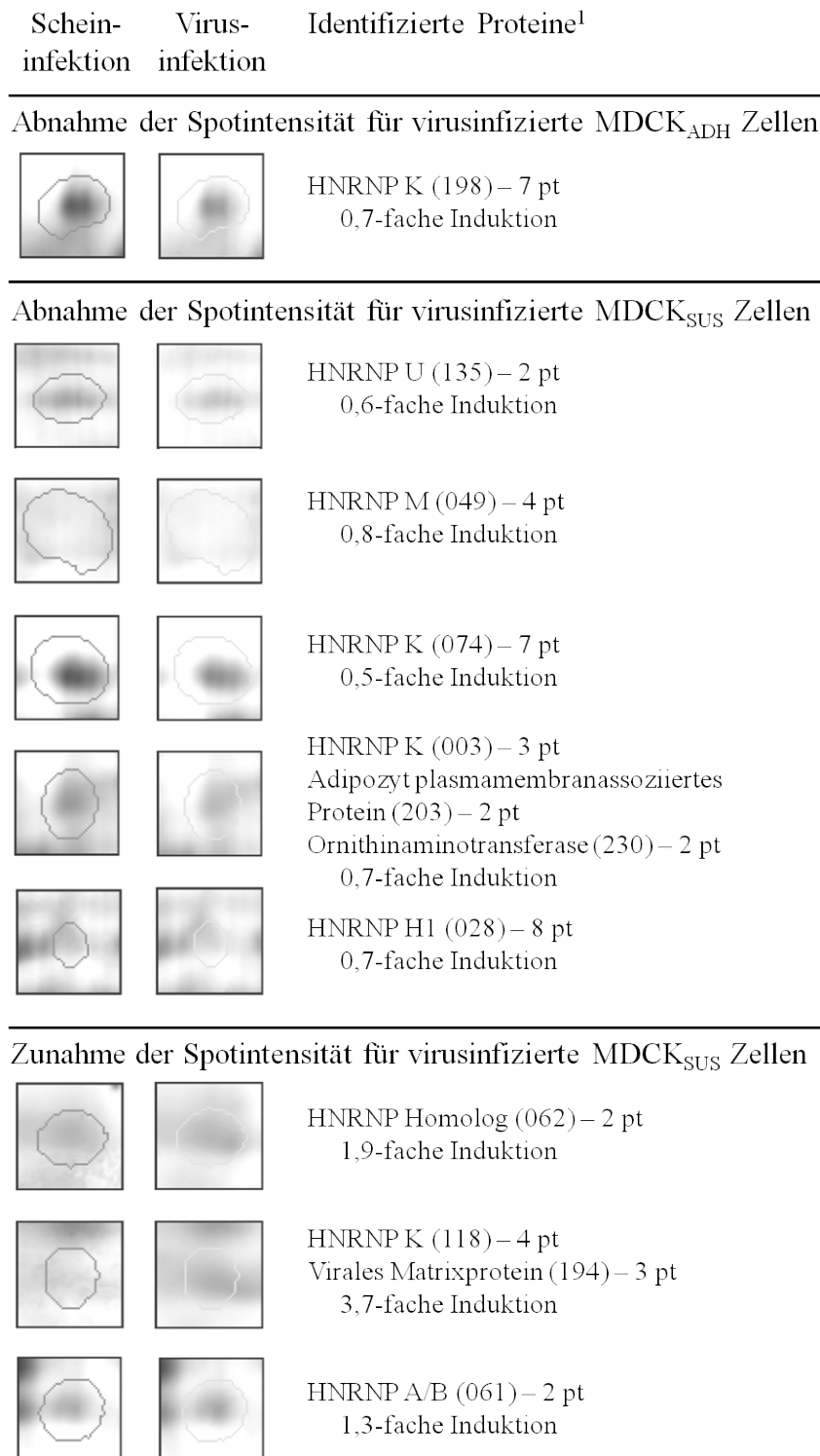


Abb. 4.33.: Differenziell exprimierte Proteinspots der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine im Vergleich der Schein- und Virusinfektion zum Zeitpunkt 32 h p.i. für MDCK Zellen. Fortsetzung nächste Seite.

Fortsetzung Abb. 4.33: 1 – NCBI Inr Datenbankeinträge nach MALDI-TOF/TOF-MS Peptidanalytik und Spektrensuche (Abschnitt 3.4.4, Gelkarten der MDCK Influenzainfektion, Tab. 4.1); HNRNP - heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein, pt - Peptide. Die Virusinfektion erfolgte im Spinner_{PA}, bei MOI 6, ohne Trypsin-Zugabe, nach Mediumswechsel mit Influenza A/PR/8/34 (RKI) für jede Zelllinie in drei Replikaten (Abschnitt 3.2.5). Die Spotintensitäten für die Virusinfektion im Vergleich zur Scheininfektion waren signifikant verschieden (Student's t-Test, p-Wert $\leq 0,05$). Die Proteinidentifizierung (Proteinname, Spotnummer in Klammern, Peptidanzahl) wurde für die MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zellproteome durchgeführt (Gelkarten Tab. 4.1). Die Bilder wurden für je ein Gel repräsentativ aus der Software Delta2D exportiert.

Nachweislich war ein signifikanter Anteil der virusinfizierten Zellpopulationen beider Zelllinien 32 h p.i. apoptotisch ($20 \pm 10\%$ MDCK_{ADH} Zellen und $35 \pm 14\%$ MDCK_{SUS} Zellen, Abschnitt 4.2.1, TUNEL-Assay Abschnitt 3.4.7). Auf der Ebene des Proteoms konnten ebenfalls apoptotische Proteine detektiert werden. Darunter zählten die drei Membranproteine Ezr, Radixin und Moesin, die gemeinsam den ERM-Komplex bilden. Weiterhin wurden das GRP78 und Nucleolin detektiert, die für eine antiapoptotische Wirkungsweise in der Literatur beschrieben sind und eine Zunahme der Expression für MDCK_{SUS} zeigten. Infizierte MDCK_{SUS} Zellen zeigten zusätzlich eine abnehmende Expression für zwei proapoptotische Proteine (programmierter Zelltod Protein 5, PDCD5 und programmierter Zelltod interagierendes Protein 6, PDCD6IP). Die apoptotischen Proteine sind in Tabelle 4.11 mit den dazugehörigen Literaturstellen zusammengefasst.

Tab. 4.11.: Apoptotische Proteine mit differenzieller Expression 32 h p.i. in influenzainfizierten MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zelllinien.

Protein	Expression MDCK _{ADH}	Expression MDCK _{SUS}	Wirkungsweise	Literatur
GRP78	–	zunehmend	Bindung des proapoptotischen Proteins bik-2 zur Degradation	Fu et al. (2007)
Aconitase	–	abnehmend	Zerstörung der Mitochondrien verursacht abnehmende Enzymaktivität	Gardner et al. (1994)
Ezr	abnehmend	zunehmend	Mechanismus zur Zerstörung der Microvilli	Kondo et al. (1997)
Moesin	–	abnehmend	Mechanismus zur Zerstörung der Microvilli	Kondo et al. (1997)
Nucleolin	–	zunehmend	Stabilisierung des antiapoptotischen Proteins bcl-2	Sengupta et al. (2004)
PDCD5	–	abnehmend	Proapoptotische Aktivität	Liu et al. (2004)
PDCD6IP	–	abnehmend	Proapoptotische Aktivität	Chatellard-Causse et al. (2002)
Radixin	abnehmend	abnehmend	Mechanismus zur Zerstörung der Microvilli	Kondo et al. (1997)

1 – 78 kDa Glucose-reguliertes Protein; 2 – B-cell lymphoma-2 Proteinfamilie; 3 – programmierter Zelltod Protein 5; 4 – programmierter Zelltod interagierendes Protein 6, auch bekannt als ALIX - ALG-2-interagierendes Protein X.

4.6.2. Einfluss der medienbedingten Zelllinienadaptation auf die virusinduzierte Zellantwort bei Vero Zellen

Die Vero Zellen, kultiviert in zwei Medien, dienten als Wirt und Produzent der Tollwutviren. Dafür ist eine Virus-Wirtszell-Interaktion notwendig, die mit Hilfe eines 2-D DIGE Ansatzes analysiert wurde. Ein Proteomvergleich der virusinfizierten Kulturen mit den scheininfizierten Kulturen nach 1, 3, 5 und 8 d p.i. ergab für beide Medien 269 differenziell exprimierte Proteinspots für VerO_{SCM/SFM} Zellen und 198 Spots für VerO_{IPT-AFM} Zellen. Beide Medien zeigten eine Schnittmenge von 90 Proteinspots. Davon konnten 47 Spots mit dem präparativen Mastergel identifiziert werden. Innerhalb dieser identifizierten Spots konnten 16 Proteinspots (9 Proteine) einem gleichen Expressionsprofil für beide Medienbedingungen zugeordnet werden. Die restlichen 31 Spots (14 Proteine) zeigten verschiedene Expressionsprofile für die beiden Bedingungen (Tab. 4.12, Anhang A.5).

Fünf Proteinspots der virusinfizierten Proben zeigten eine mehr als fünffache Zunahme der Expression im Vergleich zu den scheininfizierten Proben. Es handelte sich um das virale Nucleoprotein und das virale Phosphoprotein M1. Eine Abnahme der Spotintensität für beide Medienbedingungen des Proteoms virusinfizierter Zellen im Vergleich zu scheininfizierten Zellen konnte für 11 Spots, welche 7 Wirtszellproteine repräsentierten, detektiert werden. Bei den Wirtszellproteinen handelte es sich unter anderem um S100a6 und Reticulocalbin 1. Beide Proteine sind dafür bekannt, Kalziumionen (Ca^{2+}) zu binden (Ozawa and Muramatsu 1993, Schäfer and Heizmann 1996) und in vielen zellulären Regulationswegen eine Rolle zu spielen. Weiterhin konnten zwei Proteine, 14-3-3 ζ und Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein (YWHA), der 14-3-3 Proteinfamilie identifiziert werden. Die Proteine dieser Familie sind in einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen involviert (Zhao et al. 2011). Proteine mit unterschiedlichen Expressionsprofilen für VerO_{SCM/SFM} Zellen und VerO_{IPT-AFM} Zellen konnten dem Cytoskelett, dem Nukleus, der Stressantwort, der Modifikation von Aminosäuren und der Prozessierung von genetischer Informationen zugeordnet werden.

Bei separater Betrachtung der virusinduzierten Zellantwort in verschiedenen Medien konnten deutliche Unterschiede in der Proteinexpression beider Zelllinien gesehen werden. Mit 269 differenziell exprimierten Spots konnte eine stärkere Reaktion für die VerO_{SCM/SFM} Zellen als für die VerO_{IPT-AFM} Zellen mit 198 Spots festgestellt werden. Davon konnten 50% mit dem präparativen Mastergel identifiziert werden. Allerdings ergab eine funktionelle Betrachtung der exprimierten Proteine während der Tollwutinfektion eine Ähnlichkeit beider Zelllinien (Abb. 4.34). Vor allem Proteine des Cytoskeletts, des Metabolismus und der zellulären Stressantwort waren während des Produktionsprozesses differenziell exprimiert.

Tab. 4.12.: Virusinduzierte Proteinexpression in Vero Zellen kultiviert im 2L-BR nach Tollwutinfektion. Aufgeführt sind die identifizierten Proteine und ihre zelluläre Zuordnung. Die identifizierten Proteine zeigten für beide Kultivierungsmedien (SCM/SFM, IPT-AFM) eine differenzielle Expression im Vergleich der scheininfizierten Kultur zur virusinfizierten Kultur (Student's t-Test, p-Wert $\leq 0,005$, Abschnitt 3.4.6). Die Proteinidentifizierung erfolgte mit Hilfe der Gelkarte (Gelkarte: Vero Tollwutinfektion, Tab. 4.1). Die Virusinfektion wurde bei einer MOI von 0,1 durchgeführt (Abschnitt 3.2.6). Die Expression der Proteinspots ist im Anhang A.5 dargestellt.

Klassifizierung ¹	Identifizierte Proteine ²	Gelspot	Abkürzung ³
Expressionsprofil - gesteigerte Expression			
Virus- proteine	Nucleoprotein	F_3511, F_3513	NP
	Phosphoprotein M1	F_3009, F_3010, F_3012	PP
Expressionsprofil - geminderte Expression			
Zelluläre Struktur	Annexin A5	F_3008, F_3359	Anx A5
Metabolismus	Serum paraoxonase/ arylesterase 2-like isoform 1	F_3446	Serum P/A
Multifunktionelle Enzyme	Enolase 1	F_3308	Eno 1
Regulation	Reticulocalbin-1	F_3016	RC-1
	S100a6	F_3028	S100a6
Signal- transduktion	14-3-3 ζ Protein	F_3025	14-3-3
	Tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase activation protein	F_3023	YWHA
Expressionsprofil - verschieden			
Zelluläre Struktur	Ezrin	F_3107, F_3544	Ezr
	Keratin, type II cytoskeleton 8	F_3110	Ker 8
	Keratin, type I cytoskeleton 10	F_3483	Ker 10
	Lamin A/C	F_3364, F_3549	Lam A/C
	Vimentin	F_3003, F_3004, F_3014, F_3015	Vim
Prozessierung genetischern	40S ribosomal protein SA	F_3289	40S RP
	Pre-mRNA-splicing factor SPF27	F_3562	SPF27

Informatione	Prohibitin	F_3349	PH
Protein-	Adenosylhomocysteinase	F_3560	AHC
modifizierung	Neutral α -glucosidase AB	F_3071	Gluc AB
Stressantwort	60 kDa heat shock protein	F_3005	HSP60
	Heat shock protein 90kDa	F_3561	HSP90
	Heat-shock 70-kDa protein 5	F_3035	HSP70
	T-complex protein 1	F_3499, F_3501, F_3432	TC

1 – Klassifizierung wurde mit Hilfe der UniProt KB durchgeführt; 2 – NCBI Inr Datenbankeinträge nach MALDI-TOF/TOF-MS Peptidanalytik und Spektrensuche (Abschnitt 3.4.4, Gelkarte: Vero Tollwutinfektion, Tab. 4.1); 3 – Bezug zum Anhang A.5.

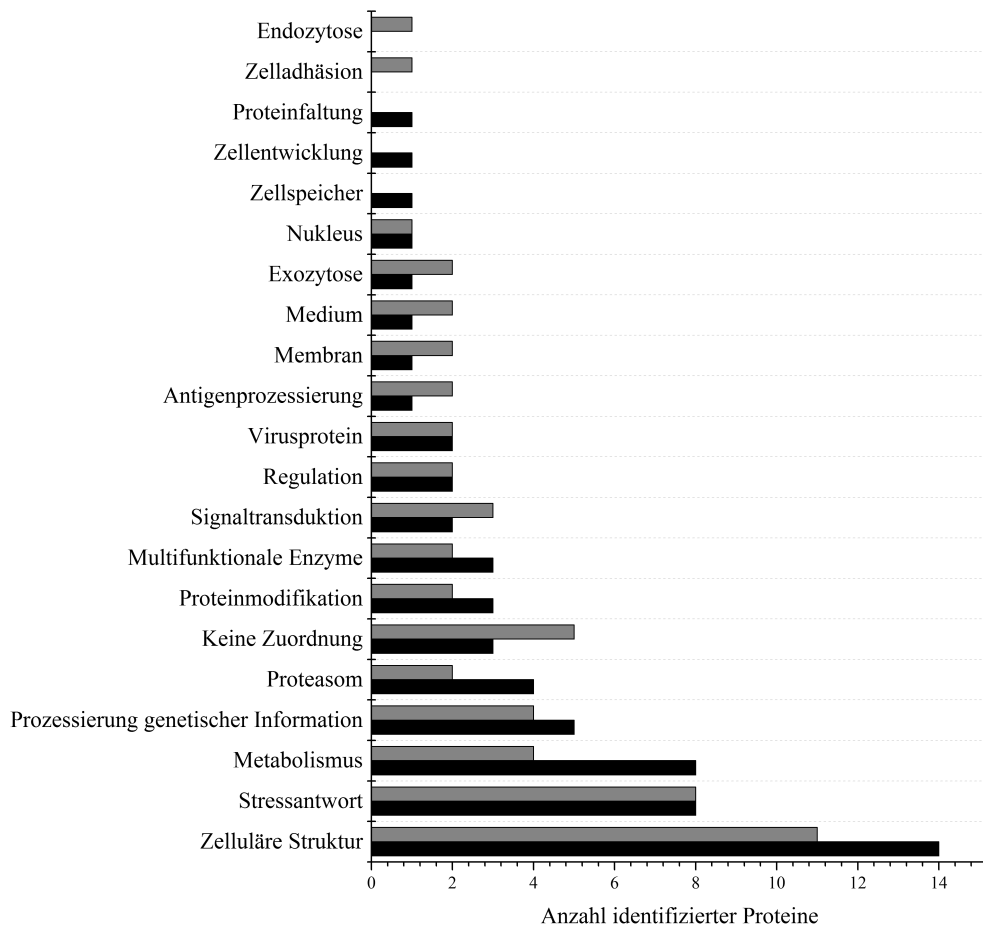


Abb. 4.34.: Funktionelle Klassifizierung der signifikant differentiell exprimierten Proteine während der Tollwutinfektion von Vero Zellen im 2L-BR. ■ VeroIPT-AFM, ■ VeroSCM/SFM Zelllinie. Die Virusinfektion wurde bei MOI 0,1 durchgeführt (Abschnitt 3.2.6). Aufgeführt sind die identifizierten Proteine, die für die Kultivierungsmedien (SCM/SFM, IPT-AFM) eine differenzielle Expression im Vergleich der scheininfizierten Kultur zur virusinfizierten Kultur zeigten (Student's t-Test, p-Wert $\leq 0,005$, Abschnitt 3.4.6). Die Klassifizierung der Proteine erfolgte anhand der in der UniProt KB dokumentierten zellulären Kompartimente und biologischen Prozesse.

5. Diskussion

Die Zelladaption adhärenter tierischer Zelllinien an Suspensionswachstum und optimiertes Medium stellt für die Zellkulturtechnik eine Herausforderung dar. Bislang ist detailliertes Wissen über die komplexen zellulären Mechanismen und deren Zusammenspiel während der Zelladaption nur begrenzt verfügbar. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Zelllinien, MDCK_{ADH} und Ver_{SCM/SFM}, betrachtet und vier Fragestellungen auf Proteomebene im Kontext der zellbasierten Impfstoffproduktion untersucht:

1. Welche Proteinexpressionen werden durch eine Adaption an Suspensionswachstum in CDM induziert? (Abschnitt 5.3)
2. Wie unterscheiden sich die Zelllinien vor und nach Adaption an Suspensionswachstum in CDM in ihrer Proteinexpression? (Abschnitt 5.4)
3. Wie unterscheiden sich die Zelllinien vor und nach Adaption an optimiertes Medium in ihrer Proteinexpression während der Virusreplikationsphase? (Abschnitt 5.5)
4. Wie verändert sich die virusinduzierte Zellantwort durch eine Zelladaption? (Abschnitt 5.6)

Dazu wurden zunächst die verwendeten Methoden der Proteinanalytik (Abschnitt 5.1) und die Zelllinien vor und nach Zelladaption (Abschnitt 5.2) näher untersucht.

5.1. Qualität der optimierten Methoden der zellulären Proteomanalytik

5.1.1. Zellaufschluss für die Proteinextraktion

Für die Proteinidentifizierung und -quantifizierung ist die Probenvorbereitung entscheidend. Dafür wurden drei Parameter für MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zellen verglichen. Dies erfolgte mit der Betrachtung des Einflusses des Waschschrilles, der lytische Effizienz verschiedener Puffer und des mechanischen Aufschlusses anhand der Proteinkonzentration der Lösung nach

der Extraktion. Das Ziel der Untersuchung war es, eine geeignete Probenvorbereitung beider Zelllinien für die LF-Quantifizierung zu etablieren.

Für die Analytik sind eine effiziente Proteinextraktion und eine minimale Zugabe störender Agenzien für die nachfolgende massenspektrometrische Analytik essenziell. Um den Eintrag störender Agenzien gering zu halten, wurden für die LF-Quantifizierung die Proben mit 0,5%igem SDS-Puffer aufgeschlossen. Die MDCK_{ADH} Zellen zeigten im Gegensatz zu MDCK_{SUS} Zellen stärkere Abweichungen der messbaren Proteinkonzentrationen (Abb. 4.1). Diese Abweichungen können durch ungewollte Proteinanheftungen über ladungsabhängige Wechselwirkungen an den Microcarriern ausgelöst worden sein.

Auf den lytischen Zellaufschluss folgte ein mechanischer Aufschluss. Dafür wurden die Proteinlösungen mit einer Einwegspritze homogenisiert, eingefroren und wieder aufgetaut. Interessanterweise hatte dieser Aufschluss einen deutlichen Effekt auf die messbare Proteinkonzentration der MDCK_{SUS} Zellen. Die Proteinkonzentration konnte annähernd verdoppelt werden (Abb. 4.1). Das bedeutet, dass für die MDCK_{SUS} Zellen eine Zellyse durch Puffer keinen vollständigen Zellaufschluss erreicht. Ob die Proteinextraktion durch weitere Schritte, wie Ultraschallbehandlung oder mechanische Zerkleinerung in der Kugelmühle, weiter verbessert werden kann, sollte in zukünftigen Versuchen geprüft werden.

Final wurde für MDCK_{ADH} Zellen ein Proteingehalt von $220 \pm 40 \mu\text{g Protein}/1 \times 10^6$ Zellen und MDCK_{SUS} Zellen von $180 \pm 10 \mu\text{g Protein}/1 \times 10^6$ Zellen ermittelt (Abb. 4.1). Die Differenz zwischen dem Proteingehalt der MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zellen kann mit großer Wahrscheinlichkeit auf den Unterschied im Zellvolumen (Durchmesser: MDCK_{ADH} Zellen ca. $14 \mu\text{m}$, MDCK_{SUS} Zellen ca. $12 \mu\text{m}$) zurückgeführt werden. Die Proteingehalte sind mit Ergebnissen für andere Säugerzellen aus der Literatur vergleichbar (Tab. 5.1). Der berichtete Wert von $410 \mu\text{g Protein}/1 \times 10^6$ Zellen für eine MDCK Zelllinie des Ludwig Institutes für Krebsforschung (Tan et al. 2012) ist im Vergleich doppelt so hoch. Ursachen für diese Differenz können zum einen der unterschiedliche Ursprung der MDCK Zelllinie und zum anderen eine andere Wachstumsphase zum Untersuchungszeitpunkt sein.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde in der vorliegenden Arbeit der BCA-Assay mit Bezug auf eine Serumalbumin-Eichkurve verwendet. Die Aminosäurezusammensetzung des Serumalbumin stimmt jedoch nicht mit der Zusammensetzung der verwendeten Proteinlösung überein. Da der BCA-Assay stark durch die vier Aminosäuren Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan beeinflusst wird (Pierce BCA Protein Assay Kit), wurde der Proteingehalt der Zellen mit einer methodenabhängigen Abweichung ermittelt. Denkbar wäre eine weitere Auftrennung der Proteinlösung in einzelne Aminosäuren und deren absolute Quantifizierung (Barolomeo and Maisano 2006). Diese Methode ist jedoch sehr zeitaufwendig. Da sowohl die 2-D DIGE als auch die LF-Methode eine relative Quantifizierung von Proteinen ist, war die Bestim-

mung des absoluten Proteingehalts nicht im Fokus der Arbeit und die Methode wurde nicht weiter optimiert.

Tab. 5.1.: Proteingehalt verschiedener Säugerzellen.

Zelllinie	Proteingehalt [$\mu\text{g}/1 \times 10^6$ Zellen]	Literatur
Chang's liver (Mensch)	190 - 314	Volpe and Eremenko-Volpe (1970)
Hela (Mensch)	146 - 195	Volpe and Eremenko-Volpe (1970)
Hela (Mensch)	150	Finka and Goloubinoff (2013)
Mesangiumzellen (Ratte)	93	Ling et al. (1998)
MDCK (Hund)	410	Tan et al. (2012)
HEK293T (Mensch)	180	Tan et al. (2012)
SW480 (Mensch)	150	Tan et al. (2012)

5.1.2. 2-D DIGE Proteomanalytik

In der vorliegenden Arbeit erfasste die 2-D DIGE Proteomanalytik hauptsächlich hochabundante Proteine (Abb. 4.5). Die Methode kann bis zu fünf Größenordnungen (z. B. 10 ng bis 1 mg) bei der Proteindetektion abdecken (Görg et al. 2004), was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte (Abschnitt 4.1.2, 2% bis 0,0002% $V_D(x_i)$). Um in einem zellulären Proteom (Proteinmengenunterschiede über 9 Größenordnungen, Schwanhäusser et al. 2011) weniger abundante Proteine zu detektieren, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Ein vielversprechender Ansatz ist die Vorfraktionierung zellulärer Bestandteile für die 2-D DIGE Methode (Mathias et al. 2011, Tauro et al. 2013) oder die Abreicherung hochabundanter Proteine über Affinitätschromatographien (Hyung et al. 2014).

In der Proteinanalytik weisen gelbasierte Verfahren im Allgemeinen eine relativ geringe Reproduzierbarkeit auf. Verbesserungen wurden durch die fluoreszenzbasierte Quantifizierungen mit einem internen Standard (Unlü et al. 1997) und die Anwendung von horizontalen Gelelektrophoresesystemen mit kommerziell erhältlichen Gel-Kits (HPE-Tower, Serva, Moche et al. 2013) erreicht. Ein in dieser Arbeit untersuchter Methodenparameter ist die statistische Genauigkeit der 2-D DIGE Methode. Sie kann über die Richtigkeit (*accuracy*) eines Messwertes und ihre Präzision (*precision*) bestimmt werden (Wellnitz 2005). Eine Aussage über die Methodenpräzision kann durch die Betrachtung der Abweichungen (Standardabweichung oder MAD) innerhalb technischer Wiederholungsmessungen getroffen werden. Die Verteilung der relativen Abweichung folgte einer logarithmischen Normalverteilung über die Gesamtheit aller Proteins-

pots ($n=6$, Abb. 4.8). Die Maxima der Verteilungen lagen für die relative Standardabweichung bei 6% und für die relative MAD bei 3%. Das Maximum der Verteilung der relativen Standardabweichung der biologischen Replikate lag bei 21% ($n=3$, Abb. 4.8).

Die relative Quantifizierung basierte in der vorliegenden Arbeit immer auf zwei bis vier technischen Replikaten und zwei bis vier biologischen Replikaten. Für die Anwendung von Signifikanztests, wie t-Test und ANOVA, wurde die Normalverteilung und die Varianzhomogenität an je einem Datensatz geprüft (Abb. 4.9, 4.10). Beide statistische Eigenschaften konnten für die durchgeführten Proteomanalysen für jeweils mehr als 95% und 89% aller Proteinspots angenommen werden (Karp and Lilley 2005).

Die gelbasierte Proteomanalytik hat den Vorteil, dass die Separation und die relative Veränderung der Proteinexpression für den Bearbeiter sichtbar sind. Um diesen Vorteil zu nutzen, wurden für jede untersuchte Zelllinie eine Gelkarte erstellt (Tab. 4.1). Diese Darstellung ist übersichtlich und ermöglicht die Erkennung von Proteinisoformen mit unterschiedlichem pI oder MW (Abb. 4.6, Senkler and Braun 2012). Weiterhin können die Gelkarten für nachfolgende Studien als Anhaltspunkt und zum Vergleich verschiedener Experimente verwendet werden. Allerdings sind Gelkarten für MDCK und Vero Zelllinien in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Theoretisch kann eine 2-D PAGE (pI-Separation 3-11) des MDCK Zellproteoms 76% aller Proteine enthalten (Abschnitt 2.3.3). Im Falle von niederabundanten Proteinen kommt es jedoch häufig im 2-D Gel zu Überlagerungen mit hochabundanten Proteinen. In der Literatur ist durch die zusätzliche Separation bei der LC-MS/MS-Analyse eines Gelspots die Identifizierung von bis zu 23 Proteinen in einem Spot beschrieben (Thiede et al. 2013). Das bedeutet, die Proteomabdeckung kann durch die Anwendung der LC-MS/MS-Analyse gesteigert werden. Die Methode ist jedoch für eine Proteinspotanalytik zeitaufwendiger, sowohl bei der Messung als auch bei der Datenauswertung. Die Daten von Thiede et al. (2013) zeigen weiterhin, dass 80% aller untersuchten Spots ein dominantes Protein ($\geq 60\%$ emPai-Index) enthalten. Im Rahmen der Arbeit wurde sich auf die MALDI-TOF-MS/MS-Analyse beschränkt mit der Annahme, dass der Großteil der Proteinspots ein dominantes Protein enthält.

5.1.3. *Label free* Proteomanalytik

Die LF-Quantifizierung basiert auf den tryptischen Peptiden eines Proteins. Eine Optimierung der enzymatischen Spaltung in-Lösung wurde initial durchgeführt, um eine nahezu vollständige Zerlegung der Proteine in Peptide zu garantieren. Für die Qualitätskontrolle der enzymatischen Spaltung wurde eine monolithische RP-LC Methode verwendet (Burkhart et al. 2012). Die Methode eignete sich, um Unterschiede in der Effizienz verschiedener Protokolle der enzymatischen Spaltung zu erkennen. Um reproduzierbare Unterschiede für die getesteten Inkubationszeiten (2 h – 11 h) oder für das Enzym:Substrat-Verhältnis (1:30, 1:50, 1:100) aufzulösen, eignete sie sich nicht (Abschnitt 4.1.3). Für die Versuche wurde das Protokoll 3 (Abschnitt 3.4.3), 7 h Inkubationszeit und das mittlere Enzym:Substrat-Verhältnis verwendet. Burkhart et al. (2012) beschrieb die Unterscheidung der enzymatischen Effizienz verschiedener Trypsinvarianten. Dabei wurde zusätzlich eine Auftrennung der Proben über eine Kationenaustauschchromatographie und anschließende MS Analytik durchgeführt. Eine zusätzliche Fraktionierung und MS geben einen tieferen Einblick in die Qualität der enzymatischen Spaltung.

Bei der *Bottom-up* Analytik konnten die Proben nach Ethanol-fällung und anschließendem in-Lösungs Verdau über eine RP-LC nicht reproduzierbar separiert werden. Die Beobachtung wurde hauptsächlich bei den Peptidlösungen der MDCK_{SUS} Zellen gemacht. Eine Ursache für diesen Effekt könnten Rückstände von Pluronic-F68 sein. Das nicht-ionische Tensid wird zum Schutz der Suspensionszellen vor Scherstress dem Kultivierungsmedium zugegeben (Tharmalingam and Goudar 2014). FASP erwies sich hier als eine effiziente Methode zur Aufreinigung der Proteinlösung (Manza et al. 2005, Wiśniewski et al. 2009) und ermöglichte nach dem tryptischen Verdau eine reproduzierbare RP-LC Separation (Abb. 4.13). Weiterhin wäre die Anwendung einer alternativen Fällung, wie der Phenolextraktion, für die Aufreinigung der Proteinlösung vorstellbar.

Die LC-MS Messung und die quantitative Auswertung wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Albert Sickmann durchgeführt. Nach Datenbanksuche und Anwendung von Qualitätsfiltern ($FDR = 0,05, \geq 2$ Peptide pro Protein für mindestens eine Zelllinie) wurden 976 Proteine für den Vergleich beider Zelllinien detektiert. Kummer et al. (2014) detektierten für MDCK Zellen 1311 zelluläre Proteine bei der Quantifizierung mit stabilen isopenmarkierten Aminosäuren. Sie wendeten außerdem die enzymatische Spaltung mit Lys-C (spaltet am C-terminalen Ende von Lysin) und Trypsin an. Die Kombination von mehreren Proteasen kann zu einer Verbesserung der Proteindetektion führen (Meyer et al. 2014). Eine Fraktionierung der Proben kann die Detektion weiterer Proteine ermöglichen. Mathias et al. (2011) extrahierte 745 MDCK Plasmamembranproteine und Tauro et al. (2013) 458 Proteine der extrazellulären Matrix.

Tab. 5.2.: Ergebnisgegenüberstellung der 2-D DIGE und der LF-Proteomanalytik.

Studienobjekt	Differenziell exprimierte Proteine			Literatur
	2-D DIGE	LF	Beide ¹	
Milchfettkügelchen des Schafs infiziert mit Mycoplasmen	23	67	9	Addis et al. (2011)
MCF-7/BOS Zellen behandelt mit 17 β -Estradiol	78 ²	120	6	Collodoro et al. (2012)
Vergleich der MDCK _{ADH} mit der MDCK _{SUS} Zelllinie	24	107	2	vorliegende Arbeit

1 – Differenziell exprimierter Proteine die sowohl mit 2-D DIGE als auch mit der LF-Proteomanalytik detektiert wurden.

2 – Angabe detektierter Spots.

5.1.4. Vergleichende Betrachtung der 2-D DIGE und der *label free* Proteomanalytik

In der Literatur sind einige Beispiele einer Gegenüberstellung der 2-D DIGE und der LF-Proteomanalytik beschrieben. Auffällig ist die geringe Übereinstimmung beider Methoden in ihrer Detektion differenziell exprimierter Proteine (Tab. 5.2). Der Vergleich der MDCK_{ADH} mit der MDCK_{SUS} Zelllinie in der vorliegenden Arbeit ergab nur zwei Proteine, welche sowohl mit 2-D DIGE als auch mit LF-Quantifizierung detektiert wurden (Abschnitt 4.4). Bei den restlichen 22 Proteinen, die mit der 2-D DIGE Methode aber nicht mit der LF-Methode detektiert wurden, kann es sich um Proteinvarianten handeln. Ein Hinweis, dass es sich im Fall von Ezr, bei der Detektion differenzieller Expression mit 2-D DIGE, um eine Änderung der Proteinisoform handelt, gab die Western Blot Analytik (Abb. 4.26). Das Protein konnte mit Hilfe der 2-D DIGE Analyse detektiert werden, zeigte jedoch keine Expressionsänderung in der 1-D Western Blot Analyse. Die Proteinvarianten können durch PTMs, alternatives Splicing oder die Expression verschiedener Genvarianten (Allele) entstehen. MDCK Zelllinien wurden in der Literatur nach mehreren Passagen auch als pseudo-diploid bezeichnet. Dies lässt auf eine Veränderung des Chromosomensatzes nach der Zelladaption über mehrere Passagen schließen (Cassio 2013).

Die LF-Quantifizierung detektiert in der Regel keine Proteinvarianten, da die Quantifizierung auf den identifizierten Peptiden beruht und modifizierte Peptide je nach den gewählten Suchkriterien in der Analyse ignoriert werden. Bevor eine Quantifizierung erfolgt, wurden die Proteine

und ihre zugehörigen Peptide identifiziert. Somit liegt ein kompletter Proteindatensatz vor (Identifizierungs- und Quantifizierungsdaten). Beim Vergleich beider Methode in der vorliegenden Arbeit deckte die LF-Quantifizierung alle Proteine die mit 2-D DIGE detektiert wurden ab und zeigte zusätzliche Proteine auf. Am Beispiel der Catalase konnte mit Hilfe einer Western Blot Analyse ein deutliches Signal für differenzielle Expression detektiert werden (Abb. 4.26). Das Protein wurde mittels 2-D DIGE Ansatz nicht als differenziell exprimiert detektiert. Die Ursache kann eine Überlagerung mit hochabundanten Proteinen sein, da die Catalase, wie andere Proteine, ein MW von 60 kDa und ein pI von 6,88 (UniProt KB) aufweist. Auf der Peptidebene konnte die differenzielle Expression gezeigt werden. Damit ist die 2-D DIGE Methode selektiver und limitiert für die Analyse des Gesamtproteoms von Säugerzellen. Mit der LF-Quantifizierung konnte somit ein tieferer Einblick erreicht werden.

Beide Methoden sind in der Detektion hydrophober Proteine limitiert und es müssten zusätzliche Schritte durchgeführt werden, um diese zu analysieren. Bei der 2-D DIGE Methode gibt es die Möglichkeit ein alternatives Detergenz mit zwitterionischen Eigenschaften zu nutzen (Bednarz-Misa et al. 2014, Wright et al. 2014). Bei der LF-Methode können zelluläre Transmembrandomänen teilweise nicht massenspektrometrisch detektiert werden. Die Domänen besitzen keine tryptische Schnittstelle und generieren deshalb zu große Peptide. Wie bereits erwähnt kann durch die Anwendung von alternativen Enzymen und deren Kombination eine Verbesserung der Proteinspaltung und somit der Proteindetektion erzielt werden (Peng et al. 2012). Im Allgemeinen können für beide Methoden Anreicherungsstrategien die Quantifizierung von Membranproteinen verbessern (Mathias et al. 2011). Bei der Gegenüberstellung beider Methode wurde jedoch deutlich, dass die LF-Methode eine größere Anzahl differenziell exprimierter Membranproteine detektierte (Abb. 4.7).

Die Wahl der Sequenzdatenbank ist für die Proteinidentifizierung beider Methoden entscheidend. In dieser Arbeit wurde entweder die NCBIInr oder die UniProt KB verwendet. Die Proteineinträge der UniProt KB enthielten meist nicht charakterisierte Proteineinträge und die hinterlegten Proteinsequenzen wurden manuell über BLAST homologen humanen Proteinen zugeordnet (Tab. ??, Anhang A.4). Der Proteineintrag der NCBIInr Datenbank enthielt meist die Information homologer Proteine. Für eindeutige Zuordnung der Massenspektren zu Proteinen wäre jedoch die Etablierung einer zelllinienspezifischen Proteindatenbank von Vorteil.

Für die Auswertung der differenziell exprimierten Proteine auf funktioneller Ebene wurden Netzwerkanalysen (z. B. STRING, KEGG, Reactom) durchgeführt. Die Proteineinträge für *Canis familiaris* oder *Macaca mulata* ergaben, auf Grund der geringen Datengrundlage aus der Literatur, meist kein Ergebnis bei einer Netzwerkanalyse. Es gibt mindestens zwei Strategien trotz der geringen Datenlage mit Hilfe von Netzwerkanalysen Zusammenhänge zwischen Proteinen auf funktioneller Ebene zu finden. Eine Strategie wurde in dieser Arbeit verfolgt. Die

Netzwerkanalyse wurde mit den homologen, humanen Proteineinträgen durchgeführt, um Klassifizierungen der Proteine zu biologischen Prozessen zu erhalten (Tab. 4.4, Anhang A.3). Das wiederum ermöglichte die Selektion relevanter Proteingruppen, um die nachfolgende Literaturrecherche zu fokussieren. Eine weiterte Möglichkeit Proteindaten funktionell auszuwerten ist es, den Bezug zu ihren Genen zu nutzen. Über *Gene Ontology* (GO, Vereinheitlichung der Begriffe zur Beschreibung von Genprodukteigenschaften) sind drei verschiedene Ontologien verfügbar: biologische Prozesse, molekulare Funktionen und zelluläre Kompartimente (Ashburner et al. 2000). Proteindaten können auf der Ebene ihrer GO Einträge klassifiziert und ausgewertet werden. Dies setzt jedoch die Nutzung weiterer bioinformatischer Anwendungen voraus (Falcon and Gentleman 2007, Kummer et al. 2014, Pan et al. 2009).

5.2. Untersuchung der Zelllinien für die Virusreplikation

Die Prozessanalytik wurde für die Infektionsversuche mit MDCK und Vero Zelllinien angewandt. Für jede Zelllinie vor und nach Zelladaptation konnte eine Vergleichbarkeit auf Grund der Verläufe der Zellkonzentration, der Virustiter und zusätzlich, für die influenzainfizierten MDCK Zellen, der Expression viralen mRNA gezeigt werden (Abschnitt 4.2). Für beide Vero Zelllinien verliefen die Virus- und die Scheininfektionen ähnlich (Abb. 4.2.2). Die Virustiter in der Größenordnung von 10^7 FFU/mL stimmen mit berichteten Werten von 2×10^7 FFU/mL, 1×10^8 FFU/mL (Rourou et al. 2007), 4×10^7 FFU/mL (Rourou et al. 2009b), 8×10^7 FFU/mL und 3×10^7 FFU/mL (Trabelsi et al. 2006) überein. Eine Auffälligkeit im direkten Vergleich beider Vero Zelllinien war eine schnellere Abnahme der Zellzahl für Vero_{IPT-AFM} Zellen, was auf eine schnellere, virusinduzierte Zellyse hindeutete.

Die Influenzainfektionsversuche mit hoch MOI in MDCK Zelllinien ohne Trypsinzugabe resultierten in ähnlichen Virustitern von $2,5 \log_{10}$ HA/100 μ L und 10^7 infektiöse Viruspartikel/mL (Abb. 4.18 B, C). In der Literatur sind jedoch höhere Virustiter beschrieben. Bei einer Influenzainfektion von MDCK Zellen mit niedriger MOI (10^{-5}) und Trypsinzugabe können höhere HA-Titer von bis zu $3,2 \log_{10}$ HA/100 μ L und TCID₅₀-Titer von 10^9 infektiöse Viruspartikel/mL erreicht werden (Peschel et al. 2013). Mit zunehmender MOI wurde eine Abnahme der Virustiter detektiert (Isken et al. 2012). Die Abnahme kann durch die Anhäufung von DIPs bei Viruspassagen mit hoher MOI hervorgerufen werden (von Magnus 1951). Ähnliche Ergebnisse fanden Frensing et al. (2014), die den Effekt gesteigerter DIP Produktion in MDCK Zellen auf den Virustiter untersuchten. Bei hoher MOI kann es mit hoher Wahrscheinlichkeit zu Koinfektionen kommen und die Vermehrung von DIPs kann dadurch begünstigt werden.

Eine Trypsinzugabe zur TOI begünstigt die Influenzavirusreplikation in Zellkulturen (Klenk et al. 1975, Seitz et al. 2012). Trypsin unterstützt, neben zellulären Proteasen, die Spaltung

von HA0 in die aktiven Untereinheiten HA1 (bindet zelluläre Sialinsäuren mit α -2,3- oder α -2,6-Bindung) und HA2 (Fusion zellulärer und viraler Membran) (Bertram et al. 2010). Das verwendete Saatvirus wurde unter Trypsinzugabe hergestellt und gespaltenes HA war somit bei der Infektion vorhanden (Seitz et al. 2012). Die hohe MOI sollte für einen Großteil der Zellen die Infektion mit dem Saatvirus ermöglicht haben. Das bedeutet, die Abwesenheit des Trypsins hat im Versuch der vorliegenden Arbeit auf die initiale Virusinfektion vermutlich nur einen sehr geringen Effekt. Dafür spricht, dass die HA-Titerbestimmung der MDCK_{ADH} Zellen und auch die Replikation viraler mRNA für beide Zelllinien mit früheren Untersuchungen übereinstimmt (Frensing et al. 2014, Genzel et al. 2005, Isken et al. 2012, Schulze-Horsel et al. 2008).

Der Titeranstieg war für beide MDCK Zelllinien vergleichbar. Peschel et al. (2013) beobachteten eine Verzögerung des Anstiegs im HA-Titer der MDCK_{SUS} Zellen im Vergleich zu MDCK_{ADH} Zellen. Sie vermuteten, dass der Effekt durch inhibierende Substanzen im Medium während der Zellwachstumsphase der MDCK_{SUS} Zellen verursacht wurde (Glacken et al. 1986). Im von Peschel et al. (2013) beschriebenen Versuch erfolgte vor TOI ein halber Mediumswechsel. Bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde das Medium komplett gewechselt und keine Verzögerung detektiert, was die Hypothese von Peschel et al. (2013) stützt.

Im Gegensatz zu Peschel et al. (2013) konnte für MDCK_{SUS} Zellen ein früherer Anstieg des HA-Titers beobachtet werden (Abb. 4.18 B). Ein Influenzainfektionsmodell in MDCK_{ADH} Zellen von Heldt et al. (2012) basiert auf intrazellulären Replikationsdynamiken und zeigte 6 h p.i. eine Virusausschleusung. Dies konnte für die adhärenenten Zellkulturen gezeigt werden (Abb. 4.18 B). Ein erster signifikanter Anstieg des HA-Titers konnte jedoch bei den MDCK_{SUS} Zellen bereits 4 h p.i. detektiert werden. Weiterhin wurde 8 h p.i. ein geringerer Anteil infizierter Zellen für MDCK_{SUS} Zellen im Vergleich zu MDCK_{ADH} Zellen detektiert. Dieses Ergebnis zeigte eine verzögerte Infektionsrate in Suspensionszellen. Wenn 8 h p.i. weniger Zellen infiziert waren, jedoch 4 h p.i. ein signifikanter Anstieg im HA-Titer für die Suspensionszellen detektiert wurde, scheint die Virusreplikation effizienter zu sein. Ob diese Beobachtung durch Batchvariationen, DIP Produktion, fehlende zelluläre Proteasen, Zellaggregation oder veränderte Virusausschleusung verursacht wurde, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht beantwortet werden.

5.3. Zelladaption an Suspensionswachstum in chemisch definiertem Medium

Nachdem die Vergleichbarkeit der Influenzareplikation für MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zellen gezeigt werden konnte, war das Ziel der Arbeit die Veränderungen der Proteinexpression während der Zelladaption zu untersuchen. Die beiden unabhängig voneinander durchgeführten MDCK-

Zelladaptionen zeigten eine Übereinstimmung mit gleicher differenzieller Proteinexpression von weniger als 55% (Abschnitt 4.3.1). Weiterhin wurde über den gesamten Prozess der Zelladaption für Adaption 1 65% (597 Spots der Gelkarte der MDCK Zelladaption mit 908 Proteinspots) und für Adaption 2 89% (809 Spots der Gelkarte der MDCK Zelladaption mit 908 Proteinspots) aller Proteinspots mit differenziell exprimierten Proteinen detektiert. Diese Heterogenität während der Zelladaption wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Sie kann die Grundlage für widersprüchliche Beobachtungen im Verhalten von Zellen nach Veränderung von Prozessbedingungen sein. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Zelladaption der MDCK_{ADH} Zelllinie an Suspensionswachstum in CDM nicht in geordneter und vorhersagbarer Weise verläuft.

Im speziellen Fall der MDCK Zellen finden verschiedene Zelllinien in Wissenschaft und Industrie Verwendung (Dukes et al. 2011). Bereits diese Zelllinien weisen unterschiedliche Wachstumseigenschaften auf. Im Gegensatz zu einer aufwendigen Adaption der MDCK_{SUS} Zelllinie (Ursprung: MDCK_{ADH} der European Collection Of Cell Cultures, ECACC, Lohr et al. 2010) konnte die MDCK.2 Zelllinie der amerikanischen Zellbank (American Type Culture Collection, ATCC) durch einfaches Passagieren in SFM4BHK21 Medium (HyClone) adaptiert werden (van Wielink et al. 2011). Es existieren ebenfalls widersprüchliche Aussagen für verschiedene adhärent wachsende MDCK Zellen in Bezug auf ihre tumorogenen Eigenschaft (Boerner et al. 1985, Liu et al. 2010, Omeir et al. 2011, Schwartz et al. 2012). Das bedeutet, dass sich bereits die ursprünglichen MDCK Zelllinien verschieden verhalten. Ein weiterer Aspekt, welcher der Komplexität der Proteinexpression während der Zelladaption zu Grunde liegt, ist die Größe des zellulären Genoms (Hunde haben durchschnittlich 48 Chromosomen). In der Literatur wurde während der Passagierung von MDCK Zelllinien eine Veränderung der Chromosomenanzahl beschrieben (Cassio 2013).

Der Proteomvergleich der Stadien SC der Adaptionen 1 und 2 zeigte $\geq 95\%$ Übereinstimmung der Proteinexpression (Abschnitt 4.3.1). Interessanterweise handelte es sich bei den Unterschieden hauptsächlich um metabolische Proteine der Glykolyse (gesteigert für Adaption 1) und des Citratzyklus (gesteigert für Adaption 2). Das Ergebnis dieses Vergleichs zeigte, dass die Zelladaption trotz ihres ungeordneten und nicht vorhersagbaren Verlaufs der Adaption 1 und 2 im finalen Adaptionsstadium (SC) reproduzierbar ist. Die finale Kultivierungsbedingung (Suspensionswachstum in CDM) scheint trotz der unterschiedlichen Adaptionen in MDCK Zellen ein spezifisches Proteinexpressionsprofil zu selektieren. Die Beobachtung könnte bedeuten, dass durch den spezifischen Selektionsdruck für eine Zellspezies der MDCK_{ADH} Zelllinie begünstigende Wachstumsbedingungen vorlagen. Das wiederum lässt auf eine gerichtete Modifikation statt auf eine zufällige Mutation schließen. Um diese Fragestellung zu adressieren, sollten in zukünftigen Untersuchungen das Genom der MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zellen sequenziert und verglichen werden.

Die Proteomstudien zeigten, dass für die Vergleichsebenen des Abschnitts I - Serumentzug (Abschnitt 4.3.2, Tab. 4.2) die meisten Spots mit differenzieller Expression (94%) detektiert wurden. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Adaption von NS0 Myeloma Zellen von SCM an proteinfreies Medium berichtet (de la Luz-Hernández et al. 2008). Diese Adaption induzierte viele Veränderungen in der Proteinexpression des Kohlenstoffwechsels, der Proteinsynthese und des Membrantransports. Der Entzug von Serum, mit seiner komplexen Zusammensetzung (Wachstumsfaktoren, Vitamine, Hormone, Spurenelemente, etc.), hatte auch in der vorliegenden Arbeit einen starken Einfluss auf die Proteinexpression. Der Serumentzug induzierte eine Vielzahl zellulärer Netzwerke, wie zum Beispiel des Metabolismus, des Cytoskeletts, des Proteinauf- und abbaus, der pre-mRNA-Prozessierung und der Zellmembran. Durch die Komplexität der zellulären Reaktion wurden für die Diskussion der Ergebnisse ausschließlich die Effekte des Serumentzugs auf Suspensionswachstum näher betrachtet.

Während des Serumentzuges im ersten Adaptionsschritt lösen sich Zellen und Zellaggregate von der Oberfläche ab (Lohr et al. 2010, Scharfenberg and Wagner 1995). Deshalb konnten beide Prozesse, Serumentzug und Suspensionswachstum, nicht getrennt voneinander untersucht werden. Die MDCK_{ADH} Zellen erreichten die stationäre Phase mit konfluentem Zellwachstum bevor mit dem Serumentzug gestartet wurde. Ein Mediumswechsel mit Serum führt zu hyperkonfluentem Wachstum. Das bedeutet die Zellen sind in der Lage, in den Grenzen des Monolayers, weiter zu wachsen. Bei Mediumswechsel werden die im Serum enthaltenen Adhärenzfaktoren, zum Beispiel Fibronectin und Vitronectin (Underwood and Bennett 1989), verdünnt. Die beobachteten Zellaggregate bildeten eine lockere Bindung zum Monolayer und zur Wachstumsfläche. Dieser Effekt konnte schon für verschiedene Zelllinien beobachtet werden (Lewandowska et al. 1976, Scharfenberg and Wagner 1995).

Die Bildung von Zellaggregaten, die in lockerer Bindung zum Monolayer stehen, kann auf verschiedenen Mechanismen beruhen. So ist zum Beispiel bekannt, dass MDCK Zellen durch die Ras-Induktion EMT ausführen können (Mathias et al. 2010). Bekannte differenziell exprimierte Proteine während der EMT (Tab. 2.3) wurden während der Zelladaption an Suspensionswachstum in CDM jedoch nicht detektiert. Um EMT näher zu untersuchen, müssten relevante Signalproteine auf der niedermolekularen Ebene, mit Hilfe von Antikörpern oder über die Genexpression, analysiert werden.

Für MDCK Zellen wurde weiterhin berichtet, dass aus einem Monolayer einzelne Zellen ausgeschleust werden können (Rosenblatt et al. 2001). Benachbarte Zellen induzieren dabei eine Aktin-Myosin-Kontraktion. Diese Kontraktion ist ein sehr frühes apoptotisches Signal. Zwei verschiedene Myosinvarianten, die leichte Kette des Myosin 2 und Topomyosin α -3, wurden im Vergleich zum Stadium AC in den folgenden Stadien (CL, DC, SC) höher exprimiert (Abschnitt 4.3.2). Diese Beobachtung lässt auf einen Zellausschluss aus dem Monolayer über eine Aktion-

Myosin-Kontraktion schließen. Mit Hilfe bildgebender Verfahren (z. B. konfokale Mikroskopie) könnte dieser Mechanismus für die MDCK Zelladaption nachgewiesen werden

Anoikis (Apoptose durch Verlust der Zell-Matrix-Verbindung, Grossmann 2002) wurde erstmals für MDCK Zellen in der Literatur beschrieben (Emoto 2008, Frisch and Francis 1994). In der vorliegenden Arbeit wurden während der Zelladaption nur wenige apoptotische Proteine detektiert (z. B. Radixin, Programmed Cell Death 6, Abschnitt 4.3). Die Versuche von Rosenblatt et al. (2001) zeigten weiterhin, dass das Ausschleusen der Zellen aus dem Monolayer stattfindet bevor zelluläre Apoptose detektiert werden kann. Damit stellt sich die Frage, ob die Apoptose vor oder nach der Zellausschleusung ausgelöst wird. Für die Zelladaption wiederum setzt es im ersten Fall eine Überwindung der Apoptose und im zweiten Fall einen alternativen zellulären Mechanismus, wie zum Beispiel EMT, voraus.

Scharfenberg and Wagner (1995) beschrieben die abgelösten Zellaggregate als gewebeähnliche, wachstumsfördernde Umgebung. Im Gegensatz dazu konnte Emoto (2008) zeigen, dass aggregierende MDCK Zellen in Suspension schneller in Apoptose übergehen. Die meisten regulierten zellulären Prozesse nach Serumentzug waren im Zell-Zellkontakt involviert. Darunter zählen die Verbindung des transmembranen Glykoproteins L1 mit F-Actin, die Dab2 Rekrutierung zu den Gap Junctions und der Endostatinabbau durch Cathepsin (Abschnitt 4.3.2, Tab. 4.4). Während des Abschnitts II - Suspensionswachstum wurde Galectin-3 differenziell exprimiert detektiert, welches mit dem Übergang von Stadium CL zu Stadium DC eine erhöhte Expression zeigte (Abschnitt 4.3.2). Galectin-3, auch bekannt als galactosebindendes Lektin, kann Laminin (extrazelluläres Glykoprotein) binden oder die Bindung an Laminin unterstützen (Margadant et al. 2012, van den Brûle et al. 1994). Weiterhin konnte für Galectin-3 gezeigt werden, dass es die Proanoikisaktivität seines Gegenspielers Galectin-1 in Tumorsuppressor p16 exprimierenden Pankreaskrebszellen mindern kann (Sanchez-Ruderisch et al. 2011). Ob der bestehende Zell-Zellkontakt eher einen wachstumsfördernden oder apoptosefördernden Einfluss hat, sollte in nachfolgenden Studien untersucht werden. Eine detaillierte Untersuchung der Zellaggregate mit bildgebenden Verfahren in Kombination mit einer Membranproteomanalyse kann einen tieferen Einblick geben.

Suspensionswachstum wurde schon früher kanzerogenen Zellen als Eigenschaft zugesprochen. Von diesem Standpunkt betrachtet ist es wenig überraschend, dass während der Zelladaption an Suspensionswachstum differenziell exprimierte Proteine auch in Untersuchungen kanzerogener Gewebe identifiziert wurden (Abschnitt 4.3.2). Bereits während des Abschnitts I - Serumentzug weisen die regulierten zellulären Prozesse auf kanzerogene Mechanismen hin. Das Adhäsionsmolekül L1 und die Endoprotease Cathepsin werden in verschiedenen Krebsgeweben verstärkt exprimiert (Weidle et al. 2009, Zhu et al. 2013). Das AUF1 Protein (auch bekannt als HNRNP D0) moduliert die Stabilität der mRNA und kann die Krebsentwicklung unterstützen (Yang et al. 2014). Für fast alle Proteine, die ausschließlich im Abschnitt II -

Suspensionswachstum detektiert wurden, ist in der Literatur ebenfalls ein Bezug zu kanzerogenen Mechanismen beschrieben. Für die Sulfotransferase 1A1, die im Katecholamin-, Lipid- und Steroidmetabolismus involviert ist, wurde der Einfluss auf die Kanzerogenese gezeigt (Gamage et al. 2003). RuvB-ähnliches Protein 2 (auch bekannt als Reptin) spielt eine Rolle in der Prozessierung genetischer Informationen. Unter anderem wird es für die Aktivierung der Transkription benötigt, welche mit onkogenen Mechanismen assoziiert ist (Grigoletto et al. 2011). Galectin-3 spielt, wie oben erwähnt, in Pankreaskrebszellen eine Rolle (Sanchez-Ruderisch et al. 2011). Die Aktivierung der Translation durch den eukaryotischen Translations-Initiationsfaktor 3 wurde für verschiedene Krebszelllinien beschrieben (Saletta et al. 2010). Lactoylglutathionlyase (auch bekannt als Glyoxalase I) kann die fördernde Aktivität des Tumornekrosefaktors (TNF) für die Translation des nukleären Faktors κ B (NF- κ B, zentrales Protein zellulärer Signalwege) unterdrücken (de Hemptinne et al. 2009). Zusammenfassend lässt sich für das finale Adaptionstadium SC und für die MDCK_{SUS} Zelllinie keine Aussage über ihre Tumorigenität treffen. Die Ergebnisse zeigen die differenzielle Regulation krebszellassoziierter Proteine jedoch sind Mausstudien notwendig um die tumorogenen Eigenschaften einer Zelle zu untersuchen.

5.4. Vergleich einer adhärennten MDCK Zelllinie mit ihrer verwandten Suspensionszelllinie

Für den Vergleich einer adhärennten MDCK Zelllinie mit ihrer verwandten Suspensionszelllinie wurden zwei orthogonale Methoden angewendet. Dieses Vorgehen ermöglicht es einen tiefen Einblick in die differenzielle Proteinexpression zwischen den beiden Zelllinien zu erhalten (Abschnitt 5.1.4). Beide Proteinquantifizierungsmethoden ergaben einen Unterschied von ca. 10% zwischen den MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zelllinien auf Proteinspotebene (2-D DIGE, 76 Spots von 804 Spots) und Proteinebene (LF, 107 Proteine von 976 Proteinen, Abschnitt 4.4). Das Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Zelladaptionen, die eine starke Veränderung der Proteinexpression nachwies (Adaption 1 - 597 Spots, Adaption 2 - 809 Spots, Abschnitt 4.3.1). Bei den Zelladaptionen spielten Unterschiede der Wachstumsphase und die Induktion zellulärer Mechanismen durch den Selektionsdruck eine Rolle. Der Zelllinienvergleich betrachtete hingegen nur eine Wachstumsphase und stabile Kultivierungsbedingungen. Beide Proteomuntersuchungen zeigen starke Verschiebungen der Genexpression, die eine Aufrechterhaltung der Homöostase ermöglichten.

Neben der differenziellen Proteinexpression resultierten beide Analysen in zusätzlichen Informationen über die Zelllinien. Die LF-Methode identifizierte mehr als 900 Proteine in einer Analyse. Sowohl die differenziell exprimierten Proteine als auch die konstant exprimierten Proteine

wurden betrachtet. Bei der 2-D DIGE Methode lässt sich durch den Vergleich der Proteinprofile einer Probe die biologische Varianz der Zelllinien, auf einer detaillierteren Ebene als das Zellwachstum, näher betrachten (Abschnitt 4.1.2). Die MDCK_{ADH} Zelllinien zeigte innerhalb der drei biologischen Replikate 49 Spots mit differenziell exprimierten Proteinen wohingegen MDCK_{SUS} Zellen eine Proteinregulation für nur einen Spot zeigten (Abschnitt 4.1.2). Die parentale MDCK Zelllinie besteht aus einer relativ heterogenen Zellpopulation (Lugovtsev et al. 2013, Omeir et al. 2011). Das Wachstum auf Microcarriern ist für die MDCK_{ADH} Zellen als Adaptionsschritt zu sehen. Die Zellen wechseln von einem statischen in ein dynamisches Zellsystem mit gesteigerten Scherkräften (Merten et al. 2014). Ein *up-scaling* des Bioprozesses von Gefäßwandwachstum (T-Flaschen, Rollerflaschen) auf Carrierwachstum beeinflusst die Reproduzierbarkeit eines Herstellprozesses (van Wenzel 1973). Dieser Aspekt kann eine Erklärung dafür sein, dass die MDCK_{ADH} Zellen eine stärkere Schwankung im zellulären Proteom im Vergleich zu den MDCK_{SUS} Zellen zeigten (Abschnitt 4.1.2).

Bei der Anwendung der orthogonalen Methoden zur Proteinquantifizierung wurde deutlich, dass nur zwei Proteine, Serumalbumin und *high mobility group box 2* (Tab. 4.5), von beiden Methoden als differenziell exprimiert detektiert wurden. Alle weiteren mit der 2-D DIGE Analytik detektierten Proteine, wie Ezr und verschiedene Anx Proteine, beschreiben differenziell exprimierte Proteinvarianten, die durch die LF-Quantifizierung nicht detektiert wurden (Maurer et al. 2014). Für die meisten Proteine sind in der Literatur Modifikationen wie Deamidierungen und Phosphorylierungen beschrieben (Tab. 4.5). Beide können zu einer Verschiebung des pI führen und resultieren in einer Proteinspotreihe auf einem 2-D Gel (Maurer et al. 2014).

Die induzierten Veränderungen der Proteinexpression werden im Folgenden auf den funktionellen Ebenen des Metabolismus, der Genexpression, der Signalwege und der zellulären Adhäsion betrachtet. Da die LF-Quantifizierung, im Vergleich zur 2-D DIGE Analytik einen tieferen Einblick gab (Abschnitt 5.1.4), wurden für den weiteren Vergleich beider MDCK Zelllinien auf funktioneller Ebene diese Ergebnisse herangezogen. Auf metabolischer Ebene wurden für beide Zelllinien Proteine des Kohlenstoffmetabolismus differenziell exprimiert (Abb. 3.4.4). Auffällig war die gesteigerte Expression von Proteinen der Glykolyse für MDCK_{ADH} Zellen und Proteinen des Citratzyklus für MDCK_{SUS} Zellen. Weiterhin waren viele Proteine der Atmungskette für MDCK_{SUS} Zellen vermehrt exprimiert. Diese Beobachtung kann einen Hinweis auf einen erhöhten Beitrag der Atmungskette zum Energiehaushalt in den Suspensionszellen sein. Die gesteigerte Proteinexpression der Glykolyse kann jedoch auch durch eine gesteigerte Wachstumsrate der MDCK_{ADH} Zellen erklärt werden. Dagegen spricht, dass beide Zelllinien nach gleicher Startzellkonzentration und 70 h Wachstum eine ähnliche Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/mL erreichten. Bei MDCK_{ADH} Zellen ist jedoch eine Latenzphase von 20 h zu berücksichtigen (Rehberg et al. 2013). Aber auch die MDCK_{SUS} Zellen zeigten nach Transfer in

den 1L-BR ein langsames Anwachsen im Vergleich zu den Vorversuchen im Spinner_{PA} (Abb. 4.23).

Der Kohlenstoffmetabolismus und die Atmungskette können durch Signalwege reguliert werden. Hypoxia-induzierbarer Faktor 1 (HIF-1) ist ein Transkriptionsfaktor, der als Hauptregulator für Sauerstoffhomöostase in *Metazoa* (vielzellige Tiere) bekannt ist (Semenza 2007). HIF-1 beeinflusst die Expression vieler Gene, darunter Gene der Glykolyse und des Energiemetabolismus (Elvidge et al. 2006). Es konnten in dieser Arbeit jedoch keine Faktoren der HIF-1 Regulation detektiert werden, was an der Detektionsgrenze der Methode liegen kann. Mit Hilfe der Western Blot Analytik oder RT-qPCR sollte die Expression dieses Signalwegs in Zukunft weiter charakterisiert werden.

MDCK_{SUS} Zellen zeigten im Vergleich zu MDCK_{ADH} Zellen eine gesteigerte Expression verschiedener ribosomaler Untereinheiten, wie L5 oder S3A (Abb. 4.28). Ribosomen bestehen aus über 80 großen und kleinen Untereinheiten und spielen nicht nur in der Proteintranslation sondern auch während der Reparatur der DNA, der Apoptose und der zellulären Homöostase eine Rolle (Shenoy et al. 2012). Die ribosomale Biogenese ist eng mit einem bekannten Signalweg der Stressantwort, dem *Mouse double minute 2 homolog* p53 Tumorsuppressor (Mdm2-p53) Signalweg verbunden (Deisenroth and Zhang 2010). Das Mdm2 Protein, auch bekannt als E3 Ubiquitinligase, bindet p53 und vermittelt über die Ubiquitinierung dessen Abbau. Das Signalprotein p53 wiederum induziert den Arrest des Zellzykluses und die zelluläre Apoptose. Von diesem Mdm2-p53 Signalweg wurden ebenfalls keine Proteine identifiziert, jedoch kann die Detektion differenziell exprimierter ribosomaler Proteine ein Hinweis auf eine veränderte Aktivität sein. Binden verschiedene ribosomale Proteine, wie L5 oder L23, an das Mdm2 Protein wird die Menge an intrazellulärem p53 beeinflusst (Warner and McIntosh 2009). Zum Beispiel induziert ein *loss of function* Experiment mit S3A eine Steigerung der Apoptose, wohingegen ein *loss of function* Experiment mit L5 die Anreicherung von p53 verhindert (Warner and McIntosh 2009). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Energiemetabolismus eng mit dem Mdm2-p53 Signalweg verbunden ist (Deisenroth and Zhang 2011). Wird das Level an p53 stabilisiert, nimmt die Aktivität der Glykolyse ab und die der Atmungskette zu. Ist p53 inaktiviert nimmt die Glykolyseaktivität zu und die Aktivität der Atmungskette ab. Inwiefern der Mdm2-p53 oder der HIF-1 Signalweg den Energiemetabolismus der MDCK_{SUS} Zelllinie maßgeblich beeinflusst, sollte in zukünftigen Studien betrachtet werden.

Ein Großteil der differentiellen Expression von Signalproteinen zwischen beiden Zelllinien konnte dem Zellzyklus zugeordnet werden (Tab. 4.6). Da das molekulare Netzwerk des Zellzyklus sehr komplex ist und in dieser Arbeit nicht näher betrachtet wurde, werden die Proteine nicht tiefergehend diskutiert. Interessanterweise wurden drei Signalproteine, welche während der Apoptose eine Rolle spielen, mit gesteigerter Expression für MDCK_{SUS} Zellen detektiert. Zum einen

zeigte die Glycylpeptid N-Tetradecanoyl-Transferase 1 (NMT-1) eine gesteigerte Expression. Das NMT-1 Protein induziert Myristoylierung (Anheftung einer gesättigten 14-C Fettsäure) verschiedener Proteine sowohl während als auch nach ihrer Translation und kann proapoptische sowie antiapoptische Eigenschaften haben (Perinpanayagam et al. 2013). Die Aktivität des NMT-1 kann durch Caspase-3 und 8 beeinflusst werden. Die Abspaltung einer basischen Proteindomäne induziert die Verlagerung des NMT-1 von der Membran ins Zytoplasma (Perinpanayagam et al. 2013). Diese Verlagerung beeinflusst das Myristoylierungsprofil der Proteine während zellulärer Apoptose. Eine gesteigerte Expression der NMT-1 deutet auf ein verändertes Myristoylierungsprofil zwischen der MDCK Suspensionszelllinie und ihrer adhären Form hin. Zwei Proteine, die in der Literatur mit proapoptischen Eigenschaften beschrieben sind, zeigen eine gesteigerte Expression in MDCK_{SUS} Zellen. Das Zellzyklus-Apoptose Regulatorprotein 2 (CCAR2) inhibiert die Aktivität einer Proteindeacetylase SIRT1, was wiederum die Acetylierung von p53 steigert und Apoptose auslöst (Zhao et al. 2008). Weiterhin wurde die mitochondriale Peptidyl-tRNA hydrolase 2, auch bekannt als Bcl-2 Inhibitor der Transkription 1 (Bit-1), identifiziert. Das Protein interagiert mit den zwei Regulatorproteinen AES und TLE1 der Transkription. Die Integrin-vermittelte Zellanheftung reduziert die Bildung des Bit-1-AES-Komplexes, was zu einer Anreicherung von TLE1 führt. Das Protein TLE1 wiederum wirkt antiapoptisch (Jan et al. 2004). Das heißt im Falle der Anoikis kann die Apoptoseinduktion durch das Anheften und Ablösen von Zellen über diesen Signalweg reguliert werden. Die gesteigerte Expression von Bit-1 in MDCK_{SUS} Zellen im Vergleich zu ihrer adhären Form korreliert mit der geminderten Expression von Integrin- α und β . Die Inhibierung von CCAR2 und Bit-1 birgt somit das Potential in MDCK Zellen die p53-induzierte Apoptose und die Anoikis zu inhibieren.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Zelladaptation konnte für den Vergleich der MDCK_{ADH} und der MDCK_{SUS} Zelllinie ein Protein des EMT detektiert werden. Das einzige detektierte Signalprotein als eindeutiges Indiz für eine Veränderung der EMT Regulation nach Zelladaptation war das Adaptermolekül Crk, das eine gesteigerte Expression für MDCK_{SUS} Zellen zeigte. Das Protein Crk besitzt Src-homologe Domänen, die verschiedene tyrosinphosphorylierte Proteine binden. In MDCK Zellen kann eine zunehmende Expression das Ablösen von Adhärenzverbindungen (*adhering junctions*) induzieren (Lamorte et al. 2002).

Das Signalprotein Ras ist ein zentraler Botenstoff des EMT (Mathias et al. 2010). Im Proteomvergleich der MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zelllinie wurden drei Ras-verwandte Faktoren mit erhöhter Expression für MDCK_{ADH} Zellen detektiert (Tab. 4.6). Rab-21 vermittelt den effizienten Integrintransport zu neuen, adhären Abschnitten der Zelloberfläche (Tang and Ng 2009). Rab-10 reguliert die basolaterale und apikale Ausrichtung des Proteintransports über Recyclingmechanismen zellulärer Endosomen (Babbey et al. 2006). Das Protein IQGAP1

unterstützt die Assoziation membrangebundenen E-Cadherins und Nectins. Letzteres vermittelt die Anordnung von IQGAP1 innerhalb der Adhäsionsverbindungen (Katata et al. 2003). Weiterhin wurde CAP-1 und ein Vertreter der A-Kinase Ankerproteinfamilie (AKAP) mit gesteigerter Expression für MDCK_{ADH} Zellen identifiziert. Das CAP-1 Protein bindet Aktinmonomere und vermittelt deren Anordnung (Ono 2013). Das Protein AKAP 12 interagiert mit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), die über den cAMP-Mechanismus vor zunehmender parazellulärer (zwischen den Zellen) Permeabilität schützt (Radeva et al. 2014). Eine geminderte Expression der drei Ras-verwandten Faktoren, sowie CAP-1 und AKAP 12 in MDCK_{SUS} Zellen deutet auf eine Abnahme der Adhäsionsverbindungen und eine Änderung der polaren Ausrichtung hin, was ebenfalls für die EMT Regulation spricht.

Die adhärenente Ausrichtung der MDCK_{ADH} Zelle wird durch das Wachstum in Suspension aufgehoben. Das bedeutet, dass basolaterale und apikale Membrandomänen bei Einzelzellwachstum keiner starren Ausrichtung folgen. Interessanterweise konnte eine gesteigerte Expression von Stromatin in MDCK_{SUS} Zellen im Vergleich zu MDCK_{ADH} Zellen detektiert werden (Abb. 4.7). Stromatin ist in MDCK Zellen ausschließlich in apikalen Microvilli exprimiert und leistet einen Beitrag zur Verankerung von Glycoproteinen an der Außenseite der Plasmamembran (Snyers et al. 1999). Weiterhin wurde für Thrombospondin 1 der Abbau fokaler Adhäsion berichtet (Orr et al. 2004), was ebenfalls eine gesteigerte Expression in MDCK_{SUS} Zellen zeigte. Im Gegensatz dazu ist eine Vielzahl adhärenenter Proteine, wie Integrine, Galectine, Serpine und Cadherin-1, für MDCK_{ADH} Zellen höher exprimiert (Abb. 4.7).

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass sowohl im Metabolismus, der Genexpression, der Signalwege als auch der zellulären Adhäsion eine deutliche Veränderung der zellulären Homöostase nach Zelladaption an Suspensionswachstum in CDM erkennbar war. Eine zentrale Rolle scheint der Energiemetabolismus, das p53 Protein und die EMT Regulation zu spielen. Die vergleichende Betrachtung der adhärenenten MDCK Zelllinie mit ihrer verwandten Suspensionszelllinie hat Proteine für zukünftige molekularbiologische Experimente im Kontext des Energiemetabolismus (HIF-1, Mdm2), der Apoptoseinduktion (NMT-1, CCAR2, Bit-1) und der EMT Regulation (Crk, Thrombospondin 1) identifiziert.

5.5. Medienbedingte Proteomveränderungen während der Virusinfektionsphase

Die Virusproduktionsprozesse können auf unterschiedliche Weise durchgeführt werden. Bei einem serumhaltigen Prozess wird vor dem Start der Virusinfektionsphase das im Medium enthaltene Serum durch mehrere Waschschrte und einen Mediumswechsel entfernt. Der Produk-

tionsprozess von Tollwutviren in Vero Zellen kultiviert in IPT-AFM (serumfrei) kann auf einen Mediumswechsel verzichten. Die Umstellung von serumhaltigen auf serumfreie Kultivierungsbedingungen erforderte eine Adaption an das modifizierte Zellkulturmedium in der Zellwachstumsphase.

Eine vorausgegangene Proteomuntersuchung der NS0 Myeloma Zelllinie, die an SFM adaptiert wurde, zeigte nach der Adaption an serumfreie Bedingungen 102 differentiell exprimierte Proteine (de la Luz-Hernández et al. 2008). Die meisten Veränderungen der zellulären Proteinexpression konnten dem Kohlenhydratstoffwechsel, der Proteinsynthese und dem Membrantransport zugeordnet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Vero Zellen in IPT-AFM und in SCM/SFM kultiviert. Der Vergleich beider Zellproteome wurde während der Scheininfektionsphase bis zu 8 d p.i. durchgeführt. Hierbei wurden 60 Proteine mit differenzieller Expression detektiert (149 Proteinspots, Abschnitt 4.5). Dazu gehören Proteine der zellulären Strukturierung, der Membranfunktion, der Stressantwort, des Metabolismus, der Proteinfaltung im endoplasmatischen Retikulum (ER) und des Proteinabbaus (Tab. 4.8). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Veränderungen des Kulturmediums Zellpopulationen mit spezifischen, an die Bedingungen angepassten, Proteinexpressionen hervorbringen. Im Folgenden werden die betroffenen zellulären Ebenen näher betrachtet.

Das Cytoskelett übernimmt in tierischen Zellen viele zentrale Funktionen. Hierzu zählen der Aufbau der zellulären Struktur, Transportprozesse und die effiziente Ausschleusung von Metaboliten (Ovádi and Saks 2004). Daher ist die Ausrichtung des Cytoskeletts, insbesondere für intrazelluläre Signalkaskaden und metabolische Flüsse, von entscheidender Bedeutung. Die Proteine MVP und Vimentin, die eine differenzielle Proteinexpression zwischen $\text{Vero}_{\text{SCM/SFM}}$ und $\text{Vero}_{\text{IPT-AFM}}$ Zellen zeigten (Tab. 4.8), sind in Transportprozesse involviert (Ivaska et al. 2007, van Zon et al. 2006). Das Cytoskelett übernimmt in primären Zellen, durch die Bindung von glykolytischen Enzymen, regulierende Funktionen innerhalb der Glykolyse (Knull and Walsh 1992). Glykolytische Enzyme, wie PKI M1/M2 und FBP Aldolase, wurden in $\text{Vero}_{\text{SCM/SFM}}$ Zellen mit gesteigerter Expression detektiert. Dieses Ergebnis korreliert mit Beobachtungen in adaptierten NS0 Zelllinien an SFM (de la Luz-Hernández et al. 2008). Die Autoren beschrieben eine verminderte Expression von 10 Proteinen der Glykolyse in adaptierten NS0 Zellen. Eine geminderte Expression der Glykolyseenzyme konnte auch für MDCK_{SUS} Zellen, im Vergleich zu MDCK_{ADH} Zellen, gezeigt werden (Abb. 4.28).

Die veränderte Expression von Membranproteinen, induziert durch die Anpassung an serumfreie Kultivierungsmedien, scheint direkt mit der Fähigkeit der Zelladhäsion zu korrelieren. Es wurde bereits berichtet, dass IPT-AFM keine essenziellen adhäsionsfördernden Faktoren enthält. Das adhärente Wachstum der $\text{Vero}_{\text{IPT-AFM}}$ Zellen kann nur durch vorherige Beschichtung der Zellkulturmaterialien mit Teleostean erzielt werden (Rourou et al. 2009b). Veränderungen mem-

branassoziierter Proteine konnten für beide Medienzusammensetzungen detektiert werden. Bei den Kultivierungen mit SCM/SFM wurde eine erhöhte Expression von drei Anx Proteinen, die an der Membranorganisation beteiligt sind, detektiert. Weiterhin zeigte das adhärente Protein Galectin-3, wie bereits im Zelllinien Vergleich der MDCK Zellen (Abschnitt 5.4), eine gesteigerte Expression. Hingegen konnte eine zunehmende Expression für Ezr in Vero_{IPT-AFM} Zellen detektiert werden. Ezr ist ein Teil des Ezr, Radixin und Moesin (ERM) Komplexes und an der Ausbildung von komplexen Membrandomänen wie zum Beispiel Mikrovilli und intrazellulären Verbindungen, beteiligt (Fehon et al. 2010).

Bei der zellulären Stressantwort spielen Chaperone eine entscheidende Rolle. Sie sind an der Stabilisierung der Proteinfaltung, dem intrazellulären Proteintransport und der Proteinstruktur beteiligt. Die Proteomvergleiche der Vero_{SCM/SFM} mit Vero_{IPT-AFM} Zellpopulationen zeigten eine gesteigerte Expression aller detektierten HSP während der Kultivierungen in SCM/SFM. Diese sind in der Zelle meist mit den Mitochondrien assoziiert, dem Zellorganell für die Sauerstoffumsetzung und Quelle reaktiver Sauerstoffspezies. Ebenfalls wurde für die Proteine GST und POR, die an der Redoxhomöostase beteiligt sind (Mitozo et al. 2011, Tew et al. 2011), eine gesteigerte Expression in Vero_{SCM/SFM} Zellen detektiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass in SCM/SFM kultivierte Zellen nach den Waschsritten und dem Mediumswechsel, Proteine der zellulären Stressantwort vermehrt exprimieren.

Die Ergebnisse des Vergleiches der IPT-AFM und SCM/SFM Kultivierung gibt Hinweise auf eine Verschiebung der Proteinsynthese und Proteinfaltung. Zum einen waren die meisten proteasomassoziierten Proteine bei der SCM/SFM Kultivierung erhöht exprimiert, was auf einen gesteigerten Protein *Turn-over* im Vergleich zu Vero_{IPT-AFM} hinweist (Pickart and Cohen 2004). Dies konnten de la Luz-Hernández et al. (2008) ebenfalls für NS0 Myeloma Zellen, kultiviert in serumhaltigen Medium, zeigen. Zum anderen waren ER gekoppelte Proteine während der Kultivierung von Vero Zellen in IPT-AFM erhöht exprimiert. Das ER spielt eine entscheidende Rolle in der Proteinprozessierung, bei der Ansammlung von sekretorischen Proteinen und dem Kalziumhaushalt (Hubbard et al. 2000). Es ist denkbar, dass die Veränderungen der zellulären Proteinexpression einen Einfluss nicht nur auf die Quantität sondern auch auf die Qualität replizierter Viren nehmen kann. Für die Tollwutreplikation in Vero Zellen konnte eine erhöhte Expression einer Glykosidase bei Kultivierungen in IPT-AFM nachgewiesen werden. Von der der Influenzavirusreplikation ist bekannt, dass veränderte Prozessbedingungen die N-Glykosylierung modifizieren (Rödig et al. 2013).

5.6. Einfluss der Zelladaption auf die virusinduzierte Proteinexpression

Die Zelladaption an Suspensionswachstum und optimiertes Medium induziert Veränderungen der zellulären Proteinexpression auf der Ebene des Metabolismus, der Signalwege, der Zellmembran, der Stressantwort und der Proteinprozessierung. Da das Virus im zellulären Netzwerk repliziert, ist der Einfluss der Zelladaption auf die virusinduzierte Zellantwort von Interesse.

5.6.1. Vergleich der influenzainduzierten Zellantwort einer adhären MDCK Zelllinie mit ihrer verwandten Suspensionszelllinie

Für den Zeitpunkt 8 h p.i. wurde die frühe und 32 h p.i. die späte virusinduzierte Zellantwort für MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zelllinien untersucht. Die Proteinexpression der frühen virusinduzierten Zellantwort zeigte für beide Zelllinien nur sehr geringe Unterschiede zwischen der Virusinfektion und der Scheininfektion (Abb. 4.31). Im Gegensatz dazu wurden 32 h p.i. für MDCK_{ADH} 72 und für MDCK_{SUS} 154 Proteinspots mit differenzieller Expression detektiert. Der jeweils größere Anteil der Proteinspots zeigte eine abnehmende Spotintensität für die virusinfizierte Kultur. Influenzaviren sind in der Lage, die zelleigene Proteinsynthese zu inhibieren und die virale Proteinsynthese zu induzieren (Hale et al. 2008). Damit ist es möglich, dass Proteine mit einer konstanten Abbaurate eine abnehmende Spotintensität zeigen.

Das einzige differenziell exprimierte zelluläre Protein, das sowohl in der frühen als auch in der späten Infektionsphase virusinfizierter MDCK_{SUS} Zellen detektiert wurde, war Ezr. Das Protein wies eine erhöhte Expression auf. Es ist ein apikales Markerprotein und bildet mit Radixin und Moesin den ERM-Komplex. Dieser reguliert die Membrandynamik und die Anordnung des Cytoskeletts über die Anheftung von Actin an die apikale Zellmembran (Neisch and Fehon 2011). Sagara et al. (1995) detektierten Proteine des ERM-Komplexes im Proteom verschiedener Viren. Bei dem humanen Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1) resultiert eine erhöhte Wirtszellexpression von Ezr in einer Inhibition der Infektionen und eine verminderte Expression begünstigte die Infektion (Haedicke et al. 2008). Der Einfluss von Ezr, Radixin und Moesin auf die Replikation des Hepatitis C Virus wurde ebenfalls analysiert (Bukong et al. 2013). Im Gegensatz zur Wirkung im HIV-1, wurde die Virusinfektion durch ein Abschalten der zellulären Ezr Expression inhibiert. Die Versuche von Zhang et al. (2014) zeigten, dass drei Kinasen über die Phosphorylierung des ERM-Komplexes am influenzainduzierten Wandel des Cytoskeletts beteiligt sind. Die Phosphorylierung korreliert positiv mit der Permeabilität pulmonaler mikrovascularer Endothelzellen. Eine Änderung der Spotintensität von Ezr kann

neben der differentiellen Expression auf eine veränderte Phosphorylierung zurückzuführen sein. Die induzierte Modifikation des Cytoskeletts kann einen Einfluss auf den Virustransport in der Zelle und die Permeabilität der Membranen haben.

Die Abwesenheit von Trypsin während der Virusinfektion begünstigt das zelluläre Interferonsignal (Seitz et al. 2012). Auf der Proteomebene konnte für beide Zelllinien keine Indikationen für die Aktivierung des interferonassoziierten Signalweges detektiert werden. Vester et al. (2010) identifizierte in MDCK_{ADH} Zellen 8 h p.i. drei interferonassoziierte Proteine, Mx1-Protein, Proteinkinase C Inhibitorprotein-1 und IFN-induziertes Protein mit Tetratricopeptid-Repeats. Erwähnt sei, dass dabei das Saatvirus Influenza A/PR/8/34 H1N1 eines anderen Zulieferers (*National Institute for Biological Standards and Control*, Hertfordshire, UK) verwendet wurde (Vester et al. 2010). Es ist bekannt, dass dieses Saatvirus relativ viele DIPs und einen relativ geringen Anteil infektiöser Viruspartikel enthält (Frensing et al. 2014). Weiterhin korreliert die absolute Anzahl der DIPs mit der Aktivität des Interferonsignalweges (Frensing et al. 2014). Folglich kann, für die Ergebnisse dieser Arbeit, das niedrige Mx1-Level auf mRNA Ebene (Abb. 4.30) und die geringe Induktion interferonabhängiger Proteine vermutlich auf die Verwendung von unterschiedlichen Saatviren zurückgeführt werden.

Während der Influenzainfektion wurden für beide Zelllinien apoptoseassoziierte Proteine mit differentieller Expression detektiert (Tab. 4.11). Ähnliche Ergebnisse wurden in Untersuchungen von van Diepen et al. (2010) gezeigt, welche die Apoptoseinduktion durch respiratorische Viren in A549 Zellen mittels 2-D DIGE untersuchten. Für die MDCK_{SUS} Zellen wurden vergleichsweise mehr apoptoseassoziierte Proteine identifiziert. Aconitase und dem GRP38 werden proapoptotische Eigenschaften zugesprochen, wohingegen für Nucleolin eine antiapoptotische Wirkungsweise in der Literatur beschrieben ist (Sengupta et al. 2004). Die Balance der beschriebenen Faktoren kann die Dynamik der fortschreitenden Infektion beeinflussen (Ludwig et al. 2006). Die Ergebnisse im TUNEL-Assay wiesen auf eine gesteigerte Apoptoseinduktion in MDCK_{SUS} Zellen hin (Abschnitt 4.2.1).

Die Proteine des Cytoskeletts wiesen eine gesteigerte Proteinexpression 32 h p.i. in virusinfizierten Suspensionszellen auf (Tab. 4.10). Ähnliche Veränderungen des Cytoskeletts wurden bereits bei virusinfizierten MDCK_{ADH} Zellen von Vester et al. (2009, 2010) beschrieben. Weiterhin war in virusinfizierten Suspensionszellen die Expression verschiedener HSP erhöht (Tab. 4.10). Für Proteine des Cytoskeletts und der Stressantwort zeigten infizierte MDCK_{ADH} Zellen eine geringe Änderung der Proteinexpression (Tab. 4.9). Diese Ergebnisse deuten auf ein erhöhtes Stresslevel der virusinfizierten MDCK_{SUS} Zellen hin.

Die Proteinspots mit abnehmender Intensitäten 32 h p.i. in MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zellen resultierten in der Identifizierung verschiedener Proteine ähnlicher funktioneller Ebenen (Abb. 4.32). Ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Zelllinien konnte auf der funktionellen Ebe-

ne der Prozessierung genetischer Informationen detektiert werden. MDCK_{SUS} Zellen zeigten 32 h p.i. die differenzielle Expression von HNRNP Varianten (Abb. 4.33). HNRNP sind dafür bekannt, während der Replikation verschiedener Viren involviert zu sein (Castilla and Scolaro 2012). Sie können die virale Replikation positiv oder negativ beeinflussen.

Im Falle der Familie der *Orthomyxoviridae*, wie zum Beispiel der Influenzaviren, wurde der Einfluss von HNRNP bisher nur in geringem Umfang untersucht. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die virale Polymerase in HEK293 und A549 Zellen intrazellulär mit HNRNP M und H1 einen Komplex bildet (Jorba et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit wiesen beide MDCK Zelllinien eine verminderte Expression der HNRNP K auf (Abb. 4.33). Für dieses Protein ist in der Literatur eine antiapoptotische Wirkung beschrieben (Xiao et al. 2013). Weiterhin wurde mittels RT-qPCR in humanen A549 Zellen gezeigt, dass HNRNP K ein maßgeblicher Mediator des viralen M1-mRNA Splicing ist (Tsai et al. 2013). Interessanterweise resultierte die Proteinidentifizierung eines Spots des 2-D Gels im basischen pH-Bereich (Gelkarte: MDCK_{SUS} Influenzainfektion, Gelspot 118) in einer Variante des HNRNP K Proteins und dem viralen Protein M1. Einerseits könnte die Überlagerung mit einem viralen Protein die gesteigerte Proteinexpression von HNRNP K erklären, andererseits deutet diese Beobachtung auf eine enge Assoziation von beiden Proteinen in den MDCK_{SUS} Zellen hin. In der Literatur wird sowohl ein positiver als auch negativer Einfluss von HNRNP auf die virale Genexpression von HIV-1 in infizierten Hela Zellen beschrieben (Lund et al. 2012). In der Zukunft sollten die Konsequenzen einer gesteigerten oder geminderten Expression von HNRNPs in MDCK Zelllinien bei der Influenzareplikation untersucht werden. Der Fokus sollte dabei auf inhibitorische oder aktivierende Effekte der viralen Gen- und Proteinexpression durch Interaktionen von HNRNPs mit viralen RNA-Segmenten und Proteinen gelegt werden.

Interessanterweise konnten für die viralen Proteine NS1 und NP in der vorliegenden Arbeit Spotreihen detektiert werden (Tab. 4.9, 4.10). Einerseits können Modifikationen der Proteine durch die Probenvorbereitung gebildet worden sein. Die Zugabe von Harnstoff kann zum Beispiel eine Deamidierung an Aminosäuren (z. B. Asparagin) verursachen, was wiederum eine Ladungsheterogenität induziert (Lindner and Helliger 2001). Andererseits sind in der Literatur für NS1 die Sumoylierung und alternative Splicingvarianten und für NP die Spaltung durch Caspasen beschrieben (Xu et al. 2011, Zhirnov et al. 1999), was ebenfalls eine Änderung der Ladung verursachen kann. Die Spaltungsreaktion am NP ist in der Literatur auch als Apoptosemarker nach Influenzainfektion beschrieben (Zhirnov et al. 2002).

5.6.2. Einfluss der medienbedingten Zelladaption auf die virusinduzierte Zellantwort in Vero Zellen

Die Adaption von Vero Zellen an Medium frei von tierischen Produkten zeigte einen Einfluss auf die zelluläre Proteinexpression (Tab. 4.8). In der vorliegenden Arbeit wurden bei der Tollwutinfektion über einen Zeitraum von acht Tagen (vier Probenahmen) in Vero_{IPT-AFM} 269 und in Vero_{SCM/SFM} 189 differenziell exprimierte Proteinspots detektiert. Obwohl nur ein geringer Anteil der differenziellen Proteinexpressionen für beide Zelllinien gemeinsam detektiert wurde, wiesen beide Medienbedingungen eine ähnliche Verteilung differenziell exprimierter Proteine auf funktioneller Ebene auf (Abb. 4.34). Das Ergebnis gibt einen Hinweis darauf, dass die Virusinfektion mit ähnlichen zellulären Netzwerken interagiert, die durch eine Veränderung des Mediums nicht beeinflusst werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten nach Tollwutinfektion für beide Medienbedingungen (SCM/SFM und IPT-AFM) 16 Proteinspots mit gleicher differenzieller Expression detektiert werden. Dazu gehörten die viralen Proteine PP und NP. Die Funktion beider Proteine innerhalb der Wirtszelle wurde in der Literatur beschrieben (Ivanov et al. 2011). Beide Proteine binden die virale RNA und beeinflussen die virale Replikation. Die Expressionsprofile zeigen einen Anstieg während des gesamten Probenahmezeitraums und deuten auf eine kontinuierliche Virusreplikation hin (Anhang A.5).

Die weiteren Proteindetektionen konnten Wirtszellproteinen zugeordnet werden, die während der Virusreplikation eine abnehmende Expression zeigten (Tab. 4.12, Anhang A.5). Zwei Proteine der 14-3-3 Proteinfamilie, die in verschiedenen Signalwegen involviert sind (Zhao et al. 2011), konnten für Vero Zellen, infiziert mit einem attenuierten Tollwutstamm, identifiziert werden. Wang et al. (2011) detektierte mittels einer peptidbasierten Proteomanalyse bei der Infektion von Maus N2a Nervenzellen mit verschiedenen Tollwutvirusstämmen (Wildtyp, fixiert, attenuiert) ebenfalls Proteine der 14-3-3 Proteinfamilie. Während der Wildtyp keine starken Expressionsänderungen in der Wirtszelle induzierte, wurden für einen fixierten und einen attenuierten Stamm drei 14-3-3 Proteine mit differenzieller Expression detektiert. 14-3-3 Proteine können Apoptose inhibieren (Xing et al. 2000) und eine negative Regulation dieser Proteine korreliert mit der Apoptoseinduktion (Dhingra et al. 2007). Für die biotechnologische Herstellung von viralen Impfstoffen ist es von Vorteil die zellspezifische Virusproduktionsphase zu verlängern. Eine Möglichkeit wäre das Hinauszögern der virusinduzierten Apoptose, wobei eine gesteigerte Expression des 14-3-3 Proteins ein potentieller Ansatzpunkt in Vero Zellen darstellt.

Viren erzeugen eine zelluläre Umgebung, die ihre Replikation begünstigt (Zhou et al. 2009). Ca²⁺ ist ein wichtiger Botenstoff innerhalb vieler zellulärer Signalkaskaden und spielen in fast

jedem Stadium der viralen Replikation eine wichtige Rolle. Diese Versuche konnte zeigen, dass zwei Ca^{2+} bindende Proteine, S100a6 (Schäfer and Heizmann 1996) und Reticulocalbin (Ozawa and Muramatsu 1993), während der Tollwutvirusinfektion vermindert exprimiert wurden. Auch Anx A5, das Ca^{2+} abhängig reguliert wird, wurde in infizierten Vero Zellen mit abnehmender Expression detektiert. Möglicherweise können für die Zellkulturtechnik Strategien entwickelt werden, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration virusreplikationsfördernd zu beeinflussen. Damit ergibt sich ein zweiter Ansatzpunkt, über eine geminderte oder gesteigerte Ca^{2+} -Konzentration den Virustiter zu steigern.

6. Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss veränderter Kultivierungsbedingungen auf das Proteom tierischer Zelllinien untersucht. Dabei wurden ein gelbasierter und ein gelfreier Ansatz zur Proteomanalyse gegenübergestellt. Die verwendeten Methoden ergänzten sich in der Detektion differenziell exprimierter Proteine. Die gelbasierte 2-D DIGE Methode ermöglichte die Detektion veränderter Proteinvarianten. Die gelfreie LF-Quantifizierung detektiert zusätzlich zu allen in der 2-D DIGE Methode identifizierten Proteine weitere Proteine, bot aber nicht die Möglichkeit Proteinvarianten zu unterscheiden. Damit ist die gelbasierte 2-D DIGE Methode selektiver und für die Analyse des Gesamtproteoms der Zelllinien in ihrer Aussagekraft etwas stärker limitiert.

Die gelbasierte und gelfreie Proteomics bot einen umfassenden Einblick in das veränderte Proteom während zweier Zelladaptionen. Dazu wurde eine adhärente MDCK Zelllinie an Suspensionswachstum und chemisch definiertes Medium adaptiert. Weiterhin wurde eine Adaption einer Vero Zelllinie an ein Medium frei von tierischen Produkten durchgeführt. Beide Zelllinien zeigten vor und nach der Adaption vergleichbares Zellwachstum und vergleichbare Virustiter. Die MDCK Zelladaption wurde in zwei Wiederholungen, die zwei Adaptionsschritte (Serumentzug, Suspensionswachstum) enthielten, untersucht. Die zwei unabhängig voneinander durchgeführten MDCK Zelladaptionen wiesen eine geringe Übereinstimmung der differenziellen Proteinexpression auf, wenngleich die finalen Adaptionsstadien ähnliche Proteinexpressionsmuster zeigten. Für beide Adaptionen konnten nach Serumentzug die größte Anzahl (94%) differenziell exprimierter Proteine detektiert werden. Die komplexe Zusammensetzung des Serums induzierte nach Entzug eine Vielzahl zellulärer Netzwerke, wie zum Beispiel des Metabolismus, des Cytoskeletts, des Proteinauf- und abbaus, der pre-mRNA-Prozessierung und der Zellmembran. Während der Adaption an Suspensionswachstum exprimierten die MDCK Zellen Proteine, die in der Literatur mit Krebszellgeweben assoziiert werden. Die Transformation einer adhärenen Zelle zu einer Suspensionszelle ähnelt somit nicht nur konzeptionell, sondern auch auf Proteomebene der Entstehung metastasierender Zellen. Inwiefern die tumorogenen Eigenschaften der Zelllinien betroffen sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Denkbar ist es, dass tumorogene Eigenschaften der Zelllinien, die im Rahmen der Vorgaben durch Zulassungsbehörden für die Genehmigung zur Produktion von Impfstoffen relevant sein könnten, zukünftig in Mausmodellen näher zu untersuchen.

Ein Proteomvergleich der MDCK_{ADH} und der MDCK_{SUS} Zelllinie zeigte für 10% aller detektierten Signale (gelbasierter Ansatz: 76 von 804 Spots, gelfreier Ansatz: 107 von 976 Proteinen) eine differenzielle Expression. Für das Suspensionswachstum ist anzunehmen, dass die MDCK Zelllinie einen Weg finden muss Prozesse, die in Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod nach Verlust des Zell-Matrix Kontakts stehen (Anoikis), auszusetzen. Es wurde eine Zunahme der Expression des Membranproteins Galectin-3 während der Zelladaption beobachtet, das die proapoptische Aktivität ihres Gegenspielers Galectin-1 hemmen kann. Interessanterweise wurden jedoch auch zwei proapoptische Proteine, Zellzyklus-Apoptose-Regulatorprotein 2 und Bcl-2-Inhibitor der Transkription 1 mit gesteigerter Expression in den MDCK_{SUS} gegenüber der MDCK_{ADH} Zelllinie detektiert. Die Beobachtungen verdeutlichten, dass der Verlust des Zell-Matrix Kontaktes komplexe Mechanismen wie EMT und Apoptose auslöst, die im Detail weiter untersucht werden sollten.

Bei der Expression metabolischer Proteine war die reduzierte Expression von Proteinen der Glykolyse sowie die gesteigerte Expression von Proteinen des Citratzyklus und der Atmungskette in MDCK_{SUS} Zellen im Vergleich zu MDCK_{ADH} Zellen auffällig. Diese Beobachtung kann ein Hinweis auf einen erhöhten Beitrag der Atmungskette zum Energiehaushalt in den Suspensionszellen sein. Die im Vergleich zu MDCK_{SUS} Zellen gesteigerte Proteinexpression der Glykolyse für die MDCK_{ADH} Zellen kann, mit Berücksichtigung einer Latenzphase für die zelluläre Anheftung an die Microcarrier, auch durch eine gesteigerte Wachstumsrate erklärt werden.

Es konnten zelllinienspezifische Effekte der Zelladaption auf die virusinduzierte Zellantwort in MDCK Zellen gezeigt werden. Die MDCK_{SUS} Zellen zeigten nach Influenzainfektion sowohl für Ezr als auch verschiedene HNRNPs eine deutliche Veränderung der Proteinexpression. Der Einfluss der Ezr-Expression auf die Membranpermeabilität sowie die Interaktionen von HNRNPs mit viralen RNA-Segmenten im Hinblick auf induzierte inhibitorische oder aktivierende Effekte auf die Virusreplikation sollten für MDCK Zellen weiter untersucht werden.

Interessanterweise zeigten influenzainfizierte MDCK_{SUS} Zellen im Gegensatz zu infizierten MDCK_{ADH} Zellen Änderungen in der Expression apoptoseassoziiierter Proteine. Aconitase und dem GRP38 werden proapoptische Eigenschaften zugesprochen, wohingegen Nucleolin eine antiapoptische Wirkungsweise zugesprochen wird (Sengupta et al. 2004). Eine Veränderung der Balance der beschriebenen Faktoren, zum Beispiel über die Manipulation der Expression antiapoptischer Proteine, könnte eine Maßnahme sein, die virussinduzierte Apoptose von Wirtszellen hinauszuzögern und damit die zellspezifischen Ausbeuten zu steigern.

Die Adaption der Vero Zelllinie an ein Medium frei von tierischen Produkten induzierte eine veränderte Expression von Proteinen der zellulären Struktur, der Membranfunktion, der Stressantwort, des Metabolismus, der Proteinfaltung im ER und des Proteinabbaus. Ein Mediumswechsel von SCM/SFM zu IPT-AFM bei der Kultivierung einer Vero Zelllinie induzierte

eine Verschiebung innerhalb der Proteinprozessierung, der Redoxhomöostase und des Energiehaushalts. Wie auch MDCK_{SUS} Zellen zeigten Vero_{IPT-AFM} Zellen eine verminderte Expression glykolytischer Enzyme im Vergleich zu den Zelllinien vor der Adaption.

Beide Vero Zelllinien reagierten auf die Infektion mit Tollwutviren mit differenzieller Expression von Proteinen verschiedenster funktioneller Ebenen, wie zelluläre Strukturierung, Metabolismus und Stressantwort. Interessanterweise konnte für beide Vero Zellen die gleiche Expression zentraler Signalproteine der 14-3-3-Proteinfamilie und im Kalziumhaushalt involvierter Proteine detektiert werden.

Die Untersuchung des Proteoms tierischer Zelllinien in ihrer Reaktion auf veränderte Kultivierungsbedingungen ermöglicht neben der Identifizierung zelllinienspezifischer Effekte auch die Identifikation zelllinienübergreifender Effekte. Eine Verschiebung der Proteinexpression innerhalb der Glykolyse und der Atmungskette wurde in beiden Zelllinien detektiert. Für solche Verschiebung wurden in der Literatur zwei Signalwege diskutiert: der Mdm2-p53- und der HIF-1-Signalweg. Beide Signalwege werden über niederabundante Signalproteine reguliert, die im durchgeführten Proteomansatz nicht detektiert werden konnten. Die Datensätze wurden somit auf indirekt assoziierte Proteinregulationen untersucht. Eine Änderung im Mdm2-p53-Signalweg induziert die differenzielle Expression ribosomaler Proteine, was für beide Zelllinien vor und nach Zelladaption detektiert wurde. Der HIF-1-Signalweg ist ein Hauptregulator für Sauerstoffhomöostase. Interessanterweise konnten in diesem Zusammenhang vermehrt Proteine des oxidativen Stresses, wie Glutathion-S-Transferase, Thioredoxinreduktase 1, und Peroxiredoxin-1 für die MDCK und Vero Zelllinien nach Adaption detektiert werden.

Der Prozess der Zelladaption hat einen ausgeprägten Einfluss auf die zelluläre Homöostase. Die veränderten Kultivierungsbedingungen induzierten in beiden Zelllinien eine differenzielle Expression von Stressproteinen wie HSPs sowie assoziierter Proteine des ERs und des oxidativen Stresses. Weiterhin erzeugte der Adaptionsprozess in beiden Zelllinien eine gesteigerte Stresssensibilität gegenüber einer Virusinfektion, was zu einem erhöhten Anteil an differenziell exprimierten Stressproteinen in infizierten adaptierten Zellen führte.

Beide Zelllinien replizieren die jeweiligen Viren unterschiedlich schnell und in verschiedenen zellulären Kompartimenten. Der Replikationsprozess von Influenzaviren dauert in der Regel bis zu vier Tagen (Isken et al. 2012). Vero Zellen replizieren Tollwutviren in bis zu acht Tagen (Trabelsi et al. 2006). Tollwutviren replizieren nur im Cytoplasma, Influenzaviren zusätzlich im Nukleus. Diese Unterschiede setzen diverse Mechanismen des Virus zur Beeinflussung der Wirtszelle voraus - mögliche Ursache dafür, dass weder zelllinien- noch virusstammübergreifend gleiche Proteinexpressionsmuster beobachtet werden konnten. Lediglich die Proteine 14-3-3, Prohibitin, T-complex und Ezr wurden für beide Zelllinien während der Virusinfektion detektiert. Diese zeigten jedoch unterschiedliche Expressionsprofile. Zusammenfassend ließ sich

ein stärkerer Einfluss auf die virusinduzierte Zellantwort für MDCK Zellen nach Adaption an Suspensionswachstum in CDM als bei nach Vero Zellen nach Adaption an optimierte Medienbedingungen detektieren.

Mit Hilfe der zwei *untargeted* Proteomanalysen konnte gezeigt werden, dass die MDCK und Vero Zelladaptionen an optimierte Kultivierungsbedingungen physiologische Veränderungen induzierten. Der verwendete explorative Ansatz konnte dabei einige Zielgene identifizieren, welche durch nähere Charakterisierung auf niedermolekularer Ebene und funktionelle Analysen zukünftig untersucht werden können. Die aufgedeckten Ansatzpunkte und die zugehörigen Hypothesen sind zusammenfassend im Anhang A.7 dargestellt.

Die Expression niederabundanter Proteine kann über *targeted* (zielgerichtete) Ansätze untersucht werden. Zum Beispiel weisen antikörperbasierte Assays eine hohe Sensitivität auf und eignen sich für Expressionsstudien. Zum Beispiel konnte im Kontext der Influenzareplikation in MDCK Zellen mit Hilfe von Western-Blot Analysen zellulärer Signalwege ein verbessertes Prozessverständnis erlangt werden (Heynisch et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit konnten Hinweise für die differenzielle Expression niederabundanter Signalproteine, wie HIF-1, Mdm2-p53, Ras und Crk, gefunden werden, die mittels Western Blot näher untersucht werden können. Weiterhin kann die Quantifizierung eines Zielproteins über die Massenspektrometrie mittels *single-* oder *multi-reaction-monitoring* (einzelner oder mehrfacher Reaktionsnachweis) erreicht werden. Die Etablierung dieser Methodik ist erstrebenswert, da sie eine absolute Proteinquantifizierung ermöglicht. Die dabei generierten quantitativen Daten viraler oder spezifischer zellulärer Proteine können in mathematischen Simulationen von Infektionsmodellen genutzt werden, um das Prozessverständnis weiter zu vertiefen. Auch die Molekularbiologie stellt Methoden für *targeted* Expressionsstudien zur Verfügung. So wurde zum Beispiel durch die detaillierte Charakterisierung des Interferon-Signalwegs mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR von Seitz et al. (2010) das Prozessverständnis speziell im Hinblick auf die Zugabe von Trypsin während der Influenzareplikation in MDCK Zellen verbessert.

Funktionelle Analysen können über die Manipulation der genetischen Expression durchgeführt werden. Über *silencing* (stilllegende) RNA, Mikroinjektion (Cook et al. 2011) sowie stabile und flexible Zelltransfektion (Mathias et al. 2010) kann die Genexpression der Zellen verändert werden (*loss-*, *gain-of-function*). Veränderungen der Genexpression in den Zelllinien für die in der vorliegenden Arbeit aufgedeckten Ansatzpunkte (Anhang A.7) können die Zell-Matrix Interaktion, den Metabolismus, die Apoptoseinduktion und die Virusreplikation beeinflussen. Möglichkeiten, die Zellanheftung über die Manipulation einzelner Proteinexpressionen in zentralen Signalwegen oder mehrerer Proteinexpressionen am Ende verschiedener Signalkaskaden zu verändern, konnten die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen. Für die veränderte Genexpression eines einzelnen Proteins bieten sich codierende Gene des Ras-Signalwegs oder des

Crk Proteins im EMT Signalweg an. Für eine Kombination veränderter Genexpressionen eignen sich codierende Gene der Proteine Anx A1, Galectin-3 und Ezr. Nach Serumentzug wurde die differenzielle Expression dieser membranassoziierten Proteine für beide Zelllinien detektiert (Anhang A.6). Unterdessen wurde im Rahmen dieser Arbeit für beide Zelllinien eine Lockerung ihrer Anheftung an die Wachstumsoberfläche beobachtet. Ein erwartetes Ergebnis für die Veränderung der Genexpression im Zusammenhang mit der Zell-Matrix Interaktion wäre ein schneller Übergang in Suspensionswachstum für die MDCK und Vero Zelllinien.

Hinsichtlich der Anwendung von Säugerzelllinien in der Biotechnologie sind noch viele Fragen offen, die mittels Proteomanalyse des zellulären Netzwerks beantwortet werden können. Eine wichtige Fragestellung im Zusammenhang mit Suspensionswachstum widmet sich dem *High-cell-density*-Effekt, der die Abnahme der zellspezifischen Produktausbeute mit zunehmender Zelldichte beschreibt (Lindsay and Betenbaugh 1992). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass der Adaption an Suspensionswachstum in CDM zentrale Mechanismen der Zellanheftung und Apoptoseinduktion zugrunde liegen. Einige Mechanismen können durch zelllinienübergreifende Proteomanalysen aufgedeckt werden. Nachfolgende Arbeiten sollten als Referenz humane oder CHO Zelllinien als gut charakterisierten Ausgangspunkt in die Untersuchung aufnehmen. Mithilfe der in dieser Arbeit durchgeführten *untargeted* Proteomanalysen konnten komplexe Fragestellungen untersucht und Interaktionen im zellulären Netzwerk aufgedeckt werden.

Literaturverzeichnis

- Addis, M. F., Pisanu, S., Ghisaura, S., Pagnozzi, D., Marogna, G., Tanca, A., Biosa, G., Cacciotto, C., Alberti, A., Pittau, M., Roggio, T. and Uzzau, S.: 2011, Proteomics and pathway analyses of the milk fat globule in sheep naturally infected by *Mycoplasma agalactiae* provide indications of the in vivo response of the mammary epithelium to bacterial infection., *Infect Immun* **79**(9), 3833–3845. 5.2
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J.: 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs., *Nucleic Acids Res* **25**(17), 3389–3402. 2.3.5
- An, Y., Rininger, J. A., Jarvis, D. L., Jing, X., Ye, Z., Aumiller, J. J., Eichelberger, M. and Cipollo, J. F.: 2013, Comparative glycomics analysis of influenza Hemagglutinin (H5N1) produced in vaccine relevant cell platforms., *J Proteome Res* **12**(8), 3707–3720. 2.1.1
- Arias, A. M.: 2001, Epithelial mesenchymal interactions in cancer and development., *Cell* **105**(4), 425–431. 2.2.3
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M. and Sherlock, G.: 2000, Gene ontology: Tool for the unification of biology. The gene ontology consortium., *Nat Genet* **25**(1), 25–29. 5.1.4
- Assoian, R. K.: 1997, Anchorage-dependent cell cycle progression., *J Cell Biol* **136**(1), 1–4. 2.2.3
- Babbey, C. M., Ahktar, N., Wang, E., Chen, C. C.-H., Grant, B. D. and Dunn, K. W.: 2006, Rab10 regulates membrane transport through early endosomes of polarized Madin-Darby canine kidney cells., *Mol Biol Cell* **17**(7), 3156–3175. 5.4
- Bandaranayake, A. D. and Almo, S. C.: 2014, Recent advances in mammalian protein production., *FEBS Lett* **588**(2), 253–260. 1

- Bardiya, N. and Bae, J. H.: 2005, Influenza vaccines: recent advances in production technologies., *Appl Microbiol Biotechnol* **67**(3), 299–305. 2.1.1
- Barrett, P. N., Mundt, W., Kistner, O. and Howard, M. K.: 2009, Vero cell platform in vaccine production: Moving towards cell culture-based viral vaccines., *Expert Rev Vaccines* **8**(5), 607–618. 1, 2.2, 2.2.1
- Barsnes, H., Vaudel, M., Colaert, N., Helsens, K., Sickmann, A., Berven, F. S. and Martens, L.: 2011, Compomics-utilities: An open-source Java library for computational proteomics., *BMC Bioinformatics* **12**, 70. 3.4.5
- Bartolomeo, M. P. and Maisano, F.: 2006, Validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative amino acid analysis., *J Biomol Tech* **17**(2), 131–137. 5.1.1
- Becker, G. W.: 2008, Stable isotopic labeling of proteins for quantitative proteomic applications., *Brief Funct Genomic Proteomic* **7**(5), 371–382. 2.3.4
- Bednarz-Misa, I., Serek, P., Dudek, B., Pawlak, A., Bugla-Ploskonska, G. and Gamian, A.: 2014, Application of zwitterionic detergent to the solubilization of *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis., *J Microbiol Methods* **107**, 74–79. 5.1.4
- Behrens, J., Mareel, M. M., Van Roy, F. M. and Birchmeier, W.: 1989, Dissecting tumor cell invasion: Epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion., *J Cell Biol* **108**(6), 2435–2447. 1, 2.2.3
- Belshe, R. B., Edwards, K. M., Vesikari, T., Black, S. V., Walker, R. E., Hultquist, M., Kemble, G., Connor, E. M. and , C. A. I. V.-T. C. E. S. G.: 2007, Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children., *N Engl J Med* **356**(7), 685–696. 2.1
- Benedict, C. A., Norris, P. S. and Ware, C. F.: 2002, To kill or be killed: Viral evasion of apoptosis., *Nat Immunol* **3**(11), 1013–1018. 2.2.4
- Berth, M., Moser, F. M., Kolbe, M. and Bernhardt, J.: 2007, The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images., *Appl Microbiol Biotechnol* **76**(6), 1223–1243. 2.3.5
- Bertram, S., Glowacka, I., Steffen, I., Kühl, A. and Pöhlmann, S.: 2010, Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin., *Rev Med Virol* **20**(5), 298–310. 5.2

- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P. G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R. and Postel, W.: 1982, Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications., *J Biochem Biophys Methods* **6**(4), 317–339. 2.3.3
- Bjellqvist, B., Hughes, G. J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J. C., Frutiger, S. and Hochstrasser, D.: 1993, The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences., *Electrophoresis* **14**(10), 1023–1031. 2.5
- Bock, A., Sann, H., Schulze-Horsel, J., Genzel, Y., Reichl, U. and Möhler, L.: 2009, Growth behavior of number distributed adherent MDCK cells for optimization in microcarrier cultures., *Biotechnol Prog* **25**(6), 1717–1731. 4.2.1, 4.4
- Boerner, P., Rindler, M. J., Chuman, L. and Saier, Jr, M.: 1985, Characterization of chemically and virally transformed variants of Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells., *J Cell Physiol* **122**(2), 299–307. 2.2.3, 5.3
- Bouvier, N. M. and Palese, P.: 2008, The biology of influenza viruses., *Vaccine* **26 Suppl 4**, D49–D53. 2.2.4
- Bukong, T. N., Kodys, K. and Szabo, G.: 2013, Human ezrin-moesin-radixin proteins modulate hepatitis C virus infection., *Hepatology* **58**(5), 1569–1579. 5.6.1
- Burgoyne, R. D. and Geisow, M. J.: 1989, The annexin family of calcium-binding proteins., *Cell Calcium* **10**(1), 1–10. 4.5
- Burkhart, J., Schumbrutzki, C., Wortelkamp, S., Sickmann, A. and Zahedi, R.: 2012, Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics., *J Proteomics* **75**(4), 1454–1462. 2.3.2, 3.4.2, 3.13, 4.1.3, 5.1.3
- Burkhart, J., Vaudel, M., Gambaryan, S., Radau, S., Walter, U., Martens, L., Geiger, J., Sickmann, A. and Zahedi, R.: 2012, The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways., *Blood* **120**(15), e73–e82. 2.3.4
- Burleson, F. G., Chambers, T. M. and Wiedbrauk, D. L.: 1992, *Virology: A laboratory manual*., Academic Press. 3.3.3
- Cabrera, K.: 2004, Applications of silica-based monolithic HPLC columns., *J Sep Sci* **27**(10–11), 843–852. 2.3.3

- Caspi, R., Altman, T., Billington, R., Dreher, K., Foerster, H., Fulcher, C. A., Holland, T. A., Keseler, I. M., Kothari, A., Kubo, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L. A., Ong, Q., Paley, S., Subhraveti, P., Weaver, D. S., Weerasinghe, D., Zhang, P. and Karp, P. D.: 2014, The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases., *Nucleic Acids Res* **42**(Database issue), D459–D471. 2.3.5
- Cassio, D.: 2013, Long term culture of MDCK strains alters chromosome content., *BMC Res Notes* **6**, 162. 2.2.3, 5.1.4, 5.3
- Castilla, V. and Scolaro, L.: 2012, Involvement of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in viral multiplication., *Future Virology* **7**(6), 575–591. 5.6.1
- Chatellard-Causse, C., Blot, B., Cristina, N., Torch, S., Missotten, M. and Sadoul, R.: 2002, Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization., *J Biol Chem* **277**(32), 29108–29115. 4.11
- Chew, T., Noyce, R., Collins, S. E., Hancock, M. H. and Mossman, K. L.: 2009, Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production., *Mol Immunol* **46**(3), 393–399. 2.2.4
- Christoforou, A. L. and Lilley, K. S.: 2012, Isobaric tagging approaches in quantitative proteomics: The ups and downs., *Anal Bioanal Chem* **404**(4), 1029–1037. 2.3.4
- Chu, C., Lugovtsev, V., Golding, H., Betenbaugh, M. and Shiloach, J.: 2009, Conversion of MDCK cell line to suspension culture by transfecting with human *siat7e* gene and its application for influenza virus production., *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(35), 14802–14807. 1, 2.2.3
- Collodoro, M., Lemaire, P., Eppe, G., Bertrand, V., Dobson, R., Mazzucchelli, G., Widart, J., De Pauw, E. and De Pauw-Gillet, M.-C.: 2012, Identification and quantification of concentration-dependent biomarkers in MCF-7/BOS cells exposed to 17 β -estradiol by 2-D DIGE and label-free proteomics., *J Proteomics* **75**(14), 4555–4569. 5.2
- Consortium, U.: 2014, Activities at the Universal Protein Resource (UniProt)., *Nucleic Acids Res* **42**(Database issue), D191–D198. 2.5, 4.5, 4.27
- Cook, R. N., Ang, S. F., Kang, R. S.-o. and Fölsch, H.: 2011, Analyzing the function of small GTPases by microinjection of plasmids into polarized epithelial cells., *J Vis Exp* (51). 6

- Cox, M. M. J., Izikson, R., Post, P. and Dunkle, L.: 2015, Safety, efficacy, and immunogenicity of Flublok in the prevention of seasonal influenza in adults., *Ther Adv Vaccines* **3**(4), 97–108. 2.1.1
- Critchley, D. R.: 2000, Focal adhesions - the cytoskeletal connection., *Curr Opin Cell Biol* **12**(1), 133–139. 4.5
- Croft, D., Mundo, A. F., Haw, R., Milacic, M., Weiser, J., Wu, G., Caudy, M., Garapati, P., Gillespie, M., Kamdar, M. R., Jassal, B., Jupe, S., Matthews, L., May, B., Palatnik, S., Rothfels, K., Shamovsky, V., Song, H., Williams, M., Birney, E., Hermjakob, H., Stein, L. and D'Eustachio, P.: 2014, The Reactome pathway knowledgebase., *Nucleic Acids Res* **42**(Database issue), D472–D477. 2.3.5, 3.4.5, 4.3.2, 4.4, A.3
- Dautel, F., Kalkhof, S., Trump, S., Michaelson, J., Beyer, A., Lehmann, I. and von Bergen, M.: 2011, DIGE-based protein expression analysis of B[a]P-exposed hepatoma cells reveals a complex stress response including alterations in oxidative stress, cell cycle control, and cytoskeleton motility at toxic and subacute concentrations., *J Proteome Res* **10**(2), 379–393. 2.3.5
- de Faria, I. J. d. S., Olmo, R. P., Silva, E. G. and Marques, J. T.: 2013, dsRNA sensing during viral infection: lessons from plants, worms, insects, and mammals., *J Interferon Cytokine Res* **33**(5), 239–253. 2.2.4
- de Hemptinne, V., Rondas, D., Toepoel, M. and Vancompernelle, K.: 2009, Phosphorylation on Thr-106 and NO-modification of glyoxalase I suppress the TNF-induced transcriptional activity of NF-kappaB., *Mol Cell Biochem* **325**(1-2), 169–178. 5.3
- de la Luz-Hernández, K. R., del Calvo, L. R., Rabasa-Legón, Y., Lage-Castellanos, A., Castillo-Vitlloch, A., Díaz, J. and Gaskell, S.: 2008, Metabolic and proteomic study of NS0 myeloma cell line following the adaptation to protein-free medium., *J Proteomics* **71**(2), 133–147. 5.3, 5.5
- Deisenroth, C. and Zhang, Y.: 2010, Ribosome biogenesis surveillance: Probing the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway., *Oncogene* **29**(30), 4253–4260. 5.4
- Deisenroth, C. and Zhang, Y.: 2011, The Ribosomal Protein-Mdm2-p53 Pathway and Energy Metabolism: Bridging the Gap between Feast and Famine., *Genes Cancer* **2**(4), 392–403. 5.4
- Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R. and Silverman, R. H.: 1998, Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays., *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26), 15623–15628. 2.2.4

- Dhingra, V., Li, X., Liu, Y. and Fu, Z. F.: 2007, Proteomic profiling reveals that rabies virus infection results in differential expression of host proteins involved in ion homeostasis and synaptic physiology in the central nervous system., *J Neurovirol* **13**(2), 107–117. 5.6.2
- Diaz, M. O., Ziemins, S., Le Beau, M. M., Pitha, P., Smith, S. D., Chilcote, R. R. and Rowley, J. D.: 1988, Homozygous deletion of the alpha- and beta 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines., *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(14), 5259–5263. 2.2.4
- Doroshenko, A. and Halperin, S. A.: 2009, Trivalent MDCK cell culture-derived influenza vaccine Optaflu (Novartis Vaccines)., *Expert Rev Vaccines* **8**(6), 679–688. 2.1.1
- Drake, J. W.: 1993, Rates of spontaneous mutation among RNA viruses., *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(9), 4171–4175. 2.1.1
- Du, J., Yuan, Z., Ma, Z., Song, J., Xie, X. and Chen, Y.: 2014, KEGG-PATH: Kyoto encyclopedia of genes and genomes-based pathway analysis using a path analysis model., *Mol Biosyst* **10**(9), 2441–2447. 2.3.5
- Dukes, J. D., Whitley, P. and Chalmers, A. D.: 2011, The MDCK variety pack: choosing the right strain., *BMC Cell Biol* **12**, 43. 2.2.1, 5.3
- Earle, W., Schilling, E., Bryant, J. and Evans, V.: 1954, The growth of pure strain L cells in fluid-suspension cultures., *J Natl Cancer Inst* **14**(5), 1159–1171. 2.2.2
- Eidhammer, I., Flikka, K., Martens, L. and Mikalsen, S.-O.: 2007, *Computational methods for mass spectrometry proteomics*, John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England. Kapitel 1. 2.3.2, 2.3, 2.3.2, 2.3.5
- Elias, J. E., Haas, W., Faherty, B. K. and Gygi, S. P.: 2005, Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations., *Nat Methods* **2**(9), 667–675. 2.3.5
- Elmore, S.: 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death., *Toxicol Pathol* **35**(4), 495–516. 2.2.4
- Elvidge, G. P., Glenney, L., Appelhoff, R. J., Ratcliffe, P. J., Ragoussis, J. and Gleadle, J. M.: 2006, Concordant regulation of gene expression by hypoxia and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibition: the role of HIF-1alpha, HIF-2alpha, and other pathways., *J Biol Chem* **281**(22), 15215–15226. 5.4
- Emoto, Y.: 2008, Cellular aggregation facilitates anoikis in MDCK cells., *J Physiol Sci* **58**(6), 371–380. 5.3

- Enders, J. F., Weller, T. H. and Robbins, F. C.: 1949, Cultivation of the Lansing strain of Poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues., *Science* **109**(2822), 85–87. 2.2, 2.2.3
- Ensembl: 2012, Ensembl gene annotation project (e!68) *Canis lupus familiaris* (dog, CanFam3.1 assembly)., Internet.
URL: http://www.ensembl.org/info/genome/genebuild/2012_07_dog_genebuild.pdf 2.3.5
- Faber, M., Pulmanusahakul, R., Hodawadekar, S. S., Spitsin, S., McGettigan, J. P., Schnell, M. J. and Dietzschold, B.: 2002, Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response., *J Virol* **76**(7), 3374–3381. 2.2.4
- Falcon, S. and Gentleman, R.: 2007, Using GOstats to test gene lists for GO term association., *Bioinformatics* **23**(2), 257–258. 5.1.4
- Fehon, R. G., McClatchey, A. I. and Bretscher, A.: 2010, Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins., *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(4), 276–287. 4.5, 5.5
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. and Whitehouse, C. M.: 1989, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules., *Science* **246**(4926), 64–71. 2.3.1, 2.3.3
- Fenyő, D. and Beavis, R. C.: 2003, A method for assessing the statistical significance of mass spectrometry-based protein identifications using general scoring schemes., *Anal Chem* **75**(4), 768–774. 2.3.5
- Finka, A. and Goloubinoff, P.: 2013, Proteomic data from human cell cultures refine mechanisms of chaperone-mediated protein homeostasis., *Cell Stress Chaperones* **18**(5), 591–605. 5.1
- Frensing, T., Heldt, F. S., Pflugmacher, A., Behrendt, I., Jordan, I., Flockerzi, D., Genzel, Y. and Reichl, U.: 2013, Continuous influenza virus production in cell culture shows a periodic accumulation of defective interfering particles., *PLoS One* **8**(9), e72288. 4.2.1
- Frensing, T., Pflugmacher, A., Bachmann, M., Peschel, B. and Reichl, U.: 2014, Impact of defective interfering particles on virus replication and antiviral host response in cell culture-based influenza vaccine production., *Appl Microbiol Biotechnol* **98**(21), 8999–9008. 3.3.6, 5.2, 5.6.1
- Friede, M., Palkonyay, L., Alfonso, C., Pervikov, Y., Torelli, G., Wood, D. and Kieny, M. P.: 2011, WHO initiative to increase global and equitable access to influenza vaccine in the event of a pandemic: Supporting developing country production capacity through technology

- transfer, *Vaccine* **29**, **Supplement 1**(0), A2 – A7. Transfer of Technology for Pandemic Influenza Vaccine Production in Developing Countries. 2.1.1
- Frisch, S. M. and Francis, H.: 1994, Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis., *J Cell Biol* **124**(4), 619–626. 2.2.3, 5.3
- Fu, Y., Li, J. and Lee, A. S.: 2007, GRP78/BiP inhibits endoplasmic reticulum BIK and protects human breast cancer cells against estrogen starvation-induced apoptosis., *Cancer Res* **67**(8), 3734–3740. 4.11
- Gamage, N. U., Duggleby, R. G., Barnett, A. C., Tresillian, M., Latham, C. F., Liyou, N. E., McManus, M. E. and Martin, J. L.: 2003, Structure of a human carcinogen-converting enzyme, SULT1A1. Structural and kinetic implications of substrate inhibition., *J Biol Chem* **278**(9), 7655–7662. 5.3
- García-Sastre, A.: 2011, Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses., *Virus Res* **162**(1-2), 12–18. 2.2.4
- Gardner, P. R., Nguyen, D. D. and White, C. W.: 1994, Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs., *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(25), 12248–12252. 4.11
- Gasparini, R., Amicizia, D., Lai, P. L. and Panatto, D.: 2011, Live attenuated influenza vaccine - a review., *J Prev Med Hyg* **52**(3), 95–101. 2.1.1
- Gaush, C. R., Hard, W. L. and Smith, T. F.: 1966, Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK)., *Proc Soc Exp Biol Med* **122**(3), 931–935. 2.2.1, 2.2.3
- Geer, L. Y., Markey, S. P., Kowalak, J. A., Wagner, L., Xu, M., Maynard, D. M., Yang, X., Shi, W. and Bryant, S. H.: 2004, Open mass spectrometry search algorithm., *J Proteome Res* **3**(5), 958–964. 2.3.5
- Genzel, Y., Behrendt, I., König, S., Sann, H. and Reichl, U.: 2004, Metabolism of MDCK cells during cell growth and influenza virus production in large-scale microcarrier culture., *Vaccine* **22**(17-18), 2202–2208. 3.3.2
- Genzel, Y., Frensing, T. and Reichl, U.: 2013, Zellkultur statt Hühnerrei - Herstellung moderner Grippeimpfstoffe., *Chem. Unserer Zeit* **47**, 12 – 22. 2.1
- Genzel, Y. and Reichl, U.: 2009, Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines., *Expert Rev Vaccines* **8**(12), 1681–1692. 1, 2.2, 2.2, 2.2.1

- Genzel, Y., Ritter, J. B., König, S., Alt, R. and Reichl, U.: 2005, Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells., *Biotechnol Prog* **21**(1), 58–69. 4.4, 5.2
- Glacken, M. W., Fleischaker, R. J. and Sinskey, A. J.: 1986, Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells., *Biotechnol Bioeng* **28**(9), 1376–1389. 4.4, 5.2
- Görg, A., Weiss, W. and Dunn, M. J.: 2004, Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics., *Proteomics* **4**(12), 3665–3685. 5.1.2
- Gotzmann, J., Mikula, M., Eger, A., Schulte-Hermann, R., Foisner, R., Beug, H. and Mikulits, W.: 2004, Molecular aspects of epithelial cell plasticity: Implications for local tumor invasion and metastasis., *Mutat Res* **566**(1), 9–20. 2.3
- Grigoletto, A., Lestienne, P. and Rosenbaum, J.: 2011, The multifaceted proteins Reptin and Pontin as major players in cancer., *Biochim Biophys Acta* **1815**(2), 147–157. 5.3
- Gross, J. H.: 2004, *Mass spectrometry.*, Springer-Verlag. 2.3.1, 2.3.1, 2.3.1
- Grossmann, J.: 2002, Molecular mechanisms of detachment-induced apoptosis - anoikis., *Apoptosis* **7**(3), 247–260. 2.2.3, 5.3
- Guthals, A. and Bandeira, N.: 2012, Peptide identification by tandem mass spectrometry with alternate fragmentation modes., *Mol Cell Proteomics* **11**(9), 550–557. 2.3.2
- Haedicke, J., de Los Santos, K., Goff, S. P. and Naghavi, M. H.: 2008, The ezrin-radixin-moesin family member ezrin regulates stable microtubule formation and retroviral infection., *J Virol* **82**(9), 4665–4670. 5.6.1
- Hale, B. G., Randall, R. E., Ort̃n, J. and Jackson, D.: 2008, The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses., *J Gen Virol* **89**(Pt 10), 2359–2376. 5.6.1
- Hayflick, L. and Moorhead, P. S.: 1961, The serial cultivation of human diploid cell strains., *Exp Cell Res* **25**, 585–621. 2.2.1
- Heldt, F. S., Frensing, T. and Reichl, U.: 2012, Modeling the intracellular dynamics of influenza virus replication to understand the control of viral RNA synthesis., *J Virol* **86**(15), 7806–7817. 5.2
- Hess, R. D., Weber, F., Watson, K. and Schmitt, S.: 2012, Regulatory, biosafety and safety challenges for novel cells as substrates for human vaccines., *Vaccine* **30**(17), 2715–2727. 2.2.1

- Heynisch, B., Frensing, T., Heinze, K., Seitz, C., Genzel, Y. and Reichl, U.: 2010, Differential activation of host cell signalling pathways through infection with two variants of influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) in MDCK cells., *Vaccine* **28**(51), 8210–8218. 3.4.7, 4.3.2, 4.4, 6
- Horzinek, M. C.: 1999, *Veterinary vaccines and diagnostics.*, Academic Press, San Diego. 2.1
- Hubbard, M. J., McHugh, N. J. and Carne, D. L.: 2000, Isolation of ERp29, a novel endoplasmic reticulum protein, from rat enamel cells. Evidence for a unique role in secretory-protein synthesis., *Eur J Biochem* **267**(7), 1945–1957. 5.5
- Hyung, S.-W., Piehowski, P. D., Moore, R. J., Orton, D. J., Schepmoes, A. A., Clauss, T. R., Chu, R. K., Fillmore, T. L., Brewer, H., Liu, T., Zhao, R. and Smith, R. D.: 2014, Microscale depletion of high abundance proteins in human biofluids using IgY14 immunoaffinity resin: analysis of human plasma and cerebrospinal fluid., *Anal Bioanal Chem* **406**(28), 7117–7125. 5.1.2
- Imai, M., Watanabe, T., Hatta, M., Das, S. C., Ozawa, M., Shinya, K., Zhong, G., Hanson, A., Katsura, H., Watanabe, S., Li, C., Kawakami, E., Yamada, S., Kiso, M., Suzuki, Y., Maher, E. A., Neumann, G. and Kawaoka, Y.: 2012, Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets., *Nature* **486**(7403), 420–428. 2.1.1
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J. and Mann, M.: 2005, Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein., *Mol Cell Proteomics* **4**(9), 1265–1272. 2.3.4
- Isken, B., Genzel, Y. and Reichl, U.: 2012, Productivity, apoptosis, and infection dynamics of influenza A/PR/8 strains and A/PR/8-based reassortants., *Vaccine* **30**(35), 5253–5261. 5.2, 6
- Ivanov, I., Yabukarski, F., Ruigrok, R. W. H. and Jamin, M.: 2011, Structural insights into the rhabdovirus transcription/replication complex., *Virus Res* **162**(1-2), 126–137. 2.1, 5.6.2
- Ivaska, J., Pallari, H.-M., Nevo, J. and Eriksson, J. E.: 2007, Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling., *Exp Cell Res* **313**(10), 2050–2062. 5.5
- Jan, Y., Matter, M., Pai, J.-t., Chen, Y.-L., Pilch, J., Komatsu, M., Ong, E., Fukuda, M. and Ruoslahti, E.: 2004, A mitochondrial protein, Bit1, mediates apoptosis regulated by integrins and Groucho/TLE corepressors., *Cell* **116**(5), 751–762. 5.4

- Janke, R., Genzel, Y., Wahl, A. and Reichl, U.: 2010, Measurement of key metabolic enzyme activities in mammalian cells using rapid and sensitive microplate-based assays., *Biotechnol Bioeng* **107**(3), 566–581. 4.4
- Jorba, N., Juarez, S., Torreira, E., Gastaminza, P., no, N. Z., Albar, J. P. and Ortín, J.: 2008, Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors., *Proteomics* **8**(10), 2077–2088. 5.6.1
- Kalbfuss, B., Knöchlein, A., Kröber, T. and Reichl, U.: 2008, Monitoring influenza virus content in vaccine production: Precise assays for the quantitation of hemagglutination and neuramidase activity., *Biologicals* **36**(3), 145–161. 3.3.3
- Karas, M. and Hillenkamp, F.: 1988, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons., *Analytical Chemistry* **60**(20), 2299–2301. 2.3.1
- Karp, N. A. and Lilley, K. S.: 2005, Maximising sensitivity for detecting changes in protein expression: Experimental design using minimal CyDyes., *Proteomics* **5**(12), 3105–3115. 5.1.2
- Katata, T., Irie, K., Fukuhara, A., Kawakatsu, T., Yamada, A., Shimizu, K. and Takai, Y.: 2003, Involvement of nectin in the localization of IQGAP1 at the cell-cell adhesion sites through the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells., *Oncogene* **22**(14), 2097–2109. 5.4
- Kawakami, E., Watanabe, T., Fujii, K., Goto, H., Watanabe, S., Noda, T. and Kawaoka, Y.: 2011, Strand-specific real-time RT-PCR for distinguishing influenza vRNA, cRNA, and mRNA., *J Virol Methods* **173**(1), 1–6. 3.3.6
- Kienitz, H.: 1968, *Massenspektrometrie.*, Verlag Chemie: Weinheim. 2.3.1
- Klenk, H. D., Rott, R., Orlich, M. and Blödorn, J.: 1975, Activation of influenza a viruses by trypsin treatment., *Virology* **68**(2), 426–439. 5.2
- Klose, J.: 1975, Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. a novel approach to testing for induced point mutations in mammals., *Humangenetik* **26**(3), 231–243. 2.3.3
- Kluge, S., Benndorf, D., Genzel, Y., Scharfenberg, K., Rapp, E. and Reichl, U.: 2015, Monitoring changes in proteome during stepwise adaptation of a MDCK cell line from adherence to growth in suspension., *Vaccine* . 1, 3.4.5, 4
- Kluge, S., Rourou, S., Vester, D., Majoul, S., Benndorf, D., Genzel, Y., Rapp, E., Kallel, H. and Reichl, U.: 2013, Proteome analysis of virus-host cell interaction: rabies virus replication

- in Vero cells in two different media., *Appl Microbiol Biotechnol* **97**(12), 5493–5506. 2, 3.4.4, 3.4.5, 4
- Knull, H. R. and Walsh, J. L.: 1992, Association of glycolytic enzymes with the cytoskeleton., *Curr Top Cell Regul* **33**, 15–30. 5.5
- Kondo, T., Takeuchi, K., Doi, Y., Yonemura, S., Nagata, S. and Tsukita, S.: 1997, ERM (ezrin/radixin/moesin)-based molecular mechanism of microvillar breakdown at an early stage of apoptosis., *J Cell Biol* **139**(3), 749–758. 4.11
- Kummer, S., Flöttmann, M., Schwanhäusser, B., Sieben, C., Veit, M., Selbach, M., Klipp, E. and Herrmann, A.: 2014, Alteration of protein levels during influenza virus H1N1 infection in host cells: A proteomic survey of host and virus reveals differential dynamics., *PLoS One* **9**(4), e94257. 5.1.3, 5.1.4
- Lamorte, L., Royal, I., Naujokas, M. and Park, M.: 2002, Crk adapter proteins promote an epithelial-mesenchymal-like transition and are required for HGF-mediated cell spreading and breakdown of epithelial adherens junctions., *Mol Biol Cell* **13**(5), 1449–1461. 5.4
- Lee, M.-S. and Hu, A. Y.-C.: 2012, A cell-based backup to speed up pandemic influenza vaccine production., *Trends in Microbiology* **20**(3), 103 – 105. 2.1.1
- Lewandowska, K., Skierski, J. and Doroszewski, J.: 1976, Influence of serum protein and medium composition on the dynamic adhesiveness of lymphocytes and erythrocytes., *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **24**(5), 749–757. 5.3
- Leyrat, C., Ribeiro, E. A., Gérard, F. C., Ivanov, I., Ruigrok, R. W. and Jamin, M.: 2011, Structure, interactions with host cell and functions of rhabdovirus phosphoprotein., *Future Virology* **6**(4), 465–481. 2.1
- Lindner, H. and Helliger, W.: 2001, Age-dependent deamidation of asparagine residues in proteins., *Exp Gerontol* **36**(9), 1551–1563. 5.6.1
- Lindsay, D. A. and Betenbaugh, M. J.: 1992, Quantification of cell culture factors affecting recombinant protein yields in baculovirus-infected insect cells., *Biotechnol Bioeng* **39**(6), 614–618. 6
- Ling, H., Ardjomand, P., Samvakas, S., Simm, A., Busch, G. L., Lang, F., Sebekova, K. and Heidland, A.: 1998, Mesangial cell hypertrophy induced by NH₄Cl: Role of depressed activities of cathepsins due to elevated lysosomal pH., *Kidney Int* **53**(6), 1706–1712. 5.1

- Liu, D., Feng, Y., Cheng, Y. and Wang, J.: 2004, Human programmed cell death 5 protein has a helical-core and two dissociated structural regions., *Biochem Biophys Res Commun* **318**(2), 391–396. 4.11
- Liu, J., Mani, S., Schwartz, R., Richman, L. and Tabor, D. E.: 2010, Cloning and assessment of tumorigenicity and oncogenicity of a Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line for influenza vaccine production., *Vaccine* **28**(5), 1285–1293. 2.2.3, 5.3
- Lohr, V., Genzel, Y., Behrendt, I., Scharfenberg, K. and Reichl, U.: 2010, A new MDCK suspension line cultivated in a fully defined medium in stirred-tank and wave bioreactor., *Vaccine* **28**(38), 6256–6264. 1, 2.2.3, 3.2.1, 3.2.3, 4.4, 5.3
- Lottspeich, F. and Engels, J. W.: 2012, *Bioanalytik.*, Vol. 3., Springer Spektrum. (Autorenverbund). 2.1, 2.3.1, 2.3.1, 2.3.2, 2.4, 2.3.3, 2.3.3
- Ludwig, S., Pleschka, S., Planz, O. and Wolff, T.: 2006, Ringing the alarm bells: Signalling and apoptosis in influenza virus infected cells., *Cell Microbiol* **8**(3), 375–386. 5.6.1
- Lugovtsev, V. Y., Melnyk, D. and Weir, J. P.: 2013, Heterogeneity of the MDCK cell line and its applicability for influenza virus research., *PLoS One* **8**(9), e75014. 5.4
- Lund, N., Milev, M. P., Wong, R., Sanmuganantham, T., Woolaway, K., Chabot, B., Abou Elela, S., Moulard, A. J. and Cochrane, A.: 2012, Differential effects of hnRNP D/AUF1 isoforms on HIV-1 gene expression., *Nucleic Acids Res* **40**(8), 3663–3675. 5.6.1
- Maassab, H. F. and Bryant, M. L.: 1999, The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans., *Rev Med Virol* **9**(4), 237–244. 2.1.1
- Madin, S. H., Andriese, P. C. and Darby, N. B.: 1957, The in vitro cultivation of tissues of domestic and laboratory animals., *Am J Vet Res* **18**(69), 932–941. 2.2.1
- Madin, S. H., S. H. and Darby, Jr, N.: 1958, Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin., *Proc Soc Exp Biol Med* **98**(3), 574–576. 2.2.1
- Mahy, B. W. J. and Kangro, H. O.: 1996, Virology methods manual., *Academic press, London* . 3.3.3, 3.3.4
- Manza, L. L., Stamer, S. L., Ham, A.-J. L., Codreanu, S. G. and Liebler, D. C.: 2005, Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters., *Proteomics* **5**(7), 1742–1745. 4.1.3, 5.1.3

- Margadant, C., van den Bout, I., van Boxtel, A. L., Thijssen, V. L. and Sonnenberg, A.: 2012, Epigenetic regulation of galectin-3 expression by β 1 integrins promotes cell adhesion and migration., *J Biol Chem* **287**(53), 44684–44693. 5.3
- Marinari, E., Mehonic, A., Curran, S., Gale, J., Duke, T. and Baum, B.: 2012, Live-cell delamination counterbalances epithelial growth to limit tissue overcrowding., *Nature* **484**(7395), 542–545. 2.2.3
- Marouga, R., David, S. and Hawkins, E.: 2005, The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology., *Anal Bioanal Chem* **382**(3), 669–678. 2.3.4
- Mathias, R. A., Chen, Y.-S., Goode, R. J. A., Kapp, E. A., Mathivanan, S., Moritz, R. L., Zhu, H.-J. and Simpson, R. J.: 2011, Tandem application of cationic colloidal silica and Triton X-114 for plasma membrane protein isolation and purification: Towards developing an MDCK protein database., *Proteomics* **11**(7), 1238–1253. 5.1.2, 5.1.3, 5.1.4
- Mathias, R. A., Chen, Y.-S., Wang, B., Ji, H., Kapp, E. A., Moritz, R. L., Zhu, H.-J. and Simpson, R. J.: 2010, Extracellular remodelling during oncogenic Ras-induced epithelial-mesenchymal transition facilitates MDCK cell migration., *J Proteome Res* **9**(2), 1007–1019. 2.2.3, 2.3, 5.3, 5.4, 6
- Mathias, R. A., Wang, B., Ji, H., Kapp, E. A., Moritz, R. L., Zhu, H.-J. and Simpson, R. J.: 2009, Secretome-based proteomic profiling of Ras-transformed MDCK cells reveals extracellular modulators of epithelial-mesenchymal transition., *J Proteome Res* **8**(6), 2827–2837. 2.2.3
- Matthiesen, R.: 2013, *Mass spectrometry data analysis in proteomics*, Vol. 2., Springer Protocols, Humana Press. (Autorenverbund). 2.3.2
- Maurer, T., Eiber, M. and Krause, B. J.: 2014, Molecular multimodal hybrid imaging in prostate and bladder cancer., *Urologe A* **53**(4), 469–483. 4.4, 5.4
- Medina, R. A. and García-Sastre, A.: 2011, Influenza A viruses: New research developments., *Nat Rev Microbiol* **9**(8), 590–603. 2.1.1, 2.1
- Meng, F., Cargile, B. J., Patrie, S. M., Johnson, J. R., McLoughlin, S. M. and Kelleher, N. L.: 2002, Processing complex mixtures of intact proteins for direct analysis by mass spectrometry., *Anal Chem* **74**(13), 2923–2929. 4.1.1
- Merten, O. W.: 2006, Introduction to animal cell culture technology – past, present and future., *Cytotechnology* **50**(1-3), 1–7. 2.2

- Merten, O.-W., Bakker, W. A., Vorlop, J., Reiter, M., Visnovsky, G., Jäger, V., Merabishvili, M. and Reichl, U.: 2014, *Industrial scale suspension crulture of living cells.*, number Kapitel 14, Wiley-VCH Verlag GmbH und Ca. KGaA, Weinheim. 2.2.3, 5.4
- Meyer, J. G., Kim, S., Maltby, D. A., Ghassemian, M., Bandeira, N. and Komives, E. A.: 2014, Expanding proteome coverage with orthogonal-specificity α -lytic proteases., *Mol Cell Proteomics* **13**(3), 823–835. 5.1.3
- Mitozo, P. A., de Souza, L. F., Loch-Neckel, G., Flesch, S., Maris, A. F., Figueiredo, C. P., Dos Santos, A. R. S., Farina, M. and Dafre, A. L.: 2011, A study of the relative importance of the peroxiredoxin-, catalase-, and glutathione-dependent systems in neural peroxide metabolism., *Free Radic Biol Med* **51**(1), 69–77. 5.5
- Mitulovic, G. and Mechtler, K.: 2006, HPLC techniques for proteomics analysis - a short overview of latest developments., *Brief Funct Genomic Proteomic* **5**(4), 249–260. 2.3.3
- Moche, M., Albrecht, D., Maaß, S., Hecker, M., Westermeier, R. and Büttner, K.: 2013, The new horizon in 2D electrophoresis: New technology to increase resolution and sensitivity., *Electrophoresis* **34**(11), 1510–1518. 2.3.3, 5.1.2
- Mulder, N. J., Kersey, P., Pruess, M. and Apweiler, R.: 2008, In silico characterization of proteins: UniProt, InterPro and Integr8., *Mol Biotechnol* **38**(2), 165–177. 2.3.5
- Neisch, A. L. and Fehon, R. G.: 2011, Ezrin, Radixin and Moesin: Key regulators of membrane-cortex interactions and signaling., *Curr Opin Cell Biol* **23**(4), 377–382. 5.6.1
- Nesvizhskii, A. I.: 2010, A survey of computational methods and error rate estimation procedures for peptide and protein identification in shotgun proteomics., *J Proteomics* **73**(11), 2092–2123. 2.3.5
- Ngoka, L. C. M.: 2008, Sample prep for proteomics of breast cancer: proteomics and gene ontology reveal dramatic differences in protein solubilization preferences of radioimmunoprecipitation assay and urea lysis buffers., *Proteome Sci* **6**, 30. 4.1.1
- O’Farrell, P. H.: 1975, High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins., *J Biol Chem* **250**(10), 4007–4021. 2.3.3
- Omeir, R. L., Teferedegne, B., Foseh, G. S., Beren, J. J., Snoy, P. J., Brinster, L. R., Cook, J. L., Peden, K. and Lewis, Jr, A. M.: 2011, Heterogeneity of the tumorigenic phenotype expressed by Madin-Darby canine kidney cells., *Comp Med* **61**(3), 243–250. 2.2.1, 2.2.3, 5.3, 5.4

- Ono, S.: 2013, The role of cyclase-associated protein in regulating actin filament dynamics - more than a monomer-sequestration factor., *J Cell Sci* **126**(Pt 15), 3249–3258. 5.4
- Orr, A. W., Pallero, M. A., Xiong, W.-C. and Murphy-Ullrich, J. E.: 2004, Thrombospondin induces RhoA inactivation through FAK-dependent signaling to stimulate focal adhesion disassembly., *J Biol Chem* **279**(47), 48983–48992. 5.4
- Ovádi, J. and Saks, V.: 2004, On the origin of intracellular compartmentation and organized metabolic systems., *Mol Cell Biochem* **256-257**(1-2), 5–12. 5.5
- Ozawa, M. and Muramatsu, T.: 1993, Reticulocalbin, a novel endoplasmic reticulum resident Ca(2+)-binding protein with multiple EF-hand motifs and a carboxyl-terminal HDEL sequence., *J Biol Chem* **268**(1), 699–705. 4.6.2, 5.6.2
- Pan, C., Kumar, C., Bohl, S., Klingmueller, U. and Mann, M.: 2009, Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions., *Mol Cell Proteomics* **8**(3), 443–450. 5.1.4
- Paoletti, A. C., Parmely, T. J., Tomomori-Sato, C., Sato, S., Zhu, D., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Florens, L. and Washburn, M. P.: 2006, Quantitative proteomic analysis of distinct mammalian mediator complexes using normalized spectral abundance factors., *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(50), 18928–18933. 2.3.4
- Peng, M., Taouatas, N., Cappadona, S., van Breukelen, B., Mohammed, S., Scholten, A. and Heck, A. J. R.: 2012, Protease bias in absolute protein quantitation., *Nat Methods* **9**(6), 524–525. 5.1.4
- Penque, D.: 2009, Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery., *Proteomics Clinical Applications* **3**(2), 155–172. 2.3.3
- Perinpanayagam, M. A., Beauchamp, E., Martin, D. D. O., Sim, J. Y. W., Yap, M. C. and Berthiaume, L. G.: 2013, Regulation of co- and post-translational myristoylation of proteins during apoptosis: Interplay of N-myristoyltransferases and caspases., *FASEB J* **27**(2), 811–821. 5.4
- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. and Cottrell, J. S.: 1999, Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data., *Electrophoresis* **20**(18), 3551–3567. 2.3.5, 3.4.4

- Peschel, B., Frentzel, S., Laske, T., Genzel, Y. and Reichl, U.: 2013, Comparison of influenza virus yields and apoptosis-induction in an adherent and a suspension MDCK cell line., *Vaccine* **31**(48), 5693–5699. 3.3.5, 3.4.7, 4.2.1, 5.2
- Pichon, S., Guinet-Morlot, F., Minutello, M., Donazzolo, Y., Rouzier, R., Chassard, D., Fitoussi, S. and Hou, V.: 2013, A serum-free, purified vero cell rabies vaccine is safe and as immunogenic as the reference vaccine Verorab for pre-exposure use in healthy adults: Results from a randomized controlled phase-II trial., *Vaccine* **31**(18), 2295–2301. 2.1.2
- Pickart, C. M. and Cohen, R. E.: 2004, Proteasomes and their kin: Proteases in the machine age., *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(3), 177–187. 5.5
- Radeva, M. Y., Kugelmann, D., Spindler, V. and Waschke, J.: 2014, PKA compartmentalization via AKAP220 and AKAP12 contributes to endothelial barrier regulation., *PLoS One* **9**(9), e106733. 5.4
- Reed, C., Meltzer, M. I., Finelli, L. and Fiore, A.: 2012, Public health impact of including two lineages of influenza B in a quadrivalent seasonal influenza vaccine., *Vaccine* **30**(11), 1993–1998. 2.1.1
- Rehberg, M., Ritter, J. B., Genzel, Y., Flockerzi, D. and Reichl, U.: 2013, The relation between growth phases, cell volume changes and metabolism of adherent cells during cultivation., *J Biotechnol* **164**(4), 489–499. 5.4
- Rehberg, M., Ritter, J. B. and Reichl, U.: 2014, Glycolysis is governed by growth regime and simple enzyme regulation in adherent MDCK cells., *PLoS Comput Biol* **10**(10), e1003885. 4.4
- Rode, C., Senkler, M., Klodmann, J., Winkelmann, T. and Braun, H.-P.: 2011, GelMap—a novel software tool for building and presenting proteome reference maps., *J Proteomics* **74**(10), 2214–2219. 4.1
- Rödig, J. V., Rapp, E., Bohne, J., Kampe, M., Kaffka, H., Bock, A., Genzel, Y. and Reichl, U.: 2013, Impact of cultivation conditions on N-glycosylation of influenza virus a hemagglutinin produced in MDCK cell culture., *Biotechnol Bioeng* **110**(6), 1691–1703. 5.5
- Rosenblatt, J., Raff, M. C. and Cramer, L. P.: 2001, An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism., *Curr Biol* **11**(23), 1847–1857. 2.2.3, 5.3

- Rourou, S., van der Ark, A., Majoul, S., Trabelsi, K., van der Velden, T. and Kallel, H.: 2009b, A novel animal-component-free medium for rabies virus production in Vero cells grown on Cytodex 1 microcarriers in a stirred bioreactor., *Appl Microbiol Biotechnol* **85**(1), 53–63. 3.2.1, 3.1, 5.2, 5.5
- Rourou, S., van der Ark, A., van der Velden, T. and Kallel, H.: 2007, A microcarrier cell culture process for propagating rabies virus in Vero cells grown in a stirred bioreactor under fully animal component free conditions., *Vaccine* **25**(19), 3879–3889. 3.2.1, 3.2.6, 5.2
- Rourou, S., van der Ark, A., van der Velden, T. and Kallel, H.: 2009a, Development of an animal-component free medium for vero cells culture., *Biotechnol Prog* **25**(6), 1752–1761. 3.2.1, 3.1, 3.2.6
- Rozek, W., Kwasnik, M. and Zmudzinski, J. F.: 2013, Protein expression changes in cells inoculated with equine influenza virus: Antibody microarray analysis., *Pol J Vet Sci* **16**(4), 663–669. 2.2.4
- Rupprecht, C. E., Hanlon, C. A. and Hemachudha, T.: 2002, Rabies re-examined., *Lancet Infect Dis* **2**(6), 327–343. 2.1
- Sagara, J., Tsukita, S., Yonemura, S., Tsukita, S. and Kawai, A.: 1995, Cellular actin-binding ezrin-radixin-moesin (ERM) family proteins are incorporated into the rabies virion and closely associated with viral envelope proteins in the cell., *Virology* **206**(1), 485–494. 5.6.1
- Saletta, F., Suryo Rahmanto, Y. and Richardson, D. R.: 2010, The translational regulator eIF3a: The tricky eIF3 subunit!, *Biochim Biophys Acta* **1806**(2), 275–286. 5.3
- Saltzman, W. M., Mahoney, M. J. and University, C.: 2000, *Cell structure and motion, extracellular matrix and cell adhesion.*, John Wiley & Sons, USA. 2.2.3
- Sanchez-Ruderisch, H., Detjen, K. M., Welzel, M., André, S., Fischer, C., Gabius, H.-J. and Rosewicz, S.: 2011, Galectin-1 sensitizes carcinoma cells to anoikis via the fibronectin receptor $\alpha 5 \beta 1$ -integrin., *Cell Death Differ* **18**(5), 806–816. 5.3
- Sann, H., Bock, A. and Reichl, U.: 2004, Device and method for extracting liquid samples. 3.2.4
- Schäfer, B. W. and Heizmann, C. W.: 1996, The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology., *Trends Biochem Sci* **21**(4), 134–140. 4.6.2, 5.6.2
- Scharfenberg, K. and Wagner, R.: 1995, A reliable strategy for the achievement of cell lines growing in protein-free medium, *ESACT/ JAACT Animal cell technology* pp. 619 – 623. 5.3

- Schnell, M. J., McGettigan, J. P., Wirblich, C. and Papaneri, A.: 2010, The cell biology of rabies virus: Using stealth to reach the brain., *Nat Rev Microbiol* **8**(1), 51–61. 2.2.4
- Schoenenberger, C. A., Zuk, A., Kendall, D. and Matlin, K. S.: 1991, Multilayering and loss of apical polarity in MDCK cells transformed with viral K-ras., *J Cell Biol* **112**(5), 873–889. 1, 2.2.3
- Schulze-Horsel, J., Genzel, Y. and Reichl, U.: 2008, Flow cytometric monitoring of influenza A virus infection in MDCK cells during vaccine production., *BMC Biotechnol* **8**, 45. 3.3.5, 5.2
- Schulze-Horsel, J., Schulze, M., Agalaridis, G., Genzel, Y. and Reichl, U.: 2009, Infection dynamics and virus-induced apoptosis in cell culture-based influenza vaccine production-Flow cytometry and mathematical modeling., *Vaccine* **27**(20), 2712–2722. 3.4.7
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W. and Selbach, M.: 2011, Global quantification of mammalian gene expression control., *Nature* **473**(7347), 337–342. 5.1.2
- Schwartz, R., Berry, J. M., Subramanian, A. and Shi, X.: 2012, Non-tumorigenic MDCK cell line for propagating viruses. 5.3
- Scott, L. J., Carter, N. J. and Curran, M. P.: 2012, Live attenuated influenza vaccine (Fluenz): A guide to its use in the prevention of seasonal influenza in children in the EU., *Paediatr Drugs* **14**(4), 271–279. 2.1.1
- Seitz, C., Frensing, T., Höper, D., Kochs, G. and Reichl, U.: 2010, High yields of influenza A virus in Madin-Darby canine kidney cells are promoted by an insufficient interferon-induced antiviral state., *J Gen Virol* **91**(Pt 7), 1754–1763. 3.4.7, 4.6.1, 6
- Seitz, C., Isken, B., Heynisch, B., Rettkowski, M., Frensing, T. and Reichl, U.: 2012, Trypsin promotes efficient influenza vaccine production in MDCK cells by interfering with the antiviral host response., *Appl Microbiol Biotechnol* **93**(2), 601–611. 4.6.1, 5.2, 5.6.1
- Semenza, G. L.: 2007, HIF-1 mediates the Warburg effect in clear cell renal carcinoma., *J Bioenerg Biomembr* **39**(3), 231–234. 5.4
- Sengupta, T. K., Bandyopadhyay, S., Fernandes, D. J. and Spicer, E. K.: 2004, Identification of nucleolin as an AU-rich element binding protein involved in bcl-2 mRNA stabilization., *J Biol Chem* **279**(12), 10855–10863. 4.11, 5.6.1, 6
- Senkler, M. and Braun, H.-P.: 2012, Functional Annotation of 2D Protein Maps: The GelMap Portal., *Front Plant Sci* **3**, 87. 5.1.2

- Shenoy, N., Kessel, R., Bhagat, T. D., Bhattacharyya, S., Yu, Y., McMahon, C. and Verma, A.: 2012, Alterations in the ribosomal machinery in cancer and hematologic disorders., *J Hematol Oncol* **5**, 32. 5.4
- Simonsen, L., Viboud, C., Taylor, R. J. and Miller, M. A.: 2011, *Part 1 Evolution and epidemiology - Influenza virus: The Biology of a changing virus.*, Vol. 2., Birkhäuser advances in infectious diseases, Basel. 2.1.1
- Sinacore, Martin S. und Drapeau, D. and Adamson, S.: 2000, Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media., *Molecular Biotechnology* **15**, 249–257. 2.2.3
- Smith, J. S., Yager, P. A. and Baer, G. M.: 1973, A rapid tissue culture test for determining rabies neutralizing antibody., *Monogr Ser World Health Organ* (23), 354–357. 3.3.4
- Snyers, L., Umlauf, E. and Prohaska, R.: 1999, Association of stomatin with lipid-protein complexes in the plasma membrane and the endocytic compartment., *Eur J Cell Biol* **78**(11), 802–812. 5.4
- Subbarao, K. and Katz, J.: 2004, *Influenza vaccines generated by reverse genetics.*, Springer, Heidelberg. 2.1.1
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J. and Holle, A.: 2003, A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics., *Anal Bioanal Chem* **376**(7), 952–965. 3.4.4
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Minguetz, P., Doerks, T., Stark, M., Muller, J., Bork, P., Jensen, L. J. and von Mering, C.: 2011, The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored., *Nucleic Acids Res* **39**(Database issue), D561–D568. 2.3.5
- Tan, C. W., Gardiner, B. S., Hirokawa, Y., Layton, M. J., Smith, D. W. and Burgess, A. W.: 2012, Wnt signalling pathway parameters for mammalian cells., *PLoS One* **7**(2), e31882. 5.1.1, 5.1
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. and Matsuo, T.: 1988, Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2**(8), 151–153. 2.3.1
- Tang, B. L. and Ng, E. L.: 2009, Rabs and cancer cell motility., *Cell Motil Cytoskeleton* **66**(7), 365–370. 5.4

- Tauro, B. J., Mathias, R. A., Greening, D. W., Gopal, S. K., Ji, H., Kapp, E. A., Coleman, B. M., Hill, A. F., Kusebauch, U., Hallows, J. L., Shteynberg, D., Moritz, R. L., Zhu, H.-J. and Simpson, R. J.: 2013, Oncogenic H-ras reprograms Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell-derived exosomal proteins following epithelial-mesenchymal transition., *Mol Cell Proteomics* **12**(8), 2148–2159. 5.1.2, 5.1.3
- Tew, K. D., Manevich, Y., Grek, C., Xiong, Y., Uys, J. and Townsend, D. M.: 2011, The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer., *Free Radic Biol Med* **51**(2), 299–313. 5.5
- Tharmalingam, T. and Goudar, C. T.: 2014, Evaluating the impact of high Pluronic®F68 concentrations on antibody producing CHO cell lines., *Biotechnol Bioeng* . 5.1.3
- Thiede, B., Koehler, C. J., Strozynski, M., Treumann, A., Stein, R., Zimny-Arndt, U., Schmid, M. and Jungblut, P. R.: 2013, High resolution quantitative proteomics of HeLa cells protein species using stable isotope labeling with amino acids in cell culture(SILAC), two-dimensional gel electrophoresis(2DE) and nano-liquid chromatography coupled to an LTQ-OrbitrapMass spectrometer., *Mol Cell Proteomics* **12**(2), 529–538. 2.3.4, 5.1.2
- Trabelsi, K., Rourou, S., Loukil, H., Majoul, S. and Kallel, H.: 2006, Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in a bioreactor., *J Biotechnol* **121**(2), 261–271. 3.1, 3.2.6, 5.2, 6
- Trinh, H. V., Grossmann, J., Gehrig, P., Roschitzki, B., Schlapbach, R., Greber, U. F. and Hemmi, S.: 2013, iTRAQ-Based and Label-Free Proteomics Approaches for Studies of Human Adenovirus Infections., *Int J Proteomics* **2013**, 581862. 2.3.5
- Tsai, P.-L., Chiou, N.-T., Kuss, S., García-Sastre, A., Lynch, K. W. and Fontoura, B. M. A.: 2013, Cellular RNA binding proteins NS1-BP and hnRNP K regulate influenza A virus RNA splicing., *PLoS Pathog* **9**(6), e1003460. 5.6.1
- Tsao, Y.-S. and Gould, S. L.: 2000, *Animal cell culture media.*, John Wiley & Sons, USA. 2.2.2
- Tsutsumi, R., Fujisaki, S., Shozushima, M., Saito, K. and Sato, S.: 2006, Anoikis-resistant MDCK cells carrying susceptibilities to TNF-alpha and verotoxin that are suitable for influenza virus cultivation., *Cytotechnology* **52**(2), 71–85. 1, 2.2.3
- Twyman, R. M.: 2004, *Principles of proteomics.*, Advanced text, Garland science/BIOS scientific Publishers. 2.3.3

- Underwood, P. A. and Bennett, F. A.: 1989, A comparison of the biological activities of the cell-adhesive proteins vitronectin and fibronectin., *J Cell Sci* **93** (Pt 4), 641–649. 5.3
- Unlü, M., Morgan, M. E. and Minden, J. S.: 1997, Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts., *Electrophoresis* **18**(11), 2071–2077. 2.3.4, 3.4.6, 5.1.2
- van Deemter, J., Zuiderweg, F. and Klinkenberg, A.: 1956, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography., *Chem Eng Sci* **5**, 271 – 289. 2.3.3
- van den Brûle, F. A., Price, J., Sobel, M. E., Lambotte, R. and Castronovo, V.: 1994, Inverse expression of two laminin binding proteins, 67LR and galectin-3, correlates with the invasive phenotype of trophoblastic tissue., *Biochem Biophys Res Commun* **201**(1), 388–393. 5.3
- van der Valk, J., Brunner, D., Smet, K. D., Svenningsen, A. F., Honegger, P., Knudsen, L., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M. and Gstraunthaler, G.: 2010, Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods, *Toxicology in Vitro* **24**(4), 1053 – 1063. 2.2.2
- van der Valk, J., Mellor, D., Brands, R., Fischer, R., Gruber, F., Gstraunthaler, G., Hellebrekers, L., Hyllner, J., Jonker, F., Prieto, P., Thalen, M. and Baumans, V.: 2004, The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture., *Toxicology in Vitro* **18**(1), 1 – 12. 2.2.2
- van Diepen, A., Brand, H. K., Sama, I., Lambooy, L. H. J., van den Heuvel, L. P., van der Well, L., Huynen, M., Osterhaus, A. D. M. E., Andeweg, A. C. and Hermans, P. W. M.: 2010, Quantitative proteome profiling of respiratory virus-infected lung epithelial cells., *J Proteomics* **73**(9), 1680–1693. 5.6.1
- van Wenzel, A.: 1973, *Tissue culture: Methods and Applications*, number Kapitel 7.2, Academic Press, New York. 2.2.3, 5.4
- van Wielink, R., Kant-Eenberg, H. C. M., Harmsen, M. M., Martens, D. E., Wijffels, R. H. and Coco-Martin, J. M.: 2011, Adaptation of a Madin-Darby canine kidney cell line to suspension growth in serum-free media and comparison of its ability to produce avian influenza virus to Vero and BHK21 cell lines., *J Virol Methods* **171**(1), 53–60. 1, 2.2.3, 5.3
- van Zon, A., Mossink, M. H., Houtsmuller, A. B., Schoester, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Sonneveld, P. and Wiemer, E. A. C.: 2006, Vault mobility depends in part on microtubules and vaults can be recruited to the nuclear envelope., *Exp Cell Res* **312**(3), 245–255. 5.5

- Vandermarliere, E., Mueller, M. and Martens, L.: 2013, Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics., *Mass Spectrom Rev* **32**(6), 453–465. 2.3.2
- Vaudel, M., Barsnes, H., Berven, F. S., Sickmann, A. and Martens, L.: 2011, SearchGUI: An open-source graphical user interface for simultaneous OMSSA and X!Tandem searches., *Proteomics* **11**(5), 996–999. 2.3.5, 3.4.5
- Vester, D., Rapp, E., Gade, D., Genzel, Y. and Reichl, U.: 2009, Quantitative analysis of cellular proteome alterations in human influenza A virus-infected mammalian cell lines., *Proteomics* **9**(12), 3316–3327. 3.5, 3.4.3, 3.4.4, 3.4.5, 4.2.1, 4.6.1, 4.6.1, 5.6.1
- Vester, D., Rapp, E., Kluge, S., Genzel, Y. and Reichl, U.: 2010, Virus-host cell interactions in vaccine production cell lines infected with different human influenza A virus variants: A proteomic approach., *J Proteomics* **73**(9), 1656–1669. 4.6.1, 4.6.1, 5.6.1
- Volpe, P. and Eremenko-Volpe, T.: 1970, Quantitative studies on cell proteins in suspension cultures., *Eur J Biochem* **12**(1), 195–200. 5.1
- von Magnus, P.: 1951, Propagation of the PR8 strain of influenza A virus in chick embryos. III. Properties of the incomplete virus produced in serial passages of undiluted virus., *Acta Pathol Microbiol Scand* **29**(2), 157–181. 5.2
- Wang, X., Zhang, S., Sun, C., Yuan, Z.-G., Wu, X., Wang, D., Ding, Z. and Hu, R.: 2011, Proteomic profiles of mouse neuro N2a cells infected with variant virulence of rabies viruses., *J Microbiol Biotechnol* **21**(4), 366–373. 5.6.2
- Warner, J. R. and McIntosh, K. B.: 2009, How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins?, *Mol Cell* **34**(1), 3–11. 5.4
- Weidle, U. H., Eggle, D. and Klostermann, S.: 2009, L1-CAM as a target for treatment of cancer with monoclonal antibodies., *Anticancer Res* **29**(12), 4919–4931. 5.3
- Weiss, R., Tendeloo, V. V., Scheiblhofer, S. and Thalhamer, J.: 2012, *General mechanisms of gene vaccines*, Springer-Verlag/Wien, Wien. 2.1
- Wellmitz, J.: 2005, *Leitlinie zur Methodvalidierung*, Umweltbundesamt. 5.1.2
- Wheeler, D. L., Barrett, T., Benson, D. A., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D. M., DiCuccio, M., Edgar, R., Federhen, S., Geer, L. Y., Helmberg, W., Kapustin, Y., Kenton, D. L., Khovayko, O., Lipman, D. J., Madden, T. L., Maglott, D. R., Ostell, J., Pruitt, K. D., Schuler, G. D., Schriml, L. M., Sequeira, E., Sherry, S. T., Sirotkin, K., Souvorov, A.,

- Starchenko, G., Suzek, T. O., Tatusov, R., Tatusova, T. A., Wagner, L. and Yaschenko, E.: 2006, Database resources of the National Center for Biotechnology Information., *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue), D173–D180. 2.3.5
- Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M. and Fenn, J. B.: 1985, Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers., *Anal Chem* **57**(3), 675–679. 2.3.1
- WHO: 1995, Cell culture as a substrate for the production of influenza vaccines: Memorandum from a WHO meeting., *Bull World Health Organ* **73**(4), 431–435. 2.2.1
- WHO: 2009, Influenza (seasonal)., Internet. Merkblatt Nr. 211.
URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html> 2.1
- Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T. and Mann, M.: 1996, Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry., *Nature* **379**(6564), 466–469. 2.3.3
- Wise, H. M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R. M., Patel, S., Howard, W., Anderson, E. C., Barclay, W. S. and Digard, P.: 2009, A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA., *J Virol* **83**(16), 8021–8031. 2.1
- Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N. and Mann, M.: 2009, Universal sample preparation method for proteome analysis., *Nat Methods* **6**(5), 359–362. 3.4.3, 4.1.3, 5.1.3
- Wright, E. P., Prasad, K. A. G., Padula, M. P. and Coorsen, J. R.: 2014, Deep imaging: How much of the proteome does current top-down technology already resolve?, *PLoS One* **9**(1), e86058. 5.1.4
- Wu, X., Smith, T. G. and Rupprecht, C. E.: 2011, From brain passage to cell adaptation: The road of human rabies vaccine development., *Expert Rev Vaccines* **10**(11), 1597–1608. 2.1.2
- Xiao, Z., Ko, H. L., Goh, E. H., Wang, B. and Ren, E. C.: 2013, hnRNP K suppresses apoptosis independent of p53 status by maintaining high levels of endogenous caspase inhibitors., *Carcinogenesis* **34**(7), 1458–1467. 5.6.1
- Xing, H., Zhang, S., Weinheimer, C., Kovacs, A. and Muslin, A. J.: 2000, 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades., *EMBO J* **19**(3), 349–358. 5.6.2
- Xu, K., Klenk, C., Liu, B., Keiner, B., Cheng, J., Zheng, B.-J., Li, L., Han, Q., Wang, C., Li, T., Chen, Z., Shu, Y., Liu, J., Klenk, H.-D. and Sun, B.: 2011, Modification of nonstructural protein 1 of influenza A virus by SUMO1., *J Virol* **85**(2), 1086–1098. 5.6.1

- Yang, W., Qu, S., Liu, Q. and Zheng, C.: 2009, Avian influenza virus A/chicken/Hubei/489/2004 (H5N1) induces caspase-dependent apoptosis in a cell-specific manner., *Mol Cell Biochem* **332**(1-2), 233–241. 2.2.4
- Yang, Y., Kang, P., Gao, J., Xu, C., Wang, S., Jin, H., Li, Y., Liu, W. and Wu, X.: 2014, AU-binding factor 1 expression was correlated with metadherin expression and progression of hepatocellular carcinoma., *Tumour Biol* **35**(3), 2747–2751. 5.3
- Yang, Y., Thannhauser, T. W., Li, L. and Zhang, S.: 2007, Development of an integrated approach for evaluation of 2-D gel image analysis: impact of multiple proteins in single spots on comparative proteomics in conventional 2-D gel/MALDI workflow., *Electrophoresis* **28**(12), 2080–2094. 2.3.4
- Yu, Y.-Q., Gilar, M., Lee, P. J., Bouvier, E. S. P. and Gebler, J. C.: 2003, Enzyme-friendly, mass spectrometry-compatible surfactant for in-solution enzymatic digestion of proteins., *Anal Chem* **75**(21), 6023–6028. 4.1.1
- Zhang, C., Wu, Y., Xuan, Z., Zhang, S., Wang, X., Hao, Y., Wu, J. and Zhang, S.: 2014, p38MAPK, Rho/ROCK and PKC pathways are involved in influenza-induced cytoskeletal rearrangement and hyperpermeability in PMVEC via phosphorylating ERM., *Virus Res* **192**, 6–15. 5.6.1
- Zhao, J., Meyerkord, C. L., Du, Y., Khuri, F. R. and Fu, H.: 2011, 14-3-3 proteins as potential therapeutic targets., *Semin Cell Dev Biol* **22**(7), 705–712. 4.6.2, 5.6.2
- Zhao, W., Kruse, J.-P., Tang, Y., Jung, S. Y., Qin, J. and Gu, W.: 2008, Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1., *Nature* **451**(7178), 587–590. 5.4
- Zhirnov, O. P., Konakova, T. E., Garten, W. and Klenk, H.: 1999, Caspase-dependent N-terminal cleavage of influenza virus nucleocapsid protein in infected cells., *J Virol* **73**(12), 10158–10163. 5.6.1
- Zhirnov, O. P., Konakova, T. E., Wolff, T. and Klenk, H.-D.: 2002, NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis., *J Virol* **76**(4), 1617–1625. 5.6.1
- Zhou, Y., Frey, T. K. and Yang, J. J.: 2009, Viral calciomics: Interplays between Ca²⁺ and virus., *Cell Calcium* **46**(1), 1–17. 5.6.2
- Zhu, L., Wada, M., Usagawa, Y., Yasukochi, Y., Yokoyama, A., Wada, N., Sakamoto, M., Maekawa, T., Miyazaki, R., Yonenaga, E., Kiyomatsu, M., Murata, M. and Furue, M.: 2013,

Overexpression of cathepsin D in malignant melanoma., *Fukuoka Igaku Zasshi* **104**(10), 370–375. 5.3

Zubarev, R. A. and Makarov, A.: 2013, Orbitrap mass spectrometry., *Anal Chem* **85**(11), 5288–5296. 2.3.1

Abbildungsverzeichnis

2.1. Aufbau von Massenspektrometern.	15
2.2. Strukturformel von α -Cyano-4-hydroxymizimsäure.	16
2.3. Peptidfragmentierung.	20
2.4. Spektrum der Trennmethoden für Biomoleküle.	22
2.5. Theoretischen Auftrennung von Proteinen der Art <i>Canis familiaris</i> nach pI und MW.	24
2.6. Prinzip der LF-Quantifizierung.	26
3.1. Schema des Adaptionsprozesses einer MDCK _{ADH} Zelllinie an Suspensionswachstum in CDM.	38
3.2. Versuchsaufbau für den Vergleich von MDCK _{ADH} und MDCK _{SUS} während der Wachstumsphase.	40
3.3. Versuchsaufbau für den Vergleich der Virusinfektion mit der Scheininfektion für VerO _{IPT-AFM} und VerO _{SCM/SFM} Zelllinien.	43
4.1. Effizienz verschiedener Lysepuffer für den Zellaufschluss.	66
4.2. Vergleich der Gelbilder nach Verkleinerung des pH-Bereiches der Proteinauftrennung mittels IEF.	69
4.3. Vergleich der Gelbilder nach einer vertikalen und einer horizontalen 2-D PAGE.	69
4.4. Vergleich der Gelbilder nach 2-D PAGE eines Vero und MDCK Zellproteoms.	71
4.5. Funktionelle Klassifizierung der identifizierten Proteine auf den Gelkarten.	72
4.6. Verteilung der Anzahl detektierter Proteinisoformen auf der Gelkarte der MDCK Zelladaptation.	72
4.7. Streudiagramm der gemessenen Proteinintensitäten $I_{g_j,F}(x_i)$ für die mit Dye 1 und Dye 2 gefärbten Spots.	73
4.8. Verteilung der detektierten Proteinspots einer 2-D PAGE über die prozentuale Abweichung der normalisierten Proteinintensität.	74
4.9. Verteilung der p-Werte des Shapiro-Wilk-Tests der gemessenen Daten I_{Norm} des Proteoms von MDCK _{SUS} Zellen.	76
4.10. Verteilung der p-Werte des Levene-Tests der gemessenen Daten I_{Norm} während der MDCK Zelladaptation.	77

4.11. Qualitätskontrolle mittels monolithischer Auftrennung von tryptisch gespaltenen Proteinlysaten.	78
4.12. Optimierung der tryptischen Spaltung zellulärer Proteinlysate.	79
4.13. Qualitätskontrolle mittels nano-HPLC Auftrennung von tryptisch gespaltenen Proteinlysaten.	81
4.14. Anzahl identifizierter Peptide und Proteine der LC-MS/MS-Läufe.	82
4.15. Übereinstimmung detektierter Proteine bei LC-MS-Messungen der MDCK _{ADH} und MDCK _{SUS} Zelllinie.	82
4.16. Übereinstimmung aller identifizierten und quantifizierten Proteine für MDCK _{ADH} und MDCK _{SUS} Zellen.	83
4.17. Verteilung der Proteine über die Anzahl spezifischer Peptide für die Quantifizierung.	83
4.18. Zellkonzentration und Influenzavirusvermehrung in 250 mL Spinner ^{PA} -Kultivierungen von MDCK _{ADH} und MDCK _{SUS} Zellen.	85
4.19. Zellkonzentration und Tollwutvirusvermehrung in Vero Zellen kultiviert im 2 L Bioreaktor.	87
4.20. Differenziell exprimierte Proteine der drei Stadienvergleiche: AC versus CL, AC versus DC, AC versus SC.	95
4.21. Western Blot Analyse zweier repräsentativer Proteine während der MDCK-Zelladaption.	97
4.22. Expression der Proteinspots mit signifikant verändertem $Z(x_i)$ während der Adaption an Wachstum in Suspension.	97
4.23. Zellkonzentration und Vitalität der MDCK _{SUS} Zellkultivierung im Spinner _{PA}	98
4.24. Glucose- und Lactatkonzentration während der Kultivierung der MDCK _{SUS} Zelllinie im Spinner _{PA}	99
4.25. Glutamin-, Glutamat- und Ammoniumkonzentration während der Kultivierung der MDCK _{SUS} Zelllinie im Spinner _{PA}	99
4.26. Western Blot Analyse zweier repräsentativer Proteine für den Vergleich der MDCK-Zelllinien.	104
4.27. Funktionelle Klassifizierung der differenziell exprimierten Proteine nach LF-Quantifizierung.	105
4.28. Differenziell exprimierte Proteine im Stoffwechsel und der Genexpression für den Vergleich von MDCK _{ADH} und MDCK _{SUS} Zellen.	106
4.29. Veränderte zelluläre Proteinexpression von scheininfizierten Vero Zellen während der Kultivierung in SCM/SFM und IPT-AFM.	115

4.30. Relative Induktion von Mx1 während der Influenzavirusinfektion zum Zeitpunkt 12 h p.i. für MDCK Zelllinien analysiert mit RT-pPCR.	117
4.31. Differenziell exprimierte Proteinspots für den Vergleich der Schein- mit der Virusinfektion zum Zeitpunkt 8 h p.i. für MDCK Zellen.	119
4.32. Funktionelle Klassifizierung differenziell exprimierter Proteine mit abnehmender Expression nach Influenzavirusinfektion zum Zeitpunkt 32 h p.i. für MDCK Zelllinien.	122
4.33. Differenziell exprimierte Proteinspots der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine im Vergleich der Schein- und Virusinfektion zum Zeitpunkt 32 h p.i. für MDCK Zellen.	123
4.34. Funktionelle Klassifizierung der signifikant differenziell exprimierten Proteine während der Tollwutinfektion von Vero Zellen im 2L-BR.	129

Tabellenverzeichnis

2.1. Fakten zum Influenza- und Tollwutvirus.	5
2.2. Inflenzavirusausbeuten kontinuierlicher Zelllinien.	7
2.3. Molekulare Mechanismen der MDCK Zelllinie während epithelial-mesenchymaler Transition	13
2.4. UniProt KB Datenbankeinträge für <i>Canis familiaris</i> und ihre Nachweisebene. . .	28
3.1. Verwendete Medien.	36
3.2. Kultivierungssysteme.	37
3.3. Stadien des Adaptionsprozesses einer MDCK _{ADH} Zelllinie an Suspensionswachstum in CDM.	39
3.4. Kultivierungsbedingungen im 1L-BR unter Anwendung des DasGip-Systems. . .	39
3.5. Durchgeführte Infektionsbedingungen im Vergleich zur Standardinfektion der MDCK Zelllinien mit Inflenzaviren.	41
3.6. Validierte Messbereiche und relative Standardabweichungen des Enzymsensors Bioprofile 100 Plus.	44
3.7. Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Methoden zur Proteomanalytik. .	48
3.8. Probenahme.	49
3.9. Probenvorbereitung für die Proteinquantifizierung.	50
3.10. Sequenz für die isoelektrische Fokussierung präparativer Gele.	51
3.11. Sequenz für die isoelektrische Fokussierung für analytischer Gele.	52
3.12. Zusammensetzung 12%-iger Polyacrylamidgele für die vertikale 2-D SDS-PAGE.	53
3.13. Protokolle für die Optimierung des in-Lösungs Verdau.	55
3.14. 2-D DIGE Extinktions- und Emissionseinstellungen am Typhoon Scanner. . . .	60
3.15. Arbeitsschritte in Delta2D.	60
3.16. Signifikanztests für differenzielle Proteinexpression.	63
3.17. Antikörper für die Western Blot Analytik.	64
4.1. Übersicht der Proteinidentifikationen der verschiedenen Projekte.	70
4.2. Anzahl differenziell exprimierter Proteinspots im Verlauf der Zelladaption. . . .	90
4.3. Differenziell exprimierte Proteine zwischen den Stadien SC der Adaption 1 und 2.	91
4.4. Regulierte zelluläre Prozesse nach Serumentzug.	93

4.5. Differenziell exprimierte Proteine im Vergleich der MDCK _{ADH} und MDCK _{SUS} Zellen detektiert mit 2-D DIGE.	101
4.6. Differenziell exprimierte Proteine der Signaltransduktion für den Vergleich von MDCK _{ADH} und MDCK _{SUS} Zellen.	107
4.7. Differenziell exprimierte Membranproteine für den Vergleich von MDCK _{ADH} und MDCK _{SUS} Zellen.	108
4.8. Veränderte zelluläre Proteinexpression von scheininfizierten Vero Zellen während der Kultivierung in SCM/SFM und IPT-AFM.	112
4.9. Proteine mit gesteigerter Expression 32 h p.i. für die influenzainfizierte MDCK _{ADH} Zelllinie.	120
4.10. Proteine mit gesteigerter Expression 32 h p.i. für die influenzainfizierte MDCK _{SUS} Zelllinie.	120
4.11. Apoptotische Proteine mit differenzieller Expression 32 h p.i. in influenzainfizierten MDCK _{ADH} und MDCK _{SUS} Zelllinien.	125
4.12. Virusinduzierte Proteinexpression in Vero Zellen kultiviert im 2L-BR nach Tollwutinfektion.	127
5.1. Proteingehalt verschiedener Säugerzellen.	133
5.2. Ergebnisgegenüberstellung der 2-D DIGE und der LF-Proteomanalytik.	136

Anhang

A. Zusatzmaterial

A.1. Versuchsaufbau für die 2-D DIGE Analytik

Aufgelistet sind die Poolzusammensetzungen des internen Standards (Dye 2) als Grundlage für den Vergleich analytischer Gele (Abschnitt 3.4.6). Die Vergleichsebenen sind gelistet. Weiterhin ist die Herstellung der präparativen Gele für die Proteinidentifizierung aufgeführt (Vgl. auch Tab. 4.1). Die biologischen Replikaten (BR) sind für jedes Projekt durchnummeriert.

Projekt	Interner Standard (Vergleichsebenen)	Präparative Gele
MDCK Influenza		
Zelladaption	a) Adaption 1: alle Stadien BR1 und BR2 b) Adaption 2: alle Stadien BR3 und BR4 c) SC-Stadium Adaption 1 und 2	MDCK Zelladaption
Zelllinien- vergleich	a) BR1, BR2 und BR3 der MDCK _{ADH} und MDCK _{SUS} Zelllinien	MDCK _{ADH} , MDCK _{SUS}
MDCK _{ADH} Influenza- replikation	a) 0 h p.i.: Mock- und Virusinfektion von BR1, BR2 und BR3 b) 8 h p.i.: Mock- und Virusinfektion von BR1, BR2 und BR3 c) 32 h p.i.: Mock- und Virusinfektion von BR1, BR2 und BR3	MDCK _{ADH} Influenzainfektion
MDCK _{SUS} Influenza- replikation	a) 0 h p.i.: Mock- und Virusinfektion von BR1, BR2 und BR3 b) 8 h p.i.: Mock- und Virusinfektion von BR1, BR2 und BR3 c) 32 h p.i.: Mock- und Virusinfektion von BR1, BR2 und BR3	MDCK _{SUS} Influenzainfektion
Vero Tollwut		
Zelllinien- vergleich	a) 1 d p.i.: Mockinfektion von BR1 und BR2 der Vero _{SCM/SFM} und Vero _{IPT-AFM} Zelllinien b) 3 d p.i.: Mockinfektion von BR1 und BR2 der Vero _{SCM/SFM} und Vero _{IPT-AFM} Zelllinien b) 5 d p.i.: Mockinfektion von BR1 und BR2 der Vero _{SCM/SFM} und Vero _{IPT-AFM} Zelllinien	Vero Tollwutinfektion

	b) 8 d p.i.: Mockinfektion von BR1 und BR2 der Ver _{SCM/SFM} und Ver _{IPT-AFM} Zelllinien	
<hr/>		
Ver _{SCM/SFM} Tollwut- replikation	a) 1 d p.i.: Mock- und Virusinfektion von BR1 und BR2	Vero Tollwutinfektion
	b) 3 d p.i.: Mock- und Virusinfektion von BR1 und BR2	
	b) 5 d p.i.: Mock- und Virusinfektion von BR1 und BR2	
	b) 8 d p.i.: Mock- und Virusinfektion von BR1 und BR2	
<hr/>		
Ver _{IPT-AFM} Tollwut- replikation	a) 1 d p.i.: Mock- und Virusinfektion von BR1 und BR2	Vero Tollwutinfektion
	b) 3 d p.i.: Mock- und Virusinfektion von BR1 und BR2	
	b) 5 d p.i.: Mock- und Virusinfektion von BR1 und BR2	
	b) 8 d p.i.: Mock- und Virusinfektion von BR1 und BR2	

A.2. Übersicht aller identifizierten Proteine

Die folgenden Tabellen stellen eine Übersicht aller Proteinidentifikationen dar. Über den Gelspot sind die Daten mit den Proteinlisten im Hauptteil verknüpft. Für die Identifizierung wurde der Mascot-Suchalgorithmus verwendet. Die Spektrensuche ergab mit einer Bewertung (*score*) die Übereinstimmung mit einer Proteinsequenz in der NCBI nr oder UniProt KB Datenbank.

Zelladaption der MDCK_{ADH} Zellen (4.3): Gelkarte <https://gelmapp.de/228>

Gelspot	Eintrag	MW	pI	Mascot score	pt	Sequenz- abdeckung [%]	Identifizierte Proteine (Kurzform)	Funktionelle Klassifizierung
1	gi345784720	41	7	268	5	13,9	Acetyl-CoA acetyltransferase	Enzyme: Multifunctional
2	gi73953440	32,6	4,5	122,6	2	11,6	Nucleophosmin	Virus-Wirtzell-Interaktion
3	gi73996743	40,1	6,5	250,3	5	18,3	Twinfilin	Struktur
4	gi1149029725	15	4,7	227,3	5	40,4	Nascent-polypeptide	Regulation
5	gi57087181	37	6,3	311,4	6	22,8	26S proteasome	Proteasom
6	gi345794878	23	4,6	58,5	2	6,3	EIF	Proteinbiosynthese
7	gi57099501	37,5	6,8	276,3	8	25,8	Transaldolase	Metabolismus
8	gi57104538	25	4,6	177,2	3	13,4	Multivesicular body	Transport
9	gi73977271	32,3	6,5	121,8	4	17,6	PNP	Enzyme: Multifunctional
10	gi345802660	28,9	4,7	169,9	5	22,7	Tropomyosin	Struktur
11	gi345805375	43,9	5	524,6	10	29,1	Keratin	Struktur
12	gi345782656	29,1	5,4	345,4	6	29,5	Proteasome protein	Proteasom
13	gi60594411	22,537	5,33	70	3	21	Huntington interacting protein	Exocytosis
14	gi73986497	21,9	5,1	371,1	5	29,8	Peroxiredoxin 2	Stress
15	gi73983054	16,8	9,3	246,6	5	29,5	Cofilin	Regulation
16	gi56204523	14,8	4,7	55,5	2	14,8	Actin	Struktur
17	gi68299781	17,2	5,7	201,4	6	42,1	Nucleoside diphosphate kinase	Regulation
18	gi8699209	16,9	9,5	297	6	39,7	Cyclophilin	Proteinprozessierung
19	gi74009724	26	11,4	307,2	7	21,8	Peptidylprolyl isomerase	Proteinprozessierung
20	gi47523764	17,9	9,4	369,8	7	48,8	Peptidylprolyl isomerase	Proteinprozessierung
21	gi296209210	17,9	9,4	447,7	8	48,8	Peptidylprolyl isomerase	Proteinprozessierung

22	gi301792411	68,1	6,3	69,7	2	5,4	Actin	Struktur
23	gi114158648	94,3	5	244,2	6	9,3	HSP70	Stress
24	gi114158648	94,3	5	496,5	9	13,9	HSP70	Stress
25	gi345778472	80	4,8	394	8	13,1	HSP90	Stress
26	gi345806081	72,2	4,9	849,7	14	26,6	78 kDa glucose-regulated	Proteinprozessierung
27	gi73961895	20,5	4,4	213,9	3	17,4	Myosin	Struktur
28	gi73961895	20,5	4,4	229,9	4	28,7	Myosin	Struktur
29	gi356582227	37,4	6,8	57,2	2	4,2	Cathepsin L1	Proteolyse
30	gi50979090	21,1	4,6	387,8	8	43,9	Calcyphosin	Signaltransduktion
31	gi297699875	12,4	5	137,3	3	22,3	EIF	Proteinbiosynthese
32	gi119612724	30,3	4,7	56,5	2	9,6	Actin	Struktur
33	gi345802827	34,312	7,49	61	2	8	Cofilin	Regulation
34	gi66864897	20,1	5,6	598,7	12	58,9	Ferritin	Zellspeicher
35	gi297665953	22,7	6,8	175,6	3	13	Stathmin	Struktur
36	gi50978674	15,9	5,7	270,2	5	38,6	Superoxide dismutase	Stress
37	gi74746925	50,2	9,8	362,6	6	14,5	EF-1-alpha	Prozessierung genetischer Information
39	gi259490360	46,6	9,4	639	11	30,6	Serpin H1	Proteolyse
40	gi73987401	57,1	9,8	322,1	9	25,6	Polypyrimidine tract-binding protein	Prozessierung genetischer Information
41	gi73956307	69,71	9,89	75	5	5	Plasminogen	Regulation
42	gi57100553	35,9	4,8	568,4	12	40,8	Annexin A5	Annexin
43	gi148681465	26,9	4,9	271	8	33,5	EF hand domain	Prozessierung genetischer Information
44	gi57094359	27	5	254,1	6	19,9	Nuclear chloride ion channel 27	Kanal
45	gi74007756	25	4,9	350,2	7	29,1	UPF0368	Keine Zuordnung
46	gi345794439	27,8	4,5	456,8	11	33,9	14 3 3	Signaltransduktion
47	gi197097886	27,7	4,5	474,3	12	33,5	14 3 3	Signaltransduktion
48	gi50978820	37,25	6,8	50	2	8	Cathepsin L1	Proteolyse
49	gi345801243	37,4	9,8	423,9	10	29,3	14 3 3	Signaltransduktion
50	gi73963050	28,4	5,2	176,8	5	17,3	Proteasome protein	Proteasom

51	gi173963050	28,4	5,2	252,6	7	25,9	Proteasome protein	Proteasom
52	gi173981866	32,6	4,8	486,8	13	30,4	YWHAZ	Metabolismus
53	gi157110955	24,8	4,4	282,6	6	27,6	LOC478881	Keine Zuordnung
54	gi1114667511	58,2	5	486,5	9	18	Keratin	Struktur
55	gi157110955	24,8	4,4	237,8	4	21,8	LOC478881	Keine Zuordnung
56	gi173964747	23,4	5	547,2	10	37,7	Rho GDP dissociation inhibitor	Signaltransduktion
57	gi173947828	28,4	5,1	347	7	32,8	Calpain	Regulation
58	gi1345790427	37,7	5,7	105,7	4	9,4	Cathepsin B	Proteolyse
59	gi1114794484	20,6	5,1	110,1	4	16,1	Tumor Protein	Tumorprotein
60	gi1114558626	19,6	4,7	220,9	4	29,1	Tumor protein	Keine Zuordnung
61	gi1345778725	20,8	5,1	175,4	5	17,9	Lactylglutathione lyase	Metabolismus
62	gi173955410	25,5	4,75	77	2	8	Proteasome protein	Proteasom
63	gi1359320843	17,7	4,4	200,7	3	26,5	Clathrin	Transport
64	gi167464424	26,7	4,8	541,7	10	38,5	14 3 3	Signaltransduktion
65	gi158891281	12,7	4,8	100,4	3	34,3	Prostaglandin E synthase	Prozessierung genetischer Information
66	gi173967136	33,5	5,2	466,5	8	32,9	CG1532-PA	Keine Zuordnung
67	gi1356582227	37,4	6,8	274,2	4	21	Cathepsin L1	Proteolyse
68	gi150979116	22,9	6,3	126,8	2	16,7	HSP beta-1	Stress
69	gi157106504	21	5,2	191,9	4	32,3	Heme-binding	Regulation
70	gi173986497	21,9	5,1	397,4	6	40,4	Peroxiredoxin 2	Stress
71	gi173958708	33,7	4,9	55,4	2	3,2	Thiomorpholine-carboxylate DH	Regulation
72	gi1345801870	99,1	5,4	328,9	8	11,5	MVP	Transport
73	gi1345779526	28,9	4,9	132,1	3	8,4	LOC475115	Keine Zuordnung
74	gi157100553	35,9	4,8	640,5	9	34	Annexin A5	Annexin
75	gi173995897	24	4,8	198,9	4	17,8	GTPase-activating	Signaltransduktion
76	gi174007756	25	4,9	88	2	11,4	UPF0368	Keine Zuordnung
77	gi174011500	34	6,7	400,7	8	25,4	Uridine phosphorylase	Metabolismus
78	gi174011500	34	6,7	400,3	8	25,4	Uridine phosphorylase	Metabolismus
79	gi173999465	36,3	9,5	272,7	6	17	Proteasome protein	Proteasom
80	gi171043798	44,3	8,9	185,1	4	16,6	Cathepsin D	Proteolyse

81	gi 73974928	29,5	7,7	193,4	4	15,7	Proteasome protein	Proteasom
82	gi 345792633	28,8	6,8	467,7	8	34,6	Phosphoglycerate mutase	Metabolismus
83	gi 345792633	28,8	6,8	477,5	7	29,5	Phosphoglycerate mutase	Metabolismus
84	gi 223556019	29,2	6,8	320,3	7	27,3	Carbonic anhydrase	Regulation
85	gi 345792633	28,8	6,8	513,1	8	31,1	Phosphoglycerate mutase	Metabolismus
86	gi 345792633	28,8	6,8	286,9	5	22,8	Phosphoglycerate mutase	Metabolismus
87	gi 345792633	28,8	6,8	386,1	6	29,5	Phosphoglycerate mutase	Metabolismus
88	gi 57090119	25,2	9,8	162,2	3	18,3	Peptidylprolyl isomerase	Proteinprozessierung
89	gi 114667511	58,2	5	402,3	7	17,3	Keratin	Struktur
90	gi 73999070	62,8	10	356,6	8	15,5	Enoyl-CoA hydratase	Metabolismus
91	gi 255311816	24,8	7,9	483,1	7	35,7	Rangdp-Nup153znf3	Membran
92	gi 345804207	27,5	10,4	138,6	4	16,5	Cysteine-reich	Keine Zuordnung
93	gi 308082020	26,7	7,7	697,6	10	49	TIM	Metabolismus
94	gi 308082020	26,7	7,7	714,1	10	53,8	TIM	Metabolismus
95	gi 73975490	26,1	9,5	384,6	7	27,3	CCHCCH-containing	Struktur
96	gi 73975490	26,1	9,5	316,6	6	26,9	CCHCCH-containing	Struktur
97	gi 345791388	26,7	6,8	226,7	4	20,5	GST theta	Metabolismus
98	gi 73948324	22,1	7,9	491,2	9	62,1	Flavin reductase	Electronentransport
99	gi 73948324	22,1	7,9	480,5	9	62,1	Flavin reductase	Electronentransport
100	gi 56202552	17,5	9,6	81,6	2	16	Lysophospholipase	Metabolismus
101	gi 1709759	25,9	9,1	329,4	5	29,1	Proteasome protein	Proteasom
102	gi 345778889	25,7	9,6	375,2	8	27,8	GST A2	Metabolismus
103	gi 57094546	25,6	9,4	362,5	7	27,4	GST A3	Metabolismus
104	gi 345783025	23,5	6,4	425,9	6	36,2	GST P	Metabolismus
105	gi 345783696	37,2	6,7	243,8	6	25	GST P 1	Metabolismus
106	gi 73974057	26,4	8,8	374,9	9	41,5	Proteasome protein	Proteasom
107	gi 57094548	25,7	6,9	166,8	4	20,7	GST A4	Metabolismus
108	gi 73977959	22,1	9,2	400,7	6	33,7	Peroxioredoxin 1	Stress
109	gi 73977959	22,1	8,27	421	12	41	Peroxioredoxin 1	Stress
110	gi 345783257	106,3	5,6	328,2	12	14,7	Glucosidase	Proteinprozessierung
111	gi 114326321	20,9	7,8	371,9	6	48,7	Phosphatidylethanolamine-	Proteasom

112	gi14507357	22,377	8,41	67	3	17	binding protein	Regulation
113	gi1117386	20,1	6,9	286,1	6	32,6	Transgelin	Stress
114	gi1117386	20,1	6,9	444,4	8	31,4	Crystallin	Stress
115	gi21465643	25,8	7,7	246,9	5	27	20S proteasome	Proteasom
116	gi173992675	48,2	10,4	514,6	9	21,4	Proteasome protein	Proteasom
117	gi174000478	19,2	9,4	110,6	3	20,8	Peptidylprolyl isomerase	Proteinprozessierung
118	gi174000476	23,761	9,33	63	2	12	Peptidylprolyl isomerase	Proteinprozessierung
119	gi8699209	16,9	9,5	373,1	7	44,2	Cyclophilin	Proteinprozessierung
120	gi345802827	34,312	7,49	53	2	10	Cofilin	Regulation
121	gi173977271	32,3	6,5	136,3	2	13,1	PNP	Enzyme: Multifunctional
122	gi345793058	31,7	6,7	497	9	30,8	Syntenin	Struktur
123	gi173977271	32,3	6,5	293,1	7	24,2	PNP	Enzyme: Multifunctional
124	gi171043798	44,3	8,9	193,7	5	18,5	Cathepsin D	Proteolyse
125	gi173999070	62,8	10	294,2	6	15,5	Enoyl-CoA hydratase	Metabolismus
126	gi173949913	25,7	6,7	465,2	8	33,8	Adenylate kinase	Enzyme: Multifunctional
127	gi308082020	26,7	7,7	646,1	10	53,8	TIM	Metabolismus
128	gi110720404	32,3	9,2	511,2	8	26,7	Porin	Kanal
129	gi114326321	20,9	7,8	330,4	7	45,5	Phosphatidylethanolamine-binding protein	Proteasom
130	gi345802827	34,3	8,7	164,2	5	12,3	Cofilin	Regulation
131	gi174000677	57,8	9	635,9	10	26,4	Pyruvat kinase	Metabolismus
132	gi173947982	62,8	8,6	315,2	8	14,2	GPI	Metabolismus
133	gi57035983	54,9	8,6	148,1	2	5,2	Retinal DH	Stress
134	gi173947982	62,8	8,6	263,2	9	17,9	GPI	Metabolismus
135	gi57035983	54,9	8,6	507,9	9	23,8	Retinal DH	Stress
136	gi57035983	54,9	8,6	506,8	8	23,6	Retinal DH	Stress
137	gi57089039	54,4	9,6	170,4	4	14,2	Fumarate hydratase	Tumorsuppressor
138	gi359319162	76,7	10,6	183,7	4	6,3	Isocitrate DH	Metabolismus
139	gi345797138	44,7	8,9	130,8	5	15,2	Obg-like ATPase	Energiemetabolismus
140	gi174007807	44,4	9	659,7	10	29,3	PGK	Metabolismus

141	gi 73958481	39,5	9,2	565,1	10	33,2	FBA	Metabolismus
142	gi 73958481	39,5	9,2	626,1	10	33,5	FBA	Metabolismus
143	gi 73958481	39,5	9,2	707,2	11	33,8	FBA	Metabolismus
144	gi 73971560	35,7	9,2	492,1	7	19,5	Leukotriene B4 12-hydroxy-dehydrogenase	Leukotrienebiosynthese
145	gi 73971560	35,7	9,2	472	6	19,5	Leukotriene B4 12-hydroxy-dehydrogenase	Leukotrienebiosynthese
146	gi 50978862	35,8	9	712,9	14	28,8	GAP	Metabolismus
147	gi 344270293	38,8	9,6	426	10	28,8	HNRP A2/B1	RNA Prozessierung
148	gi 89574135	31,1	8,8	304,6	4	22,9	Malate DH	Metabolismus
149	gi 344270293	38,8	9,6	605,9	10	34	HNRP A2/B1	RNA Prozessierung
150	gi 124028629	37,4	9,3	637,7	11	40,8	HNRP A2/B1	RNA Prozessierung
151	gi 344270293	38,8	9,6	605,2	12	38,1	HNRP A2/B1	RNA Prozessierung
152	gi 437331	29,1	9,2	417,6	8	25,3	Lectin	Regulation
153	gi 73953093	31,6	8,7	355,5	6	22,8	Porin	Kanal
154	gi 437331	29,1	9,2	418,6	8	25,3	Lectin	Regulation
155	gi 74000809	35	9,6	660,6	11	41,7	Flavoprotein	Electronentransport
156	gi 345777401	29,6	9,5	279,8	5	26,6	G protein	Prozessierung genetischer Information
157	gi 345777401	29,6	9,5	310,2	5	24	G protein	Prozessierung genetischer Information
158	gi 57107281	27,4	8,8	228,4	5	24,5	GST omega	Metabolismus
159	gi 345800929	26,2	8,9	214,5	4	20,4	NAD(P)H DH	Stress
160	gi 73985437	67,6	6,48	176	5	7	Transketolase	Metabolismus
161	gi 57086811	74	9,4	262,5	6	12,9	Palmitoyltransferase	Metabolismus
162	gi 345800110	67,8	9,5	109,5	2	3,3	VLCAD	Metabolismus
163	gi 74000677	57,8	9	894	14	33,5	Pyruvat kinase	Metabolismus
164	gi 74000677	57,83	7,96	468	11	17	Pyruvat kinase	Metabolismus
165	gi 73976741	51,4	7,8	303,6	10	18,7	Adenylyl cyclase-associated	Struktur
166	gi 73947982	62,8	8,6	151,2	5	10,4	GPI	Metabolismus
167	gi 73980931	34,9	10,1	291,6	4	18,6	Succinyl-CoA ligase	Metabolismus

168	gi185060507	38,8	9,6	537	8	32,2	HNRP A1	RNA Prozessierung
169	gi174002101	34,3	9,6	395,5	9	27,9	Hydroxyacyl-coenzym A DH	Metabolismus
170	gi173949086	32,9	9,7	309,3	5	16,5	ATP synthase	Energiemetabolismus
171	gi150950177	38,6	7,6	755,9	12	41,3	Annexin A2	Annexin
172	gi150950177	38,6	7,6	811	12	41,3	Annexin A2	Annexin
173	gi150950177	38,6	7,6	789,1	13	45,1	Ferritin	Zellspeicher
174	gi1437331	29,1	9,2	158,3	2	8,8	Lectin	Regulation
175	gi110720404	32,3	9,2	557,7	8	32,4	Porin	Kanal
176	gi173984913	98,8	5,53	200	7	6	10-FTHFDH	Tetrahydrofolat-Biosynthese
177	gi1345798043	52,4	9,3	476,3	11	25,8	Isocitrate DH	Metabolismus
179	gi162088934	43,8	8,7	76,4	2	7,6	CDC10	Regulation
180	gi1259490360	46,6	9,4	603,1	10	28	Serpin H1	Proteolyse
181	gi1345798043	52,4	9,3	252	7	17,3	Isocitrate DH	Metabolismus
182	gi189573935	24	9,7	99,1	2	12,5	GAP	Metabolismus
183	gi173955189	45,7	9,6	635	11	32,6	Acetyl-CoA acetyltransferase	Enzyme: Multifunktional
184	gi173957738	25,7	9,4	133,6	4	18,9	EIF	Proteinbiosynthese
185	gi1308082020	26,7	7,7	740,7	11	54,2	TIM	Metabolismus
186	gi173959317	25,7	7,7	470,5	9	39,9	GST Mu	Metabolismus
187	gi1345800929	26,2	8,9	493,7	7	24,7	NAD(P)H DH	Stress
188	gi1345800929	26,2	8,9	204,6	3	15,3	NAD(P)H DH	Stress
189	gi1359322052	61,1	5,6	250,5	5	15,2	10-FTHFDH	Tetrahydrofolat-Biosynthese
190	gi173953093	31,6	8,7	291,7	5	18,4	Porin	Kanal
191	gi1308081799	29,5	8,7	387,2	7	23,3	Galectin-3	Regulation
192	gi1345797531	28,3	9,3	178	3	13,1	Actin	Struktur
193	gi171043798	44,3	8,9	348,4	6	23,2	Cathepsin D	Proteolyse
194	gi171043798	44,3	8,9	422,8	6	18,8	Cathepsin D	Proteolyse
195	gi173957738	25,7	9,4	240,4	6	29,2	EIF	Proteinbiosynthese
196	gi173992675	48,2	10,4	57,7	2	3,2	Proteasome protein	Proteasom
197	gi1126272791	123,7	5,5	330	11	10	Vinculin	Membran
198	gi173987435	77,8	6,3	425,7	7	12	EF-2	Prozessierung genetischer Information

199	gi173989664	96,1	6	81,1	3	4,1	Programmed cell death	Regulation
200	gi173945728	69,4	5,8	286,3	8	10,1	Villin	Struktur
201	gi1345777924	80,8	6	534,4	11	16,5	Gelsolin	Struktur
202	gi173945728	69,4	5,8	390,7	11	13,1	Villin	Struktur
203	gi1359321220	83,6	6,9	409,5	5	9,9	Glycyl-tRNA synthetase	Prozessierung genetischer Information
204	gi18569616	34,5	9,4	170,3	4	10,2	Moesin	Membran
205	gi1114667511	58,2	5	585,1	6	17,3	Keratin	Struktur
206	gi1301779083	89,4	8,8	167,5	4	6,2	HSP75	Stress
207	gi1345795599	47,7	7,8	531,6	12	33,7	26S proteasome	Proteasom
208	gi174001715	38,4	8,5	252,3	5	19,2	HNRP D0	RNA Prozessierung
209	gi189573935	24	9,7	414,9	7	36,6	GAP	Metabolismus
210	gi173975387	36,6	6,9	299,3	6	21,8	Alcohol DH	Metabolismus
211	gi157093423	37,4	6,8	846,7	12	39,3	HnRNP-E1	Prozessierung genetischer Information
212	gi1345784720	41	7	388,7	6	13,9	Acetyl-CoA acetyltransferase	Enzyme: Multifunctional
213	gi173971731	98,3	8,9	437,4	6	11,4	Ferritin repressor	Transport
214	gi189573935	24	9,7	373,9	7	36,6	GAP	Metabolismus
215	gi174007807	44,4	9	636,9	10	29,3	PGK	Metabolismus
216	gi173958481	39,5	9,2	244,7	6	17,9	FBA	Metabolismus
217	gi130794280	69,3	5,8	167	4	8,9	Albumin	Medium
218	gi150978862	35,8	8,2	202	5	16	GAP	Metabolismus
219	gi176445989	53,9	6,1	99,5	2	5,5	Albumin	Medium
220	gi150950177	38,6	7,6	739,9	10	30,4	Annexin A2	Annexin
221	gi150978862	35,8	9	512,1	10	28,8	GAP	Metabolismus
222	gi150950177	38,6	7,6	974,7	11	35,7	Annexin A2	Annexin
223	gi173968966	85,7	8,07	507	13	17	Aconitase	Metabolismus
224	gi174006742	71,3	6,3	225,2	9	15,9	DEAD/H box	Keine Zuordnung
225	gi173985437	67,6	6,48	226	6	7	Transketolase	Metabolismus
226	gi173970116	157,5	6,46	199	7	4	Leucine-rich PPR	Keine Zuordnung
227	gi173970116	101,187	6,38	997	21	20	C1-THF synthase	Tetrahydrofolat-Biosynthese

228	gi 73964198	101,2	6,4	470	11	13,9	C1-THF synthase	Tetrahydrofolat-Biosynthese
229	gi 73987248	82,7	8,54	335	8	11	KH-type splicing regulatory protein	Prozessierung genetischer Information
230	gi 73954811	68,5	6	99,9	4	7	Radixin	Struktur
231	gi 345777924	80,8	6	224,2	5	8	Gelsolin	Struktur
232	gi 73964198	101,187	6,38	1328	27	24	C1-THF synthase	Tetrahydrofolat-Biosynthese
233	gi 115497900	95,217	6,41	210	6	6	EF-2	Prozessierung genetischer Information
234	gi 73945728	69,4	5,8	85,2	2	1,9	Villin	Struktur
235	gi 73989664	96	5,99	474	14	14	Programmed cell death	Regulation
236	gi 73969353	73,8	5,1	299,6	7	12,5	CG1550-PA	Keine Zuordnung
237	gi 57110953	79,628	5,85	163	6	12	NADH-ubiquinone oxidoreductase	Energiemetabolismus
238	gi 24234686	53,5	5,5	538,1	10	24,5	HSP71	Stress
239	gi 73970888	73,6	5,9	617,5	13	21,5	HSP70	Stress
240	gi 73970888	73,6	5,9	343	7	10	HSP70	Stress
241	gi 74012289	53,5	5,5	511,8	11	26,4	HSP70	Stress
242	gi 73954623	67,7	5,48	345	12	18	HSP71	Stress
243	gi 76445989	53,9	6,1	100,7	2	8	Albumin	Medium
244	gi 50978734	69,9	5,3	613,5	11	18,9	HSP70	Stress
245	gi 50978734	69,9	5,3	538,1	9	16,9	HSP70	Stress
246	gi 77735541	89,3	5	226,4	6	9,8	ER ATPase	Medium
247	gi 74010709	47,5	4,9	200,8	6	16	Debrin	Endocytosis
248	gi 73946459	50,9	5,2	406,1	9	18,3	HNRP K	RNA Prozessierung
249	gi 73993697	73,5	6	467,3	10	19,8	Dihydropyrimidinase	Regulation
250	gi 73948978	53,6	4,9	550,7	15	45,1	Vimentin	Struktur
251	gi 73946459	50,9	5,2	392,8	9	18,3	HNRP K	RNA Prozessierung
252	gi 73983760	62,5	6,4	106,1	3	7	Phosphoprotein 1	Stress
253	gi 73946459	50,9	5,2	351	9	15,1	HNRP K	RNA Prozessierung
254	gi 74005449	64,7	6,2	184	6	9,5	ATIC	Metabolismus
255	gi 73960920	74,2	6,57	372	7	11	Lamin	Struktur

256	gi345783784	67,5	9,8	569,4	10	23,1	Dihydroxyacetone kinase/ FAD-AMP lyase	Energiemetabolismus
257	gi77736031	57,9	6,3	469,8	11	25,6	T-complex protein	Proteinprozessierung
258	gi57032236	60,216	5,71	167	6	11	T-complex protein	Proteinprozessierung
259	gi73946459	50,9	5,2	327,7	8	15,7	HNRP K	RNA Prozessierung
260	gi345797614	61	5,7	229	6	10	HSP60	Stress
261	gi345797614	61	5,7	788,1	10	24,8	HSP60	Stress
262	gi74005076	58,7	6..9	1260	30	35	HSP60	Stress
263	gi345792158	51,5	4,9	258,4	4	15,1	Tubulin	Struktur
264	gi345794865	56,7	5,8	661,8	12	23,6	Disulfide-isomerase	Proteinprozessierung
265	gi73964749	57,4	4,7	476,4	11	24,5	Disulfide-isomerase	Proteinprozessierung
266	gi359323093	54,7	5,5	178,9	3	6,9	Keratin	Struktur
267	gi359323093	54,7	5,5	114,3	2	7,1	Keratin	Struktur
268	gi73961834	61,4	6,4	48,7	2	2,4	Ubiquitin hydrolase	Proteasom
269	gi73968966	85,7	8,9	543	11	17,7	Aconitase	Metabolismus
270	gi74003009	59,6	5,5	431,4	10	18,1	T-complex protein	Proteinprozessierung
271	gi345783739	54,5	6,2	350,1	7	14,7	EH domain protein	Endosome
272	gi73948956	53,6	5,1	616	29	28	Vimentin	Struktur
273	gi345794865	56,7	5,8	183,1	4	9,9	Disulfide-isomerase	Proteinprozessierung
274	gi345794865	56,7	5,8	609,3	12	25,5	Disulfide-isomerase	Proteinprozessierung
275	gi73979767	82,4	6,81	158	6	7	DEAD box	Keine Zuordnung
276	gi73948956	53,6	5,1	1563	52	53	Vimentin	Struktur
277	gi209870470	49,9	4,6	680,4	15	27,2	Stathmin	Struktur
278	gi345791825	51,8	5,6	609,5	13	24,1	Keratin	Struktur
279	gi307938303	41,7	5,2	181,2	3	12	Actin	Struktur
280	gi74009187	62,7	8,8	794,5	14	30,5	G6PD	Metabolismus
281	gi359323093	54,7	5,5	430,8	7	18,9	Keratin	Struktur
282	gi359323093	54,7	5,5	402,7	6	15,1	Keratin	Struktur
283	gi73983508	55,1	6,1	137,3	4	12,5	PRP19/PSO4	Prozessierung genetischer Information
284	gi73981259	56,5	6,2	543,2	13	27,2	3-PGDH	Metabolismus

285	gi345791849	53,7	6,8	416,5	11	25,8	Keratin	Struktur
286	gi50950177	38,63	7,6	376	8	28	Annexin A2	Annexin
287	gi345791825	51,8	5,6	815,2	14	23,7	Keratin	Struktur
288	gi359323093	54,7	5,5	441,2	7	16,9	Keratin	Struktur
289	gi359323093	54,7	5,5	504,9	7	16,9	Keratin	Struktur
290	gi73958059	40,1	5,2	649	17	30,1	Actin	Struktur
291	gi345791825	51,8	5,6	834,9	14	25,6	Keratin	Struktur
292	gi345791825	51,8	5,6	644,5	12	22,2	Keratin	Struktur
293	gi73968673	57,4	6	479	8	24,7	Chaperonin	Stress
294	gi73951809	56,2	9	613,9	14	31,6	Leucine aminopeptidase	Enzyme: Multifunctional
295	gi48145673	49,1	5,8	230,6	6	21,2	HNRP H1	RNA Prozessierung
296	gi57035983	54,9	8,6	270,6	6	18	Retinal DH	Stress
297	gi345800677	49	9,3	622,1	9	20,8	Enolase	Enzyme: Multifunctional
298	gi345799031	65,1	9,9	236	6	17,3	Glutamate DH	Metabolismus
299	gi57035983	54,9	8,6	475,5	9	23,8	Retinal DH	Stress
300	gi73968432	56,3	5,1	1010,9	16	33,4	ATP synthase	Energiemetabolismus
301	gi73968432	56,3	5,1	368	6	12,5	ATP synthase	Energiemetabolismus
302	gi345799031	65,1	9,9	466,3	10	23,9	Glutamate DH	Metabolismus
303	gi73968528	44,4	4,9	537,9	9	28	Dynactin	Struktur
304	gi74007970	49,2	5,9	422,2	9	29,4	HNRP H2	RNA Prozessierung
305	gi73997922	45,6	5,2	199,7	5	13,5	HNRP F	RNA Prozessierung
306	gi73980394	48,3	4,8	688,5	10	22,7	Disulfide-isomerase	Proteinprozessierung
307	gi345783337	45,4	4,6	281,8	7	22,4	Ribonuclease inhibitor	Stress
308	gi73997922	45,6	5,2	481	10	28,7	HNRP F	RNA Prozessierung
309	gi345791849	53,7	6,8	544,2	11	25,4	Keratin	Struktur
310	gi345783337	45,4	4,6	218,8	3	16,3	Ribonuclease inhibitor	Stress
311	gi345800677	49	9,3	713,6	11	26,8	Enolase	Enzyme: Multifunctional
312	gi73980394	48,3	4,8	329,4	4	13,4	Disulfide-isomerase	Proteinprozessierung
313	gi345807422	48,9	4,9	114,3	3	7,6	26S proteasome	Proteasom
314	gi73948016	51,1	5,4	339,9	8	20,3	RuvB-like	Stress
315	gi345800677	49	9,3	533,9	11	25,5	Enolase	Enzyme: Multifunctional

316	gi345800677	49	9,3	506,4	5	14,3	Enolase	Enzyme: Multifunctional
317	gi345791849	53,7	6,8	261	3	10,4	Keratin	Struktur
318	gi345800677	49	9,3	440,3	5	14,3	Enolase	Enzyme: Multifunctional
319	gi345791849	53,7	6,8	389,8	7	17,6	Keratin	Struktur
320	gi57106334	48,2	5,2	873,9	16	37,6	Keratin	Struktur
321	gi345800677	49	9,3	449,8	7	17,4	Enolase	Enzyme: Multifunctional
322	gi345784152	40,7	5,6	391,3	9	25,6	Actin	Struktur
323	gi73985642	52,8	6	285,4	4	15	Ubiqumol-cytochrome c reductase	Energiemetabolismus
324	gi73969405	46376	5,13	131	4	11	Alpha-galactosidase	Metabolismus
325	gi790470	37,9	9	332,5	7	15,9	P38-2G4	Regulation
326	gi291391275	58	7,7	298	8	19,2	26S proteasome	Proteasom
327	gi74001930	49,9	6,8	405,5	8	20,4	EF-1-gamma	Prozessierung genetischer Information
328	gi73950940	53,1	6,7	128,2	3	10,4	6-phosphogluconate DH	Metabolismus
329	gi73950940	53,1	6,7	481,8	10	21,7	6-phosphogluconate DH	Metabolismus
330	gi57106334	48,2	5,2	168	7	9	Keratin	Struktur
331	gi57106334	48,2	5,2	892,1	16	38,1	Keratin	Struktur
332	gi57091463	42,5	6	95,8	3	11,3	Vesicle amine transport protein	Exocytosis
333	gi73998802	48,4	6,5	382,9	9	25,7	Ornithine aminotransferase	Metabolismus
334	gi73950940	53,1	6,7	478,1	10	25,3	6-phosphogluconate DH	Metabolismus
335	gi57106334	48,2	5,2	459,7	9	24,6	Keratin	Struktur
336	gi307938303	41,7	5,2	514,8	6	22,7	Actin	Struktur
337	gi345805476	46,6	5,5	105,6	4	15,5	Secernin	Proteolyse
338	gi345802027	49,4	7,1	488,8	10	29,9	EF-1-Tu	Prozessierung genetischer Information
339	gi307938303	41,7	5,2	308,6	7	20,8	Actin	Struktur
340	gi307938303	41,7	5,2	249,5	4	15,5	Actin	Struktur
341	gi345329244	38,8	5,8	471	10	32,4	Centractin	Regulation
342	gi345799103	41,2	7,5	182,4	5	16,5	Annexin A7	Annexin

343	gi174003806	42,667	5,66	54	2	8	Serpin B6	Proteolyse
344	gi1345799231	54,4	8,5	459,1	9	23,4	Annexin A11	Annexin
345	gi189573987	40,7	5,9	126,9	3	8,3	Isocitrate DH	Metabolismus
346	gi1307938303	41,7	5,2	730	11	28,3	Actin	Struktur
347	gi155741585	41,6	6	567,8	7	21,6	Actin	Struktur
348	gi1307938303	41,7	5,2	179,9	5	14,9	Actin	Struktur
349	gi1148744172	41,7	5,2	322,4	6	20,8	Actin	Medium
350	gi1296203724	38,2	5,2	578,9	8	28,4	Actin	Struktur
351	gi1345797763	33,4	5,4	223,7	7	28,2	Bisphosphate nucleotidase	Metabolismus
352	gi173985532	45,4	5,6	632,6	8	27,2	Aminoacylase	Metabolismus
353	gi1348563462	47,1	7,7	315,3	7	24,5	Actin	Struktur
354	gi1345790828	41,5	6,2	490,6	10	31,6	Septin	Regulation
355	gi1345790828	41,5	6,2	311,5	7	26,9	Septin	Regulation
356	gi173980918	38,8	6	476,8	8	28,1	CAP-G protein	Transport
357	gi173980918	38,8	6	553,2	10	28,7	CAP-G protein	Transport
358	gi173980918	38,8	6	248,8	5	19,8	CAP-G protein	Transport
359	gi150979052	39,6	5,2	484,3	10	30,8	Annexin A13	Annexin
360	gi150979052	39,6	5,2	222	6	23,5	Annexin A13	Annexin
361	gi150978800	42,1	5,4	464,8	11	25,8	Galactokinase	Metabolismus
362	gi173999010	37,3	5,3	196,7	4	19,5	Thioredoxin	Stress
363	gi1345784333	43,4	5,5	233,2	6	21,2	Serpin B5	Proteolyse
364	gi173977271	32,3	6,5	88,4	2	9,7	PNP	Enzyme: Multifunctional
365	gi1296482420	44,3	6,1	138,8	4	15,4	Actin	Medium
366	gi150979052	39,6	5,2	429,1	6	21,3	Annexin A13	Annexin
367	gi173996743	40,1	6,5	297,2	6	20,6	Twinfilin	Struktur
368	gi162898411	35,973	6,93	60	3	11	HNRP AB	RNA Prozessierung
369	gi157036395	38,3	5,1	195,2	3	16,5	SUMO-1 activating enzyme	Proteinprozessierung
370	gi173946797	38,6	5,8	741,3	12	34,5	Annexin A1	Annexin
371	gi173966759	59,4	8,6	129,6	2	7,7	TATA-binding protein	Prozessierung genetischer Information
372	gi173946797	38,6	5,8	290,3	5	16,8	Annexin A1	Annexin

373	gi73981496	33	5,5	372	5	28	Actin filament	Struktur
374	gi73946797	38,6	5,8	481,6	7	24,1	Annexin A1	Annexin
375	gi73946797	38,6	5,8	151,4	3	11,9	Annexin A1	Annexin
376	gi73966152	29,8	6,4	140,9	4	15,6	LIM and SH3	Transport
377	gi73946797	38,6	5,8	430	13	25	Annexin A1	Annexin
378	gi73966759	59,4	8,6	203,2	7	15,8	TATA-binding protein	Prozessierung genetischer Information
379	gi57092777	33,1	6	346,1	8	37,2	MPST	Stress
380	gi50978726	35,6	5,2	204,5	4	12,9	Phosphatase	Regulation
381	gi73966152	29,8	6,4	368,7	8	24,8	LIM and SH3	Transport
382	gi73946797	38,6	5,8	511	16	31	Annexin A1	Annexin
383	gi73985153	39,2	6,2	243	4	8,9	PDHE1-B	Metabolismus
384	gi57092971	36,4	6,6	183,6	5	15	Malate DH	Metabolismus
385	gi57092971	36,4	6,6	368,2	7	24,9	Malate DH	Metabolismus
386	gi50950177	38,6	7,6	537,8	13	44,2	Annexin A2	Annexin
387	gi345798978	30,7	5,5	306,2	6	32,5	Pyrophosphatase	Metabolismus
388	gi73953207	36,6	5,4	633,4	11	33,3	Annexin A8	Annexin
389	gi308081799	29,5	8,7	127,8	2	8,7	Galectin-3	Regulation
390	gi301758226	36	5,6	439,3	10	32,3	Annexin A4	Annexin
391	gi345776458	23,6	5,9	219,7	6	29	SAP ribonucleoprotein	Prozessierung genetischer Information
392	gi55741764	34,1	5,9	570,7	12	33,9	Sulfotransferase	Metabolismus
393	gi73957585	30,1	5,3	189,9	3	20,9	RP/EB family	Regulation
394	gi55741764	34,1	5,9	373,4	7	27,8	Sulfotransferase	Metabolismus
395	gi71043798	44,3	8,9	212,9	5	18,8	Cathepsin D	Proteolyse
396	gi57090023	28,7	5,7	288,6	6	19,3	Proteasome activator	Proteasom
397	gi71043798	44,3	8,9	64,1	2	8	Cathepsin D	Proteolyse
398	gi345791165	40	9,4	233,8	4	10,5	ER resident	Proteinprozessierung
399	gi345791825	51,8	5,6	120,2	3	7,5	Keratin	Struktur
400	gi73947299	70,6	5,9	70,8	2	5,2	Echinoderm microtubule	Prozessierung genetischer Information

428	gi345781076	69,2	5,9	333,2	7	14,2	Leukotriene A-4 hydrolase	Leukotrienebiosynthese
429	gi12082093	59,8	7	389,9	10	25,8	Katalase	Stress
430	gi73966164	94,2	5,35	533	16	19	Aminopeptidase	Proteinprozessierung
431	gi73984913	98,8	5,53	204	6	5	10-FTHFDH	Tetrahydrofolat-Biosynthese
432	gi345800110	67,8	9,5	237,6	6	12,6	VLCAD	Metabolismus
433	gi73971222	87,15	5,15	385	15	12	ER ATPase	Regulation
434	gi74004536	68,4	5,17	245	7	13	Dynein	Struktur
435	gi344265339	36,2	6,2	121,9	3	11,1	HNRP A/B	RNA Prozessierung
436	gi345784833	33,8	6,1	185,5	5	21	Aminotransferase	Metabolismus
437	gi73948991	39,3	6,3	128,8	4	19,2	Phosphotriesterase	Prozessierung genetischer Information
438	gi57099501	37,5	6,8	319,7	9	26,1	Transaldolase	Metabolismus
439	gi344275081	37,2	6,4	397,2	8	27,1	HNRP H3	RNA Prozessierung
440	gi57092971	36,4	6,6	427,7	7	24,9	Malate DH	Metabolismus
441	gi50950177	38,6	7,6	63,1	2	10	Annexin A2	Annexin
442	gi359279916	43,9	5	942,9	11	37,3	Keratin	Struktur
443	gi345805375	43,9	5	747,1	13	36,3	Keratin	Struktur
444	gi12082093	59,8	7	478,3	9	21,8	Katalase	Stress
445	gi73946459	50,9	5,2	94,8	3	6,7	HNRP K	RNA Prozessierung
446	gi345783337	45,4	4,6	548,8	6	22,4	Ribonuclease inhibitor	Stress
447	gi345788984	37,1	4,7	298	6	13,4	40S ribosomal protein	Prozessierung genetischer Information
448	gi50979240	51,76	5,65	105	3	4	Clusterin	Regulation
449	gi73975637	37,1	4,3	154,8	4	9,5	Calumenin	Keine Zuordnung
450	gi345782539	44,8	4,8	148,7	2	6,6	Cofactor NHE-RF3	Regulation
451	gi50950177	38,6	7,6	451,6	10	31,3	Annexin A2	Annexin
452	gi57099501	37,5	6,8	279	7	22	Transaldolase	Metabolismus
453	gi50950177	38,6	7,6	824,6	12	41,3	Annexin A2	Annexin
454	gi74002320	34,6	5,9	117,9	3	14,5	Pyrophosphatase	Metabolismus
455	gi57036579	35,9	9,2	169	4	16,2	Dienoyl-CoA isomerase	Metabolismus
456	gi345794325	59,145	6,79	72	3	9	Tyrosyl-tRNA synthetase	Regulation

457	gi 73980527	59,4	6,9	378	9	25,4	T-complex protein	Proteinprozessierung
458	gi 73970196	58,002	7,96	44	2	4	T-complex protein	Proteinprozessierung
459	gi 345784214	55,2	8,6	133,3	4	14,7	Glutamate DH	Metabolismus
460	gi 74001715	38,4	8,5	211,4	6	21,1	HNRP D0	RNA Prozessierung
461	gi 57091277	39,3	6,2	538,5	9	35,7	FBA	Metabolismus
462	gi 57093423	37,4	6,8	653,6	11	37,1	HNRNP-E1	Prozessierung genetischer Information
463	gi 55742732	54,15	7,95	104	3	5	Dihydropoyl DH	Regulation
464	gi 345791825	51,8	5,6	266,3	7	14,9	Keratin	Struktur
465	gi 74007970	49,2	5,9	426,1	6	16,7	HNRP H2	RNA Prozessierung
466	gi 345791849	53,7	6,8	472,2	8	18	Keratin	Struktur
467	gi 345800677	49	9,3	281,9	4	9,8	Enolase	Enzyme: Multifunctional
468	gi 73998802	48,4	6,5	198,6	5	10	Ornithine aminotransferase	Metabolismus
469	gi 73998802	48,4	6,5	305,8	6	17,7	Ornithine aminotransferase	Metabolismus
470	gi 74007632	54,1	9,6	258,5	8	23,8	Octamer-binding isoform	Prozessierung genetischer Information
471	gi 73987401	57,1	9,8	469,3	9	25,6	Polypyrimidine tract-binding protein	Prozessierung genetischer Information
472	gi 74006138	52,413	6,37	50	3	7	NADH dehydrogenase	Energiemetabolismus
473	gi 338728491	28,4	4,7	158,1	2	8,2	EF-1-delta	Prozessierung genetischer Information
474	gi 355711142	29,5	5,5	379,3	6	28,9	Prohibitin	Prozessierung genetischer Information
475	gi 301779467	36	4,9	223,5	5	19	EIF	Proteinbiosynthese
476	gi 55741764	34,1	5,9	440	11	28,5	Sulfotransferase	Metabolismus
477	gi 71043798	44,3	8,9	417	7	23,2	Cathepsin D	Proteolyse
478	gi 73966182	30	8,8	195,1	5	20,7	Pyridoxine-5'-P oxidase	Metabolismus
479	gi 57035983	54,9	8,6	583,4	10	26,1	Retinal DH	Stress
480	gi 74007807	44,4	9	616,6	10	33,3	PGK	Metabolismus
481	gi 73974844	35,8	6,8	395,3	8	24,3	GDP-L-fucose synthase	Energiemetabolismus
482	gi 332206844	56,6	8,6	185,4	2	5,9	Keratin	Struktur

483	gi174007807	44,4	9	244,7	4	16,1	PGK	Metabolismus
484	gi174007807	44,4	9	265,5	5	18,2	PGK	Metabolismus
485	gi174007807	44,4	9	180,3	3	11,8	PGK	Metabolismus
486	gi173976563	83,6	6,9	163,6	4	7,3	Glycyl-tRNA synthetase	Proteinbiosynthese
487	gi174007500	67,9	6,1	129,4	5	7,3	Moesin	Membran
488	gi157103704	77,2	6,6	138,5	3	6	GMP synthase	Metabolismus
489	gi173971013	37,8	9,8	113,4	3	3	PC4 and SFRS1-interacting	Virus-Wirtzell-Interaction
495	gi1545510629	119,6	7,8	253	5	6	ATP-citrate synthase	Metabolismus
498	gi190109870	48,074	7,32	80	2	6	Testin	Regulation
499	gi157100553	35,9	4,8	766	13	38	Annexin A5	Annexin
508	gi173968966	85,668	8,07	517	16	19	Aconitase	Metabolismus
509	gi173953207	36,599	5,53	345	7	18	Annexin A8	Annexin
510	gi173977271	32,281	6,4	136	4	10	Purine nucleoside phosphorylase	Metabolismus

Vero Tollwutinfektion (4.2.2): Gelkarte <https://gelmap.de/1108>

Gelspot	Eintrag	MW	pI	Mascot score	pt	Sequenz- abdeckung [%]	Identifizierte Proteine (Kurzform)	Funktionelle Klassifizierung
F_3001	gil297273827	41,7	5,2	493,3	6	22,7	Actin, cytoplasmic 2	Struktur
F_3002	gil297273827	41,7	5,2	529,4	6	21,6	Actin, cytoplasmic 2	Struktur
F_3003	gil75075845	53,7	4,9	1524,7	18	37,8	Vimentin	Struktur
F_3004	gil75075845	53,7	4,9	1423,6	18	40,8	Vimentin	Struktur
F_3005	gil306922374	61	5,7	1136,9	12	29	HSP 60	Stress
F_3006	gil25742677	47,4	5	1074,7	13	35,9	26S Protease	Proteasom
F_3007	gil109106421	49,2	5	1411,5	18	46,2	26S Protease	Proteasom
F_3008	gil297293304	53,9	9,7	819,5	13	24,7	Annexin A5	Annexin
F_3009	gil9627199	33,1	4,8	400,7	6	19,5	PP M1	Virus
F_3010	gil9627199	33,1	4,8	346,3	5	22,2	PP M1	Virus
F_3012	gil9627199	33,1	4,8	157,9	3	16,8	PP M1	Virus
F_3013	gil297284763	10,8	4,6	44,6	2	11,7	V-type proton ATPase	Energiemetabolismus
F_3014	gil75075845	53,7	4,9	997,2	16	34,3	Vimentin	Struktur
F_3015	gil109088355	53,4	5	896	11	34,7	Vimentin	Struktur
F_3016	gil297268166	33	4,7	217,6	3	15	Reticulocalbin-1	Regulation
F_3018	gil109068261	35,7	6,5	959	13	50,9	Aldose reductase	Metabolismus
F_3020	gil56966699	38,6	7,6	1384,6	16	44,8	Annexin A2	Annexin
F_3021	gil109068261	35,7	6,5	1183,3	14	54,4	Aldose reductase	Metabolismus
F_3022	gil297295797	20,1	4,2	403,3	7	26,6	Clathrin	Struktur
F_3023	gil297699561	29,7	4,8	766,1	11	34,7	14 3 3	Signaltransduktion
F_3023	gil55824574	22,5	5,1	596,2	9	39,1	YWHAE	Signaltransduktion
F_3024	gil58042495	22,6	4,6	734,6	7	56,2	Proteasome protein	Proteasom
F_3025	gil192988247	27,9	4,6	1084,7	14	52,6	14 3 3	Signaltransduktion
F_3026	gil115497570	22,4	4,8	783,7	11	65,6	Calcium-binding protein p22	Medium
F_3027	gil58042495	22,6	4,6	272,3	3	23,8	Proteasome protein	Proteasom
F_3028	gil20664042	10,2	5,2	249,5	4	36,7	S100a6	Signaltransduktion
F_3030	gil42542978	14,6	5,2	494,6	6	51,5	Galectin-1	Regulation

F_3032	gil1351907	69,2	5,8	994,9	13	24,5	Serum albumin	Medium
F_3035	gil55824560	66,9	5,1	1557,2	16	27,1	HSP 70	Stress
F_3044	gil109114294	118,3	6,5	115,8	4	3,9	Integrin alpha-3	Membranproteine
F_3046	gil109100308	115,9	5,3	127,7	3	3	Integrin alpha-5	Membranproteine
F_3054	gil109105240	129,7	6,3	740	15	16,3	Pyruvate carboxylase	Metabolismus
F_3060	gil109091157	59,7	5,3	685,9	7	29,1	Vinculin	Struktur
F_3061	gil297283758	99,3	5,3	1196,7	21	27	Major vault protein	Struktur
F_3071	gil109105748	106,9	5,6	414,5	9	12,3	Glucosidase AB	Proteinmodifikation
F_3077	gil297288376	115,4	6,6	442,2	9	9,9	2-oxoglutarate dehydrogenase	Metabolismus
F_3083	gil297287113	94,7	6,2	201	3	5,5	Programmed cell death 6	Signaltransduktion
F_3092	gil297305092	279,7	5,7	140,2	3	1,6	Filamin	Struktur
F_3104	gil229552	66,1	5,7	267,9	7	13,9	Serum albumin	Medium
F_3105	gil114578628	73,9	5,6	400,2	9	16,5	Inner membrane protein	Membranproteine
F_3107	gil297291462	65,6	5,6	169,3	6	9,6	Ezrin	Struktur
F_3110	gil297262468	57,8	5,3	906,6	12	24,3	Keratin, type II cytoskeletal 8	Struktur
F_3115	gil215398470	66,3	8,8	439,6	6	12,8	Globulin 3	Medium
F_3119	gil109115381	47,2	4,7	608,3	8	26	Keratin, type I cuticular Ha1	Struktur
F_3125	gil109240248	39	10,5	226,4	3	9,6	Glutenin	Medium
F_3132	gil55824560	66,9	5,1	309	4	10,6	HSP 70	Stress
F_3141	gil297276847	33,6	5,3	401	4	17,5	Calpain	Regulation
F_3149	gil109131409	34,2	9,7	219,7	3	13,1	HNRNP A1	Prozessierung genetischer Information
F_3154	gil109131409	34,2	9,7	61,7	1	5	HNRNP A1	Prozessierung genetischer Information
F_3162	gil90082004	22,8	6	673,7	8	49,8	Unnamed protein product	Keine Zuordnung
F_3169	gil245563	28,4	5,5	564,2	10	35,6	Apolipoprotein A-I	Metabolismus
F_3171	gil109081748	64,5	9,1	132,9	4	7,6	Pyruvate kinase M1/M2	Metabolismus
F_3181	gil111185949	23,4	5,9	417,7	6	36,7	GST P	Stress
F_3181	gil109114735	22,9	6,2	276,3	5	27,3	Proteasome protein	Proteasom
F_3214	gil297288261	58,1	6,4	678,1	10	20,9	T-complex protein 1	Stress
F_3220	gil109075738	18,5	5,5	548,5	6	43,5	ATP synthase	Energiemetabolismus
F_3231	gil75075845	53,7	4,9	940,6	11	40,8	Vimentin	Struktur
F_3272	gil306774115	56,4	5,1	1596,5	17	34,2	ATP synthase	Energiemetabolismus

F_3275	gil297273827	41,7	5,2	302,4	6	22,1	Actin, cytoplasmic 2	Struktur
F_3276	gil297273827	41,7	5,2	531,6	5	21,1	Actin, cytoplasmic 2	Struktur
F_3277	gil67971314	41,7	5,4	439,5	7	26,1	Unnamed protein product	Keine Zuordnung
F_3289	gil109131007	32,8	4,6	245,7	4	12,2	40S ribosomal protein	Prozessierung genetischer Information
F_3290	gil75075845	53,7	4,9	947,7	16	31,8	Vimentin	Struktur
F_3296	gil306518599	32,8	4,6	812	11	35,9	LOC693293	Andere
F_3298	gil306774115	56,4	5,1	959,6	9	29,3	ATP synthase	Energiemetabolismus
F_3299	gil297286179	37,3	5,8	122,4	3	11,8	DnaJ homolog	Prozessierung genetischer Information
F_3302	gil56966699	38,6	7,6	643,2	8	29,8	Annexin A2	Annexin
F_3305	gil344268400	36,5	5,6	790,6	14	23,9	26S Protease	Proteasom
F_3305	gil109081748	64,5	9,1	283,1	7	18,3	Pyruvate kinase M1/M2	Metabolismus
F_3308	gil307219254	47,1	7,7	95,2	3	11,1	Enolase	Enzyme: Multifunktional
F_3313	gil297286778	44,2	9,3	451,6	10	29,1	28S ribosomal protein	Prozessierung genetischer Information
F_3314	gil109081748	64,5	9,1	370,5	7	18,3	Pyruvate kinase M1/M2	Metabolismus
F_3318	gil297297899	26,1	9,1	224,5	3	13,3	Galectin-3	Regulation
F_3319	gil297297899	26,1	9,1	257,4	4	20,2	Galectin-3	Regulation
F_3321	gil297276972	35,5	9,7	152	2	9,5	Dienoyl-CoA isomerase	Metabolismus
F_3322	gil109089308	52,7	5,4	385,5	5	15	Annexin A7	Annexin
F_3323	gil297302021	48,4	6,9	257,3	3	11,4	Ornithine aminotransferase	Metabolismus
F_3336	gil297273827	41,7	5,2	627,3	6	21,1	Actin, cytoplasmic 2	Struktur
F_3337	gil297273827	41,7	5,2	898,2	10	28,5	Actin, cytoplasmic 2	Struktur
F_3337	gil297295182	72,3	5,8	189,8	4	7,5	Stress-70 protein	Stress
F_3339	gil297273827	41,7	5,2	356,6	4	15,2	Actin, cytoplasmic 2	Struktur
F_3340	gil90085315	25,1	5,1	119,5	3	12,5	Unnamed protein product	Keine Zuordnung
F_3341	gil388453467	37,3	5,6	247,9	4	12,6	Unnamed protein product	Keine Zuordnung
F_3343	gil297271091	40,4	6,5	222,9	4	15,2	Annexin A1	Annexin
F_3344	gil109103263	36	5,4	1063,7	14	37,1	Annexin A4	Annexin
F_3345	gil109103263	36	5,4	1090	15	37,1	Annexin A4	Annexin
F_3346	gil109114294	118,3	6,5	154,4	5	4,8	Integrin alpha-3	Membranproteine
F_3349	gil114666280	29,1	5,3	339,5	7	35,3	Prohibitin	Prozessierung genetischer Information
F_3359	gil297293304	53,9	9,7	424,3	8	16,1	Annexin A5	Annexin

F_3361	gil18307578	74,6	9,8	185,7	4	6,8	FBP aldolase	Metabolismus
F_3364	gil297280274	74	6,6	860,5	12	20,7	Lamin A/C	Struktur
F_3366	gil297264391	36	9,8	379,2	5	21,1	HNRNP A3	Prozessierung genetischer Information
F_3370	gil109074379	36,4	5,9	1066,3	13	39,6	Annexin A3	Annexin
F_3396	gil297273001	70	4,8	563,1	8	11,3	LOC703932	Andere
F_3413	gil297269442	68,8	5,2	433,3	7	14,8	HSP 71	Stress
F_3426	gil109078796	73,6	6	964	18	33,3	Stress-70 protein	Stress
F_3427	gil306922374	61	5,7	1601,9	19	39,4	HSP 60	Stress
F_3431	gil306922374	61	5,7	1430,9	18	34,7	HSP 60	Stress
F_3432	gil297293983	51,6	5,2	508,8	9	21	T-complex protein 1	Stress
F_3440	gil55846684	47,4	5,1	1047,8	14	36,1	Glial fibrillary acidic protein	Struktur
F_3441	gil297274312	47,9	5,3	317,8	8	23,5	Keratin, type I cytoskeletal 18	Struktur
F_3442	gil67971314	41,7	5,4	713,9	12	37,1	Unnamed protein product	Keine Zuordnung
F_3444	gil5730023	51,1	5,4	1286,8	19	39,3	ruvB-like	Prozessierung genetischer Information
F_3445	gil297266886	42	5,3	375,1	5	27,2	Actin, cytoplasmic 3	Struktur
F_3446	gil297288859	40	5,5	585,8	7	27,3	Serum P/A	Metabolismus
F_3447	gil109111118	38,6	7,7	213,2	3	18	Stomatin	Struktur
F_3450	gil109132798	280,4	5,7	150,8	4	2,3	Filamin	Struktur
F_3456	gil55824560	66,9	5,1	1276,4	15	28,6	HSP 70	Stress
F_3457	gil109105240	129,7	6,3	597,1	10	12,8	Pyruvate carboxylase	Metabolismus
F_3461	gil297273827	41,7	5,2	871,9	11	29,3	Actin, cytoplasmic 2	Struktur
F_3461	gil67971314	41,7	5,4	834	12	38,1	Unnamed protein product	Keine Zuordnung
F_3464	gil90075276	53,6	4,9	1348,3	16	31,1	Unnamed protein product	Keine Zuordnung
F_3465	gil297273827	41,7	5,2	713,3	11	30,4	Actin, cytoplasmic 2	Struktur
F_3466	gil297295182	72,3	5,8	1230,2	22	35,8	Stress-70 protein	Stress
F_3468	gil297295182	72,3	5,8	1829,3	22	38,3	Stress-70 protein	Stress
F_3471	gil306922374	61	5,7	489,6	9	20,2	HSP 60	Stress
F_3474	gil30794280	69,3	5,8	128,8	4	7,2	Serum albumin	Medium
F_3476	gil109078796	73,6	6	182,6	5	9,6	Stress-70 protein	Stress
F_3477	gil1351907	69,2	5,8	1288	16	26,9	Serum albumin	Medium
F_3477	gil90076224	71	6,2	85	2	1,8	Unnamed protein product	Keine Zuordnung

F_3483	gil297283366	77,3	6,9	559	11	20,1	HSP 75	Stress
F_3483	gil114667513	56,7	4,9	314,5	7	14,2	Keratin 10	Struktur
F_3483	gil67971086	67,8	8,5	249,5	5	10,9	Unnamed protein product	Keine Zuordnung
F_3489	gil297273001	70	4,8	77,8	2	3,8	LOC703932	Andere
F_3495	gil297280274	74	6,6	128,5	2	4,5	Lamin A/C	Struktur
F_3499	gil109073165	60,3	5,7	143,3	4	9,2	T-complex protein 1	Stress
F_3501	gil109073165	60,3	5,7	113,4	4	9,7	T-complex protein 1	Stress
F_3504	gil220702506	54,2	5,5	538	10	23,3	TapasinERP57	ER
F_3505	gil220702506	54,2	5,5	924,5	12	22,5	TapasinERP57	ER
F_3506	gil220702506	54,2	5,5	472,5	8	21	TapasinERP57	ER
F_3511	gil114645817	65,4	6,1	412,5	6	16,7	Chaperonin containing TCP1	Stress
F_3511	gil329402820	50,6	6,1	270,4	7	17,3	NP	Virus
F_3513	gil124387888	26,1	6,4	499,4	7	39,1	NP	Virus
F_3516	gil148886840	49,2	5,7	640,5	6	26,5	HNRNP H	Prozessierung genetischer Information
F_3526	gil297270252	78,8	5,6	123,9	5	7,7	Gelsolin	Struktur
F_3527	gil297266457	63,1	6,2	194,7	3	6,4	Inner membrane protein	Membranproteine
F_3531	gil297283366	77,3	6,9	444,1	8	15,3	HSP 75	Stress
F_3535	gil90077472	75,8	6,7	309,8	7	14,1	Unnamed protein product	Keine Zuordnung
F_3544	gil297291462	65,6	5,6	403,9	11	14,8	Ezrin	Struktur
F_3548	gil297296092	42,4	5	93,3	2	7,6	Actin, alpha cardiac muscle	Struktur
F_3549	gil297280274	74	6,6	59,1	2	4,5	Lamin A/C	Struktur
F_3551	gil52782237	65	6,4	309,2	7	14,9	Lamin A/C	Struktur
F_3552	gil297289859	18,3	10	340,7	7	44,4	26S Protease	Proteasom
F_3553	gil90075616	52,8	5,7	266,7	4	14,4	Unnamed protein product	Keine Zuordnung
F_3554	gil297273001	70	4,8	562,7	8	13,6	LOC703932	Andere
F_3559	gil109089965	54,1	6,6	39,5	1	1,7	Centrosomal protein	Prozessierung genetischer Information
F_3560	gil297259974	48,5	6,5	256,2	6	14,1	Adenosylhomocysteinase	Proteinmodifikation
F_3561	gil296474454	78,6	5	101,3	4	9	HSP 90	Stress
F_3562	gil157824097	26,1	5,4	583,6	8	45,8	Pre-mRNA-splicing factor	Prozessierung genetischer Information
F_3563	gil109083120	27,3	5,3	83,2	2	10,9	SPF27 Proteasome protein	Proteasom

F_3564	gil297301951	26,1	7,9	144,5	2	12,1	Peroxid reductase	Stress
F_3565	gil297680149	20,7	6,2	590,2	7	41,1	HSP B1	Stress
F_3566	gil297266886	42	5,3	375,1	5	27,2	Actin-related protein	Struktur
F_3567	gil297261683	23	7,8	86,7	2	13,1	Triosephosphat isomerase	Metabolismus
F_3568	gil297265432	47,8	4,7	891,2	9	26,8	Disulfide isomerase A6	Proteinmodifikation
F_3569	gil307691180	28,9	7,5	482,5	7	23	ER protein 29	ER
F_3570	gil87887875	72,2	4,9	1256,3	19	30,4	Immunoglobulin	Keine Zuordnung

MDCK_{ADH} Influenzainfektion (4.6.1): Gelkarte <https://gelmap.de/288>

Gelspot	Eintrag	MW	pI	Mascot score	pt	Sequenz- abdeckung [%]	Identifizierte Proteine (Kurzform)	Funktionelle Klassifizierung
1	gil73960920	74,2	6,6	165,1	5	10,7	Prelamin-A/C	Struktur
2	gil345794865	56,7	5,8	595	8	20,6	Disulfide-isomerase	Proteinprozessierung
3	gil50950177	38,6	7,6	1151,1	13	49,6	Annexin A2	Annexin
4	gil74012289	53,5	5,5	185,1	4	15	HSP 71	Stress
5	gil50950177	38,6	7,6	100,1	3	11,5	Annexin A2	Annexin
6	gil296477375	18,5	10,3	220,3	3	28,6	Ribosomal protein SA	Prozessierung genetischer Information
7	gil296477375	18,5	10,3	275,4	4	28,6	Ribosomal protein SA	Prozessierung genetischer Information
8	gil359279916	43,9	5	691,5	10	28,1	Keratin, type I cytoskeletal 19	Struktur
9	gil359279916	43,9	5	81,5	3	11,5	Keratin, type I cytoskeletal 19	Struktur
10	gil50979116	22,9	6,3	86,8	2	8,6	HSP beta-1	Stress
11	gil301772544	47,2	5	179,8	5	17,3	26S protease	Proteasom
12	gil57093423	37,4	6,8	355,3	6	18,3	Poly(rC)-binding protein	Prozessierung genetischer Information
13	gil73958481	39,5	9,2	714,8	10	39,6	FBP aldolase	Metabolismus
14	gil73958481	39,5	9,2	221,4	6	19,2	FBP aldolase	Metabolismus
15	gil73953093	31,6	8,7	247,4	3	14,3	Anion-selective channel	Kanal: Mitochondriale Diffusion
16	gil345786886	79,9	6,3	279,8	6	10,6	Transketolase	Metabolismus

17	gil73980918	38,8	6	419,7	5	15,8	Macrophage-capping	Transport
18	gil426348414	51,7	4,9	212,7	4	10,6	Keratin, type I cytoskeletal 10	Struktur
19	gil73954811	68,5	6	100,5	3	4,1	Radixin	Membranproteine
20	gil291387267	66,6	4,9	515,9	10	16,9	Lamin-B1	Struktur
21	gil291387267	66,6	4,9	575	12	20,6	Lamin-B1	Struktur
22	gil375065844	50,9	5,2	498	8	21,6	HNRNP K	RNA Pozeisierung
23	gil410948170	30,7	9,2	523,6	6	30	Anion-selective channel	Kannal: Mitochondriale Diffusion
24	gil359323093	54,7	5,5	244,4	4	9,4	Keratin, type II cytoskeletal 8	Struktur
25	NS1_IAPUE	25,9	6,2	334,1	8	23,9	NS1	Virus
26	NS1_IAPUE	25,9	6,2	226,5	5	19,1	NS1	Virus
27	gil6137547	41,2	5,6	115,5	4	10,6	HSP 70	Stress
28	gil345783257	106,3	5,6	342,6	9	9,4	Glucosidase AB	Proteinprozessierung
29	gil345791849	53,7	6,8	219,2	5	14,5	Keratin, type II cytoskeletal 7	Struktur
30	gil73983760	62,5	6,4	334,4	8	12,3	Stress-induced-phosphoprotein 1	Stress
31	gil359322781	86,6	5	191,1	4	7,2	HSP 105	Stress
32	gil345801870	99,1	5,4	208	5	6,5	Major vault protein	Transport
33	gil74007807	44,4	9	880,3	10	32,6	PGK	Metabolismus
34	gil73960920	74,2	6,6	614,5	7	14,3	Prelamin-A/C	Struktur
35	gil73960920	74,2	6,6	674,5	11	19,8	Prelamin-A/C	Struktur
36	gil73983760	62,5	6,4	358,9	10	17,1	Stress-induced-phosphoprotein 1	Stress
37	gil73993705	62,2	5,9	410,5	8	19,6	Dihydropyrimidinase	Regulation
38	gil73993705	62,2	5,9	266,4	4	11,7	Dihydropyrimidinase	Regulation
39	gil345789004	37	11,3	109,3	2	8,4	LOC100683352	Keine Zuordnung
40	gil73960920	74,2	6,6	87,8	2	4,4	Prelamin-A/C	Struktur
41	gil220702506	54,2	5,5	272,2	5	13,9	TapasinERP57	ER
42	gil57098823	11,6	7,7	284,9	5	44,7	S100-A11	Signaltransduktion
43	gil74012289	53,5	5,5	648,2	9	23,5	HSP 71	Stress
44	gil307938303	41,7	5,2	458,4	7	22,9	Actin, cytoplasmic 1	Struktur
45	gil73968432	56,3	5,1	491,7	7	21,3	ATP synthase	Energiemetabolismus
46	gil291394513	34,2	9,6	677,9	10	34,1	HNRNP A1	RNA Pozeisierung
47	gil73980394	48,3	4,8	203,5	4	13,4	Disulfide-isomerase	Proteinprozessierung

48	gi1307938303	41,7	5,2	191,6	3	12	Actin, cytoplasmic 1	Struktur
49	gi1307938303	41,7	5,2	967,7	12	32	Actin, cytoplasmic 1	Struktur
50	gi1307938303	41,7	5,2	265	5	17,9	Actin, cytoplasmic 1	Struktur
51	gi1307938303	41,7	5,2	334,5	6	20,8	Actin, cytoplasmic 1	Struktur
52	gi1381964	42,5	6,4	273,8	5	20,2	Actin-related protein	Struktur
54	gi1507715739	34	4,9	483,9	5	24,9	Actin, cytoplasmic 1	Struktur
55	gi1345784152	40,7	5,6	154,4	3	11,8	Actin-related protein 3	Struktur
56	gi1426348414	51,7	4,9	298,1	3	11,9	Keratin, type I cytoskeletal 10	Struktur
57	gi1426348414	51,7	4,9	101,4	3	8,4	Keratin, type I cytoskeletal 10	Struktur
58	gi1426348414	51,7	4,9	465,9	5	16,6	Keratin, type I cytoskeletal 10	Struktur
59	gi1397522843	54,8	4,9	422,5	9	19,5	Keratin, type I cytoskeletal 10	Struktur
60	gi157106334	48,2	5,2	321,2	6	16,7	Keratin, type I cytoskeletal 18	Struktur
61	gi1397485709	56	4,9	186,7	4	6,8	Keratin, type I cytoskeletal 9	Struktur
62	gi1345791904	62,8	8,6	131,1	3	6	Keratin, type II cytoskeletal 5	Struktur
63	gi1345791849	53,7	6,8	857	15	31,9	Keratin, type II cytoskeletal 7	Struktur
64	gi1359323093	54,7	5,5	331,7	4	10,8	Keratin, type II cytoskeletal 8	Struktur
65	gi1359323093	54,7	5,5	736,8	10	20	Keratin, type II cytoskeletal 8	Struktur
66	gi1359323093	54,7	5,5	131,4	4	10,8	Keratin, type II cytoskeletal 8	Struktur
67	gi1359323093	54,7	5,5	494	7	16,9	Keratin, type II cytoskeletal 8	Struktur
68	gi1359323093	54,7	5,5	356,8	8	15,5	Keratin, type II cytoskeletal 8	Struktur
69	gi1359323093	54,7	5,5	244,8	6	14,5	Keratin, type II cytoskeletal 8	Struktur
70	gi1359323093	54,7	5,5	330,3	6	11,6	Keratin, type II cytoskeletal 8	Struktur
71	gi1359323093	54,7	5,5	235,1	5	9,6	Keratin, type II cytoskeletal 8	Struktur
72	gi1397522843	54,8	4,9	406,7	4	14,6	Keratin, type I cytoskeletal 10	Struktur
73	gi1426348277	50,3	5,1	170,9	3	6,2	Keratin, type I cytoskeletal 9	Struktur
74	gi173948978	53,6	4,9	988,6	17	51,1	Vimentin	Struktur
76	gi173963357	102,5	5,2	133,9	2	2,8	Actinin-1	Struktur
77	gi173947718	104,9	5,2	295	7	8,3	Actinin-4	Struktur
78	gi173945728	69,4	5,8	437,1	8	11,4	Ezrin	Membranproteine
79	gi173945728	69,4	5,8	669,3	12	20,5	Ezrin	Membranproteine
80	gi173945728	69,4	5,8	289,8	6	11,3	Ezrin	Membranproteine

81	gil395836656	15	9,4	173,2	2	22,9	Profilin-1	Struktur
82	gil298351663	11,1	10,2	150,1	2	12	Ezrin	Membranproteine
83	gil301765406	70,5	5	411,8	9	14,6	Lamin-B1	Struktur
84	gil73960920	74,2	6,6	179,1	3	7,1	Prelamin-A/C	Struktur
85	gil73960920	74,2	6,6	1070,6	18	31,9	Prelamin-A/C	Struktur
86	gil73960920	74,2	6,6	1181	18	28,9	Prelamin-A/C	Struktur
87	gil73960920	74,2	6,6	796,4	13	22	Prelamin-A/C	Struktur
89	gil327532722	94,6	5,8	102	2	3,2	Matrin-3	Struktur
90	gil50950177	38,6	7,6	455,8	6	22,1	Annexin A2	Annexin
91	gil55742853	35,8	5,6	409,5	5	19,7	Annexin A4	Annexin
92	gil73946797	38,6	5,8	195,4	2	10,1	Annexin A1	Annexin
93	gil73946797	38,6	5,8	123	2	8,7	Annexin A1	Annexin
94	gil57100553	35,9	4,8	175,9	4	11,8	Annexin A5	Annexin
95	gil73953207	36,6	5,4	512,9	7	26,9	Annexin A8	Annexin
96	gil50978734	69,9	5,3	882,4	14	23,8	HSP 70	Stress
97	gil50978734	69,9	5,3	534,4	10	16,1	HSP 70	Stress
98	gil114158648	94,3	5	568,5	11	16,5	HSP 70	Stress
99	gil114158648	94,3	5	95	2	2,9	HSP 70	Stress
100	gil74012289	53,5	5,5	868,9	11	27,8	HSP 71	Stress
101	gil359322781	86,6	5	384,9	6	12,4	HSP 105	Stress
102	gil359322781	86,6	5	465,1	6	10,8	HSP 105	Stress
103	gil359322781	86,6	5	512,2	8	13,2	HSP 105	Stress
104	gil359322781	86,6	5	201,5	5	9,3	HSP 105	Stress
105	gil359320163	77,9	5	824,1	11	18,6	HSP 90	Stress
107	gil50950219	59,8	7	98,9	2	5,1	Catalase	Stress
108	gil157831589	41,9	6,4	449	7	24,1	HSP 70	Stress
109	gil345799849	111,4	5	265,4	6	7,8	Hypoxia up-regulated protein 1	Stress
111	gil359322074	21,9	5,1	221,7	3	18,2	Peroxidoxin-2	Stress
112	gil356461044	22,1	9,2	227	4	21,1	Peroxidoxin-1	Stress
113	NS1_IAPUE	25,9	6,2	640,1	13	40,9	NS1	Virus
114	NS1_IAPUE	25,9	6,2	129,6	4	16,1	NS1	Virus

115	NS1_IAPUE	25,9	6,2	840,8	13	53,5	NS1	Virus
116	NS1_IAPUE	25,9	6,2	129,9	3	15,2	NS1	Virus
117	NS1_IAPUE	25,9	6,2	639,3	13	40,9	NS1	Virus
118	NS1_IAPUE	25,9	6,2	333,6	6	24,8	NS1	Virus
122	gil73964198	101,2	6,4	116,1	2	3,2	C-1-tetrahydrofolate synthase	Tetrahydrofolat-Biosynthese
123	gil73964198	101,2	6,4	541	16	18	C-1-tetrahydrofolate synthase	Tetrahydrofolat-Biosynthese
124	gil73964198	101,2	6,4	691,8	15	17,6	C-1-tetrahydrofolate synthase	Tetrahydrofolat-Biosynthese
125	gil73968432	56,3	5,1	228,2	3	10,2	ATP synthase	Energiemetabolismus
126	gil73968432	56,3	5,1	395,4	6	18,2	ATP synthase	Energiemetabolismus
127	gil73968432	56,3	5,1	428,6	7	21,3	ATP synthase	Energiemetabolismus
128	gil73968432	56,3	5,1	847,3	10	29,8	ATP synthase	Energiemetabolismus
129	gil73968432	56,3	5,1	529,5	8	22,2	ATP synthase	Energiemetabolismus
130	gil73971210	89,2	5	221,4	3	6,5	ER ATPase	Energiemetabolismus
131	gil73971210	89,2	5	589,8	12	20,2	ER ATPase	Energiemetabolismus
132	gil359322253	88,3	9,9	635,5	9	14,5	Up-stream-binding protein	Prozessierung genetischer Information
133	gil359322253	88,3	9,9	608,5	11	17,4	Up-stream-binding protein	Prozessierung genetischer Information
134	gil359322253	88,3	9,9	376	9	13,7	Up-stream-binding protein	Prozessierung genetischer Information
135	gil359319035	17,1	5,1	72,5	2	5,1	Transcription factor BTF3	Prozessierung genetischer Information
136	gil359318542	88,7	5,4	422,1	5	10,8	Transcription factor 1	Prozessierung genetischer Information
137	gil407261700	45,3	9,8	308,7	4	12	EF1	Prozessierung genetischer Information
138	gil359322142	95,3	6,4	425,4	9	13,2	EF2	Prozessierung genetischer Information
139	gil359322142	95,3	6,4	78,3	2	4	EF2	Prozessierung genetischer Information
140	gil359322142	95,3	6,4	138,7	2	4	EF2	Prozessierung genetischer Information

141	gi 359322142	95,3	6,4	87,2	2	4,4	EF2	Information Prozessierung genetischer Information
142	gi 345802027	49,4	7,1	1146,6	16	40,9	EF Tu	Information Prozessierung genetischer Information
143	gi 356461040	36,6	5,7	134,2	2	9,6	Lactate dehydrogenase	Metabolismus
144	gi 73988675	36,6	9,3	519,1	11	29,8	Lactate dehydrogenase	Metabolismus
145	gi 345778157	55,1	5,3	125,1	2	6,8	NADP-dependent malic enzyme	Metabolismus
146	gi 345786886	79,9	6,3	154,3	3	5,8	Transketolase	Metabolismus
147	gi 73998802	48,4	6,5	117,1	3	11,6	Ornithin aminotransferase	Metabolismus
148	gi 55824574	22,5	5,1	123,2	4	21,8	YWHAE	Metabolismus
149	gi 73954761	68,8	9,3	236,6	5	11,1	Pyruvat dehydrogenase	Metabolismus
150	gi 89573935	24	9,7	104,4	2	9,8	GAPDH	Metabolismus
151	gi 50978862	35,8	9	379,3	6	21,6	GAPDH	Metabolismus
152	gi 89573935	24	9,7	411,7	6	29,9	GAPDH	Metabolismus
153	gi 57091277	39,3	6,2	147,6	2	10,7	FBP aldolase	Metabolismus
154	gi 74009187	62,7	8,8	668,7	12	23,7	G6PDH	Metabolismus
155	gi 74009187	62,7	8,8	394,8	9	17,6	G6PDH	Metabolismus
156	gi 74007807	44,4	9	475,9	7	26,9	PGK	Metabolismus
157	gi 345792633	28,8	6,8	766,4	9	42,5	PGM	Metabolismus
158	gi 308082020	26,7	7,7	284,9	3	19,3	TPI	Metabolismus
159	gi 308082020	26,7	7,7	718,6	12	59,4	TPI	Metabolismus
160	gi 308082020	26,7	7,7	548,4	9	50,6	TPI	Metabolismus
161	gi 359323295	30,8	5,6	323,1	6	22,1	Enoly-CoA-hydratase	Metabolismus
162	gi 345777370	27	9,7	130,9	3	18	MDH	Metabolismus
163	gi 57092971	36,4	6,6	180,1	4	15,3	MDH	Metabolismus
164	gi 73968966	85,7	8,9	834,4	15	24,7	Aconitate hydratase	Metabolismus
165	gi 73968966	85,7	8,9	235,5	6	11,4	Aconitate hydratase	Metabolismus
166	gi 73968966	85,7	8,9	148,6	5	9	Aconitate hydratase	Metabolismus
167	gi 345776619	50,9	7,9	206,9	5	12,3	Citrate synthase	Metabolismus
168	gi 57090023	28,7	5,7	237,2	4	16,9	Proteasome activator	Proteasom

169	gil301775863	29,5	6,3	232,3	5	29,7	Proteasome protein	Proteasom
170	gil126342959	25,8	7,7	176,8	4	19,2	Proteasome protein	Proteasom
171	gil73962756	27,4	6,4	150,4	3	16,7	Proteasome protein	Proteasom
172	gil345806081	72,2	4,9	1169,2	16	28,4	GRP78	Proteinprozessierung
173	gil359323746	59,6	5,5	668,2	14	26,6	T-complex protein 1	Proteinprozessierung
174	gil359323746	59,6	5,5	262	6	12,9	T-complex protein 1	Proteinprozessierung
175	gil359323746	59,6	5,5	167,6	3	8,1	T-complex protein 1	Proteinprozessierung
176	gil74000476	23,8	9,9	230	4	24,1	Peptidyl-prolyl isomerase	Proteinprozessierung
177	gil73964749	57,4	4,7	312,7	6	11	Disulfide-isomerase	Proteinprozessierung
178	gil73964749	57,4	4,7	158,9	4	7,6	Disulfide-isomerase	Proteinprozessierung
179	gil57032236	60,2	5,6	270,5	9	18	T-complex protein 1	Proteinprozessierung
180	gil73968673	57,4	6	522,1	10	27,3	T-complex protein 1	Proteinprozessierung
181	gil73968673	57,4	6	676,4	11	28,6	T-complex protein 1	Proteinprozessierung
182	gil73980527	59,4	6,9	311,3	5	11,6	T-complex protein 1	Proteinprozessierung
183	gil345802573	60,6	6,5	366,3	7	13,2	T-complex protein 1	Proteinprozessierung
184	gil359319626	56,3	7	297,9	5	10,9	T-complex protein 1	Proteinprozessierung
185	gil359319626	56,3	7	614,2	11	24,3	T-complex protein 1	Proteinprozessierung
186	gil296439772	13,4	5	91,9	2	24,4	T-complex protein 1	Proteinprozessierung
187	gil296439772	13,4	5	81,5	2	10,6	T-complex protein 1	Proteinprozessierung
188	gil350539836	60,3	5,6	428,4	9	16,2	T-complex protein 1	Proteinprozessierung
189	gil223556019	29,2	6,8	200,7	5	22,7	Carbonic anhydrase 2	Regulation
190	gil55742732	54,1	8,9	221,3	5	10,6	Dihydropyrimidinase	Regulation
191	gil73947828	28,4	5,1	130,8	2	14,4	Calpain	Regulation
193	gil73993705	62,2	5,9	309,4	4	11,4	Dihydropyrimidinase	Regulation
194	gil344243611	59	4,9	147,8	4	12	Serine/threonine phosphatase	Regulation
195	gil296482866	48,2	4,9	168,6	3	10,9	TPA: PDIA6	Medium
196	gil437331	29,1	9,2	126,6	2	6,3	Lectin	Regulation
197	gil437331	29,1	9,2	542	10	30,9	Lectin	Regulation
198	gil375065844	50,9	5,2	448,5	7	16,6	HNRNP K	RNA Poessierung
200	gil354483412	54,3	5,3	137,7	4	9,6	HNRNP L	RNA Poessierung
201	gil345801243	37,4	9,8	125,4	3	10,1	14 3 3	Signaltransduktion

202	gi173964747	23,4	5	97,1	3	22,5	Rho GDP-dissociation inhibitor	Signaltransduktion
203	gi1380783705	37,3	5,7	176,2	3	9,7	Nucleotide-binding protein	Signaltransduktion
206	gi173946510	59	4,9	75,4	2	3	Upiquillin-1	Signaltransduktion
207	gi1345801870	99,1	5,4	219	4	6	Major vault protein	Transport
208	gi1345801870	99,1	5,4	258,9	5	7,9	Major vault protein	Transport
210	gi173948241	27,8	6,2	154,9	4	22	ETHE1	Keine Zuordnung
212	gi1359323006	12,8	5,8	147	2	18,6	Dopachrome decarboxylase	Keine Zuordnung
213	gi174007500	67,9	6,1	118,6	3	4,9	Moesin	Membranproteine
214	gi173954811	68,5	6	386,4	6	10,5	Radixin	Membranproteine
215	gi173954811	68,5	6	112,7	3	4,8	Radixin	Membranproteine
216	gi1345798988	127,2	5,5	473,1	9	11,5	Vinculin	Membranproteine
217	gi1345798988	127,2	5,5	262,7	7	8,9	Vinculin	Membranproteine
218	gi1410975393	116,7	5,8	695,5	10	15,7	Vinculin	Membranproteine
219	gi1410975393	116,7	5,8	189	3	5,7	Vinculin	Membranproteine
220	gi1345782343	82,7	6,1	479,9	4	10,4	Inner membrane protein	Membranproteine
221	gi1345782343	82,7	6,1	504,3	7	15,9	Inner membrane protein	Membranproteine
222	gi1440909714	69,3	5,8	941,8	11	22,1	Serum albumin	Medium
223	gi171043798	44,3	8,9	275	5	19	Cathepsin D	Proteolysis
224	gi171043798	44,3	8,9	443,8	6	20,7	Cathepsin D	Proteolysis
225	gi173977271	32,3	6,5	111,1	3	11,4	Purine nucleoside phosphorylase	Enzyme: Multifunktional
226	gi1410965986	42,6	6,7	470,3	10	26,3	Enolase	Enzyme: Multifunktional
227	gi1345800677	49	9,3	671,5	8	18,8	Enolase	Enzyme: Multifunktional
228	gi1345800677	49	9,3	640,1	9	24,6	Enolase	Enzyme: Multifunktional
229	gi1345800677	49	9,3	579,9	6	19,2	Enolase	Enzyme: Multifunktional
230	gi150979166	92,5	4,6	1086,5	18	22,1	Endoplasmin	ER
231	gi173980918	38,8	6	215,6	4	15,8	Macrophage-capping	Transport
232	gi173980918	38,8	6	388,5	4	12,3	Macrophage-capping	Transport
233	gi173980918	38,8	6	525,9	7	21,5	Macrophage-capping	Transport
234	gi173980918	38,8	6	179,5	3	12,3	Macrophage-capping	Transport
235	gi18569616	34,5	9,4	135,4	3	9,5	Moesin	Membranproteine
236	gi1220702506	54,2	5,5	415,8	6	15,2	TapasinERP57	ER

237	gi189573935	24	9,7	105,5	3	12,5	GAPDH	Metabolismus
238	gi124234686	53,5	5,5	291,1	6	24,3	HSP 71	Stress
239	gi17739445	31,5	6,9	178,2	3	13,8	HNRNP 2H9B	RNA Pozeisierung
240	gi1359279916	43,9	5	184,9	2	9	Keratin, type I cytoskeletal 19	Struktur
241	gi1359279916	43,9	5	206,9	2	9	Keratin, type I cytoskeletal 19	Struktur
242	NS1_IAFOM	22,7	7,7	140,1	2	10,9	NS1	Virus
243	NS1_IAPUE	25,9	6,2	201,7	3	17	NS1	Virus
245	gi1345807422	48,9	4,9	144,2	4	14	26S protease	Proteasom
246	gi1395839113	41,1	7,9	126	3	7,1	Acetyl-CoA acetyltransferase	Enzyme: Multifunktional
247	gi173955189	45,7	9,6	205,5	3	10,6	Acetyl-CoA acetyltransferase	Enzyme: Multifunktional
248	gi173955189	45,7	9,6	228	3	10,6	Acetyl-CoA acetyltransferase	Enzyme: Multifunktional
249	gi1109115381	47,2	4,7	365	4	13	Keratin, type I cuticular Ha1	Struktur
250	gi1345780449	68,6	8,5	142,5	3	7	Oxidoreductase	Electronen Transport
251	gi157091277	39,3	6,2	136,1	2	10,7	FBP aldolase	Metabolismus
252	gi1345777924	80,8	6	103,1	2	3	Gelsolin	Struktur
253	gi1359321220	83,6	6,9	100,9	2	4,4	Glycyl-tRNA synthetase	Prozeisierung genetischer Information
254	gi174012289	53,5	5,5	144,3	5	14,4	HSP 71	Stress
255	gi174012289	53,5	5,5	424,9	6	17,8	HSP 71	Stress
256	gi174012289	53,5	5,5	199,5	4	11,8	HSP 71	Stress
257	gi1345795823	35,9	9,4	108,4	2	6,4	Hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase	Metabolismus
258	gi1345799849	111,4	5	159,5	3	4,4	Hypoxia up-regulated protein 1	Stress
259	gi1359323093	54,7	5,5	157,3	3	7,7	Keratin, type II cytoskeletal 8	Struktur
260	gi1359323093	54,7	5,5	199,4	4	10,2	Keratin, type II cytoskeletal 8	Struktur
261	gi1472387987	66,4	5	290,2	4	10,6	Lamin-B1	Struktur
262	gi173987072	106,6	5,9	213,8	5	6,4	Ion protease	Proteasom
263	gi1345800677	49	9,3	332	4	11,2	Enolase	Enzyme: Multifunktional
264	gi1359322791	58,5	6,4	145,8	3	7,1	Paraspeckle	Prozeisierung genetischer Information
265	gi1359318542	88,7	5,4	179	3	5	Transcription factor 1	Prozeisierung genetischer Information

266	gil359324173	115,2	5,8	93,7	2	2,6	Ubiquitin modifier	Proteinprozessierung
267	gil73960161	49,4	9,8	130	3	10,4	Acyl-CoA-dehydrogenase	Metabolismus
268	gil74007500	67,9	6,1	121,4	3	4,2	Moesin	Membranproteine
269	gil74007500	67,9	6,1	130,6	3	4,9	Moesin	Membranproteine
270	gil73960920	74,2	6,6	252,3	4	7,7	Prelamin-A/C	Struktur
271	gil73960920	74,2	6,6	246,4	5	10,2	Prelamin-A/C	Struktur
272	gil73960920	74,2	6,6	139,9	4	7,8	Prelamin-A/C	Struktur
273	gil397512371	9,8	10,1	109,3	2	31,9	Profilin-2	Struktur
275	gil345794865	56,7	5,8	295,2	5	13,9	Disulfide-isomerase	Proteinprozessierung
277	gil73970888	73,6	5,9	155,6	3	5,6	Stress-70 protein	Stress
278	gil57100954	46,8	7,5	236,9	5	15,3	Succinyl-CoA-ligase	Metabolismus
279	gil345796700	55,3	5,8	92,3	2	4	Thioredoxin	ER
280	gil351697839	25,8	9,6	359,8	5	28,4	HNRNP A1	RNA Prozessierung
281	gil296482866	48,2	4,9	157,3	3	10,9	TPA: PDIA6	Medium
282	gil345806081	72,2	4,9	97	2	4,9	GRP78	Proteinprozessierung
283	gil73960920	74,2	6,6	122,2	2	3,9	Prelamin-A/C	Struktur

MDCK_{SUS} Influenzainfektion (4.6.1): Gekarte <https://gelmap.de/297>

Gelspot	Eintrag	MW	pI	Mascot score	pt	Sequenz- abdeckung [%]	Identifizierte Proteine (Kurzform)	Funktionelle Klassifizierung
1	gi 73970116	157,6	6,5	65,2	2	1,9	Leucine-rich PPR protein	Prozessierung genetischer Information
2	gi 73980527	59,4	6,9	593,7	9	19,9	T-complex protein 4	Proteinprozessierung
3	gi 375065844	50,9	5,2	114,3	3	7,1	HNRNP K	RNA Prozessierung
4	gi 57106334	48,2	5,2	66,5	2	5,3	Keratin, type I cytoskeletal 18	Struktur
5	gi 345783185	21,2	6	141,3	2	12,3	Phosphatase 1	Keine Zuordnung
7	gi 345780013	101,9	6,8	239,8	5	7	Staphylococcal nuclease	Prozessierung genetischer Information
8	gi 73968966	85,7	8,9	123,7	3	5,5	Aconitate Hydratase	Metabolismus
9	gi 73968966	85,7	8,9	194,6	3	4,6	Aconitate Hydratase	Metabolismus
10	gi 73968966	85,7	8,9	108,6	2	3,6	Aconitate Hydratase	Metabolismus
12	gi 345777924	80,8	6	366,1	8	9,9	Gelsolin	Struktur
13	gi 345777924	80,8	6	480,2	10	13,4	Gelsolin	Struktur
14	NCAP_IAPUE	56,1	9,9	816,8	13	34,1	NP	Virus
15	gi 359323093	54,7	5,5	300,5	6	13,8	Keratin, type II cytoskeletal 8	Struktur
16	gi 301775757	54,4	5,4	84,9	2	5,7	Keratin, type II cytoskeletal 8	Struktur
17	NS1_IAPUE	25,9	6,2	731,2	12	43,5	NS1	Virus
18	NS1_IAPUE	25,9	6,2	310,2	5	17,4	NS1	Virus
19	NS1_IAPUE	25,9	6,2	527,2	9	31,3	NS1	Virus
20	NS1_IAPUE	25,9	6,2	111,2	2	11,3	NS1	Virus
21	gi 359279916	43,9	5	545,8	9	24,3	Keratin, type I cytoskeletal 19	Struktur
22	NS1_IACAO	10,4	10	168,1	4	32,2	NS1	Virus
23	NS1_IACAO	10,4	10	117,7	2	28,9	NS1	Virus
24	NS1_IAPUE	25,9	6,2	116,4	2	11,7	NS1	Virus
25	gi 359279916	43,9	5	625,8	10	27,1	Keratin, type I cytoskeletal 19	Struktur
26	gi 114667511	58,2	5	596,8	8	19,4	Keratin, type I cytoskeletal 10	Struktur
27	gi 73946797	38,6	5,8	363,9	6	23,2	Annexin A1	Annexin

28	gi 48145673	49,1	5,8	741,8	8	29,8	HNRNP H1	RNA Poessierung
29	gi 345802027	49,4	7,1	792,2	11	32,7	EF Tu	Prozessierung genetischer Information
30	gi 345794484	44,6	6,3	185,4	4	10,1	TAR DNA binding protein	Prozessierung genetischer Information
31	gi 73960920	74,2	6,6	880,5	12	22,9	Prelamin-A/C	Struktur
32	gi 73960920	74,2	6,6	509,2	8	15,9	Prelamin-A/C	Struktur
33	gi 50978734	69,9	5,3	1358,4	19	31,6	HSP 70	Stress
34	gi 345806081	72,2	4,9	416,8	7	14,8	GRP78	Proteinprozessierung
35	gi 50978734	69,9	5,3	1357,3	20	30,5	HSP 70	Stress
36	gi 57032236	60,2	5,6	331,4	6	10,3	T-complex protein 2	Proteinprozessierung
37	gi 57106334	48,2	5,2	391,1	8	15,5	Keratin, type I cytoskeletal 18	Struktur
38	gi 73992048	27,8	4,6	249,3	3	15,6	14 3 3	Signaltransduktion
40	gi 73992048	27,8	4,6	387,9	6	22,1	14 3 3	Signaltransduktion
41	gi 73945728	69,4	5,8	153,3	3	4,6	Ezrin	Struktur
43	gi 345806081	72,2	4,9	266,4	5	12,8	GRP78	Proteinprozessierung
44	gi 61740600	57,7	4,9	155	2	7	Keratin, type I cytoskeletal 10	Struktur
46	gi 359322052	61,1	5,6	424,7	6	16,3	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	Metabolismus
47	gi 359322253	88,3	9,9	87,9	2	2,9	Up-stream binding protein	Prozessierung genetischer Information
48	gi 345777924	80,8	6	292,3	5	8,2	Gelsolin	Struktur
49	gi 345786673	78,8	9,8	137,9	4	7,8	HNRNP M	RNA Poessierung
50	gi 73996063	75,1	6,8	154,6	4	7,3	PAPS synthase	Metabolismus
51	gi 345794325	59,1	7	144,4	2	5,9	TRNA _{syn}	Regulation
52	gi 73980527	59,4	6,9	311,1	8	16,2	T-complex protein 3	Proteinprozessierung
53	gi 73976741	51,4	7,8	86,6	2	7,2	Adenylyl cyclase-associated protein	Struktur
54	gi 73989664	96,1	6	218,1	4	5,8	Programmed cell death 6	Signaltransduktion
55	gi 74005729	92,7	5,8	186,9	6	6,4	Villin	Struktur
56	gi 73954811	68,5	6	191,4	4	6,5	Radixin	Membranproteine
57	gi 73960920	74,2	6,6	408,3	8	15,3	Prelamin-A/C	Struktur

58	gi1359319626	56,3	7	702,7	12	22,9	T-complex protein 7	Proteinprozessierung
59	gi173980374	43,6	6	127,2	3	10,4	S-adenosylmethionine synthase	Metabolismus
61	gi1344246933	23,7	10,1	107,7	2	10	HNRNP A/B	RNA Poesisierung
62	gi1255317	2,4	11	100,4	2	100	HNRNP A2	RNA Poesisierung
63	NCAP_IAPUE	56,1	9,9	455,8	12	23,3	NP	Virus
66	PA_IAP10	82,5	5,3	99,3	3	6,8	Polymerase acidic protein	Virus
67	gi173970888	73,6	5,9	465,4	7	13,7	Stress 70 protein	Stress
68	gi173970888	73,6	5,9	609,4	9	17,2	Stress 70 protein	Stress
69	gi174012289	53,5	5,5	302,5	4	12	HSP 71	Stress
70	gi150978734	69,9	5,3	554,7	9	17,2	HSP 70	Stress
71	gi150978734	69,9	5,3	675,8	10	18,9	HSP 70	Stress
72	gi1149029725	15	4,7	228,9	3	30,9	Polypeptide	Regulation
73	NS1_IAPUE	25,9	6,2	44,2	2	9,6	NS1	Virus
74	gi1375065844	50,9	5,2	384,2	7	14,4	HNRNP K	RNA Poesisierung
76	gi157032236	60,2	5,6	125,4	4	8,1	T-complex protein 1	Proteinprozessierung
77	gi1345787749	48,2	4,2	76,3	2	3,8	Calreticulin	Regulation
78	gi174005772	51	4,8	513,9	8	22,8	Tubulin	Struktur
79	gi157106334	48,2	5,2	593,6	10	21,6	Keratin, type I cytoskeletal 18	Struktur
80	gi157106334	48,2	5,2	1335,1	21	45,9	Keratin, type I cytoskeletal 18	Struktur
81	gi150815	42,2	6,7	655,5	9	22,4	Unnamed protein product	Keine Zuordnung
82	gi1426348414	51,7	4,9	398,9	5	12,1	Keratin, type I cytoskeletal 10	Struktur
83	gi1426348414	51,7	4,9	167,8	3	11,9	Keratin, type I cytoskeletal 10	Struktur
84	gi1359279916	43,9	5	1025,3	16	40,9	Keratin, type I cytoskeletal 19	Struktur
85	gi173963740	38,3	5,2	172,2	4	10,7	Activator HSP	Stress
86	gi150978800	42,1	5,4	734,5	11	28,1	galactokinase	Metabolismus
87	gi173946797	38,6	5,8	1004	11	37,7	Annexin A1	Annexin
88	gi1426348414	51,7	4,9	123	2	6,3	Keratin, type I cytoskeletal 10	Struktur
91	gi1114158648	94,3	5	250,2	5	7	HSP 70	Stress
92	gi173946797	38,6	5,8	942,1	10	29,3	Annexin A1	Annexin
93	gi157043172	36,4	5,3	283,9	6	16,9	ETIF 3I	Prozessierung genetischer Information

94	gi 354623047	30	5	478,5	6	30,6	RP/EB	Struktur
95	gi 74007500	67,9	6,1	111,6	2	1,9	Moesin	Membranproteine
96	gi 160425231	226,3	5,4	239,1	4	3,6	Myosin-9	Struktur
97	gi 426348414	51,7	4,9	588,1	4	11,9	Keratin, type I cytoskeletal 10	Struktur
98	gi 73952886	60,9	5,6	267,9	6	11,2	Hydroxylase	Struktur
99	gi 291405834	29,8	5,5	302,4	6	24,6	Prohibitin	Prozessierung genetischer Information
100	gi 57088975	26,4	9	172	4	12,2	Calcyclin-binding protein	Regulation
101	gi 73963046	27,6	5,2	106,3	3	12,5	Proteasome protein	Proteasom
102	NS1_IAPUE	25,9	6,2	449,8	10	31,3	NS1	Virus
103	gi 50979090	21,1	4,6	173,9	3	22,2	Calcyphosin	Signaltransduktion
104	gi 397522843	54,8	4,9	620,9	9	27,4	Keratin, type I cytoskeletal 10	Struktur
105	gi 58891281	12,7	4,8	77,5	2	15,7	Cytosolic prostaglandin E synthase	Prozessierung genetischer Information
107	gi 119612222	47,3	9,7	152,6	3	10,3	Poly(A) binding protein	Prozessierung genetischer Information
108	gi 345790650	77,4	4,4	209,2	5	7,6	Nucleolin	Keine Zuordnung
109	gi 73946797	38,6	5,8	294,3	3	10,1	Annexin A1	Annexin
110	gi 345786886	79,9	6,3	277,6	4	8	Transketolase	Metabolismus
111	gi 119612222	47,3	9,7	191,5	4	12,9	Poly(A) binding protein	Prozessierung genetischer Information
112	gi 383417507	51,8	9,9	226	4	11,8	Poly(A) binding protein	Prozessierung genetischer Information
113	gi 345790650	77,4	4,4	269,3	4	7,6	Nucleolin	Keine Zuordnung
114	gi 73989664	96,1	6	227,6	4	5,5	Programmed cell death 6	Signaltransduktion
115	gi 73946797	38,6	5,8	441,6	6	21,4	Annexin A1	Annexin
116	gi 410965312	18,1	5,1	248,9	3	25,5	Ubiquitin-conjugating enzyme	Regulation
117	gi 73948546	15,5	10,2	69,5	2	17,4	Programmed cell death 5	Signaltransduktion
118	gi 375065844	50,9	5,2	162,3	4	9,1	HNRNP K	RNA Pozessierung
119	NCAP_IAPUE	56,1	9,9	696,3	16	32,1	NP	Virus
120	gi 345317198	45,3	9,3	118,7	3	8	HNRNP M	RNA Pozessierung

121	NCAP_IAPUE	56,1	9,9	564,6	12	27,1	NP	Virus
122	giI440907832	44,2	6,3	231,3	5	17,5	Actin-related protein	Struktur
123	giI57099501	37,5	6,8	111,4	3	7,1	Transaldolase	Metabolismus
124	giI73983298	30,1	7,8	298,8	5	19,8	NADH dehydrogenase	Metabolismus
125	giI73960920	74,2	6,6	747,2	13	18,9	Prelamin-A/C	Struktur
126	giI50979116	22,9	6,3	438,4	8	35,4	HSP beta-1	Stress
127	giI57106334	48,2	5,2	576,2	8	21,1	Keratin, type I cytoskeletal 18	Struktur
128	giI426328917	18	6,5	101,5	2	16,3	Proteasome protein	Proteasom
130	giI345805121	31	5,9	610,2	7	30,6	Proteasome protein	Proteasom
132	giI307938303	41,7	5,2	211,6	3	12	Actin, cytoplasmic 1	Struktur
134	NS1_JAANN	24,4	7,7	105	2	11,5	NS1	Virus
135	giI345783239	85,1	4,7	95,6	2	3,2	HNRNP U	RNA Pozeisierung
137	giI359323540	108,2	6,2	185,7	4	4,7	Purine biosynthetic protein	Metabolismus
138	NS1_IAPUE	25,9	6,2	104,7	2	11,7	NS1	Virus
139	giI426348414	51,7	4,9	195,8	2	6,3	Keratin, type I cytoskeletal 10	Struktur
140	giI359322142	95,3	6,4	172,2	4	8,4	EF 2	Prozeisierung genetischer Information
141	giI74007500	67,9	6,1	100,5	2	1,9	Moesin	Membranproteine
142	giI73960920	74,2	6,6	481,4	7	14,9	Prelamin-A/C	Struktur
143	giI73960920	74,2	6,6	233,1	2	4,5	Prelamin-A/C	Struktur
144	giI47132620	65,4	8,9	521,1	7	16,7	Keratin, type II cytoskeletal 2	Struktur
145	giI73993705	62,2	5,9	171,4	3	8	Dihydropyrimidinase	Struktur
146	giI57032236	60,2	5,6	688,3	11	20,3	T-complex protein 5	Proteinprozeisierung
147	giI149730129	92	5,1	230,1	4	8,2	HSP 105	Stress
148	giI114667511	58,2	5	725,1	6	15,6	Keratin, type I cytoskeletal 10	Struktur
149	giI73951809	56,2	9	254,9	7	12,1	Cytosol aminopeptidase	Proteasom
150	NCAP_IAPUE	56,1	9,9	589,1	16	31,7	NP	Virus
151	giI488530430	45	6,5	429,4	6	24,4	HNRNP H	RNA Pozeisierung
152	giI13278504	34,1	8,8	114,8	3	11,8	Psmc5	Proteasom
153	giI148702336	36,3	6,3	376,7	9	34,4	26S Protease	Proteasom
154	giI74002259	39,8	7,2	65,1	2	9,6	Methionine aminopeptidase	Proteinprozeisierung

155	gi173974844	35,8	6,8	141,4	2	7,8	GDP-L-fucose synthase	Keine Zuordnung
156	gi173960920	74,2	6,6	182,1	3	6,3	Prelamin-A/C	Struktur
157	gi189573935	24	9,7	170,1	2	12,5	GAPDH	Metabolismus
158	gi150950177	38,6	7,6	153,7	2	5,6	Annexin A2	Annexin
159	gi175517570	29,4	9,7	493	7	28,5	HNRNP A1	RNA Pozeisierung
160	gi174011500	34	6,7	384,2	5	18,1	Uridine phosphorylase	Metabolismus
161	gi1359322253	88,3	9,9	168,1	5	8,2	Up-stream binding protein	Prozeisierung genetischer Information
162	gi173960920	74,2	6,6	636,3	9	18	Prelamin-A/C	Struktur
164	gi1426348414	51,7	4,9	433,1	9	21,5	Keratin, type I cytoskeletal 10	Struktur
166	NCAP_IAZCA	56,1	9,9	73,9	2	5,6	NP	Virus
168	NS1_IAPUE	25,9	6,2	225,5	5	20,9	NS1	Virus
169	gi1356461018	23	6,2	322,4	4	27,8	Proteasome protein	Proteasom
170	ALBU_BOVIN	69,2	5,8	667,6	8	16,3	Serum albumin	Medium
171	gi1354542529	31,3	4,8	187,1	4	13,3	Ubiquitin thioesterase	Proteinprozeisierung
172	gi157106334	48,2	5,2	1021,2	12	32	Keratin, type I cytoskeletal 18	Struktur
173	gi1505779595	19,2	7,7	123	2	19,3	Prohibitin	Prozeisierung genetischer Information
174	gi173967136	33,5	5,2	155,4	4	13,1	Glyoxylase	Prozeisierung genetischer Information
175	gi173960920	74,2	6,6	149,3	2	4,7	Prelamin-A/C	Struktur
176	gi1345807932	35,8	8,7	487,8	6	20,7	GAPDH	Metabolismus
178	gi1307938303	41,7	5,2	538,1	7	20,5	Actin, cytoplasmic 1	Struktur
179	gi157032236	60,2	5,6	501,7	11	18,9	T-complex protein 6	Proteinprozeisierung
180	gi1410959298	83,2	4,8	462,3	11	19,2	HSP 90	Stress
181	gi161740600	57,7	4,9	411,6	5	12,3	Keratin, type I cytoskeletal 10	Struktur
182	gi121465643	25,8	7,7	194,6	3	12	20S Proteasome	Proteasom
183	gi173983543	43,9	4,4	97,9	2	2,8	Nucleosome	Struktur
184	gi1296485609	62,1	5,2	130,9	3	6	Lamin B1	Struktur
185	gi173997922	45,6	5,2	352	5	15	HNRNP F	RNA Pozeisierung
186	gi1224036359	46,9	5,1	655,5	9	20	Pdcd4	Keine Zuordnung

188	gi155741585	41,6	6	359,5	5	16	Actin, cytoplasmic 2	Struktur
189	gi173945680	30,3	6,9	189,2	2	10,9	Methyltransferase	Proteinprozessierung
190	gi173946797	38,6	5,8	319,5	5	14,2	Annexin A1	Annexin
191	gi1345777924	80,8	6	67,1	2	3	Gelsolin	Struktur
192	gi1359321324	34,8	11,7	248,9	3	12,7	LOC100856713	Keine Zuordnung
193	gi127805849	20	6,9	111,8	2	11,4	Crystallin B	Struktur
194	M1_IAANN	27,9	10,1	132,4	3	14,3	Matrix protein 1	Virus
195	NS1_IAPUE	25,9	6,2	176,3	3	15,2	NS1	Virus
196	gi1345791165	40	9,4	168,3	4	10,2	ER29	Keine Zuordnung
197	gi1344252649	32	5,1	165,9	3	15,5	Actin, cytoplasmic 2	Struktur
198	gi157106334	48,2	5,2	200,5	4	12,3	Keratin, type I cytoskeletal 18	Struktur
200	gi1359320163	77,9	5	255,8	7	11,8	HSP 90	Stress
201	gi1359324369	16,8	5,5	58,9	2	18	Dioxygenase	Metabolismus
203	gi1345789049	46,3	5,8	140,9	2	4,3	Adipocyte plasma membrane-associated	Keine Zuordnung
204	gi173979767	82,4	6,9	118,1	3	5,1	RNA helicase DDX1	Prozessierung genetischer Information
205	gi173979767	82,4	6,9	86,9	2	3,4	RNA helicase DDX1	Prozessierung genetischer Information
207	gi1345782343	82,7	6,1	246,3	6	13,4	Inner membrane protein	Membranproteine
208	NS1_IAPUE	25,9	6,2	223,6	4	20,4	NS1	Virus
209	gi189573935	24	9,7	246,9	4	21,9	GAPDH	Metabolismus
210	gi173983298	30,1	7,8	173,1	4	19,4	NADH dehydrogenase	Metabolismus
211	gi1345803242	25	5,6	183,5	3	19,2	Peroxidase-6	Stress
212	gi1298351663	11,1	10,2	100,5	2	12	Ezrin	Struktur
213	NS1_IAPUE	25,9	6,2	338,6	6	23,5	NS1	Virus
216	gi1426348414	51,7	4,9	437,6	5	10,6	Keratin, type I cytoskeletal 10	Struktur
217	gi1345800677	49	9,3	128,8	3	9,8	Enolase	Enzyme: Multifunktional
218	gi174007970	49,2	5,9	553,5	5	18,3	HNRNP H2	RNA Prozessierung
219	gi173980374	43,6	6	165,2	3	10,4	S-adenosylmethionine synthase	Metabolismus
220	gi1359322781	86,6	5	127	2	4,8	HSP 105	Stress

225	gi174012289	53,5	5,5	405,1	7	18,1	HSP 71	Stress
226	gi174012289	53,5	5,5	232	6	14,4	HSP 71	Stress
227	gi1410970793	46,5	5,2	441,4	4	11,5	EIF4A2	Prozessierung genetischer Information
229	NS1_IAANN	24,4	7,7	56	2	9,7	NS1	Virus
230	gi173998802	48,4	6,5	92,2	2	6,8	Ornithin aminotransferase	Metabolismus
231	gi1345802027	49,4	7,1	86,1	3	8,2	EF Tu	Prozessierung genetischer Information
232	gi1345789049	46,3	5,8	140,9	2	4,3	Adipocyte plasma membrane-associated	Keine Zuordnung
233	gi189573987	40,7	5,9	82,9	2	4,7	Isocitrate dehydrogenase 1	Metabolismus

MDCK Zelllinienvergleich (3.2.4)

Gelspot	Eintrag	MW	pI	Mascot score	pt	Sequenz [%]	Identifizierte Proteine (BLAST)
Sus_01	F1PYV1	106,2	7,4	471,1	6	8,2	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic
Sus_03	E2RHG2	22,1	9,2	666,1	9	39,2	Peroxisredoxin-1
Sus_04	F1PQN5	18,5	9,1	275	4	26,5	Cofilin-1
Sus_05	F1PW98	55	5,5	305	4	8,3	Keratin, type II cytoskeletal 8
Sus_06	F1PBJ3	74,2	6,6	397,1	3	7,1	Prelamin-A/C
Sus_07	F1PBJ3	74,2	6,6	624,6	6	12,3	Prelamin-A/C
Sus_08	F1PC59	24,7	5,6	355	3	15,8	Peroxisredoxin 6
Sus_10	F1P6B7	38,6	5,8	1242,5	14	47	Annexin A1
Sus_11	F1PLS4	53,6	4,9	623,8	8	18,2	Vimentin
Sus_12	E2QSM8	110,3	9,6	132,8	2	2,6	Serotransferrin
Sus_13	F1Q0N9	43,9	5	1129,6	11	36,3	Keratin, type I cytoskeletal 19
Sus_14	E2RQ14	35,9	4,8	1000,7	13	43,6	Annexin A5
Sus_15	F1PW98	55	5,5	590,6	6	11,4	Keratin, type II cytoskeletal 8
Sus_16	F1PW98	55	5,5	921	9	17,2	Keratin, type II cytoskeletal 8
Sus_17	F1PE28	63,1	6,8	686,7	9	20,1	Transketolase
Sus_18	F1PIC7	72,2	4,9	828,6	10	21,7	78 kDa glucose-regulated protein

Sus_20	E2RJ06	35	4,7	652,2	8	24,8	Laminin-binding protein/ 40S ribosomal protein SA
Sus_22	F1PL93	23,4	5	605,2	11	37,7	Rho GDP-dissociation inhibitor 1
Sus_23	E2RMA1	19,6	4,7	367,3	4	29,7	Tumor protein translationally-controlled 1
Sus_24	F1PBJ3	74,2	6,6	417	5	11,3	Prelamin-A/C
Sus_25	F1PYV1	106,2	7,4	632,7	7	9,8	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic
Sus_26	E2RMX7	54,6	8,6	682,4	9	24,2	Retinal dehydrogenase 1
Sus_29	F1PW98	55	5,5	945,8	11	23,9	Keratin, type II cytoskeletal 8
Sus_30	E2R743	83,7	6,1	169,5	2	5	Mitochondrial inner membrane protein
Sus_31	F1PCH3	46,8	9,7	807	9	24,9	Enolase
Sus_32	F1PYV1	106,2	7,4	1042,1	11	15,4	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic
Sus_32	E2RHG2	22,1	9,2	615,8	8	44,2	Peroxiredoxin-1
Sus_33	E2QU37	42,2	4,3	488,6	6	14,7	Calreticulin
Sus_34	J9NWX5	11,4	5	140,5	2	19,8	Thioredoxin
Sus_35	F1PW98	55	5,5	407,1	6	11,6	Keratin, type II cytoskeletal 8
Sus_37	E2R0S6	42,6	6,6	655,5	8	24,6	Annexin A8
Sus_38	Q6YKA4	24,9	5,5	340,2	5	23,3	High mobility group protein
Sus_38	F1PCH3	46,8	9,7	544,1	7	19,3	Enolase
Sus_39	F1PL93	23,4	5	585,2	8	37,3	Rho GDP-dissociation inhibitor 1
Sus_40	E2RAU5	73,6	5,9	402,5	5	10,6	Stress-70 protein, mitochondrial
Adh_01	E2RSI6	69,4	5,8	217,4	2	4,3	Ezrin
Adh_02	E2RSI6	69,4	5,8	435,2	5	7,7	Ezrin
Adh_03	F1P6B7	38,6	5,8	498,7	4	17,4	Annexin A1
Adh_05	F1PL93	23,4	5	583,9	7	35,8	Rho GDP-dissociation inhibitor 1
Adh_06	F1PXG4	35,9	5,6	322,5	4	16,6	Annexin A13
Adh_07	F1PIB3	39,2	6,1	236,8	2	9	L-lactate dehydrogenase
Adh_08	F1PBJ3	74,2	6,6	859,3	8	16,5	ATP synthase subunit alpha
Adh_08	E2RNG2	59,6	9,6	734,3	8	20,6	Prelamin-A/C
Adh_09	E2RMX7	54,6	8,6	175,8	3	8,3	Retinal dehydrogenase 1
Adh_10	F1PCH3	46,8	9,7	672,9	5	16,1	Enolase
Adh_11	F2Z4Q6	68,6	5,4	266,6	3	6,4	Serum albumin (Canis familiaris)
Adh_12	F1Q332	88,9	9,6	232,6	3	4,4	Glycine-tRNA ligase

Adh_14	F1PBJ3	74,2	6,6	306,9	3	7,1	Prelamin-A/C
Adh_15	E2QWY5	20,9	9,5	170,4	3	22,7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta
Adh_16	E2R0S6	42,6	6,6	509,9	6	20,5	Annexin A8
Adh_17	F1PRB0	50,9	6,1	621,4	8	21,5	Keratin, type II cytoskeletal 7
Adh_18	E2RSI6	69,4	5,8	661,8	7	13,5	Ezrin
Adh_19	F1PCH3	46,8	9,7	929	11	27,3	Enolase
Adh_20	F1PBJ3	74,2	6,6	437,7	6	12,2	Prelamin-A/C
Adh_22	F1PBJ3	74,2	6,6	442,9	5	11,3	Prelamin-A/C
Adh_24	gi 359323093	54,7	5,5	1006,5	12	23,4	Keratin, type II cytoskeletal 8
Adh_26	E2RSI6	69,4	5,8	357,1	3	4,4	Ezrin
Adh_27	E2RJ06	35	4,7	528,9	4	17,8	Laminin-binding protein/ 40S ribosomal protein SA
Adh_28	F1PE28	63,1	6,8	197,6	3	9	transketolase
Adh_29	E2RJ06	35	4,7	673,4	8	24,8	Laminin-binding protein/ 40S ribosomal protein SA
Adh_31	F1P7V6	62,7	6,9	259,9	4	10,6	stress-induced-phosphoprotein 1
Adh_32	F1PBZ4	30,8	9,1	240,2	2	11,6	NAD(P)H dehydrogenase
Adh_33	F1P6B7	38,6	5,8	1163,7	13	45,8	Annexin A1
Adh_35	F1PXC4	35,9	5,6	999,9	7	31	Annexin A4
Adh_36	gi 73983760	62,5	6,4	268,6	2	5,2	Stress-induced-phosphoprotein 1

A.3. Überrepräsentationsanalyse in Reaktom für die Zelllinienadaptation

Die MDCK_{ADH} Zelllinie wurde an Suspensionswachstum in Medium frei von tierischem Serum adaptiert. Dargestellt sind die Ergebnisse der Überrepräsentationsanalyse in Reaktom (Croft et al. 2014) zur Detektion zellulärer Prozesse, denen mehrere differenziell exprimierte Proteine nach Serumentzug zugeordnet werden konnten. Als Grenze für die Auflistung wurde manuell eine *un-adjusted probability* von $\leq 0,0006$ gewählt.

<i>Un-adjusted probability</i>	P	T	Reactom-ID	Biologischer Prozess	Uniprot-ID ¹
Zunehmende Expression nach Serumentzug					
0,00004	4	54	REACT_25325	Destabilization of mRNA by AUF1 (hnRNP D0)	Q06323, Q53HF2, P25788, P25789
0,00013	2	5	REACT_150386	Endostatin degradation by cathepsins	P07711, P07339
0,00020	2	6	REACT_22244	Linkage of L1 with treadmilling F-actin	P15311, P60709
0,00020	2	6	REACT_22109	Dephosphorylation of pL1 (Y1176)	P15311, P60709
0,00026	4	86	REACT_24994	Regulation of mRNA Stability by Proteins that Bind AU-rich Elements	Q06323, Q53HF2, P25788, P25789
0,00047	2	9	REACT_9951	Dab2 is recruited to the junctional plaques	P09497, P60709
0,00054	3	44	REACT_111172	Proteasomal cleavage of exogenous antigen	Q06323, P25788, P25789
0,00058	3	45	REACT_25343	Destruction of AUF1 and mRNA	Q06323, P25788, P25789
0,00058	2	10	REACT_2086	Purine catabolism	P00491, P07203
Abnehmende Expression nach Serumentzug					
$\leq 0,00001$	7	31	REACT_1520	Gluconogenesis	zu viele
$\leq 0,00001$	6	27	REACT_1383	Glycolysis	P18669, P06733,

									P05062, P04406,
									P00558, P06744
								zu viele	
								zu viele	
								P61978, Q14103,	
								P31943, P55795,	
								P22626	
								P15311, P35241,	
								P60709	
								P15311, P35241,	
								P60709	
								P62333, Q14103,	
								P25786, P62191,	
								P28070	
								P78371, P50991,	
								P60709	
								P78371, P50991,	
								P60709	
								P78371, P50991,	
								P60709	
								zu viele	
								zu viele	
								zu viele	
								P61978, Q14103,	

≤0,00001	7	62	REACT_723	Glucose metabolism					
≤0,00001	6	54	REACT_25325	Destabilization of mRNA by AUF1 (hnRNP D0)					
0,00001	5	34	REACT_1877	Formation of pre-mRNPs					
0,00001	3	6	REACT_22244	Linkage of L1 with treadmilling F-actin					
0,00001	3	6	REACT_22109	Dephosphorylation of pL1 (Y1176)					
0,00004	5	45	REACT_25343	Destruction of AUF1 and mRNA					
0,00005	3	9	REACT_17050	Folding of actin by CCT/TriC					
0,00005	3	9	REACT_16915	Hydrolysis of ATP and release of folded actin from CCT/TriC					
0,00005	3	9	REACT_17011	Exchange of ADP for ATP in CCT/TriC:actin complex					
0,00010	6	86	REACT_24994	Regulation of mRNA Stability by Proteins that Bind AU-rich Elements					
0,00011	26	1446	REACT_111217	Metabolism					
0,00023	9	238	REACT_474	Metabolism of carbohydrates					
0,00028	5	66	REACT_222	Formation of the Spliceosomal E complex					

0,00045	4	41	REACT_22365	Recycling pathway of L1	P31943, P55795, P22626
0,00046	2	4	REACT_22428	L1 binds ERM family members	Q16555, P15311, P35241, P60709
0,00046	2	4	REACT_22211	L1 trans-homophilic interaction	P15311, P35241
0,00046	2	4	REACT_21290	Release of (inferred) platelet cytosolic components	P23528, Q01518
0,00059	4	44	REACT_111172	Proteasomal cleavage of exogenous antigen	P62333, P25786, P62191, P28070

1 – UniProt KB Einträge als Ergebnis des Blast homologer humaner Proteine im Anschluss an die Spektrensuche nach MALDI-TOF/TOF-MS Peptidanalytik (Abschnitt 3.4.4); P – Number of mapped proteins, T – Total number of proteins in the pathway.

A.4. Differenzielle Proteinexpression zwischen einer adhärennten MDCK Zelllinie und ihrer verwandten Suspensionszelllinie

Aufgeführt sind differenziell exprimierte Proteine zwischen MDCK_{ADH} und MDCK_{SUS} Zellen. Die Zellen wurden im 1L-BR bis zu einer Zellkonzentration von $1 \pm 0, 1 \times 10^6$ Zellen/mL kultiviert (Abschnitt 3.2.4). Es wurden nur Proteine mit signifikant verändertem $R(x)_{LF}$ betrachtet (t -Test, p -Wert $\leq 0,05$, $\geq 1,4$ -fache Differenz, Abschnitt 3.4.6). Die LF-Methode ermöglichte die relative Proteinquantifizierung unabhängig von Isoformen.

$R(x)_{LF}^1$	Identifizierte Proteine ²	Eintrag ³	Peptide ⁴
		I	Q
Erhöhte Proteinintensität für MDCK _{ADH} Zellen			
0,5	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	F1PX32	5 5
0,44	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	F1Q466	5 5
0,23	Acid ceramidase	F1PWA9	4 3
0,47	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, isoform CRA_b	F1PEH9	12 8
0,43	Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial	E2RMR8	4 4
0,4	Adenylyl cyclase-associated protein	E2QZ50	16 16
0,41	A-kinase anchor protein 12	F1PGL8	40 34
0,28	Carbonic anhydrase 2	F1PDY8	11 10
0,37	Catalase	O97492	6 5
0,4	Cathepsin D	Q4LAL9	7 6
0,47	Copine-3	E2QZQ6	5 5
0,25	Cystatin-B	F1PS73	3 1
0,45	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial	E2RRF8	3 3
0,37	Desmoglein-2	F1PGX1	15 9
0,46	Dihydropyrimidinase-like 2 variant	F1P9U4	19 16

0,19	Dihydropyrimidinase-related protein 3	F1Q3Y2	14	7
0,46	Elongation factor 1-alpha	J9NRT6	24	8
0,42	Endonuclease domain-containing 1 protein	F1PQA0	4	4
0,24	Ephrin type-A receptor 1	E2R6A6	4	4
0,4	Eukaryotic translation initiation factor 4B	E2RKS4	9	9
0,06	Galactin-1	E2RJL1	4	4
0,46	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	E2RAZ8	8	7
0,16	Golgi phosphoprotein 2, isoform CRA_a	E2RLA5	3	3
0,34	Heat shock cognate 71 kDa protein	E2R0T6	40	5
0,29	Inverted formin-2	F1PU24	7	6
0,21	Isoform 2 of Sequestosome-1	F1P6L5	5	4
0,43	Isoform 5 of Poly(rC)-binding protein 2	E2RCF9	11	3
0,32	Isoform 6 of Agrin	F1Q2Z6	14	11
0,42	Isoform Alpha-6X1B of Integrin alpha-6	E2RL88	4	3
0,47	Isoform Beta-4A of Integrin beta-4	J9NXR3	10	9
0,43	LDLR chaperone MESD	J9P7R9	4	4
0,41	Leukocyte elastase inhibitor	E2RKJ6	6	6
0,46	Macrophage-capping protein	E2R4I3	9	6
0,24	Malic enzyme	J9NZX7	9	7
0,37	Moesin	E2R7F1	20	10
0,48	Myoferlin	F1PZD5	20	15
0,26	NADH-cytochrome b5 reductase 3	F1PS26	10	7
0,48	Neural cell adhesion molecule L1	E2R2V5	12	8
0,13	Osteopontin	E2R161	11	6
0,17	PDZ and LIM domain protein 5	E2RBA8	10	8

0,33	Periplakin	J9NU37	23	19
0,45	Phosphoglycerate kinase 1	E2RRC9	13	12
0,44	Polymerase I and transcript release factor	J9P923	8	8
0,44	Profilin 1	F1Q3Y0	5	4
0,44	Prostaglandin E synthase 3	J9NT37	4	4
0,41	Proteasome-associated protein ECM29 homolog	F1PYA6	8	5
0,3	Protein AHNAK2	J9NZV9	15	13
0,32	Protein kinase C delta-binding protein	F1Q0L3	3	3
0,48	Ras-related protein Rab-3D	E2RFR4	4	3
0,47	Reticulon-4	E2R925	6	6
0,42	Serine-tRNA ligase, cytoplasmic	E2R4D5	11	10
0,02	Serum Albumin	F2Z4Q6	4	3
0,22	Splicing factor 3A subunit 3	E2QXU5	6	5
0,19	Squalene epoxidase	E2RHB9	5	4
0,4	Structural maintenance of chromosomes protein 4	E2RCX4	7	6
0,38	Syndecan-4	J9NZ79	4	3
0,43	Syntaxin-7	E2R4Q2	3	3
0,29	Translationally-controlled tumor protein	E2RMA1	6	5
0,5	Transportin-3	E2REK5	12	11
0,45	Twinfilin-1	J9NRP8	6	4
0,46	Ubiquitin-associated protein 2	J9PB94	12	9
0,4	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	E2RKT9	3	2
0,34	Utrophin	J9P1H1	19	13
0,32	Zyxin	F1P7F8	7	7
0,2	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	E2RTC5	12	9

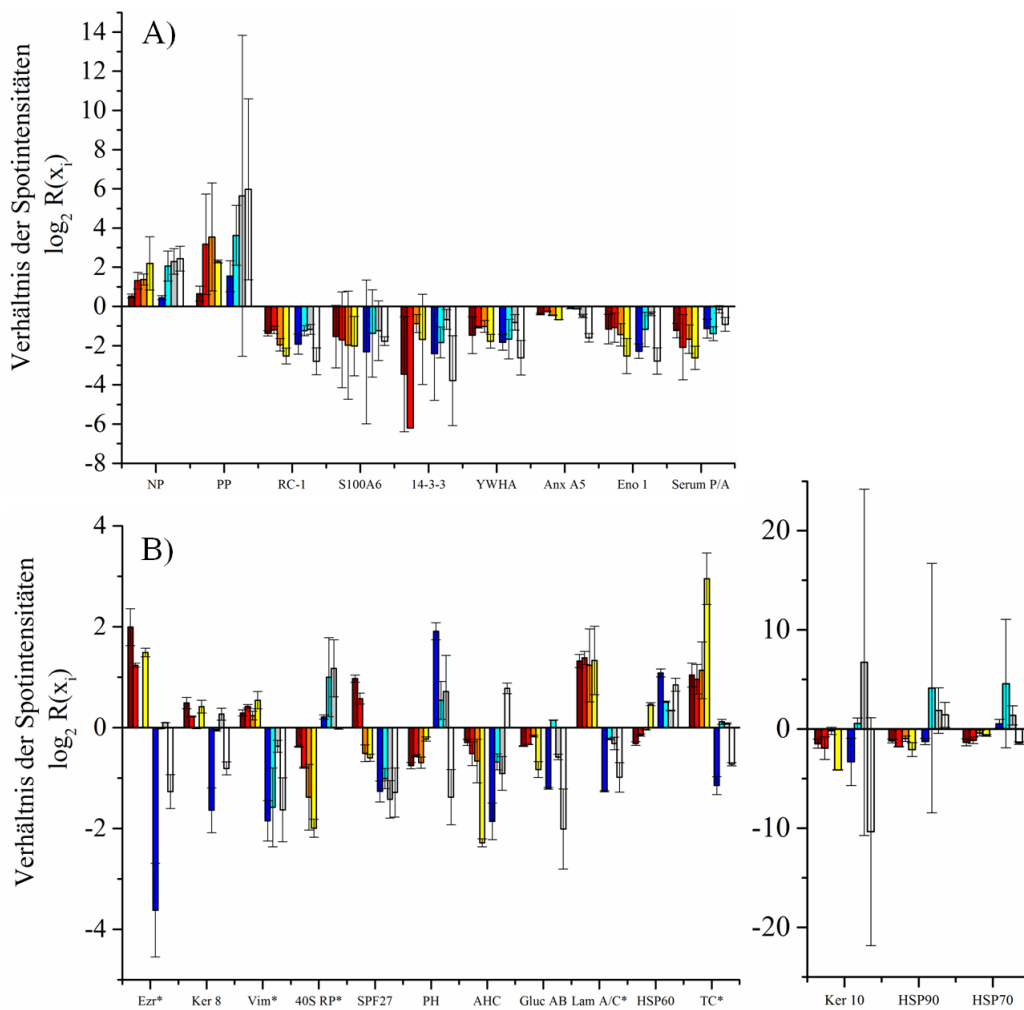
0,38	Keratin, type I cytoskeletal 19	F1Q0N9	23	11
Erhöhte Proteinintensität für MDCK _{SUS} Zellen				
3,41	Annexin A13	J9P497	11	8
2,35	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	J9P8W9	7	3
2,23	14 kDa phosphohistidine phosphatase	E2R1M6	3	3
2,13	14-3-3 protein epsilon	J9P9V0	9	8
2,13	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	F1PYI3	3	3
2,03	60S ribosomal protein L31	J9P389	2	1
2,05	Alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein	F1PAG7	3	3
2,13	Band 4.1-like protein 2	F1PTI7	6	6
2,17	B-cell receptor-associated protein 31	E2R4U9	3	2
2,61	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing)	F1Q0K5	10	8
4,35	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	E2QZV5	7	5
3,13	Cathepsin L2	Q9GL24	9	7
2,48	Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	E2R4C1	4	4
2,41	cDNA FLJ60743, highly similar to SEC14-like protein 3	E2RM47	5	4
2,14	Chloride intracellular channel protein 4	E2RGI4	11	8
2,34	Collagen alpha-2(V) chain	F1PG08	23	17
2,15	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1, isoform CRA_a	C1KG39	6	5
2,3	Diablo homolog, mitochondrial	A1DZY5	4	4
2,05	Dipeptidyl peptidase 2	E2R6F6	5	5
2,02	Endoplasmic reticulum resident protein 29	J9P4L2	4	3
4,56	Glutamate-cysteine ligase	E2RPP4	8	8

2,39	Glutathione S-transferase P1	F1Q0J0	10	6
2,4	High mobility group protein B2	Q6YKA4	11	7
2,18	Histone H4	F1P8Y7	8	5
2,19	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	J9NVT2	8	6
3,52	Isoform 4 of A-kinase anchor protein 2	J9NTM8	15	13
2,17	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1	E2QUL3	13	10
4,08	MHC class II antigen	Q30437	3	3
5,8	Mucin-13	J9P9I4	6	5
5,02	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF3	E2QZ92	25	8
2,89	Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial	E2RND8	3	3
4,34	Pirin (Homo sapiens)	E2QSR0	4	4
2,17	Protein disulfide-isomerase TMX3	F1PIX5	4	4
2,52	Quinone oxidoreductase	E2R3I8	7	6
2,1	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B	F1Q0Z0	3	3
2,63	Thioredoxin reductase 1	F1PBX0	6	6
2,58	Thrombospondin-1	F1PBI6	13	11
4,85	Transgelin	E2RAE8	3	3
2,32	Vacuole membrane protein 1	F1PHP3	3	3
2,46	V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (Avian)	E2QWD3	6	6
3,82	Villin-1	E2RPX1	14	13

1 – Verhältnis zwischen der Kontrolle (MDCK_{ADH}) und der Probe (MDCK_{SUS}, Abschnitt 3.4.6); 2 – UniProt KB Einträge als Ergebnis des Blast homologer humaner Proteine im Anschluss an die Spektrensuche nach ESI-Q/Orbitrap-MS Peptidanalytik (Abschnitt 3.4.4); 3 – UniProt KB Einträge im Anschluss an die Spektrensuche nach ESI-Q_Q/Orbitrap-MS Peptidanalytik (*Canis familiaris*); I - Identifizierung, Q - Quantifizierung, LF - *labelfree* Quantifizierung. Es wurden nur Proteine mit signifikant veränderter Peptidquantität betrachtet (t-Test, p-Wert $\leq 0,05$, \geq zweifache Differenz, Abschnitt 3.4.6).

A.5. Expressionsprofile der differenziell exprimierten Proteine nach Tollwutinfektion in Vero Zellen im 2L-BR.

Dargestellt sind die differenziell exprimierten Proteine, welche für beide Kultivierungsmedien (SCM/SFM, IPT-AFM) eine differenzielle Expression im Vergleich der scheininfizierten Kultur zur virusinfizierten Kultur zeigten (t-Test, p-Wert $\leq 0,005$, Abschnitt 3.4.6). Die Proteinidentifizierung erfolgte mit Hilfe der Gelkarte (Abschnitt 4.1). Die Virusinfektion wurde bei einer MOI von 0,1 durchgeführt (Abschnitt 3.2.6). Die Legende ist auf der nächsten Seite.



■ 1 d.p.i. ■ 3 d.p.i. ■ 5 d.p.i. ■ 8 d.p.i. - VerO_{SCM/SFM}, ■ 1 d.p.i. ■ 3 d.p.i. ■ 5 d.p.i. □ 8 d.p.i. - VerO_{IPT/AFM}. A) Proteine mit ähnlichem Expressionsprofil für beide Zelllinien, B) Proteine mit unterschiedlichem (teilweise auch gegensätzlichem (*)) Expressionsprofil für beide Zelllinien. Die Virusinfektion wurde bei einer MOI von 0,1 durchgeführt (Abschnitt 3.2.6). Dargestellt sind die Mittelwerte vom Verhältnis der $I_{Norm}(x)$ der Virusinfektion zur Scheininfektion über zwei biologische und vier technische Replikate (Standardabweichung n=6). Die Abkürzungen sind in Tabelle 4.12 aufgeführt.

A.6. Übersicht mehrfach detektierter differenziell exprimierter Proteine

Die Tabelle stellt eine Übersicht aller detektierter Proteine dar, die in mehreren Vergleichsexperimenten identifiziert wurden (Legende in der anschließenden Tabelle). Die Symbole ↗ und ↘ stehen für zunehmende und abnehmende Proteinexpression. Das Symbol ↔ steht für eine sowohl zunehmende als auch abnehmende Expression verschiedener Proteinisoformen.

Protein	Zelladaption			Zelllinienvergleich			Virusreplikation		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
14-3-3 protein	↘	↗		↗			↗	↗	↗
26S protease regulatory SU 6A	↗				↗	↗			
40S ribosomal protein SA					↗			↗	↗
60 kDa HSP	↗				↗			↗	↗
78 kDa glucose-regulated protein					↗		↗		
Aconitase 2			↗				↗		
Annexin A1	↗			↗					
Annexin A5	↗		↗					↗	
Annexin A8	↗		↗						↗
Calcyphosin	↗						↗		
Cathepsin D	↗								
Dihydropyrimidinase 2							↗		
Elongation factor 1-alpha	↗			↗					
Endoplasmic reticulum protein 29	↗			↗					
Enolase				↗					
Ezrin				↗				↗	↗
Fructose-bisphosphate aldolase A				↗				↗	↗
Galectin		↗		↗	↗				
Gelsolin	↗								
Glutathione S transferase	↗		↗	↗					
Heat shock cognate 71 kDa protein				↗					
HSP 105 kDa				↗					
HSP 90kDa				↗					

HSP beta-1	↗			↗		
HNRNP K	↗			↗	↗	
Macrophage-capping protein			↗	↗		
Moesin			↗		↗	
Nascent-polypeptide-associated complex α		↗			↗	
Neutral α -glucosidase AB				↗		↗
Ornithine aminotransferase	↗			↗		
Peroxiredoxin 1	↗		↗			
Phosphoglycerate kinase 1	↗		↗			
Prelamin-A/C			↗	↗	↗	
Profilin 1			↗	↗		
Programmed cell death 6		↗			↗	
Prohibitin				↗	↗	↗
Proteasome SU α	↗			↗	↗	
Protein disulfide-isomerase A6	↗			↗	↗	
Radixin	↗			↗	↗	
Reticulocalbin-1				↗		↗
Ruv-B2		↗		↗		
Serum paraoxonase/ arylesterase				↗		↗
Stress-70 protein		↗		↗		
T-complex protein 1					↗	↗
Triosephosphate isomerase		↗		↗		
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	↗	↗				
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3			↗		↗	
Villin-1			↗		↗	
Vimentin			↗			↗
Vinculin		↗		↗		

Vergleichsexperiment	Kontrolle	Probe
1	AC	CL, DC, SC
2	CL	DC, SC
3	SC - Adaption 1	SC - Adaption 2
4	MDCK _{ADH}	MDCK _{SUS}
5	Ver _{SCM/SFM}	Ver _{IPT-AFM}
6 – 9	Scheininfection	Virusinfektion
6		MDCK _{ADH}
7		MDCK _{SUS}
8		Ver _{SCM/SFM}
9		Ver _{IPT-AFM}

A.7. Involvierte Proteine und zelluläre Mechanismen für weiterführende Untersuchungen

Involvierte Proteine und zelluläre Mechanismen für weiterführende Untersuchungen im Kontext der Adaption an verbesserte Impfstoffproduktionsprozesse. Zusammenfassende Darstellung der im Abschnitt 5 diskutierten differenziell exprimierten Proteine und betroffene Mechanismen, mit dem Potenzial durch Veränderung der Expression die Zelladaption zu beschleunigen oder die Virusvermehrung zu steigern.

Abschnitt	Identifizierte Proteine	Hypothese	Einflussebene
Zelluläre Proteine			
4.3.2, 5.3,	Galectin-3, Galectin-1	Galectin-3 mindert die Pro-Anoikisaktivität seines Gegenspielers Galectin-1 in MDCK Zellen.	Anoikis
4.3.2, 4.5,	Galectin-3	Die Inhibierung der Galectin-3 Expression mindert die Substratanheftung in MDCK und Vero Zellen.	Zellanheftung
5.3, 5.5			
4.4, 4.5,	Protein der Glykolyse	Mdm2-p53 oder HIF-1 sind Signalwege welche während zellulärer Adaption eine Verschiebung der Glykolyse und der Atmungskette in kontinuierlichen Zelllinien hervorrufen.	Zellwachstum
4.3.1, 5.4	und Atmungskette		
4.4, 5.4	CCAR2	Die Inhibierung der CCAR2 Expression mindert p53-induzierte Apoptose in MDCK Zellen.	Anoikis
4.4, 5.4	Bit-1	Die Inhibierung der Bit-1 Expression mindert Anoikis in MDCK Zellen.	Anoikis
4.4, 5.4	Crk	Die Expression von Crk induziert EMT und Suspensionswachstum in MDCK Zellen.	Suspensionswachstum
4.6.1, 5.6.1	HNRNP K, U, M, H1	Die Expression verschiedener HNRNPs haben einen Effekt auf die Influenzareplikation in MDCK Zellen.	Virusvermehrung

4.6.1, 5.6.1	Ezr	Die Expression von Ezr hat einen Effekt auf den Virus-eintritt in die Zelle bei der Influenzareplikation in MDCK Zellen.	Virusvermehrung
Zelluläre Mechanismen			
4.3.2, 5.3	Aktin-, Myosinvarianten	Aktin-Myosin-Kontraktion als Adaptionmechanismus zur Ausschleusung von MDCK Zellen aus dem Monolayer.	Zellanheftung
4.6.2, 5.6.2	Retikulocalbin, Anx 5, S100a6	Ca ²⁺ -Regulation durch Tollwutviren in Vero Zellen begünstigt Virusreplikation.	Virusvermehrung
4.4, 5.4	NMT-1	Verändertes Myristolierungsprofil zwischen MDCK _{ADH} und MDCK _{SUS} Zellen, was eng mit der apoptotischen Regulation verknüpft ist.	Apoptose
4.4	Glutathion-S-Transferase, Thioredoxin reductase 1, Peroxiredoxin-1	Suspensionswachstum induziert oxidativen Stress in MDCK Zellen.	Zellwachstum

B. Tabellarischer Lebenslauf

Fischhaberstraße 13 c, 82377 Penzberg

✉ Sabine-Kluge@t-online.de

geboren am 03.04.1986, Leipzig

BERUFSERFAHRUNGEN

seit Okt. 2014	Gruppenleiterin Entwicklungsanalytik Roche Pharma, Penzberg
Sep. 2009 – Sep. 2014	Wissenschaftliche Mitarbeiterin - Doktorarbeit Otto-von-Guericke Universität und Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg Bioprozesstechnik (Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl, Bioprozesstechnik)
Okt.-Dez. Mär.-Jun. 2008	Studentische Hilfskraft Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg Proteinanalytik und Mikrobiologie (Dr. rer. nat. Dirk Benndorf, Bioprozesstechnik)
Feb.-Sep. 2008	Studentische Hilfskraft Max-Planck-Institut für evolutionäre Anthropologie, Leipzig, Verwaltung endokrinologischer Datenbanken
Apr.-Jul. 2006/7	(Dr. rer. nat. Tobias Deschner, Primatologie)

AUSZEICHNUNGEN

16.09.2011	Wissenschaftlicher Vortrag MiCom Konferenz, Jena
28.06.2011	Nachwuchswissenschaftler Arbeitstagung zur Proteinanalytik, Martinsried
08.09.2010	Posterpräsentation ESBES Konferenz, Bologna

AUSBILDUNG

Okt. 2004 – **Diplom Biologie**

Sep. 2009 Universität Leipzig

Spezialisierung: Biophysik, Genetik, Mikrobiologie, Pflanzenphysiologie

Okt. 2008 – **Diplomarbeit**

Jun. 2009 Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg

Proteomanalyse einer heterogenen Bakterienkultur

(Prof. Dr. rer. nat. Hauke Harms, Umweltmikrobiologie; Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl, Bioprozesstechnik)

Mär. 2008 – **Projektarbeit**

Mai 2008 Helmholtz Zentrum für Umweltforschung, Leipzig

Molekulare Umweltmikrobiologie

(Prof. Dr. rer. nat. Hauke Harms, Dr. rer. nat. Kathleen Schleinitz, Umweltmikrobiologie)

Sep. 2007 – **Austauschstudium**

Dec. 2007 Carleton Universität, Ottawa

Studien-Kurs: Molekulare Biotechnologie

Graduierten-Kurs: Fortschritte in der Molekularbiologie für Pflanzen

Forschungsprojekt: Untersuchung von Proteinen zur Fettsäureaufnahme

(Prof. PhD Owen Rowland, Pflanzenbiochemie und molekulare Genetik)

Aug. 2005 – **Praktikum**

Sep. 2005 Max-Planck-Institut für evolutionäre Anthropologie, Leipzig

Endokrinologische Analytik

(Dr. rer. nat. Tobias Deschner, Primatologie)

Jul. 1996 – **Abitur**

Sep. 2004 Gymnasium Neue Nikolaischule, Leipzig

C. Wissenschaftliche Arbeiten

VERÖFFENTLICHTE ARTIKEL

Kluge, S., Genzel, Y., Laus, K., Serve, A., Pflugmacher, A., Peschel, B., Rapp, E., Reichl, U. (2016) *Virus release and virus-induced apoptosis correlate with changes in expression levels of proteins related to membrane permeability, RNA processing and apoptosis of MDCK suspension cells*, Applied Microbiology and Biotechnology, *before submission*.

Beitrag: Für diese Arbeit wurden die Versuchsplanung, die Zellkultivierungen, die Proteinanalytik und die Datenauswertung durchgeführt.

Kluge, S., Benndorf, D., Genzel, Y., Rapp, Scharfenberg, K., E., Reichl, U. (2015) *Monitoring changes in proteome during stepwise adaptation of a MDCK cell line from adherence to growth in suspension*, Vaccine, 33(35):4269-4280.

Beitrag: Für diese Arbeit wurden die Proteinanalytik und die Datenauswertung durchgeführt.

Kluge, S., Rourou, S., Vester, D., Majoul, S., Benndorf, D., Genzel, Y., Rapp, E., Kallel, H., Reichl, U. (2013) *Proteome analysis of virus-host cell interaction: Rabies virus replication in Vero cells in two different media*, Applied Microbiology and Biotechnology, 97(12):5493-5506.

Beitrag: Für diese Arbeit wurden die Proteinanalytik und die Datenauswertung durchgeführt.

Pulsifer, I. P., **Kluge, S.**, Rowland, O. (2012) *Arabidopsis long-chain acyl-CoA synthetase 1 (LACS1), LACS2, and LACS3 facilitate fatty acid uptake in yeast*, Plant physiology and biochemistry, 51:31-9.

Beitrag: Für diese Arbeit wurden Hefezellklonierungen und Versuche zur Enzymaktivität durchgeführt.

Kluge, S., Hoffmann, M., Benndorf, D., Rapp, E., Reichl, U. (2011) *Proteomic tracking and analysis of a bacterial mixed culture*, Proteomics, 12(12):1893-901.

Beitrag: Für diese Arbeit wurden die Kultivierungen der Bakterien, die Proteinanalytik und die Datenauswertung durchgeführt.

Vester, D., Rapp, E., **Kluge, S.**, Genzel, Y., Reichl, U. (2010) *Virus-host cell interactions in vaccine production cell lines infected with different human influenza A virus variants: a proteomic approach*, Journal of proteomics, 73(9):1656-69.

Beitrag: Für diese Arbeit wurden die Western Blot Analysen zur Verifizierung der Protein-

expression durchgeführt.

KONFERENZVORTRÄGE

Kluge, S., Serve, A. (2014), *Probenvorbereitung zur qualitativen Protein- und Lipidanalytik: Anwendung in der Inprozess-Kontrolle der Virusproduktion*, 21. Arbeitstagung - Mikromethoden in der Proteinchemie, Dortmund.

Kluge, S., Rourou, S., Genzel, Y., Benndorf, D., Majoul, S., Rapp, E., Kallel, H., Reichl, U. (2012), *Proteomanalyse der Virus-Wirtszell-Interaktion: Tollwutvirus-Replikation in einer Vero Zelllinie unter Einfluss zweier Zellkulturmedien*, Biopharmazeutische Produktion, Freiburg.

Kluge, S., Hoffmann, M., Benndorf, D., Rapp, E., Reichl, U. (2011) *Proteomic Tracking - Population Dynamics and Interaction of a Bacterial Mixed Culture*, MICOM, Jena.

Kluge, S., Hoffmann, M., Benndorf, D., Rapp, E., Reichl, U. (2011) *Proteomic Tracking Populationsdynamik und Interaktion einer bakteriellen Mischkultur*, 18. Arbeitstagung - Mikromethoden der Proteinchemie, Martinsried.

Kluge, S., Vester, D., Rapp, E., Genzel, Y., Reichl, U. (2010) *Virus-Wirtszell-Interaktion bei der Produktion von Influenza A Impfstoff in tierischer Zellkultur: Änderungen des Proteoms von Produktionszelllinien*, ProcessNet-Jahrestagung, Aachen.

POSTERPRÄSENTATIONEN

Kluge, S., Rapp, E., Genzel, Y., Scharfenberg, K., Reichl, U. (2014) *Impact of MDCK cell line adaption to suspension growth on proteome level and virus replication dynamics*, Vaccine Technology, Playa del Carmen, Mexiko.

Kluge, S., Rapp, E., Benndorf, D., Genzel, Y., Scharfenberg, K., Reichl, U. (2013) *Proteomic monitoring along the adaptation of MDCK cells from adherent to suspension growth with respect to influenza virus vaccine production*, 23rd ESACT Meeting, Lille, Frankreich.

Kluge, S., Vester, D., Rapp, E., Genzel, Y., Reichl, U. (2010) *Virus-Wirtszell-Interaktion bei der Produktion von Influenza A Impfstoff in tierischer Zellkultur: Änderungen des Proteoms*

von *Produktionszelllinien*, Proteomic Forum, Berlin.

Kluge, S., Genzel, Y., Herche, K. C., Peschel, B., Pflugmacher, A., Rapp, E., Scharfenberg, K., Reichl, U. (2013) *Virus-Wirtszellinteraktionen einer adhärenen Zelllinie und ihrer adaptierten Suspensionszelllinie: Eine Proteom-Studie*, Himmelfahrtstagung der DECHEMA, Bad Wildungen.

Kluge, S., Hoffmann, M., Rapp, E., Benndorf, D., Reichl, U. (2011) *Proteome analysis of a bacterial mixed culture*, Proteomic Forum, Berlin.

Kluge, S., Vester, D., Rapp, E., Genzel, Y., Scharfenberg, K., Reichl, U. (2010) *Adherent growth versus growth in suspension for a MDCK cell line: a proteomic evaluation*, ESBES, Bologna, Italien.

BETREUTE ARBEITEN

Herche, K. (2013) *Vergleichende Proteomanalyse zum Zeitpunkt der Influenzainfektion von adhärenen und in Suspension wachsenden MDCK Zellen im dynamischen Kultivierungssystem*, Bachelorarbeit.

Matias, E. (2012) *Optimization of In-Solution Trypsin Digestion for Comparative Shotgun Proteomics*, DAAD-Forschungsaustausch.

Pech, M. (2011) *Anreicherung nieder abundanter Proteine in humanem Blutplasma*, Studienarbeit.

D. Liste der verwendeten Geräte und Anlagen

Gerät	Hersteller	Modell
Autoklav	Thermo Scientific (DE)	Steam Sterilizer
Bioprofil	Nova biomedical (DE)	100 plus Analyzer
Bioreaktor (MDCK)	DasGip (DE)	Advanced Spinner 400-1200 mL
Bioreaktor (Vero)	Inceltech (UK)	Discovery 100
Blotkammer	Invitrogen (USA)	Xcell™ Blot Modul
Brutschrank	Heraeus (DE)	Hera Safe®
Brutschrank	Heraeus (DE)	Hera Cell 240
Ceramik Streifenhalter	GE Healthcare (DE)	Manifold
Chemolumineszenz Imager	Intas (DE)	Intas ChemoCam HR 16 3200
Durchflusszytometer		
Eismaschine	Scotsman (USA)	AF10
Enzymsensor	I&L Biosystems (DE)	Bioprofile 100 Plus
Feinwaage	Mettler-Toledo (DE)	Excellence Plus
Fluoreszenz-Scanner	GE Healthcare (CH)	Typhoon Variable Mode Imager 9400
Gelelektrophorese		
- horizontal (2-D)	Serva (DE)	HPE™ FlatTop Tower
- vertikal (2-D)	GE Healthcare (DE)	Ettan Dalt II System
- vertikal (1-D)	Invitrogen (DE)	Xcell SureLock™
Heizblock/ Magnetrührer	Heidolph (DE)	MR Hei-Standard
IEF System	Pharmacia Biotech (SE)	IPGphor System
Ionenquelle	Applied Biosystems (DE)	NanoSpray® II Source
MALDI-Target	Bruker Daltonics (DE)	AnchorChip
Massenspektrometer		
- MALDI-TOF/TOF-MS	Bruker Daltonics (DE)	Ultraflex extreme
- ESI-Q/TOF-MS	Applied Biosystems (DE)	QSTAR XL
- ESI-Q/Orbitrap-MS	Thermo Scientific (DE)	Q-Exactive
Mehrkanalpipette	Eppendorf (DE)	10, 100, 300, 1000 µL
Mikropipetten	Eppendorf (DE)	2, 10, 20, 200, 1000 µL
Mikroskopie		
- Kamera	Sony	AVT Horn 3 CCD
- Mikroskope	Zeiss (DE)	Axioskop 2, Axiovert 25, Axiovert S100
Mikrotiterplattenreader	Tecan	Infinite® 200PRO NanoQuant
nano-HPLC Systeme		

- ESI-Q/TOF-MS	Thermo Scientific (DE)	Ultimate 3000 <i>online</i> gekoppelt
- ESI-Q/Orbitrap-MS	Thermo Scientific (DE)	nanoRSLC <i>online</i> gekoppelt
- Monolithseparation	Thermo Scientific (DE)	Ultimate 3000
pH-Meter	InoLab (DE)	pH7110
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte (DE)	Pipetus®
qPCR-Disk-Versiegler	Qiagen (DE)	Rotor-Disc Heat Sealer
Real-Time-PCR Thermozykler	Qiagen (DE)	Rotor-Gene® Q
Reinstwasseranlage	Millipore (DE)	MilloQ® Advantage A10
Rollerflaschen-Inkubator	Bellco Glass Inc. (USA)	Bench Top Incubator
Schüttler (horizontal)	Heidolph (DE)	Unimax 1010
Spinner mit Pendelrührer	Techne (DE)	250 mL Cell Culture Vessels
Spinner mit Paddelrührer	Wheaton (DE)	250 mL Celstir
Spotpicker	GE Healthcare (SE)	Ettan spot picker
Sterilbank	Heraeus (DE)	HERAsafe®
Thermomixer	Eppendorf (DE)	Comfort
Ultraschall	Bandelin (DE)	Sonopuls HD2200
Ultraschall-Wasserbad	Bandelin (DE)	Sonorex Digitec 10P
Vortex	Heidolph (DE)	Reax Top
Waage	Mettler-Toledo (DE)	PB5001-S/FACT
Zählkammer	LO-Laboroptik (DE)	Fuchs-Rosenthal
Zellzählung	Beckman Coulter (DE)	Vi-Cell™ XR
Zentrifugalvakuum- verdampfer	Thermo Scientific (USA)	SPD 121P Zentrifuge, gekop- pelt an gekühlte Vapor Trap
Zentrifugen		
- Auswingrotor Tisch- zentrifuge (groß)	Heraeus (DE)	7591
- Festwinkelrotor Tisch- zentrifuge (groß)	Thermo Scientific (DE)	7588
- Rotor Tischzentrifuge (klein)	Thermo Scientific (DE)	7599B
- Rotor Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (DE)	Type 70Ti
- Rotor Zentrifuge	Beckman Coulter (DE)	JA-14
- Tischzentrifuge (groß)	Thermo Scientific (DE)	Biofuge Primo R
- Tischzentrifuge (klein)	Thermo Scientific (DE)	Fresco™ 17
- Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (DE)	Optima LE-80K
- Zentrifuge	Beckman Coulter (DE)	Avanti J 20 XP

E. Liste der verwendeten Software

Software	Version	Anwendung
ChemoStar Imager, Intas	v.0.2.31	Western Blot Entwicklung
Chromeleon, Thermo Scientific	6.80 SR10	LC-Separation
Delta2D, Decodon	4.3	Proteinquantifizierung
FlexAnaylsis, Bruker	3.3	Spektrenprozessierung
FlexControll, Bruker	3.3	MS-Messung
FlowJo, Tree Star	7.6.1	Durchflusszytometrie
LabImage 1D L340, Intas	4.1	Western Blot Auswertung
Mascot, Matrix Science	2.2.07	Proteinidentifizierung
Mecha Cybernetics, Optimas	6.2	Mikroskopie
Origin	9.0	Statistische Auswertung
Peptidshaker	0.22.5	Proteinidentifizierung
Progenesis LC-MS, Nonlinear Dynamics	3.0	Proteinidentifizierung
Proteinscape, Bruker	3.1.3	Proteinidentifizierung
ProteomeDiscoverer, Thermo Scientific	1.4.1.14	Proteinidentifizierung
QS Software	1.1	QSTAR Massenspektrometer
Reactome		Netzwerkanalyse
Rotor-Gene Q	2.0.2	qRT-PCR
R-Programm	3.0.3	Statistische Auswertung
Search-GUI	1.14.0	Proteinidentifizierung
Spot Picker	1.2	Spotsselektion
STRING		Netzwerkanalyse
Tune Plus, Thermo Scientific	2.7.0	MS-Messung
Typhoon Scanner Control	5.0	Gelscan
Vi-Cell XR	2.03	Zellzählung
Xcalibur, Thermo Scientific	2.2 SP1.48	Spektrenprozessierung

F. Liste der Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller (Land)
2D HPE Large Gel Kit, NF-12.5 %	Serva Electrophoresis (DE)
Antikörper der Tabelle 3.17	Biorbyt (GB)
Antikörper ERK2	Santa Cruz (TX)
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific (DE)
Benzonase, 25 U/ μ L, \geq 99% Reinheit	Millipore (DE)
Chromatographiesäulen	
- Trap-Säule ESI-Q/TOF-MS C18, 300 μ m \times 5 mm PepMap	Thermo Scientific (DE)
- Trap-Säule ESI-Q/Orbitrap-MS C18, 100 μ m \times 2 cm PepMap RSLC	Thermo Scientific (DE)
- Trap-Säule Monolith PepSwift Monolithic, 200 μ m \times 5 mm	Thermo Scientific (DE)
- Trennsäule ESI-Q/TOF-MS C18, 75 μ m \times 15 cm PepMap	Thermo Scientific (DE)
- Trennsäule ESI-Q/Orbitrap-MS C18, 75 μ m \times 50 cm PepMap RSLC	Thermo Scientific (DE)
- Trennsäule Monolith PepSwift Monolithic, 200 μ m \times 5 cm	Thermo Scientific (DE)
Complete Ultra Tablets, Mini Easypack	Roche Applied Science (DE)
Einwegpipetten Cellstar	Greiner bio-one (DE)
Erlenmayerkolben	Corning Incorporated (DE)
Filtersäulen, Omega Membran 10k Da cut-off	Pall Corporation (DE)
Falcon Gefäße (15 mL, 50 mL)	Greiner bio-one (DE)
Hühnerblut	Geflügelhof Möckern (DE)
INSTANT Virus RNA Kit	Analytik Jena (DE)
Ionenkalibrierlösung Negativ	Thermo Scientific (DE)
Ionenkalibrierlösung Positiv	Thermo Scientific (DE)
IPG-Streifen	
- Immobiline DryStrip pH 3-11, NL, 24 cm	GE Healthcare (SE)
- Immobiline DryStrip pH 4-7, 24 cm	GE Healthcare (SE)
Maxima H Minus Reversen Transkriptase	Thermo Scientific (DE)
Membransterilfilter (0,22 μ m Poren)	Nalgene nunc (USA)
Microcarrier Cytodex 1	GE Healthcare (SE)
Microcarrierfilter Cell Trics (50 μ m)	Partec (DE)
Mikrotiterplatten (96-Wells, flacher und U-Boden)	Greiner bio-one (DE)

NuPAGE MOPS SDS Puffer (20X)	Invitrogen (DE)
MS-Target AnchorChip	Bruker Daltonics (DE)
NuPAGE Bis-Tris-Gel, 12%	Invitrogen (DE)
Papierfilter (dick)	GE Healthcare (SE)
Papierfilter (dünn)	Serva Electrophoresis (DE)
PCR-Platten Thermo Fast 96	ABGene (DE)
PCR-Tubes Multiply Pro	Sarstedt (DE)
Peptide Kalibrierstandard II	Bruker Daltonics (DE)
Pipettenspitzen Diamond TIPACK	Gilson (DE)
Pipettenspitzen, Reloads	Eppendorf (DE)
PVDF Membran	Millipore (USA)
qPCR Rotor-Disc 100	Qiagen (DE)
qPCR Rotor-Disc Heat Sealing Film	Qiagen (DE)
Reaktionsgefäße	
- 1,5 mL; 2 mL	Eppendorf (DE)
- Omnistrips; 8 Wells; 0,3 mL	Thermo Scientific (USA)
- Low profile Thermo Strips	Thermo Scientific (USA)
Refraction-2D Labeling Kit	NH DyeAgnostics (DE)
Rollerflasche 850 cm ²	Greiner Bio One (DE)
Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit	Qiagen (NL)
Sekundärer Antikörper (Ziege, Hase)	Sigma-Aldrich (DE)
Spritze	Braun Medical (DE)
Spritzenkanüle, 0,7 × 16 mm	Braun Medical (DE)
SuperSignal Western Dura Extended	Thermo Scientific (DE)
Duration Substrats	
T-Flasche 175 cm ² (Zellkultur)	Greiner Bio One (DE)
T-Flasche 175 cm ² (Adaption)	BD Biosciences (DE)
Trypsin (2,5%, vom Schwein, 0,5 mg/mL)	Gibco (GE)
Trypsin Gold lyophilisiert	Promega (DE)
uncoated SilicaTips TM	NewObjective (USA)
Wasserfilter LC-Pak0001	Millipore (GE)
Wasserfilter BioPAK	Millipore (GE)

G. Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie (Strukturformel/ Abkürzung)	Weitere Angaben	Hersteller (Land)	Artikelnummer
2-Phosphoglycerate (2-PG)	für Molekularbiologie	Sigma-Aldrich (DE)	G9891
2-Propanol	für LC-MS	Fluka Analytical (DE)	34965
Aceton	für HPLC	Sigma-Aldrich (DE)	270725
Acetonitril	für LC-MS	Fluka Analytical (DE)	34967
Acrylamid 30% (Mix 37,5:1)	für Molekularbiologie	AppliChem (DE)	A36261000
Alpha-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (HCCA)	für MALDI-TOF/TOF-MS	Bruker Daltonics (DE)	8201344
Agarose			
Ameisensäure (FA)	für LC-MS	Fluka Analytical (DE)	56302
Ammoniumhydrogencarbonat (ABC)	BioUltra, $\geq 99,5\%$	Fluka Analytical (DE)	09830
Ammoniumhydrophosphat $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$	BioUltra	Sigma-Aldrich (DE)	09839
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Minimum Assay $\geq 98\%$	Amersham Biosciences (SE)	17131101
Ammoniumphosphat $((\text{NH}_4)_3\text{PO}_4)$	Zellkultur	Sigma-Aldrich (DE)	216003
Ammoniumsulfat	zur Analyse	AppliChem (DE)	A35981000
Bindsilan			
Bovines Serumalbumin (BSA)	2 mg/mL	Bio-Rad (DE)	5000206
Bradford Reagenz	für Proteinassay	Bio-Rad (DE)	5000006
Calziumchlorid Dihydrat	für Molekularbiologie	AppliChem (DE)	A46890250
CHAPS Detergenz	keine Angaben	AppliChem (DE)	A10990010
Coomassie Brilliantblau G-250	für Elektrophorese	Merck (DE)	1154440025
DeStreak Reagenz	für Rehydratisierung	GE Healthcare (SE)	17600319
Dimethylformamid	keine Angaben	Sigma-Aldrich (DE)	D8654
Dinatriumhydrogenphosphat $(\text{Na}_2\text{HPO}_4)$	Zellkultur	Merck (DE)	106566
Dithiothreitol (DTT)	BioXtra, $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich (DE)	D55455G

Essigsäure (AA)	für LC-MS	Fluka Analytical (DE)	49199
Ethanol	≥ 99,9%, für HPLC	Carl Roth (DE)	P0762
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Zellkultur	Merck (DE)	324503
Fetales Kälberserum	steril	Sigma-Aldrich (DE)	G8270
Glucose (Glc)	Zellkultur	Sigma-Aldrich (DE)	A29261000
Glycerol	wasserfrei, für Molekularbiologie	AppliChem (DE)	A10671000
Glycin	für Molekularbiologie	AppliChem (DE)	A13611000
Harnstoff	für Molekularbiologie	AppliChem (DE)	17133501
Immobiline Dry Cover Fluid	für IEF	GE Healthcare (SE)	I114925G
Iodacetamid (IAA)	BioUltra	Sigma-Aldrich (DE)	1096342511
Isopropanol	keine Angaben	Merck (DE)	1049355000
Kaliumchlorid (KCl)	Zellkultur	Merck (DE)	104872
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Zellkultur	Merck (DE)	L5626100G
L-Lysin Monohydrochlorid	≥ 98%	Sigma-Aldrich (DE)	A36180500
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂)	zur Analyse	AppliChem (DE)	14262
Methanol	für UHPLC-MS	Fluka Analytical (DE)	T1451
Milchpulver	Blotting Reinheit	Carl Roth (DE)	P029.3
Natriumchlorid (NaCl)	Zellkultur	Carl Roth (DE)	A22630100
Natriumdodecylsulfat (SDS)	für Molekularbiologie	AppliChem (DE)	201154
Natriumfluorid (NaF)	für Molekularbiologie	Sigma-Aldrich (DE)	S6014
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Zellkultur	Sigma-Aldrich (DE)	1064821000
Natriumhydroxid (NaOH)	Plätzchen	Merck (DE)	0274.1
Natriummolybdat (Na ₂ MoO ₄)	zur Analyse	Carl Roth (DE)	450243
Natriumorthovanadate (Na ₃ VO ₄)	für Molekularbiologie	Sigma-Aldrich (DE)	63662
Ortho-Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	≥ 85%	AppliChem (DE)	17045601
Pharmalyte	3-10, für IEF	Amersham Biosciences (SE)	6367.1
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	≥ 99%	Carl Roth	

Rapigest Detergenz (RG)	keine Angaben	Waters	186002123
Salzsäure (HCl)	37%	Carl Roth (DE)	X942.1
Salzsäure (HCl)	0,1 M; für LC-MS	Fluka Analytical (DE)	84434
Sucrose	für Molekularbiologie	Sigma-Aldrich (DE)	S0389
Sypro Ruby	zur Proteingelfärbung	Invitrogen (USA)	S12000
TEMED	Minimum Assay \geq 99%	GE Healthcare (SE)	17131201
Thiourea	\geq 99%	Sigma-Aldrich (DE)	T8658100G
Trifluoressigsäure (TFA)	für LC-MS	Fluka Analytical (DE)	73645
TRIS	für Molekularbiologie	AppliChem (DE)	A22645000
TRIS-HCl	für Molekularbiologie	AppliChem (DE)	A34521000
Triton X-100 Detergenz	für Molekularbiologie	Sigma-Aldrich (DE)	93443
Trypanblau	Zellkultur	Merck (DE)	111732
Tween 20 Detergenz	keine Angaben	Merck (DE)	28321

H. Zusammensetzung verwendeter Standardpuffer

Puffer	Konzentration	Chemikalie
ABC-Puffer (aq)	50 mM	ABC
Äquibrierpuffer (aq) pH 8,8	30% (v/v)	Glycerol
	1,5 M	TRIS
	6 M	Harnstoff
	2% (w/v)	SDS
Aufschluss-Lysepuffer (aq)	1 fach	Complete Ultra Tablets
	5 mM	EDTA
	1 mM	MgCl ₂
	150 mM	NaCl
	1 mM	PMSF
	0,5% (w/v)	SDS
	30 mM	Tris
	50 mM	DTT
DIGE-Lysepuffer (aq) pH 8,5-9	30 mM	TRIS-HCl
	4 % (w/v)	CHAPS Detergenz
	7 M	Harnstoff
	2 M	Thiourea
Harnstofflösung (aq) pH 8,5	0,1 M	TRIS-HCl
	8 M	Harnstoff
Laufpuffer (10x, aq)	250 mM	TRIS
	2 M	Glycin
	35 mM	SDS
Matrixlösung (aq)	1 mM	(NH ₄) ₂ HPO ₄
	85 % (v/v)	Acetonitril
	3,7 mM	HCCA
	0,1 % (v/v)	TFA
PBS-Puffer (aq)	2,5 mM	KCl
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	8 mM	Na ₂ HPO ₄
	135 mM	NaCl
RG-Lysepuffer (aq)	150 mM	NaCl
	1% (w/v)	RG
	30 mM	TRIS
RIPA-Lysepuffer (aq)	20 mM	2-PG

	1 fach	Complete Ultra Tablets
	3.35 mM	EDTA
	6,7 % (v/v)	Glycerol
	6,7 mM	K ₂ HPO ₄
	1 mM	Na ₂ MoO ₄
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	100.5 mM	NaCl
	20 mM	NaF
	200 μM	PMSF
	0,0335% (w/v)	SDS
	33.5 mM	TRIS
	0,67 % (v/v)	Triton X-100
SDS-Lysepuffer (aq)	150 mM	NaCl
	0,5% ; 1%, 2% (w/v)	SDS
	30 mM	TRIS
Sucrosepuffer (aq)	250 mM	Sucrose
TBS-Puffer (aq)	137 mM	NaCl
	20 mM	TRIS
TRIS-Waschpuffer (aq)	150 mM	NaCl
	1 mM	PMSF
	30 mM	TRIS

I. Arbeitsanweisungen

1. M 02: Herstellung von Glasgow-MEM-Vollmedium aus gebrauchsfertigen Teillösungen, Version 3.0 (11.09.2006)
2. M 03: Herstellung von Glasgow-MEM-Medium aus Pulvermedium, Version 5.0 (19.08.2010)
3. Z 01: Zellbestimmung auf Microcarriern, Version 2.0 (07.03.2005)
4. Z 04: Passagieren von MDCK-Zellen in serumhaltigem Medium, Version 4.0 (11.09.2006)
5. Z 10: Auftauen und Kultivierung MDCK Suspensionszellen, Version 1.0 (17.07.2008)
6. Kurzanleitung Zellzählgerät ViCell XR, Version 2.0 (08.08.2008)
7. V 03: Virenvermehrung in Kulturflaschen, Version 5.0 (15.05.2013)
8. V 05: HA-Assay, Version 2.2 (20.01.2011)
9. V 08: Bestimmung des TCID₅₀, Version 2.0 (26.09.2011)
10. MoBi 1: Western Blot mit anschließender Immundetektion, Version 2.0 (07.07.2010)
11. Proteinbestimmung: Bradford-Test, Version 1.0 (12.09.2012)
12. Arbeitsanweisung: Gelfärbung Coomassie Brilliant Blau G-250, Version 3.0 (05.03.2014)
13. Arbeitsanweisung: Verdau MALDI-TOF/TOF-MS Proteinidentifizierung, Version 1.0 (03.09.2012)
14. Arbeitsanweisung: TCA-Fällungen, Version 2.0 (06.05.2013)
15. Arbeitsanweisung: Ethanol-Fällungen, Version 1.0 (04.02.2014)
16. Arbeitsanweisung: Phenolextraktion, Version 2.0 (05.03.2014)