Charakterisierung sekretorischer Lysosomen aus humanen T- und NK-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

HENDRIK SCHMIDT

Kiel 2009

Referent: Koreferent:	Prof. Dr. Stefan Rose-John Prof. Dr. Matthias Leippe
Tag der mündlichen Prüfung:	13.07.2009
Zum Druck genehmigt:	13.07.2009

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

Inhaltsverzeichnis

1.	EINI	LEITUNG	1
	1.1 1.1.1 1.1.2	Die Rolle von T- und NK-Zellen im Immunsystem T-Zellen NK-Zellen	 1 2 3
	1.2 1.2.1 1.2.2 1.2.3 1.2.4 1.2.5 1.2.6	Sekretorische Lysosomen Zelltypen mit sekretorischen Lysosomen Struktur und Inhalt sekretorischer Lysosomen Der Inhalt lytischer Granula Die Biogenese sekretorischer Granula Regulation der Exozytose und Bildung der immunologischen Synapse Sekretorische Granula und assoziierte Krankheiten	4 5 6 . 10 . 11 . 12
	1.3 1.3.1	Proteomanalysen lysosomaler Kompartimente Die zwei-dimensionale differentielle Gelelektrophorese (2D-DIGE)	. 14 . 14
2.	FRA	GESTELLUNG	16
3.	MAT	FERIAL	18
	3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4	Material für die Zellbiologie Zellen Medien und Puffer Antikörper Kits	. 18 . 18 . 18 . 21 . 23
	3.2 3.2.1	Material für die Biochemie Puffer und Reagenzien	. 23 . 23
	3.3	Weitere Materialien	. 31
	3.4	Geräte	. 32
4.	MET	HODEN	34
	4.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7 4.1.8	Zellbiologische Methoden Kultivierung von Zellen Kryokonservierung von Zellen Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut Isolierung von Lymphozyten-Subpopulationen Kultivierung von Lymphozyten-Subpopulationen Zytotoxizitätsassay Immunfluoreszenzanalysen	. 34 . 34 . 35 . 35 . 36 . 38 . 38 . 38
	4.1.9	Elektronenmikroskopie	. 41

	4.2	Biochemische Methoden	41
	4.2.1	Immunpräzipitation	41
	4.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	41
	4.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	42
	4.2.4	Western Blot	43
	4.2.5	2D-Gelelektrophorese	44
	4.2.6	Isolation sekretorischer Granula	45
	4.2.7	Auftrennung und Massenspektrometrie der Organellenlysate	47
5.	ERG	BEBNISSE	51
	5.1	Anreicherung und Charakterisierung lytischer Granula	51
	5.1.1	Etablierung der Anreicherung sekretorischer Granula aus allogen	
		stimulierten Lymphozyten	51
	5.1.2	FasL als Marker für sekretorische Granula in Lymphozyten-	
		Subpopulationen	54
	5.1.3	CD63 als Marker für sekretorische Granula	55
	5.2	Etablierung hoch reproduzierbarer 2D-Gelelektrophoresen	57
	5.2.1	Etablierung massenkompatibler Gelfärbungen	59
	5.3	Der Proteinbesatz lytischer Granula aus NK-Zellen	61
	5.3.1	Phänotypische Charakterisierung leukämischer und	
		aktivierter humaner NK-Zellen	61
	5.3.2	Funktionelle Unterschiede leukämischer NK-Zellen	
		bei der Erkennung von Zielzellen	63
	5.3.3	Isolierung und Charakterisierung lytischer Granula aus NK-Zellen	64
	5.3.4	2D-DIGE Analyse angereicherter lytischer Granula aus NK-Zellen	66
	5.3.5	Proteinidentifizierung lytischer Granula aus NK-Zellen durch	~~
	5 2 6	Massenspektrometrie	69
	5.3.0	Differentielle Proteine in sekretonschen Granula aus verschiedenen	71
	537	Verifikation der Unterschiede im Proteom sekretorischer Granula von	11
	0.0.7	NK-Zellen	74
	54	Proteomanalysen sekretorischer Granula aus verschiedenen	
	5.4	T-Zellsubpopulationen	78
	5.4.1	Phänotypische Charakterisierung der Subpopulationen	78
	5.4.2	Charakterisierung der Dichtegradientenfraktionen aus den	
		verschiedenen T-Zellsubpopulationen	79
	5.4.3	Das Proteom FasL-tragender Granula aus CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	81
	5.4.4	Der Proteinbesatz sekretorischer Granula aus CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.	84
	5.4.5	Der Proteinbesatz sekretorischer Granula aus v $\delta 1^+$ und v $\delta 2^+$ T-Zellen	86
	5.4.6	Der Proteinbesatz sekretorischer Granula aus $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen	89
	5.5	Heterogenität sekretorischer Granula in T-Zellen	92
	5.5.1	Zytotoxische Proteine werden in unterschiedlich dichten Granula	
		gespeichert	92
	5.5.2	Elektronenmikroskopische Analysen angereicherter Granula	94
	5.5.3	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit	
		Granula-spezifischen Markern	95
	5.5.4	Unterschiede im Proteom FasL- und Granzym B-reicher Granula	97
	5.5.5	Proteom der Fraktion 6	. 99

	5.6 5.6.1	Reifung lytischer Vesikel Besatz an zytotoxischen Proteinen in Lymphozyten-subpopulationen	. 103 .104
	5.7 5.7.1 5.7.2	Proteomanalysen zur Reifung sekretorischer Granula Die Reifung FasL-tragender Vesikel Die Reifung Granzym B-angereicherter Vesikel	.107 .108 .114
	5.8 5.8.1	Identifikation und Expression von Interleukin-16 in NK-Zellen IL-16 wird in FasL-tragenden Granula gespeichert	. 116 .120
6.	DIS	KUSSION	122
	6.1	Etablierung einer effizienten Anreicherung sekretorischer Granula aus Lymphozyten	ı 122
	6.2 6.2.1	Das Proteom sekretorischer Lysosomen aus NK-Zellen Phänotypische und funktionelle Charakterisierung der humanen	. 124
	6.2.2	Anreicherung und Charakterisierung sekretorischer Granula aus	124
	6.2.3	Unterschiede im Proteom sekretorischer Lysosomen aus NKL, YTS und expandierten NK-Zellen	.125
	6.2.4	Interleukin-16 wird von NK-Zellen exprimiert und mit FasL in Iysosomalen Granula gespeichert	.130
	6.3	Limitierungen der 2D-Gelelektrophorese	.132
	6.4 6.4.1	Proteomanalysen sekretorischer Granula (Fraktion 2) aus T-Zellsubpopulationen Proteom FasL-reicher Granula (Fraktion 2) Relevante Proteine der FasL-Granula	. 133 .134
	6.5	Das Proteom Perforin/Granzym B-reicher Granula (Frakt, 6)	.139
	6.6 6.6.1	Die Reifung sekretorischer Lysosomen Expression zytolytischer Proteine in Lymphozyten und deren Subpopulationen Proteomanalysen zur Reifung sekretorischer Granula	143 143 .145
7.	ZUS	AMMENFASSUNG	148
8.	SUN	IMARY	150
9.	LITE	ERATURVERZEICHNIS	152

10.	ANF	IANG: PROTEINDATEN	165
	10.1	Proteinliste und annotierte Gelscans zum Proteom sekretorischer Granula aus NK-Zellen	.166
	10.2	Proteinliste und annotierte Gelscans zum Proteom der Fraktion 2.	.175
	10.3	Proteinliste und annotierte Gelscans zum Proteom der Fraktion 6.	.190
11.	DAN	IKSAGUNG	201
12.	CUF		202
13.	PUE	BLIKATIONSLISTE	204
14.	ERK	(LÄRUNG	206

Abkürzungsverzeichnis

2D	zwei-dimensional
Abb.	Abbildung
ABC	Ammoniumbicarbonat
AIF	Apoptose induzierender Faktor
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
Arp2/3	Aktin-verwandtes Protein 2/3
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
BP	Bandpassfilter
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BVA	biologische Varianzanalyse
CAU	Christian-Albrechts-Universität
CD	Differenzierungscluster (cluster of differentiation)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CTLA-4	zytotoxische T-Lymphozyten assoziierte Antigen-4
Су	Cyanin
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIA	differentielle in-Gel Analyse
DIGE	Differentielle Gelelektrophorese
DMF	Dimethylformamid
DTT	1,4-Dithio-L-Threitol
DZ	Dendritische Zellen
EBV	Epstein-Barr Virus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenz-gestützte Zellsortierung
FasL	Fas Ligand
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	forward scatter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HLA	humanes Leukozytenantigen
hrlL-2	humanes rekombinantes Interleukin-2
lg	Immunglobulin
IL	Interleukin
LAMP	Lysosomen assoziiertes Membranprotein
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
МНС	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	messenger RNA
МТОС	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
MW	Molekulargewicht

NCAM	neurales Zell-Adhäsions-Molekül
NK	Natrürliche Killer(zellen)
NP-40	Nonidet P40
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMZ	Periphere Blut-Mononukleäre Zellen
PBS	Phosphatpuffer
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
PHA-Blasten	Phytohämagglutinin-aktivierte T-Zell-Blasten
PP	Polypropylen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SD	Standardabweichung
SL	Sekretorische Lysosomen
SSC	sideward scatter
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylendiamin
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TZR	T-Zell-Rezeptor
TZR	T-Zell-Rezeptor
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot

1. Einleitung

1.1 Die Rolle von T- und NK-Zellen im Immunsystem

Das Immunsystem höherer Lebewesen dient dem Schutz vor Infektionen durch Pathogene und lässt sich nach der Funktionsweise und dem Zeitpunkt der Immunabwehr grundlegend unterteilen. Stammesgeschichtlich sehr früh entwickelte sich das angeborene Immunsystem, dem neben physiologischen Barrieren und dem Komplementsystem auch spezielle Zellen, wie Makrophagen, Neutrophile Zellen und Natürliche Killerzellen angehören. Diese Zellen können durch spezielle Rezeptoren Pathogene von körpereigenen Zellen unterscheiden. Somit kann eine Abwehr ohne vorherigen Kontakt mit dem Erreger stattfinden. NK-Zellen sind hierfür konstitutiv "bewaffnet" und können innerhalb weniger Minuten nach Aktivierung Zielzellen lysieren. Die Aktivierung von NK-Zellen erfolgt rasch, aber relativ unspezifisch, da NK-Zellen nicht über Antigen-spezifische Rezeptoren verfügen [1]. Ergänzend dazu gibt es das adaptive Immunsystem, dass sich durch seine Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheitserregern auszeichnet. Insbesondere sind die T-Lymphozyten zu nennen, die spezifische Antigene der Pathogene erkennen und dann klonal expandieren. Dies hat den Vorteil, dass nach dieser Proliferationsphase viele T-Zellen und Effektorzellen des adaptiven Immunsystems zur Verfügung stehen, die gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet sind. Die verschiedenen Zelltypen ergänzen sich nicht nur beim zeitlichen Ablauf einer Immunantwort, sondern auch bei der Erkennung bestimmter pathogener Strukturen. Besonders Viren und einige Bakterien entziehen sich der adaptiven Immunantwort, indem sie sich intrazellulär reproduzieren. Eine Eliminierung der Viren wird durch das Auslösen des programmierten Zelltods, der Apoptose, in der Pathogen-infizierten Zelle erreicht. Apoptose wird nicht nur in Virus-infizierten, sondern auch in entarteten Zellen (Tumore) durch zytotoxische Zellen des Immunsystems ausgelöst. Natürliche und zytotoxische T-Zellen werden somit Killerzellen (NK) nicht nur zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Infektion aktiv, sondern sie sind auch für die präzise Regulation der Apoptose-auslösenden Effektorsysteme verantwortlich.

1.1.1 T-Zellen

T-Zellen sind die zentralen Effektorzellen des adaptiven Immunsystems. Im peripheren Blut sind etwa 30% aller Lymphozyten CD8⁺ zytotoxische T-Zellen, die wie auch NK-Zellen viral infizierte oder maligne Zellen durch Sekretion zytotoxischer Effektorproteine eliminieren. Diese Effektorproteine werden in speziellen lytischen Granula gespeichert. Die Aktivierung dieser Zellen erfolgt durch die Präsentation von Peptiden intrazellulärer, meist viraler Proteine über den Haupthistokompatibilitäts (MHC) Klasse-I Komplex von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ). Der Peptid-MHC Komplex wird dabei über den antigenspezifischen T-Zellrezeptor (TZR) erkannt.

Den Großteil der Lymphozyten machen mit 40% die CD4⁺ T-Zellen aus, die durch stimulatorische oder inhibitorische Zytokine und Chemokine die Immunantwort modulieren. Daher werden sie auch als T-Helferzellen bezeichnet. CD4⁺ T-Zellen können wie auch CD8⁺ T-Zellen unter bestimmten Stimulationsbedingungen lytische Eigenschaften entwickeln [2]. Jedoch ist im Gegensatz zu den klassischen zytotoxischen Zellen, wie CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen, fast nichts über das zytotoxische Potential im Hinblick auf Biogenese und molekulare Zusammensetzung der Effektormaschinerie bekannt [3].

Eine weitere Subpopulation der Lymphozyten stellen die $\gamma\delta$ T-Zellen dar, die sich durch die $\gamma\delta$ Ketten des TZR auszeichnen. Sie stellen einen Anteil von 1-5% der gesamten Lymphozytenpopulation im peripheren Blut dar, jedoch kommen sie in weit größerer Anzahl (bis 50%) in Epithel-reichen Geweben wie der Haut, dem Intestinum und dem Reproduktionstrakt vor [4]. Die Besonderheit dieser Zellen liegt in der Erkennung von proteinogenen und nicht-proteinogenen Strukturen ohne deren Präsentation durch MHC-Komplexe. Nicht zuletzt erschwert diese Eigenschaft, den Zellen eine spezifische biologische Funktion zuzuordnen [5]. Anhand der $\gamma\delta$ Genloci lässt sich eine gewebsspezifische Prädisposition erkennen. So exprimieren $\gamma\delta$ T-Lymphozyten im peripheren Blut zu 50-95% v γ 9 und v δ 2 [6], während die intraepithelialen $\gamma\delta$ T-Zellen hauptsächlich v δ 1 mit verschiedenen V γ Elementen kombinieren [7]. Auch die $\gamma\delta$ T-Zellen besitzen ein zytotoxisches Potential, dass sie unter anderem zum Töten von Tumorzellen befähigt [8]. Es ist auch hier nichts Genaueres über den Inhalt der lytischen Granula und mögliche Unterschiede des Kompartiments im Vergleich zu $\alpha\beta$ T-Zellen oder NK-Zellen bekannt.

1.1.2 NK-Zellen

NK-Zellen werden dem angeborenen Immunsystem zugeordnet. Sie stellen ebenfalls einen relativ geringen Anteil der gesamten Lymphozytenpopulation, in der Maus je nach Gewebe 2-10% und im peripheren Blut des Menschen 2-18% [9]. Die Lebenspanne von NK-Zellen beträgt dabei in beiden Spezies rund zwei Wochen [10,11]. Im Menschen werden NK-Zellen durch das Oberflächenantigen CD56 (NCAM) und das Fehlen des TZR (CD3) definiert [12], wobei je nach Expressionsstärke von CD56 verschiedene Subpopulationen unterschieden werden können.

Obwohl NK-Zellen dem angeborenen Immunsystem zugerechnet werden, ist für eine volle Aktivierung, auch ein "Priming" ähnlich dem der T-Zellen, zum Beispiel durch Dendritische Zellen (DZ) notwendig [13,14].



Abb. 1.1: Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen (A) und NK-Zellen (B). Die T-Zellen werden durch Antigenpräsentation über den MHC Klasse-I Komplex aktiviert. Fehlt dieser Komplex kommt es zur Aktivierung der NK-Zellen. In beiden Fällen wird durch Apoptose die infizierte Zelle abgetötet. (Abb. nach Dr. M. Schubert, Heidelberg)

Wie bereits erwähnt, erfolgt die Präsentation pathogener Peptide an CD8⁺ T-Zellen über MHC Klasse-I Moleküle. Einige Pathogene stören diese Präsentation und entziehen sich so der Immunantwort. NK-Zellen erkennen MHC Klasse-I Moleküle über inhibitorische Rezeptoren. Fehlen körpereigene Strukturen bzw. MHC Moleküle oder zeigen ein verändertes Expressionsmuster, wie beispielsweise auf Tumorzellen, wird das inhibitorische Signal aufgehoben und die NK-Zellen werden aktiviert. Die Apoptose der Zielzellen wird auch hierbei durch zytotoxische Proteine vermittelt, die in spezialisierten Organellen gespeichert werden, den sogenannten sekretorischen Lysosomen. Neben der viralen Abwehr, ist der Inhalt der sekretorischen Lysosomen auch für die Tumoreliminierung durch NK-Zellen essentiell [15,16]. In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien wurde gezeigt, dass die An- oder Abwesenheit bestimmter NK-Zell-Liganden des Tumors der Erkennung dient. So führt bei den Tumoren eine reduzierte Expression von MHC Klasse-I ("missing-self"), sowie die Hochregulation von NKG2D- oder CD27-Liganden zur NK-Zell-vermittelten Lyse [17-19]. NK-Zellen tragen zudem zur Regulation der Immunhomöostase bei, indem unreife Dendritische Zellen (DZ), aktivierte CD4⁺ T-Zellen und hyperaktivierte Makrophagen eliminiert werden [20-22]. Des Weiteren können sie verschiedene Zytokine freisetzen, wobei auch die Mechanismen der Speicherung und Sekretion entsprechender Zytokine noch weitestgehend unbekannt sind [23].

1.2 Sekretorische Lysosomen

Sekretorische Lysosomen (SL) sind spezialisierte bifunktionelle Organellen, die degradative Eigenschaften konventioneller Lysosomen mit einer induzierbaren Freisetzung zytotoxischer Effektorproteine vereinen.

1.2.1 Zelltypen mit sekretorischen Lysosomen

Sekretorische Lysosomen sind im Wesentlichen in Zellen der hämatopoetischen Linie zu finden. So setzen Osteoklasten als spezialisierte Zellen des mononukleärphagozytären Systems nach Fusion von SL mit der Plasmamembran gezielt lysosomale Hydrolasen frei, die dann Knochensubstanz abbauen [24,25].

Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen, Dendritische Zellen oder B-Zellen prozessieren Antigene und MHC Klasse-II Moleküle in so genannten MHC-II Kompartimenten, die einige Eigenschaften von sekretorischen Lysosomen aufweisen [26]. Thrombozyten induzieren die Blutgerinnungskaskade durch die Freisetzung von Serotonin und P-Selectin aus sekretorischen Vesikeln [27]. Weitere Zellen der hämatopoetischen Linie sind basophile Granulozyten und Mastzellen, die nach IgEoder chemotaktisch vermittelter Stimulation Histamin und/oder Serotonin aus ihren Granula freisetzen und dadurch allergische Reaktionen vermitteln können [28]. Eine wesentliche Ausnahme an Zellen mit sekretorischen Lysosomen außerhalb der hämatopoetischen Reihe sind Melanozyten, die dem Neuroektoderm entspringen und als Pigmentzellen der Haut fungieren. Diese Zellen produzieren als Pigment Melanin, welches in Melanosomen synthetisiert und gelagert wird [29,30]. Der vielleicht deutlichste Hinweis dafür, dass Melanosomen als sekretorische Lysosomen angesehen werden können, basiert auf Befunden im Rahmen von genetischen Defekten lysosomaler Transportproteine, die phänotyptisch einerseits mit Immundefizienzen, anderseits aber auch mit Pigmentstörungen (Albinismus) assoziiert sind [31].

1.2.2 Struktur und Inhalt sekretorischer Lysosomen

Morphologisch sind sekretorische Lysosomen von konventionellen Lysosomen kaum unterscheidbar. Beide repräsentieren den Endpunkt eines endozytotischen Weges [32] und entstehen hauptsächlich durch Fusion und Teilung endozytotischer und lysosomaler Kompartimente [33]. Hierdurch bilden sich multivesikuläre Strukturen, die sich nach dem Proteinbesatz der SL unterschiedlich darstellen können. So haben zum Beispiel SL von Thrombozyten dichte Bereiche, während sich MHC-II Kompartimente von APZ (Monozyten, reife DZ) eher lamellenartig darstellen [34]. In diesen findet die Prozessierung und Beladung der MHC Moleküle mit extrazellulären Antigenen statt [35]. T- und NK-Zellen weisen vermutlich sowohl elektronendichte Strukturen (dense cores) auf, die durch Proteoglykane und assoziierte Proteine hervorgerufen werden, als auch Strukturen, die eher an die weniger dichten SL von APZ erinnern.

Der Inhalt konventioneller und sekretorischer Lysosomen ähnelt sich in hohem Maße in der Zusammensetzung. Dementsprechend besitzen beide saure lysosomale Hydrolasen für die Degradation von Proteinen und eine Reihe charakteristischer Membranproteine. Hier sind die lysosomal-assoziierten Membranproteine (LAMPs) zu nennen, zu deren Vertretern LAMP-1 (CD107a) [36], LAMP-2 (CD107b) [37] und LAMP-3 (CD63) [38] gehören. Deren eigentliche Funktion ist noch weitgehend unbekannt, sie spielen aber auch im Zusammenhang mit dem Prozess der Autophagie eine wichtige Rolle [39,40]. Die Proteine der 70 kDa Hitzeschockprotein-Familie (Hsc70) erkennen spezifische Sequenzen zytosolischer Proteine und transportieren diese mit Hilfe der LAMP-Proteine in das Lumen der Lysosomen [41,42]. Der essentielle Unterschied zu konventionellen Lysosomen ist im Falle der SL der Besatz mit Zelltyp-spezifischen Effektorproteinen. Diese können gerichtet sezerniert werden und sind gleichzeitig entscheidend für das jeweilige morphologische Erscheinungsbild.

Die meisten Zelltypen enthalten sowohl konventionelle, als auch sekretorische Lysosomen [43]. Es wurde postuliert, dass die meisten Lysosomen zytotoxischer T-Lymphozyten (ZTL) sekretorische Proteine enthalten [44]. Da diese sekretorischen Komponenten häufig eine zytolytische Aktivität aufweisen, werden die Organellen auch als lytische Granula bezeichnet.

5

1.2.3 Der Inhalt lytischer Granula

Die lytischen Granula von T- und NK-Zellen setzen sich aus einer äußeren Membran und den bereits erwähnten elektronendichten "dense cores" zusammen. In diesen liegen vor allem zytotoxische Proteine, wie Granulysin, Perforin und Granzyme komplexiert mit Chondroitin-Sulfat-reichen Proteoglykanen vor [45,46]. Diese zur Serglycinfamilie gehörenden, negativ geladenen Moleküle regulieren Lagerung und Freisetzung von Perforin und Granzymen [47,48]. Neben den oben genannten stark glykosilierten LAMP Proteinen, die bei Lysosomen etwa 50% der Membranproteine ausmachen, sind in T- oder NK-Zellen charakteristische Proteine wie der negative Kostimulator CTLA-4 (CD152) und der Todesfaktor Fas Ligand (CD178) zu finden (Abb.1) [49-51].



Abb. 1.2: Sekretorische Lysosomen zytotoxischer T-Zellen. Nach Erkennung über den T-Zellrezeptor (TZR) werden lytische Granula mobilisiert und deren Inhalt in die immunologische Synapse freigesetzt. Dabei werden neben klassischen lytischen Proteinen (FasL, Perforin, Granzyme, Granulysin), auch akzessorische (Serglycin) und regulatorische (CD63, CTLA-4) Moleküle ausgeschleust. (Abb. verändert nach Lettau, Schmidt et al. 2007 [52])

Fas Ligand

Der Fas Ligand (FasL, CD178, CD95L oder auch TNFSF6) ist ein Typ II Transmembranprotein und gehört zur Tumor-Nekrosis-Faktor Superfamilie (TNFSF) von Zytokinen [53]. FasL kann durch Interaktion mit seinem Rezeptor Fas (CD95) Apoptose auslösen und ist ein wesentlicher Regulator der Immunhomöostase [54]. FasL ist nicht nur zytotoxisches Effektormolekül von T- und NK-Zellen, sondern ist auch an der Ausbildung sogenannter immunprivilegierter Gewebe beteiligt, wie dem Trophoblasten, dem Gehirn oder dem Auge [55-57]. Der dabei zugrunde liegende Mechanismus wird von einigen Tumoren genutzt, um sich vor infiltrierenden T-Lymphozyten zu schützen, ein Vorgang, der als "tumor-counterattack" bezeichnet wird [58,59].

CTLA-4

Das zytotoxische T-Lymphozyten assoziierte Antigen-4 (CTLA-4) ist ein membranständiges Glykoprotein der Immunglobulin Superfamilie mit ähnlichen Bindungspartnern wie das kostimulatorische Protein CD28 [60,61]. Eine T-Zelle benötigt neben der Aktivierung über den TZR ein zweites (kostimulatorisches) Signal, welches von CD28 vermittelt wird. Nach Aktivierung wird mit der Freisetzung zytotoxischer Proteine auch das membranständige CTLA-4 auf die Oberfläche transloziert. Da dieses Protein eine 10-fach höhere Affinität zu den CD28 Liganden CD80 und CD86 hat, kommt es zur kompetitiven Hemmung und negativen Regulation der T-Zell Aktivierung [62].

CD63

CD63 ist ein Mitglied der Tetraspaninfamilie und gilt als Markerprotein für das lysosomale Kompartiment [63]. CD63 (LAMP-3, Granulophysin, Tetraspanin-30) wird in T-Zellen nach Aktivierung auf der Plasmamembran exprimiert, wo es unter Umständen auch als kostimulatorisches Molekül fungieren kann [64].

Perforin

Perforin war das erste Protein, welches aus lytischen Granula isoliert und 1985 als Ca²⁺-abhängiges, porenformendes Protein beschrieben wurde [65-67]. In ZTL kolokalisiert das Ca²⁺-assoziierte Protein Calreticulin mit Perforin und wird ebenfalls bei Degranulation freigesetzt [68]. Die Interaktion der beiden Proteine findet an der P-Domäne des Perforins statt, welche auch eine hohe Affinität gegenüber Ca²⁺ besitzt. Bei hohen Ca²⁺ Konzentrationen dissoziieren die beiden Proteine und

Perforin verankert sich in der Membran der Zielzelle, wo es polymerisiert und zylindrische Poren mit einem inneren Durchmesser von 5 bis 20 nm bildet [69,70]. Calreticulin kann somit als Ca²⁺-abhängiges Chaperon für Perforin angesehen werden [71]. Auch 24 Jahre nach seiner Entdeckung werden Wirkmechanismus und Funktion von Perforin kontrovers diskutiert. Drei Modelle zur zytolytischen Aktivität von Perforin wurden dabei experimentell etabliert.



Abb. 1.3: Drei Modelle für die Transport zytolytischer Moleküle in die Zielzelle. Die Mechanismen zu den drei Modellen sind im nachfolgenden Text erläutert. (Abb. aus [72])

A) Das am weitesten anerkannte Modell postuliert, dass die oben genannten Poren einen passiven Transport von Granzymen und Granulysin (siehe unten) durch die Plasmamembran der Zielzelle ermöglichen. Des Weiteren kommt es zum Ausstrom von Ionen, was ein osmotisches Ungleichgewicht hervorruft und damit das Eintreten des Zelltodes unterstützt [73].

B) Motyka et al. zeigten jedoch, dass Granzym B auch in Abwesenheit von Perforin über die ionenunabhängige Internalisierung eines Granzym B / Mannose-6-phosphat Rezeptor Komplexes in die Zielzelle gelangen kann [74]. Sie postulierten, dass zusammen mit Granzym B auch Granzym A, Granulysin und Perforin in kompletten endosomalen Vesikeln internalisiert. Perforin ermöglicht dann eine Freisetzung ins Zytoplasma durch Porenbildung in der endo-lysosomalen Membran der Zielzelle. Hierdurch kann wiederum Apoptose induziert werden.

C) Keefe et al. zeigten, dass Granzym-haltige multimolekulare Komplexe durch elektrostatische Wechselwirkungen an negativ geladene Glykosaminoglykane der Zielzell-Plasmamembran adhärieren [75]. Durch Perforin wird ein Ca²⁺-Einstrom in die Zelle verursacht, die dadurch aktiviert wird und versucht durch Internalisierung der geschädigten Membran die eigene Nekrose zu verhindern. Endozytierte Granzyme können so Apoptose in der Zielzelle auslösen [76].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Perforin vielleicht nicht essentiell für den Transport von Proteasen in die Zielzelle ist, jedoch als ein zentraler Vermittler der Zytolyse fungiert.

Granzyme

Granzyme sind globuläre Serinproteasen. Es gibt mindestens fünf humane und zehn murine Granzyme, von denen Granzym A und B zu den abundantesten zählen und am besten untersucht sind. Granzyme lösen durch verschiedene Mechanismen in der Zielzelle Apoptose aus. Granzym A induziert durch Hydrolyse von Proteinen mit basischen Aminosäuren wie Arginin oder Lysin eine Caspase-unabhängige Apoptose [77,78]. Des Weiteren aktiviert Granzym A einen dem endoplasmatischen Reticulum (ER) assoziierten Komplex (SET-Komplex), der auf noch unbekannte Weise in den Kern transloziert [77]. Dort wird durch Granzym A das Protein NM23-H1 freigesetzt, welches die chromosomale DNA degradiert [79]. Auch eine mögliche Spaltung des Histons 1 wird postuliert, wodurch das freigesetzte Chromatin für Endonukleasen zugänglich wird [80].

Granzym B spaltet Proteine am C-Terminus nach sauren Aminosäuren, besonders nach Asparaginsäure [81]. Granzym B kann Apoptose auf zwei verschiedenen Wegen induzieren. Beim extrinsischen Weg wird direkt die Effektor-Caspase-3 aktiviert, was zur Apoptose mit DNA-Fragmentierung, Auflösung der Kernmembran und Zerstörung des Zytoskeletts führt [82]. Beim intrinsischen Weg wird die Permeabilität der äußeren Membran von Mitochondrien erhöht und das Protein Bid gespalten [83]. Dieses induziert die Freisetzung von Cytochrom C und anderen apoptogenen Proteinen (z.B. Apoptose induzierende Faktor (AIF)) [81]. Durch Cytochrom C wird wiederum die Bildung des Apoptosoms und die Aktivierung von Caspase-9 induziert, die anschließend über eine Spaltung und Aktivierung von Caspase-3 die oben beschriebenen Effekte auslöst.

9

Neben diesen beiden Granzymen gibt es in lytischen Granula noch weitere, deren Funktion allerdings bisher weniger detailliert beschrieben ist. Granzym K ist eine Trypsin-ähnliche Protease, die ebenfalls Bid-abhängige Apoptose auslösen kann [84]. Granzym H ist eine Chymotrypsin-ähnliche Protease (Chymase) und scheint synergistisch mit Granzym B zum Zelltod zu führen [85]. Das letzte bekannte Granzym im Menschen ist Granzym M, welches vornehmlich in NK-Zellen exprimiert wird [86] und Zelltod insbesondere durch Spaltung von Ezrin und α -Tubulin induziert [87].

Granulysin

Granulysin ist ein kleines, zytolytisches Protein, das zur Saposin-Familie gehört und ebenfalls in lytischen Granula von T- und NK-Zellen gespeichert wird [88]. Eine Zellschädigung wird durch die Anlagerung des kationischen Proteins an negativ geladene Lipide der Mitochondrienmembran ausgelöst, wodurch Cytochrom C und AIF, sowie Caspasen und Endonukleasen aktiviert werden [89-91]. Bei Infektion mit intrazellulären, mikrobiellen Pathogenen wirkt Granulysin direkt durch Veränderung der Membranintegrität [92]. Granulysin wird neben der zytotoxischen Funktion auch eine Funktion als Chemokin und Aktivator von Leukozyten zugeschrieben [93].

1.2.4 Die Biogenese sekretorischer Granula

Die Granzyme A und B gelangen über den Mannose-6-phosphat Rezeptor (MPR) Weg in die SL. Hierzu werden die Proteine zunächst im Cis-Golgi-Netzwerk mit Mannose-6-phosphat (M6P) modifiziert und über das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zu den SL transportiert [94]. Jedoch scheint es auch noch einen M6P-unabhänigigen Weg zu geben, da bei MPR-defizienten Zellen noch 30% der Granzyme in die Granula transportiert werden [95]. Auch Perforin und Granulysin nutzen einen MPR unabhänigen Weg, der noch nicht im Detail aufgeschlüsselt ist.

Lysosomale Membranproteine werden in der Regel über Adapter Proteine (AP-1 bis AP-3) zu den SL transportiert [96]. Hierbei stellt FasL eine Ausnahme dar. Die Expression und der Transport dieses potenten Todesfaktors muss streng kontrolliert werden. Hierfür wird offensichtlich die prolinreiche Domäne des cytoplasmatischen Anteils des FasL genutzt, welche Proteine mit Src-Homologie-3 Domänen (SH3) binden kann. Es wird postuliert, dass über die Bindung von SH3-Proteinen ein direkter Transport vom TGN zu den Granula gewährleistet wird [97]. Über den

genauen molekularen Mechanismus ist jedoch auch im Falle des FasL Transportes wenig bekannt.

1.2.5 Regulation der Exozytose und Bildung der immunologischen Synapse

Die Exozytose der SL findet nur nach vorheriger Aktvierung der T- und NK-Zellen statt. Bei ZTL geschieht dies über die Stimulation des T-Zellrezeptors durch Antigen auf der Zielzelle und Ausbildung einer "immunologischen Synapse". Erkennt der TZR ein spezifisches Antigen, initiiert dies eine Signalkaskade, die zum Ca²⁺ Einstrom und zur Aktivierung der T-Zelle führt. Es bildet sich an der T-Zell – APZ Kontaktzone ein zentraler supramolekularer Aktivierungskomplex (SMAC) aus, der unter anderem den TZR und CD8 enthält. Dieser zentrale Komplex (c-SMAC) wird in der Peripherie von einem Ring aus Adhäsionsproteinen (LFA-1) umgeben, der als p-SMAC bezeichnet wird [98]. Innerhalb des zentralen Komplexes befindet sich auch die sekretorische Domäne, in der die lytischen Granula ihren Inhalt freisetzen [99] (siehe auch Abb. 1.2).

Bei NK-Zellen verläuft die Bildung der immunologischen Synapse (IS) ähnlich, jedoch erfolgt die Auflösung durch das Zusammenspiel von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren. Wie bereits erwähnt, kann eine Reduktion körpereigener MHC-I Komplexe auf transformierten Zielzellen über bestimmte NK Rezeptoren erkannt werden.

Nach Aktivierung der Zellen verläuft der Transport zur Plasmamembran in T- und NK-Zellen vergleichbar. Das Mikrotubuli-Organisations Zentrum (MTOC), der Golgi-Apparat und Mitochondrien reorientieren und polarisieren durch F-Aktin Reorganisation zur immunologischen Synapse [100]. Die Granula sammeln sich am MTOC und werden von dort über Dynein-Dynactin Motorproteine entlang der Microtubuli zur immunologischen Synapse transportiert [101]. Dort findet der weitere Transport wahrscheinlich über das Aktinzytoskelett statt, dabei spielt auch Myosin IIA eine wichtige Rolle [102]. An der Fusion mit der Plasmamembran und der anschließenden Degranulierung ist unter anderem Rab27a beteiligt [103]. Dieses G-Protein vermittelt die Bindung zu Munc13-4, welches vermutlich mit SNARE (solube N-ethylmaleimide-sensitive factor assory-protein receptor) Proteinen der Plasmamembran interagiert [104].

Neuste Befunde zeigten allerdings, dass der Mechanismus der Exozytose nicht einheitlich auf alle sekretorischen Granula projiziert werden kann. So konnte in

murinen Zellen gezeigt werden, dass die Oberflächenexpression von gespeichertem FasL Ca²⁺-unabhängig verläuft, während die Degranulation von Granzymen und Perforin ein Ca²⁺ Signal benötigt [105]. Diese verschiedenen Signale hängen unter anderem von der Stärke der TZR Aktivierung ab [106]. Es wurde postuliert, dass bei einem schwachen TZR Signal eine FasL-vermittelte Apoptose stattfindet, während eine starke Aktivierung zur Perforin/Granzym-vermittelten Zytotoxizität führt [107]. Ebenfalls scheint auch der Transport zur immunologischen Synapse unterschiedlich zu verlaufen. Es wurden für die FasL- und Perforin/Granzym-Degranulation verschiedene Zytoskelett Proteine identifiziert, die unabhängig voneinander einen Transport ermöglichen. Außerdem wurde in diesen Studien keine fluoreszenzmikroskopische Kolokalisation des FasL mit anderen klassischen lytischen Proteinen beobachtet [105,108]. Aufgrund dieser Befunde postulierten Kassahn und Kollegen, dass der FasL und andere Marker für sekretorische Lysosomen auf unterschiedlichen Wegen freigesetzt werden bzw. dass die unterschiedlichen Effektroproteine nicht im gleichen Kompartiment lokalisiert sind [108].

1.2.6 Sekretorische Granula und assoziierte Krankheiten

Fehlfunktionen des Transportes und der Sekretion von sekretorischen Granula äußern sich in der Regel gleichzeitig in Immundefizienzen und (partiellem) Albinismus, was auf den funktionellen Zusammenhang zwischen SL in Effektorzellen des Immunsystems und in Melanozyten zurückzuführen ist. Durch die nachfolgend beschriebenen genetischen Defekte konnten die Funktionen einiger an der Sekretion beteiligter Proteine aufgeklärt werden.

Chédiak-Higashi Syndrom (CHS)

Das Chédiak-Higashi Syndrom ist eine seltene autosomal rezessive Erkrankung, die neben den oben genannten Defekten auch neurologische Fehlfunktionen aufweist [109]. Patienten mit CHS bzw. Mäuse mit dem entsprechenden Syndrom (*beige*) weisen einen Defekt des 400 kDa Protein CHS1 (bzw. Lyst in der Maus) auf. Morphologisch äußert sich dies in vergrößerten Lysosomen, die als Riesenlysosomen in verschiedenen Zelltypen vorliegen [110]. Beide Formen sind mit partiellem Albinismus und Funktionsstörungen in T- und NK-Zellen assoziiert.

Hermansky-Pudlack Syndrom (HPS)

Zurzeit gibt es beim Menschen acht verschiedene Mutationen, die in verschiedener Ausprägung als HPS zusammengefasst wurden [111]. Bei Mäusen sind wenigstens 15 verschiedene Mutationen beschrieben [112]. Die *"peart*" Mutation entspricht dem HPS Typ 2 des Menschen. Hierbei ist das Gen AP3B1 mutiert, welches für die β-Untereinheit des Adapter Protein 3 (AP3) codiert [113,114]. Im Gegensatz zum CHS stellt sich die Pathologie zusätzlich zum Albinismus und defekter Zytotoxizität, auch durch Thrombozytenaggregationsstörungen mit einer Blutungsneigung dar. Dieser Phänotyp beruht auf einer Dysfunktion der Exozytose sekretorischer Granula von Thrombozyten [115]. Die AP-3 Mutation resultiert in einem fehlerhaften Transport der LAMP Proteine zu den sekretorischen Lysosomen, wie auch in einem defekten Transport der Lysosomen selbst entlang der Mikrotubuli [116].

Griscelli Syndrom (GS)

Beim Griscelli Syndrom werden zwei verschiedene Typen unterschieden. Das Griscelli Syndrom Typ 2 resultiert aus einem Defekt der Rab27a Expression [117]. Diese kleine GTPase ist in Melanozyten für das Andocken von Lysosomen an die Plasmamembran verantwortlich. Eine Dysfunktion verhindert eine Sekretion von Melanosomen und resultiert in Hypopigmentierung. Auch die Sekretion lytischer Granula ist beeinträchtigt, was zu einer deutlich geschwächten Immunabwehr und damit erhöhter Infektanfälligkeit führt. Beim GS Typ 1 liegt der Defekt in der Myosin Va Expression [118]. Dieses Protein ist zusammen mit Rab27a für den Transfer von Melanosomen von Mikrotubuli zum Aktinzytoskelett verantwortlich. Da es bei diesem Defekt aber nicht zur fehlerhaften Sekretion von lytischen Granula kommt, lässt sich hier schlussfolgern, dass in ZTL ein anderer Mechanismus vorliegt [119].

Familiäres Hämophagozytose-Syndrome (FHL)

Bei dieser Erbkrankheit liegt ebenfalls eine Störung der Zytotoxizität vor. Hier kommt es vor allem im Rahmen einer antiviralen Immunantwort zu einer unkontrollierten Aktivierung und Proliferation von ZTL. Die dadurch entstehende massive Zytokinausschüttung mit nachfolgender Makrophagenaktivierung führt morphologisch zur Phagozytose von Blutzellen, was auch als Hämophagozytose bezeichnet wird. Es werden mehrere Typen der FHL unterschieden. Hierzu gehören Defekte im Perforin-Gen (FHL-2), wobei die Granula zwar noch degranulieren können, jedoch kein funktionelles Perforin beinhalten [120]. Bei FHL-3 dagegen ist die Degranulierung gestört, da hier das Gen defekt ist, welches für Munc13-4 kodiert. Wie bereits zuvor erwähnt, interagiert dieses Protein mit Rab27a und vermittelt die Fusion mit der Plasmamembran [121].

1.3 Proteomanalysen lysosomaler Kompartimente

Das Spektrum an SL-assoziierten Krankheiten kann bei weitem nicht den Proteinbesatz der lysosomalen Strukturen wiedergeben. Eine Proteomanalyse von gereinigten Granula ermöglicht jedoch eine detailliertere Analyse. Der Vorteil von Proteomanalysen liegt in der quantitativen Detektion von Proteinen, die meist in ihrer aktiven Form vorliegen. Dagegen sind RNA-Analysen nur bedingt aussagekräftig, da die mRNA-Expression nicht zwangsweise mit der Proteinmenge korrelieren muss. Dies ist besonders bei gespeicherten Proteinen der Fall. Die ersten Experimente zur Isolierung von Lysosomen wurden mit Rattenhepatozyten durchgeführt. Mit der Erfindung der Matrix-unterstützten Laser-Desorption / Ionisation (MALDI) war es ab den 1980-er Jahren möglich, einzelne Proteine unabhängig von immunologischen oder enzymatischen Nachweisen zu identifizieren. So gelang es unter anderem Bagshaw et al., eine erste Proteinkarte von Tritosomen aus der Rattenleber zu erstellen [122]. Tritosomen sind lysosomale Strukturen, die nach oraler Verabreichung von Triton WR1339 eine veränderte Dichte aufweisen, wodurch eine einfachere Separation im Dichtegradienten ermöglicht wird. Da jedoch bei der Analyse von humanen Proben dieses Hilfsmittel entfällt, ist ein effizientes Reinigungsprotokoll der Lysosomen essentiell. Dichtegradientenfraktionen sind zwangsläufig nicht absolut rein, dies muss aber nicht unbedingt von Nachteil sein. Angereicherte, Granula-assoziierte Proteine lassen so Rückschlüsse auf eine mögliche Verknüpfung zum Zytoskelett oder anderen subzellulären Strukturen zu. Diese assoziierten Proteine könnten dadurch eine Bedeutung in Mobilisierung, Transport und Fusion mit der Plasmamembran haben.

1.3.1 Die zwei-dimensionale differentielle Gelelektrophorese (2D-DIGE)

Das Prinzip der 2D-DIGE Technologie beruht, ähnlich der konventionellen zweidimensionalen Gelelektrophorese, auf der Separation der Proteine anhand ihres Molekulargewichts und isoelektrischen Punktes. Jedoch findet vor dieser Separation eine Markierung der Proteinlysate mit fluoreszierenden Farbstoffen statt. Diese sogenannten CyDyes binden dabei über einen N-Hydroxysuccinimidester (NHS-

Ester) an primäre Amine (wie z.B. Lysin). Da die Fluoreszenzintensität eines Spots im Gel mit seiner Proteinmenge korreliert, kann man durch die Nutzung verschiedenfarbiger Fluoreszenzfarbstoffe, Unterschiede in Proteinbesatz und -expression quantifizieren. Aufgrund der Eigenschaften der Farbstoffe und der Markierungsmethodik erreicht man im Gegensatz zu herkömmlichen Silber- oder Coomassie-Gelen zudem einen sehr großen dynamischen Bereich [123]. Da sich durch die Eigenmasse der Farbstoffe das Molekulargewicht der Proteine um je 434-464 Da (abhängig vom CyDye) vergrößern würde, wird das Verhältnis von Protein und Farbstoff so gewählt, dass nur circa 3-5% der Proteine markiert werden. Deshalb wird diese Methode auch als Minimalmarkierung bezeichnet. Trotz dieser geringen Farbstoffmenge liegt die Detektionsgrenze bei 0,1-1,0 ng Protein [124,125]. Der größte Vorteil dieser Technologie ist jedoch der Vergleich von zwei ähnlichen Proben in einem Gel, wodurch elektrophoretische Laufunterschiede zwischen zwei separat laufenden Gelen entfallen. Dies reduziert die Anzahl der Gele um ein Vielfaches und erlaubt anschließend eine softwaregestützte, statistische Analyse der differentiellen Proteine.

2. Fragestellung

Zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen vermitteln ihre Effektorfunktionen über eine induzierbare Freisetzung von zytotoxischen Proteinen wie FasL, Perforin, Granulysin und Granzymen. Um eine effiziente Lyse von Zielzellen zu erreichen, ist es notwendig, dass diese Effektormoleküle in mobilisierbaren Organellen gespeichert werden, aus denen sie bei Bedarf schnell in die zytotoxische immunologische Synapse freigesetzt werden können.

Zu Beginn der Arbeit war unklar, ob in verschiedenen Zellpopulationen einheitliche sekretorische Lysosomen vorliegen, oder ob sich anhand des Proteinbesatzes verschiedene sekretorische Granula unterscheiden lassen. Des Weiteren waren die Befunde zur Reifung der sekretorischen Vesikel und damit zur Expression einzelner Effektorproteine in ruhenden oder aktivierten Lymphozyten widersprüchlich.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst eine Methodik zur Isolierung und Analyse intakter Vesikel etabliert werden, um mittels differentieller Proteomanalytik die oben angedeuteten Unklarheiten zu beseitigen.

Zielsetzung im Einzelnen:

- 1. Etablierung eines Protokolls zur Anreicherung von sekretorischen Lysosomen aus T-Zellen und natürlichen Killerzellen
- 2. Charakterisierung und Abgrenzung der individuellen Organellenfraktionen mittels Nachweis bekannter Markerproteine in Western Blots
- 3. Etablierung der 2D-DIGE-Plattform und Optimierung der Probenvorbereitung und -prozessierung für die folgenden differentiellen Proteomanalysen
- 4. Erste Validierung der Methodik durch vergleichende Analysen einzelner Fraktionen aus T-Zellpopulationen unterschiedlicher Spender
- Anwendung der Methodik zur Charakterisierung und zum Vergleich angereicherter sekretorischer Vesikel aus NK-Zelllinien und primären NK-Zellen
- 6. Erstellung einer Proteomkarte sekretorische Lysosomen aus NK-Zellen
- 7. Exemplarische Verifizierung ausgewählter apparenter Unterschiede (biochemisch, durchflußzytometrisch, mikroskopisch)
- 8. Charakterisierung und Vergleich angereicherter sekretorischer Lysosomen aus verschiedenen T-Zell-Subpopulationen
- 9. Erstellung einer Proteomkarte sekretorische Lysosomen aus T-Zellen

10. Vergleich angereicherter sekretorischer Lysosomen aus $\alpha\beta$ T-Zellen (hier CD4⁺ und CD8⁺) und $\gamma\delta$ T-Zellen (hier $v\delta1^+$ und $v\delta2^+$)

Aufgrund der erzielten Ergebnisse ergaben sich während der Arbeit neue Fragestellungen zur Reifung sekretorischer Vesikel in unterschiedlichen Zellpopulationen und zu Vorkommen und Besatz unterschiedlich beladener lytischer Granula.

Im Laufe der Arbeit neu formulierte Ziele:

- 11. Darstellung der Reifung sekretorischer Granula anhand der Expression zytotoxischer Moleküle in individuellen Zellpopulationen, sowie Vergleich von Vesikeln aus ruhenden und aktivierten Zellen (mittels 2D-DIGE Analyse).
- 12. Mikroskopische und biochemische Charakterisierung sowie direkter Vergleich zweier Populationen von sekretorischen Granula aus der differentiellen und Dichtegradienten-Zentrifugation (Fraktion 2 - "FasL/CD63" Lysosomen; Fraktion 6 - dichte "Granzym" Granula)

3. Material

3.1 Material für die Zellbiologie

3.1.1 Zellen

Als Quelle für mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) dienten Buffy-Coat Präparationen gesunder Spender, die vom Institut für Transfusionsmedizin, UK-SH, Campus Kiel bzw. Campus Lübeck bereitgestellt wurden.

Die NK-Zelllinien NKL und YTS und die MHC-Klasse-I negative B-Zelllinie 721.221 wurden von Carsten Watzl (Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die Erythroleukämie-Linie K562 (ATCC: CCL-243) wurde von David Kaplan (Cleveland, USA) bereitgestellt. Der stabil FasL exprimierende Klon JFL39.1 wurde im Labor aus einer Apoptose-resistenten Variante (RAPO) der humanen Leukämielinie Jurkat hergestellt. Für Restimulationen wurden EBV-transformierte B-Zelllinien (EBV-O und EBV-M) eingesetzt, die ebenfalls aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zur Verfügung Darüber hinaus wurden neben eigens gereinigten Тstanden. und NK-Zellpopulationen etablierte $\gamma\delta$ T-Zelllinien (DCv δ 1, DCv δ 2, DKv δ 1 und DKv δ 2) von Dr. Daniela Wesch (AG Kabelitz, Immunologie Kiel) für einige Versuche verwendet.

3.1.2 Medien und Puffer

3.1.2.1 Zellkulturmedien

RPMI 1640 mit 25 mM HEPES und L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)	Invitrogen
<u>Zusätze für Zellkulturmedien</u> Penicillin / Streptomycin (10000U) / (10000 µg)	Biochrom AG, Berlin
FCS (fetal calf serum) (inaktiviert bei 56°C für 30 min, 0,22 µm steril filtriert)	Invitrogen, Karlsruhe

Die Medien wurden mit 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, Zelllinien-spezifisch mit 5-12,5% (v/v) FCS und 50 μ M β -Mercaptoethanol versetzt. Lagerung: 4°C

weitere Zusätze		
Phytohämagglutinin (HA16) in PBS Proleukin [®] S (Interleukin-2) 0.01 M β-Mercaptoethanol (200-fach Stock) 70 ul in 100 ml	Remel, Dartford, UK Novartis, Nürnberg PBS, filtriert durch
0,22 μm PVDF	, · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
Einfriermedium Zellkulturmedium mit 20% (v/v) FCS und 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO), gekühlt unmittelbar verwenden		Merck, Darmstadt
PBS (Phosphate-buffered saline)		
PBS/DULBECCO	eine Einheit	Biochrom AG
ddH ₂ O, Lagerung :4°C	ad 10 I	
<u>Eosin-Lösung</u>		
Eosin	2 g	Merck
NaN ₃	0,25 g	Merck
FCS	50 ml	Invitrogen
0,9% NaCI-Lösung	450 ml	
Filtrieren, Lagerung: 4°C		
Trypanblau-Lösung		
0,1% Trypanblau in PBS		Merck
3.1.2.2 Zellseparation		
Ficoll (1,077 g/ml)		Biochrom AG
MACS Waschpuffer		
BSA (bovines Serumalbumin)	0,5% (w/v)	Roth, Karlsruhe
EDTA	2 mM	Merck
Lösen in PBS, Lagerung: 4°C		

3.1.2.3 Durchflusszytometrie

<u>Waschpuffer</u>		
BSA	1% (w/v)	Roth
NaN ₃	0,1% (w/v)	Merck
Lösen in PBS, Lagerung: 4°C		
Fixierungspuffer PFA (Paraformaldehvd)	1% (w/v)	Merck
Lösen in PBS, Lagerung: 4°C	.,	moreix
3.1.2.4 Konfokale Mikroskopie		
<u>Poly-L-Lysin-Lösung</u> Poly-L-Lysin in PBS	100 µg/ml	Sigma, München
PEM-Puffer (2x)	000	Marcal
PIPES	200 mM	Merck
MgCl ₂	2 mM	Merck
EGIA nH 6 95 einstellen und steril filtrierer	2 mM	Merck
	Γ(0,22 μπ)	
<u>Borat-Puffer (2x)</u> Natriumborat (Na ₂ B ₄ O ₇)	200 mM	Merck
MgCl ₂	2 mM	Merck
pH 11 einstellen und steril filtrieren (0,22 μm)	
<u>Fixierungspuffer</u>		
PFA in PBS	6% (w/v)	Merck
pH 7 einstellen, zur Herstellung des PEM-Puffer (2x) bzw. Borat-Puffer (2	Fixierungspuffers mit (2x) mischen	gleichem Volumen
Permeabilisierungspuffer Triton X-100 in PBS	1% (v/v)	Merck
<u>Reduktionslösung</u> NaBH₄ in PBS	0,1% (w/v)	Merck

<u>Blockierungspuffer</u>		
BSA	0,2% (w/v)	Merck
Triton X-100 in PBS	0,01% (v/v)	Merck
Mounting Medium Prolong Gold Antifade Reagent Mounting Medium mit DAPI		Invitrogen

3.1.3 Antikörper

Tabelle 3.1: Primärantikörper für die Immunfluoreszenz

Primärantikörper	Klon	lsotyp	Applikation		Bezugsquelle
			DZ	KM	_
α-CD2-FITC (S5.2)		lgG2a	1/5	-	BD Pharmingen, Heidelberg
α-CD2-PE (S5.2)		lgG2a	1/5	-	BD
α-CD3-FITC (SK7)		lgG1	1/5	-	BD
α-CD3-PE (SK7)		lgG1	1/5	-	BD
α-CD4-FITC (SK3)		lgG1	1/5	-	BD
α-CD4-PE (SK3)		lgG1	1/5	-	BD
α-CD8-FITC (SK1)		lgG1	1/5	-	BD
α-CD8-PE (SK1)		lgG1	1/5	-	BD
α-CD16-FITC (Leu11a)		lgG1	1/5	-	BD
α-CD19-FITC (4G7)		lgG1	1/5	-	BD
α-CD19-PE (4G7)		lgG1	1/5	-	BD
α-CD25-PE (IL-2R)	PC61	lgG1	1/5	-	BD
α-CD56-FITC (NCAM)		lgG2b	1/5	-	BD
α-CD56-PE (NCAM)		lgG2b	1/5	-	BD
α-NKG2D	1D11	lgG1	1/5	-	BD
α-TZR $\alpha\beta$ -FITC		lgG1	1/5	-	BD
α-TZR γδ-ΡΕ		lgG1	1/5	-	BD
α-vδ1-FITC		lgG1	1/5	-	BD
α-vδ2-FITC		lgG1	1/5	-	BD
α-Granzyme A-FITC	GrA-11	lgG1	1/5	1/50	immunotools
α-Granzyme B Alexa 647	GB11	lgG1	1/100	1/50	BD
α-Perforin Alexa 647	dG9	lgG2b	1/40	-	Biozol, Eching

Primärantikörper	Klon	Isotyp	Applikation		Bezugsquelle
			DZ	KM	
α-Perforin Alexa 488	dG9	lgG2b	1/40	-	Biozol, Eching
α-HLA-DR-FITC	L243	lgG2a	1/50	-	BD
α-Interleukin-16	70719	lgG1	-	1/50	R&D, Minneapolis, USA
α-FasL	Nok1	lgG1	-	1/50	BD
Isotypkontrollen					
α-IgG₁-FITC			1/5	-	BD
α-IgG₁-PE			1/5	-	BD
α -IgG _{2a} -FITC			1/5	-	BD
α -IgG _{2a} -PE			1/5	-	BD
IgG ₁ Kontrolle (MOPC21)			-	1/50	Abcam, Cambridge, UK
lsotypkontrollen für intrazel	luläre Fär	bungen			
α-IgG₁-Alexa 647	MOPC-2	:1	1/100	-	BD
α -IgG _{2b} -Alexa 488	MPC-11		1/40	-	BD
α-IgG₁-Alexa 488	MOPC-2	.1	1/50	-	BD
α -IgG _{2b} -Alexa 647	MPC-11		1/40	-	BD

Abkürzungen: DZ, durchflusszytometrische Analyse; KM, konfokale Mikroskopie

Tabelle 3.2: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

Sekundärantikörper	Konz.	Appli	kation	Bezugsquelle
		DZ	KM	
Esel α-Maus Alexa 555	2 mg/ml	-	1/200	Invitrogen
Esel α-Maus Alexa 488	2 mg/ml	-	1/200	Invitrogen
Kaninchen α -Ziege Alexa 555	2 mg/ml	-	1/200	Invitrogen

Abkürzungen: DZ, durchflusszytometrische Analyse; KM, konfokale Mikroskopie

3.1.4 Kits

Zellisolationskits

Tabelle 3.3: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

Name	Nummer	Isolationsmethode
CD4 ⁺ T-Zell Isolations Kit II	#130-091-155	negativ
CD8 ⁺ T-Zell Isolations Kit	#130-094-156	negativ
Anti TZR g/d Micro Bead Kit	#130-050-701	positiv
NK-Zell Isolations Kit	#130-092-657	negativ

Zytotoxizitätskit

CytoTox96 Zytotoxizitätsassay

Promega

3.2 Material für die Biochemie

3.2.1 Puffer und Reagenzien

3.2.1.1 Lysepuffer

NP40-L	yse	pu	ffer
		-	

Nonidet [®] P 40 (NP40)	1% (v/v)	Fluka, Seelze
Tris-Puffer	20 mM	Merck
NaCl	0,15 M	Merck
Aprotinin	2 µg/ml	Sigma
Leupeptin	2 µg/ml	Sigma
Phenylmethyl-Sulfonyl-Fluorid	1 mM	Sigma
Natriumorthovanadat	1 mM	Merck
Natriumfluorid	10 mM	Fluka
Natriumpyrophosphat	1 mM	Sigma
Pepstatin A	2 µg/ml	Sigma
Lagerung: 4°C bis zu 3 Wochen		

<u>2D-D</u>	IGE-Lysepuffer		
	Harnstoff	7 M	GE Healthcare
	Thioharnstoff	2 M	GE Healthcare
	CHAPS	4% (w/v)	Merck
	Tris	30 mM	Fluka
	pH 8,5 vor CHAPS Zugabe eingestellt, al	iquotiert und gel	agert bei: -20°C
	Protease Inhibitor Cocktail (40-fach) 1 Tablette pro 250 µl ddH₂O	2,5% (v/v)	Roche, Penzberg
<u>2D-L</u>	<u>ysepuffer (2x Probenpuffer)</u>		
	Harnstoff	7 M	GE Healthcare
	Thioharnstoff	2 M	GE Healthcare
	CHAPS	4% (w/v)	Merck
	aliquotiert a 500 µl, gelagert bei –20°C, v	or Benutzung Zu	ugabe von:
	DTT	2% (w/v)	GE Healthcare
	IPG Puffer	2% (v/v)	GE Healthcare

3.2.1.2 SDS-PAGE Systeme

SDS-PAGE: NuPAGE-System (Invitrogen)

	Invitrogen
	Invitrogen
0,85 M	Merck
	Invitrogen
	Invitrogen
	Invitrogen
	0,85 M

SDS-PAGE: Protean II-System (Bio-Rad)

<u>Laufgel (10 %)</u>		
ddH ₂ O	8,7 ml	Braun, Melsungen
1 M Tris/HCl, pH 8,8	11,2 ml	Merck
30% Acrylamid, 0,8% N,N'-Methylen- bisacrylamid, Verhältnis 37,5 : 1	10 ml	Carl Roth
10% SDS	300 µl	Merck
TEMED (N, N, N`, N`-Tetra- methylendiamin)	20 µl	Merck
20% APS	100 µl	Merck
Sammelgel		
ddH ₂ O	7,03 ml	Braun
1 M Tris/HCl, pH 6,8	1,25 ml	Merck
30% Acrylamid, 0,8% N,N'-Methylen- bisacrylamid, Verhältnis 37,5 : 1	1,67 ml	Carl Roth
10% SDS	100 µl	Merck
TEMED	10 µl	Merck
20% APS	50 µl	Merck
10x Elektrophoresepuffer		
Tris	250 mM	Merck
Glycin	1,92 M	Merck
SDS	0,1 %	Merck
vor Gebrauch 500 ml Puffer mit 4,5 l dd	H ₂ O gemischt	
<u>3x Probenpuffer</u>		
SDS	6% (w/v)	Merck
Glycerin	30% (v/v)	Merck
Tris-Puffer 1 M, pH 6,8	200 mM	Merck
Bromphenolblau	0,005% (w/v)	Merck
β-Mercaptoethanol	2-5 % (v/v)	Merck

Protein-Molekulargewichts-Standards	
Low Range-Standard	Bio-Rad, München
Precision Plus Protein™ Standards	Bio-Rad

SDS-PAGE: Ettan Dalt six (GE Healthcare)

<u>Trenngel (12,5 %)</u>	407	
ddH ₂ U	127 mi	Braun, Meisungen
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	100 ml	Merck
30% Acrylamid, 0,8% N,N'-Me bisacrylamid, Verhältnis 37,5 :	thylen- 166,7 ml 1	Carl Roth
10% SDS	4 ml	Merck
entgasen für mindestens 5 Stu	Inden vor Zugabe von:	
20% APS	1 ml	GE Healthcare
TEMED	111 µl	GE Healthcare
Verdrängungslösung		
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	375 mM	Merck
Glycerol (87% (v/v))	50% (v/v)	Carl Roth
Bromphenolblau	0,002% (w/v)	Merck
Equilibrierungslösung		
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	75 mM	Merck
Harnstoff	6 M	GE Healthcare
SDS	2% (w/v)	GE Healthcare
Glycerol (87% (v/v))	30% (v/v)	Carl Roth
Equilibrierungslösung A	+ 1% Dithiothreitol	GE Healthcare
Equilibrierungslösung B	+ 2,5% lodacetamid	GE Healthcare
Low-melting Agarose		

 L.M.P. Agarose	0,5% (w/v)	Gibco
Bromphenolblau	0,005% (w/v)	Merck
in 2x Elektrophoresepuffer aufkochen und	d auf 40-50°C al	kühlen lassen

3.2.1.3 Western Blot

<u>Transferpuffer</u>		
Tris	25 mM	Merck
Glycin	192 mM	Merck
Methanol	20% (v/v)	Sigma
SDS	0,015% (v/v)	Merck
Lagerung: 4°C		
Protein-Färbe-Lösung		
Ponceau S-Farbkonzentrat		Sigma
Waschpuffer (TBST)		
Tris	10 mM	Merck
NaCl	150 mM	Merck
Tween20	0,05% (v/v)	Merck
auf pH 7,5-8,0 einstellen, Lagerung: 20°0		
BSA Blockierungslösung		
Tris/HCI pH 7,5	100 mM	Merck
NaCl	2,2% (w/v)	Merck
BSA	5% (w/v)	Carl Roth
NaN ₃	0,01% (w/v)	Merck
Steril filtrieren (0,22 µm), Lagerung: 4°C		
Milchpulver Blockierungslösung		
Instant-Milchpulver	5% (w/v)	frema-Refrom
in TBST-frisch ansetzen,		
<u>"Stripping"-Lösung</u>		
Tris/HCI pH 6,8	62,5 mM	Merck
β -Mercaptoethanol	2% (v/v)	Merck
SDS	6,9% (w/v)	Merck

III.	MATERIAL

Antikörper	Klon	Spezies	MW (kDa)	Bestnr.	Firma	Einsatzkonz.
BiP/GRP78	40	Maus	78	610978	BD	1:250
Catalase	-	Kaninchen	65	ab1877-100	Abcam	1:1000
Cathepsin D	CTD-19	Maus	34 und 52	C0715	Sigma	1:2500
CD26 / DPPIV	222113	Ratte	110	MAB1180	R&D	1:1000
CD63 / LAMP3	MEM-259	Maus	40-60	SM3035P	Acris	1:1000
COX IV	10G8D12C12	2 Maus	17	MS408	MitoScience	1:1000
Cytochrom c	7H8.2C12	Maus	15	556433	BD	1:1000
EEA-1	14	Maus	180	610456	BD	1:2500
FasL	G247-4	Maus	45	556387	BD	1:1000
Galectin-3	9C4	Maus	31	sc-56108	Santa Cruz	1:3000
GAPDH	6C5	Maus	36	RDI-TRK5G4-6C5	RDI	1:2500
GM130	35	Maus	130	610822	BD	1:250
Golgin 84	26	Maus	84	611382	BD	1:250
Granulysin	-	Ziege	9 und 15	AF3138	RnD	1:1000
Granzyme B	2C5/F5	Maus	32	550558	BD	1:2500
Interleukin-16	70719	Maus	75	MAB316	R&D	1:1000
LAMP-1	25	Maus	110	611042	BD	1:500
p230	15/p230	Maus	230	611280	BD	1:1000
p47A	18	Maus	47	610900	BD	1:250
pan Cadherin	mAb22744	Maus	139	ab22744	abcam	1:1000
Perforin	B-D48	Maus	70	ab47225	abcam	1:500
Rab 4A (D-20)	-	Kaninchen	24	sc-312	Santa Cruz	1:500
Rab 5B (A-20)	-	Kaninchen	24	sc-598	Santa Cruz	1:500
Rab 7 (C-19)	-	Ziege	22	sc-6563	Santa Cruz	1:500
Vti1b	7	Maus	27	611404	BD	1:1000
α-Maus-IgG-HRP	-	Schaf	-	NA931V	GE Healthcare	e 1:7500
α -Kaninchen-IgG-HRP	-	Esel	-	NA9340V	GE Healthcare	e 1:7500
α -Ratte-IgG-HRP	-	Ziege	-	NA9350V	GE Healthcare	e 1:7500
α -Ziege-IgG-HRP	-	Esel	-	sc-2033	Santa Cruz	1:7500

Tabelle 3.4: Für Westerr	Blot verwendete	Antikörper
--------------------------	-----------------	------------

Abkürzungen: HRP: Meerrettich-Peroxidase
3.2.1.4 Färbelösungen für die 2D-Gelelektrophorese

Ruthenium II-bathophenanthrolin Disulfonat Chelat (RuBPS)

<u>Fixierlösung</u>		
Ethanol	30% (v/v)	Merck
Essigsäure	10% (v/v)	Carl Roth
<u>Färbelösung</u> RuBPS	1µM	eigene Herstellung
Entfärbelösung		
Ethanol	40% (v/v)	Merck
Essigsäure	10% (v/v)	Carl Roth
Sypro Ruby		
Fixierlösung		
Methanol	40% (v/v)	Merck
Essigsäure	10% (v/v)	Carl Roth
<u>Färbelösung</u> Sypro Ruby gel stain		Invitrogen
Entfärbelösung		
Methanol	10% (v/v)	Merck
Essigsäure	7% (v/v)	Carl Roth
Flamingo Pink		
<u>Fixierlösung</u>		
Ethanol	40% (v/v)	Merck
Essigsäure	10% (v/v)	Carl Roth
<u>Färbelösung</u> Flamingo Fluorescent gel stain		Bio-Rad
Entfärbelösung Tween20	0,1% (w/v)	Merck

Deep Purple / Lava Purple		
Fixierlösung		
Ethanol	15% (v/v)	Merck
Zitronensäure	1% (v/v)	Merck
<u>Färbelösung</u> Lava Purple oder Deep Purple in 100 mM Natriumborat, pH 10,5		Fluorotechnics, Sydney, Australien GE Healthcare
<u>Entfärbelösung</u> Ethanol	15% (v/v)	Merck

3.2.1.5 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie

<u>10 x Ammoniumbicarbonat (ABC)</u>		
Ammoniumbicarbonat (MW 79,06)	250 mM	Fluka
Wasser (HPLC Ultra Gradient Grade)	192 mM	Carl Roth
<u>Trifluoressigsäure</u> (TFA)	0,1%	Fluka
Acetonitril (HPLC Ultra Gradient Grade)		Carl Roth
<u>Matrixlösung (3,2 mg/ml)</u> α-Cyano-4-Hydroxyzimtsäure (CHCA)	3,2 mg	Laser Labs, Sophia- Antipolis Cedex, Frankreich
0,1% Trifluoressigsäure (TFA)	650 µl	Fluka
Acetonitril (HPLC Ultra Gradient Grade)	350 µl	Carl Roth
25 mM Ammoniumbicarbonat + Acetonitril 1:1 Ammoniumbicarbonat 250mM	5 ml	Merck
Wasser (HPLC Ultra Gradient Grade)	45 ml	Carl Roth
Acetonitril (HPLC Ultra Gradient Grade)	50 ml	Carl Roth

3.3 Weitere Materialien

96-Loch-Spitzbodenplatte 96-Loch-Spitzbodenplatte aus PP 96-Loch-U-Bodenplatte aus PP Centricon[®]-30 Konzentrator 30000 MWCO Coomassie-Protein-Assay-Reagenz Deckgläschen (18 mm) ECL-Detektionsreagenzien Filterpapier Whatman 3MM Gel-Spotpicker (1,5 mm und 3 mm) Microlance[®] Kanülen Nitrozellulosemembran Hybond[™]C Extra; 0,45 µm Nitrozellulosemembran PuraBind 02; 0,2 µm NuPAGE[™]4-12% Bis-Tris-Gel (10 Wells, 1.5 mm) NuPAGE[™]4-12% Bis-Tris-Gel (15 Wells, 1.5 mm) Objektträger Opti-Tof[®] MALDI-Platte Pipettenspitzen Protein G-Sepharose[™]4B Reaktionsgefäße Serologische Pipetten Skalpell Spektrometer-Küvetten Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter 0,45 µm Sterilvakuumfilter Zellkulturflaschen Zellkulturplatten Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)

Nerbe plus, Winsen Greiner-Bio, Frickenhausen Greiner-Bio Amicon, MA, USA Thermo Scientific, Karlsruhe Carl Roth **GE** Healthcare Whatman, UK Biostep GmbH, Jahnsdorf **Becton Dickinson GE Healthcare** Whatman Invitrogen Invitrogen Carl Roth Applied Bio, Darmstadt Sarstedt Invitrogen Sarstedt Greiner Feather, Osaka, Japan Sarstedt Sartorius, Göttingen Sartorius Millipore, Eschborn Greiner-Bio Nunc Sarstedt, Nürnberg

3.4 Geräte

CO₂-Begasungsbrutschränke Ettan IPGphor Ettan Dalt six Ettan Spotpicker Ettan Digester **Ettan Spotter** Typhoon Trio, Fluoreszenzscanner Gelcaster elektr. 8-Kanalpipette E8-200 Ultrazentrifuge für SW60Ti Ultrazentrifuge für TLA-100 Ultraschallbad Dounce-Homogenisatoren Ein- und Zwölfkanalpipetten Elektronische Achtkanalpipette E8-200 Elektrophoresekammer Protean[®] II Elektrophoresekammer X Cell SureLock™ Western Blot Transfer-Tank Trans-Blot® Western Blot Transfer-Tank Mini Trans-Blot[®] Entwicklungskassetten Hypercassette Geltrockner Filmentwicklungsmaschine Agfa Curix60 Spektrometer SmartSpec[™] 3000 Ultraschallstab Lichtmikroskop Netzgeräte Power Pack 200/300 Netzgerät PS 250-2 Neubauer Zählkammer Feinwaage A120S Gel Imager (Videokamera und Thermodrucker) pH-Meter wtw pH 315i Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 mit Apotome (Zoophysiologie, CAU Kiel) Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 Meta Durchflusszytometer FACSCalibur

Heraeus, Osterrode GE Healthcare **GE** Healthcare **GE Healthcare GE** Healthcare **GE Healthcare GE Healthcare GE** Healthcare Mettler Toledo Beckman-Coulter Beckman-Coulter Branson Braun Eppendorf, Hamburg Mettler Toledo, Gießen **Bio-Rad** Invitrogen **Bio-Rad Bio-Rad GE** Healthcare **Bio-Rad** Agfa Deutschland, Köln **Bio-Rad** Branson, USA Zeiss, Jena **Bio-Rad** Sigma Techware, München Fischer, Frankfurt Sartorius Intas, Göttingen WTW, Weilheim Zeiss Zeiss Becton Dickinson

Schüttelwasserbad Sicherheits-Sterilbank Tischzentrifuge 5415C Zentrifuge Biofuge 15R Zentrifuge Varifuge 3.0R Zentrifuge Megafuge 1.0 Zentrifuge Avanti J-25 I (Rotoren JA-10 und JA-25.50) Flachbettscanner GS-800 Wipptisch Rocky Heizblöcke Thermostat DB-2 und DB-3 MALDI-Tof/Tof 4700 Proteomics Analyzer Kühlfalle RVT-400 accu-jet pro SpeedVac Plus SC110A GFL, Burgwedel Heraeus Eppendorf Heraeus Heraeus Beckman Coulter, Krefeld Bio-Rad Fröbel Labortechnik, Lindau Techne, Wertheim Applied Biosystems Savant, Farmingdale, USA Brand, Wertheim

4. Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C mit 5% CO₂. Die Suspensionszelllinien Jurkat (JFL39.1), EBV-M und EBV-O wurden in RPMI-1640-Medium mit HEPES (10 mM), L-Glutamin (2 mM), 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) und 5% FCS (v/v) kultiviert. Die NK-Zelllinie NKL wurde in RPMI mit 10% FCS und 100 U/ml rIL-2 kultiviert, YTS in IMDM mit 12,5% FCS und 50 μ M β -Mercaptoethanol.

Für T-Zellklone und -linien wurden dem Medium 10% FCS (v/v) und rekombinantes IL-2 (rIL-2, 100 U/ml) zugesetzt. Die T-Zellklone oder -linien wurden direkt nach dem Auftauen oder periodisch etwa 14-21 Tagen nach Aktivierung mit einem sogenannten "Feeder-Cocktail" restimuliert. Dieser "Feeder-Cocktail" bestand aus 10⁶ isolierten peripheren mononukleären Zellen (PBMZ, 40 Gy bestrahlt) und 10⁵ EBV-transformierten B-Zellen (B-LCL, 60 Gy bestrahlt) pro ml. Die bestrahlten Zellen wurden zusammen in einer zehnfach konzentrierten Menge angesetzt und vor Zugabe von rIL-2 (1000 U/ml) und PHA (5 µg/ml) zweimal mit Kulturmedium aewaschen, um durch Bestrahlung eventuell entstandene Radikale zu entfernen. Die zu restimulierenden Zellen wurden mit 10⁶ Zellen/ml in Kulturmedium mit 10% FCS aufgenommen und mit einem Zehntel des Volumens an "Feeder-Cocktail" versetzt. Zur Erzeugung von T-Zell Blasten wurden PBMZ durch PHA (0,5 µg/ml) aktiviert. Wie bei der Stimulation von Zelllinien/Klonen wurden auch hier nach drei bis fünf Tagen lebende Zellen mittels Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt und unter Zusatz von rIL-2 (100 U/ml) weiter expandiert. Die phänotypische Charakterisierung sämtlicher Zellen erfolgte periodisch mittels Durchflusszytometrie.

4.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Zellen können für längere Zeiträume in flüssigem Stickstoff kryokonserviert werden. Die Zellen wurden dazu zentrifugiert und mit einer Dichte von maximal 20-30 x 10⁶ Zellen pro ml in kaltem (4°C) Einfriermedium aufgenommen. Hierbei verhindert das dem Einfriermedium zugesetzte DMSO eine Kristallbildung innerhalb der Zelle und eine damit verbundene Schädigung. Als nächstes wurde die Zellsuspension auf Eis in Kryoröhrchen überführt, die dann unter Verwendung von Luftpolster-Isolationsmaterial langsam auf zunächst -20°C abgekühlt wurde. Nach der zweiten Einfrierphase bei -80°C erfolgte die Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff (-196°C). Zum Auftauen wurden 10 ml kaltes Kulturmedium unter ständigem Schütteln tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Zellzahl und Zellvitalität wurde nach zweimaligem Waschen (1300 rpm, 7 min) mit Kulturmedium bestimmt. Der Auftauvorgang erfolgte möglichst rasch, da DMSO bei Raumtemperatur für die Zellen toxisch ist.

4.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl einer Trypanblau- bzw. Eosin-Lösung verdünnt. Dabei dringt der Farbstoff (Trypanblau bzw. Eosin) durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol ein und färbt so selektiv tote Zellen an. Die lebenden Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer mit definiertem Kammervolumen ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension ergibt sich durch Multiplikation des Mittelwerts, der in zwei bis vier Teilquadraten gezählten Zellen, dem Verdünnungsfaktor (10) und dem Kammerfaktor (10⁴).

4.1.4 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Aus Leukozytenkonzentraten, sogenannten "Buffy-Coats", die nach dem Abzentrifugieren von Vollblut abgepresst werden, lassen sich durch eine Dichtegradientenzentrifugation periphere mononukleäre Zellen (PBMZ) isolieren. Dabei reichern sich die Lymphozyten und Monozyten entsprechend ihrer Dichte in der Interphase zwischen Plasma- und Thrombozyten-Überstand und der Ficoll-Lösung an. Im Sediment setzten sich Erythrozyten und Granulozyten (und gegebenenfalls tote PBMZ) ab. Vor der Isolierung der Zellen wurden zunächst 100 ml PBS in einer mittleren Zellkulturflasche vorgelegt und der "Buffy-Coat" (meist ca. 25-30 ml) darin verdünnt. In 50 ml Röhrchen wurden jeweils 25 ml des verdünnten "Buffy-Coats" vorgelegt und mit 15 ml Ficoll (d=1,077 g/ml) vorsichtig unterschichtet. Nach der Zentrifugation (2000 rpm, 20 min, ohne Bremse) wurde der Lymphozytenring abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt, zweimal mit PBS, einmal mit Kulturmedium gewaschen (1300 rpm, 7 min) und schließlich in RPMI-Medium mit 5% FCS aufgenommen. Dabei dienten die Waschschritte der Entfernung von Thrombozyten, Serum und Ficollrückständen.

35

4.1.5 Isolierung von Lymphozyten-Subpopulationen

4.1.5.1 Separation von T-, NK- und B-Lymphozyten (E-Rosettierung)

Humane T- und NK-Zellen exprimieren im Gegensatz zu B-Zellen das Oberflächenmolekül CD2, welches an ein Glykoprotein (T11TS) bindet, das in hoher Dichte auf Schaferythrozyten (sheep red blood cells, SRBC) exprimiert wird. Dadurch lagern sich die Schaferythrozyten in "Rosetten" an die T- und NK-Zellen (E-Rosetten). Diese Rosetten lassen sich aufgrund ihrer insgesamt höheren Dichte mittels Ficoll-Dichtegradienten von den restlichen Leukozyten der PBMZ (B-Zellen oder Monozyten) separieren. Die Schaferythrozyten werden anschließend mit einer 1 M NH₄Cl-Lösung lysiert. Die zu behandelnden Zellen wurden auf eine Zelldichte von 10⁶ Zellen/ml eingestellt und 20 ml dieser Zellsuspension mit 5 ml Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten versetzt. Anschließend wurde dieses Gemisch auf 15 ml Ficoll geschichtet und zentrifugiert (2000 rpm, 20 min, ohne Bremse). Der Interphasering enthielt die E⁻ Zellen, die Rosetten bildenden E⁺ Zellen befanden sich im Zellsediment. Zur Entfernung der Erythrozyten wurde das sedimentierte Material in 1-2 ml NH₄Cl resuspendiert und anschließend dreimal mit RPMI-Medium mit 10% FCS gewaschen.

Herstellung von Neuraminidase-behandelten Schafserythrozyten

20 ml Schafblut (zur Konservierung 1:2 mit Alsever-Lösung verdünnt) wurden dreimal mit PBS gewaschen (2000 rpm, 5 min, ohne Bremse). Dabei wurde jeweils die sich ablagernde Schicht von Schaflymphozyten auf den Erythrozyten entfernt. Das Erythrozytensediment wurde dann in 20 ml RPMI-Medium mit 10% FCS aufgenommen. Nach Zugabe von 500 µl Neuraminidase und 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Erythrozyten noch zweimal mit PBS gewaschen (2000 rpm, 5 min, ohne Bremse). Ausgehend vom Volumen des erhaltenen Pellet wurde eine 10%-ige Schaferythrozyten-Suspension in RPMI-Medium mit 10% FCS hergestellt. Die Reinheit der Erythrozyten wurde durch die Lyse von 500 µl Suspension in NH₄Cl-Lösung und anschließender Zählung der verbleibenden Leukozyten in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Schaferythrozyten wurden nur für Rosettierungen verwendet, wenn die Auszählung weniger als sieben Leukozyten pro Quadrant ergab.

4.1.5.2 Negative Isolierung von Lymphozyten-Subpopulationen

Zur Isolierung von CD4⁺, CD8⁺ oder NK-Zellen wurde das Prinzip der Negativselektion mittels magnetischer Sortierung eingesetzt. Hierbei wurden alle nicht erwünschten Zellen mittels spezifischer Antikörper magnetisch aus dem Lymphozytenpräparat entfernt. Die gereinigten PBMZ wurden zunächst zweimal mit kaltem MACS Puffer gewaschen (1400 rpm, 5 min). Je 10⁷ Zellen wurden in 40 µl MACS Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl des jeweiligen Antikörpergemisches zugegeben und für 10 min bei 4°C inkubiert. Direkt im Anschluss wurden 30 µl MACS Puffer und 20 µl anti-Biotin Mikrobeads zugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurden die Zellen mit 2 ml MACS Puffer gewaschen (1400 rpm, 5 min) und der Überstand abgesaugt. Für die magnetische Separation wurde das Pellet in 50 μ l / 10⁷ Zellen resuspendiert und über einen Vorfilter (Porengröße 70 µm) auf die magnetisierte und mit MACS Puffer equilibrierte Säule gegeben. Je nach Zellmenge wurden hierfür verschiedene Magnetsäulen verwendet. Die nicht magnetisch markierten Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit MACS Puffer in ein neues Röhrchen gespült, abschließend zentrifugiert (1400 rpm, 5 min) und in einem entsprechenden Kulturmedium aufgenommen.

4.1.5.3 Positive Isolierung von Lymphozyten-Subpopulationen

 $\gamma\delta$ T-Zellen wurden durch positive Isolierung gewonnen. Sie wurde analog zur negativen Isolierung durchgeführt, jedoch werden hierbei die gewünschten Zellen "magnetisch markiert". Die Präparation der Zellen bis zur Applikation auf die Magnetsäule verlief identisch. Beim Waschen der Säule wurden die nicht gewünschten Zellen entfernt, während die $\gamma\delta$ T-Zellen in der magnetisierten Säule verblieben. Durch Entfernen des Magnetfeldes wurden die Zellen in ein neues Röhrchen mit 1 ml MACS Puffer gespült. Mit einem weiteren Milliliter Puffer und einem passenden Stempel wurde die restliche Zellsuspension aus dem Todvolumen der Säule gedrückt. Die erhaltenen Zellen wurden nach Zentrifugation in Kulturmedium aufgenommen.

4.1.6 Kultivierung von Lymphozyten-Subpopulationen

4.1.6.1 Kultivierung von isolierten T-Zellen

Isolierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden mit einem allogenen "Feeder-Cocktail" stimuliert und unter Zugabe von rekombinantem IL-2 expandiert. Zur Expansion isolierten NK-Zellen wurde ein gesondertes Protokoll [126] verwendet.

4.1.6.2 Kultivierung von isolierten NK-Zellen

Im Gegensatz zu anderen Zellen erreicht man eine optimale Expansion von NK-Zellen bei der Verwendung von Mitogen-aktivierten Feeder Zellen. Hierfür wurden zunächst PBMZ aus "Buffy-Coats" isoliert und unter Zugabe von 50 U/ml rIL-2 und 0,5 μ g/ml PHA für 72 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit Medium wurde das PHA entfernt und die Zellen auf 10⁷ Zellen pro ml in RPMI mit 10% humanen AB-Serum in RPMI eingestellt. Nach der Bestrahlung mit 60 Gy erfolgte die Zugabe zu den isolierten NK-Zellen in einem Volumenverhältnis von 1:10. Die NK-Zellen wurden unter Zusatz von 10³ U/ml rIL-2 bei einer Zelldichte von 1,5-2,0 x 10⁶ Zellen/ml expandiert.

4.1.7 Zytotoxizitätsassay

Die Zytotoxizität von Zellen wurde in einem nicht-radioaktiven Assays bestimmt, der auf der Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH) nach Lyse der Zielzellen beruht. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die enzymatische Reaktion am ELISA-Reader bei 492 nm gemessen. Die Berechnung der Zytotoxizität erfolgte unter Berücksichtigung der Spontanlyse von Effektor- und Zielzellen. Die maximale LDH Freisetzung der Zellen wurde durch Zugabe von Lysepuffer ermittelt und nach Abzug der Spontanlyse und Mediumkontrolle einer Zytotoxizität von 100% gleich gesetzt.

4.1.8 Immunfluoreszenzanalysen

4.1.8.1 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Fluoreszenz-aktivierten Durchflusszytometrie (FACS) basiert auf Fluoreszenz-markierten Antikörpern, die sowohl Oberflächenantigene, als auch intrazelluläre Antigene nachweisen können. Des Weiteren können aufgrund der Lichtstreuung der Zellen gleichzeitig deren Zellgröße und Granularität analysiert werden.

Nachweis von Zelloberflächenantigenen

Für einen Ansatz wurden 2 x 10⁵ Zellen in eine Kavität einer 96-Loch-Spitzboden-Mikrotiterplatte pipettiert, zentrifugiert (180 g, 4 min, 4°C) und anschließend mit 100 µl kaltem FACS-Waschpuffer gewaschen. Die sedimentierten Zellen wurden mit direkt konjugierten Antikörpern bzw. einer geeigneten Isotypkontrolle gleicher Konzentration (siehe Tab. 3.1) in einem Volumen von 10 µl resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach Entfernung überschüssiger Antikörper durch zwei weitere Waschschritte wurden die Zellen in einer 1%-igen PFA-Lösung fixiert und innerhalb von 48 h analysiert.

Nachweis intrazellulärer Antigene

Zur Detektion intrazellulärer Antigene müssen die Zellen permeabilisiert werden. Hierzu wurde das Cytofix/Cytoperm-Kit von Becton Dickinson verwendet. Jeweils 2×10^5 Zellen wurden in einer 96-Loch-Spitzboden Mikrotiterplatte zentrifugiert (1000 rpm, 4 min, 4°C) und einmal mit 100 µl kaltem FACS-Waschpuffer gewaschen. Zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden diese in 100 µl Cytofix/Cytoperm-Lösung resuspendiert und 15 Minuten auf Eis belassen. Nach zwei weiteren Waschschritten mit jeweils 100 µl Perm/Wash-Lösung wurden die Zellen mit Antikörpern in geeigneter Konzentration bzw. einer entsprechenden Isotypkontrolle gleicher Konzentration in einem Volumen von 100 µl Perm/Wash-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden nach zwei weiteren Waschschritten mit Perm/Wash-Lösung direkt in einer 1%-igen PFA-Lösung aufgenommen.

4.1.8.2 Konfokale Mikroskopie

Zur Reinigung der Deckgläser wurden diese für 15 Minuten in konzentrierter Salzsäure geschwenkt. Anschließend wurden sie zweimal mit Wasser und einmal mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Nachfolgend wurden sie zu Sterilisationszwecken über Nacht bei 180°C getrocknet und waren so für den Gebrauch in der Zellkultur geeignet. Damit Zellen auf den Glas-Deckgläsern adhärieren, wurden diese in 12-Loch-Platten überführt und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Beschichtung mit Poly-L-Lysin (50 µg/ml in PBS) und die anschließende Inkubation der Deckgläser erfolgten bei 37°C für 30 Minuten. Nachfolgend wurden die Deckgläser wiederum dreimal mit PBS gewaschen. Die verwendeten Suspensionszellen wurden direkt auf vorgekühlte Deckgläser in einer 12-Loch-Platte überführt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Adhärenz der Zellen wurde lichtmikroskopisch überprüft. Nicht-adhärente Zellen wurden durch Abnehmen des Kulturmediums vorsichtig entfernt.

Die adhärierenden Zellen wurden vor der Fixierung einmal mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte durch eine fünfminütige Inkubation mit 3% PFA in PEM-Puffer, gefolgt von einer zehnminütigen Inkubation mit 3% PFA in Borat-Puffer. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden diese nachfolgend 15 Minuten mit 1% Triton X-100 in PBS behandelt. Anschließend wurden die Deckgläser zweimal mit gewaschen. Zur Reduktion reaktiver Aldehydgruppen, PBS welche zur Hintergrundfluoreszenz des Präparats beitragen könnten, wurden die Zellen zweimal 10 Minuten mit Natriumborhydrid (1 mg/ml in PBS) behandelt. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellen gefärbt. Eine Blockierung von unspezifischen Antikörperbindungsstellen erfolgte durch eine einstündige Inkubation der Präparate mit 1% BSA in PBS. Zur Färbung wurden die Zellen mit Antikörpern in geeigneter Konzentration inkubiert. Hierzu wurden die Antikörper in einem Volumen von 60 µl in Blockierungspuffer verdünnt und auf Parafilm aufgebracht. Die mit Zellen beschichteten Deckgläser wurden bei Raumtemperatur über Nacht mit auf Parafilm vorgelegten Antikörpern inkubiert und zweimal mit PBS gewaschen. Bei direkt konjugierten Antikörpern wurden die Deckgläser nach einem weiteren Waschschritt mit destilliertem Wasser direkt auf die Objektträger aufgebracht. Bei Verwendung unkonjugierter Antikörper wurden die Zellen mit einem geeigneten Fluorochromkonjugiertem Sekundärantikörper inkubiert (45-60 min, RT). Die Deckgläser wurden abschließend mit 14 µl "Prolong Gold Antifade Reagent Mounting" Medium auf dem Objektträger fixiert. Das Mounting Medium enthielt zusätzlich DAPI zur Visualisierung der Zellkerne. Die Präparate wurden konfokalmikroskopisch am LSM 510 mit einem 63x Objektiv untersucht.

4.1.8.3 Fluoreszenzmikroskopie mit Apotome[®]

Einige Proben wurden nicht nur im Laserscanning Mikroskop, sondern auch an einem Zeiss Axio Imager.Z1 mit Apotome[®] im Institut für Zoophysiologie (Prof. Dr. M. Leippe) untersucht. Ein Apotome[®] ist ein Modul im Mikroskop, welches ein bestimmtes Gitter enthält. Durch definierten Versatz der Gitterstruktur in der Präparatebene und anschließende Verrechnung der entstandenen drei Rohbilder ergibt sich ein präziser optischer Schnitt durch das Präparat. Hierbei ermöglicht das gute Signal/Rausch Verhältnis eine hohe optische Auflösung mit hohem Kontrast. Die Aufnahmen wurden mit einem 100x Objektiv durchgeführt.

4.1.9 Elektronenmikroskopie

Die in Homogenisationspuffer zentrifugierten Organellen wurden im selbigen Puffer mit 2,5% Glutaraldehyd aufgenommen und über Nacht bei 4°C fixiert. Die Proben wurden danach im Institut für Anatomie unter Leitung von Prof. Dr. Ralph Lucius mit PBS gewaschen, mit 2% OsO₄ nachfixiert, mit steigenden Konzentrationen an Ethanol dehydriert und abschließend in Araldit eingebettet. Ultradünnschnitte wurden auf Formvar-beschichteten Trägern befestigt und mit einer gesättigten Lösung von Uranylacetat in 70% Methanol und Bleicitrat gefärbt. Die Proben wurden mit einem Zeiss EM 900 Transmissions Elektronenmikroskop untersucht.

4.2 Biochemische Methoden

In Abhängigkeit von Zelltyp und der späteren Verwendung der Lysate wurde eine bestimmte Anzahl von Zellen einmal mit PBS gewaschen und in einem definierten Volumen 1% NP40-Lysepuffer resuspendiert. Um die Degradation und Modifikation von Proteinen zu hemmen, wurden dem Lysepuffer die Inhibitoren Aprotinin, Leupeptin, Phenylmethyl-Sulfonyl-Fluorid, Pepstatin A, Natrium-Orthovanadat, EDTA, Natriumfluorid und Natriumpyrophosphat beigefügt. In einigen Fällen wurde das Lysat unter Verwendung eines 2 ml Homogenisators zusätzlich mechanisch aufgeschlossen. Nach 15-25 Minuten Inkubation auf Eis wurde das Lysat bei 17300 x g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden entweder direkt für weitere Analysen verwendet oder aliquotiert und bei -80°C gelagert.

4.2.1 Immunpräzipitation

Für die Präzipitation von spezifischen Proteinen aus Zelllysaten wurden 2 µg eines Antikörpers und 60 µl in PBS gewaschene Protein G-Sepharose-Beads (50% (v/v) in PBS) zugegeben und zwei Stunden bei 4°C rotiert. Anschließend wurden die "Beads" zentrifugiert, viermal mit kaltem Lysepuffer gewaschen und in Probenpuffer aufgekocht (5 min, 95°C). Die Proben wurden nachfolgend über SDS-Gelelektrophorese separiert und mittels Western Blot analysiert.

4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden mit einem auf Coomassie G-250 basierendem kolorimetrischen Reagenz (Bradford) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Messung der Absorption erfolgte nach einer 10 minütigen Inkubation bei 595 nm.

4.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu wurden diese zunächst mit Natrium- oder Dithiothreitol (DTT) reduziert. Hierdurch kommt es zur Reduktion der Disulfidbrückenbindungen und zur Bindung von negativ geladenem SDS an hydrophobe Regionen der Proteine. Dieses überdeckt wiederum die Eigenladung der Proteine, wodurch deren Mobilität im Acrylamidgel nur noch von ihrer Größe abhängt. Die SDS-PAGE wurde auf verschiedenen Systemen durchgeführt: 1.) NuPAGE-System von Invitrogen, 2.) Protean II-System der Firma Bio-Rad und 3.) Ettan Dalt six von GE Healthcare. Das Ettansystem wurde ausschließlich für 2D-Gelelektrophoresen genutzt. Bei allen Systemen wurde die Elektrophorese in der Regel gestoppt, wenn die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

NuPAGE-System (Invitrogen)

Hierbei wurden 4-12% Bis-Tris-Fertiggele in einem MES-Puffersystem verwendet. 3-6 µg der Probe wurden mit einem Viertel des Endvolumens an NuPAGE-Probenpuffer und einem Zehntel an 0,85 M DTT-Lösung versetzt und mit Wasser auf ein maximales Volumen von 30 µl eingestellt. Die Proben wurden nachfolgend 10 Minuten bei 70°C denaturiert, zentrifugiert und in die Geltaschen überführt. Die Elektrophorese erfolgte für ca. eine Stunde bei 200 V.

Protean-II-System (BioRad)

Bei diesem Gelsystem konnte die Acrylamidkonzentration des Trenngels entsprechend der gewünschten Auftrennung angepasst wurden. Die anschließende Überschichtung des Trenngels mit 96%-igem Ethanol diente einer ebenen Oberfläche. Das Ethanol wurde nach erfolgter Polymerisation abgegossen und etwaige Reste durch dreimaliges Spülen mit destilliertem Wasser von der Geloberfläche entfernt. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Die Proteinmenge der zu untersuchenden Proben betrug zwischen 20-50 µg. Die Proben wurden mit einem Drittel des Endvolumens an Probenpuffer versetzt und fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Abschließend wurden die Proben zentrifugiert und in die mit Laufpuffer gefüllten Taschen überführt. Aufgekochte Präzipitate auf Protein A/G Beads wurden direkt in die trockenen Geltaschen geladen und erst danach mit Laufpuffer überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte bei 60-70 V über Nacht.

Ettan Dalt six System (GE Healthcare)

Auch bei Verwendung des Ettan-Systems musste die Acrylamidkonzentration den Anforderungen entsprechend angepasst werden. Die für mindestens zwei Stunden entgaste Acrylamidlösung wurde luftblasenfrei durch die Rinne des "Gelcasters" bis 1 cm vor Plattenende gegossen. Durch Zugabe von 1,5 ml Verdrängungslösung wurde die beim Auspolymerisieren entstehende Hitzeentwicklung am Boden der Kammer verhindert, wodurch ein homogeneres Acrylamidnetz entstehen konnte. Um dies zu erreichen wurde zudem die erforderliche APS und TEMED Konzentrationen empirisch bestimmt, ein langsames, homogenes um Polymerisieren zu gewährleisten. Abschließend wurden die Gele mit fein vernebeltem destilliertem Wasser überschichtet. Die Kammer wurde mit Parafilm abgedeckt und zum vollständigen Auspolymerisieren über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die reduzierten und alkylierten IPG-Streifen (siehe Isoelektrische Fokussierung)

wurden mit niedrig schmelzender Agarose in den mit destilliertem Wasser gewaschenen Geltaschen fixiert. Zunächst wurde die untere Pufferkammer mit Laufpuffer gefüllt, danach die obere mit doppelt konzentriertem Laufpuffer. Die Elektrophorese erfolgte initial für eine Stunde bei 10 mA / Gel und anschließend bei 12-14 mA / Gel über Nacht unter konstanter Kühlung bei 20°C.

4.2.4 Western Blot

Der Transfer separierter Proteine erfolgt durch "Tank-Blotting" auf eine Nitrozellulosemembran. Hierzu wurden die Komponenten der Transfer-Kammer zunächst in Western Blot-Transferpuffer equilibriert. Die Transferkammer wurde von der Kathode zur Anode wie folgt zusammengesetzt: Schwamm, zwei Whatman-Papiere, Gel, Nitrozellulosemembran, zwei Whatman-Papiere, Schwamm.

NuPAGE-Gele wurden unter Verwendung kleiner Gelkassetten bei 100 V für eine Stunde unter Eiskühlung auf eine Nitrozellulosemembran transferiert; Protean II Gele dagegen bei 4°C und 0,8 A für zwei Stunden. Die Membran wurde im Anschluss kurz mit Wasser equilibriert und fünf Minuten mit Ponceau S gefärbt, um die Effizienz des Transfers zu überprüfen. Unspezifisch gebundenes Ponceau S wurde mit Wasser entfernt und der Blot anschließend abgelichtet. Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper (verdünnt in TBST) wurde die Membran zunächst mit TBS entfärbt und mit 5% BSA oder 5% Milchpulver für eine Stunde blockiert. HRP-konjugierte Sekundärantikörper (1:7500 in TBST) wurden für 45 Minuten inkubiert. Dabei wurde zwischen jedem Schritt die Membran dreimal für zehn Minuten mit TBST-gewaschen. Die spezifisch markierten Proteine konnten nach Inkubation mit ECL-Detektionsreagenz und die nachfolgende Belichtung von Hyperfilm-ECL Filmen visualisiert werden.

4.2.5 2D-Gelelektrophorese

Vorbereitung

Die zwei-dimensionale Gelelektrophorese trennt Proteine in der ersten Dimension anhand ihrer spezifischen Eigenladung (*pl*) und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht (MW) auf. Für analytische Proben wurden hierfür zunächst Streifen mit einem in Acrylamidmatrix immobilisierten pH-Gradienten (z.B. Immobiline DryStrip pH 3-11NL) mit einem entsprechenden Volumen (z.B. 450 µl für 24 cm) DeStreak-Lösung (GE-Healthcare) und 0,5% Ampholyten rehydriert. Bei präparativen Gelen (>250 µg Protein) wurden die IPG-Streifen mit der in 2D-Lysepuffer mit 1% (w/v) DTT und 1% (v/v) Ampholyten gelösten Probe rehydriert. Die Streifen wurden in den einzelnen Quellschalen mit je 3 ml Mineralöl (Dry Strip Cover Fluid, GE Healthcare) überschichtet, um die Proben während der 10-stündigen Rehydration vor Austrocknung und Oxidation zu schützen.

Markierung der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen

Für die differentielle Gelelektrophorese wurden Fluoreszenzfarbstoffe (Cy5, Cy3 und Cy2) verwendet, die über einen reaktiven N-Hydroxysuccinimid (NHS) Ester kovalent an primäre Amine binden. Bei den DIGE-Versuchen wurde eine Minimalmarkierung durchgeführt, wobei durchschnittlich nur 3% der Gesamtproteinmenge markiert wurden. Die trockenen Fluorochrome (CyDye) wurden als 1 mM Lösung in DMF rekonstituiert. Die Markierung von 50 µg Protein erfolgte mit 400 pmol CyDye bei einem pH von 8,5 für 30 Minuten auf Eis. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 µl (10 mM) Lysin zugegeben und damit reaktive CyDyes abgesättigt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die einzeln markierten Proben vereinigt und isoelektrisch fokussiert.

Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Die Proben wurden bei analytischen Versuchen (auch bei DIGE) mittels Napf-Beladung (cup loading) appliziert. Hierzu wurden die Proben zuvor mit dem gleichen Volumen an 2-fach 2D-Probenpuffer (+2% (v/v) Ampholyte, +2% (w/v) DTT) versetzt, 10 Minuten auf Eis inkubiert und abschließend bei 180.000 x g für 20 min ultrazentrifugiert. Die Streifen wurden entsprechend der Markierung auf dem Keramikblock der IPGphor (GE-Healthcare) platziert und die Enden der IPG-Streifen mit in Wasser getränkten Papierstreifen abgedeckt. Hierauf wurden die Elektroden fixiert, der Keramikblock mit Öl überschichtet und die isoelektrische Fokussierung (IEF) mit folgendem in Abb. 4.2.1 schematisch aufgeführten Programm gestartet. Dabei wurde das Limit für die anliegende Stromstärke auf 75 µA pro Streifen gesetzt. Die totale Fokussierungszeit betrug durchschnittlich 65-70 kVh.

SDS-PAGE (2. Dimension)

Nach Beendigung der isoelektrischen Fokussierung wurden die Streifen für 15 Minuten reduziert und für 15 Minuten alkyliert. Anschließend wurden die Streifen in zweifachem Laufpuffer abgespült und in die gewaschene Geltasche der SDS-PAGE (siehe oben) transferiert.



Abb. 4.2.1: Repräsentativer Verlauf einer IEF unter Verwendung der in A aufgeführten Parameter

4.2.6 Isolation sekretorischer Granula

Sekretorische Granula wurden mittels einer Kombination aus differentieller und Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Hierbei diente die differentielle Zentrifugation der Anreicherung von Organellen und dem Entfernen von intakten Zellen und Zellkernen.

Differentielle Zentrifugation

Zur Anreicherung von Organellen wurden je nach Zelltyp zwischen 4-20 x10⁸ Zellen verwendet. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde das Volumen des Zellpellets bestimmt. Anschließend wurde das 2,7-fache Volumen an Extraktionspuffer zugegeben. Die resuspendierten Zellen wurden in einen Dounce-Homogenisator überführt und mit 20-30 Zügen eines Pistills mit geringem Spaltmaß vorsichtig aufgeschlossen. Das Aufschließen der Zellen wurde in regelmäßigen Abständen mittels Trypan-Blaufärbung unter einem Lichtmikroskop überprüft und bei einem Zellbruch von 80-85% gestoppt. Vor möglicher Proteindegradation schützten dabei die zugegebenen Proteaseinhibitoren. Das Homogenat wurde in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 1000 x g für 10 min zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Organellen wurden anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 20000 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Die Organellen konnten danach in einem geringen Volumen (455 µl) Extraktionspuffer resuspendiert und der Dichtegradientenzentrifugation zugeführt werden. Aus einem Teil des Gesamthomogenats und der angereicherten Organellen wurden NP-40 Lysate hergestellt, die in der Folge mittels Western Blot analysiert wurden.

Dichtegradienten Zentrifugation

Als Dichtegradientenmedium diente Optiprep[®], das als 60%-ige Stocklösung vorlag. Die in der differentiellen Zentrifugation angereicherten und in 455µl Extraktionspuffer resuspendierten Organellen wurden mit 156,5 µl Optiprep[®] Verdünnungslösung und 288 µl Optiprep[®] versetzt und somit auf eine Konzentration von 19% Optiprep[®] eingestellt. Der Gradient wurde auf Eis in Ultra-Clear Zentrifugenröhrchen geschichtet (Tabelle 4.2.2).

Tab. 4.2.2 Schichtung des Dichtegradienten		
Gehalt an Optiprep [®]	Volumen	
8%	0,9 ml	
12%	0,8 ml	
16%	0,7 ml	
19%	0,9 ml	
22,5%	0,7 ml	
27%	0,4 ml	

Die einzelnen Gradientenstufen wurden auf 230 mOsm mit 2,5 M Saccharoselösung angeglichen, um eine osmotische Homöostase zu gewährleisten. Nach einer fünfstündigen Zentrifugation bei 38000 rpm (148000 x g) und 4°C wurden die Interphasen sequenziell von oben abgenommen und in einzelne Reaktionsgefäße überführt.

4.2.7 Auftrennung und Massenspektrometrie der Organellenlysate

4.2.7.1 Lyse der Proben für die 2D-Gelelektrophorese

Zur Gewinnung von 2D-Lysaten aus gereinigten Organellen wurden die einzelnen Fraktionen in neue Ultra-Clear Zentrifugenröhrchen überführt und mit Homogenisationspuffer aufgefüllt. Durch Zentrifugation bei 148000 x g für 20 Minuten wurden die gereinigten Organellen konzentriert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 40 µl 2D-Lysepuffer resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten bei 20000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder bei -80°C gelagert oder direkt für die 2D-Gelelektrophorese verwendet.

4.2.7.2 Dokumentation, Gelanalyse und Ausstanzen individueller Proteinspots

Die spezifischen Emissionswellenlängen der mit Cy5, Cy3 und Cy2 gefärbten Proteine im 2D-Gel wurden mit dem Fluoreszenzscanner "Typhoon Trio" quantifiziert. Dabei korreliert die Fluoreszenzintensität mit der Menge an Protein über einen weiten dynamischen Bereich. Die einzelnen Scans der Kanäle wurden in die DIA (Differential In-gel Analysis) Software des DeCyder 6.5 Softwarepakets geladen. Hier wurden zunächst die einzelnen Spots analysiert und nach bestimmten Kriterien (Fluoreszenzintensität, Steilheit, Fläche) in die nachfolgende Gelanalyse einbezogen. Dabei wurde mit Hilfe eines berechneten Schwellenwertes die differentiellen Spots festgelegt und in eine Pickliste übertragen.

Zum Ausstanzen wurden nach Herstellerangaben die hinteren Glasplatten silanisiert und die vorderen mit "Repel-Silane-ES" behandelt. Die dadurch entstandene Funktionalisierung der Glasoberflächen verhinderte ein Ablösen der Gele von den hinteren Glasplatten.

Die Pickliste wurde zum Ausstanzen der Spots auf den "Ettan Spotpicker" übertragen, der anhand von Referenzmarkierungen mit einem Pickkopf von 2 mm Durchmesser die Gelstücke in eine 96-Loch Platte transferierte. Das korrekte Stanzen wurde durch nochmaliges Scannen verifiziert.

4.2.7.3 Post-elektrophoretische Gelfärbungen

Aufgrund der Veränderungen des Molekulargewichtes durch CyDye Markierung (siehe Diskussion Kapitel 6.3) wurde in den meisten Fällen eine Nachfärbung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt.

Ruthenium II-bathophenanthrolin Disulfonat Chelat (RuBPS) (leicht modifiziert nach [127])

Die Gele wurden über Nacht fixiert. Danach wurde das Gel dreimal für 30 Minuten mit 20%-igem Ethanol gewaschen und anschließend über Nacht in einer 1 μ M RuBPS Lösung (eigene Herstellung nach [128]) gefärbt. Entfärbt wurde zweimal für je 20 Minuten. Vor dem Scannen fand eine abschließende Equilibrierung in ddH₂O für 10 Minuten statt. Der Scan fand bei 610 nm BP30 mit 457 nm Anregungswellenlänge statt.

Deep Purple / Lava Purple

Die Gele wurden auch bei dieser Methode über Nacht fixiert. Der Farbstoff wurde in 100 mM Natriumborat, pH 10,5 anschließend für 1,5 Stunden auf das Gel gegeben. Danach wurde das Gel für 45 Minuten in 15% Ethanol entfärbt und schließlich wieder für 10 Minuten in der Fixierlösung geschwenkt. Die Detektion fand bei 610 nm BP30 mit 532 nm Anregungswellenlänge statt.

Sypro Ruby (Invitrogen)

Die Gele wurden für mindestens drei Stunden fixiert und über Nacht mit Sypro Ruby gefärbt. In einem ersten Schritt wurde das Gel zweimal für 30 Minuten entfärbt und anschließend zweimal fünf Minuten mit ddH₂O gewaschen. Das Gel wurde nach Herstellerangaben mit einer Anregungswellenlänge von 457 nm bei einer Emission von 610 nm BP30 eingescannt.

Flamingo Pink (Bio-Rad)

Auch bei dieser Färbemethode wurden die Gele mindestens drei Stunden fixiert und anschließend mit Flamingo Pink für 14 Stunden gefärbt. Zur Entfärbung wurden die Gele zweimal 10 Minuten mit ddH₂0 gewaschen. Die Fluoreszenz wurde nach den Herstellerangaben mit 532 nm im Fluoreszenzscanner angeregt und bei 610 BP30 nm gemessen.

4.2.7.4 Proteolytische Spaltung und Massenspektrometrie

In Abhängigkeit von der Anzahl der Spots wurde die proteolytische Spaltung manuell oder automatisiert (Ettan Digester, GE Healthcare) durchgeführt. Bei beiden Methoden wurden umfangreiche Schutzmaßnahmen gegen das Einbringen von Fremdproteinen (wie z.B. Keratin) in die Proben getroffen.

Manueller Verdau und Spotting

Die Gelspots wurden dreimal mit je 100 µl ddH₂O (HPLC Grade) für mindestens 5 min gewaschen. Anschließend wurde mit 100 µl 25 mM Ammoniumbicarbonat in 50% Acetonitril (ACN) für 5 Minuten umgepuffert und gleichzeitig dehydriert. Die vollständige Dehydration der Gelspots erfolgte mit 100 µl Acetonitril und war an einer Weißfärbung der Spots erkennbar. Die Gelspots konnten an dieser Stelle bei -80°C für bis zu 3 Monate gelagert werden oder direkt dem tryptischen Verdau zugeführt werden. Hierfür wurden die Spots mit 100 ng porcinem Trypsin in 10 µl 25 mM Ammoniumbicarbonat bei 4°C für 15 Minuten rehydriert. Danach wurden noch je 10 µl 25 mM Ammoniumbicarbonat auf die geguollenen Gelstücke gegeben und bei 37°C über Nacht verdaut. Der Verdau wurde durch die Zugabe von 10 µl 0,3% Trifluoressigsäure (TFA) in ACN abgestoppt. Die Elution der Peptide aus der Gelmatrix wurde durch 15-minütige Ultraschall-Behandlung unterstützt. Der Überstand wurde abgenommen und in eine neue 96-Loch U-Bodenplatte überführt. Die Gelspots wurden hinterher mit 20 µl ACN dehydriert und der Überstand mit dem bereits abgenommenen vereinigt. Die eluierten Peptide wurden in der Vakuumzentrifuge auf mittlerer Heizstufe für 30 Minuten eingeengt. Die Proben wurden in 0,8 µl Matrixlösung aufgenommen und auf eine 192-Loch MALDI-Edelstahlplatte pipettiert und luftgetrocknet.

Automatisierter Verdau (Ettan Digester) und Spotting (Ettan Spotter)

Der automatisierte Verdau verlief, mit geringen Abweichungen, analog zum manuellen Vorgehen. Die Spots wurden hierbei vom Ettan Digester (GE Healthcare) zweimal mit je 70 µl ddH₂O und dreimal mit je 70 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat in 50% Methanol für je 20 Minuten gewaschen. Die Dehydration erfolgte mit 70%-igem Acetonitril. Trypsinisiert wurde wie zuvor beschrieben. Durch Zugabe von 40 µl 0,1% TFA in 50% Acetonitril wurde die Reaktion gestoppt und darauf folgend zweimal mit je 30 µl derselben Lösung eluiert. Die abschließende Dehydrierung erfolgte durch 70%-iges Acetonitril. Alle Überstände wurden bei diesen je 20-minütigen Schritten in einer neuen 96-Loch Spitzbodenplatte vereint und zunächst in der Vakuumzentrifuge

und anschließend durch Verdunstung bei Raumtemperatur eingeengt. Die Peptide wurden danach automatisch durch den Ettan Spotter (GE Healthcare) mit je 1,3 µl Matrixlösung vermischt und auf eine 192-Loch MALDI-Edelstahlplatte pipettiert.

Bei beiden Methoden wurde zur Kalibrierung des Massenspektrometers noch der Peptidstandard "4700-Cal1" auf die Kalbibrierpunkte der Edelstahlplatte aufgebracht.

Peptidmassenanalyse

Die Peptidmassenanalyse erfolgte mit dem 4700 Proteomics Analyzer MALDI-Tof/Tof Massenspektrometer (Applied Biosystems, Darmstadt) und wurde von Herrn Dr. Christoph Gelhaus (Abteilung Zoophysiologie, Prof. Dr. M. Leippe, Zoologisches Institut, CAU Kiel) durchgeführt. Für die Analyse wurden die Spots mit 1000-2000 Laserimpulsen beschossen und die gemessenen Spektren kumuliert. Die autolytischen Fragmente des porcinen Trypsins dienten zur internen Kalibrierung der Spektren und wurden aus der Datenbanksuche ausgeschlossen.

Datenverarbeitung

Die Datenbanksuche mit den erhaltenen Peptidmassen wurde mit Hilfe der Software "GPS Explorer Version 3.6" (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Massen wurden dazu mit dem Programm an den MASCOT-Server Version 2.0 (Matrix Science Ltd., London, UK) übertragen, der dabei gegen eine "in-house" Datenbank, mit allen hinterlegten Proteinen aus Homo sapiens (191694 Einträge, 28/02/2007) suchte. MASCOT-wurde dabei mit den folgenden Einstellungen verwendet: Modifikation von Cysteinen durch Carboxyamidomethylierung wurde als obligatorisch betrachtet und die Oxidation von Methionin wurde als eine potentielle Modifikation eingestuft. Die maximale Anzahl an fehlenden tryptischen Spaltungen wurde auf 1 gesetzt, monoisotopische Massen wurden zugelassen und die Massentoleranz wurde auf \pm 20 ppm gesetzt. Die Proteine galten als sicher identifiziert, wenn ein MASCOT-Score \geq 65 (entsprechende Identifikationswahrscheinlichkeit höher als 95%) erreicht wurde.

5. Ergebnisse

5.1 Anreicherung und Charakterisierung lytischer Granula

Für eine detaillierte Analyse des Proteoms von sekretorischen Lysosomen (SL) war es zunächst essentiell, diese möglichst effizient und frei von anderen subzellulären Strukturen anzureichern. Hierfür wurde auf der Basis von Iodixanol[®], einem nichtionischen, niedrig osmolaren Röntgenkontrastmedium, eine mehrschichtige Dichtegradientenzentrifugation etabliert.

5.1.1 Etablierung der Anreicherung sekretorischer Granula aus allogen stimulierten Lymphozyten

Die Organellen des Lymphozytenhomogenats von 14 Tage alten PHA-Blasten Lymphozyten) (Allogen-stimulierte wurden zunächst mittels differentieller Iodixanol[®] Zentrifugation angereichert 19% auf eingestellt. Die und Organellensuspension wurde in die Mitte des diskontinuierlichen Dichtegradienten pipettiert und durch Ultrazentrifugation in sechs Fraktionen separiert (Abb. 5.1.1).



Abb. 5.1.1: Dichtegradientenzentrifugation. Die Schichtung des Gradienten erfolgte mit den angegebenen lodixanolkonzentrationen durch langsames Pipettieren von oben (**A**). Dabei wurden die angereicherten Organellen (AO) in die Mitte des Gradienten platziert. Nach fünfstündiger Zentrifugation bei 148000 x g erfolgte eine Auftrennung der Organellen in sechs verschiedene Fraktionen (**B**).

Die einzelnen Fraktionen wurden von oben abgenommen, die Proteinmenge quantifiziert und je 4 µg im Western Blot analysiert. Als Marker für sekretorische Granula in T- und NK-Zellen dienten zunächst die zytotoxischen Proteine Fas Ligand (FasL, CD178) und Perforin [52]. Als klassische Marker für Lysosomen wurden LAMP-1 (CD107a) und LAMP-3 (CD63) benutzt [51,97]. Zusätzlich wurde Vti1b, ein membrangebundenes SNARE Protein gefärbt, das mit der Regulation des post-Golgi Vesikeltransports und sekretorischen Transportwegen in Verbindung steht [129]. Alle putativen Markerproteine für SL waren in der Fraktion 2 deutlich angereichert (Abb. 5.1.2). Dagegen war in dieser Fraktion weder Golgin-84 als Marker für Golgi-Zisternen [130], CoxIV oder Cytochrom C als mitochondriale Marker [131], noch Katalase als Marker für Peroxisomen [132] nachweisbar. Die einzelnen Fraktionen waren zudem nicht durch Plasmamembran verunreinigt, was durch pan-Cadherin Antikörper nachgewiesen wurde. Bip/Grp78, ein Marker für das endoplasmatische Retikulum [133] und EEA-1 ein früher Endosomenmarker [134] wurden in der putativen SL Fraktion 2 nachgewiesen. Das etablierte Protokoll kann somit verwendet werden, um nach den oben genannten Kriterien sekretorische Vesikel signifikant anzureichern. Interessanterweise waren die beiden zytotoxischen Proteine Granzym B und Granulysin auch in anderen Fraktionen vorhanden. In den dargestellten Fraktionen aus PHA-Blasten war bei Granulysin die unreife 15 kDa Form in der Fraktion 2 angereichert, während die reife Form (9 kDa) verstärkt in den Fraktionen 4 und 6 nachgewiesen wurde. Ganz ähnlich war die Verteilung von Granzym B, bei dem die stärksten Signale in Fraktion 4 und 6 festzustellen waren. Weiteres Indiz für die effiziente Anreicherung und Separation von mitochondrialen Verunreinigungen war das Auftreten der mitochondrialen Proteine Cytochrom C und CoxIV ausschließlich bzw. angereichert in der Fraktion 5 (Abb.5.1.2).



Abb. 5.1.2: Western Blot Analyse der Dichtegradientenfraktionen. Das Gesamtlysat (GL) wurde aus dem Zellhomogenat entnommen und in 1% NP-40 lysiert. Die gleiche Prozedur wurde mit den durch die differentielle Zentrifugation angereicherten Organellen (AO) durchgeführt. Von allen Proben wurden je 4 µg aufgetragen und unter nicht-reduzierenden (CD63, Granulysin) oder reduzierenden Bedingungen auf einem 4-20% NuPAGE Gradientengel aufgetrennt. Der Transfer erfolgte auf 0,2 µm Nitrozellulose-(NC) Membranen, die für verschiedene Antikörperinkubationen gestrippt wurden.

5.1.1.1 Vergleich der subzellulären Fraktionen 2 und 5

In initialen DIGE Versuchen wurden die Fraktionen 2 und 5 miteinander verglichen. Die Fraktionen unterscheiden sich in den oben genannten Markerproteinen. Dieser Unterschied wurde auch durch das Proteinprofil im 2D-Gel bestätigt. Hierbei war festzustellen, dass das Spotmuster der Fraktion 5 (Abb. 5.1.3, grün) zu dem bereits veröffentlichten Proteom der Mitochondrien einer lymphoblastoiden Zelllinie in den meisten Proteinlokalisationen analog ist [135]. Das dargestellte 2D-Gel zeigt zusätzlich, dass sich der Proteinbesatz der Fraktion 2 und 5 nahezu komplett unterscheidet, was auch die deutliche Trennung der Organellen im Dichtegradienten widerspiegelt.



Abb. 5.1.3: 2D-DIGE Analyse der Fraktion 2 und 5 aus PHA-Blasten. Die Organellen der Fraktionen wurden wie beschrieben angereichert und anschließend mit Cy-Farbstoffen markiert. Hierbei wurde Fraktion 2 mit Cy5 (rot) und Fraktion 5 mit Cy3 (grün) markiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei unabhängig durchgeführten.

5.1.2 FasL als Marker für sekretorische Granula in Lymphozyten-Subpopulationen

Als Marker für lytische Granula diente der FasL, der nach dem derzeitigen Literaturstand direkt vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) in die Granula transportiert wird. Für die nachfolgenden Proteomanalysen mussten zunächst entsprechende Granula aus verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen isoliert und angereichert werden. Die durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten Fraktionen wurden deshalb jeweils auf Anreicherung des FasL in Fraktion 2 überprüft. Hierfür wurde zunächst analysiert, ob der FasL in allen zu untersuchenden Subpopulationen in meßbarer Menge vorhanden war. Die Immunpräzipitation (Abb. 5.1.4) mit zwei verschiedenen FasL mAks (NOK-1 und FasLcyto-2) zeigte bei allen

Proben, mit Ausnahme der Negativkontrollen, ein positives Signal bei 37 kDa. Dies bedeutet, dass Granula aus *in vitro* expandierten PHA-Blasten sowie CD4⁺, CD8⁺, $v\delta1^+$, $v\delta2^+$ T-Zellen und aus NK-Tumorzelllinien NKL, YTS und *in vitro* expandierten NK-Zellen FasL als Effektormolekül enthalten.



Abb. 5.1.4: Immunpräzipitation des Fas Liganden aus Lymphozytensubpopulationen. Aus den Lysaten von 10 Mio. Tumorzellen (JFL39.1, RAPO, NKL, YTS) oder 20 Mio. Zellen der verschiedenen stimulierten und expandierten Lymphozytensubpopulationen wurde mit je 1 μ g α -FasL (NOK-1) und 25 μ l Protein G Sepharose für vier Stunden präzipitiert. Zusätzlich wurde auch mit 2 μ g FasLcyto-2 präzipitiert, der an den N-Terminus des FasL bindet. Der Western Blot wurde abschließend mit α -FasL (G247-4) gefärbt. Als Negativkontrollen dienten eine Präzipitation mit IgG1 und das Lysat der RAPO Zellen, die keinen FasL exprimieren. Als Positivkontrolle wurde die mit FasL stabil transfizierte Zelllinie JFL39.1 benutzt.

5.1.3 CD63 als Marker für sekretorische Granula

CD63 wurde wie bereits erwähnt als Markerprotein für lysosomale Membranen beschrieben und wird erst nach Aktivierung auf der Plasmamembran exprimiert. Der Transport von CD63 (LAMP-3) vom Golgi-Apparat in die sekretorischen Granula erfolgt im Gegensatz zu den anderen LAMP Proteinen über AP-3. Die anderen LAMPs werden von AP-1 und AP-2 zunächst zu den Endosomen eskortiert und gelangen erst von dort aus zu den SL [136]. Gegenüber den anderen LAMPs stellt CD63 somit einen spezifischeren Marker für SL dar. Im folgenden Versuch sollte ob deshalb geklärt werden, CD63 angereicherte der Granula in Fluoreszenzmikroskopie mit den FasL Speichervesikeln kolokalisieren. Hierfür wurden die in Abbildung 5.1.5 angegebenen Zellen verwendet und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. In den untersuchten T- und NK-Zellen war eine deutliche Kolokalisation von FasL und CD63 in denselben Kompartimenten zu beobachten. CD63 ist damit als ein weiteres Markerprotein für lytische Granula in den hier untersuchten Zellen anzusehen.



Abb. 5.1.5: CD63 als Marker für sekretorische Granula in NK- (A) und T-Zellen (B). Die NK-Zellinie YTS und die für 16 Tage *in vitro* expandierten CD4⁺, CD8⁺ und NK-Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit anti-FasL mAk NOK-1 und Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG und anschließend nach intensivem Waschen mit Alexa Fluor 555 direkt markiertem anti-CD63 mAk MEM-259 gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert. Eine Skalierung ist für die jeweilige Zelle angegeben. Die Bilder von YTS, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden am LSM, die der NK-Zellen am Axio Imager Z1 mit Apotome aufgenommen.

5.2 Etablierung hoch reproduzierbarer 2D-Gelelektrophoresen

Für die nachfolgenden Proteomanalysen ein war es notwendig 2D-Gelelektrophoresesystem zu etablieren, welches eine hohe Reproduzierbarkeit innerhalb einzelner elektrophoretischer Auftrennungen gewährleistet. Die Reproduzierbarkeit wurde überprüft, indem elektrophoretisch aufgetrennte und Flamingo Pink gefärbte Lysate von sekretorischen Lysosomen (Fraktion 2) aus CD4⁺ T-Zellen von drei verschiedenen Spendern miteinander verglichen wurden. Eine erste visuelle Auswertung der drei verschiedenen Gele ergab eine sehr große Ähnlichkeit zwischen den Proteinprofilen der SL aus verschiedenen Spendern. Dieses Ergebnis wurde auch durch die durchgeführte statistische Auswertung mit der Image Master Software 6.0 bestätigt. Die Spots der einzelnen Gele wurden analysiert und die relativen Spotintensitäten in einem Streudiagramm gegeneinander aufgetragen. Nach der Berechnung einer Regressionsgeraden, konnte anhand des Korrelationskoeffizienten die Abweichung zwischen den Spendern bestimmt werden. Der durchschnittliche Korrelationskoeffizient lag bei 0,95, wobei ein Koeffizient von eins einem absolut identischen Spotmuster entsprechen würde. Somit ist festzuhalten, dass die Spender- und Elektrophorese-spezifischen Unterschiede im Proteom von CD4⁺ T-Zellgranula sehr gering ausfallen.



Abb. 5.2.1: Übereinstimmung der Proteinprofile von sekretorischen Granula aus verschiedenen CD4⁺ T-Zelllinien. Die isolierten Granula (Fraktion 2) aus CD4⁺ Zellen von drei individuellen Spendern wurden auf einem 2D-Gel separiert und mit Flamingo Pink gefärbt. Die statistische Analyse der Spotintensitäten wurde mit Hilfe der Image Master Software erstellt und ergab ein sehr analoges Proteinmuster in allen drei Spendern. Dies wurde auch durch die Regressionsgerade und den Korrelationskoeffizienten verdeutlicht.

5.2.1 Etablierung massenkompatibler Gelfärbungen

Eigene Beobachtungen und ein parallel veröffentlichter Befund von Hrebicek und Kollegen [137] ergaben, dass ein direktes Stanzen CyDye markierter Proteine zu erheblichen Ungenauigkeiten in der Identifikation von Proteinen führen kann. Dies begründet sich durch das zusätzliche Gewicht der markierten Proteine, dass durch die CyDyes (434-464 Da) verursacht wird. Dieser leichte Unterschied im Molekulargewicht macht sich besonders bei niedermolekularen, aber auch einigen hochmolekularen Proteinen bemerkbar. Dadurch werden im Einzelfall nur 3-5% des zu identifizierenden Proteins gestanzt, während der Rest des Proteins unter dem fluoreszierenden Spot lokalisiert ist. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die CyDye Gele mit sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen nachgefärbt. Es wurde eine relativ große Varianz in Sensitivität und Massenkompatibilität festgestellt, daher wurde durch zunächst vergleichende Versuche ein optimiertes Färbeprotokoll etabliert.

Neben den klassischen Proteinfärbemethoden (Coomassie oder Silber) standen verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung, die auf Massenkompatibilität und Sensitivität geprüft werden sollten. Hierzu gehörten Lava Purple, Deep Purple, Flamingo Pink und ein im Labor synthetisierter Ruthenium-basierter Farbstoff (RuBPs) als Alternative zu dem kommerziell erhältlichen Ruthenium-Farbstoff Sypro Ruby. Da bei Coomassiefärbungen eine geringe Sensitivität und bei Silberfärbungen niedrige massenspektrometrische Identifikationsraten zu verzeichnen waren, sollten zunächst die Färbeeigenschaften der genannten Fluoreszenzfarbstoffe überprüft werden.

Dabei zeigte Flamingo Pink bei gleichen Färbe- und Detektionsbedingungen die deutlich höchste Sensitivität. Ebenfalls waren die MALDI-Identifikationsraten bei diesem Farbstoff zufrieden stellend. Der im eigenen Labor synthetisierte Farbstoff zeigte einen starken Hintergrund, wies aber eine erhöhte Sensitivität gegenüber Lava und Deep Purple auf. Sypro Ruby hatte eine ähnliche Sensitivität, zeigte aber ein besseres Signal-Rauschverhältnis (nicht gezeigt). Deshalb wurde für zukünftige post-elektrophoretische Färbungen standardmäßig Flamingo Pink verwendet. RuBPs dagegen konnte als kostengünstige Alternative zu den kommerziell erhältlichen Fluoreszenzfarbstoffen für Vorversuche verwendet werden.



Abb. 5.2.2: Vergleich der Fluoreszenzfarbstoffe. Es wurden je 75 µg Gesamtzelllysat auf nicht linearen 13 cm pH 3-11 IPG Streifen in der ersten Dimension aufgetrennt. In der zweiten Dimension wurden die Proteine auf 10%-igen Gelen separiert. Die Färbungen erfolgten nach Herstellerangaben. Die Gele wurden mit Anregungswellenlängen von 532 nm bzw. 457 nm (bei RuBPs) eingescannt. Die Detektion erfolgte bei 610 nm BP30 mit 555V am PMT. Die Gelbilder wurden ausgeschnitten, aber weder in Kontrast noch Helligkeit verändert.

5.3 Der Proteinbesatz lytischer Granula aus NK-Zellen

Zu Beginn der Untersuchung wurde zur Darstellung des Proteoms angereicherter sekretorischer Lysosomen der Schwerpunkt auf NK-Zellen gelegt. Ausgehend von ihrer Funktion als zytotoxische Effektorzellen werden diese auch als "large granular lymphocytes" bezeichnet, was bereits auf einen hohen Besatz an lytischen Granula hindeutet. NK-Zellen bzw. NK-Zelllinien stellten somit ein geeignetes System zur Etablierung der differentiellen Proteomanalyse angereicherter Vesikel dar. Wie zuvor beschrieben, war auch in dieser Population eine Anreicherung von FasL in der Fraktion 2 sowie eine Kolokalisation dieses Markers mit dem lysosomalen Markerprotein CD63 nachweisbar. Der limitierende Faktor bei vergleichenden Proteomanalysen isolierter Organellen ist in der Regel die Proteinmenge, die aus subzellulären Fraktionierungen gewonnen werden kann. Vorversuche ergaben, dass mindestens 400 x 10⁶ in vitro expandierte NK-Zellen notwendig sind, um genügend Granula zu isolieren. Da sich diese Zellen jedoch nur aufwändig expandieren lassen, wurde zunächst auf leukämische NK-Zellen zurückgegriffen. NKL und YT(S) sind dabei die NK-Zelllinien, die derzeit weltweit in Laboratorien zur Funktionsanalyse von NK-Zellen am häufigsten benutzt werden [138]. Die Zelllinien zeichnen sich jedoch durch individuelle Oberflächenmarker aus und repräsentieren deshalb nicht unbedingt primäre, polyklonal expandierte NK-Zellen.

5.3.1 Phänotypische Charakterisierung leukämischer und aktivierter humaner NK-Zellen

Leukämische NK-Zelllinien und MACS isolierte, expandierte NK-Zellen wurden durch spezifische Oberflächenmarker charakterisiert (Abb. 5.3.1). Wie erwartet waren primäre NK-Zellen positiv für CD2, CD16, CD56, aber negativ für CD3 und CD28. Des Weiteren exprimieren sie auch den aktivierenden c-Typ Lektin Rezeptor NKG2D. Den NKL-Zellen fehlten dagegen CD16 und CD56. YTS-Zellen waren NKG2D⁻ und exprimierten weder CD2 noch CD16. Erstaunlicherweise waren YTS deutlich positiv für CD28. Diese massiven Unterschiede bei spezifischen Oberflächenmarkern schlagen sich auch funktionell in der Erkennung der Zielzellen nieder.



Abb. 5.3.1: FACS Analyse phänotyptischer Charakteristika von NKL (links), YTS (Mitte) und *in vitro* expandierten NK-Zellen (rechts). Die Zellen wurden mit fluoreszierenden Antikörpern gegen die aufgeführten Oberflächenproteine gefärbt. Es wurden jeweils 10.000 Zellen pro Probe im FACS analysiert. Die schwarz gefüllte Fläche repräsentiert die Fluoreszenz des spezifischen Antikörpers, während die Fluoreszenz der entsprechenden Isotypkontrolle als graue Linie abgebildet ist.

5.3.2 Funktionelle Unterschiede leukämischer NK-Zellen bei der Erkennung von Zielzellen

Die eben erwähnten Unterschiede im Besatz der Oberflächenproteine hatten auch einen Einfluss auf die Erkennung von Zielzellen. Als Zielzellen dienten 721.221 und K562, die sich ebenfalls im Besatz ihrer Oberflächenmoleküle unterscheiden und dadurch unterschiedlich von den NK-Zellen erkannt werden. Die Zytotoxizität wurde mit einem LDH-Freisetzungs-Assay bestimmt. NKL zeigte gegenüber K562 eine höhere Zytotoxizität als gegenüber 721.221 (Abb. 5.3.2 A). YTS war dagegen nicht in der Lage, K562 Zielzellen effizient zu lysieren (Abb. 5.3.2 B).



Abb. 5.3.2: Zytotoxizität von NKL (A) und YTS (B) gegenüber 721.221 und K562. Es wurden je 20000 Zielzellen in Triplikaten mit den entsprechenden Effektorzellen in den angegebenen Verhältnissen bei 37°C für 45 min inkubiert. Durch Lyse freigesetztes LDH wurde im Überstand gemessen und die Zytotoxizität unter Berücksichtigung der Kontrollen für Spontan- und Maximallyse der Effektor- bzw. Zielzellen ermittelt.

5.3.3 Isolierung und Charakterisierung lytischer Granula aus NK-Zellen

Analog zu der bereits beschriebenen Methode zur Anreicherung sekretorischer Lysosomen Lymphozyten, wurde auch bei den NK-Zellen aus eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Die so erhaltenen Fraktionen wurden anschließend mittels Western Blot analysiert. Hierbei wurde eine leicht abweichende Verteilung der Organellenmarker im Vergleich zu Abb. 5.1.3 beobachtet. Bei YTS-Zellen wurde eine Anreicherung des Fas Liganden in den Fraktionen 1 und 2 festgestellt, wobei nur Fraktion 2 auch eine Anreicherung der lysosomalen Membranproteine (LAMP-1 und CD63) aufweist. Nach Entfernen der Antikörper (durch Stripping) wurden die Blots mit weiteren Antikörpern gegen spezifische subzelluläre Strukturen inkubiert. Neben den zu Beginn benutzten Markern wurde die Golgi-Membran mit anti-GM130 nachgewiesen. Die Anreicherung in Fraktion 4 und 5 deckt sich mit der von anti-p47A, das ein Teil des AP3 Komplexes darstellt und am Proteintransport im trans-Golgi Netzwerk (TGN) beteiligt ist.



Abb. 5.3.3: Verteilung Organell-spezifischer Marker in individuellen subzellulären Fraktionen. Dargestellt sind repräsentative Western Blots für fünf Experimente mit YTS (A) und NKL (B), und für drei Experimente mit NK-Zellen (C). FasL und CD63 dienten als Marker für sekretorische Granula, LAMP-1 für Lysosomen, GM130 und p47A für Golgi-Matrix bzw. -Membran, EEA-1 und Rab4 sind frühe Endosomenmarker, CoxIV ist ein Markerprotein für Mitochondrien und Catalase für Peroxisomen.
Die Anreicherung der frühen Endosomen wurde mit anti-EEA-1 und anti-Rab4 überprüft. Rab4 ist am endosomalen Recycling der Plasmamembranproteine beteiligt. Im Gegensatz zur Anreicherung von Granula aus PHA-Blasten war bei den leukämischen NK-Zellen keine Kontamination mit endosomalen Markern, dafür aber mit Katalase und dem ER Markerprotein Bip/Grp78 nachweisbar. Interessanterweise zeigte Granzym B eine ähnliche Verteilung wie LAMP-1 in NKL (Abb. 5.3.3 B), jedoch eine stärkeres und unerwartet breites Vorkommen in allen Fraktionen von YTS-Zellen (Abb. 5.3.3 A). NK-Zellen zeigten, wie bereits bei PHA-Blasten beobachtet, eine Anreicherung von Granzym B in der Fraktion 6, obwohl FasL ein deutliches Vorkommen in der 2. Fraktion aufwies (Abb. 5.3.3 C). Bereits diese Western Blot Analysen gaben erste Hinweise auf einen unterschiedlichen Besatz mit zytotoxischen Proteinen zwischen leukämischen und *in vitro* expandierten NK-Zellen.

5.3.4 2D-DIGE Analyse angereicherter lytischer Granula aus NK-Zellen

Basierend auf den Ergebnissen der Western Blot Analysen wurden angereicherte sekretorische Lysosomen (Fraktion 2) nachfolgend auf zwei-dimensionalen Gelen aufgetrennt und separierte Spots mittels der Peptidmassenanalyse identifiziert. Die CyDye markierten Granulalysate aus NKL, YTS und *in vitro* expandierten NK-Zellen (18 Tage) wurden wie in Tabelle 5.3.1 dargestellt in verschiedenen DIGE Experimenten bezüglich ihres Proteinbesatzes miteinander verglichen.

Tabelle 5.3.1: 2D-DIGE Experimente der NK-Zellen. Dargestellt ist ein Experimentschema für direkte Vergleiche von angereicherten lytischen Granula aus NKL und YTS (Experimente 1-5) und NKL, YTS und NK-Zellen (Experimente 6-8).

Exp. Nr. Protein-		CyDye Markierung			Spots	verringe	rt in YTS	erhöht in YTS	
	menge	Cy5	СуЗ	Cy2		#	%	#	%
1	150 µg	NKL		YTS	1492	83	5.6	72	4.8
2	150 µg	YTS	NKL		1513	53	3.5	77	5.1
3	200 µg	NKL	YTS		1758	74	4.2	55	3.1
4	200 µg	YTS	NKL		1909	92	4.8	64	3.4
5	200 µg		NKL	YTS	1414	68	4.8	93	6.6
		Durchschnitt:		hschnitt:	1617	74	4.6	72	4.6
		Reproduzierbarkeit*:				45		56	
6	150 µg	NK	NKL	YTS	2036				
7	225 µg	NKL	YTS	NK	1484				
8	150 µg	YTS	NK	NKL	1154				

Nach den DeCyder Berechnungen entspricht die angegebene Spotanzahl der Menge an differentiell exprimierten Proteinen. Hierbei bezieht sich die Anzahl der geringer oder verstärkten auftretenden Spots auf YTS-Zellen.

*) Veränderungen, die in mindestens drei Experimenten reproduzierbar waren.

Der direkte Vergleich von NKL und YTS ergab eine ermittelte Spotanzahl von 1414-1909 (1617 im Durchschnitt) in fünf unabhängigen Experimenten. Durch unterschiedliche Farbstoffkombinationen ("Dye Swap") wurde eine CyDye spezifische Färbung bestimmter Proteine ausgeschlossen. Die Berechnungen mit Hilfe der "Differentiellen in-Gel Analyse" (DIA) des DeCyder[®] Softwarepakets ergab bei einem Grenzwert von 3.0 für den Unterschied in den Spot Volumina, 101 Spots, die reproduzierbar differentiell zwischen NKL und YTS waren. Ein repräsentatives Experiment für diesen Vergleich ist in Abb. 5.3.4 dargestellt (entspricht Experiment Nr. 3 in der Tabelle 5.3.1).



Abb. 5.3.4: 2D-DIGE Analyse von angereicherten SL aus zwei verschiedenen NK-Zelllinien. Es wurden jeweils 50 µg der Fraktion 2 (=SL) von NKL mit Cy5 (rot) bzw. von YTS mit Cy3 (grün) markiert und auf 24 cm Streifen, pH 3-11 NL in der 1. Dimension und auf 12,5 % Laemmli Gelen in der 2. Dimension aufgetrennt. Die Überlagerung (A) beider Fluoreszenzkanäle ergibt eine Gelbfärbung bei ähnlichen von Proteinmengen in einem Spot. Die einzelnen Kanäle sind repräsentativ für fünf Experimente (Exp. Nr. 3, Tabelle 5.3.1) auch als Graustufenbild für NKL (B) und YTS (C) dargestellt. Unterschiedlich exprimierte Proteine sind rot umrandet bei einer Verminderung und blau bei einer Erhöhung der Spotvolumina außerhalb einer 3-fachen Veränderung von NKL zu YTS. Die korrespondierenden *pl* Bereiche sind als gestrichelte Linien angegeben

Beim Vergleich der *in vitro* expandierten NK-Zellen mit den leukämischen NK-Zelllinien ergaben sich bei maximal 2036 Spots je 28 geringer bzw. verstärkter exprimierte Proteine beim direkten Vergleich von NK- und NKL-Zellen. Zwischen NKund YTS waren 35 vermindert und 37 erhöht. Ein repräsentatives Experiment (Nr. 6 in Tabelle 5.3.1) ist in Abbildung 5.3.5 dargestellt. Bei all diesen Experimenten ergab sich eine überwiegende Übereinstimmung im Proteinprofil, da mehr als 90% der Proteine ein ähnliches Spotvolumen (mit den benutzten Parametern) in den 2D-Gelen aufwiesen. Dennoch waren klare und hoch reproduzierbare Unterschiede zwischen den einzelnen leukämischen Zelllinien auf der einen Seite bzw. den Zelllinien und den aktivierten NK-Zellen auf der anderen Seite, festzustellen. Diese Unterschiede im Proteinbesatz wurden nachfolgend im Rahmen der Erstellung einer Proteinkarte lytischer NK-Granula, mittels Massenspektrometrie identifiziert.



Abb. 5.3.5: 2D-DIGE Analyse von angereicherten lytischen Granula aus NKL und YTS im Vergleich zu expandierten NK-Zellen. Es wurden jeweils 50 µg der Granulafraktion von NK (C), NKL (B) und YTS (D) mit Cy5, Cy3 und Cy2 markiert. Der daraus resultierende Farbcode NK/Cy5/rot, NKL/Cy3/blau und YTS/Cy2/grün ist in (A) als Überlagerung dargestellt. Dieses Gel zeigt die Unterschiede im Proteinbesatz repräsentativ für drei unabhängige Experimente (Exp. Nr. 6, Tabelle 5.3.1). Proteinspots von NKL- (B) und YTS- (D) Zellen, die eine Änderung im Spotvolumen von mehr als 3-fach im Vergleich zu expandierten NK-Zellen aufwiesen, wurden bei erhöhten Spotvolumenverhältnissen blau und bei verminderten rot markiert.

5.3.5 Proteinidentifizierung lytischer Granula aus NK-Zellen durch Massenspektrometrie

Die Identifizierung von individuellen Proteinen wurde nur mit den Spots durchgeführt, die ein vergleichbares Expressionsprofil in mindestens zwei Experimentsätzen (NKL/YTS und NKL/YTS/NK) zeigten. Die Spots wurden mit Fokus auf die differentiellen Proteine automatisch für die gestanzt und manuell Massenspektrometrie aufbereitet. Obwohl nur zwischen 150 und 225 µg Gesamtprotein für die 2D-PAGE eingesetzt wurden, konnten insgesamt 1008 Proteine aus allen acht Gelen (siehe Tabelle A1 im Anhang) identifiziert werden. Da verschiedene Spots (besonders die differentiellen) mehrfach aus verschiedenen Gelen gestanzt und analysiert wurden, ergab sich eine Anzahl von 397 die 234 unterschiedlichen Proteinspots, Proteine und deren Isoformen repräsentierten. Von diesen 234 Proteinen wurden 76,8% bereits im Zusammenhang mit anderen proteomischen Analysen von Lysosomen oder sekretorischen Vesikeln anderer Zelltypen, wie Melanosomen, Exosomen oder synaptischen Vesikeln identifiziert. Anhand dieser bioinformatischen Analyse von Hu und Kollegen [139] wurde eine iProXpress Datenbank (GUMC, Washington DZ, USA) erstellt, die die Proteinprofile von sieben lysosomen-assoziierten Organellen, als auch vom ER und Mitochondrien beinhaltet. Einträge dieser Datenbank konnten anhand der UniProt Nummer gesucht werden. Des Weiteren dienten diese Nummern auch dazu in der ,UniProt Knowledgebase' und der ,literature hyperlinked database' ,ihop-net' (www.ihop-net.org [140]) die funktionellen Eigenschaften der Proteine zu bestimmen. Ergebnisse dieser bioinformatischen Analyse wurden in Abb. Die 5.3.6 zusammengefasst.



Abb. 5.3.6: Zelluläre Lokalisation (A) und funktionelle Klassifizierung (B) der identifizierten Proteine. Jedes der 234 identifizierten Proteine wurde wie im Text beschrieben nach ihrer Funktion und zellulären Lokalisation in Gruppen eingeteilt. Lysosomale und sekretorische Vesikel werden hierbei durch Lysosomen (LY), Melanosomen (ME), Blutplättchen Granula (PL), Synaptosomen (SY), Exosomen (EX) und lytischen Granula (LY) vertreten. Andere zelluläre Kompartimente sind: Mitochondrien (MT), Golgi (GO), Endosomen (EN), Plasmamembran (PM), Peroxisomen (PE), Zytoplasma (CY), endoplasmatisches Retikulum (ER) und Nukleus (NU).

Neben der großen Anzahl an lysosomalen und sekretorischen Proteinen, wurden auch Proteine (z.B. Granzyme und Perforin) identifiziert, die nur in lytischen Granula von T- und NK-Zellen vorkommen. Die funktionelle Analyse der Proteine (Abb. 5.3.6 B) zeigte eher ein heterogenes Profil. Dennoch zeichneten sich funktionelle Gruppen (Hydrolasen, Chaperone, Immunität) ab, die den bifunktionellen Charakter der lytischen Granula hervorheben. Zusätzliche Informationen zu den Identifikationen, wie NCBI, UniProt Nummer, theoretisches Molekulargewicht und *pl*, die Anzahl der übereinstimmenden und nicht-übereinstimmenden, gemessenen Peptide und die daraus resultierenden MASCOT-Punkte können der Tabelle A1 im Anhang entnommen werden.

5.3.6 Differentielle Proteine in sekretorischen Granula aus verschiedenen NK-Zellpopulationen

Durch die DIGE-Technologie kann die Menge eines spezifischen Proteins aus einem Proteingemisch quantifiziert und mit einer Vergleichsprobe in Relation gesetzt werden. Durch die zuvor beschriebene massenspektrometrische Analyse war es möglich 90 der 101 differentiellen Proteinspots der beiden leukämischen Zelllinien zu identifizieren und in der folgenden Tabelle 2 zusammenzufassen.

			relatives	Vorkomr	nen ^{b)} in
	,	Uni Prot			
Proteinname	Spot Nr. ^{a)}	Nr.	NKL	YTS	NK
14-3-3 Protein epsilon	2	P62258	0	1	0
Actin gamma	11	Q562R8	1	1	0
Active breakpoint cluster region-related prot.	14,15	Q12979	0	1-2	0
Acyl-CoA synthetase 4	16,17	O60488	1-2	0	0
Aldolase C, fructose-bisphosphate	25	P09972	0	1	0
Annexin A2	30,31	P07355	1	1	0
Annexin A5	35	P08758	1	1	0
Cathepsin C	64	P53634	0	1	1
Cathepsin C	63	P53634	0	2	n.d.
Cathepsin D	65,67,68	P07339	0	0	1
Cathepsin D preproprotein	66	P07339	0	1	1
Cathepsin D preproprotein	69	P07339	0	1	2
Cathepsin S	71	P25774	1	0	1
Coronin 7 (Golgi)	87	P57737	1	0	1
Galactose mutarotase	132	Q96C23	0	1	0
Galectin-1	133	P09382	1	0	1
Galectin-3	134	P17931	0	1	0
Granzyme A	154,155	P12544	2	0	1
Granzyme A	156,157	P12544	3	0	3
Granzyme B	159	P10144	0	1	0
Granzyme B	160,162,163	P10144	0	2	0
Granzyme B	161,164	P10144	0	3	1
Granzyme B	165	P10144	0	4	0
Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	185	P51659	1	0	1
Interleukin-16	191-193	Q14005	0	0	1
Leukocyte-derived arginine aminopeptidase	196-198,200,201	Q9HBX2	1	0	1
Leukocyte-derived arginine aminopeptidase	199,202	Q9HBX2	1	0	2

Tabelle	5.3.2:	Differentielle	Proteine	aus	angereicherten	Granula	leukämischer	und
expandie	erter hu	maner NK-Zelle	en.		-			

		_	relatives	Vorkomn	nen ^{b)} in
	2	Uni Prot			
Proteinname	Spot Nr.*/	Nr.	NKL	YTS	NK
LIM and SH3 protein 1	206	Q14847	0	0	1
Lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	209,210	P13796	0	0	1
Lysosomal acid alpha-mannosidase	215	O00754	0	0	1
MHC class I antigen	220,223	P30443	0	1-2	0
MHC class I antigen	222	P30443	1	0	0
MHC class II HLA-DQ alpha	224,225	P01907	2	1	0
MHC class II HLA-DQ beta	231	P01918	2	1	0
MHC class II HLA-DR alpha	226	P01903	3	1	0
MHC class II HLA-DR alpha	227-230	P01903	1	0	0
MHC class II HLA-DR beta-1	232	Q861H6	3	1	0
MHC class II HLA-DR beta-1	233,238	Q861H6	1	0	0
MHC class II HLA-DR beta-1	234,236	Q861H6	3	0	0
MHC class II HLA-DR beta-1	235,242	Q861H6	3	1	0
MHC class II HLA-DR beta-1	237	Q861H6	2	1	0
MHC class II HLA-DR beta-1	239	Q861H6	4	1	0
MHC class II HLA-DR beta-2	240,241	P01911	1	0	0
Moesin	244-257	P26038	2-3	0	3
Non-metastatic cells 1, protein (NM23A)	266	P15531	1	1	0
NME1-NME2 protein	264	unbekannt	0	1	0
Perforin 1 (pore forming protein)	268-272	P14222	0	1	1
Peroxiredoxin 1	273	Q06830	1	1	0
Peroxiredoxin 4	275	Q13162	1	1	0
Phosphoglycerate kinase 1	282-285	P00558	0	1	0
Prolyl 4-hydroxylase, alpha I subunit	297	P13674	1	1	0
Septin 9	339	Q9UHD8	2	0	0
Serpin B1	340, 341,342, 343	P30740	0	1-2	0
Serpin B9	344, 345	P50453	0	3	1

n.d. nicht definiert

^{a)} Spots desselben Proteins mit ähnlichem Expressionsprofil wurden zusammengefasst.

 ^{b)} Das relative Vorkommen von Proteinen ist in Relation zur geringsten Expression (0) in Teilbereiche gegliedert worden, bei denen 1 eine Änderung von bis zu 10 –fach, 2: 10-20 -fach, 3: 20-30 –fach und 4 größer 30 –fach bedeutet.

Interessanterweise waren viele differentielle Proteine mit zytotoxischen Funktionen (Granzym A und B, Perforin) aber auch mit Antigenpräsentation (MHC Moleküle) verknüpft. Diese Proteinspots wurden auch in Abb. 5.3.4 für den Vergleich NKL gegen YTS bzw. in Abb. 5.3.5 für NK *vs.* NKL und NK *vs.* YTS dargestellt. Die Lokalisierung der individuellen Spots wurde zusätzlich in der Abb. A1 des Anhangs dargestellt.



Abb. 5.3.7: (A) Histogramm der DeCyder Analyse aus dem Vergleich von NKL mit YTS (siehe auch Abb. 5.3.4). Die rote Linie gibt dabei die Anzahl der Spots mit einem bestimmten Spotvolumen wieder. Die blaue Linie stellt dabei die Gaußsche Regressionskurve dar. Die Höhe der abgebildeten Punkte gibt das maximale Spotvolumen jedes analysierten Spots wieder. Durch die Festlegung eines Grenzbereiches (vertikale Linien), welcher der 3-fachen Änderung des Volumenverhältnisses entspricht, stellen sich ähnliche Proteinspots hier als grüne Punkte, verminderte als rote und erhöhte Volumenverhältnisse als blaue Punkte dar. Einige der differentiellen Proteine der NK-Zelllinien (mit den entsprechenden Spotnummern versehen) wurden exemplarisch detaillierter dargestellt (B,C). Proteine von YTS mit mehr als 3-fach geringerem Spotvolumen als in NKL sind in **B** und mit erhöhtem in **C** dargestellt. Die korrespondierenden 3D Bilder verdeutlichen diese Unterschiede. Die graue Umrandung zeigt dieselbe Position in beiden Bildern.

Einige Beispiele für differentiell vorhandene Proteine wurden in Abb. 5.3.7 mit den dazugehörigen Spotintensitäten dreidimensional visualisiert. Wie sich bereits bei Western Blot Analysen der Fraktionen andeutete, war Granzym B (#160) in Granula von YTS im Vergleich zu NKL (bis zu 35-fach) erhöht. Es wurde auch eine höhere Expression des 42 kDa Serin Protease Inhibitors Serpin B1 (#340), des Granzym B Inhibitors Serpin B9 (#344), des Poren formenden Proteins Perforin (#269), der Proteasen Cathepsin C (#64) und D (#69), des β -Galaktosidase bindenden Lectins Galectin-3 (#134) und offensichtlich zelltyp-spezifischer HLA-A Isoformen (#220) gemessen. Auch bei den aus NKL stammenden Granula konnte eine spezifische HLA-A Isoform (#222) identifiziert werden. Des Weiteren wurden auch funktionell relevante Proteine, wie MHC Klasse-II DQ (#225, 231) und DR (#228, 236) Isoformen exklusiv in den NKL, aber nicht in NK-Zellen gefunden. Passend dazu wurde auch ein erhöhtes Vorkommen von Cathepsin S (#71) festgestellt, die als Protease die invariante Kette der MHC II Proteine degradiert [141]. Das in Vesikel Transport involvierte Protein Moesin (#244-257), das sich als Spotakkumulation von 68 kDa und pl 6 darstellte, wurde nur in Präparationen von NKL und nicht von YTS gefunden. Interessanterweise wurde in Fraktion 2 von NKL im Gegensatz zu YTS eine größere Menge an Granzym A (#154-157) ermittelt. Der Vergleich in vitro expandierter NK-Zellen mit den leukämischen Zelllinien ergab ebenfalls interessante Resultate (siehe Tabelle 5.3.2). So wurden einige Proteine in den Präparationen der NK-Zellen festgestellt, die weder in NKL noch in YTS auftraten. Hierzu gehörten z. B. Interleukin-16 (#191-193), welches chemotaktisch auf CD4⁺ Zellen wirkt. Des Weiteren wurden auch Cathepsin D (#65-70), die lysosomale saure α -Mannosidase (#215) und L-Plastin (#209, 210) verstärkt in den IL-2 expandierten NK-Zellen gefunden. Interleukin-16 wurde bis dato noch nicht in NK-Zellen gefunden und wurde daher genaueren Untersuchungen unterzogen (siehe Kapitel 5.8).

5.3.7 Verifikation der Unterschiede im Proteom sekretorischer Granula von NK-Zellen

Die vorherigen Ergebnisse deuteten auf Unterschiede im Besatz lytischer Proteine zwischen den NK-Zelllinien hin. Deshalb wurde auch das zytotoxische Molekül FasL, das nicht im Proteom identifiziert wurde, ebenfalls einer genaueren Analyse unterzogen. Hierbei wurde eine verstärkte Expression in YTS und NK-Zellen im Vergleich zu NKL ermittelt und dies sowohl im Western Blot (Abb. 5.3.8 B) als auch in der konfokalen Mikroskopie (Abb. 5.3.8 A).



Abb. 5.3.8: Expressionsunterschiede in leukämischen und aktivierten humanen NK-Zellen. (A) Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Expression des FasL in NKL, YTS und 16 Tage expandierte NK-Zellen. Die Zellen wurden in PFA fixiert, permeabilisiert und gegen FasL mit anti-FasL mAk NOK-1 und anschließend mit Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert. Der Größenmaßstab von 5 µm ist für jede Zelle entsprechend angegeben. (B) Western Blot von je 5 µg Protein von Zelllysaten aus NK, NKL und YTS. Der Blot wurde gefärbt mit anti-FasL (Klon G247-4), anti-IL 16, anti-Galectin-3, Cathepsin D (Klon CTD-19) und mit anti- β -Aktin als Beladungskontrolle.

Die in den DIGE-Versuchen gefundenen Unterschiede wurden mit verschiedenen etablierten Methoden verifiziert. Western Blot Analysen (Abb. 5.3.8 B) bestätigten so ein verstärktes Vorkommen von Galectin-3 in YTS Zellen. Auch der Nachweis von Interleukin-16 auf dem Western Blot zeigte ein selektives Vorkommen in expandierten NK-Zellen. Dagegen ist die Interpretation des Cathepsin D Western Blot Ergebnisses schwieriger, da die theoretisch berechnete 42 kDa Bande bei NKund YTS nicht auf identischer Höhe liefen. Trotzdem ließ sich ein verstärkter Cathepsin D Besatz bei den NK-Zellen feststellen, da sich die 30 kDa Bande hier höchstwahrscheinlich als Doppelbande zeigte.



Abb. 5.3.9: FACS Analyse differentiell exprimierter Proteine. Die in der Legende angezeigten NK-Zellen wurden intrazellulär für HLA-DR und Perforin (A) und Granzym B (B) gefärbt. Der Median der Fluoreszenzintensität ergibt sich auch drei unabhängigen Messungen. Die Oberflächenexpression von HLA-DR (schwarze Linie) auf NKL- (oben) und YTS- (unten) Zellen ist mit der dazugehörigen Isotyp Kontrolle in grau (C) dargestellt.

Als eine weitere Verifikationsmethode diente die intrazelluläre FACS-Färbung. Sie ergab bei HLA-DR, Perforin und Granzym B (Abb. 5.3.9) Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten bei den untersuchten NK-Zellen. Der Median der gemessenen Fluoreszenz von HLA-DR zeigte in drei verschiedenen Messungen bei NKL ein 10-mal hohes Vorkommen wie bei YTS Zellen. Die SO Oberflächenexpression von HLA-DR wies jedoch einen weit aus geringeren Unterschied auf. Granzym B war dagegen in allen drei Zelltypen nachweisbar, jedoch verstärkt in YTS und expandierten NK-Zellen. Ebenfalls war die Perforin Expression in YTS erhöht, was sich mit den DIGE Analysen aus vier unabhängig durchgeführten Experimenten deckte (nicht gezeigt).

Bisher traten alle untersuchten zytotoxischen Proteine in NKL in geringeren Mengen auf als in YTS. Eine Ausnahme stellte bei den DIGE Analysen allerdings Granzym A dar, das in mindestens vier unabhängig durchgeführten Experimenten im Gegensatz zu Granzym B verstärkt in NKL aufzufinden war (Abb. 5.3.10 A). Diese Unterschiede konnten ebenfalls im Western Blot (Abb. 5.3.10 B, C) und in der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 5.3.10 D) nachgewiesen werden.



Abb. 5.3.10: Differentielle Expression von Granzym A und B in leukämischen NK-Zelllinien, NKL und YTS. (A) Ausschnitte aus 2D-Gelen von vier unabhängigen Experimenten zeigen Proteinmuster für Granzym A (#156, grauer Kreis) und Granzym B (#161, weißer Kreis). Der gleiche Ausschnitt ist auch für NK-Zellen dargestellt. Die angegebenen Zahlen geben die Änderungen der Spotvolumina wieder. Verifikationen erfolgten durch Western Blots mit je 5 µg Protein des Zelllysats der angegebenen Zellen mit anti-Granzym B (B) und anti-Granzym A mAk (C). Des Weiteren wurden Granzyme mit direkt markierten anti-Granzym A-FITC und anti-Granzym B-Alexa Fluor 647 mAk fluoreszenzmikroskopisch in PFA fixierten NKL und YTS nachgewiesen (D). Die Detektion erfolgte mit identischen Parametern. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) visualisiert.

5.4 Proteomanalysen sekretorischer Granula aus verschiedenen T-Zellsubpopulationen

Neben Natürlichen Killerzellen als Effektorzellen der angeborenen Immunität treten T-Zellen als zytotoxische Effektorzellen der adaptiven Immunität auf. Die verschiedenen T-Zellsubpopulationen ($\alpha\beta$ und γδ) zeichnen sich dabei möglicherweise durch unterschiedliche Aktivierungs- und Effektoreigenschaften aus. Darüber hinaus ist seit langem bekannt, dass auch CD4⁺ T-Lymphozyten im Rahmen einer in vitro Expansion zytotoxisches Potenzial entwickeln [142,143]. Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war zudem bekannt, dass auch in CD4⁺ Zellen FasL als ein Markerprotein von sekretorischen Lysosomen angesehen werden kann. Dementsprechend sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Proteom angereicherter Vesikel (Fraktion 2) aus verschiedenen T-Zellsubpopulationen vergleichend analysiert werden.

5.4.1 Phänotypische Charakterisierung der Subpopulationen

Zur Gewinnung von $\alpha\beta$ T-Zellsubpopulationen wurden PBMZ verschiedener Spender mittels MACS in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sortiert und anschließend allogen durch einen "Feeder-Cocktail" stimuliert. Ähnlich wurde bei der Etablierung von $\gamma\delta$ Zelllinien vorgegangen. Nach 14-tägiger Expansion wurden die Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker im FACS charakterisiert. Hierbei ergab sich das erwartete Färbemuster für jede Subpopulation (Abb. 5.4.1). Mindestens 95% der Zellen waren ebenfalls positiv für die T-Zellmarker CD2 und CD3 (nicht gezeigt) und somit für nachfolgende subzelluläre Fraktionierungen geeignet.



Abb. 5.4.1: FACS Analyse der T-Zellsubpopulationen. Isolierte und expandierte Lymphozyten wurden 14 Tage nach Stimulation mit anti-TZR $\alpha\beta$ -FITC, anti-TZR $\gamma\delta$ -PE, anti-CD8-FITC, anti-CD4-PE, anti-v δ 1-FITC bzw. anti-v δ 2-FITC gefärbt und die spezifische Fluoreszenz im FACS gemessen. Die Quadranten wurden anhand der Isotypkontrollen festgelegt (nicht abgebildet). Die dargestellten Streudiagramme repräsentieren beispielhaft die phänotypischen Analysen von Subpopulationen aus verschiedenen Spendern.

5.4.2 Charakterisierung der Dichtegradientenfraktionen aus den verschiedenen T-Zellsubpopulationen

Die Anreicherung sekretorischer Granula aus den verschiedenen Subpopulationen erfolgte analog zu denen der NK-Zellen. Für die differentielle Zentrifugation wurden jeweils mindestens 600 x 10^6 Zellen verwendet, die zuvor mit PHA aktiviert und in Medium mit rIL-2 für 16 Tage expandiert worden waren. Es wurde während der Zellkultur darauf geachtet, dass alle Zellen zu identischen Zeitpunkten und mit identischem Medium versorgt wurden, um exogene Einflüsse auf den Proteinbesatz der Granula auszuschließen. Die durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Fraktionen wurden zunächst mittels Western Blot charakterisiert. Hierfür wurden je 4 µg Protein der einzelnen Fraktionen auf ein Gradientengel aufgetragen und anschließend auf eine NC-Membran transferiert. Bei der folgenden Färbung wurden im Wesentlichen Antikörper gegen Organellen-spezifische Markerproteine eingesetzt (Abb 5.4.2).



Abb. 5.4.2: Western Blot Analyse der Iodixanol[®] Fraktionen aus T-Zellsubpopulationen. CD4⁺ und CD8⁺ $\alpha\beta$ Zellen (A) bzw. v $\delta1$ und v $\delta2$ (B) $\gamma\delta$ T-Zellen wurden nach 16-tägiger Expansion subzellulär fraktioniert, je 4 µg Protein jeder Fraktion auf Gradientengelen aufgetrennt und anschließend auf NC-Membran transferiert. Die Immunodetektion erfolgte mit monoklonalen Antikörpern gegen CD63, FasL, LAMP-1, Perforin, Granzym B und CoxIV. Die Western Blots der CD4⁺, CD8⁺ (A) und der v $\delta1^+$, v $\delta2^+$ (B) T-Zellen sind repräsentativ für je vier bzw. je zwei unabhängig durchgeführte Experimente dargestellt.

In allen Fällen waren die lysosomalen Membranproteine CD63 und LAMP-1 sowie FasL als spezifische Marker für sekretorische Lysosomen von T- und NK-Zellen in Fraktion 2 deutlich angereichert (Abb. 5.4.2) Interessanterweise ergab sich für Perforin neben einer Anreicherung in Fraktion 2 bei allen Zellen und insbesondere bei CD8⁺ Zellen ein erhöhtes Vorkommen in den Fraktionen 4 und 6. Überraschend war die Verteilung von Granzym B. Hier war in allen Linien keine Anreicherung in der zweiten Fraktion festzustellen, sondern nur in Fraktion 6. In allen durchgeführten Versuchen war diese zunächst widersprüchliche Verteilung der zytotoxischen Effektorproteine ebenso reproduzierbar wie die Anreicherung der Mitochondrien in Fraktion 5. Aufgrund der Literaturlage und der eigenen Vorbefunde aus NK- Zellpopulationen wurden in der vorliegenden Arbeit sekretorische Granula einheitlich über ihre membranständigen Marker FasL, CD63 und LAMP-1 klassifiziert.

5.4.3 Das Proteom FasL-tragender Granula aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Zur Darstellung unterschiedlicher Proteomzusammensetzungen von sekretorischen Lysosomen aus T-Zellen war es zunächst erforderlich, eine möglichst komplette Proteinkarte der Granula zu erstellen. Dies war möglich, da sich die Sensitivität der Proteinidentifizierungen im Laufe der Doktorarbeit optimieren ließ. Es wurden so aus 9 Gelen, die zu gleichen Mengen mit Granula-Lysaten von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen verschiedener Spender beladen waren, insgesamt über 1600 Spots ausgestanzt, tryptisch verdaut und massenspektroskopisch analysiert. Davon wurden 1344 identifiziert. Da viele Identifikationen doppelt oder in Einzelfällen bis zu 6-fach vorlagen, ergab sich schließlich eine Anzahl von 751 individuellen Annotationen, die in der Proteinkarte in Abb. 5.4.3 und im Anhang in Tab. A2 zusammengefasst dargestellt sind. Mehrfachidentifikationen an derselben Position in unterschiedlichen Gelen wiesen erneut auf die Reproduzierbarkeit der Analysen hin. Einige Proteine wurden als Isoformen oder posttranslationale modifizierte Varianten mehrfach in unterschiedlichen Spots identifiziert, wodurch sich eine tatsächliche Anzahl von 402 individuellen Proteinen ergab. Die anschließende Zuordnung ihrer Lokalisation und Funktion wurde analog zu den NK-Zellauswertungen durchgeführt und ist in Abb. 5.4.4 dargestellt. Die bioinformatischen Analysen ergaben, dass 68,2% von 402 Proteinen bereits in anderen lysosomalen oder sekretorischen Vesikeln identifiziert wurden (Abb. 5.4.4 A). Im Vergleich zu den NK-Zellen waren dies 8,6% weniger vesikuläre Proteine. Gleichzeitig erhöhte sich der Anteil zytoplasmatischer Proteine um 5,7% auf 10,9%. Dieser Anstieg könnte unter anderem auf viele gering exprimierte Proteine zurückzuführen sein, die in NK-Zelllysosomen nicht identifiziert wurden. Insgesamt wurden in T-Zellen 274 Lysosomen- oder Granula-assoziierte Proteine benannt, im Vergleich zu 179 im Falle der NK-Zellen.



Abb. 5.4.3: Annotierte Proteomkarte FasL-angereicherter Vesikel aus $\alpha\beta$ T-Zellen. Es wurden je 125 µg Proteinlysat der Fraktion 2 aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (von Spender 2, Tab. 5.4.1) auf einem 24 cm Streifen mit dem nicht linearen pH Bereich 3-11 in der ersten Dimension und auf 12,5% Tris-Glycin Gelen in der zweiten Dimension aufgetrennt. Die Proteinfärbung erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Flamingo Pink. Die Liste der Identifikationen mit den entsprechenden Spotnummern (Tab. A2) und vergrößerte Gelausschnitte (Abb. A2) sind im Anhang zusammengestellt. Proteinspots, die in diesem Gel nicht identifiziert wurden, jedoch in mehreren anderen Gelen, wurden implementiert und sind mit Nummern größer als 865 annotiert.

Die funktionelle Annotierung der Proteine erfolgte ebenfalls anhand der ,UniProt' und ,ihop' Datenbanken (Abb. 5.4.4 B). Hierbei wurden neben vielen Proteinen, die mit dem Zytoskelett (9,7%) oder allgemeinen Transportfunktionen (10,4%) in Verbindung stehen auch ein großer Anteil (13,4%) degradativer Proteine gefunden.



Abb. 5.4.4: Einteilung der identifizierten Proteine nach Lokalisation (A) und Funktion (B). Die 402 identifizierten Proteine wurden nach ihrer Funktion und zellulären Lokalisation in Gruppen eingeteilt. Lysosomale und sekretorische Vesikel werden hierbei durch Melanosomen (ME), Lysosomen (LY), Blutplättchen Granula (PL), Synaptosomen (SY), Exosomen (EX) und lytischen Granula (LG) repräsentiert. Andere zelluläre Kompartimente sind: Mitochondrien (MT), Golgi (GO), Endosomen (EN), Peroxisomen (PE), Zytoplasma (CY), endoplasmatisches Retikulum (ER) und Nukleus (NU).

5.4.4 Der Proteinbesatz sekretorischer Granula aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Mittels differentieller Gelelektrophorese wurden im Folgenden Proteinmuster von angereicherten sekretorischen Lysosomen aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen direkt miteinander verglichen. Hierbei wurden die Granula von identisch expandierten Subpopulationen von vier Spendern jeweils mit Cy5 bzw. Cy3 markiert und anschließend auf einem 2D-Gel aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein Gemisch aus allen 8 Proben mit Cy2 markiert, um spenderspezifische Unterschiede in der späteren Analyse auszuschließen. Dadurch ergab sich das in Tab. 5.4.1 dargestellte Experimentdesign. In der Tabelle ist auch die Anzahl der analysierten Spots aufgeführt, die den verwendeten Kriterien entsprachen und in die Analyse eingingen (siehe NK-Zellen). Die angegebene 2-fache Standardabweichung (2x SD) ist das Maß für die Ähnlichkeit der Spotvolumina in den beiden Fluoreszenzkanälen Cy5 und Cy3. Eine Standardabweichung von 1 würde dabei einem 100%-ig identischem Gel entsprechen. Die differentiellen "in-Gel" Analyen (DIA) ergaben bei einem Grenzbereich, der der 2-fachen Standardabweichung entsprach, eine Anzahl von durchschnittlich insgesamt 122 differentiellen Spots. Diese verteilten sich zu gleichen Teilen auf Spots, die entweder vermindert oder verstärkt in CD8⁺ T-Zellen vorlagen.

	Су	Dye Markier	ung		_	vermir CI	ndert in D8⁺	erhö CI	oht in D8⁺
Spender Nr.	Cy5	СуЗ	Cy2	Spots	2x SD	#	%	#	%
1	CD4 ⁺ 1103	CD8 ⁺ 1103	mix	1913	1.50	65	3.4	59	3.1
2	CD4 ⁺ 2003	CD8 ⁺ 2003	mix	1937	1.71	86	4.4	46	2.4
3	CD4 ⁺ 3004	CD8 ⁺ 3004	mix	2146	1.53	50	2.3	56	2.6
4	CD4 ⁺ 1704	CD8 ⁺ 1704	mix	1775	1.62	48	2.7	80	4.5
			Durchschnitt:	1943	1.59	62	3.2	60	3.2

Tab. 5.4.1: Experimentdesign für den Vergleich von SL aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Die annotierte Proteinkarte von Spender 2 ist in Abb. 5.4.3 dargestellt.

In einem nächsten Schritt wurden die vier 2D-Gele mit den T-Zellpaaren der vier Spender über den Cy2 markierten internen Standard (Gemisch aus allen Proben) virtuell überlagert. Hierdurch ergab sich eine Anzahl von 1463 Spots, die in allen vier Gelen reproduzierbar ermittelt werden konnten. Anschließend wurden in der so genannten "biologischen Variationsanalyse" (BVA) spenderspezifische Unterschiede durch Wahrscheinlichkeitsberechnungen ausgeschlossen. Durch die Verwendung der Varianzanalyse (t-Test) konnten so die Spots identifiziert werden, die bei allen vier Spendern mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% ein ähnliches differentielles Profil zeigten. Ein weiteres Auswahlkriterium war die Änderung des durchschnittlichen Volumenverhältnisses. Hierdurch ergaben sich letztendlich 13 von 1463 Spots, die sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% in ihrem Volumenverhältnis durchschnittlich um mindestens das 1,5-fache unterschieden.

Tab. 5.4.2: Differentielle Proteine sekretorischer Granula aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Spenderunabhängige Unterschiede sind im Falle der Identifizierung mit der korrespondierenden Spotnummer der T-Zell Proteomkarte (Abb. 5.4.3 und A2) gezeigt. Als Auswahlkriterien wurden p<0,05 und ein durchschnittliches Volumenverhältnis >1,5 bzw. <-1,5 angelegt.

Nr.	Spot ID	t-Test	CD8 ⁺ /CD4 ⁺ Volumen- verhältnis	Protein Name
1	305	0.00022	2.07	syntaxin binding protein 1 (Munc18-1)
2	ni	0.03600	1.76	nicht identifiziert
3	706	0.03500	1.67	galectin-3
4	553	0.02800	1.60	adenosine desaminase
5	1081	0.03000	1.59	endophilin-B1
6	1067	0.04000	1.53	vacuolar sorting protein 33A
7	677	0.00200	1.55	glucosamine-6-phosphate deaminase 1
8	596	0.00150	-1.55	aldose 1-epimerase
9	774	0.00550	-1.56	peroxiredoxin 1
10	ni	0.04200	-1.71	nicht identifiziert
11	738	0.01900	-1.79	cathepsin H
12	ni	0.04000	-1.98	nicht identifiziert
13	691	0.00210	-2.20	cathepsin B

Aus der zuvor erstellten Proteomkarte der Fraktion 2 von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, war es möglich, 10 dieser signifikant differentiellen Spots zu benennen (Tab. 5.4.2). Ein Beispiel für ein verstärkt exprimiertes Protein in sekretorischen Lysosomen von CD8⁺ T-Zellen war das "Syntaxin binding Protein 1" (Abb. 5.4.5), dass auch als Munc18-1 bekannt ist und mit Syntaxin 1 und anderen SNARE Proteinen interagiert, um so bei Andock-, Fusions- und Exozytoseprozessen von Vesikeln mitzuwirken [144]. Neben Munc18-1 (STXBP1) wurden auch Munc18-2 (STXBP2) und Munc18-3 (STXBP3) identifiziert, jedoch war bei diesen Proteinen nur eine Erhöhung des durchschnittlichen Volumenverhältnisses von 1,31 bei Munc18-2 (# 302) bzw. ca. 1,20 bei allen Munc18-3 Isoformen (# 264, 281, 294, 291) festzustellen.



Abb. 5.4.5: Differentielle Expression vom 'Syntaxin binding Proteins 1' (Munc18-1) (A) und ,Cathepsin B' (B). Die biologische Variationsanalyse des Spots 305 (Munc18-1) ergab eine im Mittel 2.07-fache Erhöhung in CD8⁺ Zellen (A). Dagegen ergab die Analyse des Spots 691 (Cathepsin B) eine durchschnittlich 2.20-fache Verminderung in CD8⁺ Zellen (B). Der Gelausschnitt der aufgetrennten Fraktion 2 ist für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus vier verschiedenen Spendern gezeigt (oben). Die einzelnen Spotvolumenverhältnisse und das Mittel dieses Verhältnisses (durchgezogene Linie) wurden in Diagrammen aufgetragen (unten). Zusätzlich ist für Spender 1 auch das umrandete Protein als 3D-Bild für CD4⁺ (links) und CD8⁺ (rechts) T-Zellen dargestellt.

Auf der anderen Seite wurden auch 6 Proteine ermittelt, die in Granula von CD4⁺ T-Zellen verstärkt vorkamen. Hier wäre als ein Beispiel Cathepsin B (#691) zu nennen. Diese lysosomale Cysteinprotease war in allen vier Spendern durchschnittlich 2,20-fach erhöht (Abb. 5.4.5).

5.4.5 Der Proteinbesatz sekretorischer Granula aus v δ 1⁺ und v δ 2⁺ T-Zellen

Im Gegensatz zu den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, standen hier aufgrund der schwierigeren *in vitro* Kultivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen nur zwei Zellpaare in ausreichender Zellzahl für DIGE Versuche zur Verfügung. Die Lysate der Granula von v δ 1⁺ und v δ 2⁺ T-Zellen der beiden Spender wurden wie in Tabelle 5.4.3 dargestellt mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und zwei-dimensional aufgetrennt. Hierbei diente das Gemisch aller Proben wiederum als interner Standard. In beiden Gelen wurden durchschnittlich 1655 Spots analysiert, die eine 2-fache Standardabweichung der mittleren Volumenverhältnisse von 2,32 aufwiesen.

CyDye Markierung						vermir vð	ndert in 62 ⁺	erhö vδ	ht in 2 ⁺
Spender Nr.	Cy5	СуЗ	Cy2	Spots	2x SD	#	%	#	%
1	vδ1	vδ2	mix	1703	2.33	45	2.6	101	5.9
2	νδ2	νδ1	mix	1607	2.31	68	4.2	75	4.7
			Durchschnitt	1655	2.32	57	3.4	88	5.3

Tab. 5.4.3: Experiment design für den Vergleich von SL aus v $\delta 1^+$ und v $\delta 2^+$ T-Zellen.

Aufgrund der geringen Anzahl an biologischen Replika fehlte im Prinzip die ausreichende statistische Grundlage für die anschließende biologische Varianzanalyse (BVA). Dennoch wurde sie analog zu den $\alpha\beta$ T-Zellen durchgeführt. Der Grenzbereich wurde hierbei auf 2,5 gesetzt, da innerhalb einer Gruppe bereits eine durchschnittliche Varianz im Volumenverhältnis von 2,32 bestand. Zwischen den Gruppen wurde wiederum eine Irrtumswahrscheinlichkeit von maximal 5% (p<0,05) angenommen.

Tab. 5.4.4: Differentielle Proteine sekretorischer Granula aus võ1* und võ2* T-Zellen.
"Spenderunabhängige" Unterschiede sind mit der korrespondierenden Spotnummer der T-Zell
Proteomkarte gezeigt, sofern sie identifiziert wurden. Als Auswahlkriterien wurden p<0,05 und ein
Volumenverhältnis >2,5 bzw. <-2,5 verwendet.</th>

Nr.	Spot ID	t-Test	vδ2⁺/vδ1⁺ Volumen- verhältnis	Protein Name
1	717	0.00041	6.43	granzyme A
2	692	0.01700	5.85	proteasome activator subunit 2
3	707	0.00540	4.99	granzyme A
4	717	0.00140	4.81	granzyme A
5	ni	0.03000	4.36	nicht identifiziert
6	710	0.01800	3.98	proteasome activator reg (alpha)
7	691	0.04700	3.95	cathepsin B
8	ni	0.03400	3.72	nicht identifiziert
9	738	0.00600	3.51	cathepsin H
10	81	0.04900	3.20	dipeptidyl peptidase 4
11	130	0.02100	3.20	MTHFD1
12	83	0.02800	3.08	dipeptidyl peptidase 4
13	605	0.00050	2.93	calcium-binding protein 39 (MO25)
14	69*	0.02000	2.92	uncharakterisiertes Protein DKFZp547A1913
15	77	0.03800	2.85	dipeptidyl peptidase 4
16	ni	0.03100	2.53	nicht identifiziert
17	ni	0.01700	2.51	nicht identifiziert

Nr.	Spot ID	t-Test	vδ2⁺/vδ1⁺ Volumen- verhältnis	Protein Name
18	250	0.01500	-2.53	moesin
19	694	0.00260	-2.53	nuclear chlorid channel
20	829	0.00300	-2.54	cyclophilin A
21	163	0.02800	-2.55	moesin
22	237	0.02300	-2.60	moesin
23	246	0.00530	-2.66	moesin
24	ni	0.01100	-2.81	nicht identifiziert
25	389*	0.02900	-2.85	annexin A11
26	895*	0.00210	-2.92	MHC class I
27	ni	0.03900	-2.95	nicht identifiziert
28	ni	0.04700	-2.96	nicht identifiziert
29	342	0.01200	-3.22	EH-domain containing 1
30	684	0.02900	-3.31	nuclear chlorid channel
31	572	0.03200	-4.27	gelsolin like capping protein (CapG)

* keine Mastergelnummern, da separate Identifikationen aus "γδ Gelen" (siehe Tab. A4, Gel 36702)

Von insgesamt 985 Spots, die in beiden Gelen anhand des internen Standards übereinander gelegt werden konnten, wurden 31 Spots mit den oben genannten Kriterien als differentiell angesehen. Hiervon wurden, unter anderem durch die Identifikation von Proteinen aus $\gamma\delta$ 2D-Gelen, 24 Spots identifiziert und wie in der Tabelle 5.4.4 dargestellt, benannt. Als ein Beispiel für eine verstärkte Expression in $v\delta 2^+$ Zellen ist in Abb. 5.4.6 das zytotoxische Protein Granzym A dargestellt. Auf der anderen Seite ist als Beispiel das "Gelsolin like capping Protein" (Cap G) in $v\delta 1^+$ T-Zellen um das 4,27-fache Spotvolumen erhöht. Dieses Kalzium-sensitive Protein kann die Enden der Aktinfilamente blockieren und so potentielle Interaktionen zellulärer Strukturen mit Aktin regulieren [145]. Neben einer beschriebenen zytosolischen und nukleären Lokalisation wurde dieses Protein auch in gereinigten Melanosomen identifiziert [146].



Abb. 5.4.6: 2D-DIGE Analyse von Granzym A (A) und "Gelsolin like capping Proteins (CapG)" (B). (A) Die biologische Variationsanalyse des Spots 717 der Fraktion 2 ergab durchschnittlich eine 6,63-fache Erhöhung in v $\delta 2^+$ T-Zellen. (B) Für CapG (Spot 572) ergab diese Analyse eine Verminderung um das 4,27-fache. Der Gelausschnitt ist jeweils für v $\delta 1^+$ und v $\delta 2^+$ Zellen aus zwei verschiedenen Spendern gezeigt (oben). Die einzelnen Spotvolumenverhältnisse und deren arithmetische Mittel (durchgezogene Linie) wurden in einem Diagramm aufgetragen (unten). Zusätzlich ist für Spender 1 auch das umrandete Protein als 3D-Bild für v $\delta 1^+$ (links) und v $\delta 2^+$ (rechts) T-Zellen dargestellt.

5.4.6 Der Proteinbesatz sekretorischer Granula aus $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen

abschließenden DIGE Experimenten auch die Granula In wurden der $\gamma\delta$ Zellpopulation v δ 1 mit den Granula der CD4⁺ und CD8⁺ $\alpha\beta$ T-Zellsubpopulationen verglichen. Die in Tabelle 5.4.5 dargestellte Übersicht verdeutlicht den experimentellen Aufbau der DIGE Analyse.

	CyDye Markierung			_		vermir v	ndert in δ1	erhö vä	ht in 61
Exp. Nr.	Cy5	Cy3	Cy2	Spots	2x SD	#	%	#	%
1	νδ1	CD8⁺	mix	1637	3.00	60	3.7	129	7.9
2	$CD4^+$	νδ1	mix	1768	2.37	41	2.3	141	8.0
			Durchschnitt:	1703	2.68	51	3.0	135	8.0

In beiden Experimenten war der Anteil der verstärkt exprimierten Proteine in der $\gamma\delta$ Subpopulation deutlich höher. Da die bereits gezeigten Unterschiede von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellgranula gegenüber den hier analysierten verschwindend gering waren, wurde auch eine Varianzanalyse der beiden Gruppen ($\alpha\beta$ und $\gamma\delta$) durchgeführt (Tab. 5.4.6).

Tab. 5.4.6: Differentielle Proteine sekretorischer Granula aus $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen. Experimentell unabhängige Unterschiede sind mit der korrespondierenden Spotnummer der T-Zell Proteomkarte aufgeführt, sofern sie identifiziert wurden. Als Auswahlkriterien wurden p<0,05 und ein Volumenverhältnis >3,5 bzw. <-3,5 angelegt.

Nr.	Spot ID	t-Test	γδ/αβ Volumen- verhältnis	Protein Name
1	ni	0.01300	6.62	granzyme B*
2	720	0.04600	6.32	granzyme A
3	77 ³	0.01100	4.59	hypoxia up-regulated 1
4	76 ³	0.00780	4.59	hypoxia up-regulated 1
5	717	0.04800	4.55	granzyme A
6	837	0.00220	4.53	Interleukin-25
7	853 ²	0.00040	4.51	protein ARMET
8	749	0.01500	4.48	cathepsin S
9	226	0.00940	4.44	heat shock 70kDa protein 5
10	223	0.01500	4.42	heat shock 70kDa protein 5
11	561 ³	0.01900	4.31	protein disulfide isomerase-related protein 5
12	633	0.02100	4.28	heat shock 70kDa protein 5
13	775	0.01100	4.25	proteasome subunit beta type 2
14	194	0.01400	4.20	hexose-6-phosphate dehydrogenase
15	287	0.02200	4.05	calreticulin precursor variant
16	458	0.04300	3.94	protein disulfide isomerase-related protein 5
17	431	0.00087	3.82	beta-hexosaminidase subunit beta
18	312	0.03700	3.91	ERO1-like
19	136	0.03500	3.90	ARTS-1
20	118	0.01200	3.89	tumor rejection antigen (gp96)
21	684²	0.03600	3.88	MHC class II
22	ni	0.02100	3.79	nicht identifiziert
23	385	0.03600	3.78	protein disulfide isomerase-associated 3
24	379	0.03000	3.74	protein disulfide isomerase family A member 3
25	226	0.01900	3.72	heat shock 70kDa protein 5
26	133	0.03000	3.52	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1
27	689 ²	0.00088	3.51	MHC class II
28	313	0.01300	-3.56	dihydropyrimidinase-like 2
29	406	0.00680	-3.76	CAP, adenylate cyclase associated protein 1
30	1020	0.02400	-4.23	DK1 lymphocyte antigen
31	820	0.00460	-4.72	stathmin1/oncoprotein 18

* Annotierung anhand der Proteome der Fraktion 6 und der NK-Zellen

² Identifikation aus $\gamma\delta$ 2D Gel Nr. 36696, siehe Tab. A4 im Anhang

 3 Identifikation aus $\gamma\delta$ 2D Gel Nr. 36703, siehe Tab. A4 im Anhang

Von 1170 übereinander gelagerten Spots waren 31 mit einer durchschnittlichen Änderung im Volumenverhältnis von mehr als 3,5-fach differentiell. Davon wurden 29 Spots identifiziert. Ähnlich wie bei den DIGE Analysen der v δ 1, v δ 2 Proben, wurden hier 6 Proteine nur in " $\gamma\delta$ 2D-Gelen" identifiziert, was auf eine niedrige Abundanz (unter der Nachweisgrenze des MALDI) der hier aufgelisteten Proteine in $\alpha\beta$ T-Zellen hinweist.

Aufgrund der niedrigen Proteinmenge von Granzym B in der Fraktion 2 von $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen konnte nur eine Annotierung anhand der exklusiven Spotposition durch Identifikationen in den NK-Zell-Gelen und in der Fraktion 6 (siehe Kapitel 5.5.5) vorgenommen werden. Wie Granzym B wies auch Granzym A eine über 6-fach höhere Abundanz in v $\delta1^+$ T-Zellen auf (Abb. 5.4.7). Im Gegensatz dazu war die Expression von Stathmin 1 in Granula aus v $\delta1^+$ T-Zellen deutlich erniedrigt. Zytosolisches Stathmin 1 reguliert das Mikrotubuli-Filamentsystem, indem es die Mikrotubuli destabilisiert [147].



Abb. 5.4.7: DIGE Analyse von Granzym A (A) und Stathmin1/Oncoprotein 18 (B). Die BVA Analyse des Spots 720 ergab eine durchschnittliche Erhöhung von 6,32 in $\gamma\delta$ T-Zellen (A). Demgegenüber war der Spot 820 um das 4,72-fache im Spotvolumen der $\gamma\delta$ T-Zellen vermindert (B). Der Gelausschnitt ist für $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ Zellen von zwei unabhängigen Experimenten gezeigt (oben). Die einzelnen Spotvolumenverhältnisse und deren arithmetische Mittel (durchgezogene Linie) wurden in einem Diagramm aufgetragen (unten). Zusätzlich ist das in Experiment 1 umrandete Protein als 3D-Bild für $\alpha\beta$ (links) und $\gamma\delta$ (rechts) T-Zellen dargestellt.

5.5 Heterogenität sekretorischer Granula in T-Zellen

5.5.1 Zytotoxische Proteine werden in unterschiedlich dichten Granula gespeichert

Die Charakterisierung der Fraktionen aus den initialen Experimenten mit PHA-Blasten deutete auf eine unterschiedliche Verteilung der zytotoxischen Proteine in verschieden dichten Granula hin. Ebenfalls zeigten die in Abb. 5.4.2 dargestellten Western Blot Analysen der einzelnen Fraktionen bei den für 16 Tage expandierten T-Zellsubpopulationen auch eine unerwartete Verteilung von Granzym B gegenüber FasL. Gleichzeitig wurde in CD8⁺ T-Zellen eine breitere Verteilung von Perforin in verschiedenen Fraktionen festgestellt. Diese Heterogenität wurde nachfolgend mit einem zusätzlichen lytischen Markerprotein (Granulysin) in verschiedenen Subpopulationen verifiziert (Abb. 5.5.1). Dabei wurde eine Anreicherung des reifen Granulysins (9 kDa Form) in der Fraktion 6 und eine Dominanz der unprozessierten Form (15 kDa) in der Fraktion 2 sowohl für $\alpha\beta$, als auch $\gamma\delta$ T-Zellen festgestellt. Dieser Befund deutete darauf hin, dass Lymphozyten nicht nur eine homogene Population sekretorischer Granula beinhalten.



Abb. 5.5.1: Verteilung zytotoxischer Proteine in unterschiedlichen Fraktionen nach Dichtegradientenzentrifugation. $CD4^+$, $CD8^+$ (A) und $v\delta1^+$, $v\delta2^+$ (B) T-Zellsubpopulationen wurden nach 16-tägiger Expansion subzellulär fraktioniert und je 4 µg Protein jeder Fraktion auf Gradientengelen separiert. Die immunbiochemische Detektion erfolgte mit spezifischen mAk gegen FasL und Granzym B (nur in A). Die Detektion von Granulysin erfolgte mit polyklonalem Serum und anschließender Färbung durch HRP-konjugierten anti-Ziege Antikörper. GL=Gesamtlysat, AO=angereicherte Organellen

Zusammenfassend ließ sich so aus den Western Blot Analysen von PHA-Blasten und separierten T-Zellsubpopulationen ableiten, dass die FasL-reichen Vesikel selektiv in der Fraktion 2 des Gradienten angereichert waren. Dort wurde auch eine Anreicherung von CD63, LAMP-1, der 15 kDa Form von Granulysin und in einigen Subpopulationen von Perforin ermittelt. Im Gegensatz dazu waren Granzym B, die 9 kDa Form von Granulysin und bei CD8⁺ T-Zellen auch Perforin in der dichteren Fraktion 6 angereichert. Da sekretorische Lysosomen multivesikuläre Strukturen darstellen, sollte im Folgenden elektronenmikroskopisch überprüft werden, ob in beiden Fraktionen intakte Vesikel nachweisbar waren, die sich möglicherweise in ihrer Dichte unterscheiden.

5.5.2 Elektronenmikroskopische Analysen angereicherter Granula

Die über Dichtegradientenzentrifugation angereicherten Granula von 13 Tage alten PHA-Blasten wurden sedimentiert, mit 2,5%-igem Glutaraldehyd fixiert und elektronenmikroskopisch am Institut für Anatomie (CAU Kiel) analysiert. Repräsentative Aufnahmen der FasL / CD63-reichen Fraktion 2 sind in Abb. 5.5.2 A und B, die der Fraktion 6 in Abb. 5.5.2 C und D dargestellt. Die Strukturen in beiden Fraktionen unterschieden sich deutlich in Größe, Struktur und Elektronendichte. Während die Organellen der Fraktion 2 mindestens 300-700 nm im Durchmesser aufwiesen, zeigten die Organellen aus der Fraktion 6 eine Größe von 150-300 nm. In der Vergrößerung (Abb. 5.5.2 B, D) ist bei beiden Organellen eine deutliche Membranabgrenzung erkennbar. Des Weiteren war in den Granzym B beladenen Vesikeln der Fraktion 6 ein polarisierter Bereich zu beobachten, der sich im Vergleich zum Rest der Vesikel durch eine geringe Elektronendichte auszeichnete. Dies konnte bei fast allen analysierten Vesikeln der Fraktion 6 beobachtet werden (Abb. 5.5.2 E).



Abb. 5.5.2.: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der isolierten Fraktion 2 (A,B) und 6 (C,D) aus 13 Tage alten PHA-Blasten. Die Organellen wurden in 2,5%-iger Glutaraldehydlösung in Homogenisationspuffer fixiert, in Araldit eingebettet und mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt. B und D zeigen vergrößerte Darstellungen repräsentativer Organellen der individuellen Fraktionen. Ein zusätzliches Übersichtsbild zu Fraktion 6 ist in Abb. E gezeigt. Der Maßstab entspricht jeweils 250 nm.

5.5.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit Granulaspezifischen Markern

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob sich die Unterschiede im Proteinbesatz der lytischen Granula auch fluoreszenzmikroskopisch darstellen lassen. Hierfür wurden expandierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit Antikörpern gegen verschiedene Markerproteine gefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass in beiden Subpopulationen Granzym A, Granzym B und Granulysin im selben Kompartiment lokalisieren (Abb. 5.5.3 A). Das polyklonale anti-Granulysin Antiserum erkennt sowohl die reife, als auch die unreife Form des Granulysins. Allerdings ist bei den Aufnahmen davon auszugehen, dass vorwiegend die reife Form erkannt wird, da diese auch im Western Blot der Gradientenfraktionen das stärkste Signal ergab.



Abb. 5.5.3: Immunfluoreszenz Analyse expandierter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Alle Zellen wurden zunächst fixiert und permeabilisiert. **(A)** Die beiden Subpopulationen wurden sequentiell mit anti-Granulysin und anti-Ziege Alexa Fluor 555 und mit FITC markiertem anti-Granzym A mAK und Alexa Fluor 647 markiertem anti-Granzym B mAk gefärbt. Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Zellen intensiv gewaschen. **(B)** Die Zellen wurden zunächst mit anti-FasL mAk und anti-Maus Alexa Fluor 488 gefärbt. Nach mehreren Waschschritten erfolgte dann die Färbung mit Alexa Fluor 647 markiertem anti-Granzym B mAk. Die Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert.

Anhand der Western Blot Ergebnisse wäre keine Kolokalisation von Granzym B und FasL zu erwarten gewesen. Jedoch zeigten die LSM Aufnahmen (Abb. 5.5.3 B) eine partielle Kolokalisation. Die Ursache hierfür könnte in der fehlenden Auflösung dieser feinen Strukturen liegen.

5.5.4 Unterschiede im Proteom FasL- und Granzym B-reicher Granula

FasL- und Granzym B-reiche Organellen unterscheiden sich in Struktur, Größe, Dichte und Proteinbesatz einiger zytotoxischer Proteine. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich diese Unterschiede auch im Gesamtproteinbesatz darstellen lassen. Hierfür wurden PBMZ mit PHA stimuliert und über 14 Tage in IL-2-haltigem Medium expandiert. Nach Separation der beiden zu untersuchenden Organellenfraktionen mittels Dichtegradientenzentrifugation, wurden diese sedimentiert und in 2D-Lysepuffer aufgenommen. Anschließend erfolgten die Markierung der Lysate mit Cy5 bzw. Cy3 und eine Separation mittels 2D-PAGE. Das Scannen der einzelnen Fluoreszenzkanäle ergab das in Abb. 5.5.4 A dargestellte Bild. Im dazugehörigen Diagramm (Abb. 5.5.5) ist deutlich zu erkennen, dass sich die Proteinzusammensetzung der beiden Fraktionen signifikant unterscheidet. Eine genauere softwarebasierte (DIA) Analyse ergab, dass von 2029 ermittelten Spots bei einem festgelegten Grenzbereich, des 6-fachen Volumenverhältnisses, 56 Spots verringert und 91 Spots erhöht in der Fraktion 6 vorlagen. Die 2-fache Standardabweichung aller Volumenverhältnisse in den beiden Proben war 4,57 und spiegelte damit auch die enormen Unterschiede im Proteinbesatz der Fraktion 2 und 6 wieder. Da einige Proteine der Fraktion 2 nicht in Fraktion 6 (und umgekehrt) vorhanden waren, wurde für die folgenden Vergleiche zunächst eine Proteomkarte für Fraktion 6 erstellt.



Abb. 5.5.4: 2D-DIGE Analyse der Fraktion 2 und 6 aus PHA-Blasten. Die verschiedenen Organellen wurden wie bereits beschrieben angereichert und anschließend mit CyDye-Farbstoffen markiert. Hierbei wurde Fraktion 2 mit Cy5 (rot in der Überlagerung, A) und Fraktion 6 mit Cy3 (grün in der Überlagerung, A) gefärbt. Die beiden Fluoreszenzkanäle wurden für Fraktion 2 (B) und 6 (C) separat als Graustufenbild dargestellt und die differentiellen Spots, die ein Volumenverhältnis >6 und <-6 aufwiesen mit roten (erhöht in Fraktion 2) und blauen (erhöht in Fraktion 6) Umrandungen markiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei unabhängig durchgeführten.



Abb. 5.5.5: Statistische Analyse der Fraktionen 2 und 6. Die in Abb. 5.5.4 dargestellten Unterschiede werden durch das Histogramm wiedergegeben. Die rote Linie spiegelt die Anzahl der Spots mit einem bestimmten Spotvolumen wieder. Die blaue Linie stellt dabei die Gaußsche Regressionskurve dar. Die Höhe der abgebildeten Punkte gibt das maximale Spotvolumen jedes analysierten Spots wieder. Der Grenzbereich (vertikale Linien) entspricht der 6-fachen Änderung des Volumenverhältnisses. Dadurch stellen sich ähnliche Proteinspots hier als grüne Punkte, verminderte als rote Punkte und erhöhte Volumenverhältnisse als blaue Punkte dar.

5.5.5 Proteom der Fraktion 6

Die Proteomkarte der Fraktion 6 ist in Abb. 5.5.5 dargestellt. Nach Reinigung der Granzym B-reichen Fraktion aus PHA-Blasten und deren Separation auf 2D-Gelen mit anschließender massenspektrometrischer Analyse einzeln ausgestanzter Spots gelang die Identifizierung von 392 individuellen Spots (siehe auch Tabelle A3). Auch hier reduzierte sich nach Abzug der Proteinisoformen und posttranslationalen Modifikationen die Anzahl auf 253 individuelle Proteine.



Abb. 5.5.6: Annotierte Proteomkarte der Fraktion 6 nach Dichtegrandientenzentrifugation aus PHA-Blasten. Das Proteinlysat wurde auf einem nicht-linearen pH Gradienten von 3-11 über 24 cm aufgetrennt und in der 2. Dimension auf einem 12,5%-igen Polyacrylamidgel separiert. Die Färbung der Proteine erfolgte mit Flamingo Pink. Automatisches Picken und semiautomatische, proteolytische Spaltung der Proteine führte zu 392 identifizierten Spots, die in Tabelle A 2 aufgeführt sind.

Von den insgesamt 253 identifizierten Proteinen, ergab die Zuordnung zu den subzellulären Kompartimenten einen Anteil von 14,6% an mitochondrialen Proteinen. Dies ist wahrscheinlich auf die ähnliche Dichte zur mitochondrialen Fraktion 5 im Dichtegradienten zurückzuführen. Des Weiteren gab es Proteine, die gleichermaßen mit lysosomalen / sekretorischen, wie auch mitochondrialen Kompartimenten in Verbindung standen. Diese wurden gesondert aufgeführt und hatten einen Anteil von 7,9% am Gesamtproteom. Erstaunlicherweise wurden dennoch 50% der hier analysierten Proteine bereits in anderen lysosomalen / sekretorischen Kompartimenten gefunden. Hierzu gehörten unter anderem die Proteasen Cathepsin B, D, S und W. Ebenfalls war es möglich, in diesen Fraktionen Granzym B (#430)
und Perforin (#136) zu identifizieren. Wie in der Fraktion 2 konnte auch hier Flotillin 1 (#237,242) als Membrankomponente von Lipid-Rafts identifiziert werden. Dies ist im Einklang mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die ebenfalls Membranstrukturen zeigten.



Abb. 5.5.7: Subzelluläre Lokalisation der 253 identifizierten Proteine in der Fraktion 6. Lysosomale und sekretorische Vesikel werden hierbei durch Melanosomen (ME), Lysosomen (LY), Thrombozyten Granula (PG), Synaptosomen (SY), Exosomen (EX) und lytischen Granula (LG) repräsentiert. Andere zelluläre Kompartimente sind: Mitochondrien (MT), Golgi (GO), Endosomen (EN), Peroxisomen (PE), Plasmamembran (PM), Zytoplasma (CY), endoplasmatisches Retikulum (ER) und Nukleus (NU).

Eine weitere Analyse der Unterschiede der beiden Fraktionen 2 und 6 ist im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation nicht durchgeführt worden. In Abb. 5.5.8 sind einige Beispiele für differentielle Proteine zwischen den beiden Fraktionen abgebildet. Wie bereits erwähnt, gelang erst durch die starke Anreicherung von Granzym B in der Fraktion 6 die Identifizierung dieses Proteins. Weitere verstärkt vorkommende Proteine in der Fraktion 6 waren Granzym A und Cathepsin W.

Die Analyse gab auch Hinweise auf Unterschiede im Hinblick auf die Verknüpfung der verschiedenen Granula mit dem Zytoskelett. Während in der Fraktion 2 ein hohes Vorkommen an Aktin und Aktin-assoziierten Proteinen (Actinin) auftrat, waren in Fraktion 6 vermehrt Myosin-Isoformen zu finden. Darunter auch Myosin IIA (Myosin 9) welches für die Granzym Sekretion bei NK-Zellen essentiell ist [102].



Abb. 5.5.8: Selektierte differentielle Proteine der Fraktionen 2 und 6 aus PHA-Blasten. (A) Granzym B (durchgezogene Linie) zeigte eine Erhöhung im Spotvolumen um das 7,68-fache, ähnlich wie Granzym A (gestrichelte Linie), das 5,13-fach verstärkt war. Cathepsin W wies eine Erhöhung um das 7,03-fache, Myosin IIA um das 9,33-fache Spotvolumen auf. (B) Dagegen war in der Fraktion 6 β -Aktin um das 12,89-fache und Actinin (alpha 4) um das 16,55-fache Spotvolumen vermindert. Die korrespondierenden 3D-Bilder verdeutlichen die Unterschiede im Proteinmuster.

5.6 Reifung lytischer Vesikel

Die Reifung lytischer Vesikel wurde anhand des Expressionsprofils zytotoxischer Markerproteine in Zelllysaten vor und nach PHA Stimulation untersucht. Hierfür wurden zunächst E⁺ Lymphozyten durch Schaferythrozytenrosettierung aus PBMZ isoliert und über 19 Tage durch Stimulation mit einem "Feeder-Cocktail" *in vitro* expandiert.



Abb. 5.6.1: Verlauf der Expression zytotoxischer Proteine in isolierten E⁺ Lymphozyten. Die Isolierung von T- und NK-Zellen erfolgte durch Rosettierung mit Schaferythrozyten. Ein Teil der CD2⁺ Lymphozyten wurde vor der Stimulation lysiert. Des Weiteren wurden Lysate an den angegebenen Tagen generiert und auf einem Gradientengel aufgetrennt. Der anschließende Western Blot wurde mit anti-FasL, anti-Perforin, anti-Granulysin und als Beladungskontrolle mit anti-GAPDH gefärbt (A). Zusätzlich wurde periodisch (an den unterstrichenen Tagen) die Zusammensetzung der gemischten Lymphozytenpopulation mittels FACS bestimmt (B). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von vier unabhängig durchgeführten Versuchen.

Im Verlauf der Expansion zeigte sich eine Zunahme von FasL, Perforin und Granulysin. Parallel zur Entnahme von Lysaten aus der Zellkultur, wurden auch zu bestimmten Zeitpunkten Proben für die FACS Analyse entnommen. Hierbei sollte geklärt werden, ob sich das Verhältnis der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen ändert. Eine Zunahme von CD8⁺, NK- und NKT-Zellen und die Verringerung der CD4⁺ Population ließ sich in allen vier durchgeführten Experimenten beobachten. Deshalb stellte sich die Frage, ob die Zunahme der zytotoxischen Proteine auf eine Reifung der Granula oder auf die Zunahme der Anzahl klassischer zytotoxischer Zellen in der Kultur zurückzuführen war. In der Folge wurden daher in einem nächsten Schritt die Einzelpopulationen innerhalb der E⁺ Lymphozyten untersucht.

5.6.1 Besatz an zytotoxischen Proteinen in Lymphozytensubpopulationen

Die einzelnen Subpopulationen wurden mittels Negativselektion aus PBMZ isoliert. FACS-Analysen ergaben dabei eine Reinheit von >95% (nicht gezeigt). Die isolierten CD4⁺, CD8⁺ und NK-Zellen wurden ebenfalls mit einem "Feeder-Cocktail" stimuliert, der vor der Probenentnahme an Tag 4 mittels Dichtegradientenzentrifugation weitgehend entfernt wurde. Alle Zellen wurden zu identischen Zeitpunkten isoliert und stimuliert und Proben für Lysate entnommen. Die Expressionsverläufe sind für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Abbildung 5.6.2 und für NK-Zellen (CD3⁻, CD56⁺) in Abbildung 5.6.3 dargestellt. Bei Betrachtung der Einzelpopulationen zeigte sich nun ein verändertes Bild im Vergleich zu der anfänglich untersuchten Gesamtpopulation (E⁺).



Abb. 5.6.2: Expression zytotoxischer Proteine in CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) T-Zellen. Alle T-Zellsubpopulationen wurden mittels Negativselektion aus PBMZ eines Spenders isoliert. Vor der allogenen Stimulation wurde ein Nullwertlysat hergestellt. Die nächste Entnahme und Lyse von Zellen erfolgte nach Entfernung des "Feeder-Cocktails" an Tag 4 und periodisch an den angegebenen Tagen nach Isolation. Es wurden je 5 µg Protein des Zelllysats aufgetragen und auf 0,2 µm NC-Membran transferiert. Die antigenspezifische Detektion erfolgte mit anti-FasL mAk (Klon G-247-4), anti-Perforin mAk (Klon B-D48), anti-Granzym B mAk (Klon 2C5/F5) und anti-Granulysin Antiserum. Als Beladungskontrolle diente anti-GAPDH. Es wurden unabhängige Versuche mit je CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus fünf Spendern durchgeführt, wovon hier einer exemplarisch dargestellt ist.

Bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen war nur unmittelbar nach der Stimulation (Tag 4) ein Rückgang in der FasL-Expression zu verzeichnen, die sich aber ab Tag 6 wieder auf dem Niveau von frisch isolierten Zellen befand. Die Perforin-Expression zeigte zwischen den beiden T-Zellsubpopulationen deutliche Unterschiede. Sie wies ein hohes Vorkommen in frisch isolierten CD8⁺ T-Zellen auf, das nach Stimulation und damit offensichtlich verbundener Degranulation nicht auf das Anfangsniveau zurückging. Bei CD4⁺ T-Zellen war diese Bande nur schwach ausgeprägt, nahm aber mit der Zeit leicht zu. Auch Granzym B zeigte in CD8⁺ T-Zellen einen deutlichen Anstieg in der Expression nach Stimulation, während dieser Anstieg in CD4⁺ T-Zellen nur marginal zu erkennen war. Interessanterweise waren die Expressionsprofile von Granzym B und Perforin in CD8⁺ T-Zellen unterschiedlich. Diese Befunde waren reproduzierbar bei allen vier Spendern (Abb. 5.6.3).



Abb. 5.6.3: Kinetik der Expression von FasL, Perforin und Granzym B in CD8⁺ T-Zellen von drei verschiedenen Spendern. Die Durchführung war analog zu der Beschreibung in Abb. 5.6.2, jedoch sind hier nur die ersten drei Probenentnahmen dargestellt.

Beide Zelltypen zeigten jedoch in der Expression von Granulysin einen ähnlichen Verlauf, wobei in CD8⁺ T-Zellen bereits vor der Stimulation sowohl die unreife (15 kDa), als auch die reife (9 kDa) Form vorlagen. Nach Stimulation war Granulysin bis zur Neusynthese an Tag 11 dann fast nicht mehr nachweisbar. Die deutliche Expression ab Tag 11 wurde in beiden T-Zellsubpopulationen festgestellt. Diese Daten decken sich mit den Beobachtungen von Huang und Kollegen [148], die bei CD3/CD28 stimulierten Maussplenozyten ebenfalls erst 10 Tage nach Stimulation eine Expression von Granulysin feststellen konnten. Allerdings wurden dabei die hier detailliert untersuchten Subpopulationen und deren unterschiedliche Kinetiken in der Expression zytotoxischer Proteine nicht weiter aufgeschlüsselt.





Die Kinetik der NK-Zellen zeigte im Falle der Expression des FasL und Perforin zunächst einen Rückgang (vermutlich aufgrund einer initialen Degranulation), gefolgt von einer gesteigerten Expression mit Kultivierung der Zellen. Dieser Verlauf ließ sich auch für Granzym B erkennen, jedoch war kaum ein Vorkommen in den frisch isolierten NK-Zellen nachweisbar.

5.7 Proteomanalysen zur Reifung sekretorischer Granula

Die Ergebnisse der vorherigen Versuche deuteten auf eine Änderung im Proteinbesatz während der Maturierung sekretorischer Granula hin. Im Folgenden sollten diese Änderungen auf Proteomebene aufgeschlüsselt werden. Hierfür wurden aus ökonomischen Gründen E⁺ Zellen untersucht, von denen ein Teil direkt subzellulär fraktioniert und ein anderer nach Stimulation für 14 Tage kultiviert wurde.



Abb. 5.7.1: Nachweis der Aktivierung von Lymphozyten im FACS. Durch Rosettierung gewonnene humane E^+ Lymphozyten wurden direkt (links) oder 14 Tage nach allogener Stimulation im FACS auf Größe (FSC) und Granularität (SSC) hin untersucht (A). Des Weiteren wurde die Oberflächenexpression von CD25 (IL-2 Rez. α -Kette) (schwarze Linie) bestimmt. Die graue Linie stellt die dazugehörige Isotypkontrolle dar (B).

Naive Lymphozyten sind klein und wenig granulär. Dies zeigte sich auch in den vergleichenden FACS-Analysen von naiven und aktivierten Zellen. Ebenfalls fehlte wie erwartet CD25 (α -Kette der IL-2 Rezeptoren) als Aktivierungsindikator (Abb.

5.7.1). Da naive Lymphozyten nur wenige Organellen haben, war es notwendig Lymphozyten von vier Spendern im gleichen Verhältnis zu vereinigen, um ausreichende Proteinmengen für die geplante Proteomanalyse zu erhalten. Nach 14 Tagen separater Zellkultur wurden die expandierten, PHA-stimulierten Lymphozyten ebenfalls zu gleichen Teilen auf Eis vereinigt und sofort subzellulär fraktioniert. Die Western Blot Analyse der beiden Fraktionierungen ist in Abbildung 5.7.2 dargestellt.



Abb. 5.7.2: Analyse subzellulärer Fraktionen, aus naiven (links) und stimulierten und für 14 Tage expandierte E⁺ Lymphozyten (rechts). Nach Auftrennung und Transfer gleicher Proteinmengen auf eine NC-Membran wurde diese mit anti-FasL mAk und anti-Perforin mAk gefärbt. Die für FasL und Perforin angereicherten Fraktionen wurden anschließend für 2D-DIGE Analysen verwendet. GL= Gesamtlysat der Zellen von Tag 14

Wie schon in der Kinetik für E⁺ Lymphozyten gezeigt (Abb. 5.6.1 A), war auch in diesem Ansatz fast kein Unterschied in der FasL-Expression zu beobachten. Dagegen wurde eine deutliche Zunahme von Perforin an Tag 14 im Vergleich zu frisch isolierten Lymphozyten nachgewiesen. Erneut zeigte Perforin eine breitere Verteilung in einzelnen Fraktionen des Gradienten mit einer deutlichen Anreicherung in Fraktion 4 und 6. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die Fraktion 4 im Prinzip die Beladungsposition des Ausgangsmaterials (angereicherte Organellen) darstellt. In einem nächsten Schritt wurden jeweils die Fraktionen 2 und 6 von naiven Lymphozyten (Tag 0) und expandierten Lymphozyten (Tag 14) in 2D-DIGE Experimenten miteinander verglichen.

5.7.1 Die Reifung FasL-tragender Vesikel

Fraktion 2 der naiven Lymphozyten wurde mit Cy5 und die Granula der gleichen Fraktion der 14 Tage expandierten Zellen mit Cy3 markiert (Abb. 5.7.3). Die differentielle "In-Gel" Analyse (DIA) der auf 2D-Gelen separierten Lysate ergab eine Anzahl von 1822 ermittelten Spots, von denen sich bei einem Volumenverhältnisgrenzwert von 2,5 46 Spots verstärkt und 28 verringert in den gereiften Granula zeigten. Von den insgesamt 74 differentiellen Spots wurden 42 Spots anhand des annotierten "Mastergels" und den separaten Identifikationen aus den Maturierungsversuchen (Tab. A5) identifiziert (Tabelle 5.7.1).



Abb. 5.7.3: DIGE-Analyse II von FasL-reichen Granula aus naiven E⁺ (A) und stimulierten E⁺ Lymphozyten (B). E⁺ Zellen (790 Mio.) aus vier Spendern wurden im gleichen Verhältnis gemischt und die Organellen über einen Dichtegradienten aufgetrennt (Fraktion 2, Tag 0, Cy 5 markiert). Die gleiche Prozedur wurde mit den stimulierten Zellen der gleichen Spender durchgeführt (Fraktion 2, Tag 14, Cy3 markiert). Die Auswertung mit der DIA Software ergab eine unterschiedliche Proteinmenge. Bei einem Grenzwert von 2,5 des Volumenverhältnisses ergaben sich so Spots die in ihrer Abundanz verstärkt (blau) oder vermindert (rot) sind.

Tab.	5.7.1:	Identifizierte,	differe	ntielle	Spots	der	Fral	ktion	۱ 2	von	naiven	und	stimulierten
Lymp	ohozyte	en. Aufgelistet	sind die	identif	izierten	Prote	eine,	die e	eine	Ände	erung im	Volu	menverhältnis
von n	nehr als	2,5-fach aufw	eisen.										

Spot Nr.	Volumenverhältnis Tag 14 / Tag 0	Protein Name
*1152	-68.62	beta-globin
*1159	-6.20	alpha-globin
604	-4.54	annexin A1
*878	-4.33	chloride intracellular channe 1
²615	-3.48	annexin A1
*902	-3.44	chloride intracellular channel 1
²684	-3.25	nuclear chloride channel
²678	-3.16	actin related protein 2/3 complex
743	-2.91	triosephosphate isomerase (TIM)
*880	-2.79	chloride intracellular channel 1
808	-2.77	cofilin 1, isoform CRA_c
986	-2.73	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform 3
*1023	-2.62	peroxiredoxin-2
²342	-2.60	EH-domain containing 1
627	-2.56	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform 1
669	2.59	MHC class II antigen
717	2.67	granzym A
²1064	2.70	Tubulin, beta
² 81	2.71	dipeptidyl peptidase IV (CD26)
86	2.73	dipeptidyl peptidase IV (CD26)
444	2.74	Ena-VASP-like B6
750	2.76	proteasome subunit, beta type, 1
957	2.80	GRAP2 protein
370	2.90	alpha-tubulin
599	2.91	V-type proton ATPase subunit d 1
77	2.91	dipeptidyl peptidase IV (CD26)
749	2.93	cathepsin S
953	2.96	MHC class II antigen
85	3.00	dipeptidyl peptidase IV (CD26)
837	3.06	Interleukin-25 (R33729_1)
349	3.20	prolyl 4-hydroxylase, beta subunit precursor
²433	3.22	tubulin, beta
84	3.63	dipeptidyl peptidase IV (CD26)
²130	3.76	dipeptidyl peptidase IV (CD26)
426	3.91	ATP synthase, H+ transporting
658	4.23	voltage-dependent anion channel 1
²720	4.35	granzym A
*789	4.39	MHC class II antigen
*769	4.41	MHC class II antigen
²820	4.44	stathmin 1/oncoprotein 18
²83	5.25	dipeptidyl peptidase IV (CD26)
724	6.69	granzym A

*= wurde nur im Maturierungsgel 36836 identifiziert (separate Identifikationliste im Anhang, Tab. A5)

²= wurde sowohl im Maturierungsgel als auch im Mastergel identifiziert

Einige der aufgelisteten differentiellen Proteine wurden in Abbildung 5.7.4 aufgrund der großen Unterschiede in ihren Volumenverhältnissen detaillierter dargestellt. Hierzu gehörten unter anderem die Dipeptidylpeptidase IV, Granzym A, der spannungsabhängie Anionenkanal 1 (VDAC-1), eine vakuoläre Protonen ATPase, MHC Klasse-II, Cathepsin S und Interleukin-25. Im Gegensatz zu diesen höher exprimierten Proteinen gab es auch solche, die in den Granula der aktivierten Lymphozyten gering oder fast gar nicht mehr vorhanden bzw. nachweisbar waren. Hierzu zählten Annexin A1, der intrazelluläre Chloridkanal 1 und der Arp 2/3 Komplex. Eine Erhöhung der Protonenpumpen-Proteine und eine Erniedrigung der Chloridkanäle könnten auf eine Ansäuerung des reifenden, lysosomalen Kompartiments hindeuten. Im Zusammenhang der Reifung steht auch die Erhöhung von MHC Klasse-II Komplexen und deren funktionell assoziiertes Protein Cathepsin S, das wie bereits erwähnt für die Antigenbeladung der Komplexe notwendig ist.

Alpha- und beta-Ketten des Hämoglobins waren nur in den Granula der naiven Zellen nachgewiesen und entstammten wahrscheinlich den Schaferythrozyten, die für die Isolierung der Lymphozyten benutzt wurden.



Abb. 5.7.4: Ausgewählte differentiell exprimierte Proteine in Fraktion 2 aus naiven (Tag 0) und aktivierten Lymphozyten (Tag 14). Die Gelausschnitte stellen die angegebenen Proteine bzw. deren Isoformen dar. Das korrespondierende 3D-Profil zeigt den umrandeten Spot. Die Änderungen im Spotvolumen der dargestellten Proteine sind in der Tabelle 5.7.1 zusammengefasst.

Actin related protein 2/3 complex

5.7.1.1 Expression und Lokalisation der Dipeptidylpeptidase IV / CD26

Die Dipeptidylpeptidase IV (DPP4, CD26) sollte im Kontext der Reifung genauer untersucht werden, da 7 Isoformen dieses Proteins eine Erhöhung in den reifen Granula zeigten. Obwohl der Expressionsspiegel der Gesamtlysate hierbei nicht konstant war, so war doch eine deutlich Erhöhnung im Vergleich zu unstimulierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu erkennen. Ebenfalls konnte für DPPIV auch immunbiochemisch eine Anreicherung in FasL-reichen Vesikeln gezeigt werden (Abb. 5.7.4).



Abb. 5.7.5: Kinetik zur Expression (A) und subzelluläre Lokalisation (B) von DPPIV / CD26. Der Expressionsverlauf von CD26 wurde in autolog stimulierten T-Zellsubpopulationen (CD4⁺, CD8⁺) über 19 Tage beobachtet **(A)**. Ebenfalls wurden autologe CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen 16 Tage nach Stimulation subzellulär fraktioniert und je 4 μ g Proteinlysat aufgetrennt. Die Präsenz von CD26 und FasL wurde in Fraktion 2 mit mAk nachgewiesen **(B)**.

5.7.2 Die Reifung Granzym B-angereicherter Vesikel

Vergleichende Analysen wurden auch im Falle der Fraktion 6 durchgeführt. Hierbei wurden wieder die Lysate der angereicherten Granula der naiven Lymphozyten mit Cy5 markiert und die der expandierten mit Cy3 (Abb. 5.7.6).



Abb. 5.7.6: DIGE Analyse der Fraktion 6 Granula aus naiven (A) und stimulierten E⁺ Lymphozyten (B). Analog zum vorherigen Versuch wurden die Organellen subzellulär fraktioniert und die Fraktion 6 für DIGE Analysen präpariert. Dabei wurden das Präparat aus den naiven Zellen mit Cy5 und das der aktivierten Zellen mit Cy3 markiert.

Es wurden insgesamt 1659 Spots analysiert. 27 Proteinspots waren bei einem angelegten Volumenverhältnisgrenzwert von 4,0 verstärkt und 49 vermindert in den gereiften Granula exprimiert. Da das Proteom dieser Fraktion noch nicht so umfassend aufgeschlüsselt wurde, konnten hier nur 12 differentielle Spots identifiziert werden (Tab. 5.7.2).

Tab. 5.7.2: Ide	entifizierte, diffe	rentielle Sp	ots de	er Granzym E	3-reichen	Frakti	ion vo	on naiven	und
expandierten	Lymphozyten.	Aufgelistet	sind	identifizierte	Proteine,	die	eine	Änderung	im
Volumenverhält	tnis von mehr als	4-fach aufwi	iesen.						

Spot Nr. (Gel 36839)	Volumenverhältnis Tag14 / Tag 0	Protein Name
1653	-6.74	septin 2
*138	-5.61	succinate dehydrogenase
1642	-5.07	actin
*137	-4.25	succinate dehydrogenase
*95	-4.23	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
*303	-4.21	actin
²439	3.82 ³	granzyme A
²452	4.05	granzyme A
1865	4.47	granzyme B
1872	4.55	granzyme B
²63	4.76	myosin IIA
²616	5.39	Perforin-1

*= Annotierung wurde aus dem "Mastergel" übernommen, die anderen Identifikationen des Gels 36839 können der Tabelle A5 im Anhang entnommen werden

²= wurde sowohl im Maturierungsexperiment, als auch im "Mastergel" identifiziert

³= Ausnahme beim Volumenverhältnis

Ausgewählte differentielle Spots aus Tabelle 5.7.2 sind in Abbildung 5.7.7 im Detail dargestellt. Im Gegensatz zu Fraktion 2 wiesen in der Fraktion 6 Granzym A, B und Perforin ein verstärktes Vorkommen in den reifen Granula auf. Ebenfalls war das an der Degranulierung beteiligte Myosin IIA in den reifen Granula erhöht. Auf der anderen Seite war in den Granula der naiven Lymphozyten Septin 2 nachweisbar, welches in den reifen Vesikeln nahezu fehlte. Wie bereits erwähnt, befanden sich in Fraktion 6 vermehrt mitochondriale Proteine (wie z.B. die Succinat Dehydrogenase).



Abb. 5.7.7: Ausgewählte differentielle Proteine der Fraktion 6 aus naiven (Tag 0) und aktivierten Lymphozyten (Tag 14). Proteinspots, die ein erhöhtes oder geringeres Vorkommen in aktivierten Lymphozyten zeigten sind in A bzw. B abgebildet. Die Gelausschnitte stellen die angegebenen Proteine bzw. deren Isoformen dar. Das korrespondierende 3D-Profil zeigt den umrandeten Spot. Das Verhältnis der Spotvolumina der gezeigten Proteine ist in der Tab. 5.7.2 aufgelistet.

5.8 Identifikation und Expression von Interleukin-16 in NK-Zellen

Interleukin-16 (IL-16) wurde bei den Proteomanalysen der NK-Zellen fast exklusiv in primären und expandierten NK-Zellen gefunden. Da allem Anschein nach das Vorkommen in NK-Zellen noch nicht beschrieben wurde, sollte die Expression von IL-16 im Hinblick auf dessen Kinetik und Lokalisation untersucht werden. IL-16 stellte sich im 2D-Gel als verschiedene Isoformen mit demselben Molekulargewicht von ca. 73 kDa, aber leicht unterschiedlichem auch pl dar (Abb.: 5.8.1 A, B). Sowohl das Molekulargewicht, als auch der pl entsprechen den theoretischen Berechnungen von 66,6 kDa und pl 5,67. Wie erwähnt wurde IL-16 nur in expandierten NK-Zellen massenspektroskopisch identifiziert. Die Identifikation beruhte hierbei zunächst auf dem Vergleich der Peptidmassen mit den Datenbankeinträgen (Peptidmassen-Fingerabdruck). Zusätzlich wurden Aminosäuresequenzen der vier stärksten, proteinspezifischen Peptide bestimmt (Abb. 5.8.1 C). Die so erhaltenen Sequenzen deckten sich mit Abschnitten des Datenbankeinträges (UniProt Nr. Q14005) für Interleukin-16 (Abb. 5.8.1 D).



Abb. 5.8.1: Identifizierung von IL-16 mittel MS in der Fraktion 2 von expandierten NK-Zellen. Dargestellt ist das 2D-Gel der Fraktion 2 aus NK-Zellen (A). Die nummerierten Spots im vergrößerten Gelabschnitt (B) entsprechen denen der Spotnummern im Tabelleausschnitt (D). Das Massenspektrum von Spot Nr. 191 (C), bei dem die vier stärksten IL-16 spezifischen Peptidmassen (unterstrichen) zusätzlich mittels MS+MS/MS sequenziert wurden. Zur besseren Übersicht sind übereinstimmende Peptide in der schematischen Darstellung des IL-16 schwarz dargestellt (E).

In Lymphozyten und bronchialen Epithelzellen wird IL-16 als 631-AS Vorläufermolekül generiert, welches als pro-IL-16 bezeichnet wird. Eine Spaltung durch Caspase-3 am Serin 511, führt zu einem 121 AS langen carboxyterminalen Peptid, welches die bioaktive Form des IL-16 darstellt (Abb. 6.1.1) [149]. Sowohl pro-IL-16, als auch die bioaktive Form ließen sich in nicht-leukämischen Tund NK-Zelllinien (RAPO, JFL bzw. YTS) mit einem IL-16 spezifischen mAk nachweisen (Abb. 5.8.2). Eine Ausnahme stellte hier die NK-Zelllinie NKL dar, bei der sich auf Höhe von pro-IL-16 (73 kDa) nur eine leichte Bande abzeichnete. Die bioaktive Form des IL-16 ist im Vergleich zu den Mengen der pro-Form in T- und NK-Zellen sehr gering. Ein entsprechendes Signal auf Höhe von 15 kDa war erst nach längerer Belichtungszeit (15 min) zu erkennen. Jedoch waren auch hier Unterschiede innerhalb der Zellpopulationen zu beobachten. So zeigten 16 Tage expandierte CD8⁺ und NK-Zellen das stärkste Signal, während v δ 1⁺, v δ 2⁺ T-Zellen und nicht aktivierte E⁺ Zellen schwächere Signale aufwiesen. In der Signalstärke des pro-IL-16 war nur bei $\gamma\delta$ T-Zellen eine geringere Intensität zu beobachten, während zwischen E⁺, CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen kein wesentlicher Unterschied zu sehen war.





Neben dem erstmaligen direkten Nachweis von IL-16 in $\gamma\delta$ T-Zellen, wurde IL-16 mit der vorliegenden Arbeit erstmals in NK-Zellen nachgewiesen. Bioinformatische Recherchen (http://biogps.gnf.org, nicht gezeigt) ergaben, dass NK-Zellen, wie auch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, IL-16 mRNA besitzen und somit auch in der Lage sein sollten dieses Protein zu translatieren. Die Expression von pro-IL-16 wurde in naiven und aktivierten NK-Zellen nachgewiesen. Hierbei ist bis zu 7 Tagen nach Aktivierung ein deutlicher Rückgang der Expression zu verzeichnen. Danach erfolgt ein erneuter Anstieg bis Tag 15 nach Aktivierung. Bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ist eine ähnliche Kinetik zu beobachten gewesen (Abb. 5.8.3).



Abb. 5.8.3: Kinetik der Expression von pro-IL-16 in NK-Zellen und T-Zellsubpopulationen. Es wurden je 4 μ g Protein der Zelllysate an den angegebenen Tagen nach Stimulation auf einem Gradientengel aufgetrennt und auf 0,2 μ m NC-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte anschließend mit anti-IL-16 mAk. β -Aktin und GAPDH dienten als Beladungskontrollen.

5.8.1 IL-16 wird in FasL-tragenden Granula gespeichert

Die Speicherung von pro-IL-16 erfolgte in Vesikeln die nach Reinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation auch die Granula-spezifischen Proteine FasL, CD63 und LAMP-1 (Abb. 5.8.4) enthielten. Dies konnte nicht nur in den Fraktionen von PHA-Blasten, sondern auch in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden.



Abb. 5.8.4: Lokalisation von pro-IL-16 in subzellulären Fraktionen. Die Dichtegradientenfraktionen von PHA-Blasten, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf Membranen transferiert und mit anti-IL-16, anti-FasL und bei PHA-Blasten zusätzlich mit anti-CD63 und anti-LAMP-1 mAK gefärbt.

Des Weiteren ließ sich die Kolokalisation von IL-16 und FasL auch fluoreszenzmikroskopisch nachweisen (Abb. 5.8.5 A, B). Die NK-Zelllinien NKL und YTS dienten als Negativkontrollen für IL-16 und zeigten auch in diesem Experiment den bereits beschriebenen Unterschied in der FasL Expression. Es konnte nachgewiesen werden, dass IL-16 bei 17 Tage expandierten NK-Zellen in den gleichen granulären Strukturen lokalisiert ist wie CD63 (Abb. 5.8.5 C).



Abb. 5.8.5: In aktivierten NK-Zellen kolokalisiert IL-16 mit FasL und CD63. NK-Zellen (B, C) und NK-Zelllinien (A) wurden fixiert, permeabilisiert und mit den angegebenen Antikörpern gefärbt. Hierbei wurde mit anti-FasL mAk NOK-1 über Nacht und Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG gefärbt und in einem zweiten Schritt nach intensivem Waschen mit direkt markiertem anti-IL-16-Alexa Fluor 555 gefärbt (A, B). Des Weiteren wurde anti-IL-16 über Nacht und anschließend mit Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG gefärbt. Anschließend erfolgte die Färbung mit direkt markiertem anti-CD63-Alexa Fluor 555. Die in A dargestellten Proben wurden am LSM 510 und die in B und C am Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 aufgenommen. In allen Aufnahmen wurden die Zellkerne mit DAPI (in B und C auch durchlichtmikroskopisch) visualisiert.

6. Diskussion

Zytotoxische Lymphozyten stellen im Immunsystem eine einzigartige Barriere für viral infizierte oder transformierte Zellen dar. Obwohl die Aktivierung der T- und NK-Zellen verschieden verläuft, sind die zytotoxischen Effektorfunktionen durch die Mobilisierung der lytischen Granula in beiden Zelltypen ähnlich. In der vorliegenden Arbeit wurde der Inhalt dieser Granula definiert und Unterschiede zwischen Modellzelllinien, Subpopulationen und Reifungsstadien nachgewiesen. Diese Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

6.1 Etablierung einer effizienten Anreicherung sekretorischer Granula aus Lymphozyten

Detaillierte Proteomanalysen sekretorischer Granula erfordern eine effiziente Anreicherung dieses Kompartiments ausgehend von einer begrenzten Zellzahl. Zur Isolierung von zytotoxischen Granula aus NK- [150] und T-Zellen [151] wurden bisher meist Percoll Gradienten verwendet. Diese mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) beschichteten Silikakolloidale haben den Nachteil, dass sie für nachfolgende Experimente durch Waschschritte entfernt werden müssen. Deshalb wurde in der hier vorliegenden Arbeit Iodixanol[®] als Dichtegradientenmedium verwendet. Das nicht-ionische Iodixanol[®] wurde zuerst 1994 von Graham und Kollegen beschrieben [152,153] und ist kommerziell als Optiprep[®] erhältlich. Es kann als isoosmotische Lösung hoher Dichte (bis 1,32 g/ml) eingesetzt werden [154].

Durch Dounce-Homogenisation und anschließende differentielle Zentrifugation gelang es Organellen anzureichern und von nicht aufgeschlossenen Zellen, Zelltrümmern und assoziierten Plasmamembranen zu trennen. Dies konnte durch eine pan-Cadherin Färbung im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 5.2.1). Bei der nachfolgenden Schichtung des Dichtegradienten wurden die auf 19% lodixanol[®] eingestellten Organellen in der Mitte des Gradienten appliziert, wodurch sich der hydrostatische Druck der sensitiveren Mitochondrien erhöhte und somit eine bessere Separation der Lysosomen ermöglicht wurde [155]. Wie bereits zuvor beobachtet [153], konnte auch in der vorliegenden Arbeit eine sehr effiziente Abgrenzung von Mitochondrien (Fraktion 5) erzielt werden (Abb. 5.1.3). Die mittels Western Blot durchgeführte Charakterisierung der Dichtegradientenfraktionen aus PHA-Blasten zeigte eine deutliche Anreicherung lysosomaler (CD63, LAMP-1) als auch zytotoxischer Proteine (FasL, Perforin) in der Fraktion 2. Dennoch waren leichte

Verunreinigungen anhand des ER Markers Bip/Grp78 und des frühen Endosomenmarkers EEA-1 festzustellen. Eine Übersicht zur Verteilung der subzellulären Markerproteine ist in der folgenden Abbildung (Abb. 6.1) dargestellt.



Abb. 6.1: Modell zur Lokalistion subzellulärer Markerproteine. Die in dieser Arbeit verwendeten subzellulären Marker sind zur besseren Übersicht den verschieden Organellen zugeordnet worden.

Bereits bei den initialen Experimenten zur Etablierung des Protokolls zur Anreicherung von sekretorischen Lysosomen (SL) wurde beobachtet, dass sich ein Großteil des Granzym B Proteinbesatzes nicht in der FasL-Fraktion 2 wiederfand. Da jedoch die meisten in der Literatur für sekretorische Lysosomen benannten Marker in der Fraktion 2 angereichert waren, wurde diese in den nachfolgenden Proteomanalysen verwendet. Routinemäßig wurde dabei die Anreicherung des FasL überprüft. Die Eignung des FasL als Marker für SL konnte in den verwendeten Zellen zudem mittels Immunpräzipitation gezeigt werden (Abb.5.1.4). Ein weiterer Marker sekretorischer Lysosomen ist CD63 [97,156,157]. Eine exakte Kolokalisation dieses Iysosomalen Membranproteins mit FasL wurde bisher in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert [108]. Mittels konfokaler Mikroskopie konnte sowohl in der NK-Zelllinie YTS als auch in isolierten und expandierten CD4⁺, CD8⁺ und CD3⁻/CD56⁺ (NK) Lymphozyten eindeutig eine Kolokalisation des FasL mit CD63 dokumentiert werden (Abb. 5.1.4). Nach Etablierung des Protokolls zur Anreicherung lytischer Granula und deren Charakterisierung durch spezifische Marker, wurde zunächst das Proteom der Granula von humanen NK-Zellen analysiert.

6.2 Das Proteom sekretorischer Lysosomen aus NK-Zellen

6.2.1 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung der humanen NK-Zelllinien

NK-Zellen bilden eine der ersten Verteidigungslinien bei Infektionen und werden zum angeborenen Immunsystem gezählt. Im peripheren Blut gesunder Spender beträgt der Anteil an NK-Zellen etwa 10%. Für die Untersuchung von biochemischen Signalwegen, aktivierungsabhängigem Vesikeltransport oder dem zytotoxischen Potential werden auch im Falle von NK-Zellen etablierte Zelllinien als Modellsysteme eingesetzt. Hier finden unter anderem die leukämischen NK-Zelllinien NKL und YTS Verwendung. NKL wurde 1996 erstmals von Robertson und Kollegen beschrieben und stammt aus dem peripheren Blut eines Patienten mit NK-Zell-Leukämie [158]. YTS ist ein Subklon der YT-Zelllinie, welche aus der perikardialen Flüssigkeit eines Patienten mit akutem lymphoblastischen Lymphom etabliert und 1985 von Yodoi und Kollegen [159] eingehend charakterisiert wurde. Diese beiden Zelllinien gehören neben NK-92 [160] zu den am häufigsten verwendeten humanen NK-Modellzelllinien [138]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten NK-Zelllinien weisen mehrere phänotyptische Unterschiede auf (Abb. 5.3.1). Außerdem erfordern sie verschiedene Wachstumsbedingungen [158,161] und unterschiedliche Stimulationsbedingungen für die Induktion der zytolytischen Effektorfunktion [161,162]. Auf den klonalen Ursprung der Linien deutet die Tatsache hin, dass keine der beiden Zelllinien mit dem typischen Markerprofil von IL-2 expandierten NK-Zellen übereinstimmt. Primäre NK-Zellen sind nach zwei Wochen Expansion CD3⁻, CD2⁺, CD16⁺, CD56⁺ und NKG2D⁺. Die individuellen Profile der NK-Zelllinien sind in Abb. 5.3.1 dargestellt. Erstaunlich ist die unterschiedliche Expression klassischer NK-Zellmarker wie CD16 (fehlt bei beiden Linien) und CD56 (fehlt bei NKL) sowie das Auftreten von CD28, einem kostimulatorischen Protein auf T-Zellen, auf YTS. Diese phänotypischen Unterschiede haben nachweisbare Auswirkungen auf die Erkennung und Lyse von Zielzellen (Abb. 5.3.2). So sind YTS nicht in der Lage, K562 Zielzellen zu töten, vermutlich da diese keinen der CD28 Liganden (CD80, CD86) exprimieren, welche laut Literatur essentiell für die Aktivierung und folgende Degranulation sekretorischer Granula aus YTS-Zellen sind [161]. Im Gegensatz dazu wird Zytotoxizität bei NKL hauptsächlich durch NKG2D vermittelt, wodurch sowohl in K562 als auch 721.221 Apoptose ausgelöst werden kann [162]. Wie zuvor von Chen und Kollegen berichtet, zeigten NKL eine gesteigerte Zytotoxizität gegenüber K562. Trotz dieser Unterschiede wiesen beide Zellen ein vergleichbares zytotoxisches Potential von 65-75% bei einem Effektor/Zielzell - Verhältnis von 10:1 auf [162]. Somit ist festzuhalten, dass sowohl phänotypische als auch funktionelle Charakteristika der beschriebenen verwendeten Zelllinien mit der Literatur hier denen in übereinstimmten. Außerdem legten die dargestellten Befunde nahe, dass sich möglicherweise nicht nur die Phänotypen der Zellen unterscheiden, sondern auch der Proteinbesatz des Effektorkompartimentes.

6.2.2 Anreicherung und Charakterisierung sekretorischer Granula aus NK-Zelllinien

Auch für Proteomanalysen von subzellulären Strukturen werden häufig Zelllinien verwendet, um ausreichende Proteinmengen für die folgenden Analysen zu erhalten. So wurde kürzlich die Leukämielinie YTS von Casey und Kollegen [163] verwendet, um das Membranproteom sekretorischer Vesikel von NK-Zellen zu untersuchen.

Für die Anreicherung sekretorischer Granula wurde in der vorliegenden Arbeit das zuvor beschriebene Protokoll verwendet. Da sich die NK-Zelllinien durch ihre Größe (Durchmesser ca. 10 µm) von den PHA-Blasten unterscheiden, wurde die Homogenisierung leicht modifiziert. Die erhaltenen Fraktionen wurden ebenfalls aufgrund des Vorkommens verschiedener subzellulärer Marker charakterisiert. Hierbei zeigte FasL bei YTS eine Anreicherung in der Fraktion 1 und 2, wobei nur in Fraktion 2 auch die lysosomalen Membranproteine LAMP-1 und CD63 angereichert waren. NKL-Zellen zeigten bei FasL, LAMP-1 und CD63 ein ähnliches Verteilungsmuster, wobei FasL ein vergleichsweise schwächeres Signal ergab. Ein weiterer Unterschied war im Vorkommen von Granzym B sichtbar. Während dieses Protein in NKL-Zellen in Fraktion 2 angereichert war, zeigte sich bei YTS eine breite Verteilung über alle Fraktionen. Dies lässt sich teilweise auf die großen Mengen an Granzym B in YTS-Zellen zurückführen. Es könnte sein, dass bei der Aufarbeitung einige zerstörte Vesikel zu einem entsprechenden Granzym B Signal im Western Blot führten. Wie auch schon bei PHA-Blasten beobachtet, zeigten in vitro expandierte NK-Zellen eine Anreicherung von Granzym B in der Fraktion 6. Neben Granzym B wies auch Granulysin eine leicht unterschiedliche Verteilung in den

Fraktionen auf. Während bei NKL und YTS sowohl die unreife (15 kDa) als auch die reife (9 kDa) Form in der Fraktion 2 angereichert waren, war in YTS-Zellen die reife Form zusätzlich auch in Fraktion 6 nachweisbar.

Auch im Falle der NK-Zellen wurde anhand der oben genannten Befunde die Fraktion 2 für die Charakterisierung des Proteinbesatzes von SL eingesetzt. Die subzelluläre Einordnung der 234 identifizierten Proteine aus den NK-Zell-Gelen ergab, dass 76,8% in lysosomen-ähnlichen Organellen, exozytotischen Vesikeln oder Melanosomen bereits vorher gefunden wurden [139,146,164]. Dies verdeutlicht neben der Verteilung der subzellulären Marker, dass die Anreicherung lytischer Granula aus leukämischen und aktivierten NK-Zellen relativ effizient war.

6.2.3 Unterschiede im Proteom sekretorischer Lysosomen aus NKL, YTS und expandierten NK-Zellen

In einem nächsten Schritt sollten die individuellen Unterschiede im Proteinbesatz der angereicherten Lysosomen mittels differentieller 2D-Gelelektrophorese (2D-DIGE) herausgearbeitet werden. Die DIGE Analysen ergaben, dass das Gesamtproteom der angereicherten Granula aus NKL und YTS zu einem Großteil übereinstimmt. Dennoch wurden reproduzierbar signifikante Unterschiede in 9-10% der analysierten Spots ermittelt. Der in Tabelle 5.3.1 dargestellte Wechsel der Farbstoffe beim Markieren der Proteine ermöglichte zudem, CyDye-spezifische Färbeartefakte auszuschließen. 2D-Gele sind in der Regel von individuellen Laufunterschieden geprägt, deshalb wurden zusätzlich nur die differentiell eingestuften Proteine betrachtet, die in drei unabhängigen Experimenten eine Änderung von mindestens dem 3-fachen Spotvolumen aufwiesen. Da das Interesse nicht nur auf diesen Spots lag, wurden aus den 8 Gelen (Tabelle 5.3.1) insgesamt rund 1000 gestanzte Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert. Besonders die differentiellen Proteine wurden mehrmals identifiziert, daher ergibt sich eine endgültige Anzahl von 397 Proteinspots, die durch Isoformen und verschiedenste Modifikationen 234 individuelle Proteine repräsentieren. Wie bereits erwähnt wurden 76,8% dieser Proteine bereits in anderen lysosomalen und sekretorischen Organellen identifiziert (Abb. 5.3.3 A). Funktionell verdeutlichen Hydrolasen auf der einen Seite, Speicherund Transportproteine auf der anderen Seite, den bifunktionellen Charakter dieses einzigartigen Organells.

Direkte Vergleiche der korrespondierenden Fraktionen aus NKL, YTS und expandierten NK-Zellen ergaben unter anderem Unterschiede in Proteinen, die für Antigenpräsentation und zytotoxische Effektorfunktion verantwortlich sind (Abb. 5.3.2). So enthielten SL aus NKL und NK-Zellen größere Mengen an Granzym A, aber sehr viel weniger Granzym B als Vesikel aus YTS-Zellen. Wie in der Einleitung erwähnt, ist Granzym B eine zytotoxische Effektorprotease, die Polypeptide nach Aspartat spaltet und durch Prozessierung von Caspase-3 Apoptose in der Zielzelle auslöst [165]. Im Vergleich dazu ist über Granzym A relativ wenig bekannt. Es kann jedoch im Gegensatz zu Granzym B Caspase-unabhängigen Zelltod auslösen [166]. Das verstärkte Vorkommen von Granzym B einerseits und die geringere Expression von Granzym A in YTS im Vergleich zu NKL andererseits, konnte durch verschiedene Methoden verifiziert werden. Die intrazelluläre FACS-Färbung zeigte eine "relative" Erhöhung von Granzym B um 53% gegenüber NKL (Abb. 5.3.8). Ein ähnliches Bild ergab sich aus Western Blot Analysen von Gesamtlysaten und aus fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. In Ergänzung dazu wurde mit diesen Methoden auch das verstärkte Vorkommen von Granzym A in NKL belegt (Abb. 5.3.9).

Als weitere zytotoxische Effektormoleküle wurden FasL und Perforin genaueren Analysen unterzogen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Western Blot Analysen ergaben eine deutlich geringere Menge dieser Proteine in den NKL-Zellen (Abb. 5.3.7). Für Perforin wurde dies mittels einer intrazellulären FACS-Färbung verifiziert. NKL ist aber trotz der offensichtlichen Reduktion verschiedener zytolytischer Effektorproteine sehr wohl in der Lage, effektiv Zielzellen zu töten [167,168]. YTS und expandierte NK-Zellen zeigten einen starken "zytotoxischen Phänotyp", der neben FasL auch durch das verstärkte Vorkommen von Perforin gekennzeichnet war. Perforin ist ein Ca²⁺-abhängiges Poren formendes Protein, dass an der Zytolyse der Zielzellen beteiligt ist [169].

Das erhöhte Vorkommen von MHC Klasse-II Molekülen in Vesikeln aus NKL-Zellen war überraschend, da NK-Zellen nicht zu den klassischen Antigen-präsentierenden Zellen gehören. MHC Klasse-II Proteine auf APZ präsentieren üblicherweise prozessierte Antigene den CD4⁺ T-Zellen. Diese Funktion wurde jedoch kürzlich auch im Zusammenhang einer akzessorischen Antigenpräsentation bei aktivierten NK-Zellen beschrieben [170]. Die Lagerung von MHC Klasse-II Proteinen in sekretorischen Granula wurde auch für Mastzellen [171,172], Monozyten [35] und

auch auf Proteomebene für die NK-Zelllinie YTS beschrieben [163]. Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurden α und β Ketten der MHC Klasse-II Proteine in YTS identifiziert, jedoch im Vergleich zu NKL jedoch in sehr geringen Mengen (Abb. 5.3.8). Intrazelluläre FACS Färbungen ergaben eine etwa 10-fach höhere Expression in NKL. Im Einklang damit steht auch die verstärkte Expression von Cathepsin S, einer lysosomalen Cysteinprotease, die durch Degradation der invarianten Kette der MHC Klasse-II Proteine deren Antigenpräsentation kontrolliert [141,173,174]. Diese starken Unterschiede in der Lagerung von MHC Klasse-II Proteinen spiegelten sich jedoch nicht in der Oberflächenexpression (Abb. 5.3.8 C) der beiden Zelllinien wieder. So konnten Hanna und Kollegen auch MHC Klasse-II Proteine in Proteine in Proteinen der Zellmembran von YTS und ebenfalls durchflußzytometrisch nachweisen [175].

Im Gegensatz zu den leukämischen NK-Zelllinien waren bei aktivierten und expandierten NK-Zellen weder in den DIGE-Analysen, noch in der intrazellulären FACS-Färbung MHC Klasse-II Proteine zu ermitteln. Dieser Befund steht teilweise im Gegensatz zu den Ergebnissen von Hanna und Kollegen [170], die in weiteren Versuchen in PHA-aktivierten NK-Zellen aus dem peripheren Blut MHC Klasse-II Expression nachweisen konnten, die mit der Funktion als antigenpräsentierende Zellen korrelierte [176]. Jedoch wurde hierbei ein breiteres Spektrum der HLA Haplotypen durch anti-HLA DR/DP/DQ Antikörper abgedeckt. Eine *in vivo* Relevanz der Antigenpräsentation durch NK-Zellen lässt sich nur schwer untersuchen, da beispielsweise aktivierte, murine NK-Zellen nicht als antigenpräsentierende Zellen fungieren sollen [177,178]. Neue Befunde weisen darauf hin, dass im Menschen auch nur eine kleine Subpopulation von zirkulierenden NK-Zellen eine HLA-DR Expression aufweist [179].

Wie HLA-DR, zeigte auch Moesin eine 24-70-fache Erhöhung im Spotvolumen aus NKL Lysosomen im Vergleich zu YTS. Dieses Protein gehört zu der Familie der ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) Proteine, die als Verbindung zwischen Transmembranproteinen und dem Aktin-Zytoskelett oder assoziierten Vesikeln dienen [180-182]. Des Weiteren spielt Moesin eine wichtige Rolle bei der Bildung der immunologischen Synapse [183,184] und könnte so am Transport der lytischen Granula zur Effektor-Zielzell-Kontaktzone beteiligt sein.

Zu den differentiellen Proteinen gehörten auch zwei Mitglieder der Serin Protease Inhibitor (Serpin) Superfamilie. Eines davon, der 42 kDa Leukozyten Elastase

Inhibitor Serpin B1 oder auch MNEI genannt, inhibiert Cathepsin G in azurophilen Granula, welche die sekretorischen Vesikel der Neutrophilen darstellen [185]. Nach Freisetzung von Cathepsin G durch Neutrophile, ist diese Protease in der Lage, unter anderem an NK-Zellen zu binden [186]. Dort induziert Cathepsin G den Anstieg der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration. Durch die gesteigerte Degranulation erhöht sich auch die NK-Zell Zytotoxizität [187]. Es ist daher zu vermuten, dass Serpin B1 von den lytischen Vesikeln freigesetzt wird, um die NK-Zelle vor der Cathepsin G Protease-Aktivität zu schützen und eine weitere Stimulation zu verhindern.

Das zweite Mitglied dieser Serin Protease Superfamilie ist Serpin B9 oder PI-9. PI-9 ist der einzig bekannte intrazelluläre Inhibitor der Granzym B Aktivität [188] und der Granzym B vermittelten Apoptose [189]. PI-9 ist an der zytosolischen Seite der Membran Granzym B tragender-Vesikel von T- und NK-Zellen lokalisiert. Es schützt möglicherweise die Zellen vor der Selbstzerstörung, da Granzym B in den Vesikeln als aktive Form gespeichert wird [190]. Unkontrollierte Freisetzung von Granzym B aus Vesikeln oder aus der immunologischen Synapse könnte zum Tod der zytotoxischen Zelle führen [191]. Die verstärkte Expression von PI-9 in YTS-Zellen ist somit auch im Einklang mit dem verstärkten Vorkommen von Granzym B in diesen Zellen.

Ebenfalls wurde das β-Galaktosid-bindende Lektin Galectin-3 mit einem erhöhten Vorkommen in YTS mittels DIGE und Westen Blot Analysen identifiziert. Die Proteine dieser Lektin-Familie zeichnen sich durch ihre Kohlenhydrat-Erkennungs-Domänen (CRD) aus, Galectin-3 besitzt zusätzlich noch eine Prolin- und Glycin-reiche N-terminale Domäne, wodurch es Oligomere bilden kann. Galectin-3 wurde in verschiedensten Zelltypen und Kompartimenten gefunden. Neben der intrazellulären Lokalisation im Zellkern und im Zytoplasma wurde auch eine Sekretion beschrieben [192]. Für Galectin-3 wurde eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Funktionen beschrieben. Welche dieser Funktionen in YTS-Zellen relevant ist, ist derzeit nur schwer einzuschätzen. Für Galectin-3 ist eine Bindung an die lysosomalen Membranproteine LAMP-1 und 2 beschrieben, was die Assoziation mit lytischen Granula erklären würde [193].

Neben diesen deutlichen Unterschieden zwischen den leukämischen Zelllinien, gab es auch einige Proteine, die mit einem verstärkten Vorkommen nur in aktivierten und expandierten NK-Zellen gefunden wurden. Hierzu gehörte auch eine Isoform des Cathepsin D. Diese Aspartatpeptidase [194] ist ein Hauptbestandteil lysosomaler Kompartimente und wurde in den NK-Zellen verstärkt in den Spots #65, 67 und 68

bei ca. 30 kDa (Abb. A1 im Anhang) identifiziert. Die 42 kDa Form von Cathepsin D kann unter reduzierenden Bedingungen in ein 30 und 14 kDa Fragment gespalten werden. Die Western Blot Analysen von Gesamtlysaten zeigten die 42 kDa Bande bei allen drei Zellen auf leicht unterschiedlicher Höhe, was an unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen in den einzelnen Zellen liegen könnte. Bei dem 30 kDa Fragment waren keine Migrationsunterschiede nachzuweisen. In den NK-Zellen war jedoch eine mögliche Doppelbande zu erkennen, die vermutlich zwei Isoformen des Cathepsin D repräsentiert. An diesem Beispiel lässt sich der Vorteil einer zwei-dimensionalen Gelelektrophorese bei der Detektion von unterschiedlichen Isoformen gut verdeutlichen.

6.2.4 Interleukin-16 wird von NK-Zellen exprimiert und mit FasL in lysosomalen Granula gespeichert

Interleukin-16 (IL-16) wurde sowohl im Proteom der Fraktion 2 aus T-, als auch NK-Zellen identifiziert. IL-16 war das erste Protein, für das eine chemotaktische Wirkung auf humane T-Zellen nachgewiesen wurde. Daher wurde es 1982 auch zunächst als "Lymphocyte chemoattractant factor" (LCF) bezeichnet [195,196]. Es war bereits bekannt, dass IL-16 in T-Lymphozyten und bronchialen Epithelzellen zunächst als ein 631 AS großes Vorläufer-Molekül mit einem Molekulargewicht von ca. 67 kDa synthetisiert wird [197]. Enzymatische Spaltung durch Caspase-3 an Serin 511 resultiert in einer 121 AS umfassenden, bioaktiven Form [198].



Abb. 6.1.1:. Schematische Darstellung des IL-16 Proteins. IL-16 beinhaltet zwei je 86 AS umspannende PDZ (Disc-large homology repeats) Domänen und kann durch Caspase-3 Spaltung in das bioaktive IL-16 transformiert werden.

Obwohl die Caspase-3-Aktivität hauptsächlich mit Apoptose in Verbindung steht, kann die Freisetzung von bioaktivem IL-16 auch ohne programmierten Zelltod stattfinden [199]. Über den Mechanismus der Freisetzung ist allerdings wenig bekannt, da sezerniertes IL-16 keine sekretorische Signalsequenz aufweist. CD8⁺ T-Zellen sind in der Lage, vier Stunden nach Stimulation mit Histamin oder Serotonin

IL-16 freizusetzen. Dies geschieht auch bei Inhibition der Proteinbiosynthese, was auf eine intrazelluläre Speicherung von IL-16 hindeutet [200]. Es wurde bereits gezeigt, dass in unstimulierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen vergleichbare Mengen an pro-IL-16 vorliegen [201]. Dieser Befund konnte durch die hier vorliegende Arbeit bestätigt werden, da keine offensichtlichen Unterschiede zwischen naiven T-Zellen (E⁺) und stimulierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nachweisbar waren (Abb. 5.8.3). Obwohl die IL-16 Expression für viele Zelltypen, wie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, epitheliale Zellen [202], Eosinophile [203], Mastzellen [204], Dendritische Zellen [205] und synoviale Fibroblasten [206] gezeigt werden konnte, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit IL-16 erstmals in NK-Zellen nachgewiesen. Des Weiteren konnte es auch in $v\delta 1^+$ und $v\delta 2^+$ T-Zellen immunbiochemisch ermittelt werden, wenn auch in vergleichsweise geringeren Mengen als in $\alpha\beta$ T-Zellen. Neben dem Nachweis von pro-IL-16 in NK-Zellen, wurde auch das bioaktive Fragment des IL-16 in vergleichbarer Menge wie bei CD8⁺ T-Zellen festgestellt. Für CD8⁺ T-Zellen, Eosinophile und Mastzellen konnte bereits eine Speicherung von aktivem IL-16 gezeigt werden [200, 203, 207]. Hierbei ist anzumerken, dass diese Zelltypen durch sekretorische Granula charakterisiert sind. $CD4^+$ Zellen reife generieren sezernierbares IL-16 erst nach Stimulation durch Mitogene oder spezifische Antigene. Im Gegensatz zu CD8⁺ führte bei CD4⁺ T-Zellen eine Inhibition der Biosynthese auch zur Inhibition der IL-16 Sekretion [199]. In den hier untersuchten NK-Zellen konnte gezeigt werden, dass pro-IL-16 bereits in nicht stimulierten CD56⁺/CD3⁻ Zellen vorlag. Nach Stimulation durch einen "Feeder-Cocktail" und Entfernung desselbigen nach 5 Tagen konnte ein deutlicher Rückgang in der pro-IL-16 Expression verzeichnet werden. Anschließend (ab Tag 7) erfolgte ein stetiger Anstieg der Expression, was mit dem Verlauf der FasL-Expression korrelierte (Abb. 5.8.4). Diese Expressionskinetik von pro-IL-16 deckt sich mit den Ergebnissen von Chupp und Kollegen [201], die ebenfalls wie Wilson und Kollegen eine Prozessierung des pro-IL-16 nach T-Zell-Stimulation beobachteten [208].

Die Interaktion von IL-16 mit dem Signalrezeptor CD4 führt zu einer Signalkaskade, die neben der Migration der CD4⁺ Immunzellen auch eine Zellproliferation induziert [209]. Neben den konventionellen CD4⁺ T-Zellen exprimieren auch weitere periphere Immunzellen wie Monozyten [210], Eosinophile [211] und Dendritische Zellen [205] CD4 auf ihrer Oberfläche. Kürzlich konnte sogar gezeigt werden, dass eine NK-Zellsubpopulation aus dem Lymphknoten CD4 in relativ hohem Maße exprimiert und damit in der Lage ist, chemotaktisch in Richtung eines IL-16 Gradienten zu migrieren [212]. Ein Beispiel für die Sekretion immunregulatorischer Zytokine ist die CD56^{bright} NK-Zellpopulation, die konstitutiv den hoch-affinen IL-2 Rezeptor und Zytokine (wie IFN-γ, TNF, GM-CSF, IL-10, IL-8) exprimieren. Diese CD56^{bright} NK-Zellen sind sowohl zu 5-10% im peripheren Blut [213], als auch in Lymphknoten vorhanden [214], wo sie in unmittelbaren Kontakt zu den IL-2 sezernierenden T-Zellen stehen. Basierend auf diesen Befunden und den hier gezeigten Ergebnissen, lassen sich die dynamischen Interaktionen zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem zeigen.

Neben der Expression von IL-16 in NK-Zellen konnte auch dessen Speicherung in FasL-reichen Granula gezeigt werden. Sowohl im Dichtegradienten (Abb. 5.8.5), als auch in der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 5.8.6) korrelierte das Vorkommen von IL-16 mit dem von FasL und CD63 und damit mit einer Kolokalisation in sekretorischen Lysosomen. Als Negativkontrolle für die FasL bzw. IL-16 Färbung dienten die NK-Zelllinien NKL und YTS, die beide keine meßbaren Mengen an IL-16 aufwiesen. In T-Zellen wurde von Wilson und Kollegen auch ein "granuläres" Vorkommen von IL-16 gezeigt, dieses jedoch nicht näher analysiert [208]. Zusammenfassend konnte in der hier vorliegenden Arbeit IL-16 in T-Zellsubpopulationen und NK-Zellen nachgewiesen werden und auch eine Kolokalisation mit FasL und CD63 in sekretorischen Lysosomen gezeigt werden.

6.3 Limitierungen der 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode der Proteomforschung. Neben dem Vorteil, einzelne Isoformen und/oder posttranslationale Modifikationen zu ermitteln, erhält man auch Informationen über den isoelektrischen Punkt und das Molekulargewicht des Proteins. Darin liegen aber auch die Limitierungen der 2D-Gelelektrophorese. Auf einem 2D Gel kann nur eine begrenzte Anzahl an Proteinen dargestellt werden (hier ca. 2000). So fehlen vor allem Proteine, die sehr hohe (>200 kDa) oder geringe (<10 kDa) Molekulargewichte aufweisen. Ebenfalls entgehen extrem saure oder basische Proteine den Analysen. Das größte Problem stellt allerdings die Löslichkeit von sehr hydrophoben Proteinen dar, unter anderem also auch von membranständigen Molekülen. So ist es auch zu erklären, dass keines der membranständigen, lytischen Granulamarkerproteine (FasL, CD63, LAMP-1) im 2D Gel identifiziert werden konnte. Dennoch gab es auch Proteine, wie CD97, das trotz seiner 7 Transmembrandomänen [215] eindeutig im 2D Gel identifiziert werden konnte.

6.4 Proteomanalysen sekretorischer Granula (Fraktion 2) aus T-Zellsubpopulationen

Neben dem Proteom sekretorischer Granula aus NK-Zellen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeiten auch das Proteom lytischer Vesikel aus T-Zellen bestimmt werden. Innerhalb der $\alpha\beta$ T-Zellen existieren CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen. Dabei stellen CD8⁺ Zellen die klassischen zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL) dar, während die CD4⁺ Zellen hauptsächlich immunregulatorische und Helferzell-Aufgaben (Zytokinfreisetzung) haben. Jedoch können auch CD4⁺ T-Zellen unter in vitro Stimulation zytotoxische Effektorfunktionen übernehmen [2]. Derzeit wird angenommen, dass CD4⁺ ZTL eher FasL-vermittelt und CD8⁺ ZTL und NK-Zellen eher durch Granzym/Perforin zytotoxisch aktiv sind [216,217]. Neuere Befunde zeigten jedoch, auch CD4⁺ ZTL dass unter bestimmten Stimulationsbedingungen (CD3/CD46) Granzym B exprimieren [218]. Die in vivo Relevanz der CD4⁺ ZTL ist noch weitestgehend unbekannt, da sie nur 2% der CD4⁺ Gesamtpopulation ausmachen sollen. Ihnen wird jedoch eine Rolle bei chronischen viralen Infektionen zugeschrieben [219].

Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen entwickeln sekretorische Organellen, die nach Stimulation degranulieren [2,51]. Im Vergleich zu CD8⁺ ZTL, bei denen die SL relativ gut charakterisiert sind, ist bei CD4⁺ Zellen bis auf deren Existenz nicht viel bekannt [50]. Kürzlich veröffentlichte Daten zeigten, dass allostimulierte CD4⁺ und CD8⁺ ZTL erstaunlicherweise keine Unterschiede in der mRNA Expression zytolytischer Proteine (Granulysin, Granzym A+B, Perforin) zeigten [220]. Eine Aussage zu Expressionsunterschieden auf Proteinebene konnte hierbei aber nicht getroffen werden, da die lytischen Proteine in Granula gespeichert werden und so der Transkriptomanalyse entgehen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde dieses Problem durch vergleichende Proteomanalysen der sekretorischen Lysosomen umgangen. Zunächst wurde anhand von angereicherten SL aus CD4⁺ und CD8⁺ Zellen eine Proteomkarte erstellt. SL von $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen wurden, analog zu NK-Zellen, über den FasL, CD63 und LAMP-1 definiert und in den Dichtegradientenfraktionen deutlich von anderen Organellen (z.B. Mitochondrien) getrennt (Abb. 5.4.2). Der Anteil Lysosomen- und Exozytose-assoziierter Proteine in der Dichtegradientenfraktion 2 belief sich nach der bioinformatischen Analyse der Proteine im Hinblick auf ihre subzelluläre Lokalisation auf 68,2% (Abb. 5.4.4). Ebenfalls wurden die für

Lysosomen klassischen Cathepsine B, D, H und S und andere lysosomale Hydrolasen in der angereicherten Fraktion 2 gefunden [221].

6.4.1 Proteom FasL-reicher Granula (Fraktion 2)

Differentielle Proteomanalysen erfordern eine hohe Reproduzierbarkeit bei der zwei-dimensionalen Auftrennung. Probenvorbereitung und der In initialen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Anreicherung über die Dichtegradientenzentrifugation hoch reproduzierbar war. Auch vergleichende Analysen von Granula aus CD4⁺ T-Zellen von drei verschiedenen Spendern zeigten ein sehr ähnliches Proteinmuster (>95% identisch, Abb. 5.2.1). Eventuelle spenderspezifische Expressionsprofile konnten durch die "biologische Variationsanalyse" ausgeschlossen werden. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% konnten so subpopulationsspezifische und spenderunabhängige Unterschiede im Proteom sekretorischer Lysosomen nachgewiesen werden.

Unterschiede zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Die zwei-dimensionale differentielle Gelelektrophorese zeigte Unterschiede im Proteinbesatz der sekretorischen (FasL-reichen) Granula der verschiedenen T-Zellsubpopulationen auf. Der Vergleich von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellgranula aus vier verschiedenen Spendern ergab im Gegensatz zu den dargestellten Experimenten der NK-Zellen nur geringe Unterschiede. So beliefen sich die stärksten Änderungen auf das 2,2-fache Spotvolumen (Tab. 5.4.2). Neben Cathepsin B, welches eine Erhöhung in CD4⁺ T-Zellen aufwies, war auch Cathepsin H um das 1,8-fache verstärkt. Beide Proteine sind lysosomale Proteasen. Für Cathepsin B wurde eine schützende Rolle bei der Perforin-vermittelten Zytotoxizität beschrieben. Cathepsin B lagert sich an die Membran der degranulierten ZTL und schützt diese, indem es Perforin degradiert. Dieser Mechanismus würde auch erklären, warum ZTL beispielsweise andere ZTL töten können, ohne dabei selbst eliminiert zu werden [222].

Auf der anderen Seite war in CD8⁺ T-Zellen als einzige Munc18 Isoform Munc18-1 signifikant in allen Spendern erhöht. Dieses Protein bindet an Syntaxin 1 und vermittelt die Exozytose. Bisher wurde für Munc18-1 nur eine Funktion in neuronalen Synapsen beschrieben. Dagegen spielt Munc18-4, welches in keinem der untersuchten Proteome identifiziert werden konnte, eine Rolle in der Fusion zytolytischer Granula mit der Plasmamembran [121,144]. Die Bedeutung der

beschriebenen Unterschiede im Proteinbesatz von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen könnte durch funktionelle Versuche zukünftig aufgeklärt werden.

Unterschiede zwischen $v\delta 1^+$ und $v\delta 2^+$ T-Zellen

Die $v\delta 1^+$ und $v\delta 2^+$ Subpopulationen der $\gamma\delta$ T-Zellen zeigten eine gewebsspezifische Verteilung im Organismus. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind v $\delta 2^+$ T-Zellen hauptsächlich im peripheren Bult und v $\delta 1^+$ T-Zellen in epithelialen Geweben vertreten [7]. Die biologischen Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen werden derzeit intensiv erforscht. Für beide Zelltypen konnten zytotoxische Eigenschaften beobachtet Die werden [223,224]. Analysen der lytischen Granula dieser beiden Subpopulationen aus je zwei Spendern zeigten ebenfalls Unterschiede im Proteinbesatz. Die Differenzen zwischen $v\delta 1^+$ und $v\delta 2^+$ T-Zellen (Tabelle 5.4.3) waren hierbei größer als beim Vergleich der $\alpha\beta$ T-Zellsubpopulationen. Neben den bereits beschriebenen Cathepsinen B und H war auch Granzym A in $v\delta 2^+$ T-Zelllen erhöht. Diese globuläre Serinprotease kann in der Zielzelle Apoptose auslösen und trägt somit zu den zytotoxischen Eigenschaften der $\gamma\delta$ T-Zellen bei. Auf der anderen Seite war das aktinbindende "Gelsolin like capping Protein" in $v\delta 1^+$ T-Zellen erhöht. Dieses Kalzium-sensitive Protein kann Interaktionen mit dem Aktinzytoskelett regulieren, indem es die Enden der Aktinfilamente blockiert. Eine mögliche funktionelle Bedeutung in $v\delta 1^+$ T-Zellen läßt sich ohne weitere Untersuchungen noch nicht zuordnen.

Unterschiede zwischen $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen

In diesen DIGE-Analysen wurden die Granula der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aufgrund ihrer Ähnlichkeit in einer Gruppe zusammengefasst und mit den Granula der $v\delta1^+$ T-Zellen verglichen. Von den 31 differentiellen Spots, die eine mehr als 3,5-fache Änderung im Spotvolumen aufwiesen, konnten 29 identifiziert werden. Der Anteil der verstärkt exprimierten Proteine in $\alpha\beta$ T-Zellen belief sich nur auf 4 von 31 Proteinspots (Tab. 5.4.6). Darunter war mit einer 4,7-fachen Änderung im Spotvolumen das Mikrotubuli-destabilisierende Stathmin 1 [147]. Sowohl Granzym A als auch B zeigten, wie auch MHC Klasse-II und das damit funktionell assoziierte Cathepsin S eine deutliche Erhöhung in der $\gamma\delta$ Zelllinie. Des Weiteren war auch Interleukin-25 (IL-25) um das 4,5-fache in diesen Zellen erhöht. IL-25 ist ein Mitglied der IL-17 Zytokinfamilie und initiiert eine Typ 2 Immunantwort, indem es die Expression von Typ 2 Zytokinen wie IL-5 und IL-13 steuert [225]. Neueste Ergebnisse zeigten, dass IL-25 die entzündungsfördernde Rolle von T_H17 Zellen bei Autoimmunerkrankungen supprimieren kann [226]. Bisher waren als IL-25 Produzenten nur T_H2 und Mastzellen beschrieben worden [227,228]. Jedoch konnte in den Proteomanalysen von Vesikeln aus $\alpha\beta$ Zellen, als auch besonders in $\gamma\delta$ T-Zellpopulationen eine IL-25 Expression nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich in den Reifungsstudien (siehe unten), dass die Proteinmenge von IL-25 in aktivierten Lymphozyten dreimal so hoch war, wie in naiven Lymphozyten. Dementsprechend könnte IL-25 auch von $\gamma\delta$ T-Zellen sezerniert werden, wie dies für aktivierte Mastzellen beschrieben wurde [228].

6.4.2 Relevante Proteine der FasL-Granula

Eine Erhöhung der Sensitivität in den massenspektrometrischen Analysen durch optimierte Probenpräparation ermöglichte auch Identifikationen von niedrig abundanten Proteinen und somit die Erstellung einer detaillierteren Proteomkarte der Iysosomalen Granula aus T-Zellen. Auf einige funktionell relevante und bedeutende Proteine, die nicht bereits schon bei den NK-Zellen genauer beschrieben wurden, soll im Folgenden eingegangen werden (Tab. A2, Abb. A2).

Extended Synaptotagmin 1 (E-Syt1) wurde in den Spots Nr. 155 und 156 der Fraktion 2 aus T-Zellen identifiziert. Dieses Protein wurde erstmalig von Min und Kollegen im Jahr 2007 beschrieben [229]. E-Syt1 setzt sich aus einer N-terminalen Transmembranregion und fünf C-terminalen C₂-Domänen zusammen, von denen die erste Ca²⁺ in einem Phospholipid Komplex binden kann. Während die homologen Proteine E-Syt2 und E-Syt3 aus drei C₂-Domänen bestehen und in der Plasmamembran lokalisiert sind, ist E-Syt1 nur in vesikulären Strukturen zu finden, die jedoch bisher nicht weiter charakterisiert wurden. E-Syt1 könnte allerdings eine ähnliche Funktion ausüben wie das homologe Synaptotagmin VII. Dieses ist in lytischen Granula von ZTL lokalisiert und an der Regulation der Perforin-vermittelte Zytotoxizität beteiligt [44].

N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment Protein alpha (α -SNAP) wurde in den FasL-angereicherten Fraktionen der T- und NK-Zellen identifiziert (Spot Nr. 652 bzw. 262). SNAP- α ist ein Kofaktor, der im Komplex mit Syntaxinen und VAMPs (vesicle associated membrane protein) eine Bindung an membranständige SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein (SNAP) receptor) Proteine ermöglicht und so bei humanen Thrombozyten die Sekretion der
Granula vermittelt [230]. α -SNAP bindet dabei direkt an Syntaxin und aktiviert NSF, welches auch in den hier vorliegenden Ergebnissen identifiziert wurde. Bei Mutation von α -SNAP geht die Bindung verloren und die stimulierte Exozytose wird verhindert [231]. Die Bedeutung dieser exozytotischen Maschinerie konnte bereits für sekretorische Granula von Thrombozyten und Mastzellen gezeigt werden [230,232,233].

Dipeptidyl Peptidase IV (DPPIV, CD26) wurde in den Spots # 67, 77, 81 und # 83-88 identifiziert und ist ein evolutionär hoch konserviertes Typ II Transmembran-Glykoprotein, das in der Regel als Homodimer mit einer molekularen Masse von 220-240 kDa auftritt [234,235]. Funktionell ist neben der Peptidase-Aktivität und Interaktionen mit der extrazellulären Matrix auch eine kostimulatorische Aktivität in T-Zellen beschrieben [236,237]. Außer in T-Zellen, wurde CD26 auch in aktivierten B und NK-Zellen nachgewiesen [238]. Bis zu 70% der peripheren Blutlymphozyten exprimieren CD26 [239]. Im Thymus ist die höchste Expressionsrate bei vollständig differenzierten CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen zu beobachten [240]. Es wurde auch gezeigt, dass eine irreversible, spezifische Inhibition von CD26 die Proliferation und Zytokinproduktion von Mitogen-stimulierten, humanen PBMZ supprimiert [241,242]. Der natürliche Ligand für CD26 ist noch nicht bekannt.

Die eigenen Ergebnisse zeigten, dass sich DPPIV in mindestens 9 Isoformen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten und einem mittleren Molekulargewicht von 120 kDa darstellt (Abb. A2 A). Kähne und Kollegen [243] haben ebenfalls bei Mitogen-aktivierten T-Lymphozyten bis zu 11 Isoformen identifiziert, die im pH Bereich 3,5-5,9 migrierten. Interessanterweise änderte sich bei isolierten Membranen durch Aktivierung das Expressionsmuster. Bei diesen Versuchen wurde jedoch kein Unterschied zwischen der äußeren Plasmamembran und intrazellulären Membranen gemacht. Neben der Lokalisation in der Plasmamembran, ist auch ein Vorkommen von DPPIV in lysosomalen Membranen von Ratten-Hepatozyten [122,244] und sekretorischen Organellen von Langerhans-Zellen [245] und der NK-Zelllinie YTS beschrieben worden [163]. Kyouden und Kollegen [244] stellten des Weiteren fest, dass die Kohlenhydratketten und der Großteil des Proteins ins Lumen der Lysosomen orientiert waren. Die Lokalisation von DPPIV in sekretorischen Granula von T-Lymphozyten wurde nach den derzeit verfügbaren Informationen noch nicht gezeigt.

Es konnte hier gezeigt werden, dass DPPIV in isolierten FasL, LAMP-1 und CD63 angereicherten Granula aus naiven E⁺ Lymphozyten nur in geringen Mengen

vorhanden war. Nach Aktivierung und Expansion für 14 Tage wurde eine 2,7-5,3-fache Erhöhung festgestellt. Dieses Ergebnis konnte auch in Western Blot Analysen bestätigt werden (Abb. 5.7.5). Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass DPPIV hauptsächlich in FasL-tragenden Granula angereichert war (Abb. 5.7.5). Der Vergleich verschiedener T-Zellsubpopulationen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen PHA-Blasten oder expandierten CD4⁺, CD8⁺ bzw. v δ 1⁺ T-Zellen, jedoch war DPPIV in v δ 2⁺ T-Zellen im Vergleich zu v δ 1⁺ T-Zellen um das 2,9-3,2 fache erhöht. Ein Zusammenhang zwischen der gesteigerten Expression von DPPIV in den Lysosomen der T-Zellen und der Expressionskinetik von CD26 auf der Plasmamembran nach Aktivierung ist nahe liegend, muss aber durch weitere Versuche bestätigt werden.

Eine Auswahl funktionell bedeutender Proteine, die in den Proteomanalysen der Fraktion 2 gefunden wurden ist in dem folgenden Modell dargestellt (Abb. 6.4.1). Die dargestellten möglichen Interaktionen mit dem Zytoskelett beruhen auf den Befunden der Literatur [246-248].



Abb. 6.4.1: Hypothetisches Modell der sekretorischen Lysosomen aus Fraktion 2. Das vereinfachte Modell basiert auf den Befunden aus den Proteom- und Western Blot (*) Analysen der Dichtegradientenfraktion 2. Es sind vor allem funktionell bedeutende Proteine dargestellt, wobei laut Literatur interagierende Proteine sich überlappen. Abkürzungen für Proteine lauten wie folgt: DPP4, Dipeptidylpeptidase IV; SLC9A3R1, Solute carrier family 9 isoform A3 regulatory factor 1; WASP, Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein; Arp 2/3, Actin related protein 2/3; vATPase, vakuoläre ATPase 56 kDa; CALR, Calreticulin; ERM Ezrin/Radixin/Moesin.

6.5 Das Proteom Perforin/Granzym B-reicher Granula (Frakt. 6)

Das bestehende Modell für die FasL-vermitteltete Zytotoxizität beschreibt dessen Akkumulation in aktivierten T-Zellen in granulären Strukturen. Ausserdem soll FasL unabhängig von der Proteinneusynthese nach Restimulation freigesetzt werden [51,97,249]. Diese FasL tragenden Granula wurden als "sekretorische Lysosomen" bezeichnet. In ihnen kolokalisiert der FasL mit LAMP-1, CD63, Perforin und Granzymen [51,97]. In eigenen fluoreszenzmikroskopischen Versuchen konnte eine nahezu vollständige Kolokalisation von FasL mit CD63 und Granzymen beobachtet werden. Allerdings zeigte sich bei der Vesikelanreicherung im Dichtegradienten eine andere Verteilung dieser Proteine. So wurde FasL zusammen mit CD63 und LAMP-1 in der weniger dichten Fraktion 2 und Granzym B hauptsächlich in der sehr dichten Fraktion 6 angereichert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten sehr elektronendichte Granula von etwa 300 nm Größe. Neben der Anreicherung von Granzym B und Perforin wurde auch die reife Form (9 kDa) des Granulysins festgestellt. Wie erwähnt kann Granulysin neben verschiedenen Bakterien und Pilzen auch andere Pathogene wie Plasmodium falciparum und Mykobakterien lysieren [92,250,251]. Besonders interessant ist der Befund, dass $v\gamma 9/v\delta 2$ T-Lymphozyten in der Lage sind, intrazelluläre M. tuberculosis Bakterien durch granuläre Exozytose von Granulysin zu töten [252]. Die zytotoxische Aktivität des Granulysins bildet sich erst durch posttranslationale Prozessierung am N- als auch am C-Terminus, wofür eine Ansäuerung der Granulysin tragenden Granula notwendig ist [253]. Hierdurch entsteht aus der 15 kDa Vorform das aktive 9 kDa Granulysin [88]. Die Analysen der ergaben, Dichtegradientenfraktionen dass in FasL-reichen Granula beide Proteinformen zu finden waren. Dagegen dominierte die lytisch aktive 9 kDa Form in der Fraktion 6, zusammen mit Perforin. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Perforin die lytische Aktivität von Granulysin steigern kann [254]. Die Verteilung der zwei Reifungsformen des Granulysins war nicht nur bei PHA-Blasten (Abb. 5.1.2), sondern bei allen untersuchten T-Zellsubpopulationen festzustellen (Abb. 5.5.1). Des Weiteren ergaben mikroskopische Aufnahmen eine nahezu 100%-ige Kolokalisation von Granulysin mit den Granzymen A und B in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Hierbei konnte jedoch nicht zwischen den beiden Proteinformen unterschieden werden.

Da diese Ergebnisse teilweise eine Diskrepanz zum bestehenden Modell der FasL-Kolokalisation mit lytischen Proteinen im selben Organell darstellten, sollte eine detaillierte Proteomanalyse der Fraktion 6 Aufschluss über deren Proteinbesatz geben. Im Vergleich zur Fraktion 2 aus demselben Dichtegradienten ergab sich ein sehr unterschiedliches Proteinmuster auf dem 2D-Gel (Abb. 5.5.6). Trotz der Nähe zu den angereicherten Mitochondrien im Dichtegradienten, konnten 50% der Proteine einer bereits beschriebenen, lysosomalen oder sekretorischen Lokalisation zugeordnet werden (Abb. 5.5.7). Neben den sekretorischen Komponenten wie Granzym A / B und Perforin wurden auch viele lysosomale Proteasen identifiziert und dies, obwohl in dieser Fraktion LAMP-1 und CD63 im Western Blot kaum nachgewiesen werden konnten (Abb. 5.1.2). Neben verschiedenen lysosomalen Hydrolasen in der Fraktion 6, weckte die Dipetidylpeptidase II (DPPII) besonderes Interesse.

Die Dipeptidylpeptidase II (DPPII, DPP7, QPP) [255] ist wie auch DPPIV eine glykosylierte Protease, die nach X-Prolin schneidet. Sie wurde erstmals 1966 von McDonald und Kollegen beschrieben [256]. Obwohl die eigentliche physiologische Rolle von DPPII noch weitgehend unbekannt ist, wurden verschiedene Funktionen vorgeschlagen. So scheint das Protein in Zelldifferenzierung, Schutz vor Apoptose und Degradation von Kollagen, Myofibrillen und kurzen Neuropeptiden involviert [257]. Im Gegensatz zu DPPIV, die sowohl in der Plasmamembran als auch in Lysosomen lokalisiert ist, befindet sich DPPII exklusiv in lysosomalen Organellen [258-260]. In Mastzellen wurde DPPII auch in sekretorischen Granula gefunden [261]. Hier kann es durch induzierte Exozytose auch extrazelluläre Funktionen übernehmen. DPPII wurde in 60-80% humaner Lymphozyten nachgewiesen, jedoch wurde im Gegensatz zu DPPIV keine Steigerung der Proteinmenge nach Stimulation z.B. in T-Zelllinien beobachtet [262]. Interessanterweise konnten in Jurkat T-Zellen DPPII-reiche Vesikel identifiziert werden, die eine höhere Dichte als LAMP-1 tragende Organellen aufwiesen und nicht zum trans-Golgi Netzwerk (TGN) gehörten. Des Weiteren zeigte der Proteinase K Verdau eine Lokalisation innerhalb dieser Vesikel, die nach Ca²⁺-Freisetzung das funktionell aktive DPPII sezernieren [263]. In der vorliegenden Arbeit wurde DPPII ebenfalls nur in den elektronendichten Granzym B⁺ / LAMP-1⁻ / CD63⁻ Vesikeln (Fraktion 6) von expandierten Lymphozyten identifiziert (Spot #206) (Anhang: Tab. A3, Abb. A3). Da es sich in den 2D-Analysen als ein niedrig abundantes Protein darstellte, bedarf der Nachweis einer Anreicherung in Fraktion 6 einer immunbiochemischen Verifizierung.

Neben DPPII wurden auch Perforin und Granzym B in größeren Mengen in Fraktion 6 identifiziert. Diese Proteine werden ebenfalls nach Ca²⁺-Freisetzung sezerniert [264]. Diese Befunde deuteten an, dass es sich um zwei distinkte Organellenpopulationen handelt, die auch in unterschiedlicher Abhängigkeit vom

Ca²⁺-Signal degranulieren und einen unterschiedlichen Besatz an zytotoxischen Effektorproteinen speichern bzw. transportieren.

Der Vergleich zwischen der Fraktion 2 und 6 ergab auch erhebliche Unterschiede im Proteinbesatz Zytoskelett-assoziierter Proteine. Während β-Aktin und Aktininteragierende Proteine verstärkt in der Fraktion 2 auftraten, wurde in Fraktion 6 vor allem Myosin IIA (#62,63) und Myosin light chain (#615) nachgewiesen. Andzelm und Kollegen zeigten, dass gezielte Inhibition von Myosin IIA (Myosin 9) zur Blockierung der Granzym B Sekretion und somit zur Verminderung der Zytotoxizität von NK-Zellen führte. Dabei waren von der Inhibition weder die Zielzellkonjugation, noch die Aktin-Ringbildung (pSMAC) an der immunologischen Synapse oder die Reorganisation des MTOC und die FasL-Freisetzung betroffen [102]. Auf der anderen Seite zeigten Ostergaard und Kollegen [105] sowie Befunde der eigenen Arbeitsgruppe [265], dass die FasL-Freisetzung in zwei Wellen erfolgt. Hierbei ist die erste Welle (10-15 min) auf der Aktin-abhängigen und Mikrotubuli-unabhängigen Exozytose gespeicherten FasL zurückzuführen, während die zweite Welle (nach 2 h) auf der de novo Synthese des FasL beruht. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die schnelle Freisetzung von gespeichertem FasL Ca²⁺-unabhängig verläuft, wohingegen die Expression von neu synthetisiertem FasL Ca²⁺-abhängig ist [105]. Die Konzentration an Ca²⁺ ist dabei von der Stärke des TZR Signals abhängig [266,267]. So konnte in zwei unabhängigen Studien eine FasL Freisetzung bei schwachem und eine FasL de novo Synthese und Degranulation (Granzym A Freisetzung) bei starkem TZR Signal gezeigt werden [106,107].

Diese Daten stützen ebenfalls die Hypothese, dass FasL in distinkten Granula gespeichert und auch freigesetzt wird. Wie in Abb. 5.4.2 A dargestellt, befinden sich Granzym B und Perforin in CD8⁺ ZTL zum Teil in dichteren Fraktionen als FasL. Dieser Unterschied ließ sich allerdings nicht in der konfokalen Mikroskopie nachweisen, da eine Auflösung dieser feinen Strukturen nicht möglich war. Ostergaard und Kollegen konnten jedoch keine Kolokalisation von FasL mit Perforin und Granzym B in murinen ZTL feststellen. Allerdings waren auch Cathepsin D und LAMP-1 nicht in den FasL Granula zu finden. Dies steht eindeutig im Gegensatz zu den Befunden der eigenen Arbeitsgruppe und auch den Analysen im Rahmen der speziesvorliegenden Arbeit. Dieser Widerspruch könnte auf und/oder aktivierungsspezifische Unterschiede zurückzuführen sein oder aber auf unterschiedliche Interpretationen der mikroskopischen Aufnahmen. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Kassahn und Kollegen wurde ebenfalls mit Mauszellen durchgeführt. Auch hier konnte eine Ca²⁺-unabhängige Oberflächentranslokation des FasL gezeigt werden. Latrunculin B, ein Inhibitor der Aktinpolymerisation blockierte den Transport des FasL zur immunologischen Synapse [108]. Befunde der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass das Adapterprotein NCK den FasL bindet und mit WASP verknüpft [246]. WASP ist wiederum ein Aktivator der Aktinpolymerisation [268]. Sowohl WASP, als auch NCK wurden in den Proteomanalysen der Fraktion 2, jedoch nicht in der Fraktion 6 gefunden. Dies könnte auf einen exklusiven Transportmechanismus für FasL Granula hindeuten, der unabhängig von einer Perforin/Granzym B Degranulation verläuft.

Die Hypothese einer unterschiedlichen Assoziation mit dem Zytoskelett wird auch durch die verstärkt in Fraktion 2 auftretenden Proteine, β -Aktin und α -Aktinin 4 gestützt (Abb. 5.5.8 B). α -Aktinin-4 bündelt Aktin und trägt somit unter anderem zur Regulation der durch das Aktinzytoskelett vermittelten Exozytose bei [269]. **Cathepsin W** (oder Lymphopain) war ein weiteres Protein, welches ein exklusives Vorkommen in den elektronendichten Organellen aufwies (Abb. 5.5.8 A). Cathepsin W ist eine putative Cysteinprotease mit unbekannter Funktion, deren Expression auf NK-Zellen und CD8⁺ ZTL begrenzt ist. Obwohl Cathepsin W in diesen potenten, zytotoxischen Zellen bei Zielzellkontakt sezerniert wird, ist die Protease anscheinend für die Eliminierung der Zielzellen nicht essentiell [270].

In der nachfolgenden Abbildung ist ein vereinfachtes, hypothetisches Modell zu diesem außergewöhnlichen Organell dargestellt (Abb. 6.5.1).



Abb. 6.5.1: Modell zur Fraktion 6 in einer vereinfachten Darstellung. Die Proteomanalyse der elektronendichten Vesikel zeigte einige Proteine auf, die ebenfalls in den FasL-reichen Vesikeln identifiziert wurden (Flotilin, lysosomale ATPase, Hydrolasen). Jedoch wurde bei einigen Proteinen ein nahezu exklusives Vorkommen in diesen Granula nachgewiesen. Hierzu zählten: DPP2, Granzym B, Perforin, Cathepsin W, Myosin IIA. Ein potentielles Verbindungsprotein zwischen der Vesikelmembran und Myosin IIA ist als Linker dargestellt (+).

6.6 Die Reifung sekretorischer Lysosomen

6.6.1 Expression zytolytischer Proteine in Lymphozyten und deren Subpopulationen

Die Aktivierung ruhender T-Lymphozyten erfolgt durch die Stimulation über den TZR und kostimulatorische Moleküle (z.B. CD28). Ruhende T-Lymphozyten sind klein (ca. 5 µm) und rund und besitzen nur wenig Zytoplasma und Organellen. Einige Stunden bis Tage nach Aktivierung transformieren sie zu größeren "Blasten", einhergehend mit der Ausdehnung des Zytoplasmas. Neben der Initiation der Zellteilung, erfolgt auch die Ausbildung und Reifung sekretorischer Lysosomen. Ein erneute Erkennung über den TZR führt neben der bereits beschriebenen Degranulation der zytolytischen Granula auch zur erneuten Aktivierung und der damit verbundenen Proteinsynthese und Organellenreifung. Ohne eine erneute Aktivierung ähneln die T-Lymphozyten phänotypisch nach ungefähr 28 Tagen wieder unstimulierten Zellen [271].

Während der Reifung der Lysomen erfolgt eine Akkumulation lysosomaler Proteine (wie z.b. LAMP-1 und β-Glukoronidase) in elektronendichten Strukturen. Zur Biogenese lytischer Proteine und der damit verbundenen Zytotoxizität gibt es in der Literatur widersprüchliche Daten. So zeigte eine mit murinen ZTL durchgeführte Studie ein Maximum in der zytolytischen Aktivität bereits 36-42 Stunden nach Aktivierung [2]. Dagegen wurde bei einem humanen CD8⁺ ZTL Klon das Maximum erst nach 10 Tagen bestimmt [271]. Wie bereits in eigenen Proteomanalysen für NK-Zellen gezeigt werden konnte, spiegeln Modellzelllinien nicht immer den Gehalt vieler zytotoxischer Proteine in normalen (nicht maligne transformierten) Zellen wieder [272]. Deshalb wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Reifung der sekretorischen Lysosomen auf Proteomebene verfolgt.

In initialen Experimenten konnte die Kinetik der Expression von zytolytischen Proteinen, wie FasL, Perforin und Granulysin bei PHA-Blasten durch Western Blot Analysen beobachtet werden. Hierbei war insgesamt eine Steigerung der Expression der genannten Proteine zu verzeichnen, wobei FasL die geringste Änderung zeigte (Abb. 5.6.1.A). Diese Ergebnisse deckten sich mit den Befunden aus aktivierten Maussplenozyten [148]. Bei diesen Experimenten wurde jedoch außer Acht gelassen, dass die Lymphozytensubpopulationen möglicherweise unterschiedlich expandieren. Bei gleichzeitiger Probenentnahme aus der Alloantigen-stimulierten Zellkultur konnte in der vorliegenden Arbeit in FACS-Analysen eine Erhöhung der CD8⁺ Population um 50% und eine deutliche Reduktion der CD4⁺ Population festgestellt werden (Abb.5.6.1 B). Des Weiteren wurde auch eine signifikante Erhöhung (~3-fach) von NKT-Zellen ermittelt, die sowohl den NK-Zellmarker CD56, als auch CD3 tragen. Die Verschiebung im Lymphozytenverhältnis konnte reproduzierbar bei vier verschiedenen Spendern beobachtet werden.

Es stellte sich die Frage, inwieweit diese Änderung der Subpopulationen einen Einfluss auf die Expression der zytolytischen Moleküle hatte. Um diese Frage zu beantworten, wurden in einem nächsten Schritt die einzelnen Subpopulationen (CD4⁺, CD8⁺, NK) isoliert betrachtet. Durch negative Selektion wurde ein möglicher stimulatorischer Effekt durch die Isolierung ausgeschlossen. Die Analyse individueller zytotoxischer Proteine in separierten Subpopulationen ergab in der Tat ein differentielles Muster. So zeigten CD8⁺ T-Zellen direkt nach der Isolation aus PBMZ die stärkste Perforinexpression, die im Vergleich zu naiven CD4⁺ T-Zellen ebenfalls deutlich erhöht schien (Abb. 5.6.2 B). Ähnliche Befunde wurden auch von Ortaldo et al. berichtet [273]. Dieser Pool an Perforin scheint sowohl in CD8⁺ T-Zellen als

auch in NK-Zellen zurückzugehen, um dann ab Tag 11 nach Stimulation aufgefüllt zu werden. Selbst nach 18 Tagen Zellkultur wurde das Ausgangsniveau jedoch nicht wieder erreicht. Einen ähnlichen Verlauf zeigte auch Granulysin. Dieses ebenfalls zytolytische Protein war in großen Mengen in naiven CD8⁺ T-Zellen vorhanden und wies, nach Rückgang auf ein nicht mehr meßbares Level, erst ab Tag 11 eine Zunahme auf. Der Rückgang dieser beiden lytischen Proteine deutet auf eine initiale Degranulation der lytischen Granula hin. Erstaunlicherweise korrelierte die Kinetik von Granzym B nicht mit dem beschriebenen Verlauf. Das Maximum der Expression wurde an Tag 4 nach Primärstimulation verzeichnet. Diese Kinetik war reproduzierbar in isolierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von vier untersuchten Spendern (Abb. 5.6.3) und deutet auf eine Speicherung von Granulysin und Perforin in zirkulierenden CD8⁺ T-Zellen hin, während die Expression von Granzym B erst nach Aktivierung hochreguliert wird. Eine mögliche substituierende Rolle durch Granzym A wurde nicht untersucht. NK-Zellen zeigten ein ähnliches Expressionsprofil, jedoch war hier das Expressionsmaximum von Granzym B zu einem noch späteren Zeitpunkt (Tag 17).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die klassischen zytotoxischen Zellen (NKund CD8⁺) bereits große Mengen lytischer Proteine wie Perforin, FasL und Granulysin enthalten, jedoch Granzym B erst nach Aktivierung oder "Priming" (bei NK-Zellen) hochreguliert wird. Es ist allerdings zu beachten, dass die Expression zytotoxischer Effektorproteine keineswegs mit der zytolytischen Kapazität der Zellen einhergehen muss. In murinen Milzzellen aus denen nach TZR-Aktivierung CD8⁺ T-Zellen isoliert wurden, konnte ein Expressionsmaximum von Perforin und Granzym B nach 16-42 Stunden beobachtet werden, während in naiven CD8⁺ T-Zellen keine Detektion möglich war [2]. Diese Diskrepanzen lassen sich möglicherweise durch den unterschiedlichen Reife/Aktivierungszustand der ZTL in Milz und Blut erklären.

6.6.2 Proteomanalysen zur Reifung sekretorischer Granula

Die Biogenese sekretorischer Granula wurde bisher nur auf morphologischer und funktioneller Ebene verfolgt [271,274]. Dies wahrscheinlich nicht zuletzt, weil Proteomanalysen subzellulärer Fraktionierungen eine ausreichende Menge an Probenmaterial erfordern. So war es in der vorliegenden Arbeit notwendig, isolierte Lymphozyten aus vier verschiedenen Spendern zu vereinen, um eine entsprechende subzelluläre Fraktionierung durchzuführen zu können. Nach der Literaturlage und aufgrund der eigenen Reifungsstudien wurden diese ruhende Zellen mit 14 Tage expandierte Lymphozyten (PHA-Blasten) verglichen. Bereits die initiale Analyse der subzellulären Fraktionen zeigte eine deutliche Zunahme der Perforinexpression, während die FasL-Expression kaum beeinflußt war (Abb. 5.6.1 A). Dieser Befund bestätigte die dargestellten Western Blot Ergebnisse (Abb. 5.7.2). Nachfolgend wurden nun in DIGE Experimenten die Fraktion 2 bzw. 6 von unstimulierten mit stimulierten Lymphozyten miteinander verglichen.

Die Reifung der FasL-tragenden Granula

Der direkte Vergleich der Fraktionen 2 in DIGE Experimenten ergab ein differentielles Proteinprofil zwischen den Granula aus naiven und aktivierten Zellen (Abb. 5.7.3). Zu den Proteinen, die erst in aktivierten Zellen zu beobachten waren, gehörten unter anderem: Die v-Typ Protonen ATPase, die Protonen in das Lumen der Lysosomen transportiert und somit eine Ansäuerung bewirkt; MHC Klasse-II Komplexe und das funktionell assoziierte Cathepsin S; Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV) und Interleukin-25, deren Funktionen bereits oben beschrieben wurden und schließlich Granzym A. welches ebenfalls eine deutliche Erhöhung in den gereiften Granula zeigte (Abb. 5.7.4). Für VDAC-1 (voltage dependent anion channel 1) wurde sowohl eine Lokalisation in der äußeren Mitochondrienmembran [275], als auch in synaptischen Vesikeln des Rattenhirns beschrieben [276]. Die Änderungen im Spotvolumen sind somit schwierig zu interpretieren. Auf der anderen Seite waren Annexin A1, der intrazelluläre Chloridkanal 1 und der ARP 2/3 Komplex in den naiven Zellen deutlich erhöht. Die Verringerung der Expression des Anionenkanals steht wahrscheinlich auch im Zusammenhang mit der Ansäuerung des Lysosoms. Der ARP 2/3 Komplex ist an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt. Annexin A1 gehört zur Gruppe der Kalzium- und Phospholipid-bindenden Annexin Superfamilie und wurde bereits in anderen exozytotischen Vesikeln nachgewiesen [277]. Funktionell, scheint Annexin A1 eine Rolle in der Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen zu spielen [278]. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass anhand der Änderung des Proteinprofils sowohl die funktionell wichtige Ansäuerung, als auch die Beladung mit immunmodulatorischen (MHC Klasse-II Komplexe, IL-25) und zytotoxischen Effektormolekülen (Granzym A) beobachtet werden konnte.

Die Reifung der Granzym B-tragenden Granula

Wie sich in den oben beschriebenen Analysen der Gradientenfraktionen herausstellte, war in der Fraktion 6 von aktivierten und expandierten Zellen das stärkste Vorkommen an Granzym B und Perforin zu verzeichnen (Abb. 5.5.1). Diese Ergebnisse deckten sich mit den DIGE Analysen zur Reifung dieser Vesikel. Während in Organellen aus naiven Lymphozyten noch kein Granzym B und Perforin festgestellt werden konnte, wiesen die Granula der expandierten Zellen große Mengen dieser Proteine auf (Abb. 5.7.7). Ebenfalls war auch das bereits erwähnte Myosin IIA deutlich erhöht. Im Gegensatz dazu war beispielsweise Septin 2 in den gereiften Granula nicht mehr nachweisbar. Septine sind zytosolische GTPasen und wichtig für die Zytokinese und Exozytose [279]. Es konnte gezeigt werden, dass Septin 2 direkt an Myosin IIA bindet und hierbei für die volle Aktivierung von Myosin IIA in sich teilenden Zellen verantwortlich ist [280]. Eine Rolle von Septin 2 in der Exozytose wurde noch nicht beschrieben, allerdings kann das 60% homologe Septin 5 kompetetiv zu α -SNAP exozytotisch relevante Syntaxine binden und dadurch die Exozytose inhibieren [281].

In dieser Fraktion konnte ebenfalls eine Beladung der Granula mit zytotoxischen Proteinen beobachtet werden, jedoch wurden im Gegensatz zur Fraktion 2 nicht nur Granzym A, sondern auch Granzym B und Perforin in größeren Mengen als in unstimulierten Zellen nachgewiesen.

7. Zusammenfassung

Zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK) sind in der Lage entartete und virusinfizierte Zellen gezielt zu eliminieren. Hierzu werden zytolytische Moleküle in spezialisierten bifunktionellen Granula gespeichert. Diese zytotoxischen Granula vereinen degradative Eigenschaften konventioneller Lysosomen mit sekretorischen Funktionen und werden deshalb als sekretorische Lysosomen bezeichnet. Für die Proteomanalysen sekretorischer Lysosomen war es notwendig ein Protokoll zur Anreicherung intakter Vesikel zu etablieren. Separierte Organellen konnten anhand Markerproteinen individuellen Fraktionen zugeordnet Zur von werden. vergleichenden Proteomanalyse der lysosomalen Fraktionen wurde eine Plattform für zwei-dimensionale differentielle Gelelektrophorese (2D-DIGE) etabliert, die eine robotergestützte Probenvorbereitung und -prozessierung für die folgende massenspektrometrische Identifizierung individueller Proteine erlaubte. Die massenspektrometrischen Analysen wurden in enger Kooperation mit Dr. Christoph Gelhaus in der Abteilung Zoophysiologie des Zoologischen Instituts der CAU (Leitung von Prof. Dr. Matthias Leippe) durchgeführt.

Die erarbeitete Methodologie wurde zunächst an polyklonalen T-Zellsubpopulationen verschiedener Spender validiert. In der Folge wurde eine Proteomkarte angereicherter sekretorischer Lysosomen aus NK-Zelllinien (NKL, YTS) und primären NK-Zellen erstellt. Hierbei wurden 397 Proteine identifiziert. Über 2D-DIGE identifizierte Unterschiede im Expressionsprofil einzelner funktionell relevanter Proteine in leukämischen und nicht transformierten NK-Zellen wurden mit biochemischen, mikroskopischen und durchflußzytometrischen Methoden verifiziert. Darüber hinaus wurde erstmalig das Chemokin Interleukin-16 in primären NK-Zellen

Anschließend wurde das Proteom von sekretorischen Lysosomen aus T-Lymphozyten analysiert. Es wurde eine Proteomkarte mit 751 identifizierten Proteinen erstellt, die eine vergleichende Analyse der sekretorischen Vesikel aus $\alpha\beta$ (CD4⁺ und CD8⁺) und $\gamma\delta$ (v δ 1⁺ und v δ 2⁺) T-Zellen erlaubte. Entgegen den eigenen Befunden zur Reifung sekretorischer Granula innerhalb der einzelnen Subpopulationen, waren nur relativ geringe Unterschiede im Proteinbesatz sekretorischer Vesikel von expandierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen festzustellen.

Die weiterführenden Analysen deuteten darauf hin, dass einige lytische Proteine (Granzym B, Granulysin) vorzugsweise in distinkten, elektronendichten Organellen gespeichert werden, die in der Fraktionierung von den FasL-tragenden sekretorischen Lysosomen separieren. Die Fraktion dieser dichten Granula wurde über die Identifizierung von 392 Proteinen charakterisiert. Der Proteinbesatz der beiden Fraktionen korrelierte mit den vorgenannten Befunden und deutet auf eine unterschiedliche Verknüpfung der beiden Arten von Granula mit dem Zytoskelett hin. Die Reifung der beiden Granulatypen wurde auf Proteomebene vergleichend analysiert. Dabei wurden neben der Anreicherung lytischer Proteine auch Unterschiede in der Verteilung von Proteinen identifiziert, die für die Ansäuerung und Funktionalisierung der lytischen Kompartimente verantwortlich sein könnten.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das luminale Proteom sekretorischer Lysosomen charakterisiert. Die vergleichenden Analysen der unreifen und reifen Vesikel bilden die Grundlage für geplante Untersuchungen zur Funktionalität dieses Iysosomalen Kompartiments in NK-Zellen und verschiedenen T-Zellsubpopulationen.

8. Summary

Cytotoxic T cells and Natural Killer cells (NK) are able to directly eliminate transformed or virus-infected cells. To this end, cytolytic molecules are stored in specialized bi-functional organelles that combine properties of conventional lysosomes and exocytotic vesicles. These organelles have therefore been termed "secretory lysosomes". In the course of this PhD work, a protocol for the enrichment of intact vesicles was established to subsequently perform proteomic analyses of secretory lysosomes. Separated fractions were allocated to individual organelles using specific marker proteins. For comparative proteome analyses a two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) platform was established in the laboratory for Molecular Immunology. This robot-based platform enables us to prepare and process samples for mass-spectrometry in a high-throughput manner. All mass-spectrometric analyses were done in cooperation with Dr. Christoph Gelhaus in the department of Zoophysiology at the Zoological Institute of the Christian-Albrechts University (head: Prof. Dr. Matthias Leippe).

The developed methodology was initially validated with polyclonal T cell subpopulations of different donors. Subsequently, a proteomic map with 397 identified proteins of enriched secretory lysosomes of NK cell lines (NKL, YTS) and primary NK cells was established. Differences in the expression-profile of functionally relevant proteins in leukemic and non-transformed NK cells were verified by biochemical, microscopical and flow cytometrical assays. In this context, the chemokine Interleukin-16 was detected for the first time in primary (but not in leukemic) NK cells.

Subsequent proteomic analyses of secretory lysosomes of T cells resulted in an extended proteome map with 751 identifications, and allowed the comparative analyses of secretory vesicles of $\alpha\beta$ (CD4⁺ and CD8⁺) and $\gamma\delta$ (v δ 1⁺ and v δ 2⁺) Overall, only minor but reproducible differences in the expression profile of secretory vesicles in expanded CD4⁺ and CD8⁺ T cells were detected. Further analyses including experiments to follow the activation dependent maturation in T cells, pointed to a storage of some lytic proteins (e.g. Granzyme B, Granulysin) in distinct, electron-dense organelles which separated during fractionation from FasL-carrying secretory lysosomes. The proteome of these dense granules was characterized by the identification of 392 proteins. Protein profiles of the two fractions correlated with aforementioned granular peculiarities and also pointed to a different connection of

the two granular compartments to the cytoskeleton. The maturations of both types of vesicles were also compared at the proteome level showing an enrichment of select lytic proteins. Furthermore, within the two fractions, proteins for acidification and functionalization of lytic compartments differed to some extend.

With the present study, the luminal proteome of different cytotoxic effector populations was characterized for the first time. The comparative analyses of mature and immature vesicles within different subpopulations of T cells and NK cells will enable a better understanding of the compositional functionality of this effector compartment within immune cells.

9. Literaturverzeichnis

- 1. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S: Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008, 9: 503-510.
- Shen DT, Ma JS, Mather J, Vukmanovic S, Radoja S: Activation of primary T lymphocytes results in lysosome development and polarized granule exocytosis in CD4+ and CD8+ subsets, whereas expression of lytic molecules confers cytotoxicity to CD8+ T cells. *J Leukoc Biol* 2006, 80: 827-837.
- 3. Jolly C, Sattentau QJ: Regulated secretion from CD4+ T cells. Trends Immunol 2007, 28: 474-481.
- 4. Hayday A, Tigelaar R: Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol* 2003, 3: 233-242.
- 5. Carding SR, Egan PJ: Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2002, 2: 336-345.
- 6. Kabelitz D, Wesch D, Hinz T: gamma delta T cells, their T cell receptor usage and role in human diseases. *Springer Semin Immunopathol* 1999, 21: 55-75.
- Holtmeier W, Pfander M, Hennemann A, Zollner TM, Kaufmann R, Caspary WF: The TCR-delta repertoire in normal human skin is restricted and distinct from the TCR-delta repertoire in the peripheral blood. *J Invest Dermatol* 2001, 116: 275-280.
- 8. Gertner J, Wiedemann A, Poupot M, Fournie JJ: Human gammadelta T lymphocytes strip and kill tumor cells simultaneously. *Immunol Lett* 2007, 110: 42-53.
- 9. Gregoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E *et al.*: The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* 2007, 220: 169-182.
- 10. Zhang Y, Wallace DL, de Lara CM, Ghattas H, Asquith B, Worth A *et al.*: In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology* 2007, 121: 258-265.
- 11. Jamieson AM, Isnard P, Dorfman JR, Coles MC, Raulet DH: Turnover and proliferation of NK cells in steady state and lymphopenic conditions. *J Immunol* 2004, 172: 864-870.
- 12. Nitta T, Yagita H, Sato K, Okumura K: Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *J Exp Med* 1989, 170: 1757-1761.
- 13. Long EO: Ready for prime time: NK cell priming by dendritic cells. Immunity 2007, 26: 385-387.
- 14. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A: Dendritic cells prime natural killer cells by transpresenting interleukin 15. *Immunity* 2007, 26: 503-517.
- 15. Lee SH, Miyagi T, Biron CA: Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. *Trends Immunol* 2007, 28: 252-259.
- 16. Trinchieri G: Biology of natural killer cells. Adv Immunol 1989, 47: 187-376.
- 17. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R: Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986, 319: 675-678.
- 18. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH: Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 2001, 413: 165-171.
- 19. Kelly JM, Darcy PK, Markby JL, Godfrey DI, Takeda K, Yagita H *et al.*: Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. *Nat Immunol* 2002, 3: 83-90.
- 20. Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM: Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 2002, 195: 335-341.
- 21. Lu L, Ikizawa K, Hu D, Werneck MB, Wucherpfennig KW, Cantor H: Regulation of activated CD4+ T cells by NK cells via the Qa-1-NKG2A inhibitory pathway. *Immunity* 2007, 26: 593-604.
- 22. van Dommelen SL, Sumaria N, Schreiber RD, Scalzo AA, Smyth MJ, gli-Esposti MA: Perforin and granzymes have distinct roles in defensive immunity and immunopathology. *Immunity* 2006, 25: 835-848.

- 23. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A *et al.*: Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 2004, 5: 1260-1265.
- 24. Baron R, Neff L, Louvard D, Courtoy PJ: Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *J Cell Biol* 1985, 101: 2210-2222.
- 25. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S: Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 1989, 245: 855-857.
- 26. Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschot V, Ploegh HL, Geuze HJ: Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 1991, 349: 669-676.
- 27. McNicol A, Israels SJ: Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res* 1999, 95: 1-18.
- 28. Marone G, Casolaro V, Patella V, Florio G, Triggiani M: Molecular and cellular biology of mast cells and basophils. *Int Arch Allergy Immunol* 1997, 114: 207-217.
- 29. Orlow SJ: Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J Invest Dermatol* 1995, 105: 3-7.
- 30. Raposo G, Fevrier B, Stoorvogel W, Marks MS: Lysosome-related organelles: a view from immunity and pigmentation. *Cell Struct Funct* 2002, 27: 443-456.
- Stinchcombe J, Bossi G, Griffiths GM: Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes. Science 2004, 305: 55-59.
- Bright NA, Reaves BJ, Mullock BM, Luzio JP: Dense core lysosomes can fuse with late endosomes and are reformed from the resultant hybrid organelles. J Cell Sci 1997, 110 (Pt 17): 2027-2040.
- Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC: Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. J Cell Sci 2000, 113 (Pt 9): 1515-1524.
- Kleijmeer M, Ramm G, Schuurhuis D, Griffith J, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P *et al.*: Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J Cell Biol* 2001, 155: 53-63.
- Bunbury A, Potolicchio I, Maitra R, Santambrogio L: Functional analysis of monocyte MHC class II compartments. FASEB J 2009, 23: 164-171.
- 36. Carlsson SR, Fukuda M: Structure of human lysosomal membrane glycoprotein 1. Assignment of disulfide bonds and visualization of its domain arrangement. *J Biol Chem* 1989, 264: 20526-20531.
- Cuervo AM, Dice JF: A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. Science 1996, 273: 501-503.
- 38. Pols MS, Klumperman J: Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res* 2008.
- Majeski AE, Dice JF: Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. Int J Biochem Cell Biol 2004, 36: 2435-2444.
- Eskelinen EL: Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med* 2006, 27: 495-502.
- 41. Agarraberes FA, Terlecky SR, Dice JF: An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J Cell Biol* 1997, 137: 825-834.
- 42. Agarraberes FA, Dice JF: A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci* 2001, 114: 2491-2499.
- Raposo G, Tenza D, Murphy DM, Berson JF, Marks MS: Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J Cell Biol* 2001, 152: 809-824.
- 44. Fowler KT, Andrews NW, Huleatt JW: Expression and function of synaptotagmin VII in CTLs. *J Immunol* 2007, 178: 1498-1504.
- 45. Masson D, Peters PJ, Geuze HJ, Borst J, Tschopp J: Interaction of chondroitin sulfate with perforin and granzymes of cytolytic T-cells is dependent on pH. *Biochemistry* 1990, 29: 11229-11235.

- 46. Raja SM, Wang B, Dantuluri M, Desai UR, Demeler B, Spiegel K *et al.*: Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis. Characterization of the macromolecular complex of granzyme B with serglycin. *J Biol Chem* 2002, 277: 49523-49530.
- 47. Kolset SO, Prydz K, Pejler G: Intracellular proteoglycans. *Biochem J* 2004, 379: 217-227.
- 48. Stevens RL, Otsu K, Weis JH, Tantravahi RV, Austen KF, Henkart PA *et al.*: Co-sedimentation of chondroitin sulfate A glycosaminoglycans and proteoglycans with the cytolytic secretory granules of rat large granular lymphocyte (LGL) tumor cells, and identification of a mRNA in normal and transformed LGL that encodes proteoglycans. *J Immunol* 1987, 139: 863-868.
- 49. Hunziker W, Simmen T, Honing S: Trafficking of lysosomal membrane proteins in polarized kidney cells. *Nephrologie* 1996, 17: 347-350.
- lida T, Ohno H, Nakaseko C, Sakuma M, Takeda-Ezaki M, Arase H et al.: Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4+ T cells. J Immunol 2000, 165: 5062-5068.
- 51. Bossi G, Griffiths GM: Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med* 1999, 5: 90-96.
- 52. Lettau M, Schmidt H, Kabelitz D, Janssen O: Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunol Lett* 2007, 108: 10-19.
- 53. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993, 75: 1169-1178.
- 54. Janssen O, Sanzenbacher R, Kabelitz D: Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell Tissue Res* 2000, 301: 85-99.
- 55. Frangsmyr L, Baranov V, Nagaeva O, Stendahl U, Kjellberg L, Mincheva-Nilsson L: Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. *Mol Hum Reprod* 2005, 11: 35-41.
- 56. Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G: First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 2004, 10: 55-63.
- 57. McKechnie NM, King BC, Fletcher E, Braun G: Fas-ligand is stored in secretory lysosomes of ocular barrier epithelia and released with microvesicles. *Exp Eye Res* 2006, 83: 304-314.
- Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD, Reichert TE, Watkins S, Whiteside TL: Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2005, 11: 1010-1020.
- Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Alava MA, Pineiro A, Naval J, Lasierra P *et al.*: The human melanoma cell line MelJuSo secretes bioactive FasL and APO2L/TRAIL on the surface of microvesicles. Possible contribution to tumor counterattack. *Exp Cell Res* 2004, 295: 315-329.
- 60. Lindsten T, Lee KP, Harris ES, Petryniak B, Craighead N, Reynolds PJ *et al.*: Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J Immunol* 1993, 151: 3489-3499.
- 61. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG et al.: A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 1987, 328: 267-270.
- 62. van der Merwe PA, Bodian DL, Daenke S, Linsley P, Davis SJ: CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med* 1997, 185: 393-403.
- Metzelaar MJ, Wijngaard PL, Peters PJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK, Clevers HC: CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. J Biol Chem 1991, 266: 3239-3245.
- 64. Pfistershammer K, Majdic O, Stockl J, Zlabinger G, Kirchberger S, Steinberger P *et al.*: CD63 as an activationlinked T cell costimulatory element. *J Immunol* 2004, 173: 6000-6008.
- 65. Masson D, Tschopp J: Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. *J Biol Chem* 1985, 260: 9069-9072.
- 66. Podack ER, Young JD, Cohn ZA: Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, 82: 8629-8633.

- 67. Liu CC, Perussia B, Cohn ZA, Young JD: Identification and characterization of a pore-forming protein of human peripheral blood natural killer cells. *J Exp Med* 1986, 164: 2061-2076.
- 68. Dupuis M, Schaerer E, Krause KH, Tschopp J: The calcium-binding protein calreticulin is a major constituent of lytic granules in cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1993, 177: 1-7.
- 69. Voskoboinik I, Thia MC, Fletcher J, Ciccone A, Browne K, Smyth MJ *et al.*: Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J Biol Chem* 2005, 280: 8426-8434.
- 70. Langhans B, Ahrendt M, Nattermann J, Sauerbruch T, Spengler U: Comparative study of NK cell-mediated cytotoxicity using radioactive and flow cytometric cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 2005, 306: 161-168.
- 71. Andrin C, Pinkoski MJ, Burns K, Atkinson EA, Krahenbuhl O, Hudig D *et al.*: Interaction between a Ca2+binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules. *Biochemistry* 1998, 37: 10386-10394.
- 72. Chavez-Galan L, renas-Del Angel MC, Zenteno E, Chavez R, Lascurain R: Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 2009, 6: 15-25.
- 73. Liu CC, Walsh CM, Young JD: Perforin: structure and function. *Immunol Today* 1995, 16: 194-201.
- 74. Motyka B, Korbutt G, Pinkoski MJ, Heibein JA, Caputo A, Hobman M *et al.*: Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 2000, 103: 491-500.
- 75. Keefe D, Shi L, Feske S, Massol R, Navarro F, Kirchhausen T *et al.*: Perforin triggers a plasma membranerepair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* 2005, 23: 249-262.
- 76. Shi L, Keefe D, Durand E, Feng H, Zhang D, Lieberman J: Granzyme B binds to target cells mostly by charge and must be added at the same time as perforin to trigger apoptosis. *J Immunol* 2005, 174: 5456-5461.
- Beresford PJ, Zhang D, Oh DY, Fan Z, Greer EL, Russo ML *et al.*: Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem* 2001, 276: 43285-43293.
- 78. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J: Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 2003, 112: 659-672.
- Chowdhury D, Beresford PJ, Zhu P, Zhang D, Sung JS, Demple B *et al.*: The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Mol Cell* 2006, 23: 133-142.
- 80. Zhang D, Pasternack MS, Beresford PJ, Wagner L, Greenberg AH, Lieberman J: Induction of rapid histone degradation by the cytotoxic T lymphocyte protease Granzyme A. *J Biol Chem* 2001, 276: 3683-3690.
- 81. Waterhouse NJ, Sedelies KA, Trapani JA: Role of Bid-induced mitochondrial outer membrane permeabilization in granzyme B-induced apoptosis. *Immunol Cell Biol* 2006, 84: 72-78.
- 82. Metkar SS, Wang B, Ebbs ML, Kim JH, Lee YJ, Raja SM *et al.*: Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *J Cell Biol* 2003, 160: 875-885.
- 83. Pinkoski MJ, Waterhouse NJ, Heibein JA, Wolf BB, Kuwana T, Goldstein JC *et al.*: Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 2001, 276: 12060-12067.
- 84. Zhao T, Zhang H, Guo Y, Zhang Q, Hua G, Lu H *et al.*: Granzyme K cleaves the nucleosome assembly protein SET to induce single-stranded DNA nicks of target cells. *Cell Death Differ* 2007, 14: 489-499.
- 85. Andrade F, Fellows E, Jenne DE, Rosen A, Young CS: Granzyme H destroys the function of critical adenoviral proteins required for viral DNA replication and granzyme B inhibition. *EMBO J* 2007, 26: 2148-2157.
- 86. Kelly JM, Waterhouse NJ, Cretney E, Browne KA, Ellis S, Trapani JA *et al.*: Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death. *J Biol Chem* 2004, 279: 22236-22242.
- 87. Bovenschen N, de Koning PJ, Quadir R, Broekhuizen R, Damen JM, Froelich CJ *et al.*: NK cell protease granzyme M targets alpha-tubulin and disorganizes the microtubule network. *J Immunol* 2008, 180: 8184-8191.

- Pena SV, Hanson DA, Carr BA, Goralski TJ, Krensky AM: Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. J Immunol 1997, 158: 2680-2688.
- 89. Latinovic-Golic S, Walch M, Sundstrom H, Dumrese C, Groscurth P, Ziegler U: Expression, processing and transcriptional regulation of granulysin in short-term activated human lymphocytes. *BMC Immunol* 2007, 8: 9.
- 90. Kaspar AA, Okada S, Kumar J, Poulain FR, Drouvalakis KA, Kelekar A *et al.*: A distinct pathway of cellmediated apoptosis initiated by granulysin. *J Immunol* 2001, 167: 350-356.
- 91. Pardo J, Perez-Galan P, Gamen S, Marzo I, Monleon I, Kaspar AA *et al.*: A role of the mitochondrial apoptosisinducing factor in granulysin-induced apoptosis. *J Immunol* 2001, 167: 1222-1229.
- 92. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ *et al.*: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 1998, 282: 121-125.
- 93. Deng A, Chen S, Li Q, Lyu SC, Clayberger C, Krensky AM: Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *J Immunol* 2005, 174: 5243-5248.
- Griffiths G, Hoflack B, Simons K, Mellman I, Kornfeld S: The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* 1988, 52: 329-341.
- 95. Griffiths GM, Isaaz S: Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6phosphate receptor. *J Cell Biol* 1993, 120: 885-896.
- 96. Robinson MS, Bonifacino JS: Adaptor-related proteins. Curr Opin Cell Biol 2001, 13: 444-453.
- 97. Blott EJ, Bossi G, Clark R, Zvelebil M, Griffiths GM: Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a prolinerich domain in its cytoplasmic tail. *J Cell Sci* 2001, 114: 2405-2416.
- Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A: Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 1998, 395: 82-86.
- Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM: The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 2001, 15: 751-761.
- Orange JS, Ramesh N, Remold-O'Donnell E, Sasahara Y, Koopman L, Byrne M et al.: Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. Proc Natl Acad Sci U S A 2002, 99: 11351-11356.
- Peters PJ, Geuze HJ, Van der Donk HA, Slot JW, Griffith JM, Stam NJ *et al.*: Molecules relevant for T celltarget cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1989, 19: 1469-1475.
- 102. Andzelm MM, Chen X, Krzewski K, Orange JS, Strominger JL: Myosin IIA is required for cytolytic granule exocytosis in human NK cells. *J Exp Med* 2007, 204: 2285-2291.
- 103. Stinchcombe JC, Barral DC, Mules EH, Booth S, Hume AN, Machesky LM *et al.*: Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J Cell Biol* 2001, 152: 825-834.
- 104. Menager MM, Menasche G, Romao M, Knapnougel P, Ho CH, Garfa M *et al.*: Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat Immunol* 2007, 8: 257-267.
- He JS, Ostergaard HL: CTLs contain and use intracellular stores of FasL distinct from cytolytic granules. J Immunol 2007, 179: 2339-2348.
- 106. Berg NN, Puente LG, Dawicki W, Ostergaard HL: Sustained TCR signaling is required for mitogen-activated protein kinase activation and degranulation by cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1998, 161: 2919-2924.
- 107. Kessler B, Hudrisier D, Schroeter M, Tschopp J, Cerottini JC, Luescher IF: Peptide modification or blocking of CD8, resulting in weak TCR signaling, can activate CTL for Fas- but not perforin-dependent cytotoxicity or cytokine production. *J Immunol* 1998, 161: 6939-6946.
- Kassahn D, Nachbur U, Conus S, Micheau O, Schneider P, Simon HU et al.: Distinct requirements for activation-induced cell surface expression of preformed Fas/CD95 ligand and cytolytic granule markers in T cells. Cell Death Differ 2009, 16: 115-124.
- 109. Barak Y, Nir E: Chediak-Higashi syndrome. Am J Pediatr Hematol Oncol 1987, 9: 42-55.
- 110. Kaplan J, De D, I, Ward DM: Chediak-Higashi syndrome. Curr Opin Hematol 2008, 15: 22-29.

- 111. Huizing M, Helip-Wooley A, Westbroek W, Gunay-Aygun M, Gahl WA: Disorders of lysosome-related organelle biogenesis: clinical and molecular genetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008, 9: 359-386.
- 112. Li W, Rusiniak ME, Chintala S, Gautam R, Novak EK, Swank RT: Murine Hermansky-Pudlak syndrome genes: regulators of lysosome-related organelles. *Bioessays* 2004, 26: 616-628.
- Feng L, Seymour AB, Jiang S, To A, Peden AA, Novak EK *et al*.: The beta3A subunit gene (Ap3b1) of the AP-3 adaptor complex is altered in the mouse hypopigmentation mutant pearl, a model for Hermansky-Pudlak syndrome and night blindness. *Hum Mol Genet* 1999, 8: 323-330.
- Dell'Angelica EC, Shotelersuk V, Aguilar RC, Gahl WA, Bonifacino JS: Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol Cell* 1999, 3: 11-21.
- 115. Enders A, Zieger B, Schwarz K, Yoshimi A, Speckmann C, Knoepfle EM et al.: Lethal hemophagocytic lymphohistiocytosis in Hermansky-Pudlak syndrome type II. Blood 2006, 108: 81-87.
- 116. Clark RH, Stinchcombe JC, Day A, Blott E, Booth S, Bossi G et al.: Adaptor protein 3-dependent microtubulemediated movement of lytic granules to the immunological synapse. *Nat Immunol* 2003, 4: 1111-1120.
- 117. Menasche G, Pastural E, Feldmann J, Certain S, Ersoy F, Dupuis S *et al.*: Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet* 2000, 25: 173-176.
- 118. Pastural E, Barrat FJ, Dufourcq-Lagelouse R, Certain S, Sanal O, Jabado N *et al.*: Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat Genet* 1997, 16: 289-292.
- 119. Desnos C, Huet S, Darchen F: 'Should I stay or should I go?': myosin V function in organelle trafficking. *Biol Cell* 2007, 99: 411-423.
- Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le DF, Bhawan S, Certain S, Mathew PA *et al.*: Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* 1999, 286: 1957-1959.
- Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, Certain S, Bacq D, Dumont C *et al.*: Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 2003, 115: 461-473.
- 122. Bagshaw RD, Mahuran DJ, Callahan JW: Lysosomal membrane proteomics and biogenesis of lysosomes. *Mol Neurobiol* 2005, 32: 27-41.
- 123. Unlu M, Morgan ME, Minden JS: Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 1997, 18: 2071-2077.
- 124. Miller I, Crawford J, Gianazza E: Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics* 2006, 6: 5385-5408.
- 125. Shaw J, Rowlinson R, Nickson J, Stone T, Sweet A, Williams K *et al.*: Evaluation of saturation labelling twodimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics* 2003, 3: 1181-1195.
- 126. Rabinowich H, Sedlmayr P, Herberman RB, Whiteside TL: Increased proliferation, lytic activity, and purity of human natural killer cells cocultured with mitogen-activated feeder cells. *Cell Immunol* 1991, 135: 454-470.
- 127. Lamanda A, Zahn A, Roder D, Langen H: Improved Ruthenium II tris (bathophenantroline disulfonate) staining and destaining protocol for a better signal-to-background ratio and improved baseline resolution. *Proteomics* 2004, 4: 599-608.
- Rabilloud T, Strub JM, Luche S, van DA, Lunardi J: A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* 2001, 1: 699-704.
- Xu Y, Wong SH, Tang BL, Subramaniam VN, Zhang T, Hong W: A 29-kilodalton Golgi soluble Nethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (Vti1-rp2) implicated in protein trafficking in the secretory pathway. J Biol Chem 1998, 273: 21783-21789.
- Bascom RA, Srinivasan S, Nussbaum RL: Identification and characterization of golgin-84, a novel Golgi integral membrane protein with a cytoplasmic coiled-coil domain. *J Biol Chem* 1999, 274: 2953-2962.
- 131. Nakagawa M, Miranda AF: A monoclonal antibody against cytochrome c oxidase distinguishes cardiac and skeletal muscle mitochondria. *Exp Cell Res* 1987, 168: 44-52.

- 132. Yokota S, Fahimi HD: The peroxisome (microbody) membrane: effects of detergents and lipid solvents on its ultrastructure and permeability to catalase. *Histochem J* 1978, 10: 469-487.
- 133. Ting J, Lee AS: Human gene encoding the 78,000-dalton glucose-regulated protein and its pseudogene: structure, conservation, and regulation. *DNA* 1988, 7: 275-286.
- 134. Mu FT, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL *et al.*: EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J Biol Chem* 1995, 270: 13503-13511.
- 135. Xie J, Techritz S, Haebel S, Horn A, Neitzel H, Klose J *et al.*: A two-dimensional electrophoretic map of human mitochondrial proteins from immortalized lymphoblastoid cell lines: a prerequisite to study mitochondrial disorders in patients. *Proteomics* 2005, 5: 2981-2999.
- 136. Rous BA, Reaves BJ, Ihrke G, Briggs JA, Gray SR, Stephens DJ *et al.*: Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol Biol Cell* 2002, 13: 1071-1082.
- 137. Hrebicek T, Durrschmid K, Auer N, Bayer K, Rizzi A: Effect of CyDye minimum labeling in differential gel electrophoresis on the reliability of protein identification. *Electrophoresis* 2007, 28: 1161-1169.
- 138. Drexler HG, Matsuo Y: Commentary: what is an 'NK-precursor cell line'? Leuk Res 2002, 26: 297-299.
- 139. Hu ZZ, Valencia JC, Huang H, Chi A, Shabanowitz J, Hearing VJ *et al.*: Comparative Bioinformatics Analyses and Profiling of Lysosome-Related Organelle Proteomes. *Int J Mass Spectrom* 2007, 259: 147-160.
- 140. Hoffmann R, Valencia A: A gene network for navigating the literature. Nat Genet 2004, 36: 664.
- 141. Bania J, Gatti E, Lelouard H, David A, Cappello F, Weber E *et al.*: Human cathepsin S, but not cathepsin L, degrades efficiently MHC class II-associated invariant chain in nonprofessional APCs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100: 6664-6669.
- 142. Susskind B, Shornick MD, Iannotti MR, Duffy B, Mehrotra PT, Siegel JP *et al.*: Cytolytic effector mechanisms of human CD4+ cytotoxic T lymphocytes. *Hum Immunol* 1996, 45: 64-75.
- 143. Sun Q, Burton RL, Lucas KG: Cytokine production and cytolytic mechanism of CD4(+) cytotoxic T lymphocytes in ex vivo expanded therapeutic Epstein-Barr virus-specific T-cell cultures. *Blood* 2002, 99: 3302-3309.
- 144. Burgoyne RD, Barclay JW, Ciufo LF, Graham ME, Handley MT, Morgan A: The functions of Munc18-1 in regulated exocytosis. *Ann N Y Acad Sci* 2009, 1152: 76-86.
- 145. Mishra VS, Henske EP, Kwiatkowski DJ, Southwick FS: The human actin-regulatory protein cap G: gene structure and chromosome location. *Genomics* 1994, 23: 560-565.
- 146. Chi A, Valencia JC, Hu ZZ, Watabe H, Yamaguchi H, Mangini NJ *et al.*: Proteomic and bioinformatic characterization of the biogenesis and function of melanosomes. *J Proteome Res* 2006, 5: 3135-3144.
- 147. Cassimeris L: The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr Opin Cell Biol* 2002, 14: 18-24.
- Huang LP, Lyu SC, Clayberger C, Krensky AM: Granulysin-mediated tumor rejection in transgenic mice. J Immunol 2007, 178: 77-84.
- 149. Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM: Interleukin-16. J Leukoc Biol 2000, 67: 757-766.
- 150. Millard PJ, Henkart MP, Reynolds CW, Henkart PA: Purification and properties of cytoplasmic granules from cytotoxic rat LGL tumors. *J Immunol* 1984, 132: 3197-3204.
- 151. Podack ER, Konigsberg PJ: Cytolytic T cell granules. Isolation, structural, biochemical, and functional characterization. *J Exp Med* 1984, 160: 695-710.
- 152. Graham J, Ford T, Rickwood D: The preparation of subcellular organelles from mouse liver in self-generated gradients of iodixanol. *Anal Biochem* 1994, 220: 367-373.
- 153. Graham JM: Isolation of lysosomes from tissues and cells by differential and density gradient centrifugation. *Curr Protoc Cell Biol* 2001, Chapter 3: Unit.
- 154. Ford T, Graham J, Rickwood D: Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Anal Biochem* 1994, 220: 360-366.

- 155. Wattiaux R, Wattiaux-De CS: *Iodinated Density Gradient Media a practical approach*. Oxford, UK: IRL Press at Oxford University Press; 1983.
- 156. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krahenbuhl O, Tschopp J *et al.*: Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* 1991, 173: 1099-1109.
- 157. Blott EJ, Griffiths GM: Secretory lysosomes. Nat Rev Mol Cell Biol 2002, 3: 122-131.
- 158. Robertson MJ, Cochran KJ, Cameron C, Le JM, Tantravahi R, Ritz J: Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp Hematol* 1996, 24: 406-415.
- Yodoi J, Teshigawara K, Nikaido T, Fukui K, Noma T, Honjo T *et al.*: TCGF (IL 2)-receptor inducing factor(s). I. Regulation of IL 2 receptor on a natural killer-like cell line (YT cells). *J Immunol* 1985, 134: 1623-1630.
- 160. Gong JH, Maki G, Klingemann HG: Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 1994, 8: 652-658.
- Chen X, Allan DS, Krzewski K, Ge B, Kopcow H, Strominger JL: CD28-stimulated ERK2 phosphorylation is required for polarization of the microtubule organizing center and granules in YTS NK cells. *Proc Natl Acad Sci* U S A 2006, 103: 10346-10351.
- Chen X, Trivedi PP, Ge B, Krzewski K, Strominger JL: Many NK cell receptors activate ERK2 and JNK1 to trigger microtubule organizing center and granule polarization and cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104: 6329-6334.
- Casey TM, Meade JL, Hewitt EW: Organelle proteomics: identification of the exocytic machinery associated with the natural killer cell secretory lysosome. *Mol Cell Proteomics* 2007, 6: 767-780.
- 164. Basrur V, Yang F, Kushimoto T, Higashimoto Y, Yasumoto K, Valencia J *et al.*: Proteomic analysis of early melanosomes: identification of novel melanosomal proteins. *J Proteome Res* 2003, 2: 69-79.
- Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC: Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cellderived granzyme B. *Nature* 1995, 377: 446-448.
- 166. Lieberman J, Fan Z: Nuclear war: the granzyme A-bomb. Curr Opin Immunol 2003, 15: 553-559.
- 167. Ko YH, Park S, Jin H, Woo H, Lee H, Park C *et al.*: Granzyme B leakage-induced apoptosis is a crucial mechanism of cell death in nasal-type NK/T-cell lymphoma. *Lab Invest* 2007, 87: 241-250.
- Mahrus S, Craik CS: Selective chemical functional probes of granzymes A and B reveal granzyme B is a major effector of natural killer cell-mediated lysis of target cells. *Chem Biol* 2005, 12: 567-577.
- 169. Pipkin ME, Lieberman J: Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* 2007, 19: 301-308.
- 170. Hanna J, Gonen-Gross T, Fitchett J, Rowe T, Daniels M, Arnon TI *et al.*: Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. *J Clin Invest* 2004, 114: 1612-1623.
- Raposo G, Tenza D, Mecheri S, Peronet R, Bonnerot C, Desaymard C: Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell* 1997, 8: 2631-2645.
- 172. Vincent-Schneider H, Thery C, Mazzeo D, Tenza D, Raposo G, Bonnerot C: Secretory granules of mast cells accumulate mature and immature MHC class II molecules. *J Cell Sci* 2001, 114: 323-334.
- 173. Riese RJ, Wolf PR, Bromme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL *et al.*: Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 1996, 4: 357-366.
- 174. Shi GP, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, Haley KJ *et al.*: Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 1999, 10: 197-206.
- 175. Hanna J, Fitchett J, Rowe T, Daniels M, Heller M, Gonen-Gross T *et al.*: Proteomic analysis of human natural killer cells: insights on new potential NK immune functions. *Mol Immunol* 2005, 42: 425-431.
- 176. Roncarolo MG, Bigler M, Haanen JB, Yssel H, Bacchetta R, de Vries JE *et al.*: Natural killer cell clones can efficiently process and present protein antigens. *J Immunol* 1991, 147: 781-787.
- 177. Chan CW, Crafton E, Fan HN, Flook J, Yoshimura K, Skarica M *et al.*: Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 2006, 12: 207-213.

- 178. Taieb J, Chaput N, Menard C, Apetoh L, Ullrich E, Bonmort M *et al.*: A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* 2006, 12: 214-219.
- 179. Burt BM, Plitas G, Nguyen HM, Stableford JA, Bamboat ZM, Dematteo RP: Circulating HLA-DR(+) natural killer cells have potent lytic ability and weak antigen-presenting cell function. *Hum Immunol* 2008, 69: 469-474.
- Mangeat P, Roy C, Martin M: ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol* 1999, 9: 187-192.
- Tsukita S, Yonemura S: Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. J Biol Chem 1999, 274: 34507-34510.
- 182. Bretscher A, Chambers D, Nguyen R, Reczek D: ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000, 16: 113-143.
- 183. Delon J, Kaibuchi K, Germain RN: Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* 2001, 15: 691-701.
- 184. Faure S, Salazar-Fontana LI, Semichon M, Tybulewicz VL, Bismuth G, Trautmann A *et al.*: ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nat Immunol* 2004, 5: 272-279.
- Cooley J, Takayama TK, Shapiro SD, Schechter NM, Remold-O'Donnell E: The serpin MNEI inhibits elastaselike and chymotrypsin-like serine proteases through efficient reactions at two active sites. *Biochemistry* 2001, 40: 15762-15770.
- 186. Yamazaki T, Aoki Y: Cathepsin G binds to human lymphocytes. J Leukoc Biol 1997, 61: 73-79.
- 187. Yamazaki T, Aoki Y: Cathepsin G enhances human natural killer cytotoxicity. Immunology 1998, 93: 115-121.
- Sun J, Bird CH, Sutton V, McDonald L, Coughlin PB, De Jong TA *et al.*: A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes. *J Biol Chem* 1996, 271: 27802-27809.
- Bird CH, Sutton VR, Sun J, Hirst CE, Novak A, Kumar S *et al.*: Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Mol Cell Biol* 1998, 18: 6387-6398.
- 190. Pham CT, Ley TJ: Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96: 8627-8632.
- 191. Hirst CE, Buzza MS, Bird CH, Warren HS, Cameron PU, Zhang M et al.: The intracellular granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9, is up-regulated during accessory cell maturation and effector cell degranulation, and its overexpression enhances CTL potency. *J Immunol* 2003, 170: 805-815.
- 192. Dumic J, Dabelic S, Flogel M: Galectin-3: an open-ended story. Biochim Biophys Acta 2006, 1760: 616-635.
- Dong S, Hughes RC: Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). Glycoconj J 1997, 14: 267-274.
- 194. Zaidi N, Maurer A, Nieke S, Kalbacher H: Cathepsin D: a cellular roadmap. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 376: 5-9.
- Center DM, Cruikshank W: Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. I. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells. J Immunol 1982, 128: 2563-2568.
- 196. Cruikshank W, Center DM: Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. II. Purification of a lymphotactic factor (LCF). *J Immunol* 1982, 128: 2569-2574.
- 197. Baier M, Bannert N, Werner A, Lang K, Kurth R: Molecular cloning, sequence, expression, and processing of the interleukin 16 precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94: 5273-5277.
- 198. Zhang Y, Center DM, Wu DM, Cruikshank WW, Yuan J, Andrews DW *et al.*: Processing and activation of prointerleukin-16 by caspase-3. *J Biol Chem* 1998, 273: 1144-1149.
- Wu DM, Zhang Y, Parada NA, Kornfeld H, Nicoll J, Center DM *et al.*: Processing and release of IL-16 from CD4+ but not CD8+ T cells is activation dependent. *J Immunol* 1999, 162: 1287-1293.
- Laberge S, Cruikshank WW, Beer DJ, Center DM: Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8+ T cells in vitro. *J Immunol* 1996, 156: 310-315.

- 201. Chupp GL, Wright EA, Wu D, Vallen-Mashikian M, Cruikshank WW, Center DM *et al.*: Tissue and T cell distribution of precursor and mature IL-16. *J Immunol* 1998, 161: 3114-3119.
- 202. Bellini A, Yoshimura H, Vittori E, Marini M, Mattoli S: Bronchial epithelial cells of patients with asthma release chemoattractant factors for T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 1993, 92: 412-424.
- Laberge S, Pinsonneault S, Ernst P, Olivenstein R, Ghaffar O, Center DM *et al.*: Phenotype of IL-16-producing cells in bronchial mucosa: evidence for the human eosinophil and mast cell as cellular sources of IL-16 in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1999, 119: 120-125.
- 204. Rumsaeng V, Cruikshank WW, Foster B, Prussin C, Kirshenbaum AS, Davis TA *et al.*: Human mast cells produce the CD4+ T lymphocyte chemoattractant factor, IL-16. *J Immunol* 1997, 159: 2904-2910.
- 205. Kaser A, Dunzendorfer S, Offner FA, Ryan T, Schwabegger A, Cruikshank WW *et al.*: A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells. *J Immunol* 1999, 163: 3232-3238.
- Franz JK, Kolb SA, Hummel KM, Lahrtz F, Neidhart M, Aicher WK *et al.*: Interleukin-16, produced by synovial fibroblasts, mediates chemoattraction for CD4+ T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 1998, 28: 2661-2671.
- Berman JS, McFadden RG, Cruikshank WW, Center DM, Beer DJ: Functional characteristics of histamine receptor-bearing mononuclear cells. II. Identification and characterization of two histamine-induced human lymphokines that inhibit lymphocyte migration. *J Immunol* 1984, 133: 1495-1504.
- 208. Wilson KC, Cattel DJ, Wan Z, Rahangdale S, Ren F, Kornfeld H *et al.*: Regulation of nuclear Prointerleukin-16 and p27(Kip1) in primary human T lymphocytes. *Cell Immunol* 2005, 237: 17-27.
- Parada NA, Center DM, Kornfeld H, Rodriguez WL, Cook J, Vallen M *et al.*: Synergistic activation of CD4+ T cells by IL-16 and IL-2. *J Immunol* 1998, 160: 2115-2120.
- 210. Cruikshank WW, Berman JS, Theodore AC, Bernardo J, Center DM: Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 1987, 138: 3817-3823.
- Rand TH, Cruikshank WW, Center DM, Weller PF: CD4-mediated stimulation of human eosinophils: lymphocyte chemoattractant factor and other CD4-binding ligands elicit eosinophil migration. *J Exp Med* 1991, 173: 1521-1528.
- 212. Bernstein HB, Plasterer MC, Schiff SE, Kitchen CM, Kitchen S, Zack JA: CD4 expression on activated NK cells: ligation of CD4 induces cytokine expression and cell migration. *J Immunol* 2006, 177: 3669-3676.
- 213. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T *et al.*: Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001, 97: 3146-3151.
- 214. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M *et al.*: CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003, 101: 3052-3057.
- 215. Kwakkenbos MJ, Kop EN, Stacey M, Matmati M, Gordon S, Lin HH *et al*.: The EGF-TM7 family: a postgenomic view. *Immunogenetics* 2004, 55: 655-666.
- 216. Hahn S, Gehri R, Erb P: Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. *Immunol Rev* 1995, 146: 57-79.
- 217. Stalder T, Hahn S, Erb P: Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1994, 152: 1127-1133.
- Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ: Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 2004, 104: 2840-2848.
- Appay V, Zaunders JJ, Papagno L, Sutton J, Jaramillo A, Waters A et al.: Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. J Immunol 2002, 168: 5954-5958.
- 220. Hidalgo LG, Einecke G, Allanach K, Halloran PF: The transcriptome of human cytotoxic T cells: similarities and disparities among allostimulated CD4(+) CTL, CD8(+) CTL and NK cells. *Am J Transplant* 2008, 8: 627-636.
- 221. Bohley P, Seglen PO: Proteases and proteolysis in the lysosome. Experientia 1992, 48: 151-157.

- 222. Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M, Henkart PA: Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med* 2002, 196: 493-503.
- 223. Faure F, Jitsukawa S, Miossec C, Hercend T: CD1c as a target recognition structure for human T lymphocytes: analysis with peripheral blood gamma/delta cells. *Eur J Immunol* 1990, 20: 703-706.
- Miyagawa F, Tanaka Y, Yamashita S, Minato N: Essential requirement of antigen presentation by monocyte lineage cells for the activation of primary human gamma delta T cells by aminobisphosphonate antigen. J Immunol 2001, 166: 5508-5514.
- 225. Owyang AM, Zaph C, Wilson EH, Guild KJ, McClanahan T, Miller HR *et al.*: Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2006, 203: 843-849.
- 226. Kleinschek MA, Owyang AM, Joyce-Shaikh B, Langrish CL, Chen Y, Gorman DM *et al.*: IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2007, 204: 161-170.
- 227. Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S *et al.*: IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2associated pathologies in vivo. *Immunity* 2001, 15: 985-995.
- 228. Ikeda K, Nakajima H, Suzuki K, Kagami S, Hirose K, Suto A *et al.*: Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. *Blood* 2003, 101: 3594-3596.
- 229. Min SW, Chang WP, Sudhof TC: E-Syts, a family of membranous Ca2+-sensor proteins with multiple C2 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104: 3823-3828.
- 230. Polgar J, Chung SH, Reed GL: Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) and VAMP-8 are present in human platelets and are required for granule secretion. *Blood* 2002, 100: 1081-1083.
- Barnard RJ, Morgan A, Burgoyne RD: Domains of alpha-SNAP required for the stimulation of exocytosis and for N-ethylmalemide-sensitive fusion protein (NSF) binding and activation. *Mol Biol Cell* 1996, 7: 693-701.
- Sander LE, Frank SP, Bolat S, Blank U, Galli T, Bigalke H *et al.*: Vesicle associated membrane protein (VAMP)-7 and VAMP-8, but not VAMP-2 or VAMP-3, are required for activation-induced degranulation of mature human mast cells. *Eur J Immunol* 2008, 38: 855-863.
- Tiwari N, Wang CC, Brochetta C, Ke G, Vita F, Qi Z et al.: VAMP-8 segregates mast cell-preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways. *Blood* 2008, 111: 3665-3674.
- 234. Fleischer B: CD26: a surface protease involved in T-cell activation. *Immunol Today* 1994, 15: 180-184.
- 235. Tanaka T, Camerini D, Seed B, Torimoto Y, Dang NH, Kameoka J *et al*.: Cloning and functional expression of the T cell activation antigen CD26. *J Immunol* 1992, 149: 481-486.
- Boonacker E, Van Noorden CJ: The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur J Cell Biol* 2003, 82: 53-73.
- Ohnuma K, Takahashi N, Yamochi T, Hosono O, Dang NH, Morimoto C: Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human T cell activation and function. *Front Biosci* 2008, 13: 2299-2310.
- 238. De M, I, Korom S, Van DJ, Scharpe S: CD26, let it cut or cut it down. Immunol Today 1999, 20: 367-375.
- Klemann C, Schade J, Pabst R, Leitner S, Stiller J, von HS *et al.*: CD26/dipeptidyl peptidase 4-deficiency alters thymic emigration patterns and leukcocyte subsets in F344-rats age-dependently. *Clin Exp Immunol* 2009, 155: 357-365.
- 240. Ruiz P, Zacharievich N, Hao L, Viciana AL, Shenkin M: Human thymocyte dipeptidyl peptidase IV (CD26) activity is altered with stage of ontogeny. *Clin Immunol Immunopathol* 1998, 88: 156-168.
- Reinhold D, Bank U, Buhling F, Lendeckel U, Faust J, Neubert K *et al.*: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor-beta 1 in PWM-stimulated PBMC and T cells. *Immunology* 1997, 91: 354-360.
- 242. Reinhold D, Hemmer B, Gran B, Born I, Faust J, Neubert K *et al.*: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV/CD26 suppress activation of human MBP-specific CD4+ T cell clones. *J Neuroimmunol* 1998, 87: 203-209.
- Kahne T, Kroning H, Thiel U, Ulmer AJ, Flad HD, Ansorge S: Alterations in structure and cellular localization of molecular forms of DP IV/CD26 during T cell activation. *Cell Immunol* 1996, 170: 63-70.

- 244. Kyouden T, Himeno M, Ishikawa T, Ohsumi Y, Kato K: Purification and characterization of dipeptidyl peptidase IV in rat liver lysosomal membranes. *J Biochem* 1992, 111: 770-777.
- 245. Grondin G, Hooper NM, LeBel D: Specific localization of membrane dipeptidase and dipeptidyl peptidase IV in secretion granules of two different pancreatic islet cells. *J Histochem Cytochem* 1999, 47: 489-498.
- 246. Lettau M, Qian J, Linkermann A, Latreille M, Larose L, Kabelitz D *et al.*: The adaptor protein Nck interacts with Fas ligand: Guiding the death factor to the cytotoxic immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103: 5911-5916.
- 247. Reczek D, Berryman M, Bretscher A: Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *J Cell Biol* 1997, 139: 169-179.
- Brdickova N, Brdicka T, Andera L, Spicka J, Angelisova P, Milgram SL *et al.*: Interaction between two adapter proteins, PAG and EBP50: a possible link between membrane rafts and actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 2001, 507: 133-136.
- Wasem C, Frutschi C, Arnold D, Vallan C, Lin T, Green DR *et al.*: Accumulation and activation-induced release of preformed Fas (CD95) ligand during the pathogenesis of experimental graft-versus-host disease. *J Immunol* 2001, 167: 2936-2941.
- 250. Farouk SE, Mincheva-Nilsson L, Krensky AM, Dieli F, Troye-Blomberg M: Gamma delta T cells inhibit in vitro growth of the asexual blood stages of Plasmodium falciparum by a granule exocytosis-dependent cytotoxic pathway that requires granulysin. *Eur J Immunol* 2004, 34: 2248-2256.
- 251. Ochoa MT, Stenger S, Sieling PA, Thoma-Uszynski S, Sabet S, Cho S *et al.*: T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. *Nat Med* 2001, 7: 174-179.
- Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, Fournie JJ, Krensky AM, Bonneville M *et al.*: Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *J Infect Dis* 2001, 184: 1082-1085.
- Hanson DA, Kaspar AA, Poulain FR, Krensky AM: Biosynthesis of granulysin, a novel cytolytic molecule. *Mol Immunol* 1999, 36: 413-422.
- 254. Walch M, Latinovic-Golic S, Velic A, Sundstrom H, Dumrese C, Wagner CA *et al.*: Perforin enhances the granulysin-induced lysis of Listeria innocua in human dendritic cells. *BMC Immunol* 2007, 8: 14.
- 255. Maes MB, Lambeir AM, Gilany K, Senten K, Van d, V, Leiting B et al.: Kinetic investigation of human dipeptidyl peptidase II (DPPII)-mediated hydrolysis of dipeptide derivatives and its identification as quiescent cell proline dipeptidase (QPP)/dipeptidyl peptidase 7 (DPP7). *Biochem J* 2005, 386: 315-324.
- 256. McDonald JK, Ellis S, Reilly TJ: Properties of dipeptidyl arylamidase I of the pituitary. Chloride and sulfhydryl activation of seryltyrosyl-beta-naphthylamide hydrolysis. *J Biol Chem* 1966, 241: 1494-1501.
- 257. Maes MB, Scharpe S, De M, I: Dipeptidyl peptidase II (DPPII), a review. Clin Chim Acta 2007, 380: 31-49.
- McDonald JK, Reilly TJ, Zeitman BB, Ellis S: Dipeptidyl arylamidase II of the pituitary. Properties of lysylalanylbeta-naphthylamide hydrolysis: inhibition by cations, distribution in tissues, and subcellular localization. J Biol Chem 1968, 243: 2028-2037.
- 259. Smith RE, Dean PN: A study of acid phosphatase and dipeptidyl aminopeptidase II in monodispersed anterior pituitary cells using flow cytometry and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1979, 27: 1499-1504.
- Sannes PL, McDonald JK, Allen RC, Spicer SS: Cytochemical localization and biochemical characterization of dipeptidyl aminopeptidase II in macrophages and mast cells. J Histochem Cytochem 1979, 27: 1496-1498.
- Struckhoff G, Heymann E: Rat peritoneal mast cells release dipeptidyl peptidase II. *Biochem J* 1986, 236: 215-219.
- 262. Scott CS, Stark AN, Minowada J, Drexler HG: Quantitative and qualitative studies of leukaemic cell dipeptidylpeptidases II and IV. *Leuk Res* 1988, 12: 129-134.
- Chiravuri M, Agarraberes F, Mathieu SL, Lee H, Huber BT: Vesicular localization and characterization of a novel post-proline-cleaving aminodipeptidase, quiescent cell proline dipeptidase. *J Immunol* 2000, 165: 5695-5702.
- 264. Lyubchenko TA, Wurth GA, Zweifach A: Role of calcium influx in cytotoxic T lymphocyte lytic granule exocytosis during target cell killing. *Immunity* 2001, 15: 847-859.

- 265. Lettau M, Qian J, Kabelitz D, Janssen O: Activation-dependent FasL expression in T lymphocytes and Natural Killer cells. *Signal Transduction* 2004, 4: 206-211.
- Glass A, Walsh CM, Lynch DH, Clark WR: Regulation of the Fas lytic pathway in cloned CTL. J Immunol 1996, 156: 3638-3644.
- 267. Vignaux F, Vivier E, Malissen B, Depraetere V, Nagata S, Golstein P: TCR/CD3 coupling to Fas-based cytotoxicity. *J Exp Med* 1995, 181: 781-786.
- 268. Miki H, Takenawa T: Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. J Biochem 2003, 134: 309-313.
- 269. Honda K, Yamada T, Endo R, Ino Y, Gotoh M, Tsuda H *et al.*: Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol* 1998, 140: 1383-1393.
- Stoeckle C, Gouttefangeas C, Hammer M, Weber E, Melms A, Tolosa E: Cathepsin W expressed exclusively in CD8+ T cells and NK cells, is secreted during target cell killing but is not essential for cytotoxicity in human CTLs. *Exp Hematol* 2009, 37: 266-275.
- 271. Stinchcombe JC, Page LJ, Griffiths GM: Secretory lysosome biogenesis in cytotoxic T lymphocytes from normal and Chediak Higashi syndrome patients. *Traffic* 2000, 1: 435-444.
- Schmidt H, Gelhaus C, Nebendahl M, Lettau M, Watzl C, Kabelitz D et al.: 2-D DIGE analyses of enriched secretory lysosomes reveal heterogeneous profiles of functionally relevant proteins in leukemic and activated human NK cells. *Proteomics* 2008, 8: 2911-2925.
- Ortaldo JR, Wiltrout TA, Sayers TJ, Yagita H, Winkler-Pickett RT: Characterization of a non-granule associated pore-forming protein in agranular lymphocytes. J Leukoc Biol 1995, 57: 897-903.
- Olsen I, Bou-Gharios G, Abraham D: The activation of resting lymphocytes is accompanied by the biogenesis of lysosomal organelles. *Eur J Immunol* 1990, 20: 2161-2170.
- Ujwal R, Cascio D, Colletier JP, Faham S, Zhang J, Toro L *et al.*: The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 A resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105: 17742-17747.
- Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Gronborg M, Riedel D et al.: Molecular anatomy of a trafficking organelle. Cell 2006, 127: 831-846.
- Cao Z, Li C, Higginbotham JN, Franklin JL, Tabb DL, Graves-Deal R *et al.*: Use of fluorescence-activated vesicle sorting for isolation of Naked2-associated, basolaterally targeted exocytic vesicles for proteomics analysis. *Mol Cell Proteomics* 2008, 7: 1651-1667.
- 278. D'Acquisto F, Merghani A, Lecona E, Rosignoli G, Raza K, Buckley CD *et al.*: Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. *Blood* 2007, 109: 1095-1102.
- Martinez C, Sanjuan MA, Dent JA, Karlsson L, Ware J: Human septin-septin interactions as a prerequisite for targeting septin complexes in the cytosol. *Biochem J* 2004, 382: 783-791.
- Joo E, Surka MC, Trimble WS: Mammalian SEPT2 is required for scaffolding nonmuscle myosin II and its kinases. *Dev Cell* 2007, 13: 677-690.
- Beites CL, Campbell KA, Trimble WS: The septin Sept5/CDCrel-1 competes with alpha-SNAP for binding to the SNARE complex. *Biochem J* 2005, 385: 347-353.

10. Anhang: Proteindaten

10.1 Proteinliste und annotierte Gelscans zum Proteom sekretorischer Granula aus NK-Zellen (siehe S. 166)

- Proteinliste der Identifikationen aus angereicherten sekretorischen Lysosomen aus NKL, YTS und primären NK-Zellen in Tabelle A1
- annotiertes Gel zur Tabelle A1 mit einem direkten Vergleich von NKL und YTS in Abbildung A1
- detaillierte MASCOT Daten zu jeder einzelnen Identifikation sind auf der beiliegenden CD enthalten

10.2 Proteinliste und annotierte Gelscans zum Proteom der Fraktion 2 (siehe S. 175)

- Proteinliste der Identifikationen aus angereicherten sekretorischen Lysosomen (Fraktion 2) CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Tabelle A2
- annotiertes Gel zur Tabelle A2 in Abbildung A2

10.3 Proteinliste und annotierte Gelscans zum Proteom der Fraktion 6 (siehe S. 190)

- Proteinliste der Identifikationen aus angereicherten lytischen Granula (Fraktion 6) aus humanen Lymphozyten in Tabelle A3
- annotiertes Gel zur Tabelle A3 in Abbildung A3

Table A1. Identifizierte Proteine sekretorischer Lysosomen aus YTS, NKL and aktivierten NK Zellen

Spot Nr.	1	Replikate # ^{a)}	NCBI Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide ^{b)}	Sequenz- abdeckung (%)	MASCOT	Gen Name	Protein	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
1		1	gi 67464627	P31946	28301	4.9	6;9	26	71	YWHAB	14-3-3 protein beta	adapter protein	CY,ME
2		1	gi 67464424	P62258	26912	4.9	8;40+	44	96	YWHAE	14-3-3 Protein epsilon	adapter protein	CY,ME
3		2	gi 83754467	P63104	29413	5.0	8;17	42	100	YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta	adapter protein	CY,ME
4		2	gi 5453832	Q9Y4L1	111494	5.2	34;29+	45	562	HYOU1	150 kDa oxygen-regulated protein precursor	chaperone	ER,PL,ME
5		1	gi 15277503	P60709	40536	5.6	8;20+	31	282	ACTB	Actin beta	cytoskeleton	ER,ME,EX,PL,SY
6		2	gi 62897671	P60709	42036	5.3	12;27+	45	457	ACTB	Actin beta	cytoskeleton	ER,ME,EX,PL,SY
7		3	gi 15277503	P60709	40536	5.6	15;39+	53	547	ACTB	Actin beta	cytoskeleton	ER,ME,EX,PL,SY
8		1	gi 15277503	P60709	40536	5.6	13;32	50	135	ACTB	Actin beta	cytoskeleton	ER,ME,EX,PL,SY
9		1	gi 15277503	P60709	40536	5.6	6;32+	25	236	ACTB	Actin beta	cytoskeleton	ER,ME,EX,PL,SY
10		1	gi 4501887	Q562R8	42108	5.3	18;33+	68	599	ACTG1	Actin gamma 1, propeptide	cytoskeleton	CY
10		ა 1	gij 176045	Q302R0	20147	5.7 5.2	4,09+	20	100	ACTNA		cyloskeleton	
12		1	gil2004273	043707	102001	53	16.2	21	204		Actinin, alpha 4	cytoskeleton	
14		2	gi 12020010 gi 1082163	Q12979	94146	5.9	10;20+	9	76	ABR	Active breakpoint cluster region-related	GTPases	CY
15		1	gi 38679954	Q12979	94275	6.0	11;19	16	81	ABR	Active breakpoint cluster region-related	GTPases	CY
16		5	qi 4758332	O60488	75471	8.3	26;19	55	299	ACSL4	Acyl-CoA synthetase 4	metabolism	MT,PE,ME
17		3	gi 4758332	O60488	75471	8.3	33;18	60	395	ACSL4	Acyl-CoA synthetase 4	metabolism	MT,PE,ME
18		3	gi 62896585	Q01518	51899	8.1	13;25	44	144	CAP1	Adenylyl cyclase-associated protein variant	trafficking	PL,ME
19		1	gi 62896585	Q01518	51899	8.1	15;30	49	163	CAP1	Adenylyl cyclase-associated protein variant	trafficking	PL,ME
20		1	gi 119627645	Q01518	51357	7.6	8;26	33	81	CAP1	Adenylyl cyclase-associated protein variant	trafficking	PL,ME
21		1	gi 7657210	P53367	38632	6.1	7;16	28	77	ARFIP1	ADP-ribosylation factor interacting protein 1	GTPases	unknown
22		1	gi 119594987	P25098	75838	6.7	15;13	25	139	ADRBK1	Adrenergic, beta, receptor kinase 1	unclassified	unknown
23		2	gi 109148542	P49588	107485	5.3	14;34+	19	300	AARS	Alanyl-tRNA synthetase	biosynthesis	PL,ME
24		1	gi 49456715	P04075	39880	8.5	12;32+	42	279	ALDOA	Aldolase A, fructose-bisphosphate	metabolism	EN,ME
25		2	gi 61680382	P09972	39943	6.4	7;9	28	114	ALDOC	Aldolase C, fructose-bisphosphate	metabolism	ME,SY,MI
26		2	gi 4501993	D000116	73664	7.0	19,15	47	1224		Alkyldinydroxyacetone phosphate synthase	biosynthesis	
21		2	gil4302101	P50005	55257	7.0	10,11	43	120			trafficking	
20		1	gil02003120 gil4557317	P50995	54697	7.0	16.20	34	164	ANXA11	Annexin A11	trafficking	
30		2	gil18645167	P07355	38780	7.6	19:15	58	240	ANXA2	Annexin A2	exocytosis	MT FX ME secreted
31		4	gi 56966699	P07355	38866	6.9	24:25+	66	738	ANXA2	Annexin A2	exocytosis	MT.EX.ME.secreted
32		4	gi 4757756	P07355	38808	7.6	15;31+	51	482	ANXA2	Annexin A2	exocytosis	MT,EX,ME,secreted
33		3	gi 56966699	P07355	38866	6.9	13;29+	44	460	ANXA2	Annexin A2	exocytosis	MT,EX,ME,secreted
34		1	gi 73909156	P07355	40731	8.4	16;35+	56	418	ANXA2	Annexin A2	exocytosis	MT,EX,ME,secreted
35		4	gi 809185	P08758	35840	4.9	15;29	66	173	ANXA5	Annexin A5	trafficking	MT,EX,ME,SY
36		3	gi 71773329	P08133	76168	5.4	29;32	52	619	ANXA6	Annexin A6	trafficking	MT,EX,ME,ER
37		3	gi 71773329	P08133	76168	5.4	33;20	57	363	ANXA6	Annexin A6	trafficking	MT,EX,ME,ER
38		3	gi 71773415	P08133	75571	5.5	33;21	59	353	ANXA6	Annexin A6	trafficking	MT,EX,ME,ER
39		1	gi 35218	P08133	76154	5.4	12;28	17	80	ANXA6	Annexin A6	trafficking	MT,EX,ME,ER
40		2	gi 22219421	P08133	76037	5.4	14;16	25	124	ANXA6	Annexin A6	trafficking	MI,EX,ME,ER
41		1	gi 5031571	P61160	45017	6.3	16;28	45	167	ACTR2	ARP2 actin-related protein 2 nomolog	trafficking	
42 43		1	gilousitoss	D61159	34420	6.8 5.6	9;13	35	70	ARPCZ	ARP2/3 complex subunit 2 not identified	trafficking	EN,ME,PL,ER
44		י 2	gil5031573	P61158	42317	5.6	0,20 18:25+	55	70 536	ACTRS	ARP3 actin-related protein 3 homolog	trafficking	
43		2	gi 119584403	P59998	10079	7.8	3 40+	46	174		hCG1995701 isoform CRA h (ARPCA)	tranicking	
46		1	gi 110001100 gi 34783179	P59998	19607	8.5	4:40+	29	173	ARPC4	ARP2/3 complex subunit 4	trafficking	ER,EX,ME,SY
47		2	gi 4504111	P62993	25304	5.9	10;9	48	140	GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2	adapter protein	SY
48		1	gi 119632023	P14868	53829	6.1	14; 16	35	149	DARS	Aspartyl-tRNA synthetase	biosynthesis	ME
49		1	gi 38569423	P53396	120608	7.0	10;11	13	87	ACLY	ATP citrate lyase isoform 2	biosynthesis	CY
50		1	gi 89574029	P06576	48083	5.0	10;16	31	113	ATP5B	ATP synthase beta chain, mitochondrial	metabolism	ER,ME,NG,PL,SY,MT
51		1	gi 7245474	Q13867	52797	5.9	9;11	26	99	BLMH	Bleomycin hydrolase	unclassified	CY,PL
52 1	m	2	gi 7706481 gi 2981775	Q9H9S4 P15121	40015 35987	6,4 6,6	18;25 9;34	55 34	198 83	CAB39L AKR1B1	Calcium binding protein 39-like Aldose Reductase	unclassified	EX
53		1	gi 62897681	P27797	47061	4.3	19;27	48	230	CALR	Calreticulin precursor variant	chaperone	ER,ME,NG,EX,PL,MT
54		2	gi 62897681	P27797	47061	4.3	20;28+	62	563	CALR	Calreticulin precursor variant	chaperone	ER,ME,NG,EX,PL,MT
55		1	gi 4502551	O43852	37198	4.5	14;25+	51	337	CALU	Calumenin precursor	exocytosis	ER,ME
56		3	gi 1905874	Q14847	36604	6.8	15;23	72	200	LDB1	LIM and SH3 protein 1	cytoskeleton	ER,ME,PL,EN
57		3	gi 4557014	P04040	59947	6.9	19;24	44	201	CAI		metabolism	PE,ER,LY,EN,ME
58		1	gi 119579767	P53634	36186	7.1	3;9+	9	140	CISC	Cathepsin C	nydrolases	LY
59 60		∠ 2	gij 1 19579767 ail 1 19579767	F 00034 P53634	36186	7.1 71	∠,00+ ⊿∙⊿?⊥	/ 12	ษา 108	CTSC	Cathensin C	hydrolases	
61		2	ail119579767	P53634	36186	71	-,-+∠+ 5:48+	18	190	CTSC	Cathensin C	hydrolases	
62		2	ail119579767	P53634	36186	71	2:56+	7	148	CTSC	Cathepsin C	hydrolases	
63		1	gi 119579767	P53634	36186	7.1	2:7+	7	105	CTSC	Cathepsin C	hydrolases	LY
64		1	gi 119579767	P53634	36186	7.1	2:8+	7	133	CTSC	Cathepsin C	hydrolases	LY
65		1	gi 4503143	P07339	45037	6.1	7;30+	11	90	CTSD	Cathepsin D preproprotein	hydrolases	LY,ME,NG,EX,MT
66		2	gi 4503143	P07339	45037	6.1	6;22+	16	178	CTSD	Cathepsin D preproprotein	hydrolases	LY,ME,NG,EX,MT
67		1	gi 494296	P07339	26458	5.3	4;22+	17	82	CTSD	Cathepsin D, Chain B	hydrolases	LY,ME,NG,EX,MT
68		1	gi 4503143	P07339	45037	6.1	8;22+	11	132	CTSD	Cathepsin D preproprotein	hydrolases	LY,ME,NG,EX,MT
69		5	gi 4503143	P07339	45037	6.1	6;10+	17	384	CTSD	Cathepsin D preproprotein	hydrolases	LY,ME,NG,EX,MT
70		1	gi 4503143	P07339	45037	6.1	7;16+	21	334	CTSD	Cathepsin D preproprotein	hydrolases	LY,ME,NG,EX,MT

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	NCBI Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide ^{b)}	Sequenz- abdeckung (%)	MASCOT	Gen Name	Protein	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
71	5	gi 23200070	P25774	24389	7.7	10;44+	47	200	CTSS	Cathepsin S	Immunity	LY
72	2	gi 23110964	P56202	42747	7.1	7;30+	22	293	CTSW	Cathepsin W preproprotein	Immunity	unknown
73	3	gi 5453603	P78371	57794	6.0	19;13	48	253	CCT2	Chaperonin containing TCP1, subunit 2β	chaperone	ER,EN,ME,PL,MT,CY
74	2	gi 671527	P49368	60862	6.2	14;12	25	151	CCT3	Chaperonin containing TCP1, subunit 3γ	chaperone	CY
75 76	1	gi 62089036	P40227	58239	6.3	12;21	26	104	CC16A	Chaperonin containing TCP1, subunit $6A\zeta 1$	chaperone	
70	2	ail24307939	Q99032 P48643	60089	5.5	15.18	36	149	CCT5	Chaperonin containing TCP1, subunti 5c	chaperone	
78	3	gil24307333	P50990	60153	5.4	23:19	45	265	CCT8	Chaperonin containing TCP1, subunti 87	chaperone	EN.ME.EX
79	3	gi 14251209	O00299	27248	5.1	7;14	41	93	CLIC1	Chloride intracellular channel 1	channel	ME,EX,PL,MT
80	1	gi 3355455	Q969H8	11383	7.0	5;44+	51	188	C19orf10	Chromosome 19 open reading frame 10 (R33729_1)	unclassified	ME
81	2	gi 9836652	Q9HDC9	47887	5.8	14;15	44	167	C20orf3	Chromosome 20 open reading frame 3 (BSCv)	unclassified	ME
82	2	gi 8922699	Q96KP4	53088	5.6	18;25	43	198	CNDP2	CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20)	hydrolases	unknown
83	1	gi 8922699	Q96KP4	53088	5.6	7;13	17	70	CNDP2	CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20)	hydrolases	unknown
84	2	gi 56966036	Q14019	15898	5.6	9;23+	43	388	COTL1	Coactosin-like 1	unclassified	PL,SY
60 86	2	gil119594657	P23528	15877	0.0 8.5	4,3 6:61±	40 51	74 366	CFL1	Cofilin 1	cytoskeleton	
87	2	gi 109658548	P57737	101626	5.5	18:33+	21	348	CORO7	Coronin 7	trafficking	CY.GO
88	1	gi 109658548	P57737	101626	5.5	16;32+	21	363	CORO7	Coronin 7	trafficking	CY,GO
89	4	gi 5902134	P31146	51678	6.3	10;25+	28	206	CORO1A	Coronin, actin binding protein, 1A	cytoskeleton	LY,PL
90	1	gi 5902134	P31146	51678	6.3	16;27	36	167	CORO1A	Coronin, actin binding protein, 1A	cytoskeleton	LY,PL
91	1	gi 5902134	P31146	51678	6.3	22;25	48	253	CORO1A	Coronin, actin binding protein, 1A	cytoskeleton	LY,PL
92	1	gi 5902134	P31146	51678	6.3	21;32	51	233	CORO1A	Coronin, actin binding protein, 1A	cytoskeleton	LY,PL
93	1	gi 5902134	P31146	51678	6.3	13;8	30	167	CORO1A	Coronin, actin binding protein, 1A	cytoskeleton	LY,PL
94 95	ן ר	gi[1002923 gi]62897707		51722	6.7	8;15+ 15:20	18	158	COROIA	Coronin, actin binding protein, 1A	cytoskeleton	LY,PL ME
96	2	gil4758078	P41240	51242	6.6	9.29+	25	153	CSK	c-src tyrosine kinase	signal trans	CY PI
97	1	gi 4507855	P45974	94190	4.9	9;14	14	74	USP5	Deubiquitinating enzyme 5	hydrolases	LY,ME,NG
98	1	gi 75766275	P62937	18040	8.4	2;45+	15	158	PPIA	Cyclophilin A	chaperone	ME,EX,MT
99	1	gi 1310882	P23284	19705	9.2	12;19	53	415	PPIB	Cyclophilin B	chaperone	ER,ME
100	2	gi 1310882	P23284	19705	9.2	7;37+	35	181	PPIB	Cyclophilin B	chaperone	ER,ME
101	2	gi 4758086	P21291	21409	8.9	6;19	54	79	CSRP1	Cysteine and glycine-rich protein 1	unclassified	NU
102	1	gi 61680217	P24752	41789	6.5	9;17	27	102	ACAT1	Cytosolic Acetoacetyl-CoA Thiolase	metabolism	
103	1	gij56530646 gij4503377	O16555	62711	0.0 6.0	3,59+	25 26	111	DPYSL2	Dibydronyrimidinase-like 2 CRMP2	signal trans	SY
105	3	gi 4503377	Q16555	62711	6.0	15:18	35	162	DPYSL2	Dihydropyrimidinase-like 2 CRMP2	signal trans.	SY
106	1	gi 31543380	Q99497	20050	6.3	6;26	52	78	PARK7	DJ-1 protein, Parkinson disease	redox proteins	ME, PL, SY, MT
107 m	1	gi 119578931	P31689	42863	7,5	9;26	37	87	DNAJA1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A 1	chaperone	ED ME
107 11	'	gi 62896593	P06733	47453	7,0	8;27	27	71	ENO1	Enolase 1 (Spot 118)	chaperone	
108	3	gi 48146309	Q9UBS4	40802	5.8	16;28+	53	531	DNAJB11	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B 11	chaperone	ER,ME,PL
109	3	gi 5453980	Q13217	58000	5.8	14;30+	39	357	DNAJC3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C 3	chaperone	CY,ER,ME
110	2	gij56549121 gij30240932		90345 60646	7.0 6.4	24,10	29 49	214 435	EHD1	EH-domain containing 1	trafficking	
112	3	gi 21264315	Q9H223	61365	6.3	21:27	42	203	EHD4	EH-domain-containing 4	trafficking	EX.MT
113	5	gi 5803013	P30040	29032	6.8	6;36+	32	144	ERP29	Endoplasmic reticulum protein 29	chaperone	ER,ME,PL
114	5	gi 5803013	P30040	29032	6.8	12;15+	48	595	ERP29	Endoplasmic reticulum protein 29	chaperone	ER,ME,PL
115	1	gi 12053087	Q92556	84459	5.9	19;34	30	126	ELMO1	Engulfment and cell motility protein 1	cytoskeleton	CY,PL
116	3	gi 62896593	P06733	47453	7.0	16;17	54	214	ENO1	Enolase 1, (alpha)	metabolism	ME,EX,SY,MT
117	1	gi 62896593	P06733	47453	7.0	15;17	56	198	ENO1	Enolase 1, (alpha)	metabolism	ME,EX,SY,MT
118	4	gil62896593		47453	7.0	19;38+	56	4//	ENO1	Enolase 1, (alpha)	metabolism	ME,EX,SY,MI
120	2	gil48734966	P68104	50433	9.1	13:48+	44	290	EFF1A1	Evolution elongation factor 1g1	biosynthesis	
121	1	gi 39644794	P26641	50156	6.3	17:16	51	209	EEF1G	Eukaryotic translation elongation factor 1v	biosynthesis	ME
122	2	gi 4503483	P13639	96246	6.4	18;15	29	174	EEF2	Eukaryotic translation elongation factor 2	biosynthesis	ER,EN,ME,EX
123	3	gi 4503483	P13639	96246	6.4	29;30+	44	429	EEF2	Eukaryotic translation elongation factor 2	biosynthesis	ER,EN,ME,EX
124	3	gi 4503483	P13639	96246	6.4	38;30	58	382	EEF2	Eukaryotic translation elongation factor 2	biosynthesis	ER,EN,ME,EX
125 m	2	gi 4503483 gi 56549121	P13639 Q9UPH5	96246 98345	6,4 7,0	19;17 12;24	31 17	173 85	EEF2 DNM2	Eukaryotic translation elongation factor 2 Dynamin 2 (Spot 110)	biosynthesis	ER,EN,ME,EX
126	2	gi 5453597	P52907	33073	5.5	9;16	48	116	CAPZA1	F-actin capping protein alpha-1 subunit	actin binding	ER,EN,ME
127	1	gi 4826659	P47756	30952	5.7	7;24	25	65	CAPZB	F-actin capping protein beta subunit	actin binding	ER,EN,ME
128	1	gi 182516	P02792	16441	5.7	2;19+	19	191	FTL	Ferritin light subunit	storage	ME,EX
129	2	gi 50513343	Q02790	38487	6.4	11;20	32	114	FKBP4	FK506 binding protein 4	unclassified	ME
130	1	gi 1145816	Q13451	50859	5.8	0.11	28	108		FK506 binding protein 5	chaperone	
132	1	gil20270355	096023	37970	6.2	13.19	23 54	161	GALM	Galactose mutarotase	metabolism	CY
133	2	gil20270333	P09382	14868	5.3	2:14+	13	80	LGALS1	Galectin-1	Immunity	ME.PL
134	5	gi 3402185	P17931	15630	9.4	5;28+	46	109	LGALS3	Galectin-3	Immunity	ME,NU
135	1	gi 624873	P31150	51018	5.2	13;47+	36	105	GDI1	GDP dissociation inhibitor 1	signal trans.	ME,PL
136	3	gi 119606836	P50395	48680	7.5	18;9	49	239	GDI2	GDP dissociation inhibitor 2	signal trans.	ME,EX,PL,MT
137	3	gi 14488680	P06744	63204	8.4	17;22	35	170	GPI	Glucose phosphate isomerase (GPI)	Immunity	ME,EX,PL,MT
138	2	gi 108773793	P11413	59675	6.4	27;19	54	327	G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	metabolism	ME
139	1	gi 108773793	P11413	59675	6.4	10;11	20	105	G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	metabolism	ME
140	2	gi 2274968	Q14697	107289	5.7	23;15+	30	267	GANAB	Giucosidase, alpha; neutral AB	nydrolases	ER,ME,PL
141	1	gij119594456	Q14697	107236	5.8 5.7	36,22	58 ⊿o	435 501		Glucosidase, alpha; neutral AB	hydrolases	ER,ME,PL
142	3	yılzz <i>ı</i> 4900	Q14097	101289	J.1	30,21+	40	001	GANAB	Giucusiuase, aipria, rieutrai AB	nyurulases	

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	NCBI Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide ^{b)}	Sequenz- abdeckung (%)	MASCOT	Gen Name	Protein	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
143	2	gi 2274968	Q14697	107289	5.7	34;26	44	344	GANAB	Glucosidase, alpha; neutral AB	hydrolases	ER,ME,PL
144	1	gi 119594453	Q14697	109798	5.9	31;18	42	325	GANAB	Glucosidase, alpha; neutral AB	hydrolases	ER,ME,PL
145	1	gi 38202257	Q14697	107263	5.7	32;20	41	335	GANAB	Glucosidase, alpha; neutral AB	hydrolases	ER,ME,PL
146	2	gi 62897195	P00367	61643	8.1	10;31+	20	121	GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1	unclassified	ER,ME,PL,MT
147	1	gi 7705704	Q9Y2Q3	25594	8.5	3;32+	19	89	GSTK1	Glutathione-S-transferase kappa 1	unclassified	PL,ME,MT,PE
148	4	gi 34811305	P09211	23452	5.5	9;22	66	117	GSTP1	Glutathione-S-transferase pi	metabolism	ER,ME,EX,PL
149	1	gi 89573929	P04406	24776	8.7	10;26	58	124	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	metabolism	LY,ME,NG,EX,PL,SY,MT
150	2	gi 67464043	P04406	36483	8.6	9;25+	35	417	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	metabolism	LY,ME,NG,EX,PL,SY,MT
151	1	gi 67464043	P04406	36483	8.6	4;23+	16	140	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	metabolism	LY,ME,NG,EX,PL,SY,MT
152	2	gi 31377697	Q8NC64	71933	6.9	17;23+	28	331	GLT25D1	Glycosyltransferase 25 domain containing 1	unclassified	unknown
153	1	gi 493066	P41250	78148	5.9	22;21	42	227	GARS	glycyl-tRNA synthetase	biosynthesis	ME
154	1	gij33357761	P12544	26313	9.2	14;23	67 70	1/8	GZIMA	Granzyme A	Immunity	SL
155	5	gil33357761	P12544	20313	9.2	10,23	62	241 534	GZMA	Granzyme A	Immunity	3L SI
150	4	gij33357761	P12544	20313	9.2	0·22±	47	371	GZMA GZMA	Granzyme A	Immunity	SL
158	1	gi 33037701	P10144	25894	9.6	9.20	41	112	GZMR	Granzyme B	Immunity	SI
159	2	gi 13096242	P10144	25894	9.6	12:33	57	131	GZMB	Granzyme B	Immunity	SI
160	2	gi 13096242	P10144	25894	9.6	12:26	57	141	GZMB	Granzyme B	Immunity	SL
161	2	gi 13096242	P10144	25894	9.6	7:22+	36	192	GZMB	Granzyme B	Immunity	SL
162	1	gi 13096242	P10144	25894	9.6	4:14+	18	92	GZMB	Granzyme B	Immunity	SL
163	1	gi 13096242	P10144	25894	9.6	10:38	50	100	GZMB	Granzyme B	Immunity	SL
164	1	gi 13096242	P10144	25894	9.6	13;27	64	162	GZMB	Granzyme B	Immunity	SL
165	2	gi 13096242	P10144	25894	9.6	9;25	41	105	GZMB	Granzyme B	Immunity	SL
166	1	gi 46981967	Q2TU84	46519	6.3	7;9	20	83	GIG18	Growth-inhibiting protein 18	unclassified	unknown
167	1	gi 119585457	P04899	35425	5.2	11;37+	52	153	GNAI2	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide2	GTPases	EX
168	2	gi 119574080	P63244	30942	7.0	5;62+	24	159	GNB2L1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	signal trans.	ER
169	1	gi 109091444	P29992	39373	5.1	8;13	27	91	GNA11	Guanine nucleotide binding protein alpha	GTPases	ER,LY,ME,EX
170	1	gi 404722	Q12774	44378	8.1	13;13	39	156	ARHGEF5	Guanine nucleotide regulatory protein	unclassified	unknown
171	2	gi 6680045	P62873	38151	5.6	6;16+	27	339	GNB1	Guanine nucleotide-binding protein beta-1	signal trans.	EN,ME,EX,PL,SY
172 m	1	gi 91992949	O43613	37073	5.6	12;27	47	126	GNB	HCRTR1 protein	signal trans.	EN.ME.EX.PL.SY
173	1	gi 306785 gi 306785	unknown P62879	38061 38061	5.8 5.8	13;26 9;3+	45 19	121 138	GNB2	G protein beta subunit Guanine nucleotide-binding protein beta	signal trans.	ME,MT
474	~		B 40000	04040		0.00	05		1100004	subunit		
174	2	gi 77702086	P10809	61346	5.7	9;32+	25	410	HSPD1	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	chaperone	ME,NG,EX,SY,MI
175	1	gi 188488	Q90QC1	70294	5.5 E 4	19,18	40	217		Heat shock 70kDa protein	chaperone	
176	2	gi 16507237	P11021	72402	5.1	27;20	51	306		Heat shock 70kDa protein 5	chaperone	
178	1	gi 360736	P11021	72100	5.0	20,23+	49	902 207		Heat shock 70kDa protein 5	chaperone	ER, ME EY DI MT
170	3	gi[10307237	P11021	72402	53	23,10	34	175		Heat shock 70kDa protein 8	chaperone	
180	2	gil5729877	P11142	71082	5.5	31.34+	59	690	HSPA8	Heat shock 70kDa protein 8	chaperone	
181	1	gij6723077	P11142	53580	5.6	15.25+	41	373	HSPA8	Heat shock 70kDa protein 8	chaperone	
182	5	gil62897129	P11142	71083	5.3	13.20+	28	271	HSPA8	Heat shock 70kDa protein 8	chaperone	LY ME NG EX PL SY MT
183	3	gi 20149594	P08238	83554	5.0	28;26	41	272	HSP90AB1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	chaperone	ME,EX,MT
184	3	gi 51859374	O95479	89379	6.7	15;20+	17	194	H6PD	Hexose-6-phosphate dehydrogenase	metabolism	ER
185	1	gi 4504505	P51659	80092	9.0	6;14+	9	78	HSD17B4	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	metabolism	ER,EN,ME,PE
186	1	gi 66933016	P12268	56226	6.4	11;7	26	138	IMPDH2	IMP dehydrogenase 2	biosynthesis	ME
187	1	gi 34452173	P20702	128946	6.2	8;19+	6	67	ITGAX	Integrin, alpha X *	membrane	PM
188	1	gi 34452173	P20702	128946	6.2	9;18+	8	103	ITGAX	Integrin, alpha X *	membrane	PM
189 190	1	gi 119629788	P05107	81553	6.5	12;36+	16	86	ITGB2	Integrin, beta 2 * not identified	membrane	РМ
191	1	gi 27262655	Q14005	66948	5.7	6;22+	10	159	IL16	Interleukin 16	Immunity	secreted
192	1	gi 27262655	Q14005	66948	5.7	5;35+	9	83	IL16	Interleukin 16	Immunity	secreted
193	1	gi 27262655	Q14005	66948	5.7	6;26+	10	103	IL16	Interleukin 16	Immunity	secreted
194	1	gi 62897717	P00338	36951	7.6	10;20	34	108	LDHA	Lactate dehydrogenase A	metabolism	ME,EX,SY
195	2	gi 62897717	P00338	36951	7.6	22;26	65	195	LDHA	Lactate dehydrogenase A	metabolism	ME,EX,SY
196	1	gi 40807029	Q9HBX2	106086	6.4	8;20+	9	124		Leukocyte-derived arginine aminopeptidase	nydrolases	unknown
197	1	gi 40807029		106086	6.4	12;20+	12	321		Leukocyte-derived arginine aminopeptidase	nydrolases	unknown
198	2	gi 11641261		106096	6.3	23;34+	27	443 250		Leukocyte-derived arginine aminopeptidase	hydrolases	unknown
199	1	gi 40607029		111075	0.4 6.2	20,30+	20	309		Leukocyte-derived arginine aminopeptidase	hydrolases	unknown
200	2	gi[11641261		111075	63	10,24	10	83		Leukocyte-derived arginine aminopeptidase	hydrolases	unknown
201	2	gil11041201		106086	0.3 6.4	0.12	11	03 76		Leukocyte-derived arginine aminopeptidase	hydrolases	unknown
203	1	gil4505029	P09960	69868	5.8	8.10	17	84	I TA4H	Leukotriene A4 hydrolase	hydrolases	CY
203	1	ail4758670	060711	44615	5.6	7.15	28	78			signal trans	CY
205	2	ail62896645	Q15036	53121	7.1	12:23	32	125	SNX17	Sorting nexin 17	trafficking	EN.ME.PI
206	2	gi 5453710	Q14847	30097	6.6	11:52+	39	315	LASP1	LIM and SH3 protein 1	adapter protein	ER.EN.ME PI
207	1	gi 5031887	Q93052	67129	7.2	9;18	24	93	LPP	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma	signal trans.	NU,CY,PL
208	2	gi 4557032	P00338	36900	5.7	13;30+	52	353	LDHA	L-Lactate Dehydrogenase	metabolism	ME,EX,SY
209	5	gi 4504965	P13796	70815	5.2	20;13+	41	482	LCP1	Lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	actin binding	CY
210	6	gi 4504965	P13796	70815	5.3	31;18+	64	675	LCP1	Lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	actin binding	CY
211	3	gi 4504965	P13796	70815	5.2	33;27+	67	867	LCP1	Lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	actin binding	CY
212	3	gi 10880979	P33241	37397	4.7	9;27+	54	490	LSP1	Lymphocyte-specific protein 1	Immunity	PM

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	NCBI Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide ^{b)}	Sequenz- abdeckung (%)	MASCOT	Gen Name	Protein	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
213	1	gi 10880979	P33241	37397	4.7	9;33	41	95	LSP1	Lymphocyte-specific protein 1	Immunity	PM
214	1	gi 10880979	P33241	37397	4.7	11;35+	60	578	LSP1	Lymphocyte-specific protein 1	Immunity	PM
215	1	gi 1658374	O00754	111986	6.7	11;28+	12	139	MAN2B1	Lysosomal acid alpha-mannosidase	hydrolases	LY,ME
216	1	gi 119604687	O00754	39694	5.9	7;44+	24	89	MAN2B1	Lysosomal acid alpha-mannosidase	hydrolases	LY,ME
217	1	gi 20067161	Q8IXB1	87251	7.3	13;31	23	97	DNAJC10	Macrothioredoxin (HSP)	chaperone	ER,ME
218	3	gi 30048109	P11586	102214	6.9	39;22	53	422	MTHFD1	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	multifunctional	EN,ME,PL,MT
219	2	gi 13699868	P11586	102152	6.8	21;46+	30	526	MTHFD1	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	multifunctional	EN,ME,PL,MT
220	1	gi 112789896	P30443	31710	5.4	6;8	29	82	HLA-A	MHC class I antigen	Immunity	ME
221		170 4507 40	D 00440	04000	• •	0.00	40	407		not identified	1	ME
222	1	gi 78450748	P30443	31808	6.0	8;38+	46	167	HLA-A	MHC class I antigen	Immunity	ME
223	1	gi 4468256	P30443	41801	5.7 4 0	3;32+	9 12	88 120		MHC class I antigen	Immunity	ME
224	1	gil47078703	P01907	20153	4.9 1 0	2,10+	13	103			Immunity	
225	'	gij47070703	101307	20133	4.3	2,127	15	105	HLA-DQAT		minumu	LI
226	1	gi 32401120	P01903	28771	5.4	7;8	29	101	DQA1/DR	MHC class II HLA-DQ/DR alpha	Immunity	LY
227	3	gi 836628	P01903	19850	4.8	9;19	55	128	HLA-DRA1	MHC class II HLA-DR alpha	Immunity	LY
228	3	gi 836628	P01903	19850	4.8	6;20+	46	334	HLA-DRA1	MHC class II HLA-DR alpha	Immunity	LY
229	1	gi 836628	P01903	19850	4.8	6;25+	43	240	HLA-DRA1	MHC class II HLA-DR alpha	Immunity	LY
230	1	gi 836628	P01903	19850	4.8	4;20+	23	1//	HLA-DRA1	MHC class II HLA-DR alpha	Immunity	LY
231	2	gi 619854	P01918	26547	6.7	12;12	67	176	HLA-DQB1	MHC class II HLA-DQ beta-1	Immunity	ME
232	5 1	gil0729990 gil386031	PUI9II	22304	0.Z	9,30+	02	200		MHC class II HLA-DR beta	Immunity	
233	1	gi[560951 gi[576091		22153	6.2	8.30	44 60	03 95		MHC class II HLA-DR beta-1	Immunity	ME
234	1	gi 570091	P01011	22504	6.2	10.16	76	148		MHC class II HI A-DR beta-2	Immunity	ME
236	4	gi 0723330	0861H6	30254	63	11.25	59	133		MHC class II HI A-DR beta-1	Immunity	ME
237	1	ail188241	Q861H6	30254	6.3	10.21	51	111	HLA-DRB1	MHC class II HLA-DR beta-1	Immunity	ME
238	1	gi 188241	Q861H6	30254	6.3	10:30	54	112	HLA-DRB1	MHC class II HI A-DR beta-1	Immunity	ME
239	1	ail188241	Q861H6	30254	6.3	11:38	59	117	HLA-DRB1	MHC class II HLA-DR beta-1	Immunity	ME
240	3	gil6729998	P01911	22504	6.2	7:34+	46	160	HLA-DRB2	MHC class II HLA-DR beta-2	Immunity	ME
241	1	gi 122252	P01911	23178	6.0	8;41+	47	133	HLA-DRB2	MHC class II HLA-DR beta-2	Immunity	ME
242	3	gi 188241	Q861H6	30254	6.3	11;32	59	123	HLA-DRB1	MHC class II HLA-DR beta-1	Immunity	ME
243	2	gi 23879	P28482	40794	6.7	10;20	31	108	MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	signal trans.	ME,PL
244	2	gi 4505257	P26038	67892	6.1	36;26	62	349	MSN	Moesin	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
245	2	gi 4505257	P26038	67892	6.1	42;43	70	395	MSN	Moesin	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
246 m	2	gi 4505257	P26038	67892	6,1	22;29	34	164	MSN	Moesin	autoskeleton	
240 m	2	gi 22027538	Q8WUM4	97385	6,1	14;39	23	89	PDCD6IP	PDCD6IP (see Spot 295)	Cyloskelelon	
247	2	gi 119625804	P26038	66678	5.9	19;5	30	212	MSN	Moesin	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
248	2	gi 4505257	P26038	67892	6.1	26;27	43	215	MSN	Moesin	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
249	2	gi 4505257	P26038	67892	6.1	26;22	32	222	MSN	Moesin	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
250	2	gi 4505257	P26038	67892	6.1	24;12	39	244	MSN	Moesin	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
251	2	gi 4505257	P26038	67892	6.1	30;19	47	281	MSN	Moesin	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
252	2	gi 4505257	P26038	67892	6.1	30;15	48	299	MSN	Moesin	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
253	2	gi 4505257	P26038	67892	6.1	30;17	52	300	MSN	Moesin	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
254	2	gi 4505257	P26038	67892	6.1	36;29+	58	684	MSN	Moesin	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
255	2	gi 4505257	P26038	67892	6.1	37;28+	63	820	MSN	Moesin	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
250	1	gi 119625804	P26038	66679	5.9	24;21	41	228	MSN	Moosin	cytoskeleton	
258	1	gi 119025004	GI:54873627	117303	9.9 9.0	27,13 44·10	40	204 457	MYO1G	Myosin 1G	trafficking	
250	1	gil15809016	P19105	10824	3.0 4.7	3.26+	18	96	MRCI	Myosin regulatory light chain MBCI	unclassified	unknown
260	1	gi 15809016	P19105	19838	4.7	2:31+	12	152	MRCI	Myosin regulatory light chain MRCI	unclassified	unknown
261	1	gi 119364624	P46459	83021	6.5	13:9	20	136	NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor	trafficking	EN.ME.SY
262	2	ail/7033370	P5/020	33667	5.2	0.15	12	106		N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment	trafficking	
202	~	-:::0000004	D05040	70000	0.2	0,10		100		protein, alpha (SNAP-alpha)		
263	1	gil66392203	P35240	72090	0.7	14,11 10·35±	32 50	141 204		NME1-NME2 protein	multifunctional	
265	1	gi 00332203 gi 27734709	Q5JPE7 or	135077	5.5	18;18	22	147	NOMO	Nodal modulator 2 or 3	signal trans.	ER
000	~	1000 450 40	P69849	40000	- 4	0.44	40					0)(1)(1)
266	3	gi 38045913	P15531	19869	5.4	9;41+	49	290	NME1	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A)	multifunctional	CY,NU
267	1	gi 984305	Q13177	55166	6.0	8;17	29	85	PAK2	p21 (CDKN1A)-activated kinase 2	signal trans.	CY,PL
268	1	gi 127798593	P14222	64240	8.1	14;18	33	147	PRF1	Perforin 1 (pore forming protein)	Immunity	SL
209	ა ი	gij127798593	P14222	64240	8.1	0,11+	20	290		Perform 1 (pore forming protein)	Immunity	SL
270	2	gi 127798593	P14222	64240	8.1 0.4	10,7	40	205		Perform 1 (pore forming protein)	Immunity	SL
271	3	gil127708502	F 14222	64240	0.1	10,10	43	231		Perforin 1 (pore forming protein)	Immunity	SL
272	3	gil 127796595	F 14222	04240	0.1 8.3	19,21	7/	210		Peroviredovin 1	redox proteins	
274	1	gij - -000091	013162	307/0	5.0	6.10	20	70	PRDY/	Peroxiredoxin 4	redox proteins	
275	5	gij 3433349 ai 5453549	Q13162	30749	5.9 5.0	12·37-	60	302	PRDX4	Peroxiredoxin 4	redox proteine	
276	1	ail5453540	Q13162	307/0	5.9	3.201	16	141	PRDX4	Peroxiredoxin 4	redox proteins	
277	1	giju+00049 ai 4758638	P30041	25133	5.9 6 0	9.10	45	112	PRDX6	Peroxiredoxin 6	redox proteins	IY ME FX PL SV
278	1	gi 4758638	P30041	25133	6.0	12;24	66	152	PRDX6	Peroxiredoxin 6	redox proteins	LY,ME,EX,PL.SY
279	1	gi 4261934	P30086	16068	8.8	7;22	66	97	PEBP1	Phosphatidylethanolamine binding protein 1 (Neuropolypeptide b3)	inhibitor	ME,EX,SY
280	1	gi 11321601	Q01813	86454	7.5	22;11	33	244	PFKP	Phosphofructokinase, platelet	metabolism	ME,PL
281	1	gi 189926	P36871	61674	6.2	7;8	22	84	PGM1	Phosphoglucomutase 1	metabolism	CY
282	1	gi 4505763	P00558	44985	8.3	10;29	30	78	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	metabolism	ME,EX,SY,MT
283	2	gi 4505763	P00558	44985	8.3	5;18+	15	138	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	metabolism	ME,EX,SY,MT

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	NCBI Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide ^{b)}	Sequenz- abdeckung (%)	MASCOT	Gen Name	Protein	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
284	1	gi 4505763	P00558	44985	8.3	13;20	46	137	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	metabolism	ME,EX,SY,MT
285	1	gi 4505763	P00558	44985	8.3	10;19	33	96	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	metabolism	ME,EX,SY,MT
286	4	gi 4505753	P18669	28900	6.7	15;6	73	254	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	metabolism	ME,EX,SY
287	1	gi 32455248	P42336	83889	5.8	12;21	16	85	PIK3CA	Phosphoinositide-3-kinase, regul.subunit	signal trans.	unknown
288	1	gi 5453539	P22234	47790	7.0	13;17	34	150	PAIC	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	multifunctional	EN,SY
289	1	gi 4503915	Q52M77	108953	6.3	9;15	15	75	GART	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	metabolism	ME
290	1	gi 4503915	Q52M77	108953	6.3	8;13	12	66	GART	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	metabolism	ME
291	1	gi 28416899	Q52M77	46631	6.3	15;14	45	192	GART	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	metabolism	ME
292	1	gi 119612222	P11940	47647	9.0	20;19	50	192	PABPC1	Poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	metabolism	ER,EN,ME,PL
293	1	gi 13937850	Q9UHG3	44284	5.6	7;22	21	63 ^ĸ	PCYOX1	Prenylcysteine oxidase 1	degradation	ER,LY,EN,ME
294	2	gi 999511	P07737	15085	8.5	7;51+	57	336	PFN1	Profilin I	actin binding	ME,EX,PL,MT
295 m	1	gi 13375569	Q8WUM4	96563	6.1	20;36	32	163	PDCD6IP	PDCD6IP (HP95)	trafficking	ME,EX
206	2	gij50513540	P26038	44006	7 4	11.00.	27	170		Draliferation appariated 201, 28kDa	aignal trana	
290	2	gil33079090 gil63252888	P13674	61296	7.1 5.7	15.24	31	172	ΡΑ2G4 Ρ/ΗΔ1	Prolyl 4-bydroxylase, alpha L subunit	metabolism	
298	3	gil20070125	P07237	57480	4.8	28:34+	64	804	P4HB	Prolyl 4-hydroxylase, beta subunit	multifunctional	ER ME
200		gil20070125	P07237	57480	4.8	28:23	61	321	P4HB	Prolyl 4-hydroxylase, beta subunit (P4HB)		
299 m 300	1	gi 119610102	P07237	41073	4.6	23;31	59	217	P4HB	Proline 4-hydroxylase, beta (P4HB) not identified	multifunctional	ER,ME
301	2	gi 30410792	Q9UL46	27555	5.5	6;46+	31	303	PSME2	Proteasome activator subunit 2	Immunity	ME
302	1	gi 5453990	Q06323	28876	5.8	12;10	57	160	PSME1	Proteasome activator subunit 1	Immunity	PL,MT
303	1	gi 75766275	P62937	18040	8.4	3;18+	15	123	PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A (Cyclophilin A)	chaperone	ME,EX,MT
304	1	gi 4506181	P25787	25996	6.9	7;18	50	91	PSMA2	Proteasome subunit, alpha type, 2	hydrolases	CY,NU
305	1	gi 116283481	O14818	26868	9.0	8;22	47	90	PSMA7	Proteasome subunit, alpha type, 7	hydrolases	ME,MT
306	1	gi 62897947	P20618	26702	8.3	8;39+	47	124	PSMB1	Proteasome subunit, beta type, 1	hydrolases	ME,CY
307	2	gi 119627813	P49721	20365	7.0	4;37+	25	129	PSMB2	Proteasome subunit, beta type, 2	hydrolases	CY,NU
308	5	gi 119597640	P30101	54454	6.8	21;43+	49	445	PDIA3	Protein disulfide isomerase family A 3	chaperone	ER,LY,ME,NG,EX,PL
309	3	gi 119597640	P30101	54454	6.8	17;29+	43	429	PDIA3	Protein disulfide isomerase family A 3	chaperone	ER,LY,ME,NG,EX,PL
310	3	gi 1208427	P30101	57160	6.0	18;35+	47	413	PDIA3	Protein disulfide isomerase family A 3	chaperone	ER,LY,ME,NG,EX,PL
311	3	gi 1710248	Q14554	46512	5.0	16;32+	54	795	PDIA5	Protein disulfide isomerase-related protein 5	chaperone	ER,ME,PL
312	1	gi 1710248	Q14554	46512	5.0	4;15+	14	91	PDIA5	Protein disulfide isomerase-related protein 5	chaperone	ER,ME,PL
313	1	gij1710248	Q14554	46512	5.0	15;30+	54	580	PDIA5	Protein disunde isomerase-related protein 5	cnaperone	ER,IME,PL
314	1	gi 12053195	Q9UNF0	51663	5.3	10;11	22	104	PACSIN2	in neurons protein 2	adapter protein	unknown
315	1	gi 15488917	P14314	45339	4.3	2;4+	5	100	PRKCSH	Protein kinase C substrate 80K-H isoform 1	unclassified	ER,ME,PL
316	1	gi 27436889	Q9H488	44383	8.8	5;30+	15	68	POFUT1	protein O-rucosyltransferase 1 isoform 1 precursor	unclassified	ER
317	4	gi 4506003	P62136	38229	5.9	20;15	70	2//	PPP1CA	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, α	nydrolases	EX
318	1	gi 4506003	P62136	38229	5.9	3;12+	8	120	PPP1CA	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, α	hydrolases	EX
310	1	gij5008500	P62140	37061	5.8	3,12+	55	165		Protein phosphatase 1, catalytic subunit, γ	bydrolases	ME DI
320	1	gil4300003	P30153	66049	5.0	10.26	25	84	PPP2R1A	Protein phosphatase 2 regulatory subunit A	scaffolding	MT
321	2	gil23510362	P06241	60673	5.9	16:29+	25	297	FYN	Protein-tyrosin kinase fyn	signal trans	PM
322	2	gil6005846	Q6IBS0	39751	6.4	13:17	60	168	PTK9L	PTK9L protein tyrosine kinase 9-like	actin binding	CY
323	2	qi 33870117	P14618	62046	9.0	6:28+	10	65	PKM2	Pyruvate kinase, muscle	metabolism	ME,EX,SY
324	1	gi 67464392	P14618	60277	8.2	11;18	25	106	PKM2	Pyruvate kinase, muscle	metabolism	ME,EX,SY
325	2	gi 67464392	P14618	60277	8.2	22;31+	53	677	PKM2	Pyruvate kinase, muscle	metabolism	ME,EX,SY
326	1	gi 67464392	P14618	60277	8.2	24;19	53	287	PKM2	Pyruvate kinase, muscle	metabolism	ME,EX,SY
327	1	gi 4506467	P35241	68635	6.0	20;41+	34	427	RDX	Radixin	actin binding	ER,EN,ME,EX,PL
328	1	gi 5107682	P62826	23307	9.0	3;16+	16	167	RAN	RAN, member RAS oncogene family	GTPases	ME,EX
329	1	gi 4757768	P52565	23250	5.0	7;10	38	98	ARHGDIA	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	GTPases	ME,PL,MT
330	1	gi 56676393	P52566	23031	5.1	8;19	57	98	ARHGDIB	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	GTPases	ME,PL,MT
331 332	1 1	gi 4506753 gi 9951915	Q9Y265 P23526	50538 48255	6.0 5.9	10;5 12;13	32 31	131 142	RUVBL1 AHCY	RuvB-like 1 S-adenosylhomocysteine hydrolase	multifunctional hydrolases	ME,CY,NU ME,CY
333	1	gi 38016914	Q9Y3Z3	72896	6.7	9;22+	14	98	SAMHD1	SAM domain- and HD domain-containing protein 1	unclassified	unknown/uncharacterized
334	2	gi 22477159	Q15436	87022	6.6	11;23+	21	187	SEC23A	Sec23 homolog A	trafficking	ER,ME,PL
335	2	gi 119626209	Q9NVA2	49260	6.5	13;35+	35	187	SEPT11	Septin 11	GTPases	EN
336	2	gi 1469179	Q14141	48911	6.4	17;26	48	185	SEPT6	Septin 6 (KIAA0128)	unclassified	unknown/uncharacterized
337	3	gi 58535461	Q16181	48913	8.8	14;20	43	138	SEPT7	Septin 7 (CDC10 isoform 2)	unclassified	ME,PL,SY
338	1	gi 58535461	Q16181	48913	8.8	7;8	21	72	SEPT7	Septin 7 (CDC10 isoform 2)	unclassified	ME,PL,SY
339	1	gi 14530107	Q9UHD8	38690	7.1	5;27+	17	82	SEPT9	Septin 9	unclassified	ME
340	1	gi 13489087	P30740	42829	5.9	20;44+	51	685	SERPINB1	Serpin peptidase inhibitor,clade B,member 1	inhibitor	CY
341	2	gi 62898301	P30740	42857	5.9	9;27	30	77	SERPINB1	Serpin peptidase inhibitor, clade B, member 1	inhibitor	CY
342	2	gi 62898301	P30740	42857	5.9	6;9	21	67	SERPINB1	Serpin peptidase inhibitor,clade B,member 1	Inhibitor	CY
343	4	gi 13489087	P30740	42829	5.9	16;27+	50	575	SERPINB1	Serpin peptidase inhibitor,clade B,member 1	Inhibitor	CY
344	3	gi 4758906	P50453	43004	5.6	15;32+	43	418	SERPINB9	Serpin peptidase inhibitor, clade B, member 9	Inhibitor	CY
345 346	3	gi 4758906 gi 6274552	P50453	43004 87850	5.6 5.7	17;30+ 12·17	43 20	342 106	SERPINB9	Serpin peptidase inhibitor,clade B,member 9 Signal transducer and activator of	innibitor	
347	' 1	gi 4759140	O14745	39130	5.6	11;21+	40	418	SLC9A3R1	transcription 1 Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen	scaffolding	ME,EX,PL
										exchanger), isoform 3 regulator 1	-	

9 1 9(H751H0 0 H774 39130 5.6 14.37+ 46 37 SLCHASH Submatrix	Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	NCBI Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide ^{b)}	Sequenz- abdeckung (%)	MASCOT	Gen Name	Protein	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
39 39<	348	1	gi 4759140	O14745	39130	5.6	14;37+	45	397	SLC9A3R1	Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 3 regulator 1	scaffolding	ME,EX,PL
90 2 912280070 P10494 9058 6 2.2.8 31 6 STM11 Stattmin funcapretion 13 orageword ME/L_SY 32 1 91624333 04170.2 2.312.4 5 2.52.4 13 13 5/2.1.3 Stattales modifying factor 2-like 1 prectaro indicabilities ER ER 33 1 911702751 0480.7.7 2.217.6 4 2.43.4 11 7.5 Stattales modifying factor 2 inclassified ER ER 34 1 91179620035 05803 66553 1 1.2.1.4 31 2.9 STREPS Syntamin binding protein 3.MUNCI-8 inflicting ME/L ME/L 36 1 1.2.1.4 13 10 T5.5 T5.7 10.7 To complex protein 1 siculari spina inflicting ME/L ME/L 36 1 1.2.1.4 13 10.7 To complex protein 1 siculari spina inflicting ME/L ME/L ME/L ME/L ME/L ME/L	349	3	gi 77404397	Q7KZF4	102618	6.7	32;20	48	327	SND1	Staphylococcal nuclease domain containing 1	unclassified	ER,ME,PL
381 4 (a)[2333161 P31486 63227 6 232 3171 Strate-induced-sphcapprotein 1 chaperone ME/L_SY 383 1 (a)[1102/2785 QMAU7 22024 7.0 6,554 10 19 Subtase modifying factor 2 unclassified ER.ME 383 1 (a)[1102/2785 QMAU7 22024 7.0 6,554 10 19 Subtase modifying factor 2 unclassified ER.ME 384 (a)[1102/2785 QMAU7 22024 7.0 6,553 3.01 20 DOLT Suptase modifying factor 2 unclassified ER.ME EX 384 10100075 CON186 6833 60 17.41 12 10 TSTRPS Syntasin binding proton 1.MUU14 Babba chaperone ER.LIN.M.E.X 391 1231838 GUGBS3 6737 18.42 23 10 15 17 17 champerone ER.LIN.M.E.X 391 10[11020075 CON186 8.912.1 17.80 17 <td>350</td> <td>2</td> <td>gi 122890670</td> <td>P16949</td> <td>9858</td> <td>6.8</td> <td>2;28+</td> <td>31</td> <td>69</td> <td>STMN1</td> <td>Stathmin 1/oncoprotein 18</td> <td>cytoskeleton</td> <td>SY</td>	350	2	gi 122890670	P16949	9858	6.8	2;28+	31	69	STMN1	Stathmin 1/oncoprotein 18	cytoskeleton	SY
382 1 9 8524333 0eHCN8 23812 6 2382 1 37 5DF21 Strates moding factor 2 unclassified ER 384 1 9 11902355 08M3/7 24216 4 243 1 7 5UMF2 Suffases moding factor 2 unclassified ER RE 384 1 9 11902355 08M3/7 24216 4 243 1 7 5UMF2 Suffases moding factor 2 unclassified ER RE R	351	4	gi 5803181	P31948	63227	6.4	23;36+	39	182	STIP1	Stress-induced-phosphoprotein 1	chaperone	ME,PL,SY
363 1 0111022285 008Hay7 32024 7 555.e 10 94 SURTS Subtates moltifying factor 2 unchaseline ER.ME 365 2 013165776 PX0441 16424 5.8 355.e 20 30 20011 Subtates moltifying factor 2 unchaseline ER.ME 367 2 013165776 PX0441 16424 5.8 355.7 PX0441 16425 PX0441 16425 PX0441 16425 PX0441 1642 PX0441 1642 PX0441 1443 PX0457 PX0441 PX0457 PX0477 PX0457 PX0477 PX0477 PX0477 PX0477 PX0477 PX0477 PX0477 PX0477 PX0477 PX0477 <t< td=""><td>352</td><td>1</td><td>gi 56243533</td><td>Q9HCN8</td><td>23812</td><td>6.5</td><td>2;52+</td><td>13</td><td>137</td><td>SDF2L1</td><td>Stromal cell-derived factor 2-like 1 precursor</td><td>unclassified</td><td>ER</td></t<>	352	1	gi 56243533	Q9HCN8	23812	6.5	2;52+	13	137	SDF2L1	Stromal cell-derived factor 2-like 1 precursor	unclassified	ER
38.1 9 19/17822383 Derived Market 20/17 Participation Control Market EX.MT 38.6 1 9/17822344 Perior 1231 1311 </td <td>353</td> <td>1</td> <td>gi 110227851</td> <td>Q8NBJ7</td> <td>32024</td> <td>7.0</td> <td>5;55+</td> <td>19</td> <td>94</td> <td>SUMF2</td> <td>Sulfatase modifying factor 2</td> <td>unclassified</td> <td>ER,ME</td>	353	1	gi 110227851	Q8NBJ7	32024	7.0	5;55+	19	94	SUMF2	Sulfatase modifying factor 2	unclassified	ER,ME
35 2 (1) 1015/26 PUA41 1021 6.3 3.01 30 101 Supervised and purports Math.Ex.NII Supervised and purports Su	354	1	gi 119628385	Q8NBJ7	24216	6.4	2;43+	11	75	SUMF2	Sulfatase modifying factor 2	unclassified	ER,ME
300 a) 1/11 1/	355	2	gi 31615796	P00441	16042	5.8	3;50+	20	90	SOD1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	redox proteins	ME,EX,MI
367 1 1 1 1 2 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 <th1< th=""> 1 1 1</th1<>	350	1	gi 119593214	P51571	12311	6.4	1;7+	10	103	55K4 6TVBD2	Signal sequence receptor, delta	signal trans.	
abs abs bit is in the interval abs	357	ו ר	gil12004033	Q15033	00000	0.1	12,21+	51	209	STADP2	Syntaxin binding protein 2, MUNC18-2	trafficking	
org 1 org 11990075 000198 6833 8.0 1721 38 167 07007 Multicity Here ER.NME.EX 081 1 001253257 P1797 6019 5.2 2.4 17 20 CPI	350	2	gi 12804033	000186	68633	8.0	20,12 14·41±	31	203	STXBP3	Syntaxin binding protein 2, MUNC18-2	trafficking	
1981 2 girspace P17937 P0189 P0189 E.R.M.ME.X. PCPL T-complex protein 1 suburit sight chaperone E.R.EN.ME.X. 383 1 girspace P17937 P0180 A P17937 P17937 P17937 P17937 P17937 P1792 P1794 P17947	360	1	gil118600975	000186	68633	8.0	17.21	38	167	STYRPS	Syntaxin binding protein 3, MUNC18-3	trafficking	ME PI
Sec 1 gilf288257 P1798 P17998 P17998 P17998 <	361	2	gil 10000575	P17987	60819	5.8	20.26	41	203	TCP1	T-complex protein 1 subunit alpha	chaperone	
383 1 021233188 03110 TES Testin undessified untrouvincharacterized 385 4 01457757 P37802 2548 84 1825 950 Transpein 2 undessified MEX.MT 385 4 01457757 P37802 2548 14 124 90 Transpein 2 undessified ME.MT 385 1 014577645 P60174 26388 6.5 16.11 81 161 TFI1 Transpeina 2 undessified ME.EX.SY.MT 386 1 014577645 P60174 26388 6.5 16.19 81 226 TPI1 Tricosphosphate isomerase 1 undessified ME.EX.SY.MT 386 1 014567645 P60174 26388 6.5 16.19 81 226 TPIN Tricosphosphate isomerase 1 undessified ME.EX.SY.MT 370 01056644 P6858 47977 50 124 90 305 TUDA Tubuin, apha Cyosbeteto	362	1	gil57863257	P17987	60819	5.8	9:12	17	89	TCP1	T-complex protein 1 subunit alpha	chaperone	ER.EN.ME.EX
364 3 937138214 039828 47375 73724 235 830 TXNOC4 Threadout domain containing 4 chaperone ERKEPL 366 1 9138891 P23401 6528 79 1426 80 731 Transpin f unclassified ME.EX.SY.MT 366 1 91450765 P60174 2688 6.5 11:1 51 151 171 Transpin f unclassified ME.EX.SY.MT 367 2 91450765 P60174 2688 6.5 16:19 81 2.6 TP11 Triosephosphate isomerase 1 unclassified ME.EX.SY.MT 367 1 914714103 P6073 2893 4.8 10:24 TP31 Transpin f unclassified ME.EX.SY.MT 371 4 914006444 P6836 4797<7<50	363	1	gil23238188	Q9UGI8	48703	7.8	8:4	23	110	TES	Testin	unclassified	unknown/uncharacterized
965 4 91497357 P37802 2248 8.4 18.2 89 249 TAGLN2 Transpelin 2 undiassified ME_EN 867 1 914907845 P60174 2838 6.5 111 51 161 1711 Transpelopable isomerase 1 undiassified ME_EX_SYMT 868 1 914907645 P60174 2838 6.5 161 84 74 TP11 Trisnephopable isomerase 1 undiassified ME_EX_SYMT 870 2 914507645 P60174 2838 6.5 161.9 81 265 TP11 Trisnephopable isomerase 1 undiassified ME_EX_SYMT 871 914907645 P60174 2838 6.1737 5.0 12.44 TVBA Tropomyonin 3 isoform 2 undiassified ME_EL CY 871 9140306446 P68366 4797 5.0 12.33 45 44 TUBA Tubain, apha cytoskeleton ME_EL Statt Statt Statt Statt Statt </td <td>364</td> <td>3</td> <td>gi 37183214</td> <td>Q9BS26</td> <td>47297</td> <td>5.1</td> <td>17:32+</td> <td>43</td> <td>580</td> <td>TXNDC4</td> <td>Thioredoxin domain containing 4</td> <td>chaperone</td> <td>ER.ME.PL</td>	364	3	gi 37183214	Q9BS26	47297	5.1	17:32+	43	580	TXNDC4	Thioredoxin domain containing 4	chaperone	ER.ME.PL
368 1 9	365	4	gi 4507357	P37802	22548	8.4	18;25	89	249	TAGLN2	Transgelin 2	unclassified	ME,MT
367 1 364 9 <td>366</td> <td>1</td> <td>qi 388891</td> <td>P29401</td> <td>68528</td> <td>7.9</td> <td>14;24</td> <td>30</td> <td>133</td> <td>ТКТ</td> <td>Transketolase</td> <td>unclassified</td> <td>ME,EN</td>	366	1	qi 388891	P29401	68528	7.9	14;24	30	133	ТКТ	Transketolase	unclassified	ME,EN
368 1 9 460745 P60174 2038 6.5 4.1 24 74 P11 Trosephosphale isomerase 1 unclassified MEE.X.SY.MT 370 2 9 42119203 P06753 2234 4.8 18;31+ 40 422 TPM3 Tropomyosin 3 isoform 2 unclassified MEE.X.SY.MT 371 4 9 4470761 P6733 2245 8 10 2 No 288 Tropomyosin 4 unclassified ME ME 371 1 9 140908448 P6866 46797 50 13:34 63 14 12 UBA Tubulin, higha cytoskelton ME,PL. 375 2 9 10090848 P6866 46797 50 13:34 64 124 Tubulin, higha cytoskelton ME,PL. 377 1 9 368656 QST81 5024 48 1642 57 48 1642 57 48 1642 74 74 174 745 174	367	1	gi 4507645	P60174	26938	6.5	11;11	51	161	TPI1	Triosephosphate isomerase 1	unclassified	ME,EX,SY,MT
368 1 alight 30744 9807 4 9807 2 9877 2 9877 2 9877 2 9877 2 9877 2 9877 2 9877 2 9877 2 9877 2 9877 5 1 9877 5 1 9877 5 1 9877 5 1 9877 5 1 9877 5 1 9877 5 1 9877 5 1 9877 5 1 9877 5 1 9877 5 1 9877 5 1 9877 5 1 9877 1 98786 6 6 707 1 98786 6 6 707 7 9877 1 98786 6 707 1 9877 1 9877 1 9877 1 9877 1 9877 1 9877 1 9877 1 9877 1 9877 1	368	1	gi 4507645	P60174	26938	6.5	4;1	24	74	TPI1	Triosephosphate isomerase 1	unclassified	ME,EX,SY,MT
370 2 9124119203 PORTS3 2243 4.8 18.31 4.9 4.9 4.2 TPM3 Tropomyosin 3 isoform 2 unclassified unclassified ME 371 4 gik7419914 P23381 53474 5.8 8.10 21 92 WARS Tropomyosin 4 unclassified unclassified ME PLCY 373 1 gik70499644 P68366 46797 5.0 13.31 50 10.84 Tubini, alpha cytosketon ME,PL 376 2 gilf03096444 P68366 46797 5.0 13.33 54 41 Tub Tubini, alpha cytosketon ME,PL 377 1 gilf0306644 P68366 46797 5.0 13.33 54 44 745 HSP010 Tuburin, alpha cytosketon ME,PL,SY 378 1 gilf0456607 P14625 92567 4.8 37.28 50 1571 Harron Frort HSP010 Tumor rejocino ant	369	1	gi 4507645	P60174	26938	6.5	16;19	81	226	TPI1	Triosephosphate isomerase 1	unclassified	ME,EX,SY,MT
3/1 4 9 4507651 96736 28619 4.7 9.31 3.0 288 TPM Tropomyosin 4 unclassified MEPLCY 373 1 9 149096484 P68366 46797 5.0 13.19 5.3 149 TUBA Tubulin, alpha cytoskeleton ME.P.L 374 2 9 109096484 P68366 46797 5.0 13.33 5.4 4.42 TUBA Tubulin, alpha cytoskeleton ME.P.L 376 2 9 109096484 P68366 46797 5.0 13.33 5.4 4.40 TUBA Tubulin, alpha cytoskeleton ME.P.L.SY 378 1 9 16066607 P14625 92.67 4.8 3.72.8 6.0 13.12 2 AT.5 Type 1 tumor necrosis factor receptor hydrolases ER.M.E.P.L.GO 38 1 9 6642987 Q9N208 10.9 1.3 2 AT.5 Type 1 tumor necrosis factor receptor hydrolases ER.M.E.sccreted 38 1	370	2	gi 24119203	P06753	29243	4.8	18;31+	49	482	TPM3	Tropomyosin 3 isoform 2	unclassified	unknown/uncharacterized
3/2 1 g 47419914 P2381 S3474 5.8 8.10 2.1 9.2 WARS Typicphamyl-RNA synthetase biosynthesis MEPL_CY 374 2 g 109096444 P68366 46797 5.0 13.31 40 Tubulin, alpha cytoskeleton ME.PL 376 2 g 109096444 P68366 46797 5.0 13.33 40 112 Tubulin, alpha cytoskeleton ME.PL 377 1 g 3080871 CST81 5004 48 16.42+ 5 58 TUB Tubulin, heta cytoskeleton ME.PL_SY 378 4 g 61656607 P14625 2567 4.8 57.23+ 47 FSP Tumor rejection antigen (gp66) chaperone ER.ME.PL_CO 381 1 g 61656007 P14625 2567 4.8 57.24+ FSP FSP Tumor rejection antigen (gp66) chaperone ER.ME.PL_CO 381 2 g 6042987 Q9NZ08 10792 6.0 </td <td>371</td> <td>4</td> <td>gi 4507651</td> <td>P67936</td> <td>28619</td> <td>4.7</td> <td>9;31+</td> <td>30</td> <td>268</td> <td>TPM4</td> <td>Tropomyosin 4</td> <td>unclassified</td> <td>ME</td>	371	4	gi 4507651	P67936	28619	4.7	9;31+	30	268	TPM4	Tropomyosin 4	unclassified	ME
373 1 9 10009644 P68366 46797 5.0 13,19 53 149 TUBAI Tubalin, alpha cytoskeleton ME_PL 375 2 9 10009644 P68366 46797 5.0 13,33+ 49 1108 Tubalin, alpha cytoskeleton ME_PL 376 2 9 100096444 P68366 46797 5.0 13,33+ 49 12 TUBA Tubalin, alpha cytoskeleton ME_PL 377 1 9 16088719 OSST8 50006 4.8 16,42+ 50 35 TUB Tubalin, beta cytoskeleton ME_PL_SY 378 1 9 1665607 P14625 92567 4.8 37,24+ 56 67 P14007 Tubalin, beta cytoskeleton ME_PL_SY 378 1 9 664297 Q9N208 107923 6.0 13,12 25 12 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER.ME.secreted 383 2 9 664297 Q9N208 107923 6.0 25,11 35 25	372	1	gi 47419914	P23381	53474	5.8	8;10	21	92	WARS	Tryptophanyl-tRNA synthetase	biosynthesis	ME,PL,CY
374 2 9 109096444 P68366 46797 5.0 12.43+ 50 006 TUBAI Tubulin, alpha cytoskeleton ME.PL 376 2 9 109096444 P68366 46797 5.0 13.33+ 55 454 TUBA Tubulin, alpha cytoskeleton ME.PL 377 1 9 109096444 P68366 46797 5.0 13.33+ 55 454 TUBA Tubulin, alpha cytoskeleton ME.PL.SY 377 1 9 101656607 P14625 92567 4.8 32.33+ 44 745 HSP9061 Tumor rejection antigen (gp66) chaperone ER.ME.PL.GO 383 2 9 1642987 Q9N208 10792 6.0 12.12 27 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER.ME.secreted 383 2 9 642987 Q9N208 10792 6.0 12.12 30 2.15 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER.ME.secreted 384 1 9 102137531 Q9N208<	373	1	gi 109096484	P68366	46797	5.0	13;19	53	149	TUBA	Tubulin, alpha	cytoskeleton	ME,PL
375 2 gill0009644 P68366 46797 5.0 13:33 49 412 TUBA Tubulin, alpha cytoskeleton ME.PL 377 1 gil33695 QSST81 50240 4.8 24;24 67 298 TUBA Tubulin, beta cytoskeleton ME.PL SY 378 1 gil6166607 P14625 92567 4.8 37,284 670 MSP001 Tumor rejection antigen (gp96) chaperone ER.ME.PL.GO 381 1 gil6642987 QSN208 107923 6.0 13;12 25 12 ARTS-1 Type 1 tumor rejection antigen (gp96) chaperone ER.ME.PL.GO 382 2 gil6642987 QSN208 107923 6.0 12;12 7 167 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER.ME.secreted 384 2 gil6642987 QSN208 107923 6.0 21;12 30 219 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminope	374	2	gi 109096484	P68366	46797	5.0	12;43+	50	306	TUBA	Tubulin, alpha	cytoskeleton	ME,PL
376 2 gil 00905444 P68366 46737 5.0 13:33 55 454 TUBA Tubuin, lapha cytoskeleton ME.PL 377 1 gil 30865 055781 50240 48 42.4 72 85 TUBB Tubuin, beta cytoskeleton ME.PL.SY 378 4 gil 61656607 P14625 92567 4.8 32:33 44 745 HSP081 Tumor rejection antigen (gp96) chaperone ER.ME.PL.SO 381 1 gil 6642987 Q9NZ08 107923 6.0 13:12 25 122 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER.ME.secreted 383 2 gil 6642987 Q9NZ08 107923 6.0 19:21 70 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER.ME.secreted 384 2 gil 6642987 Q9NZ08 107923 6.0 12:12 30 21 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER.ME.secreted 383	375	2	gi 109096484	P68366	46797	5.0	13;33+	49	412	TUBA	Tubulin, alpha	cytoskeleton	ME,PL
377 1 9ij338685 CSST81 50240 4.8 24.24 67 298 TUBB Tubulin, beta cytoskeleton ME.P.L.SY 378 4 9ij61656607 P14625 92567 4.8 32.33+ 44 745 HSP00B1 Tumor rejection antigen (gp96) chaperone ER.ME.P.L.GO 381 1 gij61656607 P14625 92567 4.8 37.24+ 56 870 HSP00B1 Tumor rejection antigen (gp96) chaperone ER.ME.P.L.GO 381 1 gij61642987 Q9NZ08 107923 6.0 13:12 25 122 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER.ME.secreted 383 2 gij6642987 Q9NZ08 107923 6.0 21:12 30 219 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER.ME.secreted 384 2 gij6642987 Q9NZ08 107635 6.0 26:11 35 285 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER.ME.secr	376	2	gi 109096484	P68366	46797	5.0	13;33+	55	454	TUBA	Tubulin, alpha	cytoskeleton	ME,PL
378 1 gil18088719 CSST81 50096 4.8 16,42+ 50 358 TUBB Tubulin, beta cytoskeleton ME,PL,SY 378 4 16656607 P14625 92567 4.8 37.24 56 870 HSP90B1 Tumor rejection antigen (gp96) chaperone ER,ME,PL,GO 381 1 gil6656607 P14625 92567 4.8 37.24 56 870 HSP90B1 Tumor rejection antigen (gp96) chaperone ER,ME,PL,GO 382 1 gil6642987 Q9NZ08 106350 6.0 19:12 27 167 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 383 2 gil6642987 Q9NZ08 107923 6.0 21;12 30 219 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 384 2 gil6642987 Q9NZ08 107645 5.9 10;19 16 71 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted <td>377</td> <td>1</td> <td>gi 338695</td> <td>Q5ST81</td> <td>50240</td> <td>4.8</td> <td>24;24</td> <td>67</td> <td>298</td> <td>TUBB</td> <td>Tubulin, beta</td> <td>cytoskeleton</td> <td>ME,PL,SY</td>	377	1	gi 338695	Q5ST81	50240	4.8	24;24	67	298	TUBB	Tubulin, beta	cytoskeleton	ME,PL,SY
379 4 gil61656607 P14625 92567 4.8 32.33+ 44 745 HSP90B1 Tumor rejection antigen (gp66) chaperone ER,ME,PL,GO 381 1 gil6642987 Q9N208 107923 6.0 13.12 25 122 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,PL,GO 382 1 gil642987 Q9N208 106350 6.0 16:18 21 136 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 384 2 gil6642987 Q9N208 107923 6.0 19:21 27 167 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 384 2 gil6642987 Q9N208 107635 6.0 26:11 35 285 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 386 1 gil320137531 Q9N208 106455 9 10:19 16 71 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis f	378	1	gi 18088719	Q5ST81	50096	4.8	16;42+	50	358	TUBB	Tubulin, beta	cytoskeleton	ME,PL,SY
380 3 gi[61656607 PI4625 92567 4.8 37;28+ 56 870 HSP90E1 Tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator chaperone ER.ME.PL.GO 381 1 gi[61656607 PI4625 92567 4.8 37;28+ 56 870 HSP90E1 Tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER.ME.secreted 382 2 gi[6642987 Q9NZ08 107923 6.0 19;21 27 167 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER.ME.secreted 384 2 gi[6642987 Q9NZ08 107923 6.0 21;12 30 219 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER.ME.secreted 385 1 gi[317182302 Q9NZ08 107645 5.9 10;19 16 71 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER.ME.secreted 387 1 gi[35830 P2231	379	4	gi 61656607	P14625	92567	4.8	32;33+	44	745	HSP90B1	Tumor rejection antigen (gp96)	chaperone	ER,ME,PL,GO
381 1 gij6642987 Q9NZ08 107923 6.0 13;12 25 122 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 382 1 gij20137531 Q9NZ08 106350 6.0 16;18 21 136 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 383 2 gij6642987 Q9NZ08 107923 6.0 19;21 27 167 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 384 2 gij6642987 Q9NZ08 107923 6.0 26;11 35 285 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 386 1 gij37182302 Q9NZ08 107645 5.9 10;19 16 71 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 387 1 gij1870747	380	3	gi 61656607	P14625	92567	4.8	37;28+	56	870	HSP90B1	Tumor rejection antigen (gp96)	chaperone	ER,ME,PL,GO
382 1 gi[20137531 Q9NZ08 10630 6.0 16;18 21 136 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 383 2 gi[6642987 Q9NZ08 107923 6.0 19;21 27 167 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 383 2 gi[6642987 Q9NZ08 107923 6.0 26;11 35 28 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 386 1 gi[3718230 Q9NZ08 107645 5.9 10;19 16 71 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 387 1 gi[37271 P07948 5645 6.1 3:30+ 8 3 LYN Tyrosine-protein kinase Lyn signal trans. McR,MC/ACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	381	1	gi 6642987	Q9NZ08	107923	6.0	13;12	25	122	ARTS-1	Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator	hydrolases	ER,ME,secreted
383 2 gil6642987 Q9NZ08 107923 6.0 19;21 27 167 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 384 2 gil6642987 Q9NZ08 107923 6.0 21;12 30 219 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 385 1 gil20137531 Q9NZ08 106350 6.0 26:11 35 285 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 386 1 gil37182302 Q9NZ08 107645 5.9 10;19 16 71 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 387 1 gil37182302 Q9NZ08 107645 5.9 10;19 16 71 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 388 jigil35830 P22314 </td <td>382</td> <td>1</td> <td>gi 20137531</td> <td>Q9NZ08</td> <td>106350</td> <td>6.0</td> <td>16;18</td> <td>21</td> <td>136</td> <td>ARTS-1</td> <td>Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator</td> <td>hydrolases</td> <td>ER,ME,secreted</td>	382	1	gi 20137531	Q9NZ08	106350	6.0	16;18	21	136	ARTS-1	Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator	hydrolases	ER,ME,secreted
384 2 gil642987 Q9NZ08 107923 6.0 21:12 30 219 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 385 1 gil20137531 Q9NZ08 106350 6.0 26:11 35 285 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 386 1 gil37182302 Q9NZ08 107645 5.9 10;19 16 71 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 387 1 gil37182302 Q9NZ08 107645 5.9 10;19 16 71 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 388 3 gil4507947 P54577 59448 6.6 16:25 34 143 YARS Tyrosyl-tRNA synthetase signal trans. ME;PL 391 gil35830 P22314 17879 5.5	383	2	gi 6642987	Q9NZ08	107923	6.0	19;21	27	167	ARTS-1	Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator	hydrolases	ER,ME,secreted
385 1 gij20137531 Q9NZ08 106350 6.0 26;11 35 285 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 386 1 gij37182302 Q9NZ08 107645 5.9 10;19 16 71 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 387 1 gij1871271 P07948 56454 6.1 3;30+ 8 83 LYN Tyrosine-protein kinase Lyn signal trans. unknown/uncharacterized 388 3 gij4507947 P54577 59448 6.6 16;25 34 143 YARS Tyrosine-protein kinase Lyn signal trans. ME,PL 390 2 gij35830 P22314 118799 5.5 18;20 23 149 UBE1 Ubiquitin activating enzyme E1 degradation ME,MT 391 3 gij910280 Q9NYU2 177819 5.4 15;11 14 260 UGC41 UDP-glucose pyrophosphorylase 2 metabolism EN,ME 393 <td>384</td> <td>2</td> <td>gi 6642987</td> <td>Q9NZ08</td> <td>107923</td> <td>6.0</td> <td>21;12</td> <td>30</td> <td>219</td> <td>ARTS-1</td> <td>Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator</td> <td>hydrolases</td> <td>ER,ME,secreted</td>	384	2	gi 6642987	Q9NZ08	107923	6.0	21;12	30	219	ARTS-1	Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator	hydrolases	ER,ME,secreted
386 1 gi]37182302 Q9NZ08 10764 5.9 10;19 16 71 ARTS-1 Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator hydrolases ER,ME,secreted 387 1 gi]187271 P07948 56454 6.1 3;30+ 8 83 LYN Tyrosine-protein kinase Lyn signal trans. unknown/uncharacterized 388 3 gil4507947 P54577 59448 6.6 16;25 34 143 YARS Tyrosine-protein kinase Lyn signal trans. ME,PL 389 1 gil35830 P22314 118799 5.5 18;20 23 149 UBE1 Ubiquitin activating enzyme E1 degradation ME,MT 390 2 gil1910280 Q9NYU2 177819 5.4 15;11 14 260 UGCGL1 UDP-glucose ceramide glucosyltransferase iscaffolding ER,ME 393 1 gil19913428 P21281 56807 5.6 11;14+ 34 49 ATP6V1B2 Vacuolar H+ATPase B2 channel LY,ME,NG,SY 394 1 gil46249758	385	1	gi 20137531	Q9NZ08	106350	6.0	26;11	35	285	ARTS-1	Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator	hydrolases	ER,ME,secreted
387 1 gi[187271 P07948 56454 6.1 3;30+ 8 83 LYN Tyrosine-protein kinase Lyn signal trans. unknown/uncharacterized 388 3 gi[4507947 P54577 59448 6.6 16;25 34 143 YARS Tyrosyl-tRNA synthetase signal trans. Mcnown/uncharacterized 389 1 gi[35830 P22314 118799 5.6 22;17 29 216 UBE1 Ubiquitin activating enzyme E1 degradation ME,MT 390 2 gi[910280 P22314 118799 5.5 18;20 23 149 UBE1 Ubiquitin activating enzyme E1 degradation ME,MT 391 3 gi[9910280 Q9NYU2 177819 5.4 15;11 14 260 UGCGL1 UDP-glucose caramide glucosyltransferase-like 1 scaffolding ER,ME 393 1 gi[11913428 P21281 56807 5.6 11;14+ 34 449 ATP6V182 Vacuolar H+ATPase B2 channel LY,ME,NG,SY 394 1 gi[46249758 P15311 <t< td=""><td>386</td><td>1</td><td>gi 37182302</td><td>Q9NZ08</td><td>107645</td><td>5.9</td><td>10;19</td><td>16</td><td>71</td><td>ARTS-1</td><td>Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator</td><td>hydrolases</td><td>ER,ME,secreted</td></t<>	386	1	gi 37182302	Q9NZ08	107645	5.9	10;19	16	71	ARTS-1	Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator	hydrolases	ER,ME,secreted
388 3 gil4507947 P54577 59448 6.6 16;25 34 143 YARS Tyrosyl-tRNA synthetase signal trans. ME,PL 389 1 gil35830 P22314 118799 5.6 22;17 29 216 UBE1 Ubiquitin activating enzyme E1 degradation ME,MT 390 2 gil35830 P22314 118799 5.5 18;20 23 149 UBE1 Ubiquitin activating enzyme E1 degradation ME,MT 391 3 gil9910280 Q9NYU2 177819 5.4 15;11 14 260 UGCGL1 UDP-glucose ceramide glucosyltransferase- like 1 scaffolding ER,ME 392 2 gil19910280 Q9NRW7 65435 5.6 11;14+ 34 449 ATP6V1B2 Vacuolar H+ATPase B2 channel LY,ME,NG,SY 394 1 gil1805063 Q9NRW7 65435 8.4 6;13+ 11 233 VPS45A Vacuolar protein sorting 45A trafficking LY,ME,NG,SY 395 2 gil46249758 P15311 69313 5	387	1	gi 187271	P07948	56454	6.1	3;30+	8	83	LYN	Tyrosine-protein kinase Lyn	signal trans.	unknown/uncharacterized
389 1 gij3s830 P22314 118799 5.6 22;17 29 216 UBE1 Ubiquitin activating enzyme E1 degradation ME,M1 390 2 gij3s830 P22314 118799 5.5 18;20 23 149 UBE1 Ubiquitin activating enzyme E1 degradation ME,M1 391 3 gij9910280 Q9NYU2 177819 5.4 15;11 14 260 UGCGL1 UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1 scaffolding ER,ME 392 2 gij119620362 Q16851 54940 7.7 12;13 27 139 UGPA2 UDP-glucose pyrophosphorylase 2 metabolism EN,ME 393 1 gij1805063 Q9NRW7 65435 8.4 6;13+ 11 233 VPS45A Vacuolar protein sorting 45A trafficking LY,ME,NG,SY 394 1 gij1805063 Q9NRW7 65435 8.4 6;13+ 11 233 VPS45A Vacuolar protein sorting 45A trafficking LY,ME,NG,SY 395 2 gij46249758 P15311 69313 </td <td>388</td> <td>3</td> <td>gi 4507947</td> <td>P54577</td> <td>59448</td> <td>6.6</td> <td>16;25</td> <td>34</td> <td>143</td> <td>YARS</td> <td>Tyrosyl-tRNA synthetase</td> <td>signal trans.</td> <td>ME,PL</td>	388	3	gi 4507947	P54577	59448	6.6	16;25	34	143	YARS	Tyrosyl-tRNA synthetase	signal trans.	ME,PL
390 2 gilss30 P22314 118799 5.5 1820 23 149 UBE1 Ubiquitin activating enzyme E1 degradation ME,MT 391 3 gil9910280 Q9NYU2 177819 5.4 15;11 14 260 UGCGL1 UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1 scaffolding ER,ME 392 2 gil19910280 Q9NYU2 177819 5.6 11;14+ 34 449 ATP6V1B2 Vacuolar H+ATPase B2 metabolism EN,ME 393 1 gil18105063 Q9NRW7 65435 8.4 6;13+ 11 233 VPS45A Vacuolar H+ATPase B2 channel LY,ME,NG,SY 394 1 gil18105063 Q9NRW7 65435 8.4 6;13+ 11 233 VPS45A Vacuolar protein sorting 45A trafficking LY,ME,NG,SY 395 2 gil46249758 P15311 69313 5.9 21;35+ 37 366 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 397 2 gil46249758 P15311 69313 5.9	389	1	gi 35830	P22314	118799	5.6	22;17	29	216	UBE1	Ubiquitin activating enzyme E1	degradation	ME,MI
391 3 gi[9910280 Q9NYU2 177819 5.4 15;11 14 260 UGCGL1 UDP-glucose ceramide glucosyltransferase- like 1 scaffolding ER,ME 392 2 gi[119620362 Q16851 54940 7.7 12;13 27 139 UGPA2 UDP-glucose pyrophosphorylase 2 metabolism EN,ME 393 1 gi[119613428 P21281 56807 5.6 11;14+ 34 449 ATP6V1B2 Vacuolar H+ATPase B2 channel LY,ME,NG,SY 394 1 gi[18105063 Q9NRW7 65435 8.4 6;13+ 11 233 VPS45A Vacuolar protein sorting 45A trafficking LY,ME,NG,SY 395 2 gi[46249758 P15311 69313 5.9 35;29+ 58 657 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 396 3 gi[46249758 P15311 69313 5.9 21;35+ 37 366 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 397 2 gi[46249758 P15311 69313 <td< td=""><td>390</td><td>2</td><td>gi 35830</td><td>P22314</td><td>118799</td><td>5.5</td><td>18;20</td><td>23</td><td>149</td><td>UBE1</td><td>Ubiquitin activating enzyme E1</td><td>degradation</td><td>ME,MI</td></td<>	390	2	gi 35830	P22314	118799	5.5	18;20	23	149	UBE1	Ubiquitin activating enzyme E1	degradation	ME,MI
392 2 gi[119620362 Q16851 54940 7.7 12;13 27 139 DGPA2 DDP-glucose pyrophosphorylase 2 metabolism EN,ME 393 1 gi[19913428 P21281 56807 5.6 11;14+ 34 449 ATP6V1B2 Vacuolar H+ATPase B2 channel LY,ME,NG,SY 394 1 gi[18105063 Q9NRW7 65435 8.4 6;13+ 11 233 VPS45A Vacuolar protein sorting 45A trafficking LY,ME,NG,SY 395 2 gi[46249758 P15311 69313 5.9 35;29+ 58 657 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 396 3 gi[46249758 P15311 69313 5.9 21;35+ 37 366 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 397 2 gi[46249758 P15311 69313 5.9 21;35+ 37 366 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 398 1 gi[46249758 P15311 69313 5.9 14;20 </td <td>391</td> <td>3</td> <td>gi 9910280</td> <td>Q9NYU2</td> <td>177819</td> <td>5.4</td> <td>15;11</td> <td>14</td> <td>260</td> <td>UGCGL1</td> <td>UDP-glucose ceramide glucosyltransferase- like 1</td> <td>scaffolding</td> <td>ER,ME</td>	391	3	gi 9910280	Q9NYU2	177819	5.4	15;11	14	260	UGCGL1	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase- like 1	scaffolding	ER,ME
393 1 gi[19913428 P21281 56807 5.6 11;14+ 34 449 A P6V1B2 Vacuolar H+A Pase B2 channel LY,ME,NG,SY 394 1 gi[18105063 Q9NRW7 65435 8.4 6;13+ 11 233 VPS45A Vacuolar protein sorting 45A trafficking LY,EN 395 2 gi[46249758 P15311 69313 5.9 35;29+ 58 657 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 396 3 gi[46249758 P15311 69313 5.9 21;35+ 37 366 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 397 2 gi[46249758 P15311 69313 5.9 20;18+ 35 329 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 398 1 gi[46249758 P15311 69313 5.9 14;20 21 97 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 398 1 gi[46249758 P15311 69313 5.9 14;20 21	392	2	gi 119620362	Q16851	54940	7.7	12;13	27	139	UGPA2	UDP-glucose pyrophosphorylase 2	metabolism	EN,ME
394 1 gi 18105063 Q9NRW7 65435 8.4 6;13+ 11 233 VPS45A Vacuolar protein sorting 45A trafficking LY,EN 395 2 gi 46249758 P15311 69313 5.9 35;29+ 58 657 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 396 3 gi 46249758 P15311 69313 5.9 21;35+ 37 366 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 397 2 gi 46249758 P15311 69313 5.9 20;18+ 35 329 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 398 1 gi 46249758 P15311 69313 5.9 14;20 21 97 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 398 1 gi 46249758 P15311 69313 5.9 14;20 21 97 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 399 1 gi 14822373 Q8IWB7 47320 7.0 9;40+ 24	393	1	gi 19913428	P21281	56807	5.6	11;14+	34	449	ATP6V1B2	Vacuolar H+ATPase B2	channel	LY,ME,NG,SY
395 2 gi 46249758 P15311 69313 5.9 35;29+ 58 657 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 396 3 gi 46249758 P15311 69313 5.9 21;35+ 37 366 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 397 2 gi 46249758 P15311 69313 5.9 21;35+ 37 366 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 398 1 gi 46249758 P15311 69313 5.9 21;35+ 37 366 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 398 1 gi 46249758 P15311 69313 5.9 14;20 21 97 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 398 1 gi 46249758 P15311 69313 5.9 14;20 21 97 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 399 1 gi 146249758 P15311 6632 7.0 9;40+ 24	394	1	gi 18105063	Q9NRW7	65435	8.4	6;13+	11	233	VPS45A	Vacuolar protein sorting 45A	trafficking	LY,EN
396 3 gi 46249758 P15311 69313 5.9 21;35+ 37 366 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 397 2 gi 46249758 P15311 69313 5.9 21;35+ 37 366 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 398 1 gi 46249758 P15311 60313 5.9 20;18+ 35 329 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 398 1 gi 46249758 P15311 60313 5.9 14;20 21 97 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 399 1 gi 10435345 42158 6.6 9;40+ 27 154 unnamed protein product unclassified EN,ME 400 2 gi 12652891 O75083 66822 6.2 25;21+ 62 676 WDR WD repeat domain 1 cytoskeleton EN,ME,EX 401 1 gil24652891 O75083 66822 6.2 21 77 WDR1 WD repeat domain 1 </td <td>395</td> <td>2</td> <td>gi 46249758</td> <td>P15311</td> <td>69313</td> <td>5.9</td> <td>35;29+</td> <td>58</td> <td>657</td> <td>VIL2</td> <td>Villin 2 (ezrin)</td> <td>cytoskeleton</td> <td>ME,EX,MT,CY</td>	395	2	gi 46249758	P15311	69313	5.9	35;29+	58	657	VIL2	Villin 2 (ezrin)	cytoskeleton	ME,EX,MT,CY
397 2 gi 46249758 P15311 69313 5.9 20;18+ 35 329 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 398 1 gi 46249758 P15311 69313 5.9 14;20 21 97 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 399 1 gi 10435345 42158 6.6 9;40+ 27 154 unnamed protein product unclassified EN,ME 400 2 gi 12652891 O75083 6822 6.2 25;21+ 62 676 WDR1 WD repeat domain 1 cytoskeleton EN,ME,EX 401 1 gil/2652891 O75083 68593 6.4 6:22+ 12 77 WDR1 WD repeat domain 1 cytoskeleton EN,ME,EX	396	3	gi 46249758	P15311	69313	5.9	21;35+	37	366	VIL2	Villin 2 (ezrin)	cytoskeleton	ME,EX,MT,CY
398 1 gi 46249758 P15311 69313 5.9 14;20 21 97 VIL2 Villin 2 (ezrin) cytoskeleton ME,EX,MT,CY 399 1 gi 10435345 42158 6.6 9;40+ 27 154 unnamed protein product unclassified EN,ME 400 2 gi 12652891 075083 66822 6.2 25;21+ 62 676 WDR1 WD repeat domain 1 cytoskeleton EN,ME,EX 401 1 gi 24652891 075083 65893 6.4 6:22+ 12 77 WD R1 WD repeat domain 1 cytoskeleton EN,ME,EX	397	2	gi 46249758	P15311	69313	5.9	20;18+	35	329	VIL2	Villin 2 (ezrin)	cytoskeleton	ME,EX,MT,CY
399 1 gi[10435345 42158 6.6 9;40+ 27 154 unnamed protein product unclassified EN,ME 400 2 gi[12652891 075083 66822 6.2 25;21+ 62 676 WDR1 WD repeat domain 1 cytoskeleton EN,ME,EX 401 1 gi[12652891 075083 65893 6.6 6:22+ 21 77 WDR1 WD repeat domain 1 cytoskeleton EN,ME,EX	398	1	gi 46249758	P15311	69313	5.9	14;20	21	97	VIL2	Villin 2 (ezrin)	cytoskeleton	ME,EX,MT,CY
gilloHo2575 Q8IVVEr 47320 7.0 93404 24 100 WDF11 WD repeat and FVE domain Containing 1 400 2 gill2652891 O75083 66822 6.2 25;21+ 62 676 WDR1 WD repeat domain 1 cytoskeleton EN,ME,EX 401 1 gill240181 O75083 5893 6.4 6.22 21 77 WDR1 WD repeat domain 1 cytoskeleton EN,ME,EX	399	1	gi 10435345		42158	6.6	9;40+	27	154		unnamed protein product	unclassified	EN,ME
+νυ 2 yij 2002001 070000 00022 0.2 20,21+ 02 070 WDR1 WD repeat domain 1 Cytoskeleton EN,ME,EX 401 1 gil3420181 075083 58593 6.4 6:22+ 21 77 WDR1 WD repeat domain 1 cytoskeleton EN.ME.EV	400	2	yi 10482373	QOIVUB/	41320	1.0	9,40+ 25:24 ·	24 60	100		WD repeat and rive domain containing 1	outoekolotoo	
	400	∠ 1	ai 3420181	075083	58593	6.Z	20,21+ 6·22±	21	77	WDR1	WD repeat domain 1	cytoskeleton	EN ME EX

*diese Proteine wurden nur in einem von vier Gelen detektiert

^a Anzahl der unabhängigen Identifiaktionen aus verschiedenen 2D Gelen

^b Anzahl der Peptide die mit der Proteinsequenz übereinstimmten bzw. nicht übereinstimmten

^k Ausnahme bei den Identifikationsregeln, da ein identisches Ergebnis auf den ersten 7 Rängen der Datenbanksuche zu verzeichnen war, siehe auch Mascot Data zu (#293)

m =Proteingemisch im Spot, infolge einer Spotakkumulation, nur das höchst gewertete Protein wurde für die Identifikation akzeptiert




Abb. A1



Abb. A1: Proteinkarte sekretorischer Granula aus NKL (A,C,E) und YTS (B,D,F) Zellen. Identifizierte Proteine aus 8 Experimenten wurden in diese Karte implementiert. Die Abbildungen der oben linken (A, B) und unten rechten (C, D) Quadranten stammen aus Experiment 1 (Tab. 5.3.1), die unteren Abschnitte dagegen aus Experiment 3. Identifizierte, differentielle Proteine wurden mit rot für eine verminderte und mit blau für eine verstärkte Expression in YTS im Vergleich zu NKL markiert. Der Grenzwert der Volumenverhältnisse wurde auf eine 3-fache Änderung gesetzt. Die Einteilung des pl basiert auf der durch den Hersteller angegebenen pH-Verteilung in nicht-linearen IPG Streifen, pH 3-11.

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen- bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
8	2	coronin, actin binding protein, 1A	CORO1A	gi 1002923	P31146	51722	6.1	12	208	cytoskeleton	LY,PL
9	1	moesin, isoform CRA_b	MSN	gi 119625804	P26038	66678	5.9	15	203	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
15	3	coronin, actin binding protein, 1A	CORO1A	gi 5902134	P31146	51678	6.3	25	412	cytoskeleton	LY,PL
18	1	ACTB protein	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	8	265	cytoskeleton	ER,ME,EX,PL,SY
27	3	ACTB protein	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	11	351	cytoskeleton	ER,ME,EX,PL,SY
32	2	giucosidase II subunit alpha	GANAB	gi 577295	Q14697	107158	5.7	8	116	nydrolases	ER,ME,PL
34	2	glucosidase, alpha; neutral AB, isoform CRA_a	GANAB	gi 119594451	Q14697	104930	5.9	9	95	hydrolases	ER,ME,PL
35	1	neutrophil adherence receptor alpha-M subunit	ITGAM	gi 386975	P11215	127628	6.7	7	88	adhesion	membrane
36	1	neutrophil adherence receptor alpha-M subunit	ITGAM	gi 386975	P11215	127628	6.7	7	89	adhesion	membrane
38	2	niban protein isoform 2	FAM129A	gi 16757970	Q9BZQ8	104039	4.7	10	265	signal trans.	CY
39	2	1 isoform 1	UGCGL1	gi 9910280	Q9NYU2	177819	5.4	10	124	chaperone	ER,ME
41	1	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1 isoform 1	UGCGL1	gi 9910280	Q9NYU2	177819	5.4	8	113	chaperone	ER,ME
43	1	hypoxia up-regulated protein 1	HYOU1	gi 5453832	Q9Y4L1	111494	5.2	17	488	chaperone	ER,PL,ME
44	1	hypoxia up-regulated protein 1	HYOU1	gi 5453832	Q9Y4L1	111494	5.2	13	257	chaperone	ER,PL,ME
45	1	protein diaphanous homolog 1	DIAPH1	gi 119582323	O60610	139473	5.3	6	85	cytoskeleton	ME
47	2	hypoxia up-regulated protein 1	HYOU1	gi 5453832	Q9Y4L1	111494	5.2	34	537	chaperone	ER,PL,ME
48	1	nistocompatibility (minor) HA-1		gi 47834348	Q92619	125848	5.8 6.1	3	105	Immunity	
49 52	2	moesin isoform CRA b	MSN	ail119625804	P26038	66678	5.9	32	642	cytoskeleton	
58	2	moesin, isoform CRA_b	MSN	gi 119625804 gi 119625804	P26038	66678	5.9	17	211	cytoskeleton	EN,ME,EX,FL,MT
64	1	phosphoribosylformylalycinamidine synthase	PFAS	gi 119620004	015067	103226	5.6	6	79	hiosynthesis	CY
67	1	dipeptidyl peptidase 4	DPP4	gi 110010470	P27487	88947	5.7	7	90	hydrolase	ER.LY.EN.ME.EX
69	1	mvosin IG	MYO1G	ail54873627	B0I1T2	117393	9.0	7	124	trafficking	unknown
70	3	myosin IG	MYO1G	gi 54873627	B0I1T2	117393	9.0	11	220	trafficking	unknown
71	1	FYN-binding protein	FYB	gi 2078273	O15117	85627	6.1	6	128	adapter	CY,NU
75	1	myosin IG	MYO1G	gi 54873627	B0I1T2	117393	9.0	37	617	trafficking	unknown
77	2	dipeptidyl peptidase 4	DPP4	gi 27574040	P27487	85008	5.7	7	107	hydrolase	ER,LY,EN,ME,EX
79	1	myosin IG	MYO1G	gi 54873627	B0I1T2	117393	9.0	15	304	trafficking	unknown
80	2	integrin beta-2	ITGB2	gi 119629788	P05107	81553	6.5	11	215	membrane	PL
81	3	dipeptidyl peptidase 4	DPP4	gi 27574040	P27487	85008	5.7	25	449	hydrolase	ER,LY,EN,ME,EX
83	3	dipeptidyl peptidase 4	DPP4	gi 50513374	P2/48/	85693	5.9	16	296	hydrolase	ER,LY,EN,ME,EX
84 95	3	dipeptidyl peptidase 4		gi 27574040	P2/48/	85008	5.7 5.7	19	431	hydrolase	
86	2	dipentidul pentidase 4		gij27574040 gij110590190	P27407	84707	5.7	11	244 185	hydrolase	
87	1	dipentidyl peptidase 4	DPP4	gi[110390190 gi[27574040	P27487	85008	57	2	70	hydrolase	ER LY EN ME EX
88	1	dipeptidyl peptidase 4	DPP4	gi 27574040	P27487	85008	5.7	3	144	hydrolase	ER.LY.EN.ME.EX
89	1	phostensin	KIAA1949	ail51555766	Q6NYC8	68157	5.4	6	146	unclassified	CY
90	2	phostensin	KIAA1949	gi 51555766	Q6NYC8	68157	5.4	9	185	unclassified	CY
91	3	phostensin	KIAA1949	gi 123209015	Q6NYC8	68286	5.4	13	318	unclassified	CY
92	1	phostensin	KIAA1949	gi 123209015	Q6NYC8	68286	5.4	9	264	unclassified	CY
93	2	coronin, actin binding protein, 1A	CORO1A	gi 1002923	P31146	51722	6.1	12	183	cytoskeleton	LY,PL
94	1	ATP citrate lyase isoform 1	ACLY	gi 38569421	P53396	121674	7.0	7	99	biosynthesis	ME,EX,PL
95	1	phostensin	KIAA1949	gi 123209015	Q6NYC8	68286	5.4	7	115	unclassified	CY
96	1	A I P citrate lyase	ACLY	gi 603074	P53396	121660	7.0	11	144	biosynthesis	ME,EX,PL
99 102	2	leukocyte-derived arginine aminopeptidase long	LRAP2	gi 40807029 gi 32400649	Q6P179 Q6P179	11106086	6.4 6.2	5 9	87 151	hydrolases	unknown
104	1	form variant leukocyte-derived arginine aminopeptidase	LRAP	gi 40807029	Q6P179	106086	6.4	7	67	hydrolases	unknown
106	1	ERAP2 protein	ERAP2	gi 40807029	Q6P179	106086	6.4	6	79	immunity	ER
108	1	vinculin	VCL	gi 24657579	P18206	117234	5.8	4	188	cytoskeleton	ME
109	1	alanyl-tRNA synthetase	AARS	gi 109148542	P49588	107485	5.3	3	93	biosynthesis	ME,PL
111	4	alanyl-tRNA synthetase	AARS	gi 109148542	P49588	107485	5.3	4	160	biosynthesis	ME,PL
112	2	heat shock protein 70	HSP74	gi 292160	P34932	79858	5.1	5	119	chaperone	EX
113	3	coronin 7	CORO7	gi 109658548	Q1/RK4	101626	5.5	24	447	trafficking	CY,GO
114	1	coronin /		gi 119605714	B3KSY4	02606	5.0	1	145	trafficking	
110	ა ი	unior rejection antigen (gp96) 1		gi 4507677	P 14020	92090	4.0 5 0	41	220	dogradation	
120	2	ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	gij24465 gij24485	P22314	91102	5.8	7	344	degradation	
120	3	100 kDa coactivator	SND1	ail799177	07K7F4	100313	6.6	24	277	hiosynthesis	
124	1	tumor rejection antigen (gp96) 1	ENPI	ail15010550	P14625	90309	47	10	282	chaperone	FR ME PL GO
126	2	glucosidase II subunit beta	PRKCSH	ail48255891	P14314	60110	4.3	10	168	hydrolases	ER.ME.PL
127	1	ARTS-1	ERAP1	gi 20521069	Q9NZ08	108595	5.9	4	108	immunity	ER,ME
129	1	glucosidase II subunit alpha	GANAB	gi 2274968	Q14697	107289	5.7	14	111	hydrolases	ER,ME,PL
130	2	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1	MTHFD1	gi 13699868	P11586	102152	6.8	5	100	multifunctional	EN,ME,PL,MT
131	1	glucosidase II subunit alpha	GANAB	gi 577295	Q14697	107158	5.7	6	78	hydrolases	ER,ME,PL
132	3	glucosidase II subunit alpha	GANAB	gi 2274968	Q14697	107289	5.7	32	473	hydrolases	ER,ME,PL
133	1	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 adipocyte-derived leucine aminopeptidase	ERAP1	gi 119616483	Q9NZ08	107706	5.9	9	181	immunity	ER,ME
134	∠ 1	isoform 2 moesin, isoform CRA b	MSN	gij 19079274 aj 119625804	P26038	66678	5.9	4 17	93 166	cvtoskeleton	
136	2	ARTS-1	ERAP1	gi 37182302	Q9NZ08	107645	5.9	8	222	immunity	ER,ME
137	3	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1	MTHFD1	gi 13699868	P11586	102152	6.8	25	288	multifunctional	EN,ME,PL,MT
138	3	glucosidase, alpha; neutral AB, isoform CRA_a	GANAB	gi 119594451	Q14697	104930	5.9	31	459	hydrolases	ER,ME,PL
139	3	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1	MTHFD1	gi 13699868	P11586	102152	6.8	22	297	multifunctional	EN,ME,PL,MT
140	1	actinin, alpha 4	ACTN4	gi 12025678	O43707	105245	5.3	25	432	cytoskeleton	ME,NU,CY
141	2	Rap1-GTP-interacting adapter molecule	APBB1IP	gi 26000235	Q7Z5R6	73496	5.4	8	165	signal trans.	CY

Table A2. Identifizierte Proteine lysosomaler Vesikel (Fraktion 2) aus CD4⁺ und CD8⁺ T Lymphozyten.

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen- bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
143	2	actinin, alpha 4	ACTN4	gi 12025678	O43707	105245	5.3	36	585	cytoskeleton	ME,NU,CY
144	1	actinin, alpha 4	ACTN4	gi 119577215	O43707	104555	5.2	42	705	cytoskeleton	ME,NU,CY
146	1	moesin	MSN	gi 50513540	P26038	35010	9.0	6	251	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
147	5	eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	gi 4503483	P13639	96246	6.4	13	267	biosynthesis	ER,EN,ME,EX
148	3	dynamin 2 isoform 1	DYN2	gi 56549121	P50570	98345	7.0	14	157	trafficking	
149	1	moesin, isoform CRA_b		gi 119625804	P26038	06246	5.9 6.4	7	198	cytoskeleton	
151	2	eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	gil4503483 gil4503483	P13630	90240	0.4 6.4	13	90 175	biosynthesis	ER,EN,ME,EX
152	1	tumor rejection antigen (gp96) 1	ELI 2 ENPI	gil4507677	P14625	92696	4.8	22	480	chaperone	FR ME PL GO
154	2	ubiquitin specific peptidase 5 isoform 2	UBP5	gi 148727247	P45974	94104	5.0	6	114	degradation	LY.ME.NG
155	1	extended-synaptotagmin-1 KIAA0747 protein	ESYT1	gi 3882215	Q9BSJ8	120296	5.7	5	84	unknown	ME
156	1	extended-synaptotagmin-1 KIAA0747 protein	ESYT1	gi 3882215	Q9BSJ8	120296	5.7	3	66	unknown	ME
157	1	moesin, isoform CRA_b	MSN	gi 119625804	P26038	66678	5.9	29	315	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
158	3	eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	gi 4503483	P13639	96246	6.4	22	349	biosynthesis	ER,EN,ME,EX
159	1	valosin-containing protein	VCP	gi 48257098	Q96IF9	71534	4.9	7	207	unknown	
162	1	moesin, isoform CRA_b	IVISIN	gi 119625804	P26038	66679	5.9	30	646 546	cytoskeleton	
163	1	importin subunit beta-1	KPNB1	gi 119625804 gi 119615215	P20036 014974	95094	5.9 4.7	25	148	transport	
104		26S proteasome non-ATPase regulatory subunit	N ND1	91110010210	Q1+07+	55054	4.7		140	transport	
165	1	2	PSMD2	gi 2134674	Q13200	99994	5.1	4	121	proteasome	ME
167	2	MHC class I antigen	HLA-A	gi 51100948	Q6AW25	31659	5.7	13	282	Immunity	ME
171	1	PDCD6IP protein	PDCD6IP	gi 46249756	Q6NUS1	97385	6.1	21	290	unclassified	unknown
174	1	moesin, isoform CRA_b	MSN	gi 119625804	P26038	66678	5.9	10	92	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
177	1	heat shock protein HSP 90-beta	HS90B	gi 20149594	P08238	83554	5.0	20	299	chaperone	ME,EX,MT
178	1	phospholipase C, delta 1 variant	nd	gi 62089310	Q59EE9	88289	6.4	7	118	signal trans.	unknown
179	1	ezrin	EZR	gi 31283	P15311	69470	5.9	12	148	cytoskeleton	ME,EX,MT
180	1	1 91kDa isoform CRA c	STAT1	gi 119631258	P42224	82379	6.1	5	181	signal trans.	CY,NU
181	3	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1	HCLS1	gi 48145705	P14317	54065	4.7	19	397	signal trans.	CY,MT
182	1	signal transducer and activator of transcription	STAT1	gi 62738788	P42224	80465	6.3	9	114	signal trans.	CY,NU
184	1	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1	HCLS1	gi 119599912	P14317	57793	4.8	8	163	signal trans.	CY,MT
185	2	ACTB protein	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	5	228	cytoskeleton	ER,ME,EX,PL,SY
187	1	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1	HCLS1	gi 48145705	P14317	54065	4.7	4	91	signal trans.	CY,MT
188	4	signal transducer and activator of transcription	STAT1	gi 119631259	P42224	87076	5.8	10	191	signal trans.	CY,NU
189	1	signal transducer and activator of transcription	STAT1	gi 62738788	P42224	80465	6.3	8	78	signal trans.	CY,NU
191	1	beta adrenergic receptor kinase 1	ADRBK1	gi 148539876	P25098	80321	6.9	9	70	GTPases	CY
193	1	raftlin cell migration-inducing gene 2	RFTN1	gi 37930520	Q14699	63691	5.5	9	120	unclassified	PL
194	1	hexose-6-phosphate dehydrogenase	H6PD	gi 52145310	O95479	89407	6.8	13	106	metabolism	ER
196 197	3	ERBB2IP protein	LAP2	gi 119606901 gi 29791785	Q01813 Q96RT1	93725 72831	8.6 4.8	20 5	262 149	giycolysis multifunctional	ME,PL NU,CY
199	3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 isoform 2	ACSL4	gi 12669909	O60488	80220	8.7	18	232	metabolism	MT,PE,ME
202	1	Sec23 homolog A	SC23A	gi 22477159	Q15436	87022	6.6	8	91	trafficking	ER,ME,PL
203	5	acylamino acid-releasing enzyme	ACPH	gi 556514	P13798	82210	5.3	10	178	nydrolase	PL, CY
206	4	ezin	EZR EZR	gi 46249758 gi 46249758	Q6NUR7	69313	5.9 5.9	∠o 28	307 430	cytoskeleton	CY
208	3	ezrin	EZR EZR	gil46249758	Q6NUR7	69313	5.9	29	569	cytoskeleton	CY
209	1	interleukin-16	IL16	gi 27262655	Q14005	66948	5.7	7	299	Immunity	secreted
210	5	interleukin-16	IL16	gi 27262655	Q14005	66948	5.7	18	406	Immunity	secreted
211	3	leucine-rich repeat and calponin homology	LRCH4	gi 119596926	075427	70861	6.9	14	259	protein binding	MT
212	1	heat shock 70kDa protein 5	GRP78	gi 16507237	P11021	72402	5.1	11	157	chaperone	ER,ME,EX,PL,MT
213	2	leucine-rich repeat and calponin homology	LRCH4	gi 119596926	075427	70861	6.9	6	152	protein binding	MT
214	1	centaurin beta1	ACAP1	gi 7661880	Q15027	82397	7.6	10	142	GTPase	unknown
215	1	Sec23B protein	SC23B	gi 13529299	Q15437	87377	6.4	9	65	trafficking	EN
216	1	hypothetical protein	nd	gi 62896583	Q53HR8	71794	6.1	16	330	unclassified	unknown
217	2	interleukin-16	IL16	gi 2114410	Q9UME6	67047	5.7	5	285	Immunity	secreted
218	2	interleukin-16	IL16	gi 2114410	Q9UME7	67047	5.7	5	283	Immunity	secreted
220	2	beta adrenergic receptor kinase 1	ADRBK1	gi 148539876	P25098	80321	6.9	18	247	GIPases	
221	2	Sec23 nomolog A	GPD78	gi 22477159 gi 386758	Q15430 D11021	87022 72185	0.0 5.0	8 25	228	chaperope	
225	1	heat shock 70kDa protein 5	GRP78	gij386758	P11021	72185	5.0	27	551	chaperone	
226	1	heat shock 70kDa protein 5	GRP78	gi 16507237	P11021	72402	5.1	32	720	chaperone	ER,ME,EX,PL,MT
228	1	differentially expressed in FDCP 6 homolog (mouse), isoform CRA b	DEF6	gi 119624227	B3KSI1	44508	6.6	5	103	unknown	unknown
229	2	lymphocyte cytosolic protein 2	LCP2	gi 119581882	Q13094	59922	6.3	7	142	immunity	CY
234	2	prolyl endopeptidase	PPCE	gi 41349456	P48147	81560	5.5	6	125	proteolysis	CY
237	2	moesin, isoform CRA_b	MSN	gi 119625804	P26038	66678	5.9	30	650	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
238	1	L-plastin variant	nd	gi 62898171	Q53FI1	70785	5.2	20	348	cytoskeleton	unknown
239	2	septin-9 gamma	SEPT9	gi 14530105	Q9UHD8	64894	7.2	11	201	unclassified	
240	1	moesin	MSN	gi 4505257	P26038	67892	6.1	23	354	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
∠41 242	2		IVIDIN	gil119625804	F20038	000/8	5.9 5.0	<u>ა</u> კ ეი	0/3 150	cyloskeleton	
242 244	∠ 1	alvovi-tRNA synthetase	SYG	gij 1 9020004	F20030 P41250	83854	0.9 6.6	29 15	409 246	biosynthesis	
246	2	moesin, isoform CRA b	MSN	gi 119625804	P26038	66678	5.9	35	718	cytoskeleton	EN.ME.EX.PI MT
247	4	moesin	MSN	gi 4505257	P26038	67892	6.1	35	566	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
248	3	moesin	MSN	gi 14625824	P26038	62004	7.6	8	329	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
249	1	moesin	MSN	gi 14625824	P26038	62004	7.6	7	268	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
250	1	moesin	MSN	gi 14625824	P26038	62004	7.6	15	361	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
251	1	moesin	MSN	gi 8569616	P26038	34554	8.9	11	130	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT

20. Improcessor PLIM ECHA gld2012/80.8 FAX8 B ADM B ADMM B ADMM B ADMM	Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen- bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
28 PLAYL bridle protein 8 statem 1 rd gif/2/897 C/132 7/12 5 7/20 restabilism L/M.P. NGEXL 20 1 brast sheck 70LB protein 8 statem 1 rd gif/2/897 CG328 7/082 64 20 S1 chapterse L/M.P. NGEXL 20 1 brast sheck 70LB protein 8 statem 1 rd gif/2/897 CG328 7/082 64 20 S1 chapterse L/M.P. NGEXL 21 armein Ad A A/M.Ad gif/2/897 CG328 PG33 7/184 64 20 chapterse L/M.P. NGEXL 21 brane Ad A A/M.Ad gif/2/897 CG338 CG38 20 chapterse L/M.P. NGEXL 21 brane Ad A/M.Ad gif/2/897 CG318 CG38 20 20 conserval L/M.P. NGEXL 21 brane Ad A/M.Ad gif/2/897 CG317 CG317 CG317 CG318 20 10 CG318 20 10	253	1	mitochondrial trifunctional protein, alpha subunit precursor	ECHA	gi 20127408	P40939	83688	9.2	5	126	metabolism	PL, MT
20 2 bat shock 7MDa parten 8 isofare 1 rd g8728077 C35327 7102 5.4 20 5.7 obspace L/ME.N.G.EX. 201 1 arresn AB ANXAB g8728077 C35327 7102 5.4 20 35 catalox 7000 g152187 F0133 7114 5.4 20 5.4 catalox 7000 g152187 F0133 7114 5.4 20 5.4 catalox 7000 F11786 7102 5.4 20 5.4 catalox 7000 F11786 7102 5.2 20 5.5 catalox 7000 F11786 7102 5.2 2.4 6.4 catalox 7000 F11786 7102 7102 5.2 2.4 6.4 catalox 7000 F11786 7102 710 5.2 2.4 6.4 catalox 7000 F11786 7102 7102 5.2 5.4 6.4 6.4 6.1 7102 7102 7102 7102 7102 7102 7102 7102 7102 7102 <td< td=""><td>256</td><td>1</td><td>poly(A) binding protein, cytoplasmic 1, isoform CRA_c</td><td>PABPC1</td><td>gi 119612222</td><td>P11940</td><td>47647</td><td>9.0</td><td>5</td><td>270</td><td>metabolism</td><td>ER,EN,ME,PL</td></td<>	256	1	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1, isoform CRA_c	PABPC1	gi 119612222	P11940	47647	9.0	5	270	metabolism	ER,EN,ME,PL
200 1 brant shock TXKD grotten B isoform 1 rd glis72877 GSS287 CVIIIS 5.4 19 382 depression 21 gamesin Ad ANXAG gliS2187 POISS File 5.4 39 S34 sartfacking 22 gamesin Ad ANXAG gliS2187 POISS 5.4 7.5 S4 saftacking MTEXM 24 anten in Ad ANXAG gliS2187 POISS 5.2 S4 S4 contacking MTEXM 24 L-plestin maneration LCP1 gli420488 PIST86 708 S<1	259	2	heat shock 70kDa protein 8 isoform 1	nd	gi 5729877	Q53GZ6	71082	5.4	23	517	chaperone	LY,ME,NG,EX,PL,SY,M
21 1 armeen A ANAAE gibts? PHES 7515 5.4 28 353 tarticlymap MTEX.ME 20 armeen A ANAAE gibts? PHESTA 5.1 1.5 5.3 1.5 2.5 2.4 1.5 1.5 2.5 2.4 2.6 <t< td=""><td>260</td><td>1</td><td>heat shock 70kDa protein 8 isoform 1</td><td>nd</td><td>gi 5729877</td><td>Q53GZ6</td><td>71082</td><td>5.4</td><td>19</td><td>382</td><td>chaperone</td><td>LY,ME,NG,EX,PL,SY,M</td></t<>	260	1	heat shock 70kDa protein 8 isoform 1	nd	gi 5729877	Q53GZ6	71082	5.4	19	382	chaperone	LY,ME,NG,EX,PL,SY,M
22 2 armson A6 ANXA6 00133 76164 6.4 39 524 trafficing trafficing MTEX.M 2 armson A6 genomia Genomia <t< td=""><td>261</td><td>1</td><td>annexin A6</td><td>ANXA6</td><td>gi 35218</td><td>P08133</td><td>76154</td><td>5.4</td><td>28</td><td>353</td><td>trafficking</td><td>MT,EX,ME,ER</td></t<>	261	1	annexin A6	ANXA6	gi 35218	P08133	76154	5.4	28	353	trafficking	MT,EX,ME,ER
23 2 anvenin A6 ANXAG gittability PATEX.M PATE	262	2	annexin A6	ANXA6	gi 35218	P08133	76154	5.4	39	524	trafficking	MT,EX,ME,ER
264 4 opstack in hinding protein 3 STXEPS giptace matrix CM Mode Mod Mod Mod	263	2	annexin A6	ANXA6	gi 35218	P08133	76154	5.4	37	552	trafficking	MT,EX,ME,ER
255 1 yessonal acid alpha-mamosidae MAN281 optical 111986 C 3 77 Tyronizations L'yMA 267 1 L-plants Internation Internation </td <td>264</td> <td>1</td> <td>syntaxin binding protein 3</td> <td>STXBP3</td> <td>gi 2810993</td> <td>O00186</td> <td>68386</td> <td>8.3</td> <td>6</td> <td>170</td> <td>trafficking</td> <td>ME,PL</td>	264	1	syntaxin binding protein 3	STXBP3	gi 2810993	O00186	68386	8.3	6	170	trafficking	ME,PL
266 I. Leplantin L	265	1	lysosomal acid alpha-mannosidase	MAN2B1	gi 1658374	O00754	111986	6.7	3	77	hydrolases	LY,ME
def i classifi (i) iii) classifi (iii) iiii) classifi (iiii) iiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiii	266	1	L-plastin	LCP1	gi 4504965	P13796	70815	5.2	33	838	actin binding	CY
288 2 Leplaterin LCP1 gild60468 P1378 7081 5.2 27 68.4 acin binding CY 721 1 Leplaterin nd gild2026758 60804 6.0 7015 5.2 7 1050 6020 6010 6.0 72 biogdinydrogycolawlets synthaso, nd RAPS gill1083142 60404 6.0 72 biogdinydrogycolawlets synthaso, nd RAPS gill1083142 7015 5.2 7 55 54 acin binding CY 72 Leplaterin LCP1 gill10814727 P4401 70127 7.0 5 54 7.0 signif trans, CY 72 2 beat shock 70Lbg protein 1 P47477 P4401 70127 7.0 5.2 2.4 4.0 copase/date CY 72 2 beat shock 70Lbg protein 1 P4747 P4401 9111810737 70016 5.2 2.4 4.0 1.0 acin binding CY 7001 6.0 4.0	267	1	L-plastin variant	nd	gi 62898171	Q53FI1	70785	5.2	24	427	cytoskeleton	unknown
289 1 Leptestim Leptestim Leptestim CPT git4604805 F13780 7081 5.2 28 440 optostability 273 1 Leptestim advisithly drow control marking CPT 2 bisplant CPT bisplant bisplant<	268	2	L-plastin	LCP1	gi 4504965	P13796	70815	5.2	27	585	actin binding	CY
272 1 Lobastin variant nd gill 20207740 200016 6.2 1 105 0700500100 2 abk/db/m/covpcoton/ph/mic synthuso, percelational AGPS gill 46841462 CO00116 6.06 6.0 7 20 boosynthusia PE 2 abk/db/m/covpcoton/ph/mic synthuso, percelational AGPS gill 468405 P13768 7.05 5 5 associational CY 2 bits Charter gill 45841722 P248107 7022 5.2 27 4 22 20 charter ER.MAL 2 bits Charter Charter P1470 P14842278 P14800 7022 5.3 6.0 0 0 108 P14800 P148000 P148000 P148000 P148000 P148000 P148000 P148000 P148000 P148000 <th< td=""><td>269</td><td>1</td><td>L-plastin</td><td>LCP1</td><td>gi 4504965</td><td>P13796</td><td>70815</td><td>5.2</td><td>28</td><td>440</td><td>actin binding</td><td>CY</td></th<>	269	1	L-plastin	LCP1	gi 4504965	P13796	70815	5.2	28	440	actin binding	CY
273 2 allofaltydroxycetomelane/horbphate synthese, 28ter-christ associated protein kinase 70kDa AGPG 9[119831462 000116 60804 6.0 6 172 biosynthusis PE 212 22ter-christ associated protein kinase 70kDa ZAP70 [j]31455611 P43403 7708 5 5 161 actional associated protein kinase 70kDa CY 276 5 tarankerolase TKT g]13147521 P2401 57335 8.0 12 375 signal trans. CY 2 tarankerolase TKT g]13147521 P2401 57335 8.0 8 18 eignaturina. CY 21 pertoinal biolog protein associated	272	1	L-plastin variant	nd	gi 62087548	Q59GX5	56196	5.2	1	105	cytoskeleton	unknown
274 2 2 etter - chin associate protein kinase 70kDa ZAP70 9 [31455611 P43403 7078 7.8 5 161 algest trans. CY 71 1 Laplantin LDP1 gil4040865 P1376 708 5.2 27 5.4 all chinholing CY 71 1 TAT gil11455117421 P2410 75.3 5.4 2.75 all chinholing CY 710 1 performi TAT gil11513244 Pattor 5.5 2.4 2.75 All chinholing PERF gil11513244 Pattor 7.85 5 1.8 Chinholing PAttor PA	273	2	alkyldihydroxyacetonephosphate synthase, peroxisomal	AGPS	gi 119631462	O00116	60804	6.0	6	172	biosynthesis	PE
275 I. plastim L.P.P1 glid50468 P13766 70815 5.2 27 5 27 2 28 27 27 27 21 38 21 31 <	274	2	zeta-chain associated protein kinase 70kDa isoform 1	ZAP70	gi 31455611	P43403	70796	7.8	5	161	signal trans.	CY
276 5 rameketolase Trict opi14/172/2 P2/8017 Sca35 8.0 To Zazz result Mater 2 text-onic insascolated protein 1A LAPY0 pi14/42/279 P1/84/2707 P2/80107 7/288 5.5 24 22 chast block 70kB protein 3 TXFRP3 pi11/84/27079 P1/288 5.1 6 1 ast anticication protein 3 TXFRP3 pi11/84/27079 P1/278 5.10 6 31 ast anticication protein 3 TXFRP3 pi11/86/0709 P2/878 5.10 6 1 ast anticication protein 3 TXFRP3 pi11/86/0709 P1/878 5.10 1 ast anticication protein 3 CP1 31 ast anticication protein 3 CP1 31 chast anticication protein 3 CP1 31 chast anticication P1 WEP, P1 9iji5889700 GS1711 6870 6.2 18 257 cytoskelton ENMELS 2 V/D repet-contining protein 1 isoform 1 WDR 1 giji28297087 GS117 68870 6.2 18 250 <td>275</td> <td>1</td> <td>L-plastin</td> <td>LCP1</td> <td>qi 4504965</td> <td>P13796</td> <td>70815</td> <td>5.2</td> <td>27</td> <td>544</td> <td>actin binding</td> <td>CY</td>	275	1	L-plastin	LCP1	qi 4504965	P13796	70815	5.2	27	544	actin binding	CY
277 2 sets-chain associated protein kinase 700-Da ZAP70 pii1492/278 Pio107 7/22 7/8 22 signal fram. CV 28 prestorin-1 PFRF gil13346 Pointo 22 signal fram. CV 29 systaxis binding protein 3 STAPF3 gil1380047 Distaves 8 188 trafficking ME.P.I. 20 1 Wiskot-Aldrich syndrome protein WAS gil450700 PC278 5108 6.2 3 431 4351 chaptorne EF.N.E.R.G.P.I. 21 syndrakin binding protein 3 isoform CRA_b STAPF3 gil62897067 CO3147 6897 6.2 18 257 cytoskeleton EF.N.E.R.G.P.I. 21 yndrakin binding protein 1 isoform 1 WD repeat-containing protein 1 isoform 1 WDR1 gil62897067 CS3417 6897 6.2 18 266 cytoskeleton EF.N.E.R.E.R.E.R.E.R.E.R.E.R.E.R.E.R.E.R.E	276	5	transketolase	TKT	gi 31417921	P29401	50335	8.0	12	376	unclassified	ME.EN
278 2 Peter for the formation of t	277	2	zeta-chain associated protein kinase 70kDa	ZAP70	gil149242795	P43403	70122	7.8	22	363	signal trans.	ĊY
280 1 parton-1 PERF gli32836 P1422 22 events 6.1 6.1 1.63 Immunity SSL 2 ystructure STABP3 gli418000370 P42768 S.0.8 8.1 163 Immunity SSL 24 Wiskott-Midrich syndrome protein WAS gli4289781 P2779 47061 4.3 1.4 361 chaperone ER.ME.NG.D 267 Caleticulin precursor variant CALR gli62897801 C3711 Sittas 0.0 1.5 345 Debetoning PER.ME.NG.D 211 syntasch binding protein solorm 1 WDR1 gli62897807 C37117 66870 6.2 1.9 257 cytoskeleton EN.ME.F. 29 WDrepeat-containing protein 1 isolorm 1 WDR1 gli6289707 C33117 66870 6.2 1.9 6705 cytoskeleton EN.ME.F. 29 WDrepeat-containing protein 1 isolorm 1 WDR1 gli6289707 C33117 66870 6.2 1.9 6705 cytoskeleton	278	2	heat shock 70kDa protein 1A	HSPA1A	ail5123454	P08107	70280	5.5	24	422	chaperone	ER.EN.ME.EX.MT
221 2 syntamin binding protein 3 STXBP3 pli/15800075 O00186 B6833 B0.6 B 140 Michael Market Mark	280	1	perforin-1	PERF	gil35386	P14222	62495	8.1	6	163	Immunity	SL
284 1 Wake glidsofroop P42788 63108 CL 8 148 Cytoskeleton CV 287 5 caleticulin precursor variant CALR glic2887681 P2779 74761 4.3 1.4 351 chaperone ER.MEN.G.E 287 5 caleticulin precursor variant CALR glic288701 CS171 36102 9.1 2.121 triffiching P.P. 287 1 syntach inding protein 1 solorm 1 WDR1 glic2897007 CS3117 66870 6.2 1.8 2.8 cytoskeleton EN.ME.I 289 2 WD repeat-containing protein 1 isoform 1 WDR1 glic2897067 CS3117 66870 6.2 1.8 2.86 cytoskeleton EN.ME.I 290 2 WD repeat-containing protein 1 isoform 1 WDR1 glic289707 CS3117 66870 6.2 1.8 2.96 cytoskeleton EN.ME.I 201 WD repeat-containing protein 1 isoform 1 WDR1 glic289707 CS3117	281	2	syntaxin binding protein 3	STXBP3	gil118600975	O00186	68633	8.0	8	198	trafficking	ME.PL
266 3 calacticul precursor variant CALR glic2897681 P27797 47061 4.3 15 458 chaperone ETAME/NG2 277 5 calacticul precursor variant CALR glic2897681 P27797 47061 4.3 15 458 AMBACK (MERNA) FMER/NG2 278 3 MAGKU (MS 53 utraining protein 1 sclorm TA MPP7 Glic2897001 GS5FV1 66870 6.2 18 2.97 cytoskeleton ENMEL 287 1 VD repeat-containing protein 1 isoform 1 WDR1 glic2897007 GS5HV1 66870 6.2 18 2.97 cytoskeleton ENMEL 298 2 WD repeat-containing protein 1 isoform 1 WDR1 glic2897007 GS1HV1 66870 6.2 18 2.96 cytoskeleton ENMEL 200 2 WD repeat-containing protein 1 isoform 1 WDR1 glic2897067 G75033 66823 6.1 2.8 616 trafficing KEXPL 201 WD repeat-containing protein 1	284	1	Wiskott-Aldrich syndrome protein	WAS	gil4507909	P42768	53108	6.2	3	148	cvtoskeleton	CY
277 5 cartecular precursor variant CALR gl(1967797) 47081 4.3 c 4.8 charability 221 1 syntaxin binding protein 1 Suborn 2A. SVT14 SVT14 <td>286</td> <td>3</td> <td>calreticulin precursor variant</td> <td>CALR</td> <td>gil62897681</td> <td>P27797</td> <td>47061</td> <td>4.3</td> <td>14</td> <td>351</td> <td>chaperone</td> <td>FR ME NG EX PL MT</td>	286	3	calreticulin precursor variant	CALR	gil62897681	P27797	47061	4.3	14	351	chaperone	FR ME NG EX PL MT
211 syntaxin binding protein 3, leoform CRA_b STXBP3 jiii 19576735 COVIDE 21 Traffiching ME.PL 224 Ji MGKU pr56 subleminy member 7 MEP 7 gl(52897067) CS3H17 6850 8.0 17 22 17 traffiching PL 224 Ji MGKU proslation 1 (soform 1 WDR 1 gl(52897067) CS3H17 68570 6.2 18 257 cytoskeleton EN.ME.FL 289 2 WD repeat-containing protein 1 (soform 1 WDR 1 gl(1913995) CS3H17 68570 6.2 18 296 cytoskeleton EN.ME.FL 290 2 WD repeat-containing protein 1 (soform 1 WDR 1 gl(1913995) CPG381 58579 6.4 9 176 cytoskeleton EN.ME.FL 301 WD repeat-containing protein 1 WDR 1 gl(225707 CPG383 68570 6.2 18 166 trafficking EX.PL 302 4 syntaxin binding protein 1 (soform 1 WDR 1 gl(25257) CPG3846 6.5	287	5	calreticulin precursor variant	CALR	gil62897681	P27797	47061	4.3	15	458	chaperone	ER ME NG EX PL MT
222 MAGUK p55 subdamily member 2000 MPP7 gi[62693703 OS3FW1 86599 8.0 17 321 trafficking ME 2341 syntakin binding protein 3 suriant WD repeat-containing protein 1 isoform 1 WDR1 gi[62897087 OS3H17 66870 6.2 18 296 cytoskeleton EN.ME.f. 239 2 WD repeat-containing protein 1 isoform 1 WDR1 gi[62897087 OS3H17 66870 6.2 18 296 cytoskeleton EN.ME.f. 24 wD repeat-containing protein 1 isoform 1 WDR1 gi[62897087 OS3H17 66870 6.2 18 296 cytoskeleton EN.ME.f. 230 2 WD repeat-containing protein 1 isoform 1 WDR1 gi[62897087 OS381 66876 6.2 18 296 cytoskeleton EN.ME.f. 24 syntaxin binding protein 1 WDR1 gi[62897087 OS381 6687 5.3 16 trafficking ME FN.ME.f. 231 tyrtaxin binding protein 1 WDR1 <t< td=""><td>291</td><td>1</td><td>syntaxin binding protein 3 isoform CRA b</td><td>STXBP3</td><td>gil119576735</td><td>000186</td><td>38947</td><td>89</td><td>2</td><td>121</td><td>trafficking</td><td>ME PI</td></t<>	291	1	syntaxin binding protein 3 isoform CRA b	STXBP3	gil119576735	000186	38947	89	2	121	trafficking	ME PI
284 is syntamin binding protein 3 variant STXBP3 gi[s2397301 QS3FW1 68539 8.0 17 321 trafficking ME.PL 287 I WDR1 gi[s2397301 QS3FW1 68539 8.0 17 321 trafficking EM.ME.FL 288 WD repeat-containing protein 1 isoform 1 WDR1 gi[s2397087 QS3H17 66870 6.2 18 296 cytoskeleton EN.ME.FL 299 WD repeat-containing protein 1 isoform CR_A WDR1 gi[12904333 QSBU66 66553 6.1 28 616 trafficking EX.PL 301 WD repeat-containing protein 1 WDR1 gi[12924033 QSBU66 6653 6.1 28 616 trafficking EX.PL 301 WD repeat-containing protein 1 WDR4 gi[12924033 QSBU66 6652 8.1 8.6 trafficking EX.PL 301 WD repeat-containing protein 1 WDR4 gi[12924037 CPG86 5.8 166 trafficking K.VL.FL	292	3	MAGUK p55 subfamily member 7	MPP7	ail55958705	05T2T1	36102	9.1	6	246	protein hinding	PI
WD repeat-containing protein 1 isoform 1 WDR1 glic228707 Color 1 Color 1 <thcolor 1<="" th=""> Color 1 <thcolor 1<="" th=""></thcolor></thcolor>	294	1	syntaxin binding protein 3 variant	STXBP3	gi 60000700	053FW1	68599	8.0	17	321	trafficking	MEPI
Number Number URD PlaceAcontaining protein 1 isoform 1 WDR1 gli62897067 Q53H17 66870 6.2 19 495 cytoskeleton E.N.M.E.f. 29 2 WD repeat-containing protein 1 isoform 1 WDR1 gli62897067 Q53H17 66870 6.2 18 296 cytoskeleton E.N.M.E.f. 300 2 WD repeat-containing protein 1 isoform 1 WDR1 gli12804030 Q38U66 66253 6.1 9 176 cytoskeleton ENMEL F. 301 WD repeat-containing protein 1 isoform 1 WDR1 gli2252811 C75083 66322 6.2 15 cytoskeleton E.N.M.E.f. 301 WD repeat-containing protein 1 Stoform A.S. gli12552811 C75083 66322 6.2 16 trafficking E.N.M.E.F. 301 1 Complex protein 1 subult gamma C.T. G838775 63867 6.2 19 49.5 cytoskeleton E.N.M.E.F. 301 1 contain 1 WDR H gli125557 P3386	297	1	WD repeat-containing protein 1 isoform 1	WDR1	gi 62897087	Q53H17	66870	6.2	18	257	cytoskeleton	EN,ME,EX
variant variant WDR1 gi[62897087 Q53H17 66870 6.2 18 296 cytoskeleton ENMEL 200 2 WDR4 gi[1294033 Q3BU6 66836 6.2 18 16 cytoskeleton ENMEL 302 4 syntaxin binding protein 1 STABP2 gi[12924033 Q3BU6 66836 6.2 28 16 trafficking EX.MEL 304 1 WD repeat-constaining protein 1 STABP2 gi[1292257 O7508 66826 6.2 28 66 7 7 conscheton EN.MEL 304 1 WD repeat-constaining protein 1 STABP2 gi[17963229 O7508 66124 5.3 16 frafficking MEL 305 1 sopmatiper otein 1 subunit gamma CCT3 gi[1796349 O8606 5.4 10 16 readificking MEL 310 1 coleschine Al hydrolase LCPNE1 gi[1806051 O98717 5.5 10 2.2	298	2	WD repeat-containing protein 1 isoform 1	WDR1	gi 62897087	Q53H17	66870	6.2	19	495	cytoskeleton	EN,ME,EX
variant variant <t< td=""><td>299</td><td>2</td><td>WD repeat-containing protein 1 isoform 1</td><td>WDR1</td><td>ail62897087</td><td>Q53H17</td><td>66870</td><td>6.2</td><td>18</td><td>296</td><td>cvtoskeleton</td><td>EN.ME.EX</td></t<>	299	2	WD repeat-containing protein 1 isoform 1	WDR1	ail62897087	Q53H17	66870	6.2	18	296	cvtoskeleton	EN.ME.EX
300 2 VD repeat domain 1, isolorm CRA_d WDR1 g 19813995 Or5083 68.4 9 176 cytoskeleton EN.M.E.I 303 4 syntaxin binding protein 1 isoform 1 WDR1 g 128229727 O75083 66533 6.1 28 616 trafficking EX.M.E.I 304 1 WD repeat domain 1 WDR1 g 128229727 O75083 66822 6.2 15 50 cytoskeleton EN.M.E.I 305 1 syntaxin binding protein 1 STXBP1 g 128229727 O75083 66822 6.2 10 105 trafficking ME.N.E.I 306 2 sparangint-RNA synthetase NARS g 1983475 O73087 6387 5.9 3 167 totaport redox protein 8 ME.ER 307 1 connel CT3 g /4135607 Q98167 5.3 1.2 trafficking ME.ER 311 2 ERO1L g /4135807 Q98167 5.33 8.2 6.8 tr		-	variant		9.1						-,	,,
302 4 syntaxin binding protein 1 isoform 1 WDR1 gill/2827257 OYB083 66836 6.1 28 616 trafficking E.X.PL 304 1 WD repeat-containing protein 1 isoform 1 WDR1 gill/2827257 OYB083 66836 6.2 2.2 2.5 677 cytoskeleton ENMEL 305 1 syntaxin binding protein 1 STXBP1 gill/2827257 OYB083 66836 6.1 2.8 1.6 biosynthesis MELNE_EX 306 2 asparagimy-HRNA synthetase NARS gill/1963043 043776 63848 5.0 1.0 1.0 chaperone CY 308 1 ERO1L gill/19671527 P49806 04980147 5.1 1.0 1.0 proteins MELEF 310 1 copine I copine I ERO1L gill/1968051 0498147 64383 5.6 1.4 3.0 tradicking CY 310 topine I syntrophin, beta 1 Sort 1 Sor	300	2	WD repeat domain 1, isoform CRA_d	WDR1	gi 119613095	075083	58579	6.4	9	1/6	cytoskeleton	EN,ME,EX
303 1 VD repeat containing protein 1 isolotim 1 VDR1 gli226/247 O79083 66828 6.2 2 5 Cytoskeleton EN.ME.I 305 1 syntaxin binding protein 1 STXBP1 gli6208740 P61754 6588 5.8 166 trafficking ME.NO.E.I. 305 1 syntaxin binding protein 1 STXBP1 gli6208740 P61754 63687 5.9 3 167 biosynthesis ME 307 1 r-complex protein 1 subunit gamma CCT3 gli671527 P49388 06882 6.2 10 07 redox proteins ME FR 309 1 exCO1L ERO1L ERO1L erdox proteins ME FR 311 2 cfNudropsyniteinse-like 2 DPVL2 gli450377 O16555 62711 6.0 5 206 signal trans. SY 313 2 difudropsyniteinse-selfex 2 DPVL2 gli41919424188 P30153 65232 5.1 12 22	302	4	syntaxin binding protein 2	STXBP2	gi 12804033	Q9B065	66553	6.1	28	616	trafficking	
3/4 YUD repeat domain 1 WUD	303	1	WD repeat-containing protein 1 isoform 1	WDR1	gij9257257	075083	66836	6.2	15	150	cytoskeleton	EN,ME,EX
303 1 syntaxin binding protein STAPP glip2027490 P61764 P61764 P6386 6.5 6 106 trainkring ME, MC, EA, 307 1 T-complex protein 1 subunitig gamma CCT3 gli671527 P49388 P6882 6.2 10 223 chaperone CY 309 1 ECO1L ERO1L gli671527 P49388 P09829 5617 5.5 10 223 trafficking ME, EF 301 1 copine 1 CPNE1 gli/19862051 09829 5677 5.5 10 223 trafficking ME, EF 2 ERO1L ERO1L gli/19862051 0981E7 54393 5.6 14 304 redox proteins ME, EF 313 2 divdropyrinidinase-like 2 DPYL2 gli/403737 O16555 6231 6.0 5 268 signal trans. SY 314 1 syntrophin, beta 1 SNTB1 gli/199243188 P30153 65324	304	1	WD repeat domain 1	WDR1	gi 12652891	075083	66822	6.2	25	657	cytoskeleton	
306 2 asplaratgriny-intrivi synthetise NARS gill 19930433 O43/70 3 167 Dosynthesis Meters 307 1 Cromplex protein subunit gamma CCT3 gillof1527 Q96HE7 45319 5.4 10 169 redox proteins ME_EF 308 1 Cromplex protein subunit gamma CCT3 gillof1527 Q96HE7 5439 5.6 15 34 redox proteins ME_EF 310 1 copine I CPNE1 gill486367 Q96HE7 5439 5.6 14 348 redox proteins ME_EF 312 2 dhydropyrimidinase-like 2 DPVL2 gill4503377 Q16555 62711 6.0 5 gillafillafillafillafillafillafillafilla	305	1		SIADPI	gil62067940	P01704	0/000	0.5	0	100	tranicking	ME, NG, EX, PL, ST
307 1 FCORIDE CC13 Gillor 1527 P43308 0.0223 Chapterone CL13 308 1 ERO1L ERO1L Billor21557 Q90HET 4130 5.4 10 223 Indeperone CT 309 1 copine I CPNE1 gillor21557 Q908EE 5667. 5.5 10 222 trafficking MEEF 311 2 ERO1L ERO1L gillor3257. Q9082E 56677. 5.5 10 243 redox proteins MEEF 313 2 dihydropyrimidinase-like 2 DPVL2 gillor3377 Q16555 62711 6.0 5 206 signal trans. SY 314 1 syntrophin, beta 1 SNTB1 gill191217726 P55209 40154 4.6 3 112 cell proliferation MEE,F 315 1 syntrophin, beta 1 SNTP1 gillor30377 Q16555 62711 6.0 5 20 ryotinisration multiruni	306	2	asparaginyi-tRINA synthetase	NARS	gij119583453	D43776	63687	5.9	3	167	biosynthesis	ME
308 1 EKOTL gilac/255 Gubbert 45.319 5.4 10 169 rebox proteins Miller 310 1 copine I CPNE1 gil1986784 P09960 63.48 5.7 5.5 10 232 trafficking ME 311 2 EKO1L CPNE1 gil1986051 096H27 54.39 5.6 14 304 redox proteins ME,EF 313 2 dihydropyrimdinase-like 2 DPYL2 gil49603377 016555 62711 6.0 5 206 signal trans. SY 314 1 syntrophin, beta 1 SNTB1 gil19912414 013884 5.838 8.8 2 66 trafficking CR 316 2 phosphatase an PPP2R1A gil149243188 P30153 65232 5.1 12 227 multifunctional MT 317 1 copine traint CP14 gil62089290 052314 5.735 5.6 144 trafficking	307	1	I-complex protein 1 subunit gamma	6613	gij671527	P49368	60862	6.2	10	223	cnaperone	
309 3 bit Rother A4 hydrolase CL1 AH1 git 1961/364 PU9902 63481 5.7 5 193 hydrolases CT 311 2 CPNL1 ERO1L git 1956/561 Q961/27 55 10 232 trafficking ME_EF 312 2 ERO1L ERO1 git 1956/561 Q961/27 5439 56 15 348 redox proteins ME_EF 313 2 difydropyrimidinase-like 2 DPVL2 git 450337 C1655 62711 6.0 5 206 signal trans. SY 314 1 syntrophin, beta 1 NAP1L1 git 1961/2441 C1884 5838 8.8 2 68 trafficking ME 316 2 protein trans. SY NAP1L1 git 1961/2418 P30153 65202 1.1 202 hydrolases unknow 317 1 socolorn trainat CP protein trainat CP QI copine trainat CP<	308	1	ERU1L	EROIL	gi 6272557	Q96HE7	45319	5.4	10	169	redox proteins	ME,ER
310 1 Copine I CPNE1 gill48/45697 Classical 10 2.22 tranking medx proteins ME,EF 312 2 ERO1L ERO1L gill19586051 Q96HE7 5439 5.6 14 304 redox proteins ME,EF 312 2 Bitydropyrimicinase-like 2 DPYL2 gild50377 C16555 52671 6.0 5 206 signal trans. SY 314 1 syntrophin, beta 1 SNTB1 gill19586051 Q96HE7 5439 5.6 14 304 redox proteins. SY 316 2 Phosphatase 2a PPP2R1A gill49243188 P30153 65232 5.1 12 227 multifunctional MT 317 1 protein tyrosine phosphatase, non-receptor type nd gild5289690 Q35EL0 67966 7.7 15 202 hydrolases unknow 318 1 soc-2 suppressor of clear homolog SHOC2 gill41281398 Q30143 8.7 3 </td <td>309</td> <td>3</td> <td>leukotriene A4 hydrolase</td> <td>LIA4H</td> <td>gi 119617964</td> <td>P09960</td> <td>63481</td> <td>5.7</td> <td>5</td> <td>193</td> <td>nydrolases</td> <td>CY</td>	309	3	leukotriene A4 hydrolase	LIA4H	gi 119617964	P09960	63481	5.7	5	193	nydrolases	CY
311 2 ENOIL BIN11996001 Guesting 548.39 5.6 15 348 redox proteins MELEF 313 2 dihydropyrinkidnase-like 2 DPYL2 gi 11956051 Q96HE7 54839 5.6 14 304 redox proteins MELEF 314 1 syntrophin, beta 1 SNTB1 gi 1192612414 Q13884 58383 8.8 2 68 trafficking CY 315 1 nucleosome assembly protein 1-like 1, isoform NAP1L1 gi 149243188 P30153 65232 5.1 12 227 multifunctional MT 316 protein tyrosine phosphatase, non-receptor type nd gi 62898990 Q53EL0 67966 7.7 15 202 hydrolases unknow 318 1 soc-2 suppressor of clear homolog SHOC2 gi 41281398 Q9U013 65304 8.7 3 105 unclassified CY 319 dinydropyrimidinase-like 2 DPYL2 gi 4507909 P42768 53108 <td>310</td> <td>1</td> <td></td> <td>CPNE1</td> <td>gi 48145697</td> <td>Q99829</td> <td>59677</td> <td>5.5</td> <td>10</td> <td>232</td> <td>trafficking</td> <td>ME</td>	310	1		CPNE1	gi 48145697	Q99829	59677	5.5	10	232	trafficking	ME
312 2 EROTL BRYDL	311	2	ERU1L	EROIL	gi 119586051	Q96HE7	54839	5.6	15	348	redox proteins	ME,ER
$ \begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	312	2	ERU1L	EROIL	gi 119586051	Q96HE7	54839	5.6	14	304	redox proteins	ME,ER
314 1 syntrophin, beta 1 SNTB1 gji[19012414 Cl3884 58.8 2 68 trafficking CY 315 1 nucleosome assembly protein 1-like 1, isoform NAP1L1 gji[19012414 Cl3884 58.8 2 68 trafficking ME,PL,N 316 2 phosphatase 2a PPP2R1A gji[149243188 P30153 65232 5.1 12 227 multifunctional MT 317 1 protein tyrosine phosphatase, non-receptor type nd gji[62898990 Q53EL0 67966 7.7 15 202 hydrolases unknow 318 1 soc-2 suppressor of clear homolog SHOC2 gji[4503377 Q16555 62711 6.0 17 479 signal trans. SY 320 1 orpinel variant WAS gji[407909 P42768 53108 6.2 5 141 cytoskeleton CY 321 1 wiskott-Aldrich syndrome protein WAS gji[1805063 Q9NW7 <t< td=""><td>313</td><td>2</td><td>dihydropyrimidinase-like 2</td><td>DPYL2</td><td>gi 4503377</td><td>Q16555</td><td>62711</td><td>6.0</td><td>5</td><td>206</td><td>signal trans.</td><td>SY</td></t<>	313	2	dihydropyrimidinase-like 2	DPYL2	gi 4503377	Q16555	62711	6.0	5	206	signal trans.	SY
1 CRA_d INFNEL gi (100 mm 2 100 mm	314	1	syntrophin, beta 1 nucleosome assembly protein 1-like 1, isoform		gi 119612414	Q13884 P55209	58383 40154	8.8	2	68 112	trafficking	
317 1 protein tryosine phosphatase, non-receptor type 6 isoform 1 variant nd gil62898990 Q53EL0 67966 7.7 15 202 hydrolases unknow 318 1 soc-2 suppressor of clear homolog SHOC2 gil41281388 Q9UQ13 65304 8.7 3 105 unclassified CY 319 2 dihydropyrimidinase-like 2 DPYL2 gil4503377 Q16555 62711 6.0 17 479 signal trans. SY 320 1 copine I variant CPNE1 gil6208240 Q59El4 57352 5.5 6 144 trafficking ME 321 1 Viskott-Aldrich syndrome protein WAS gil4507309 P42768 53108 6.2 5141 trafficking LY,EN 323 mix organizing protein) WAS gil12804207 P42768 54422 6.4 17 156 chaperone ME,PLS 323 mix organizing protein WAS gil12804207 P42768 54422 6.4 6 191 cytoskeleton CY <td>316</td> <td>2</td> <td>CRA_d phosphatase 2a</td> <td>PPP2R1A</td> <td>gi 149243188</td> <td>P30153</td> <td>65232</td> <td>5.1</td> <td>12</td> <td>227</td> <td>multifunctional</td> <td>ME, PE, NO</td>	316	2	CRA_d phosphatase 2a	PPP2R1A	gi 149243188	P30153	65232	5.1	12	227	multifunctional	ME, PE, NO
318 1 soc-2 suppressor of clear homolog SHOC2 gil41281398 Q9UQ13 65304 8.7 3 105 unclassified CY 319 2 dihydropyrimidinase-like 2 DPYL2 gil4203377 C16555 62711 6.0 17 479 signal trans. SY 320 1 copine I variant CPNE1 gil62083240 Q59E14 57352 5.5 6 144 trafficking ME 321 1 Wiskott-Aldrich syndrome protein WAS gil18105063 Q9NRW7 65435 8.4 6 284 trafficking LY,EN 322 ink organizing protein) WAS gil12804207 P42768 54422 6.4 6 191 cytoskeleton CY 322 tyrosine-protein phosphatase non-receptor type PTN6 gil82407989 P2350 67924 7.3 5 95 signal trans. CY,NU 325 2 tyrosine-protein phosphatase non-receptor type PTN6 gil82407989 P2350 60638 6.1 10 115 signal trans. CY,NU	317	1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6 isoform 1 variant	nd	gi 62898990	Q53EL0	67966	7.7	15	202	hydrolases	unknown
319 2 dihydropyrimidinase-like 2 DPYL2 gil4503377 Q16555 62711 6.0 17 479 signal trans. SY 320 1 copine I variant CPNE1 gil62089240 Q59E14 57352 5.5 6 144 trafficking ME 321 1 Wiskott-Aldrich syndrome protein WAS gil4507909 P42768 53108 6.2 5 141 cytoskeleton CY 322 1 vacuolar protein sorting 45A VPS45 gil1805063 Q9NRV7 65435 8.4 6 284 trafficking LY.EN 323 mix organizing protein) Wiskott-Aldrich syndrome protein WAS gil12804207 P42768 54422 6.4 6 191 cytoskeleton CY 324 1 tyrosine-protein phosphatase non-receptor type PTN6 gil557900 P29350 60638 6.1 10 115 signal trans. CY,NL 325 2 bfunctional purine biosynthesis protein PURH ATIC gil12804207 P42768 54422 6.4 4 174	318	1	soc-2 suppressor of clear homolog	SHOC2	ail41281398	Q9UQ13	65304	8.7	3	105	unclassified	CY
320 1 copine I variant CPNE1 gi[62089240 Q59EI4 57352 5.5 6 144 trafficking ME 321 1 Wiskott-Aldrich syndrome protein WAS gi[4507909 P42768 53108 6.2 5 141 trafficking LY,EN 322 1 vacuolar protein sorting 45A VPS45 gi[18105063 Q9NRW7 65435 8.4 6 284 trafficking LY,EN 323 mix organizing protein) Wiskott-Aldrich syndrome protein WAS gi[5803181 P31948 63227 6.4 17 156 chaperone ME,PL,S 324 1 tyrosine-protein phosphatase non-receptor type PTN6 gi[557900 P29350 67924 7.3 5 95 signal trans. CY,NL 325 2 tyrosine-protein phosphatase non-receptor type PTN6 gi[28207989 P29350 660638 6.1 10 115 signal trans. CY,NL 326 2 bifunctional purine biosynthesis protein PURH ATIC gi[12804207 P42768 54422 6.4 4 <td>319</td> <td>2</td> <td>dihvdropyrimidinase-like 2</td> <td>DPYL2</td> <td>gil4503377</td> <td>Q16555</td> <td>62711</td> <td>6.0</td> <td>17</td> <td>479</td> <td>signal trans.</td> <td>SY</td>	319	2	dihvdropyrimidinase-like 2	DPYL2	gil4503377	Q16555	62711	6.0	17	479	signal trans.	SY
321 1 Wiskott-Aldrich syndrome protein WAS gi 4507909 P42768 53108 6.2 5 141 cytoskeleton CY 322 1 vacuolar protein sorting 45A VPS45 gi 18105063 Q9NRW7 65435 8.4 6 284 trafficking LY,EN 323 mix organizing protein) Wiskott-Aldrich syndrome protein WAS gi 2804207 P42768 54422 6.4 17 156 chaperone ME,PL,S 324 1 tyrosine-protein phosphatase non-receptor type PTN6 gi 557900 P29350 67924 7.3 5 95 signal trans. CY,NU 325 2 tyrosine-protein phosphatase non-receptor type PTN6 gi 82407989 P29350 60638 6.1 10 115 signal trans. CY,NU 326 2 bifunctional purine biosynthesis protein PURH ATIC gi 12804207 P42768 54422 6.4 4 174 cytoskeleton CY 326 2 bifunctional purine biosynthesis protein PURH ATIC gi 12804207 P42768 544	320	1	copine L variant	CPNE1	gil62089240	Q59EI4	57352	5.5	6	144	trafficking	MF
322 1 vacualar protein softman g45A VPS45 gij18105063 Q9NRW7 65435 8.4 6 224 trafficking LY,EN 323 mix <organizing protein<="" td=""> (Hsp70/Hsp90- wiskott-Aldrich syndrome protein STIP1 gij18105063 Q9NRW7 65435 8.4 6 224 trafficking LY,EN 324 1 vacualar protein softman protein WAS gij18105063 Q9NRW7 65435 8.4 6 101 cytoskeleton CY 324 1 tyrosine-protein phosphatase non-receptor type PTN6 gij18204207 P42768 54422 6.4 6 191 cytoskeleton CY,NU 325 2 tyrosine-protein phosphatase non-receptor type PTN6 gij18204207 P42768 54422 6.4 6 101 115 signal trans. CY,NU 326 2 bifunctional purine biosynthesis protein PURH ATIC gij18204207 P42768 54422 6.4 4 174 cytoskeleton CY 327 3 Wiskott-Aldrich syndrome protein WAS gij12804207 P4</organizing>	321	1	Wiskott-Aldrich syndrome protein	WAS	gil4507909	P42768	53108	6.2	5	141	cvtoskeleton	CY
323 mix organizing protein (Hsp70/Hsp90- wiskott-Aldrich syndrome protein STIP1 gij5803181 P31948 63227 6.4 17 156 chaperone ME,PL,S 324 1 tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 PTN6 gij557900 P29350 67924 7.3 5 95 signal trans. CY,NU 325 2 tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 PTN6 gij12804207 P42768 54422 6.4 6 191 cytoskeleton CY,NU 325 2 tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 PTN6 gij12804207 P42768 54422 6.4 1 115 signal trans. CY,NU 326 2 bifunctional purine biosynthesis protein PURH ATIC gij12804207 P42768 54422 6.4 4 174 cytoskeleton CY 327 3 Wiskott-Aldrich syndrome protein WAS gij12804207 P42768 54422 6.4 4 174 cytoskeleton CY 327 3 Wiskott-Aldrich syndrome protein WAS gij12804207	322	1	vacuolar protein sorting 45A	VPS45	gil18105063	Q9NRW7	65435	84	6	284	trafficking	LY EN
323Mix organizing proteinWASgi 12804207P42768544226.46191cytoskeletonCY3241tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6PTN6gi 557900P29350679247.3595signal trans.CY,NL3252tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6PTN6gi 82407989P29350606386.110115signal trans.CY,NL3262bifunctional purine biosynthesis protein PURHATICgi 119590931P31939650756.323401mutifunctionalME,PL3273Wiskott-Aldrich syndrome proteinWASgi 12804207P42768544226.44174cytoskeletonCY3281adenylyl cyclase-associated protein variantCAP1gi 62896585Q01518518998.15103traffickingPL,ME3291ezrinEZRgi 30217P15311682335.8894cytoskeletonME,EX,ME3311T-complex polypeptide 1TCPAgi 33150628O95747325186.95172kinaseME3321DCHT2 Serine/threonine-protein kinase OSR1OXSR1gi 3018062O95747325186.95172kinaseME3332chaperonin (HSP60)CH60gi 30689P10809610755.7285redoxRE,R,R3342chaperoni	323	miv	stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-	STIP1	gi 5803181	P31948	63227	6.4	17	156	chaperone	ME,PL,SY
3241tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6PTN6gi 557900P29350 67924 7.3595signal trans.CY,NL3252tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6PTN6gi 82407989P29350 60638 6.1 10115signal trans.CY,NL3262bifunctional purine biosynthesis protein PURHATICgi 119590931P31939 65075 6.3 23401mutifunctionalME,PL3273Wiskott-Aldrich syndrome proteinWASgi 12804207P42768 54422 6.4 4174cytoskeletonCY3281adenylyl cyclase-associated protein variantCAP1gi 62896585Q01518 51899 8.1 5103traffickingPL,ME3311T-complex polypeptide 1TCPAgi 36796P17987 60869 6.0 6 162chaperoneER,EN,ME3321DCHT2 Serine/threonine-protein kinase OSR1OXSR1gi 3150628O9574732518 6.9 5 172kinaseME3332nuclobinin 1 variantQ53GX6gi 62897169Q53GX653874 5.2 22482unchassifiedunknow3342chaperonin (HSP60)CH60gi 306809P10809 61157 5.7 21413chaperoneME,NG,EX,S3393chaperonin containing TCP1, subunit 5eCCT5gi 24307393P4864360089 5.5 <	525		Wiskott-Aldrich syndrome protein	WAS	gi 12804207	P42768	54422	6.4	6	191	cytoskeleton	CY
3252tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6PTN6gi 82407989P29350606386.110115signal trans.CY,NL3262bifunctional purine biosynthesis protein PURHATICgi 119590931P31939650756.323401mutifunctionalME,PL3273Wiskott-Aldrich syndrome proteinWASgi 12804207P42768544226.44174cytoskeletonCY3281adenylyl cyclase-associated protein variantCAP1gi 62896585Q01518518998.15103traffickingPL,ME3291ezrinEZRgi 340217P15311682335.8894cytoskeletonME,EX,N3311T-complex polypeptide 1TCPAgi 36796P17987608696.06162chaperoneER,EN,ME3321DCHT2 Serine/threonine-protein kinase OSR1OXSR1gi 33150628O95747325186.95172kinaseME3352nuclobidin 1 variantQ53CX6gi 62897169Q53CX6538745.222482unclassifiedunknow3382chaperonin containing TCP1, subunitPHAA1gi 306380P10809611575.7285redoxER,ME3401copine IIICPNE3gi 4503015O75131609475.6493traffickingME,NG,EX,S	324	1	6	PTN6	gi 557900	P29350	67924	7.3	5	95	signal trans.	CY,NU
326 2 bifunctional purine biosynthesis protein PURH ATIC gi 119590931 P31939 65075 6.3 23 401 mutifunctional ME,PL 327 3 Wiskott-Aldrich syndrome protein WAS gi 12804207 P42768 54422 6.4 4 174 cytoskeleton CY 328 1 adenylyl cyclase-associated protein variant CAP1 gi 62896585 Q01518 51899 8.1 5 103 trafficking PL,ME 329 1 ezrin EZR gi 340217 P15311 68233 5.8 8 94 cytoskeleton ME,EX,M 331 1 T-complex polypeptide 1 TCPA gi 36796 P17987 60869 6.0 6 162 chaperone ER,EN,ME 332 1 DCHT2 Serine/threonine-protein kinase OSR1 OXSR1 gi 32150628 095747 32518 6.9 5 172 kinase ME 335 2 nucleobindin 1 variant Q53GX6 gi 30680<	325	2	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	PTN6	gi 82407989	P29350	60638	6.1	10	115	signal trans.	CY,NU
327 3 Wiskott-Aldrich syndrome protein WAS gil12804207 P42768 54422 6.4 4 174 cytoskeleton CY 328 1 adenylyl cyclase-associated protein variant CAP1 gil62896585 Q01518 51899 8.1 5 103 trafficking PL,ME 329 1 ezrin EZR gil320217 P15311 68233 5.8 8 94 cytoskeleton ME,EX,N 331 1 T-complex polypeptide 1 TCPA gil36796 P17987 60869 6.0 6 162 chaperone ER,EN,ME 332 1 DCHT2 Serine/threonine-protein kinase OSR1 OXSR1 gil33150628 O95747 32518 6.9 5 172 kinase ME 335 2 nucleobindin 1 variant Q53GX6 gil62897169 Q53GX6 53874 5.2 22 482 unclassified unknow 337 1 prolyl 4-hydroxylase, alpha subunit P4HA1 gil/190786 P13674 61075 5.7 2 85 redox ER,EN,ME </td <td>326</td> <td>2</td> <td>bifunctional purine biosynthesis protein PURH</td> <td>ATIC</td> <td>gi 119590931</td> <td>P31939</td> <td>65075</td> <td>6.3</td> <td>23</td> <td>401</td> <td>mutifunctional</td> <td>ME,PL</td>	326	2	bifunctional purine biosynthesis protein PURH	ATIC	gi 119590931	P31939	65075	6.3	23	401	mutifunctional	ME,PL
328 1 adenylyl cyclase-associated protein variant CAP1 gil62896585 Q01518 51899 8.1 5 103 trafficking PL,ME 329 1 ezrin EZR gil340217 P15311 68233 5.8 8 94 cytoskeleton ME,EX,M 331 1 T-complex polypeptide 1 TCPA gil36796 P1787 60869 6.0 6 162 chaperone ER,EN,ME 332 1 DCHT2 Serine/threonine-protein kinase OSR1 OXSR1 gil362897169 Q53GX6 53874 5.2 22 482 unclassified unknow 337 1 prolyl 4-hydroxylase, alpha subunit P4HA1 gil90786 P13674 61075 5.7 2 85 redox ER,ME 338 2 chaperonin (HSP60) CH60 gil3016080 P10809 61157 5.7 21 413 chaperone ME,NG,EX,S 339 3 chaperonin containing TCP1, subunti 5ε CCT5 gil24307939 P48643 60089 5.5 15 262 chaperone EX,PL <td>327</td> <td>3</td> <td>Wiskott-Aldrich syndrome protein</td> <td>WAS</td> <td>gi 12804207</td> <td>P42768</td> <td>54422</td> <td>6.4</td> <td>4</td> <td>174</td> <td>cytoskeleton</td> <td>CY</td>	327	3	Wiskott-Aldrich syndrome protein	WAS	gi 12804207	P42768	54422	6.4	4	174	cytoskeleton	CY
329 1 ezrin EZR gi 340217 P15311 68233 5.8 8 94 cytoskeleton ME,EX,M 331 1 T-complex polypeptide 1 TCPA gi 36796 P17987 60869 6.0 6 162 chaperone ER,EN,ME 332 1 DCHT2 Serine/threonine-protein kinase OSR1 OXSR1 gi 3150628 095747 32518 6.9 5 172 kinase ME 335 2 nucleobindin 1 variant Q53GX6 gi 30150628 095747 32518 6.9 5 172 kinase ME 337 1 prolyl 4-hydroxylase, alpha subunit P4HA1 gi 30680 P10809 61157 5.7 2 85 redox ER,ME 338 2 chaperonin (HSP60) CH60 gi 30680 P10809 61157 5.7 21 413 chaperone ME,NG,EX,S 339 3 chaperonin containing TCP1, subunti 5ɛ CCT5 gi 24307939 P48643 6008	328	1	adenylyl cyclase-associated protein variant	CAP1	gi 62896585	Q01518	51899	8.1	5	103	trafficking	PL,ME
331 1 T-complex polypeptide 1 TCPA gi 36796 P17987 60869 6.0 6 162 chaperone ER,EN,ME 332 1 DCHT2 Serine/threonine-protein kinase OSR1 OXSR1 gi 33150628 O95747 32518 6.9 5 172 kinase ME 335 2 nucleobindin 1 variant Q53CX6 gi 306796 P13674 61075 5.7 2 482 unclassified unknow 337 1 prolyl 4-hydroxylase, alpha subunit P4HA1 gi 306890 P10809 61075 5.7 2 482 unclassified unknow 338 2 chaperonin (HSP60) CH60 gi 306890 P10809 61175 5.7 21 413 chaperone ME,NG,EX,S 339 3 chaperonin containing TCP1, subunti 5e CCT5 gi 4503015 O75131 60947 5.6 4 93 trafficking ME,NG,EX,F 340 1 copine III CPNE3 gi 4503015 O75131 60947 5.6 4 93 trafficking ME,EX,F <td>329</td> <td>1</td> <td>ezrin</td> <td>EZR</td> <td>gi 340217</td> <td>P15311</td> <td>68233</td> <td>5.8</td> <td>8</td> <td>94</td> <td>cytoskeleton</td> <td>ME,EX,MT</td>	329	1	ezrin	EZR	gi 340217	P15311	68233	5.8	8	94	cytoskeleton	ME,EX,MT
332 1 DCHT2 Serine/threonine-protein kinase OSR1 OXSR1 gil33150628 O95747 32518 6.9 5 172 kinase ME 335 2 nucleobindin 1 variant Q53GX6 gil62897169 Q53GX6 53874 5.2 22 482 unclassified unknow 337 1 prolyl 4-hydroxylase, alpha subunit P4HA1 gil/190786 P13674 61075 5.7 2 85 redox ER,ME 338 2 chaperonin (HSP60) CH60 gil/306890 P10809 61157 5.7 2 85 redox ER,ME 339 3 chaperonin containing TCP1, subunti 5£ CCT5 gil/24307939 P48643 60089 5.5 15 262 chaperone EX,PL 340 1 copine III CPNE3 gil/4503015 O75131 60947 5.6 4 93 trafficking ME,KZ,F	331	1	T-complex polypeptide 1	TCPA	gi 36796	P17987	60869	6.0	6	162	chaperone	ER,EN,ME,EX
335 2 nucleobindin 1 variant Q53GX6 gi[62897169 Q53GX6 53874 5.2 22 482 unclassified unknow 337 1 prolyl 4-hydroxylase, alpha subunit P4HA1 gi[190786 P13674 61075 5.7 2 85 redox ER,ME 338 2 chaperonin (HSP60) CH60 gi[306890 P10809 61157 5.7 21 413 chaperone ME,NG,EX,S 339 3 chaperonin containing TCP1, subunit 5ε CCT5 gi[24307939 P48643 60089 5.5 15 262 chaperone EX,PL 340 1 copine III CPNE3 gi[4503015 O75131 60947 5.6 4 93 trafficking ME,X,F	332	1	DCHT2 Serine/threonine-protein kinase OSR1	OXSR1	gi 33150628	095747	32518	6.9	5	172	kinase	ME
337 1 prolyl 4-hydroxylase, alpha subunit P4HA1 gil 190786 P13674 61075 5.7 2 85 redox ER,ME 338 2 chaperonin (HSP60) CH60 gil 306890 P10809 61157 5.7 21 413 chaperone ME,NG,EX,S 339 3 chaperonin containing TCP1, subunti 5ε CCT5 gil 24307939 P48643 60089 5.5 15 262 chaperone EX,PL 340 1 copine III CPNE3 gil 4503015 O75131 60947 5.6 4 93 trafficking ME,X,FL	335	2	nucleobindin 1 variant	Q53GX6	gi 62897169	Q53GX6	53874	5.2	22	482	unclassified	unknown
338 2 chaperonin (HSP60) CH60 gi 306890 P10809 61157 5.7 21 413 chaperone ME,NG,EX,S 339 3 chaperonin containing TCP1, subunti 5c CCT5 gi 24307939 P48643 60089 5.5 15 262 chaperone EX,PL 340 1 copine III CPNE3 gi 4503015 O75131 60947 5.6 4 93 trafficking ME,EX,FL	337	1	prolyl 4-hydroxylase, alpha subunit	P4HA1	gi 190786	P13674	61075	5.7	2	85	redox	ER,ME
339 3 chaperonin containing TCP1, subunti 5c CCT5 gil24307939 P48643 60089 5.5 15 262 chaperone EX,PL 340 1 copine III CPNE3 gil4503015 O75131 60947 5.6 4 93 trafficking ME,EX,FL	338	2	chaperonin (HSP60)	CH60	gi 306890	P10809	61157	5.7	21	413	chaperone	ME,NG,EX,SY,MT
340 1 copine III CPNE3 gi 4503015 O75131 60947 5.6 4 93 trafficking ME,EX,F	339	3	chaperonin containing TCP1, subunti 5ε	CCT5	gi 24307939	P48643	60089	5.5	15	262	chaperone	EX,PL
	340	1	copine III	CPNE3	gi 4503015	O75131	60947	5.6	4	93	trafficking	ME,EX,PL
341 1 EH-domain containing 1 EHD1 gil30240932 Q9H4M9 60646 6.4 13 236 traffickino ER.LY.EN.E	341	1	EH-domain containing 1	EHD1	gi 30240932	Q9H4M9	60646	6.4	13	236	trafficking	ER,LY,EN,EX.PL

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen- bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
342	4	EH-domain containing 1	EHD1	gi 119594723	Q9H4M9	61945	6.3	17	420	trafficking	ER,LY,EN,EX,PL
343	2	pyruvate kinase 3 isoform 2	PKM2	gi 67464392	P14618	60277	8.2	20	480	metabolism	ME,EX,SY
344	2	ubiquitin specific protease 14 isoform a		gi 4827050	P54578	56489	5.2	4	115	degradation	PL ED ME EV DI MT
345 346	2	provi 4-nydroxylase, beta subunit precursor	P4nb PKM2	gij20070125 gij67464392	P07237 P14618	57460 60277	4.0 8.2	20 26	677	metabolism	ME EX SY
347	2	pyruvate kinase 3 isoform 2	PKM2	gi 119598292	P14618	60773	8.0	15	335	metabolism	ME,EX,SY
348	2	prolyl 4-hydroxylase, beta subunit precursor	P4HB	gi 20070125	P07237	57480	4.8	31	653	redox	ER,ME,EX,PL,MT
349	2	prolyl 4-hydroxylase, beta subunit precursor	P4HB	gi 20070125	P07237	57480	4.8	17	448	redox	ER,ME,EX,PL,MT
350	1	pyruvate kinase 3 isoform 2		gi 67464392	P14618	60277 59570	8.2	16 7	433	metabolism	
352	2	serine/threonine-protein kinase PAK 2	PAK2	ail984305	Q13177	55166	6.0	3	196	signal trans.	
353	4	coronin, actin binding protein, 1C	CORO1C	gi 62897707	Q9ULV4	53931	6.7	7	265	multifunctional	ME
354	2	pyruvate kinase 3 isoform 2	PKM2	gi 33286420	P14618	58538	7.6	21	368	metabolism	ME,EX,SY
355	1	catalase	CATA	gi 179950	P04040	51550	7.8	5	105	metabolism	PE,ER,LY,EN,ME
350	2	M2-type pyruvate kinase chaperonin containing TCP1 subunti 87	CCT8	gi 189998 ail48762932	P50990	58447 60153	8.0 5.4	4	314	chaperone	EN ME EX
358	1	chaperonin containing TCP1, subunti 8τ	CCT8	gi 48762932	P50990	60153	5.4	5	183	chaperone	EN,ME,EX
360	2	coronin, actin binding protein, 1A	CORO1A	gi 5902134	P31146	51678	6.3	15	360	cytoskeleton	LY,PL
361	2	catalase	CATA	gi 4557014	P04040	59947	6.9	11	274	metabolism	PE,ER,LY,EN,ME
362	2	alpha-tubulin tubulin alpha 6 variant	IBA1B	gi 340021 dile2897609	P68363	50804 50476	4.9 5.0	15 12	479	cytoskeleton	PL ME DI
364	1	PPP5C protein	Q9BPW0	gil37589898	Q9BPW0	55632	5.8	4	223	hvdrolase	CY.NU
365	2	seryl-tRNA synthetase	SARS	gi 119576769	P49591	53844	6.0	6	103	tRNA processing	ME,PL
366	3	tyrosyl-tRNA synthetase	SYYC	gi 62898948	P54577	59467	6.8	8	127	signal trans.	ME,PL
368	3	pyruvate kinase 3 isoform 2		gi 33286420	P14618	58538	7.6	16 16	327	metabolism	ME,EX,SY
370	2	coronin, actin binding protein, 1A	CORO1A	gi 540021 gi 5902134	P31146	50604 51678	4.9 6.3	21	447	cytoskeleton	LY.PL
372	2	coronin, actin binding protein, 1A	CORO1A	gi 5902134	P31146	51678	6.3	17	476	cytoskeleton	LY,PL
373	1	protein-tyrosine kinase fyn isoform c	FYN	gi 23510364	P06241	54821	5.9	14	331	signal trans.	EN,CY
374	2	coronin, actin binding protein, 1A	CORO1A	gi 1002923	P31146	51722	6.1	10	145	cytoskeleton	LY,PL
376	3	chaperonin containing TCP1 subunit 7n	CCT7	gil62896515	Q53HV2	59816	7.6	7	237	chaperone	
377	1	HIP-55	DBNL	gi 48146451	Q9UJU6	48449	5.0	13	191	signal trans.	CY
378	1	protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	gi 119597640	P30101	54454	6.8	4	138	chaperone	ER,LY,ME,NG,EX,PL
379	4	protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	gi 119597640	P30101	54454	6.8	12	443	chaperone	ER,LY,ME,NG,EX,PL
385	2	protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	gil114656687	P30101	55328	6.4	9 25	443	chaperone	FRIYME, NG, EX, FL
386	3	phosphoglucose isomerase	G6PI	gi 14488680	P06744	63204	8.4	16	201	multifunctional	ME,EX,PL,MT
388	1	tubulin, beta	TBB5	gi 18088719	P07437	50096	4.8	21	466	cytoskeleton	ME,PL,SY
389	2	protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	gi 114656687	P30101	55328	6.4	14	298	chaperone	ER,LY,ME,NG,EX,PL
390	3	ACTB protein	ACTB	gi 14488680 gi 15277503	P06744 P60709	63204 40536	8.4 5.6	21 9	378 271	cvtoskeleton	ME,EX,PL,MT FR ME FX PL SY
393	1	phosphoglucose isomerase	G6PI	gi 14488680	P06744	63204	8.4	11	136	multifunctional	ME,EX,PL,MT
394	3	adenylyl cyclase-associated protein variant	CAP1	gi 62896585	Q01518	51899	8.1	8	289	trafficking	PL,ME
395	2	adenylyl cyclase-associated protein variant	CAP1	gi 62896585	Q01518	51899	8.1	18	755	trafficking	PL,ME
396 397	2	adenvivi cyclase-associated protein variant	CAP1	gil6984209 gil62896585	P06239 Q01518	50959 51899	5.3 8.1	б 21	644	trafficking	
398	2	moesin	MSN	gi 14625824	P26038	62004	7.6	11	368	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
399	2	tyrosine kinase LCK	LCK	gi 187034	P06239	58574	5.3	19	533	signal trans.	CY
400	1	annexin A11	ANX11	gi 119600805	P50995	26961	6.9	5 17	130	trafficking	MT,EX,ME
401	2	ACTB protein	ACTB	gil15277503	P60709	40536	5.6	8	294	cvtoskeleton	ER.ME.EX.PL.SY
403	2	adenylyl cyclase-associated protein	CAP1	gi 5453595	Q01518	51926	7.6	3	193	trafficking	PL,ME
404	5	adenylyl cyclase-associated protein variant	CAP1	gi 62896585	Q01518	51899	8.1	17	501	trafficking	PL,ME
406	2	adenylyl cyclase-associated protein	CAP1	gi 119627645	Q01518	51357	7.6	3	183	trafficking	PL,ME
407	2	3-phosphoglycerate debydrogenase	PHGDH	gij 100007 19 gij 5771523	P07437 043175	57370	4.0 6.3	20 15	059 411	biosythesis	ME,PL,ST
400	3	alucose-6-phosphate debydrogenase isoform b	CEPD	gil108773703	D11/13	59675	6.0	26	400	metabolism	ME
403	4	transfer RNA-Tro synthetase	SYWC	ail340368	P23381	53396	5.7	20 16	480	biosynthesis	MEPI
412	1	glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PD	gi 66361514	P11413	56688	6.7	15	418	metabolism	ME
413	2	ATPase, H+ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B2	ATP6V1B2	gi 21040528	P21281	56735	5.7	7	237	channel	LY,ME,NG,SY
414	2	vacuolar H+-ATPase 56,000 subunit	VATB2	gi 522193	P21281	56792	5.6	14	341	channel	LY,ME,NG,SY
415	4	annexin A11	ANX11	gi 4557317	P50995	54697	7.5	20	558	trafficking	MT,EX,ME
417	3	1	SKAP1	gi 115527074	Q86WV1	41692	4.5	6	211	signal trans.	CY,NU
418	1	aging-associated gene 12	Q2TSB6	gi 54632179	Q2TSB6	50022	6.9	6	165	unclassified	unknown
420	2	coronin, actin binding protein, 1A	SNX17	gi 5902134 gi 62896645	P31146 015036	51678	6.3 7 1	15 15	420 331	cytoskeleton	LY,PL EN ME PI
422	1	HEXA protein	HEXA	gil33876034	Q9BVJ8	47407	4.9	4	69	multifunctional	LY
424	2	chaperonin containing TCP1, subunit 2β	CCT2	gi 5453603	P78371	57794	6.0	17	421	chaperone	ER,EN,ME,PL,MT,CY
426	2	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit precursor	ATP5A1	gi 4757810	P25705	59828	9.2	21	412	channel	ER,LY,NG,SY,MT
428	1	Rho GTPase activating protein 1	RHG01	gi 4757766	Q07960	50461	5.9	4	108	GTPases	PL
429	2	UDP-glucose pyrophosphorylase 2	UGP2	gi 62702281	Q53QE9	49362	8.8 5 7	6 12	173	metabolism	EN,ME
430	2	ENC-1AS aka Beta-hexosaminidase subunit		gil 10020780		39540	ວ./ ຄຸດ	ıð o	408 110	multifunctional	
431	1	beta	nu	yijuozz14010		30319	0.0	3	119	mununcuonal	LT
432 433	3	ieucine aminopeptidase 3 tubulin, beta polypeptide	LAP3 TURR	gij37588925 gil57209812	P28838	54754 48135	0.8 ⊿7	17	330 161	proteolysis	MEPLSY
434	1	NESH protein	ABI3	gi 7705981	Q9P2A4	39293	5.0	5	221	unclassified	unknown
435	1	cytosolic non-specific dipeptidase	CNDP2	gi 119586960	Q96KP4	19432	6.1	2	109	proteolysis	CY

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen- bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
437	3	glutamate Dehydrogenase-Apo Form	GLUD1	gi 20151189	P00367	56315	6.7	10	276	unclassified	ER,ME,PL,MT
439	3	adenylosuccinate lyase	PUR8	gi 3211984	P30566	48981	7.9	7	155	biosynthesis	CY,PL
441	4	Rho GTPase activating protein 1	RHG01	gi 4757766	Q07960	50461	5.9	14	416	GTPases	PL
442	3	UDP-glucose pyrophosphorylase 2 isoform b	UGP2	gi 48255968	Q16851	55813	7.7	12	321	metabolism	EN,ME
443	2	mitochondrial ATP synthase, H+ transporting F1	ATP5B	ail89574029	Q0QEN7	48083	5.0	17	517	transport	MT
	~	complex beta subunit			0011100	44005	0.0		450		<u></u>
444	2	Ena-VASP-like B6	EVL	gi 33150556	Q90108	44905	8.9	4	158	cytoskeleton	CY
445	3	Ena-VASP-like protein	EVL	gi 0503200		44696	8.9	19	323	cytoskeleton	CY CY
440	4	Ena-VASP-like protein	EVL EVI	ail25090276		40352	9.0 8 Q	16	303	cytoskeleton	CY
448	2	lymphocyte-specific protein 1	LSP1	gi 12804709	P33241	37427	4.7	15	550	Immunity	PL
449	3	UPF0550 protein C7orf28	C7orf28B	gi 37674289	O95766	56286	6.1	5	124	unknown	ME
450	1	UPF0550 protein C7orf28	C7orf28B	gi 37674289	O95766	56286	6.1	7	209	unknown	ME
451	1	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 3 regulator 1	SLC9A3R1	gi 4759140	O14745	39130	5.6	2	76	scaffolding	ME,EX,PL
453	1	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, alpha	PI42A	gi 6857820	P48426	46424	6.5	9	221	metabolism	NG,PL
454	3	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, alpha	PI42A	gi 6857820	P48426	46424	6.5	2	184	metabolism	NG,PL
455	3	docking protein 2	DOK2	gi 41406050	O60496	45750	5.8	6	262	unknown	unknown
456	5	testin isoform 1	TES	gi 7661666	Q9UGI8	49789	8.0	18	578	unclassified	unknown
457	5	II, alpha	PI42A	gi 6857820	P48426	46424	6.5	16	554 722	metabolism	NG,PL
400 450	4	protein disulfide isomerase-related protein 5		gi[1710246 gi[1710248	Q15064 015084	46512	5.0	12	733 515	chaperone	
460	2	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 3 regulator 1	SLC9A3R1	gi 4759140	Q10004	39130	5.6	13	525	scaffolding	ME,EX,PL
461	2	glutathione synthetase	GSHB	gi 4504169	P48637	52523	5.7	5	274	redox	PL
462	2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	EEF1A1	gi 48734966	Q6IPN6	50433	9.1	8	182	biosynthesis	ER,LY,EN,ME,EX,PL
463	3	bleomycin hydrolase	BLMH	gi 7245509	Q13867	52869	6.0	12	264	hydrolase	CY,PL
464	3	ARP3 actin-related protein 3 homolog	ACTR3	gi 5031573	P61158	47797	5.6	19	715	trafficking	EN,ER,ME
465	4	ARP3 actin-related protein 3 homolog	ACTR3	gi 5031573	P61158	47797	5.6	22	729	trafficking	EN,ER,ME
466	1	sorting nexin 6	SNX6	gi 119586321	Q9UNH/	49690	6.7 7 F	11	106	tranport	
467	2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDI2	gi 119606836	P50395	48680	7.5 7.7	13	384	G I Pases	ME,EX,PL,MT
400	2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDI2	dil119606836	P50395	48680	7.5	16	290 676	GTPases	
470	1	tumor susceptibility gene 101	TS101	gi 110000000 gi 5454140	Q99816	44088	6.1	3	109	trafficking	EX
471	4	c-src tyrosine kinase	CSK	ail4758078	P41240	51242	6.6	15	482	signal trans.	CY.PL
472	1	hypothetical protein LOC79624	C6orf211	gi 13375746	Q9H993	51539	5.5	3	66	unclassified	unknown
473	5	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 3 regulator 1	SLC9A3R1	gi 4759140	O14745	39130	5.6	11	391	scaffolding	ME,EX,PL
474	1	LPXN protein	LPXN	gi 49168546	Q6FI07	44619	5.6	4	208	unclassified	unknown
475	3	c-src tyrosine kinase	CSK	gi 4758078	P41240	51242	6.6	19	647	signal trans.	CY,PL
476	2	gamma-enolase	ENO2	gi 182118	P09104	44568	4.9	6	294	glycolysis	ME,PL,SY
4//	2	flotillin 1 opologo 1 verient	FLOT1	gi 5031699	075955 D06722	47554	7.1	12	296	membrane	
470	2	enclase 1 variant	ENOA	gil02890593 gil62896593	P06733	47453	7.0	15	409 226	metabolism	
480	1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	gi 67464043	P04406	36483	8.6	8	507	metabolism	LY,ME,NG,EX,PL,SY,MT
482	1	septin 7	SEPT7	gi 62088934	Q59EY4	44084	7.7	3	139	unclassified	ME, PL, SY
483	3	enolase 1 variant	ENOA	gi 31873302	P06733	47405	7.6	8	386	metabolism	ME,EX,SY,MT
484	1	septin 7	SEPT7	gi 62088934	Q59EY4	44084	7.7	9	437	unclassified	ME,PL,SY
485	1	ACTB protein	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	13	495	cytoskeleton	ER,ME,EX,PL,SY
486	4	flotillin 1	FLOT1	gi 5031699	075955	47554	7.1	25	704	membrane	LY,ME,EX
487	3	enolase 1 variant	ENOA	gi 62896593	P06733	47453	7.0	17	597	metabolism	ME,EX,SY,MT
489	1	Chromosome 20 open reading frame 3 (BSCV)	C20003	GI/9836652		4/88/	5.8 7 1	4	145	unclassified	ME
490	1	tryptophanyl-tRNA synthetase	SYWC	gi 33879098 gi 40889612	P23381	49731	6.1	2	66	metabolism	MEPI
492	3	enolase 1 variant	ENOA	gi 62896593	P06733	47453	7.0	15	458	metabolism	ME.EX.SY.MT
495	2	tapasin isoform 3 precursor	TPSN	gi 27436897	O15533	44145	6.4	6	238	immunity	ER,ME
496	6	enolase 1 variant eukaryotic translation elongation factor 1	ENOA	gi 62896593	P06733	47453	7.0	19	755	metabolism	ME,EX,SY,MT
497 498	3	gamma, isoform CRA_b	EEF1G Nbla10058	gi 119594430 gi 76879893	P26641	44869	6.1 5 9	5 10	154 149	biosynthesis	
499	1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member	DNAJA1	gi 119578931	P31689	42864	7.5	2	68	chaperone	ER,ME
500	2	1, isotorm CRA_d ACTB protein	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	11	498	cytoskeleton	ER,ME,EX,PL,SY
501	1	thioredoxin domain-containing protein 4 precursor	TXND4	gi 37183214	Q9BS26	47297	5.1	8	256	scaffolding	ER,ME,PL
502	2	thioredoxin domain-containing protein 4 precursor	TXND4	gi 37183214	Q9BS26	47297	5.1	9	535	scaffolding	ER,ME,PL
503	2	vasodilator-stimulated phosphoprotein	VASP	gi 119577769	P50552	39848	9.1	9	333	cytoskeleton	PL
504	3	annexin A7 isoform 2	ANXA7	gi 4809279	P20073	52991	5.5	7	212	exocytosis	EX,ME,PL
505	1	eukaryotic translation initiation factor 4A	IF4A1	gi 4503529	P60842	46353	5.3	5	97	biosynthesis	ME
507	1	nuch auaptor protein 1 fumarata bydrataca, mitachandrial		yijo453/54 ail10742975	P 10333	43000	0.1 00	/ 0	192 225	adapter	
508	1	ACTB protein	ACTR	gil 15/43075 gil 15/277503	P60709	40536	0.9 5.6	13	230 554	cytoskeleton	ER.MEEX PL SY
509	1	mitogen-activated protein kinase kinase 2	MP2K2	gi 13489054	P36507	44681	6.1	7	126	signal trans.	unknown
510	2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial, isoform CRA b	IDH2	gi 119622488	P48735	48071	8.3	12	166	redox	PL,MT
511	1	Obg-like ATPase 1	OLA1	gi 58761500	Q9NTK5	44943	7.6	9	301	hydrolases	EN.ME.PL
512	1	tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	gi 34452679	014773	34670	5.7	4	206	degradation	LY,ME,NG,PL,MT
513	1	S-adenosylhomocysteine hydrolase	SAHH	gi 178277	P23526	48254	6.0	14	189	hydrolase	ME

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen- bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
514	1	proteasome 26S subunit, ATPase, 5	nd	gi 62087652	Q59GS3	38907	6.1	7	209	unclassified	CY,NU
516	1	ACTB protein	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	10	485	cytoskeleton	ER,ME,EX,PL,SY
517	4	Tu translation elongation factor, mitochondrial	TUFM	gi 119572383	P49411	37775	6.1	5	253	biosynthesis	LY,ME,PL,MT
518	1	ACTB protein actin related protein 2 isoform b	ACTR2	gi 15277503 gi 5031571	P60709 P61160	40536	5.6 6.3	8 6	393 200	trafficking	ER,ME,EX,PL,ST
522	3	ACTB protein	ACTB	ail15277503	P60709	40536	5.6	12	511	cvtoskeleton	ER.ME.EX.PL.SY
022	Ũ	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase,	A C I D	9.1.02.1.000			0.0		0	eyteenteleten	2. (,2,2.) (,. 2,0.)
523	3	phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase, isoform	PUR6	gi 126030593	P22234	47650	6.7	18	514	multifunctional	EN,SY
504	~	CRA_b	ACTD	-:::45077500	D00700	40500	F C		500		
524	2	ACTB protein	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.0 5.6	14	526	cytoskeleton	
526	2	ACTB protein	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	17	552	cytoskeleton	ER.ME.EX.PL.SY
527	2	ACTB protein	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	19	615	cytoskeleton	ER,ME,EX,PL,SY
530	2	ACTB protein	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	12	357	cytoskeleton	ER,ME,EX,PL,SY
531	3	GNAS complex locus isoform f	GNAS2	gi 117938762	P63092	46179	5.6	12	439	multifunctional	EX
533	1	MHC class I antigen	HLA-A	gi 64976582	Q4W6C4	31862	5.9	8	414	Immunity	ME
534 535	1	MHC class Lantigen		gi 106879085	Q1EPW2	31527	5.7 6.1	9	230	Immunity	
536	1	protein tyrosine phosphatase 1b	PTPN1	gi 124317293 gi 114793621	P18031	38453	6.3	11	224	hydrolases	ME.ER
537	2	phosphoglycerate kinase 1	PGK1	gi 48145549	P00558	44973	8.3	15	623	metabolism	ME,EX,SY,MT
539	3	phosphoglycerate kinase 1	PGK1	gi 48145549	P00558	44973	8.3	7	398	metabolism	ME,EX,SY,MT
540	2	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble, isoform CRA_b	IDH1	gi 119590846	O75874	32765	8.4	2	77	redox	ME,EX,PL
541	1	GDP-mannose pyrophosphorylase A	GMPPA	gi 31881779	Q96IJ6	46604	6.7	9	132	biosythesis	unknown
542	1	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	CNP	gi 180687	P09543	45469	8.7	12	240	hydrolase	ME,NG
543 544	1	Iaminin-binding protein		gi 34234 gi 73354293	P08865	31888	4.8 5.7	4	250	cell adhesion	ME,ER
544 545	2	MHC class Lantigen	HLA-A	gi[12598440	P01892	31963	5.7 6.0	12	341	immunity	GO EN
546	1	XRP2 protein	XRP2	gi 5902060	O75695	40472	4.9	8	217	signal trans.	ME
547	2	MHC class I antigen	HLA-A	gi 113196585	Q0GC70	31863	5.4	5	210	Immunity	ME
548	2	serpin peptidase inhibitor, clade B, member 1	SERPINB1	gi 62898301	P30740	42857	5.9	8	485	inhibitor	CY
550 551	4	adenosine deaminase DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member	ADA DNAJB11	gi 1197210 gi 7706495	P00813 Q9UBS4	35335 40774	5.6 5.8	12 9	493 311	hydrolase chaperone	CY,LY ER
550		11 precursor	AOTD	311.100.100	D00700	40500	5.0	0	000	chaperene	
552	2	ACTB protein	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	3	209	cytoskeleton	ER,ME,EX,PL,SY
554	1	sentin 2	SEPT2	ail119591666	Q15019	18259	6.2	6	210	unclassified	ME EX SY
555	1	aldolase A	ALDOA	gi 4557305	P04075	39851	8.3	11	291	metabolism	EN,ME
557	2	aldolase A	ALDOA	gi 4557305	P04075	39851	8.3	14	386	metabolism	EN,ME
558	2	septin-9 delta	SEPT9	gi 14530107	Q9UHD8	38690	7.1	6	204	unclassified	ME
559	2	aldolase A	ALDOA	gi 4557305	P04075	39851	8.3	9	150	metabolism	EN,ME
560	1	aldolase A	ALDOA	gi 4557305	P04075	39851	8.3	16	401	metabolism	EN,ME
561	2	tropomodulin 3		gi 6934244	Q9NYL9 D04075	39727	5.1 0.2	5	188	cytoskeleton	
563	3	fructose-bisphosphate aldolase C	ALDOC	gil4885063	P09972	39830	6.4	5	156	metabolism	ME SY MT
564	3	actin related protein 2 isoform b	ACTR2	gi 5031571	P61160	45017	6.3	18	611	trafficking	EN,ER,ME
565	3	fructose-bisphosphate aldolase C	ALDOC	gi 4885063	P09972	39830	6.4	12	458	metabolism	ME,SY,MT
566	1	septin-9 delta	SEPT9	gi 14530107	Q9UHD8	38690	7.1	4	96	unclassified	ME
567	2	actin related protein 2/3 complex subunit 1B	ARPC1B	gi 5031601	O15143	41722	8.7	4	186	trafficking	ME,PL
568	3	gelsolin-like capping protein isoform 9	CAPG	gi 55597035	P40121	38779	5.9	5	229	cytoskeleton	ME,CY,NU
509 570	4	actin alpha cardiac muscle		gij20900531 gij119612724	P20402 P68032	30498	0.0 1 Q	2	121	signal trans.	
571	2	actin related protein 2 isoform b	ACTR2	ail5031571	P61160	45017	6.3	21	609	trafficking	EN.ER.ME
572	3	gelsolin-like capping protein isoform 9	CAPG	gi 55597035	P40121	38779	5.9	9	368	cytoskeleton	ME,CY,NU
573	1	ACTB protein	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	7	403	cytoskeleton	ER,ME,EX,PL,SY
574	1	twinfilin-like protein	TWF2	gi 6005846	Q6IBS0	39751	6.4	15	614	cytoskeleton	CY
575	2	aspartate aminotransterase	GIG18	gi 46981967	Q21084	46519	6.3	9	129	biosynthesis	CY
576	3 1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit	PSMD13	gi 0005848 gi 114635315	Q9UNM6	43176	6.4 5.5	5	324 172	proteasome	ME
578	5	twinfilin-like protein	TWF2	ail6005846	Q6IBS0	39751	6.4	11	628	cvtoskeleton	CY
579	3	farnesyl pyrophosphate synthetase	FPPS	gi 90109287	P14324	40458	5.1	4	168	biosynthesis	CY
581	1	valosin-containing protein	VCP	gi 119390147	P08754	37644	5.6	10	311	signal trans.	ME,EX
582	4	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2, isoform	GNAI2	gi 119585457	B4E2X5	35425	5.2	12	673	GTPases	EX
584	2	GRA_C guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2, isoform	GNAI2	gi 119585458	B4E2X5	20295	5.5	6	314	GTPases	EX
585	3	guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit	GNAI3	gi 119390147	P08754	37644	5.6	11	445	transport	ME,EX
586	3	gelsolin-like capping protein	CAPG	gi 63252913	P40121	38760	5.8	9	334	cytoskeleton	ME,CY,NU
587	1	alcohol dehydrogenase class-3	ADHX	gi 110591508	P11766	40407	7.9	2	73	redox protein	PL,CY
588	1	guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	GNAI3	gi 119390147	P08754	37644	5.6	9	388	transport	ME,EX
589	1	glutaredoxin 3	GLRX3	gi 95113651	O76003	37693	5.3	8	177	redox	CY
590	3	actin related protein 2/3 complex subunit 1B guanine nucleotide binding protein (G protein)	ARPC1B	gi 5031601	O15143	41722	8.7	9	513	trafficking	ME,PL
591	3	alpha inhibiting activity polypeptide 2, isoform CRA_c	GNAI2	gi 119585457	B4E2X5	35425	5	8	525	GTPases	EX
592	1	serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit B	PPP2R4	gi 93279884	Q15257	37539	6.6	8	165	signal trans.	NU
594	2	acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	THIC	gi 61680217	Q9BWD1	41789	6.5	6	449	biosynthesis	CY

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen- bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
596	2	aldose 1-epimerase (BLOCK25)	GALM	gi 20530221	Q96C23	24185	5.6	7	245	metabolism	CY
598 500	1	GIPC1 protein		gi 33872740	O14908 P61421	32792	5.9 5.2	5 4	99 138	protein binding	SY,CY
600	4	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta			DC0140	37045	5.2	- -	100	budralassa	
600	1	isoform	PPPICB	gilo4696354	P62140	37945	5.8	6	120	nydrolases	ME,PL
601	2	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform 1	PPP1CA	gi 4506003	P62136	38229	5.9	14	343	hydrolases	EX
602	1	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform 1	PPP1CA	gi 4506003	P62136	38229	5.9	7	127	hydrolases	EX
603	1	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform 1	PPP1CA	gi 4506003	P62136	38229	5.9	18	543	hydrolases	EX
604	1	annexin A1	ANXA1	gi 4502101	P04083	38918	6.6	9	453	trafficking	ME,MT
605	1	calcium binding protein 39	CAB39	gi 42543739	Q9Y376	39834	6.3	4	117	unclassified	EX
606 607	1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	gi 1584035 gi 31645	Q14847 P04406	30185 36202	6.1 8.3	11 16	303 552	adapter protein metabolism	LY,ME,NG,EX,PL,SY,MT
608	1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	gi 67464043	P04406	36483	8.6	12	508	metabolism	LY,ME,NG,EX,PL,SY,MT
609	1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	gi 67464043	P04406	36483	8.6	15	567	metabolism	LY,ME,NG,EX,PL,SY,MT
610	4	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	gi 31645	P04406	36202	8.3	16	667	metabolism	LY,ME,NG,EX,PL,SY,MT
611	3	F-actin capping protein alpha-1 subunit	CAPZA1	ail5453597	P52907	33073	5.5	10	709	actin binding	ER.EN.ME
612	1	carboxyl terminal LIM domain protein	LDB1	gi 1905874	Q14847	36604	6.8	6	185	cytoskeleton	ER,ME,PL,EN
615	2	annexin A1	ANXA1	gi 4502101	P04083	38918	6.6	16	668	trafficking	ME,MT
616	3	F-actin capping protein alpha-2 subunit	CAPZA2	gi 119603918	P47755	31898	6.5	7	398	cytoskeleton	ER,EN,ME,PL
617	4	isoform	PPP1CB	gi 54696354	P62140	37945	5.8	8	460	hydrolases	ME,PL
618	1	annexin A2	ANXA2	gi 119597993	P07355	32600	5.9	12	445	exocytosis	MT,EX,ME,secreted
620	1	actin related protein 2/3 complex subunit 1B	ARPC1B	gi 5031601	O15143	41722	8.7	10	343	trafficking	ME,PL
621	2	catalytic subunit alpha isoform	PP2AA	gi 122921196	P67775	34186	5.1	5	209	signal trans.	MT
622	2	calcium binding protein 39	CAB39	gi 7706481	Q9Y376	40015	6.4	16	378	unclassified	EX
623	1	F-actin capping protein alpha-1 subunit variant	CAPZA1	gi 62898013	P52907	33057	5.5	3	128	actin binding	ER,EN,ME
625	4	annexin A2	ANXA2	gi 56966699	P07355	38866	6.9	21	597	exocytosis	MT,EX,ME,secreted
626	3	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	gi 49259209	P07195	36801	5.9	11	448	redox	ME,EX,PL,SY,MT
627	1	isoform 1	PPP1CA	gi 4506003	P62136	38229	5.9	7	120	hydrolases	EX
628	3	annexin A2	ANXA2	gi 56966699	P07355	38866	6.9	11	232	exocytosis	MT,EX,ME,secreted
629	1	gamma-glutamyl hydrolase	GGH	gi 4503987	Q92820	36340	6.7	2	99	hydrolase	LY,ME,NG,PL
630 631	3	annexin A2	ANXA2	gi 1584035 ai 119597993	Q14847 P07355	30185 32600	6.1 5.9	10 21	266 759	exocytosis	ER,EN,ME,PL MT.EX.ME.secreted
632	1	axin interactor, dorsalization associated protein	AIDA	gi 52545806	Q96BJ3	34954	6.2	11	531	signal trans.	unknown
633	1	LIM and SH3 domain protein 1	LASP1	gi 5453710	Q14847	30097	6.6	5	121	adapter protein	ER,EN,ME,PL
634	1	GNB1 protein	GNB1	gi 91992949	Q1RMY8	37073	5.6	4	65	signal trans.	EN,ME,EX,PL,SY
635	2	related subfamily, beta member 2 isoform 2	KCAB2	gi 27436969	Q13303	39547	8.8	15	360	channel	CY
636	2	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	gi 49259209	P07195	36801	5.9	8	129	redox	ME,EX,PL,SY,MT
637 629	1	otubain 1 C protoin hota subunit	OTUB1	gi 109148508	Q96FW1	31493	4.9	5	175	hydrolases	
639	1	chromatin modifying protein 4B	CHM4B	ail28827795	Q9H444	24935	5.8 4.8	2	90	transport	ME.EX
640	1	COP9 complex subunit 4	CSN4	gi 5410300	Q9BT78	46454	5.6	4	115	signal trans.	CY,NU
642	2	cytosolic malate dehydrogenase	MDHC	gi 5174539	P40925	36631	6.9	9	223	metabolism	ME,EX,PL,SY,MT
643 644	1	L-lactate dehydrogenase		gi 62897717 gi 13786840	P00338	36951	7.6 8.5	8	253	metabolism	ME,EX,SY ME EX SV
645	2	L-lactate dehydrogenase	LDHA	gi 13786849	P00338	36819	8.5	19	554	metabolism	ME,EX,SY
646	2	G protein beta subunit	GNB2	gi 306785	P62879	38061	5.8	10	298	signal trans.	ME,MT
647	1	calponin 2	CNN2	gi 119589975	Q99439	31829	7.6	9	169	cytoskeleton	CY
648 649	1	esterase D/formylgiutathione hydrolase	ESTD GNB2	gi 55957280 gi 306785	P10768 P62879	25695	6.4 5.8	2	131	Hydrolase signal trans	
650	1	MHC class II antigen DR alpha chain	HLA-DRA	gi 3212400	P01903	20548	4.9	3	113	Immunity	ME
651	2	CNN2 protein	CNN2	gi 49456577	Q6FHE4	34086	7.0	18	480	unknown	unknown
652	1	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha	NAPA	gi 47933379	P54920	33667	5.2	13	368	trafficking	ME,NG,PL
653 654	1	glyoxalase domain containing 4	GLOD4	gi 16198390	Q9HC38	33536	5.4	6	150	unclassified	
656	3	esterase D/formvlalutathione hvdrolase	ESTD	ail55957281	P10768	28607	6.3	7	233	Hvdrolase	ME
657	1	voltage-dependent anion channel 2	VDAC2	gi 55664661	P45880	30842	8.0	2	72	channel	SY,MT
658	2	voltage-dependent anion channel 1	VDAC1	gi 4507879	P21796	30868	8.6	8	357	channel	R,LY,ME,NG,EX,PL,SY,M
660 660	1 2	annexin A5	ANXA5 ANXA5	gi 809185	P08758	35840 35840	4.9 4.9	∠ 18	145 624	trafficking	MT.EX.ME FR
662	1	F-actin capping protein beta subunit	CAPZB	gi 4826659	P47756	30952	5.7	4	100	actin binding	ER,EN,ME
663	1	F-actin capping protein beta subunit	CAPZB	gi 4826659	P47756	30952	5.7	7	333	actin binding	ER,EN,ME
664	1	beta polypeptide 2-like 1, isoform CRA_d	GNB2L1	gi 119574080	P63244	30942	7.0	6	275	signal trans.	ER
665	1	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1	MAPRE1	gi 6912494	Q15691	30151	5.0	3	199	cytoskeleton	ME,PL
000 668	1 2	annexin A4	OBR1 ANXA4	gijoo360348 gij1703319	P16152 P09525	30510 36088	8.6 5.8	8 8	247 398	reaox protein signal trans	ME MT.EX.ME SY
669	2	MHC class II antigen	HLA-DRB1	gi 77019293	Q3LAB6	21042	6.1	5	270	Immunity	ME
670	3	nucleoside phosphorylase	PNPH	gi 157168362	P00491	32325	6.5	13	481	cell proliferation	CY,PL

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen- bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
671	2	actin related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2	gi 5031599	O15144	34426	6.8	11	528	trafficking	EN,ME,PL,ER
672	1	tropomyosin 4	TPM4	gi 4507651	P67936	28619	4.7	18	428	unclassified	ME
673	1	actin related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2	gi 7959903	015144	27290	7.8	5	148	cytoskeleton	EN,ME,PL
674	2	actin related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2	gi 5031599	015144 D06752	34426	6.8	24	775	trafficking	EN,ME,PL,ER
675	5 1	tropomyosin 3 isoform 2 ducosamine-6-phosphate deaminase 1		gi 24119203 gi 13027378	PU6753 P46026	29243	4.8 6.4	21	048 257	bydrolases	unknown
678	2	actin related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2	gil5031599	C15144	34426	6.8	12	370	trafficking	EN ME PLER
682	1	cathepsin D preproprotein	CATD	gi 4503143	P07339	45037	6.1	6	212	hydrolases	LY,ME,NG,EX,MT
683	1	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	DDAH2	gi 7524354	O95865	29911	5.7	4	80	hydrolase	unknown
684	5	nuclear chloride channel	CLIC1	gi 4588526	O00299	27249	5.0	15	575	channel	ME,EX,PL,MT
685	2	14-3-3 protein epsilon	YWHAE	gi 67464424	P62258	26912	4.9	7	295	adapter protein	CY,ME
686	2	similar to metallo-beta-lactamase superfamily protein	nd	gi 42822880	Q68D91	31493	6.4	6	344	hydrolase	unknown
687	3	proteasome subunit, alpha type, 1	PSMA1	gi 13543551	P25786	29864	6.2	9	283	hydrolases	ME
688	2	voltage-dependent anion channel 3	VDAC3	gi 25188179	Q9Y277	30981	8.9	5	152	channel	EN,ME,MT
689	1	proteasome activator complex subunit 2	PSIVIE2	gi1008915	Q90L46	27502	5.4	13	5/1	Immunity	ME
690	1	containing 2	HDHD2	gi 14149777	Q9H0R4	28746	5.8	5	113	hydrolases	
691	4	catnepsin B	CAIB	gi 24158605	P07858	29571	5.3	3	173	nydrolases	LY,ME,NG
692 694	2	nuclear chloride channel		ail4588526	Q90L40	22023	5.4	6	290	channel	
696	4	cathepsin D preproprotein	CATD	gi 4503143	P07339	45037	6.1	10	356	hvdrolases	LY.ME.NG.EX.MT
697	2	methylthioadenosine phosphorylase	MTAP	gi 847724	Q13126	31743	6.8	6	129	metabolism	CY
698	1	glutathione-S-transferase omega 1	GSTO1	gi 4758484	P78417	27833	6.2	5	137	metabolism	LY,ME,NG,EX,PL,SY,MT
699 701	1	proline synthetase co-transcribed homolog	PROSC	gi 6005842	O94903	30610	7.1	2	127	unclassified	
701	2	proteasome activator complex subunit 1 isoform	PSME1	gi 4501887 gi 5453990	Q06323	28876	5.8	, 12	297	Immunity	PL.MT
704	2	1 cathepsin D preproprotein	CATD	ail4503143	P07339	45037	6.1	8	181	hydrolases	LY.ME.NG.EX.MT
706	1	unnamed protein product	unnamed	gi 28071074	Q86TY5	13945	9.2	7	350	unknown	unknown
707	4	granzyme A	GZMA	gi 33357774	P12544	26328	9.1	6	324	Immunity	SL
708	3	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	gi 49119653	P63104	30100	4.7	17	546	adapter protein	CY,ME
709	4	cathepsin D preproprotein	CATD	gi 4503143	P07339	45037	6.1	8	250	hydrolases	LY,ME,NG,EX,MT
712	1	profilin-1	PROF1	gi 5822002	P07737	15085	8.5	11	403	actin binding	ME,EX,PL,MT
714	1	Pho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha		gi 4507949 gi 4757768	P31946 P52565	28179	4.8	0	270	CTPases	
710	4	granzyme A	GZMA	ail33357774	P12544	26328	9.1	7	372	Immunity	SL
718	5	galectin-3	LGALS3	gi 45786143	Q6NVH9	26238	8.6	7	352	Immunity	ME,NU
720	2	granzyme A	GZMA	gi 33357774	P12544	26328	9.1	9	448	Immunity	SL
721	2	endoplasmic reticulum protein 29 isoform 1	FRP29	ail5803013	P30040	29032	68	11	360	chaperone	FR ME PI
724	3	precursor granzyme A	GZMA	ail33357774	P12544	26328	Q 1	15	587	Immunity	<u> </u>
725	2	endoplasmic reticulum protein 29 isoform 1	ERP29	gi 5803013	P30040	29032	6.8	8	279	chaperone	ER,ME,PL
728	2	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	GDIR2	gi 56676393	P52566	23031	5.1	7	346	GTPases	CY
729	2	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7 (PSMA7)	PSMA7	gi 119595803	B2R515	18896	8.9	2	71	hydrolase	CY,Proteasom
730	2	PGAM1	PGAM1	gi 49456447	Q6FHK8	28931	6.7	11	393	metabolism	ME,EX,SY
734	2	proteasome subunit, alpha type, 6	PSMA6	gi 8394076	P60901	27838	6.3	5	206	hydrolase	CY,NU
736	1	TC4 protein	TC4	gi 114306762	Q0EFC9	12221	9.3	2	113	GTPases	
738	3 1	cathensin H		gij5453549 gij29708	P09668	27844	5.9 7 0	2	107	bydrolases	
739	2	peroxiredoxin 6	PRDX6	gij25766 gij4758638	P30041	25133	6.0	13	379	redox proteins	LY.ME.EX.PL.SY
740	1	triosephosphate isomerase (TIM) (Triose-	TPIS	gi 136066	P00939	26894	7.1	2	118	unclassified	ME,EX,SY,MT
741	2	programmed cell death protein 10	PDC10	gi 2465729	Q9BUL8	24642	8.6	7	122	apoptosis	unknown
742	2	triosephosphate isomerase 1	TPI1	gi 4507645	P60174	26938	6.5	13	542	unclassified	ME,EX,SY,MT
743	2	triosephosphate isomerase 1		gi 999892	P60174	26807	6.5	2	98	unclassified	ME,EX,SY,MI
747	2	cathensin S	CATS	ail30749675	P25774	24491	0.5 7.6	6	272	immunity	
750	1	proteasome subunit, beta type, 1	PSMB1	ail119567805	P20618	24634	8.7	5	169	hvdrolases	ME.CY
754	3	proteasome alpha 2 subunit variant	nd	gi 62897513	Q53GF5	25938	7.7	4	254	hydrolase	CY
755	1	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	gi 5107682	P62826	23307	9.0	6	220	transport	ME,EX
756	3	GRB2 protein	GRB2	gi 47496673	Q6ICN0	25246	6.1	10	299	adapter protein	SY
758 760	1 2	mps one binder kinase activator-like 1B proteasome subunit, beta type, 1	MOL1B PSMB1	gi 7023036 gi 119567805	Q9H8S9 P20618	25163 24634	6.7 8.7	3 10	161 135	unclassified hydrolases	unknown ME,CY
762	1	peroxiredoxin 1	PRDX1	gi 55959887	Q06830	19135	6.4	5	216	redox proteins	ER,LY,EN,ME,NG,PL,MT
764	1	DJ-1 protein	PARK7	gi 42543006	Q99497	20063	6.3	5	125	redox proteins	ME,PL,SY,MT
765	1	glutathione-S-transferase kappa 1	GSTK1	gi 7705704	Q9Y2Q3	25594	8.5	3	147	unclassified	PL,ME,MT,PE
766	3	glutathione S-transferase P1	GSTP1	gi 20664358	P09211	23430	5.1	5	303	metabolism	ER,ME,EX,PL
767	1	stromal cell-derived factor 2-like 1 precursor	SDF2L	gi 56243533	Q9HCN8	23812	6.5	3	105	unclassified	
760	1	peruxileuuxillis	CSPD1	gil 19209/83	F30048 P21201	21400	10.1 20	3 6	113 500	reaox	
770	∠ 1	glutathione S-transferase P1	GSTP1	ail2554831	P09211	23555	5.4	4	128	metabolism	ER.ME.EX.PL
771	1	PYD and CARD domain containing	ASC	gi 13325316	Q9ULZ3	15078	6.8	3	79	apoptosis	CY
772	2	peroxiredoxin 2	PRDX2	gi 1617118	P32119	18486	5.2	3	97	redox protein	ER,EN,ME,SY,MT
773	3	proteasome subunit, beta type, 8	PSMB8	gi 49456283	P28062	30019	5.5	6	279	immunity	PL,CY,NU
774	2	peroxiredoxin 1	PRDX1	gi 55959887	Q06830	19135	6.4	10	227	redox proteins	ER,LY,EN,ME,NG,PL,MT
775	1	proteasome subunit, beta type, 2	PSMB2	gi 119627813	P49721	20365	7.0	3	100	hydrolases	CY,NU
118	1	peroxiredoxin 2	PRDX2	gilaa22002	P32119	21909	5.4	9	319	reaox proteins	ER,EN,ME,SY,MT

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen- bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
779	1	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene	RASN	gi 4505451	P01111	21501	5.0	4	198	trafficking	GO,CY
780	3	proteasome subunit, beta type, 2	PSMB2	gi 119627813	P49721	20365	7.0	5	225	hydrolases	CY,NU
781	2	neuropolypeptide h3	PEBP1	gi 4261934	P30086	16068	8.8	2	149	inhibitor	ME,EX,SY
783 784	1	transgelin-2 adenine phosphoribosyltransferase isoform b	I AGLN2 APRT	gi 9956026 gi 71773201	P37802 P07741	24609 14605	8.4 6.7	4	79 91	unclassified biosynthesis	ME,MI ME EX PI
785	1	Rap1a	RAP1A	gi 1942609	P62834	19297	4.6	2	83	GTPases	EN,ME,MT
787	1	transgelin-2	TAGLN2	gi 9956026	P37802	24609	8.4	9	184	unclassified	ME,MT
790 793	3	Cdc42ACK GTPASE vacuolar protein sorting 29 isoform 2	VPS29	gi 20151145 gi 17402912	P60953 Q9UBQ0	21189 21085	6.2 6.5	4	307 96	cytoskeleton transport	ME FN
794	1	galectin-3	LGALS3	gi 45786143	Q6NVH9	26238	8.6	7	346	Immunity	ME,NU
795	1	SHUJUN-1	MRLC2	gi 32187319	O14950	17047	4.2	2	83	cytoskeleton	CY
797 798	1	ribosomal protein L11 actin related protein 2/3 complex subunit 4	Q5VVC9 ARPC4	gi 55665352 gi 5031595	Q5VVC9 P59998	15085 19768	9.0 8.5	5 7	143 355	trafficking	ribosom FR FX MF SY
799	1	actin related protein 2/3 complex subunit 3	ARPC3	gi 119618319	O15145	19108	8.7	4	120	trafficking	EN,ME,PL,ER
800	2	cyclophilin B	PPIB	gi 1310882	P23284	19705	9.2	15	447	chaperone	ER,ME
803	3	NME1-NME2 protein		gi 66392203	P22392	30346	9.1	6	328	multifunctional	CY,NU
004 805	2	actin related protein 2/3 complex subunit 5-like		gij33150554 gij23503040	Q96PA5	20700	0.U 8.5	4 3	130	unclassified	IVIE ME secreted
806	2	superoxide dismutase [Cu-Zn]	SODC	gi 36535	P00441	2602	7.9	2	195	redox proteins	ME,EX,MT
807	2	cofilin 1, isoform CRA_c	CFL1	gi 119594857	P23528	15877	8.5	5	205	cytoskeleton	ER,ME,EX,MT
808 809	2	cofilin 1, isoform CRA_c	CFL1 RPI 12	gi 119594857	P23528 P30050	15877 10457	8.5 a a	4	157	cytoskeleton	ER,ME,EX,MT
810	1	cofilin 1	CFL1	gi 5031635	P23528	18719	8.2	9	293	cytoskeleton	ER,ME,EX,MT
811	1	translocon-associated protein subunit delta	SSR4	gi 119593214	P51571	12311	6.4	3	91	trafficking	ME,ER
812 814	5	cofilin 1 destrip isoform a	CFL1	gi 5031635 gi 5802966	P23528	18719	8.2 8.1	8	251	cytoskeleton	ER,ME,EX,MT
816	2	CALM3 protein	CALM3	gi 13544110	Q9BRL5	16610	4.3	6	235	unknown	unknown
817	3	eukaryotic translation initiation factor 5A	IF5A1	gi 4503545	P63241	17049	5.1	3	213	biosynthesis	ME
818 820	2	glia maturation factor gamma	nd STMN1	gi 19697925	Q8TDZ6	17020	6.0 6.8	6 5	164 168	unclassified	unknown
821	2	galectin-3	LGALS3	gi 22030070 gi 28071074	Q86TY5	13945	9.2	5	183	Immunity	ME,NU
822	1	destrin isoform a	DEST	gi 5802966	P60981	18950	8.1	3	86	cytoskeleton	ME,EX,MT
823 824	3	NME1-NME2 protein		gi 66392203 gi 1633054	P22392 P62937	30346 18098	9.1 7.8	6 7	336 205	multifunctional	CY,NU ME EX MT
826	1	cyclophilin A	PPIA	gi 1633054	P62937	18098	7.8	7	203	chaperone	ME,EX,MT
828	1	cyclophilin A	PPIA	gi 1633054	P62937	18098	7.8	2	78	chaperone	ME,EX,MT
829 830	1	cyclophilin A myosin light polypeptide 6	PPIA MYL6	gi 1633054	P62937 P60660	18098 15923	7.8 4.6	3	76 273	chaperone	ME,EX,MT
831	2	chromosome 9 open reading frame 19	GAPR1	gi 11641247	Q9H4G4	17322	9.4	4	217	unknown	EX,GO
832	4	galectin-3	LGALS3	gi 28071074	Q86TY5	13945	9.2	7	258	Immunity	ME,NU
834 837	2	LIM domain-containing protein 2	LIMD2 CS010	gi 14585865	Q9BT23	14532	9.1 7.0	4	183	unclassified	unknown ME secreted
838	1	ubiquitin-conjugating enzyme E2 D4	UBE2D4	gi 119614587	Q9Y2X8	9633	7.7	1	115	degradation	unknown
839	1	ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	UBE2N	gi 83754516	P61088	17268	6.2	3	111	differentiation	ME,EX,MT
840 841	1	SH2 domain protein 1A	SH2D1A	gi 4506923	O60880	14349	8.7 5.6	4	196 255	signal trans.	CY
847	1	profilin-1	PROF1	gi 5822002	P07737	15085	5.0 8.5	8	373	actin binding	ME,EX,PL,MT
848	1	profilin-1	PROF1	gi 5822002	P07737	15085	8.5	10	505	actin binding	ME,EX,PL,MT
849 851	3 ⊿	profilin-1	PROF1	gi 5822002	P07737	15085	8.5 5.3	7 8	287	actin binding	ME,EX,PL,MT
852	1	histidine triad nucleotide binding protein 1	HINT1	gi 4885413	P49773	13907	6.4	3	193	Hydrolase	ME,PL,SY
856	1	FK506 binding protein 1A	FKBP1A	gi 5107718	P62942	11869	8.1	3	113	signal trans.	ME,SY,MT
857 862	3	cystatin B Macrophage Migration Inhibitory Eactor (Mif)	CYTB	gi 4503117 gi 5542151	P04080	11190	7.0 8.2	2	122	inhibitor	MEEYDISY
865	1	MHC class I antigen	HLA-A2	gi 229995	P61769	11592	6.5	7	232	Immunity	ME
867	1	BolA-like protein 2	BOLA2B	gi 46577124	Q9H3K6	10281	6.1	3	102	unknown	ME
868 871	1	leucocyte antigen CD97	CD97	gi 840771 gi 840771	P48960	83872	6.7 6.7	3	68 80	cell adhesion	ME, secreted
872	1	leucocyte antigen CD97	CD97	gi 840771	P48960	83872	6.7	5	236	cell adhesion	ME,secreted
873	1	leucocyte antigen CD97	CD97	gi 840771	P48960	83872	6.7	4	75	cell adhesion	ME, secreted
882	1	ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3 NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S	UBE2L3	gi 4507789	P68036	18021	8.7	4	168	degradation	
896	1	reductase)	NDUST	gij21411235	P28331	80415	5.8	4	112	transport	ER,ME,MI
897 902	2	tubulin tyrosine ligase-like family, member 12 histocompatibility (minor) HA-1	TTL12 HMHA1	gi 11056036 gi 2896796	Q14166 Q92619	75154	5.3 5.5	6 4	178 139	immunity	ME
908	1	leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 5	LRCH4	gi 119596926	075427	70861	6.9	20	307	protein binding	MT
913	1	ubiquitin associated and SH3 domain containing	UBASH3A	gi 119629967	P57075	51314	7.6	4	81	degradation	CY,NU
917	2	moesin	MSN	gi 4505257	P26038	67892	6.1	36	572	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
919	2	talin-1	TLN1	gi 81175200	Q9Y490	271766	5.8	37	618	cytoskeleton	EN,ME,PL
920 021	2	talin-1 hydroxysteroid (17-beta) debydrogenase 4		gi 81175200 gi 4504505	Q9Y490	271766	5.8 a n	45 3	803 109	cytoskeleton	EN,ME,PL
922	1	lymphocyte cytosolic protein 2	LCP2	gi 5031855	Q13094	60265	5.9	5	104	immunity	CY
929	1	echinoderm microtubule associated protein like 2 variant	EMAL2	gi 62089132	O95834	62949	5.7	4	98	cytoskeleton	CY
930	1	asparaginyl-tRNA synthetase	NARS	gi 119583453	O43776	63687	5.9	6	78	biosynthesis	ME
932 936	3 1	ocputi 2 glucosidase, alpha: neutral AB isoform CRA a	GANAR	gil 19591000	Q14697	10259 104930	0.2 5.9	4 14	1/0 127	hydrolases	ER.ME.PI
939	1	phosphofructokinase, liver	PFKL	gi 14286326	P17858	85720	7.0	6	84	glycolysis	unknown

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen- bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
940	1	HCLS1 protein	HCLS1	gi 48145705	Q6IBK9	54065	4.7	4	89	multifunctional	CY,MT
941	1	heat shock protein HSP 90-beta mitogen-activated protein kinase kinase 1	HS90B	gi 6807647	P08238	85189	5.0	19	288	chaperone	ME,EX,MT
943	1	interacting protein 1	DSMB4	gi 11496277	Q90HA4	25050	6.7 5.7	3	72	adapter protein	
944 945	2	peroxiredoxin 6	PRDX6	gi 4758638	P30041	25950 25133	6.0	8	415	redox proteins	LY,ME,EX,PL,SY
946	1	phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	gi 119570325	P18669	14942	9.3	2	69	metabolism	ME,EX,SY
947	1	gamma, isoform CRA_d	EEF1G	gi 119594432	P26641	48749	6.2	8	166	biosynthesis	ME
948 951	1 3	PHB EE-band domain family, member D2	PHB FFHD2	gi 49456373 gi 20149675	Q6FHP5	29871 26795	5.6	6 12	110 307	unclassified	unknown
952	2	cytoskeleton associated protein	TBCB	gi 736704	Q99426	21959	4.8	2	90	cytoskeleton	CY
953 054	2	MHC class II antigen	HLA-DRB1	gi 77019293	Q3LAB6	21042	6.1	5	287	Immunity	
954 955	4	aryl hydrocarbon receptor interacting protein	ACTB	gi 13277503 gi 118084558	A0SZW6	40530 38049	5.8	6	94 309	unknown	unknown
957	3	GRAP2 protein	GRAP2	gi 49456653	Q6FHA6	37971	6.6	6	133	unclassified	
958 959	1 1	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDI2 LSP1	gi 56410847 ai 10880979	Q55X88 P33241	46046 37397	5.9 4.7	4 14	213 608	Immunity	ME,EX,PL,MT PL
960	2	lymphocyte-specific protein 1	LSP1	gi 10880979	P33241	37397	4.7	12	602	Immunity	PL
961	2	lymphocyte-specific protein 1	LSP1	gi 12804709	P33241	37427	4.7	9	442	Immunity	PL
964	2	II, alpha	PI42A	gi 6857820	P48426	46424	6.5	7	361	metabolism	NG,PL
966 969	1	adenylyl cyclase-associated protein	CAP1	gi 5453595 gi 154146191	Q01518 P07900	51926 85006	8.1 ⊿ q	4 25	116 401	trafficking	PL,ME ME NG MT
971	1	UNC-112 related protein 2 long form	URP2	gi 41281905	Q86UX7	76475	4.5 6.5	12	206	cell adhesion	PL
973	1	septin-9 gamma	SEPT9	gi 14530105	Q9UHD8	64894	7.2	13	350	unclassified	ME
974 980	1 1	moesin actin alpha cardiac muscle	MSN ACTC1	gi 4505257 ail119612724	P26038 P68032	67892 30498	6.1 4.9	36	662 109	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT MF
981	2	aldose reductase	ALDR	gi 13096112	P15121	36099	6.6	3	99	metabolism	ME,EX,MT
984	2	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	gi 67464043	P04406	36483	8.6	16	621	metabolism	LY,ME,NG,EX,PL,SY,MT
985	1	serine/threonine phosphatase 1 gamma	PPP1CC	gi 5668560	Q9UPN1	34493	5.1	8	303	hydrolase	MT,SY
986	1	isoform 3	PPP1CA	gi 56790945	P62136	39405	6.2	7	258	hydrolases	EX
987 988	2 1	ACTB protein phosphoserine aminotransferase 1	ACTB SERC	gi 15277503 gi 16741698	P60709 Q9Y617	40536 40782	5.6 7.6	10 2	259 101	cytoskeleton biosynthesis	ER,ME,EX,PL,SY ME
989	2	guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-	GNA13	gi 24111250	Q14344	44364	8.1	15	320	signal trans.	ME
992	1	tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	gi 34452679	O14773	34670	5.7	3	226	protease	LY,ME,NG,PL,MT
993	1	N-myc downstream regulated gene 1, isoform CRA_b	NAP1L1	gi 119612571	P55209	39908	6.1	5	88	cell proliferation	ME,PL,NU
004	1	ACTB protein	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	6	169	cytoskeleton	ER,ME,EX,PL,SY
994 995	1	enolase 1 variant	ENOA	gi 62896593	P06733	47453	7.0	12	419	metabolism	ME,EX,SY,MT
998	1	Rho GTPase-activating protein 9	RHG09	gi 19584567	Q9BRR9	39593	6.7	11	206	GTPases	unknown
1000	1	(mouse), isoform CRA_b	DEF6	gi 119624227	B3KSI1	44508	6.6	4	76	unknown	unknown
1001 1002	1	Sec23B protein ezrin	SC23B EZR	gi 13529299 gi 46249758	Q15437 Q6NUR7	87377 69313	6.4 5.9	4 26	135 305	trafficking cvtoskeleton	EN CY
1003	1	talin-1	TLN1	gi 81175200	Q9Y490	271766	5.8	7	285	cytoskeleton	EN,ME,PL
1004	1	talin-1	TLN1	gi 81175200 gi 32187319	Q9Y490	271766	5.8	9	369 81	cytoskeleton	EN,ME,PL
1005	1	small GTP binding protein Rac2, isoform	RAC2	gi 119580555	B1AH80	21128	8.2	4	159	signal trans.	unknown
1007	1	peroxiredoxin 1	PRDX1	qi 55959888	Q06830	10727	8.8	2	80	redox proteins	ER,LY,EN,ME,NG,PL,MT
1008	1	triosephosphate isomerase (TIM) (Triose-	TPIS	ail136066	P00939	26894	7.1	3	165	unclassified	ME.EX.SY.MT
1009	2	proteasome subunit, alpha type, 5	PSMA5	ail54696300	P28066	26579	4.7	3	193	hydrolases	ME
1010	1	NECAP endocytosis associated 2	NECAP2	gi 119572169	Q9NVZ3	24856	7.7	2	183	transport	EN
1011	3	nuclear chloride channel	CLIC1	gi 4588526 gi 20149675	O00299	27249	5.0	7 12	268 376	channel	ME,EX,PL,MT
1012	2	farnesyl pyrophosphate synthetase	FPPS	gi 90109287	P14324	40458	5.2	3	127	biosynthesis	CY
1015	1	XRP2 protein	XRP2	gi 60416394	O75695	40471	5.0	3	149	biosynthesis	ME
1016	1	MHC class I antigen	HLA-A	gi 64976582	Q4W6C4	31862	5.9	9	351	Immunity	ME
1017	1	actin related protein 2	ACTR2	gij64976582 gij109103172	Q4006C4 P61160	31862	5.9 5.9	2	264 70	trafficking	
1019	1	actin related protein 2 isoform b	ACTR2	gi 5031571	P61160	45017	6.3	9	332	trafficking	EN,ER,ME
1020	1	MHC class I antigen	HLA-A	gi 12598440	P01892	31963	6.0	5	273	immunity	ME,EX
1021	1	phosphoglycerate kinase 1	PGK1	gi 119619008	P00558	28662	9.2	3	132	metabolism	ME,EX,SY,MT
1022	1	phosphoglycerate kinase 1 adenvlosuccinate synthetase	PGK1 PURA2	gi 119619008 gi 415849	P00558 P30520	28662	9.2 6.0	4 4	128 123	biosynthesis	ME,EX,SY,MT CY
1024	1	zeta-chain associated protein kinase 70kDa	ZAP70	gi 31455611	P43403	70796	7.8	4	154	signal trans.	CY
1027	1	ubiquitin specific peptidase 5 isoform 2	UBP5	gi 148727247	P45974	94104	5.0	3	78	degradation	LY,ME,NG
1029	4	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDI2	gi 6598323	P50395	51087	6.1	13	445	GTPases	ME,EX,PL,MT
1030	4	T-complex polypeptide 1		gi 57863257	P17987	60819	5.8	19	305	chaperone	ER,EN,ME,EX
1032	י 1	26S protease regulatory subunit 6A	PSMC3	gij 10721276 gi]338700	P17980	30121 45422	ວ.∠ 5.3	3 2	04 68	degradation	
1040	2	ACTB protein	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	8	407	cytoskeleton	ER,ME,EX,PL,SY
1044	1	annexin A6	ANXA6	gi 35218	P08133	76154	5.4	12	185	trafficking	MT,EX,ME,ER
1049	1	isoform a	RRAS2	gi 21361416	P62070	23613	5.7	4	137	GTPases	LY,ME,EX
1050	1	MHC class II antigen DR alpha chain	HLA-DRA	gi 3212400	P01903	20548	4.9	3	115	immunity	LY

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen- bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion	Subzelluläre Lokalisation
1051	1	tubulin alpha 6 variant	nd	gi 62897609	Q53GA7	50476	5.0	6	134	cytoskeleton	ME,PL
1052	2	actinin, alpha 4	ACTN4	gi 119577215	O43707	104555	5.2	16	277	cytoskeleton	ME,NU,CY
1053	1	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	PTN6	gi 82407989	P29350	60638	6.1	6	69	signal trans.	CY,NU
1054	1	phosphoglycerate kinase 1	PGK1	gi 48145549	P00558	44973	8.3	14	390	metabolism	ME,EX,SY,MT
1055	1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2, isoform CRA_d	GNAI2	gi 119585458	B4E2X5	20295	5.5	5	168	GTPases	EX
1056	1	aflatoxin aldehyde reductase AFAR	ARK72	gi 2736256	O43488	37024	6.2	3	157	redox	PL,GO
1057	1	annexin A6	ANXA6	gi 35218	P08133	76154	5.4	10	179	trafficking	MT,EX,ME,ER
1058	1	protein disulfide isomerase-associated 4	PDIA4	gi 4758304	P13667	73229	5.0	3	78	chaperone	ER,ME,PL
1059	2	formin-binding protein 1	FBP17	gi 119608323	Q96RU3	87380	5.9	2	92	adapter	SL, LY, CY
1060	1	protein disulfide isomerase-associated 4	PDIA4	gi 4758304	P13667	73229	5.0	3	79	chaperone	ER,ME,PL
1061	1	kinase/transmembrane domain fusion protein	STK4/SLC36AL	gi 28372404	Q86YK3	28640	4.4	2	68	unclassified	unknown
1062	1	opa-interacting protein OIP3	KPYM	gi 2815606	unknown	18244	9.6	2	66	metabolism	ME,EX,SY
1063	1	tubulin alpha 6 variant	nd	gi 62897609	Q53GA7	50476	5.0	8	251	cytoskeleton	ME,PL
1064	2	tubulin alpha 6 variant	nd	gi 62897609	Q53GA7	50476	5.0	7	165	cytoskeleton	ME,PL
1065	1	tubulin fragment	TUBB	gi 16198437	Q96B85	30625	4.8	6	99	cytoskeleton	CY
1066	1	moesin	MSN	gi 14625824	P26038	62004	7.6	14	220	cytoskeleton	EN,ME,EX,PL,MT
1067	1	vacuolar sorting protein 33A	VPS33A	gi 119618724	Q96AX1	56346	6.7	4	114	trafficking	EN,LY
1069	1	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	gi 5107682	P62826	23307	9.0	5	68	transport	ME,EX
1069	1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2	IQGAP2	gi 13959394	Q13576	181071	5.4	5	150	signal trans.	EN
1070	1	lin 7 homolog c	LIN7C	gi 6755973	Q9NUP9	21935	8.5	7	320	exocytosis	SY
1071	1	talin-1	TLN1	gi 81175200	Q9Y490	271766	5.8	20	398	cytoskeleton	EN,ME,PL
1072	1	histocompatibility (minor) HA-1	HMHA1	gi 40807045	Q92619	125785	5.8	4	188	GTPases	unknown
1073	1	histocompatibility (minor) HA-1, isoform CRA_c	HMHA1	gi 119589959	Q92619	108894	5.5	4	143	GTPases	unknown
1074	2	histocompatibility (minor) HA-1	HMHA1	gi 40807045	Q92619	125785	5.8	5	135	GTPases	unknown
1076	1	pyruvate kinase 3 isoform 2	PKM2	gi 67464392	P14618	60277	8.2	15	332	metabolism	ME,EX,SY
1077	1	talin-1	TLN1	gi 81175200	Q9Y490	271766	5.8	27	556	cytoskeleton	EN,ME,PL
1078	1	aldo-keto reductase family 1, member A1	AK1A1	gi 5174391	P14550	36892	6.3	10	213	metabolism	PL,SY
1079	1	actin, gamma 1 propeptide	ACTG1	gi 4501887	P63261	42108	5.3	10	257	cytoskeleton	ME,EX,PL,SY
1080	1	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1 variant	nd	gi 62897899	Q53FW2	35355	6.3	9	249	biosynthesis	unknown
1081	1	SH3-containing protein. Endophilin-B1	SH3GLB1	ail7705773	Q9Y371	41056	5.8	4	130	apoptosis	CY.GO.MT
1082	1	poly(rC) binding protein 1	PCBP1	qi 5453854	Q15365	38015	6.7	11	359	unclassified	ME,CY,NU
1083	2	MHC class II antigen DR52	HLA-DRB3	gi 6715261	P01913	27220	6.8	6	178	Immunity	ME
		•								-	

^a Anzahl der unabhängigen Identifiaktionen aus verschiedenen 2D Gelen









Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen- bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion
18	1	150 kDa oxygen-regulated protein	HYOU	gi 193785329	B3KXH0	110601	5.2	18	350	unknown
20	1	myosin 9	MYH9	gi 12667788	P35579	227646	5.5	18	466	EN,ME,EX,PL,MT
27	1	dipentidal pentidase IV (CD26)		gi 34532000 gi 27574040	P42704 P27487	159060	5.8 5.7	11 14	118 344	
30	1	dipeptidyl peptidase IV (CD26)	DPP4	gi 110590190	P27487	84797	5.7	13	185	ER,LY,EN,ME,EX
31	1	DNA damage-binding protein 1	DDB1	gi 2632123	Q16531	128086	5.1	11	90	CY,NU
33	1	dipeptidyl peptidase IV (CD26)	DPP4	gi 27574040	P27487	85008	5.7	15	209	ER,LY,EN,ME,EX
37	1	hexokinase-1	HK1	gi 188497750	P19367	102161	6.5	8	147	PL,MT
39 40	1	heat shock protein 90 kDa beta member 1	HSP90B1	ail15010550	P14625	90309	5.5 47	23	325	
44	1	100 kDa coactivator	SND1	gi 77404397	Q7KZF4	102618	6.7	32	400	ER,ME,PL
45	1	glucosidase II subunit alpha	GANAB	gi 38202257	Q14697	107263	5.7	7	94	ER,ME,PL
46	1	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase isoform 1	OGDH	gi 51873036	Q02218	117059	6.4	27	425	MT
47	1	giucosidase II subunit alpha	GANAB	gi 119594451 gi 119594451	Q14697 Q14697	104930	5.9 5.0	15 26	191 376	ER,ME,PL
49 50	1	glucosidase II subunit alpha	GANAB	gi 119594451	Q14697 Q14697	104930	5.9	20	352	ER.ME.PL
51	1	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	MTHFD1	gi 13699868	P11586	102152	6.8	8	91	EN,ME,PL,MT
53	1	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	MTHFD1	gi 13699868	P11586	102152	6.8	41	533	EN,ME,PL,MT
54	1	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	MTHFD1	gi 13699868	P11586	102152	6.8	16	318	EN,ME,PL,MT
56 57	1	eukaryotic translation elongation factor 2 eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2 EEF2	gi 4503483 gi 4503483	P13639 P13639	96246	6.4 6.4	13 28	341 598	ER,EN,ME,EX
58	1	eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	gi 4503483	P13639	96246	6.4	23	499	ER.EN.ME.EX
59	1	eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	gi 4503483	P13639	96246	6.4	13	129	ER,EN,ME,EX
62	1	myosin 9	MYH9	gi 12667788	P35579	227646	5.5	26	481	EN,ME,EX,PL,MT
63	2	myosin 9	MYH9	gi 12667788	P35579	227646	5.5	27	449	EN,ME,EX,PL,MT
64 68	1	neat snock protein HSP 90-alpha DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 1	HSP90AA1	gi 119602173 gi 4826686	P07900	57868 83340	4.9 6.8	7 25	169 401	ME,NG,MT
69	1	KLRAQ motif containing 1 isoform 3	KLRAQ1	gi 208431757	Q6ZMI0	83659	6.2	7	109	unknown
72	1	aconitate hydratase,	ACO2	gi 49168620	Q99798	86155	7.1	6	149	EX,SY,MT
73	1	aconitate hydratase,	ACO2	gi 49168620	Q99798	86155	7.1	18	447	EX,SY,MT
74	1	mitochondrial inner membrane protein	IMMT	gi 516764	Q16891	79830	5.7	18	463	ME,MT
75	1	mitochondrial inner membrane protein	IMMT	ail8131894	Q16891	68316	5.0 5.6	8	194	ME MT
77	1	ATP-dependent DNA helicase 2	XRCC5	gi 10863945	P13010	83222	5.6	33	426	NU
78	1	ATP-dependent DNA helicase 2	XRCC5	gi 10863945	P13010	83222	5.6	14	128	NU
79	1	ATP-dependent DNA helicase 2	XRCC5	gi 10863945	P13010	83222	5.6	26	356	NU
80 81	1	mitochondrial inner membrane protein		gi 516764 gi 516764	Q16891	79830	5.7 5.7	17 21	288	
82	1	SEC23B protein	SEC23B	ail13529299	Q15437	87377	6.4	11	287	EN
83	1	SEC23A protein	SEC23A	gi 22477159	Q15436	87022	6.6	20	401	ME,ER,PL
85	1	beta-Glucuronidase	GUSB	gi 2554776	P08236	70870	6.3	11	179	LY,EX
86	1	acyl-CoA synthetase	ACSL4	gi 4758332	O60488	75471	8.3	13	194	MT,PE,ME
87 88	1	ezrin	EZR E7P	gi 46249758	P15311 P15311	69313 60313	5.9 5.0	14 31	137	
90	1	heat shock 70kDa protein 5	GRP78	gi 16507237	P11021	72402	5.1	31	692	ER,ME,EX,PL,MT
91	1	beta-Glucuronidase	GUSB	gi 2554776	P08236	70870	6.3	18	301	LY,EX
92	1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit,	NDUFS1	ail21411235	P28331	80415	5.8	22	304	ER.ME.MT
04	4	mitochondrial	MCNI	~1110625804	D26028	66670	E 0	20	677	
94	1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit,		gij 1 19625604	P20030	00070	5.9	20	500	
95	1	mitochondrial	NDUF51	gij21411235	P28331	80415	5.8	30	582	ER,ME,MI
96	1	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	HSD17B4	gi 4504505	P51659	80092 72625	9.0 6.7	17	341	ER,ME,EN,PE
97 98	1	lysosomal alpha-ducosidase	GAA	ail114159823	P10253	106142	5.6	9	126	LY.NG.EX
99	1	septin 9	SEPT9	gi 14530105	Q9UHD8	64894	7.2	18	329	ME
100	1	lysosomal alpha-glucosidase	GAA	gi 114159823	P10253	106142	5.6	9	102	LY,NG,EX
101	1	moesin	MSN	gi 119625804	P26038	66678	5.9	26	581	EN,ME,EX,PL,MT
102	1	N-etnyimaleimide-sensitive factor	NSF MSN	gi 10257494 gi 119625804	P46459 P26038	83113	6.4 5 0	15 27	293 614	EN,ME,SY
103	1	NADH-ubiquinone oxidoreductase	unknown	ail194373941	B4DUC1	74393	5.6	19	286	unknown
104	1	protein disulfide isomerase	unknown	gi 158255378	A8K4K6	73157	5.0	13	163	unknown
105	1	stress-70 protein	HSPA9	gi 189054793	P38646	73890	6.0	15	310	ME,EX,PL,SY,MT
106	1	stress-70 protein	HSPA9	gi 189054793	P38646	73890	6.0	20	466	ME,EX,PL,SY,MT
107	1 1	heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 variant heat shock 70kDa protein 8 isoform 1	UNKNOWN HSPA8	gi 62896815 gi 5729877	Q53HF2 P11142	53580 71082	5.6 5.4	8 22	150 504	LY,ME,NG,EX,PL,S
109	1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese	XRCC6	gi 169145198	B1AHC7	64263	6.4	26	510	۲,MI unknown
110	1	KII antigen	unknown	ail189055002	B2RDN9	70026	63	4	101	unknown
111	1	trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	HADHA	gi 20127408	P40939	83688	9.2	23	434	PL,MT
113	1	alpha-mannosidase	MAN2B1	gi 1419374	O00754	111834	6.7	6	206	LY,ME
114	1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6 (Ku autoantigen, 70kDa)	XRCC6	gi 169145198	B1AHC7	64263	6.4	18	317	unknown
115	1	ubiquitin associated and SH3 domain-containing protein A	UBASH3A	gi 49640014	P57075	70943	6.6	17	188	CY,NU
116	1	hypothetical protein SBBI88	SAMHD1	gi 6942315	Q9Y3Z3	72839	6.6	9	141	unknown
117 110	1 1	phenyialanyi-trina synthetase beta chain alpha-I -iduronidase		gij7768938 ai 178413	Q9NSD9 P35475	00/5/ 72988	0.4 0.3	12 9	187 203	
120	1	alpha-mannosidase	MAN2B1	gi 1419374	O00754	111834	6.7	7	107	LY,ME
121	1	alkyldihydroxyacetone phosphate synthase precursor	AGPS	gi 4501993	O00116	73664	7.0	12	302	PE
122	1	L-plastin variant	unknown	gi 62898171	Q53FI1	70785	5.2	8	159	CY
125	1	nypotnetical protein SBBI88	SAMHD1	gi 6942315	Q9Y3Z3	72839	6.6 0.6	20	366	unknown
120	1	ieucine non repeat containing 47	LKKU41	yıjz4308207	QOINT G4	04004	0.0	1.1	114	IVIE

Table A3. Identifizierte Proteine Granzym B-reicher Vesikel (Fraktion 6) aus Lymphozyten

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen- bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion
128	1	replication protein A1, 70kDa	RPA1	gi 4506583	P27694	68723	6.9	18	248	NU
130	2	replication protein A1, 70kDa	RPA1	gi 4506583	P27694	68723	6.9	17	363	NU
131	1	unnamed protein product	unknown	gi 194382854	B4DJX1	63057	5.5	14	222	
132	1	transketolase		gij30009 i gil22202629	P29401 095831	00020 66530	7.9 Q ()	10	400	
136	1	perforin-1	PRF1	ail35386	P14222	62495	8.1	4	67	LG
137	1	succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	SDHA	gi 156416003	P31040	73672	7.1	23	446	ER,MT
138	2	succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	SDHA	gi 156416003	P31040	73672	7.1	28	533	ER,MT
142	1	galactosidase, beta 1	GLB1	gi 119584846	P16278	40868	8.8	5	93	LY,ME,EX
143	1	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	PTPN6	gi 82407989	P29350	60638	6.1	7	128	CY
144	1	galactosidase, beta 1	GLB1	gi 119584846	P16278	40868	8.8	8	148	LY,ME,EX
145	1	nab-dependent malic enzyme, mitochondital	GL B1	ail119584846	P23300 P16278	02003 40868	0.4 8.8	4	83	
148	1	T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3	gil671527	P49368	60862	6.2	10	203	CY
150	1	acyl-Coenzyme A dehydrogenase	ACADVL	gi 119610656	B3KPA6	62941	6.8	9	158	unknown
151	1	acyl-Coenzyme A dehydrogenase	ACADVL	gi 119610656	B3KPA6	62941	6.8	19	374	unknown
153	1	T-complex protein 1 subunit zeta	CCT6A	gi 119628379	P40227	39434	6.7	11	300	ME,EX,PL
154	1	ezrin	EZR	gi 31283	P15311	69470	5.9	13	223	ME,EX,MT
155	1	electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	ETFDH	gi 31874555	Q16134	65502	6.9	11	380	MT
157	1	ERO1-like [Homo sapiens]	GUSB FRO1I	gij2554776 gij7657069	P08236 096HE7	70870	6.3 5.5	8 15	230	
158	1	T-complex protein 1 subunit alpha	CCT1	gil36796	P17987	60869	6.0	11	159	FR EN ME EX
159	1	DnaJ homolog subfamily C member 11	DNAJC11	gi 37732147	Q9NVH1	59138	7.2	7	88	MT
160	1	EH-domain containing 1, isoform CRA_a	EHD1	gi 119594723	Q9H4M9	61945	6.3	6	69	ER,LY,EN,EX,PL
161	1	heat shock 60kD protein 1 variant 1	HSPD1	gi 189502784	B3GQS7	60813	5.8	15	310	unknown
163	1	EH-domain containing 1, isoform CRA_a	EHD1	gi 2529707	Q9H4M9	60722	6.5	22	454	ER,LY,EN,EX,PL
164	1	heat shock 60kD protein 1 variant 1	HSPD1	gi 189502784	B3GQS7	60813	5.8	22	380	unknown
165	1	catelase	CAT	gij29029550 gij4557014	Q9NZK5 P04040	59160	7.0 6.9	9 18	90 417	FRIVEN ME
167	1	pyruvate kinase	PKM2	ail67464392	P14618	60277	8.2	14	188	ME.EX.SY
168	1	protein disulfide-isomerase	P4HB	gi 159162689	P07237	13363	5.9	7	454	ER,ME,EX,PL,MT
169	1	catalase	CAT	gi 4557014	P04040	59947	6.9	11	260	ER,LY,EN,ME
170	1	cat eye syndrome critical region protein 1	CECR1	gi 29029550	Q9NZK5	59180	7.8	15	280	secreted
171	2	pyruvate kinase	PKM2	gi 67464392	P14618	60277	8.2	17	339	ME,EX,SY
172	1	cat eye syndrome critical region protein 1	CECR1	gi 29029550	Q9NZK5	59180 60277	7.8 0.2	10	221	Secreted
175	1	coronin, actin binding protein, 1A	CORO1A	ail5902134	P31146	51678	6.3	15	203	LY.PL
176	1	cat eye syndrome critical region protein 1	CECR1	gi 7650202	Q9NZK5	59199	8.1	10	192	secreted
177	1	methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	MCCC2	gi 11545863	Q9HCC0	61808	7.6	22	290	MT
178	1	vimentin	VIM	gi 47115317	P08670	53604	5.1	34	770	ME ER,LY,ME,NG,EX,P
180	1	protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	gi 860986	P30101	57043	6.1	12	337	L
181 182	1 1	cat eye syndrome critical region protein 1 cat eye syndrome critical region protein 1	CECR1 CECR1	gi 29029550 gi 29029550	Q9NZK5 Q9NZK5	59180 59180	7.8 7.8	10 12	250 239	secreted secreted
183	1	protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	gi 860986	P30101	57043	6.1	24	439	ER,LY,ME,NG,EX,P
184	1	cat eye syndrome critical region protein 1	CECR1	gi 29029550	Q9NZK5	59180	7.8	9	232	L secreted
185	1	protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	gi 860986	P30101	57043	6.1	12	209	ER,LY,ME,NG,EX,P
186	1	chromosome 22 open reading frame 28	C22orf28	gi 12652799	Q9Y3I0	55722	6.8	18	260	EN,ME
188	1	OXCT protein	OXCT	gi 48146215	Q6IAV5	56612	7.1	6	128	unknown
189	1	PRP19/PSO4 pre-mRNA processing factor 19 homolog	PRPF19	gi 7657381	Q9UMS4	55603	6.1	13	253	NU
190	1	dinyarolipoyi denyarogenase, mitochondriai		gi 83753870 gi 18088710	P09622 P07437	50656	6.5 4 8	21	485	
192	1	lysosomal Pro-X carboxypeptidase	PRCP	ail189066514	P42785	56263	6.8	6	101	LY.ME.NG
194	1	sorting and assembly machinery component 50 homolog	SAMM50	gi 7022134	Q9Y512	52270	6.6	23	350	ME,EX,MT
195	1	septin 6	SEPTIN6	gi 21952252	Q8NFH9	63617	8.2	9	199	ME
196	1	tubulin alpha 6 variant	unknown	gi 62897609	Q53GA7	50476	5.0	5	107	unknown
197	1	ezrin	EZR	gi 31283	P15311	69470	5.9	10	106	ME,EX,MT
198	1	tubulin alpha	TUBA1B	gi 340021 ail13038355	P68363 P21281	50804	4.9 5.4	16	524 205	
201	1	V-type proton ATPase subunit B2	ATP6V1B2	gi 155500000 gi 522193	P21281	56792	5.6	22	479	LY.ME.NG.SY
204	1	beta-hexosaminidase subunit beta	HEXB	gi 30749651	P07686	58480	6.3	8	230	LY,ME,NG
205	1	beta-hexosaminidase subunit beta	HEXB	gi 38492599	P07686	59220	6.4	11	193	LY,ME,NG
206	1	dipeptidyl peptidase 2	DPP2	gi 6465985	Q9UHL4	54737	5.9	9	185	ME,LY,NG
207	1	beta-hexosaminidase subunit beta	HEXB	gi 109157873	P07686	57969	6.4	11	232	LY,ME,NG
208 200	1	ATE Synthase Subunit Alpha, heta-bevosaminidase subunit beta	ATPSA1 HEYR	gij34782901 gij30740654	F23/05	400/9 58/20	9.1 6 3	10	400 235	
210	1	glutamate dehydrogenase 1. mitochondrial	GLUD1	gi 20151189	P00367	56315	6.7	11	200 304	ER,ME.PL.MT
211	1	glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	GLUD1	gi 20151189	P00367	56315	6.7	16	326	ER,ME,PL,MT
212	1	septin 6	SEPT6	gi 1469179	Q14141	48911	6.4	19	340	unknown
213	1	ATP synthase subunit alpha,	ATP5A1	gi 15030240	P25705	59886	9.1	19	500	ER,LY,NG,SY,MT
215	1	glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	GLUD1	gi 20151189	P00367	56315	6.7	31	641	ER,ME,PL,MT
216	1	A I P Synthase Subunit beta	AIP5B	gij89574029	QUQEN7	48083	5.0 5.5	13 7	487 249	
217 218	1	ATP synthase subunit alpha		gij4757810 gij4757810	P02495 P25705	49220 59828	0.0 0.2	26	∠48 503	
219	1	ATP synthase subunit beta	ATP5B	gi 89574029	Q0QEN7	48083	5.0	21	688	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,
220	1	beta-hexosaminidase subunit beta	HEXB	gi 109157873	P07686	57969	6.4	13	199	LY,ME,NG
221	1	ATP synthase subunit alpha,	ATP5A1	gi 4757810	P25705	59828	9.2	19	445	ER,LY,NG,SY,MT
223	1	beta-hexosaminidase subunit beta	HEXB	gi 30749651	P07686	58480	6.3	10	201	LY,ME,NG

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen- bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion
224	1	beta-hexosaminidase subunit beta	HEXB	gi 30749651	P07686	58480	6.3	14	303	LY,ME,NG
225	1	dihydrolipoamide succinyltransferase	DLST	gi 736677	P36957	48992	9.0	19	284	MT
226	1	chain	CAMK2D	gi 119626702	Q13557	59062	7.0	9	243	unknown
228	1	protein disulfide isomerase-related protein 5	PIDA5	gi 1710248	Q14554	46512	5.0	19 10	676	ME,ER,PL
229	1	tain i Fnah/Vasp-like	EVI	gij55859707 gij7706687	09008	260030 44878	6.1 8.9	10	231	EN,ME,PL CY
231	1	tubulin alpha 6 variant	unknown	gi 62897609	Q53GA7	50476	5.0	7	230	unknown
232	1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1,	NDUFV1	gi 119595060	P49821	50707	8.5	13	257	MT
233	1	actin-related protein 3	ACTR3	ail5031573	P61158	47797	56	18	536	FR FN MF
234	1	ARP3 actin-related protein 3 homolog variant	unknown	gi 62088286	Q59FV6	42517	5.6	11	258	unknown
235	1	unnamed protein product	CSK	gi 158254494	A8K3B6	51240	6.6	11	284	unknown
236	1	BSCv protein	BSCV	gi 9836652 gi 5031699	Q9HDC9 075955	47887 47554	5.8 7 1	17 20	381 500	
240	1	tubulin gamma 1	TUBG1	gi 31543831	P23258	51480	5.8	12	291	CY
241	1	enolase 1	ENO1	gi 203282367	P06733	47350	7.0	20	324	ME,EX,SY,MT
242	1	flotillin 1 [Homo sapiens]	FLOT1	gi 5031699	O75955	47554	7.1	34	577	LY,ME,EX
243 244	1	cvtochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	UQCRC1	gij203282367 gil515634	P06733 P31930	47350 53270	7.0 5.9	25 7	592 401	ME,EX,SY,MT ME,PL,MT
245	1	enolase 1	ENO1	gi 203282367	P06733	47350	7.0	5	75	ME,EX,SY,MT
247	1	tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	gi 215261288	014773	62788	6.3	5	272	LY,ME,NG,PL,MT
249	2	cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	UQCRC1	gi 515634	P31930	53270	5.9	23	693	ME,PL,MT
250 251	1	proliferation-associated protein 2G4	PA2G4	gi 32967307 gi 4099506	Q91229 Q9UQ80	43369 38321	0.9 7.2	5	225	ME.EN.ER
252	1	elongation factor 1-gamma	EEF1G	gi 39644794	P26641	50156	6.3	12	302	ME
253	1	tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	gi 215261288	014773	62788	6.3	5	412	LY,ME,NG,PL,MT
254	1	thioredoxin domain-containing protein 4	TXNDC4	gi 193885198	Q9BS26	44284	5.0	10	357	ER,ME,PL
255	1	Heat shock 40 kDa protein 4	DNAJA1	ail219588	P31689	45590	6.7	16	93 512	ER.ME
258	1	septin 7	SEPTIN7	gi 78057661	Q8TC62	48913	8.8	6	179	ME,PL,SY
259	1	septin 7	SEPTIN7	gi 78057661	Q8TC62	48913	8.8	12	494	ME,PL,SY
260	1	tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	gi 34452679	014773	34670	5.7	6	335	LY,ME,NG,PL,MT
262	1	sulfide:guinone oxidoreductase. mitochondrial	SQRDL	ail10864011	Q9Y6N5	50214	9.2	22	579	MT
263	1	vimentin	VIM	gi 47115317	P08670	53604	5.1	23	558	ME
264	1	fumarate hydratase, isoform CRA_a	FH	gi 119590496	P07954	52787	9.0	7	207	EN,SY,MT
265	1	growth-Innibiting protein 1 tripentidyl-pentidase 1	TPP1	gi 34452679 ail215261288	014773	34670 62788	5.7 63	6	303	
268	1	growth-inhibiting protein 1	TPP1	gi 34452679	014773	34670	5.7	6	310	LY,ME,NG,PL,MT
269	1	growth-inhibiting protein 1	TPP1	gi 34452679	O14773	34670	5.7	6	321	LY,ME,NG,PL,MT
270	1	fumarate hydratase, isoform CRA_d	FH	gi 119590499	P07954	46555	6.9	12	301	EN,SY,MT
271	1	pyruvate dehydrogenase F1	PDHA1	gi 34452679 gi 215261382	P08559	34670 43164	5.7 6.9	ь 11	464 293	SY MT
273	1	Tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	gi 215261288	014773	62788	6.3	8	325	LY,ME,NG,PL,MT
274	1	growth-inhibiting protein 1	TPP1	gi 34452679	014773	34670	5.7	6	395	LY,ME,NG,PL,MT
275	1	granzyme A	GRZA	gi 33357774	P12544	26328	9.1	14	181	
270	1	solute carrier family 25 member 24 isoform 1	SLC25A24	gi 46249805	Q6NUK1	53532	6.0	20	240 369	MT
278	1	NADH dehydrogenase-ubiquinone Fe-S protein 2 precursor	NDUFS5	ail3540239	O75306	52869	7.2	18	327	MT
270	1	[Homo sapiens] solute carrier family 25 member 24 isoform 1	SI C25A24	ail148491091	O6NILIK1	53548	6.0	14	209	МТ
280	1	lysosomal acid phosphatase	ACP2	gi 13111975	P11117	48685	6.1	8	106	LY,ME
281	1	actin, beta	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	10	351	ER,ME,EX,PL,SY
282	1	actin, beta	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	17	641	ER,ME,EX,PL,SY
283	2	actin, beta	ACTB	ail15277503	P60709	49651	5.6	17	558	ER.ME.EX.PL.SY
285	1	actin prepeptide	ACTA2	gi 178067	Q13707	37125	5.2	3	115	CY
286	1	actin, beta	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	15	567	ER,ME,EX,PL,SY
287	1	CS protein [Homo sapiens]	CS IDH2	gi 48257138	075390 P48735	45758	6.5 8 3	14 14	434 200	
289	1	cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	UQCRC2	gi 180928	P22695	48611	8.7	8	158	ER,ME,MT
290	1	isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDH2	gi 119622488	P48735	48071	8.3	24	546	PL,MT
291	1	flap endonuclease 1	FEN1	gi 61680058	P39748	42777	8.8	7	166	
292 293	2	succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	SUCLA2	gi 50592988 gi 55957259	P22695 Q9P2R7	48584 48351	8.7 6.6	19 7	748 189	ER,ME,MT
294	1	acvl-CoA dehvdrogenase, mitochondrial	ACADM	ail4557231	P11310	47015	8.6	9	286	MT
295	1	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	ACAA2	gi 509676	P42765	42469	8.5	14	426	MT,ER
296	1	methionyl aminopeptidase 1	METAP1	gi 20987224	P53582	30919	6.2	7	212	EN
298 200	1	myosin 9 mitochondrial ribosomal protein 1.38	MYH9 MRPL38	gi 189030 ail169636418	P35579	82322	7.6 7.2	5 18	127 364	EN,ME,EX,PL,MI MT
301	1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 1	SERPIN B1	gi 62898301	P30740	42857	5.9	13	531	CY
302	2	septin 2	SEPT2	gi 157835884	Q15019	36418	6.3	13	505	ME,EX,SY
303	2	actin, beta	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	15	369	ER,ME,EX,PL,SY
305 306	1 1	stomatin-like protein 2 actin beta	ACTR	gij2984585 gij15277502	Q9UJZ1 P60709	38839 40536	б.4 5.6	12 12	418 551	ME,MI FR MF FX PI SV
307	1	DnaJ homolog subfamily B member 11	DNAJB11	gi 7706495	Q9UBS4	40774	5.8	13	446	ER,ME,PL
308	1	septin 9	SEPT9	gi 5262571	Q9UHD8	27450	6.1	5	135	ME
309	2	actin-related protein 2	ACTR2	gi 5031571	P61160	45017	6.3	14	552	ER,EN,ME
310 311	1 1	sepun 9 deita mitogen-activated protein kinase 1	SEP190 MAPK1	gij14530107 gjl23879	Q90HD8 P28482	38690 40794	7.1 6.7	9 12	181 143	ME.PI
312	1	migration-inducing gene 14	unknown	gi 38570361	Q5J8M4	40080	8.0	7	72	unknown

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen- bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion
313	1	mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	TOMM40	gi 17834080	O96008	33904	6.8	6	229	MT,ME
314	1	macrophage-capping protein	CAPG	gi 33357110	P40121	38843	5.4	4	190	ME
315	1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	PSMD13	gi 119581641	Q9UNM6	40131	5.9	5	212	ME
316	1	hnRNP-E1	PCBP1	gi 460771	Q15365	38015	6.7	12	307	
318	1	sepun z fructose-bisphosphate aldolase A		ail4557976	P04075	34027	0.3 8.4	7	97	ME,EX,ST
319	1	fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA	gi 4557305	P04075	39851	8.3	7	306	ME.EX.SY.MT
320	1	budding uninhibited by benzimidazoles 3	BUB3	gi 4757880	O43684	37587	6.4	13	223	unknown
322	1	fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA	gi 4557305	P04075	39851	8.3	13	331	ME,EX,SY,MT
323	1	guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subunit	GNAI2	gi 119585458	P04899	20295	5.5	6	186	EX
325	1	guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subunit	GNAI2	gi 119585458	P04899	20295	5.5 5.6	12	305	
320			ACTE	gij 15277503	P60709	40556	5.0	9	450	ER,IVIE,EA,PL,ST
328	1	short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 10,	ACADS	gi 4557233	P16219	44611	8.1	5	106	MT
330	1	42kDa precursor [Homo sapiens]	NDUFA10	gi 4758768	095299	41067	8.7	18	405	MI
331	1	28S ribosomal protein S22, mitochondrial	MRPS22	gi 119599451	P82650	36840	6.3	13	236	MT
332	1	V-type proton ATPase subunit D1	ATP6V0D1	gi 542837	P61421	32083	5.2	8	140	LY,EN,ME,SY
334	1	unnamed protein product microtubule-associated protein PP/EB family member 2	UNKNOWN	gi 158256528	A8K683	35187	5.2	4	106	UNKNOWN
336	1	actin beta	ACTB	ail15277503	P60709	40536	5.6	15	476	
339	1	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha variant	unknown	gi 62897507	Q53GF8	40050	6.5	5	173	unknown
341	1	erythrocyte 26 S protease subunit 12, 26 S	unknown	gi 998688	unknown	36674	6.2	12	398	unknown
342	1	serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	PPP1CA	gi 4506003	P62136	38229	5.9	12	312	EX
346	1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	gi 67464043	P04406	36483	8.6	9	237	LY,ME,NG,EX,PL,S Y,MT
347	1	ATP synthase subunit alpha,	ATP5A1	gi 13111901	P25705	40374	8.9	7	199	ER,LY,NG,SY,MT
348	1	F-actin-capping protein subunit alpha-1		gilo2898013 gil12654583	P52907	33057	5.5 5.4	12	45Z	
545				9112034303	1 03300	54424	5.4	12	570	LY.ME.NG.EX.PL.S
350	1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	gi 31645	P04406	36202	8.3	11	397	Y,MT
356	1	gamma-glutamyl hydrolase precursor	GGH	gi 4503987	Q92820	36340	6.7	6	148	LY,ME,NG,PL
357	1	60S acidic ribosomal protein P0	RPLP0	gi 12654583	P05388	34424	5.4	10	220	ER,EN,ME
358	1	ACIIN, Deta-like 2 OCIA domain-containing protein 1		gij63055057 gij8923427		42318 27780	5.4 7.0	2	240	EN
361	1	actin beta	ACTB	ail15277503	P60709	40536	5.6	14	605	FR ME EX PL SY
362	1	annexin A2	ANXA2	gi 50845388	P07355	40671	8.5	32	774	ME,EX,MT
363	1	annexin A2	ANXA2	gi 18645167	Q8TBV2	38780	7.6	20	439	ME,EX,MT
364	1	gamma-glutamyl hydrolase precursor	GGH	gi 4503987	Q92820	36340	6.7	7	234	LY,ME,NG,PL
365 366	1 1	gamma-glutamyl hydrolase precursor guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-	GGH GNB2	gi 4503987 gi 306785	Q92820 P62879	36340 38061	6.7 5.8	8 10	298 382	LY,ME,NG,PL EN,ME,EX,SY,MT
367	1	z gamma-glutamyl hydrolase precursor	GGH	ail4503987	Q92820	36340	67	6	288	LY ME NG PI
370	1	gamma-glutamyl hydrolase precursor	GGH	gi 4503987	Q92820	36340	6.7	10	365	LY,ME,NG,PL
371	1	malate dehydrogenase	MDH2	gi 49168580	P40925	35993	8.9	24	880	ME,EX,PL,SY,MT
372	1	actin, beta	ACTB	gi 4501885	P60709	42052	5.3	11	401	ER,ME,EX,PL,SY
373	1	gamma-glutamyl hydrolase precursor	GGH	gi 4503987	Q92820	36340	6.7	6	160	LY,ME,NG,PL
375	1	actin, beta	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6 7.6	9 14	271	ER,ME,EX,PL,SY
370	1	interferon-induced protein 35	IEI35	gil22397717	P80217	31896	5.8	7	166	PI
380	1	alpha-mannosidase	MAN2B1	gi 1658374	O00754	111986	6.7	7	65	LY,ME
383	1	DnaJ homolog, subfamily C, member 9	DNAJC9	gi 27597059	Q8WXX5	30062	5.6	11	477	ME
384	1	interferon-induced protein 35	IFI35	gi 24307901	P80217	31896	5.8	7	227	PL
385	1	tetratricopeptide repeat protein 35	TTC35	gi 18088455	Q15006	34955	6.2	9	115	ME,ER
387	1	voltage-dependent anion-selective channel protein 2	VDAC2	gi 48146045	P45880	30849	6.8 6.9	6 7	150	
500			101	gij40140113	Q10/02	55022	0.0		113	ER.LY.ME.NG.EX.P
389	1	voltage-dependent anion channel 1	VDAC1	gi 4507879 gi 48146045	P21796	30868	8.6 6.8	21 10	794 320	L,SY,MT
390 391	1	voltage-dependent anion-selective channel protein 2 voltage-dependent anion channel 1	VDAC2 VDAC1	gi 48146045 gi 4507879	P21796	30849 30868	0.8 8.6	13	320 393	ER,LY,ME,NG,EX,P
394	1	palmitovl-protein thioesterase 1	PPT1	ail4506031	P50897	34627	6.1	5	282	LY.ME.NG
397	1	F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB	gi 119615295	P47756	30226	5.9	13	238	ME,EX
400	1	ATP synthase subunit gamma	ATP5C1	gi 4885079	P36542	32917	9.3	10	326	LY;ME,MT
401	1	palmitoyl-protein thioesterase 1	PPT1	gi 4506031	P50897	34627	6.1	5	337	LY,ME,NG
402	1	guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	GNB2L1	gi 119574080	P63244	30942	7.0	10	283	ER
403	2	voltage-dependent anion-selective channel protein 2	ARPC2	gi 48146045 gi 5031599	P45880 015144	30849	0.8 6.8	3 17	504	
405	1	V-type proton ATPase subunit E1	ATP6V1E1	ail87159816	A8MUE4	23630	9.0	6	117	unknown
408	1	electron transfer flavoprotein, alpha polypeptide	ETFA	gi 189181759	Q53XN3	30235	8.8	2	76	MT
410	1	actin related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2	gi 5031599	O15144	34426	6.8	15	382	EN,ME,PL
411	1	actin related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2	gi 5031599	015144	34426	6.8	6	132	EN,ME,PL
412	1	delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	ECH1	gi 183448176	Q13011	33061	6.4	13	474	MT
413 111	1	deita(3,5)-Deita(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial		gij183448176	Q13011 ASVM67	33061 21969	6.4 5.0	9 1	221 122	MI
415	1	palmitovl-protein thioesterase 1	PPT1	gi 4506031	P50897	34627	6.1	+ 5	200	LY ME NG
416	1	replication protein A2, 32kDa	RPA2	gi 4506585	P15927	29342	5.8	3	162	NU
417	1	granzyme A	GRZA	gi 33357774	P12544	26328	9.1	3	66	LG
418	1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1 [Homo sapiens]	BDH1	gi 15080429	Q02338	38516	9.1	10	182	ER,MT
419	1	actin, beta	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	3	66	ER,ME,EX,PL,SY
420 422	1	camepsin B	CISB	gij189096178 gij157822427	P07858	30005	5.1 5.0	3	124 274	
422	1	cathepsin B	CTSB	gi 157833437	P07858	36000	5.8	8	260	LY,ME,NG

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen- bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion
424	1	PHB protein	PHB	gi 49456373	Q6FHP5	29871	5.6	13	314	unknown
426	1	palmitoyl-protein thioesterase 1	PPT1	gi 4506031	P50897	34627	6.1	7	522	LY,ME,NG
429 430	1	PHB protein granzyme B	GR7B	gij49456373 gij13096242	Q6FHP5 P10144	29871 25894	0.C 9.6	5	197	LG
432	1	SH3-domain binding protein 1	SH3BP1	gi 85815829	Q9Y3L3	76008	6.3	5	156	unknown
434	1	voltage-dependent anion channel 3 isoform b	VDAC3	gi 25188179	Q9Y277	30981	8.9	13	296	ME,EN,MT
436	1	cathepsin D preproprotein	CTSD	gi 4503143	P07339	45037	6.1	6	159	LY,ME,NG,EX,MT
438 439	1	cathepsin D preproprotein	GRZA	gi 4503143 gi 33357774	P07339 P12544	45037	6.1 Q 1	7 14	129 597	LY,ME,NG,EX,MI
443	1	gamma-actin	ACTG	gi 178045	P63261	26147	5.7	11	467	ME,EX,PL,SY
444	1	granzyme A	GRZA	gi 33357774	P12544	26328	9.1	4	76	LG
445	1	granzyme A	GRZA	gi 33357774	P12544	26328	9.1	5	137	LG
447 448	1	granzyme A endoplasmic reticulum protein ERp29	GRZA ERP29	gi 33357774 ail192987144	P12544 P30040	26328	9.1 7 1	11 6	299	
452	2	granzyme A	GRZA	gi 33357774	P12544	26328	9.1	17	604	LG
453	1	phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	gi 38566176	P18669	28916	6.7	5	102	ME,EX,SY
454	1	enoyl-CoA hydratase	ECHS1	gi 1922287	P30084	31807	8.3	5	281	MT
455	1	NADH denydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, 30kDa (NADH-coepzyme O reductase) [Homo saniens]	NDUFS3	gi 4758788	O75489	30337	7.0	18	623	ER,MT,ME
457	1	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	qi 5107637	P62826	24519	7.0	5	76	ME,EX
458	1	cytochrome oxidase deficient homolog 2	SCO2	gi 153791313	O43819	29962	9.0	4	106	MT
460	1	ETHE1 protein, mitochondrial	ETHE1	gi 41327741	O95571	28368	6.4	5	124	MT
461	1	metaxin-2	MTX2	gi 62702262	075431 P27144	28668	6.1 7.2	5	67 127	
464	1	high-mobility group box 2	HMGB2	gil11321591	P26583	26030	7.5	8	214	NU
465	1	chromosome 14 open reading frame 166	C14orf166	gi 119586064	Q9Y224	26652	6.7	13	392	ME,EN,ER
466	1	cytochrome b-c1 complex subunit 11	UQCRFS1	gi 45768728	P47985	29958	8.6	9	377	ER,MT,ME
467	1	triosephosphate isomerase 1	TPI1	gi 17389815	P60174	26910	6.5	3	87	ME,EX,SY,MT
400 470	1	high-mobility group box 2	HMGB2	gij4005495 gij11321591	P26583	20003	0.9 76	ა 8	02 166	NU
471	2	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	gi 5107637	P62826	24519	7.0	13	493	ME,EX
472	1	gamma-actin	ACTG	gi 178045	P63261	26147	5.7	10	389	ME,EX,PL,SY
474	1	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	HSD17B10	gi 55670219	Q99714	27130	8.5	9	144	MT
477	1	L-Isoaspartate O-Metnyltransferase With S- Adenosyl Homocysteine	PCMT1	gi 20150076	P22061	24661	6.8	2	79	ER,ME,SY,MT
478	1	cathepsin S	CTSS	gi 30749675	P25774	24491	7.6	7	166	LY
479	1	cathepsin S	CTSS	gi 30749675	P25774	24491	7.6	10	305	LY
481	1	cathepsin S	CTSS	gi 30749675	P25774	24491	7.6	11	369	LY
484 489	1	NDUF V2 protein	NDUFV2 PRDX3	gi 48145973 ail119569783	Q6IB76 P30048	27617	8.2 6.1	10	198	UNKNOWN ME PL MT
491	1	loss of heterozygosity 12 chromosomal region 1 protein	LOH12CR1	gi 119616666	Q969J3	13442	6.3	5	88	unknown
492	1	ATP synthase, H+ transporting, F0 complex, subunit B1	ATP5F1	gi 55959356	P24539	22318	9.3	4	91	LY,ME,MT
493	1	glutathione S-transferase kappa 1	GSTK1	gi 33150564	Q9Y2Q3	25580	8.5	8	192	MT,ME,PL
496 498	1	peroxiredoxin 2 Rho GDR-dissociation inhibitor 2		gi 1617118 gi 9955206	P32119 P52566	18486	5.2 6.2	5 1	69 81	ER,EN,ME,SY,MT
490 500	' 1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10, 22kDa	NDUFB10	gi 4758774	O96000	21048	8.7	8	148	MT,ME
501	1	ATP synthase, H+ transporting, F0 complex, subunit D	ATP5H	gi 51479152	075947	15820	6.6	4	127	ER,ME,NG,SY,MT
502	1	peroxiredoxin 3	PRDX3	gi 119569783	P30048	11158	6.1	4	71	ME,PL,MT
503	1	actin, beta	ACTB	gi 15277503	P60709	40536	5.6	3	82	ER,ME,EX,PL,SY ER,LY,EN,ME,NG,
504	1	peroxiredoxin 1	PRDX1	gi 55959887	Q06830	19135	6.4	8	336	PL,MT
506 508	1	phorbolin I protein	APOBEC3C	ail9294747	Q9NRW3	42060 34310	5.4 5.5	5 5	120	unknown
520	1	actin-like protein	ACT	gi 62421128	Q562P0	11479	5.4	1	64	unknown
521	1	Ferritin light chain	FTL	gi 110591399	P02792	19933	5.5	6	226	ME,EX
526	1	myosin regulatory light chain MRCL3 variant	unknown	gi 62896697	Q53HL1	19838	4.7 8 6	5	113	unknown
533	1	myosin regulatory light chain MRLC2	MRLC2	ail32187319	O14950	17047	4.2	2	93	CY
537	1	actin related protein 2/3 complex subunit 3	ARPC3	gi 119618319	O15145	19108	8.7	7	150	EN,ME,PL,ER
539	2	translocon-associated protein subunit delta	SSR4	gi 5454090	P51571	19158	5.8	6	190	ER,ME
540	1	superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1	gi 31615966	P00441	16001	5.7	4	112	ME,EX,MT
541	1	cofilin-1	CFI 1	gij 13 10662 gil 5031635	P23204 P23528	18719	9.2 8.2	5 6	93	ER,IVIE
546	1	actin-like protein	ACT	gi 62421128	Q562P0	11479	5.4	2	80	unknown
549	1	hypothetical protein LOC55004	C11orf59	gi 8923579	Q6IAA8	17848	5.0	3	106	unknown
550	1	actin related protein 2/3 complex subunit 5	ARPC5	gi 5031593	O15511	16367	5.5	4	102	EN,ME
556	1	nme I-nmez protein pentidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIR	gijbb392203 gij1310882	P22392 P23284	30346	9.1	6	65	
564	1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	gi 1431788	P62937	18209	7.4	6	171	ME,EX,MT
566	1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	gi 1633054	P62937	18098	7.8	9	287	ME,EX,MT
571	1	histone H2B type 2-E	HIST2H2BE	gi 184086	Q16778	11324	10.1	7	77	NU
573 574	1	NISTONE Cluster 1, H2DM NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex	NDUFA13	gi 45767717 gi 4680717	Q99879 Q9P0.10	14080	10.4 6.9	6 6	70 148	NU MT
577	1	subunit 13	SCPD1	ail2624604	00/027	15196	9.9 Q 0	11	261	
579	1	single-sitanded DivA-binding protein, mitochondrial damma-actin	SOBP1 ACTG	yıj∠o∠4694 ail178045	QU4837 P63261	26147	0.2 5.7	6	∠04 1∩4	
582	1	granzyme A	GRZA	gi 33357774	P12544	26328	9.1	3	68	LG
583	1	ACTG1 protein	ACTG1	gi 40225338	Q96FU6	18724	5.2	9	241	unknown
590	2	profilin-1	PFN1	gi 157838211	P07737	15068	8.4	6	216	ME,EX,PL,MT
592 594	1 1	cytochrome c oxidase subunit Vb ACTG1 protein	ACTG1	gij119622335 gij40225338	P10606	19755	10.0 5.2	/ 9	130 116	EK,IVI I unknown
599	1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 5, 15kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	NDUFS5	gi 4758790	O43920	12737	9.3	2	85	MT

Spot Nr.	Replikate # ^{a)}	Protein Name	Gen- bezeichnung	NCBI. Nr.	Uni Prot Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Funktion
601	1	N-acylsphingosine amidohydrolase 1 isoform a preproprotein	ASAH1	gi 189011548	A8K0B6	45087	7.5	4	86	unknown
605	1	mitogen-activated protein kinase scaffold protein 1	MAPKSP1	gi 11496277	Q9UHA4	13671	6.7	2	68	LY
610	1	hemoglobin subunit alpha	HBA1	gi 9256890	P69905	30476	8.9	3	157	SY,ER,MT
614	2	beta-2-microglobulin	HLA-Cw	gi 6730518	P61769	11767	5.8	4	90	EN,ME,PL
615	1	smooth muscle myosin light chain	MYL	gi 189017	unknown	11753	4.5	2	103	ME

^a Anzahl der unabhängigen Identifiaktionen aus verschiedenen 2D Gelen









1.4 Identifikationsliste von Proteinen aus Granula der $\gamma\delta$ T Zellen

Spot Nr.	Protein Name	NCBI.Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Gel Nr.
69	hypothetical protein DKFZp547A1913	gi 12224840	31705	5.8	2	93	36702
389	annexin A11, isoform CRA_a	gi 119600805	26961	6.9	6	108	36702
895	MHC class I antigen	gi 118721276	30727	5.2	7	178	36702
76	hypoxia up-regulated 1 precursor	gi 5453832	111494	5.2	32	704	36703
77	HYOU1 protein	gi 116283339	73229	5.7	5	132	36703
561	protein disulfide isomerase-related protein 5	gi 1710248	46512	5.0	10	420	36703
853	protein ARMET precursor	gi 23503040	20700	8.7	3	119	36696
684	MHC class II antigen	gi 5823139	10539	5.3	2	72	36696
689	MHC class II antigen	gi 22121727	10020	4.9	2	83	36696

Tabelle A4: Identifikationen aus den 2D Gelen der $\gamma\delta$ T Zellen: 36702, 36703, 36696

1.5 Identifikationsliste von Proteinen zur Reifung sekretorischer Lysosomen

Spot Nr.	Protein Name	NCBI.Nr.	MW	PI	Peptide	MASCOT	Gel Nr.
769	histocompatibility antigen HLA-DR	gi 836628	19850	4.8	2	97	36836
789	histocompatibility antigen HLA-DR	gi 836628	19850	4.8	3	99	36836
878	chloride intracellular channel 1	gi 14251209	27248	5.1	5	69	36836
880	chloride intracellular channel 1	gi 14251209	27248	5.1	5	78	36836
881	nuclear chloride channel	gi 4588526	27249	5.0	13	321	36836
902	chloride intracellular channel 1	gi 14251209	27248	5.1	5	80	36836
1023	peroxiredoxin-2	gi 1617118	18486	5.2	4	86	36836
1152	hemoglobin beta subunit variant	gi 6003532	14069	6.5	2	44	36836
1159	alpha-hemoglobin	gi 183801	3284	8.5	2	89	36836
1653	septin 2	gi 119591666	18259	6.2	3	70	36839
1642	actin	gi 194376310	38950	5.2	3	99	36839
1946	granzyme A	gi 33357774	26328	9.1	5	141	36839
1952	granzyme A	gi 33357774	26328	9.1	3	65	36839
1865	granzyme B	gi 13096242	25894	9.6	8	104	36839
1872	granzyme B	gi 13096242	25894	9.6	10	100	36839
695	myosin light chain	gi 189017	11753	4.5	2	103	36839

Tabelle A5: Identifikationen aus den 2D Gelen zur Reifung der Granula: 36836, 36839

11. Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Dieter Kabelitz danken, für die Möglichkeit, die vorliegende Doktorarbeit im Institut für Immunologie des UK-SH Kiel durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Ottmar Janssen danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas, die hervorragende Betreuung und Unterstützung, sowie die Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Rose-John danke ich recht herzlich für die Übernahme der Betreuung und des Referates meiner Arbeit vor der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Matthias Leippe für die Übernahme des Korreferats und die Möglichkeit der Proteinanalyse am MALDI-Gerät der Zoophysiologie. In dem Zusammenhang gilt der größte Dank Dr. Christoph Gelhaus für die MALDI-Analysen, die in Schnelligkeit und Präzision unübertroffen sind. Diese Doktorarbeit wäre ohne die großartige Kooperation mit der Zoophysiologie in dem vorliegenden Umfang nicht realisierbar gewesen.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Ralph Lucius vom Institut für Anatomie (CAU Kiel) für die EM-Aufnahmen und Saskia Heppner vom Institut für Zoophysiologie für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen am Axio Imager.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie, einschließlich jener hier nicht Genannten, möchte ich für jedwede Unterstützung und die Vermittlung eines angenehmen Arbeitsklimas danken.

Ganz besonders danke ich auch Melanie Nebendahl und Alyn Gerneth für die Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung und der angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin danke ich natürlich auch allen weiteren Mitgliedern der AG Janssen, Marcus Lettau, Maren Paulsen und Signe Valentin. Maren und Marcus möchte ich auch noch für das kritische Lesen der vorliegenden Arbeit danken.

Meiner Familie möchte ich mich für die Unterstützung während der gesamten Promotionszeit danken.

Und ein ganz besonderer Dank gebührt natürlich Dorothee für ihre Geduld und die kulinarische Unterstützung während des Zusammenschreibens.

12. Curriculum vitae

Hendrik Schmidt Knooper Weg 48 24103 Kiel e-mail: h_schmidt@gmx.de

Geburtsdatum:	18.12.1980
Geburtsort:	Schwerin
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch

Hochschulausbildung

01/2006 – 08/2009	Promotion bei Prof. Dr. Ottmar Janssen am Institut für Immunologie, UK-Schleswig-Holstein, Campus Kiel
11/2005	Diplom in Biochemie und Molekularbiologie
10/2004 – 06/2005	Diplomarbeit bei PD Dr. Christoph Plieth zum Thema: 'Entwicklung fluoreszierender Redoxindikatoren und deren gezielte Expression in pflanzlichen Organellen', Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie, CAU Kiel
10/2000 – 11/2005	Studium der 'Biochemie und Molekularbiologie' (BCM) an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Hauptstudium BCM mit den Nebenfächern: Pharmazeutische Chemie, Mikrobiologie und Immunologie
Auslandspraktika	
06/2005 – 10/2005	,Construction and screening of cDNA libraries for cloning and characterization of yet unidentified luminescent and fluorescent proteins from terrestrial and deep-sea animals' Prolume Ltd. (Dr. Bruce Bryan), Pinetop, Arizona, USA
02/2004 – 04/2004	'Molecular Signaling in <i>Arabidopsis</i> ' Dr. M. Knight, Plant Science Department, University of Oxford, GB.
Wehrpflicht	
09/1999 – 07/2000	Wehrdienst beim Panzergrenadierbataillon 401, Hagenow
Schulausbildung	

08/1992 – 07/1999 Abitur: Gymnasium Gadebusch

Preise und Stipendien

2007	GBM Innovation Award For Young Scientists
2007	Posterpreis, Signal Transduction Meeting, Weimar
2007	Reisestipendium der DGfl
2006	Reisestipendium der STS
2005	Reisestipendium des DAAD (USA Aufenthalt)

13. Publikationsliste

Orginalarbeiten

Schmidt H., Gelhaus C., Nebendahl M., Lettau M., Watzl C., Leippe M. and Janssen O. 2D-DIGE analyses of enriched secretory lysosomes reveal heterogeneous profiles of functionally relevant proteins in leukemic and activated human NK-cells. *Proteomics 2008*, 8:2911-2925.

Schmidt H., Gelhaus C., Latendorf T., Nebendahl M., Petersen A., Krause S., Leippe M., Becker W.M and Janssen O. 2D-DIGE analysis of the proteome of extracts from peanut variants reveals striking differences in major allergen contents. *Proteomics 2009*, im Druck

Krause S., Latendorf T., **Schmidt H.**, Darcan-Nicolaisen Y., Reese G., Petersen A., Janssen O. and Becker W.M. Peanut varieties with reduced Ara h 1 content indicating no reduced allergenicity. *Molecular Nutrition and Food Research 2009*, im Druck

Biller L., **Schmidt H.**, Krause E., Gelhaus C., Handal G., Lotter H., Janssen O., Tannich E. and Bruchhaus I. Comparison of two genetically related Entamoeba histolytica cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties. *Proteomics*, im Druck

Schmidt H., Gelhaus C., Lucius R., Nebendahl M., Leippe M. and Janssen O. Enrichment and analysis of secretory lysosomes from lymphocyte populations. *BMC Immunology,* in Revision

Schmidt H., Gelhaus C., Nebendahl M., Lettau M., Wesch D., Leippe M., Janssen O. Comparative 2D-DIGE analyses of enriched secretory lysosomes from human T cell populations. in Vorbereitung

Ammerpohl O., **Schmidt H.**, Gelhaus C., Xu X., Heydari P., Pilarsky C., Olempska-Müller M., Martin-Subero JI., Leippe M., Siebert R., Janssen O., and Kalthoff H. Comparative analysis of the genome, transcriptome and proteome of malignant and the benign variants of the A818-6 PDAC cell line. in Vorbereitung

Noack A., Häsler R., **Schmidt H.**, Gelhaus C., Janssen O., Kalthoff H., Trauzold A. Inhibition of microRNA-197 modulates proliferation and apoptosis in pancreatic ductal adenocarcinoma cells (PDAC). in Vorbereitung

Sellami N., Adam-Klages S., Paulsen M., Lettau M., **Schmidt H.**, Nebendahl M., Kruse M.L., Gelhaus C., Buck F., Harder S., Reza Parwaresch R., Janssen O. and Heidebrecht HJ.. First insights into the function of the cancer/testis antigen 45 (CT45). in Vorbereitung

<u>Übersichtsartikel</u>

Lettau M., **Schmidt H.**, Kabelitz D., and Janssen O. Secretory lysosomes and their cargo in T-and NK-cells. *Immunology Letters 2007* 15;108(1):10-19

Veröffentlichte Tagungsbeiträge

Schmidt H., Nebendahl M., Latendorf T., Lettau M., Riecken S., Becker W.M. and Janssen O. 2D-DIGE A powerful tool for proteome comparison of isolated lysosomes, peanut extracts and more. *Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen 2006* Nov 17; 29:16

Riecken S., **Schmidt H.**, Darcan Y., Janssen O. und Becker W.M. Allergenspektrum verschiedener Erdnussvarietäten. *19. Mainzer Allergieworkshop 2006*

Schmidt H., Gelhaus C., Nebendahl M. and Janssen O. Differences in the proteome of enriched secretory lysosomes obtained from leukemic NK-cell lines and activated human NK-cells. *Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen 2007* Nov 16; 30:18

Riecken S., **Schmidt H.**, Darcan Y., Latendorf T., Janssen O. and Becker W.M. The allergen spectrum of different peanut varieties. *XXVI European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI) Congress 2007*

Schmidt H., Gelhaus C., Nebendahl M., Janssen O. Proteome analysis of enriched secretory lysosomes of human NK cells by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) *Signal Transduction 2007*

Schmidt H., Gelhaus C., Lettau M., Nebendahl M., Leippe M. and Janssen O. 2D-DIGE analysis of enriched secretory lysosomes of human T and NK cells. *Wiener klinische Wochenschrift 120, Heft 15-16 (2008)*

Schmidt H., Gelhaus C., Lettau M., Nebendahl M., Leippe M. and Janssen O. Proteomic profiling of secretory granules of different T cell subpopulations. *Signal Transduction 2008*

14. Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 9 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Arbeit unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. Ottmar Janssen selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Teile dieser Dissertation wurden bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Universität zur Begutachtung vorgelegt.

Kiel, den 25. Mai 2009

Hendrik Schmidt