Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hadi Al-Hasani

### Insulin- und Kontraktionssignalwege in insulinresistenten Skelettmuskelzellen der Maus

### Dissertation

## zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

#### **Michelle Isabel Deatc**

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter/in: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hadi Al-Hasani Zweitgutachter/in: Univ.-Prof. Dr. med. Regina Ensenauer Meinen Eltern

## **ZUSAMMENFASSUNG (DEUTSCH)**

Körperliche Bewegung ist wichtiger Bestandteil der leitliniengerechten Therapie und Prävention des Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM). Zu den positiven Effekten von Sport zählen die Verbesserung der Glukosetoleranz und Insulinsensitivität. Allerdings profitieren nicht alle T2DM-Patienten in gleichem Maße von Sport-Interventionen, da die Fähigkeit, durch körperliche Aktivität den Blutzucker-Spiegel zu verbessern, individuell variiert. Für eine maßgeschneiderte Therapie ist es daher wichtig, die zellulären Signalwege aufzudecken, die der Krankheit und möglichen sportinduzierten Verbesserungen zugrunde liegen. Eine muskuläre Insulinresistenz (IR) wird dabei als eine der Hauptursachen für T2DM angesehen. Darüber hinaus zählt die Skelettmuskulatur aufgrund der Sekretion von Myokinen zum endokrinen System. Myokine umfassen Zytokine, Proteine oder Peptide, die von Muskelfasern produziert, exprimiert und freigesetzt werden. Noch sind die meisten Myokine hinsichtlich ihrer biologischen Funktion nur unzureichend charakterisiert. Die Erforschung der Rolle der Myokine im Energiestoffwechsel könnte in Zukunft zur Entwicklung neuer T2DM-Therapiemöglichkeiten beitragen. Kontraktionsabhängig sezernierte Myokine könnten zudem als Biomarker für die Entwicklung individueller Trainingsprogramme dienen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, sekretierte Proteine (Sekretome) von insulinresistenten murinen C2C12-Muskelzellen nach Elektropulsstimulation (EPS) zu charakterisieren und zu vergleichen, um zu einem tieferen Verständnis der biochemischen Zusammenhänge von IR, T2DM und körperlicher Bewegung beizutragen. Ein Sekretom beinhaltet alle Proteine, die von Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt sezerniert werden. Zur *in vitro* IR-Induktion wurden C2C12-Zellen mittels Palmitat, Insulin, TNF-a und Chemerin behandelt. Die erfolgreiche IR-Induktion durch Palmitat- und Insulin-Behandlung wurde mittels *Western Blot* anhand einer signifikant verminderten Phosphorylierung der Serin-/Threonin-Kinase AKT bestätigt. In einem zweiten Schritt wurden die Zellen mittels EPS stimuliert, um eine Kontraktion und Myokinsekretion herbeizuführen. Schließlich erfolgte die massenspektrometrische Sekretomanalyse der Überstände sowie die Auswertung der sekretorischen Proteine anhand bioinformatischer Analyse-*Tools*.

Innerhalb der Überstände von mit Palmitat-behandelten Zellen konnten 2531 potenzielle Myokine identifiziert werden, davon 312 signifikant reguliert. Die Überstände der mit Insulin behandelten Zellen zeigten 2594 potenzielle und 231 signifikant regulierte Myokine. 27 signifikant regulierte Proteine wurden in beiden Sekretomen nachgewiesen. Die Myokine *Gremlin-1*, *C-C motif chemokine 2*, *Neutrophil gelatinaseassociated lipocalin* (NGAL), *Complement Factor B* (CFB) und *Thrombospondin-2* (TSP2) wurden anhand wissenschaftlicher Literatur diskutiert. Sie stellen Kandidaten für weiterführende Studien dar, um ihre Rolle in der Pathophysiologie von IR und T2DM zu ergründen und das Wissen über das muskuläre Sekretom zu erweitern.

## **ZUSAMMENFASSUNG (ENGLISCH)**

The positive effects of exercise include improved glucose tolerance and insulin sensitivity. Therefore, physical exercise is an important part of guideline-based diabetes therapy and prevention. However, not all patients benefit from sports interventions, as the ability to improve blood glucose levels through physical activity varies individually. It is therefore important to uncover the cellular signalling pathways underlying the disease and possible exercise-induced improvements. Muscular insulin resistance is considered one of the main causes of type 2 diabetes mellitus (T2DM). In addition, skeletal muscle is part of our endocrine system. Muscle fibers produce, express and release so-called myokines which include cytokines, proteins or peptides. Most myokines are still poorly characterised in terms of their biological function. Research into the role of myokines in energy metabolism could contribute to the development of new T2DM therapy options in the future. Myokines that are secreted in a contraction-dependent manner could also serve as biomarkers for the development of individual training programmes.

The aim of this work was to contribute to a deeper understanding of the biochemical relationship of T2DM, insulin resistance and exercise by comparing secreted proteins (secretome) of insulin-resistant C2C12 cells after electrical pulse stimulation (EPS). A cellular secretome contains all proteins that are secreted by cells at a certain point in time. For inducing insulin resistance in vitro, murine C2C12 cells were incubated with palmitate, chronic high insulin exposure, TNF-a and chemerin. Western Blot analysis showed significantly reduced phosphorylation levels of AKT after palmitate and high insulin treatment of the cells. Afterwards, cells were stimulated via EPS to induce muscle contraction and myokine secretion. Finally, the supernatant was analysed via mass spectrometry. The secretory proteins were analysed by using bioinformatic analysis tools.

2531 potential myokines could be identified in the secretome of palmitate-treated cells, 312 of which were significantly regulated. 2594 potential and 231 significantly regulated myokines could be identified in the secretome of high insulin treated cells, respectively. 27 significantly regulated proteins were detected in both secretomes. Based on scientific literature, 5 myokines could be further characterised and discussed, namely Gremlin-1, C-C motif chemokine 2, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), Complement Factor B (CFB) und Thrombospondin-2 (TSP2). They represent candidates for further studies to elucidate their role in the pathophysiology of insulin resistance and T2DM and to expand our knowledge of the muscular secretome.

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1D	One-dimensional, eindimensional	
5 % MP	5 %ige Milchpulver-Waschpuffer-Lösung	
ABC-Transporter	ATP binding cassette – Transporter, Membranprotein	
ADA	American Diabetes Association	
AGC	Automatic gain control	
AKT	Proteinkinase B	
AMPK	Adenosinmonophosphat (AMP)-abhängige Kinase	
ANOVA	Analysis of variance, Varianzanalyse	
APS	Ammoniumpersulfat	
BCA	Bicinchoninic acid, Bicinchoninsäure	
BMI	Body Mass Index	
BSA	Bovines Serum Albumin	
CaCl₂	Calcium-Chlorid	
CCL-2	C-C motif chemokine ligand 2	
CFB	Complement Factor B	
CMKLR1	Chemokine like receptor 1	
COPII-Vesikel	Coat protein complex II - Vesikel	
CPS	Conventional protein secretion	
CXCL1	C-X-C Motif Ligand 1	
DAG	Diacylglycerin	
DDA	Data dependent acquisition (mode)	
DGAT2	Diacylglycerin-Acyltransferase 2	
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	

DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DTT	Dithiotreitol
е	Elementarladung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPS	Elektropulsstimulation
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fetal bovine serum, fötales Kälberserum
FNDC5	Fibronectin type III domain-containing protein 5
FOXK1	Forkhead box K1
FOXO	Forkhead family box O
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT4	Glukosetransporter 4
GO	Gene ontology
GS	Glykogensynthase
GSK3, GSK3-α	Glykogensynthase-Kinase 3, Glykogensynthase-Kinase $3\alpha$
HbA <sub>1c</sub>	Hämoglobin A1c (glykiertes Hämoglobin A)
HCD	Higher energy collisional dissociation
HCI	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography, Hochleistungs- Flüssigkeits-Chromatographie
HS	Horse serum, Pferdeserum
IDF	International Diabetes Federation

lgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IR	Insulinresistenz
IRS	Insulin Receptor Substrate
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KCI	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
KRBH-Puffer	Krebs-Ringer-Bikarbonat-HEPES-Puffer
LC	Liquid Chromatography
LCN-2	Lipocalin-2
м	Mol
m/z	Masse/Ladung
MARD	Mild age-related diabetes
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MgSO₄ x 7 H₂O	Magnesium-Sulfat-Heptahydrat
MOD	Mild obesity-related diabetes
mTORC1, 2	Mechanistic target of rapamycin complex 1, 2
n	Anzahl
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid

NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NF-кВ	Nuclear factor kappa B
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
P/S	Penicillin/Streptomycin
ΡΑ	<i>Palmitic acid</i> , Palmitinsäure oder <i>Palmitate</i> , Palmitat als Salz der Palmitinsäure
рАКТ	Phosphorylierte Proteinkinase B
PBS	Phosphate buffered saline
PC, PCA	Principal Component, Principal Component Analysis, Hauptkomponentenanalyse
PDK	Phosphoinositid-abhängige Kinase
PGC1-α	Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1a
pGSK3-a	Phosphorylierte Glykogensynthase-Kinase 3α
РІЗК	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
РКС	Proteinkinase C
RabGAP	Rab GTPase activating protein
Rep.	Replikat (aus voneinander unabhängig durchgeführten Zellkultur-Experimenten)
SAID	Severe autoimmune diabetes
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Natriumlauryl-Sulfat
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler
SIDD	Severe insulin-deficient diabetes
SIRD	Severe insulin-resistant diabetes

SP-	Putative secretory protein without signal peptide
SP+	Putative secretory protein with signal peptide
SR	Signal Recognition Particle Receptor
SRP	Signal Recognition Particle
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
T75	Zellkulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche
TAG	Triacylglycerin
TBC1D1	TBC1 domain family member 1
TBC1D4	TBC1 domain family member 4
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoroacetic acid, Trifluoressigsäure
TGF	Transforming growth factor
TGF-β	Transforming growth factor-β
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSC2	Tuberous sclerosis complex 2
TSP-2	Thrombospondin-2
U	Units
UPLC	Ultra-Performance Liquid Chromatography
UPS	Unconventional protein secretion
UV/VIS	Ultraviolet/visible
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Weight per volume
хg	Maßeinheit der relativen Zentrifugalkraft

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.1: Vereinfachte Darstellung der Insulinsignalkaskade und der GLUT-4-	
Translokation zur Plasmamembran4	ŀ
Abb. 2: Zusammenfassende Darstellung des experimentellen Ablaufs	3
Abb. 3: Abundanz von pAKT-Ser473 und pAKT-Thr308 sowie das Verhältnis der	
Abundanzen von pAKT zu AKT in Kontroll- und Palmitat-behandelten C2C12-Zellen.	
	ŀ
Abb. 4: Abundanz von pAKT-Ser473 und pAKT-Thr308 sowie das Verhältnis der	
Abundanzen von pAKT zu AKT in Kontroll- und mit High insulin behandelten C2C12-	
Zellen	\$
Abb. 5: Abundanz von pAKT-Ser473 und das Verhältnis der Abundanzen von pAKT zu	
AKT in Kontroll- und mit verschiedenen TNF- $\alpha$ -Konzentrationen behandelten C2C12-	
Zellen	3
Abb. 6: Abundanz von pAKT-Ser473 und das Verhältnis der Abundanzen von pAKT zu	
AKT in Kontroll- und mit Chemerin behandelten C2C12-Zellen	)
Abb. 7: QC-Gel der eingeengten Überstände Palmitat-behandelter Zellen 52	2
Abb. 8: QC-Gel der eingeengten Überstände von High insulin behandelten Zellen 52	)
Abb. 9: Workflow für die Vorhersage von sekretierten Proteinen im Palmitat- und im	
High insulin – Sekretom nach EPS54	ŀ
Abb. 10: Hauptkomponentenanalysen der normalisierten Proteinabundanzen im	
Palmitat- und im High insulin - Sekretom	\$
Abb. 11: Hauptkomponentenanalysen der normalisierten Proteinabundanzen	
signifikant regulierter Proteine im Palmitat- und im High insulin - Sekretom	'
Abb. 12: Klassifikation der Proteine im Palmitat-Sekretom mit SignalP, SecretomeP	
und OutCyte	3
Abb. 13: Klassifikation der Proteine im High insulin - Sekretom mit SignalP,	
SecretomeP und OutCyte	3
Abb. 14: Volcano Plots der kontraktionsabhängig sekretierten Proteine im Palmitat-	
und im <i>High insulin</i> - Sekretom60	)
Abb. 15: Venn-Diagramm: Darstellung der überlappenden Proteine im Palmitat-	
Sekretom und High insulin - Sekretom	)

# TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: benötigte (Verbrauchs-)Materialien, deren Hersteller und dessen Firmensitz
Tabelle 2: verwendete Chemikalien, ihr Hersteller und dessen Firmensitz 16
Tabelle 3: Puffer und Lösungen sowie deren Konzentration bzw. Zusammensetzung;
Herstellerangaben der einzelnen Inhaltsstoffe sind in Tabelle 2 "Chemikalien" gelistet.
Tabelle 4: Zellkultur-Medien und ihre Zusammensetzung; Herstellerangaben der
einzelnen Inhaltsstoffe finden sich in Tabelle 2 "Chemikalien"
Tabelle 5: Antikörper für die Western Blot Analyse mit Produktnummer, verwendeter
Verdünnung und Hersteller sowie dessen Firmensitz21
Tabelle 6: im Rahmen der Experimente genutzte Geräte, deren Hersteller und dessen
Firmensitz
Tabelle 7: verwendete Softwareprogramme, deren Hersteller und ihre Version 24
Tabelle 8: BSA-Konzentration je Well und je Standard für die BCA-Proteinbestimmung
Tabelle 9: Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels für die SDS-PAGE 32
Tabelle 10: Zusammensetzung der Gel-Schichten eines Polyacrylamidgels für den In-
Gel-Proteinase-Verdau
Tabelle 11: Vorgehensweise bei der Coomassie <sup>®</sup> -Blaufärbung
Tabelle 12: Volumina der Überstände Palmitat-behandelter und High insulin-
behandelter Zellen vor und nach Ultrafiltration50
Tabelle 13: Mittels NanoDrop gemessene Proteinkonzentrationen der eingeengten
Überstände Palmitat-behandelter und High insulin-behandelter Zellen
Tabelle 14: Gegenüberstellung der Myokine im Overlap von Palmitat- und High insulin
- Sekretom61
Tabelle 15: Myokine im Overlap, analysiert innerhalb des Palmitat-Sekretoms 62
Tabelle 16: Myokine im Overlap, analysiert innerhalb des High insulin - Sekretoms 63
Tabelle 17: Top 15 der signifikant regulierten Proteine im Palmitat-Sekretom 64
Tabelle 18: Top 15 der signifikant regulierten Proteine im High insulin - Sekretom 65
Tabelle 19: Top 100 der signifikant regulierten Proteine im Palmitat-Sekretom
Tabelle 20: Top 100 der signifikant regulierten Proteine im High insulin - Sekretom 92

## INHALTSVERZEICHNIS

1	EINI	EITUN	IG	1
1.1		Diabe	tes mellitus Typ 2	1
		1.1.1	Insulin-Signaling und Insulinresistenz der Skelettmuski	ulatur 2
		1.1.2	Insulinresistenz auf molekularer Ebene	4
	1.2	Skelet	ttmuskulatur als endokrines Organ	5
		1.2.1	Das Myokin-Konzept	6
		1.2.2	Beispiele bekannter Myokine	7
		1.2.3	Sekretomanalyse	8
	1.3	Das C	2C12-Zellmodell	10
	1.4	Sport	in-vitro: Elektropulsstimulation	11
	1.5	Ziele	der Arbeit	13
2	MATERIAL UND METHODEN			14
	2.1	Zelllinie		
	2.2	(Verbrauchs-)Material		14
	2.3	Chem	ikalien	16
	2.4	Puffer	r und Lösungen	19
	2.5	Zellku	Itur-Medien	21
	2.6	Antikö	örper	21
	2.7	Gerät	e	
	2.8	Softw	areprogramme	24
	2.9	Zellku	ltur	24
		2.9.1	Auftauen von C2C12-Zellen	25
		2.9.2	Passage und Aussaat	25
		2.9.3	Differenzierung zu Myotuben	
		2.9.4	Etablierung von in-vitro-Insulinresistenz-Protokollen	
		2.9.5	Akute Insulinstimulation	
		2.9.6	Elektropulsstimulation	29
		2.9.7	Sammlung der Zellüberstände und Zell-Pelleting	
				Х

	2.10	Western Blot Analyse	30
		2.10.1 Lyse der Zellen	30
		2.10.2 Proteinbestimmung	31
		2.10.3 Gel-Elektrophorese	32
		2.10.4 Transfer und Blocking	33
		2.10.5 Antikörper-Inkubation	34
		2.10.6 Detektion mit Chemilumineszens	34
	2.11	Probenaufbereitung, Massenspektrometrie und Bioinformatik	34
		2.11.1 Probenaufbereitung	35
		2.11.2 Massenspektrometrische Messung	39
		2.11.3 Analyse der Rohdaten	41
		2.11.4 Bioinformatische Analyse, Gen-Ontologie-Analyse	41
	2.12	Statistik und Software	41
3	ERG	EBNISSE	43
	3.1	Analyse des Insulin Signalings in murinen Myotuben nach	
	Beha	andlung mit Palmitat, <i>High insulin</i> , TNF- $\alpha$ und Chemerin	43
		3.1.1 Der Effekt von Palmitat auf die Insulinsignalkaskade in murin Myotuben	ien 43
		3.1.2 Der Effekt von chronischer Insulinexposition auf die	
		Insulinsignalkaskade in murinen Myotuben	45
		3.1.3 Der Effekt von TNF- $\alpha$ auf die Insulinsignalkaskade in murine Myotuben.	n 47
		3.1.4 Der Effekt von Chemerin auf die Insulinsignalkaskade in murinen Myotuben	48
	3.2	Messung der Proteinkonzentration und Qualitätskontrolle	50
	3.3 EPS	Komparative Sekretomanalyse insulinresistenter C2C12-Zellen nac 53	h
		3.3.1 Hauptkomponentenanalyse der normalisierten	
		Proteinabundanzen im Sekretom von Palmitat – und mit High insuli	n _ ·
		behandelten C2C12-Zellen	54

		3.3.2 bioinfo	Identifizierung potenziell sekretorischer Proteine anhand der ormatischen Algorithmen <i>SignalP</i> , <i>SecretomeP</i> und <i>OutCyte</i> .	58
		3.3.3 im Sel C2C12	Quantifizierung der kontraktionsabhängig regulierten Proteine kretom von Palmitat- und mit <i>High insulin –</i> behandelten 2-Zellen anhand von Vulkandiagrammen5	, 59
		3.3.4 Palmit	Vergleich der signifikant regulierten Proteine im Sekretom at-behandelter und <i>High insulin</i> -behandelter C2C12-Zellen6	30
4	DIS	KUSSIC	DN6	37
	4.1	Das ex	xperimentelle <i>Set-up</i> 6	38
		4.1.1	Etablierung der Insulinresistenz6	38
		4.1.2	Batch-Effekt7	'0
	4.2 beh	Das p andelte	utative Sekretom von Palmitat-behandelten und mit <i>High insul</i> n Zellen nach EPS7	in 70
		4.2.1 Sekret	Ausgewählte Myokine des Palmitat- und <i>High insulin-</i> toms7	72
	4.3	Schlus	ssfolgerungen und Ausblick7	7
5	LITE	RATUR	R- UND QUELLENVERZEICHNIS 8	30
6	ANF	IANG	ε	38

## **1 EINLEITUNG**

### 1.1 Diabetes mellitus Typ 2

Mit "Diabetes mellitus" wird eine heterogene Gruppe von Stoffwechselerkrankungen zusammengefasst. Nach der American Diabetes Association (ADA) wird zwischen Diabetes mellitus Typ 1 (autoimmun bedingte β-Zell-Destruktion und meist absoluter Insulinmangel), Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM, fortschreitender Verlust der β-Zell-Funktion, häufig vor dem Hintergrund einer Insulinresistenz), Gestationsdiabetes (während der Schwangerschaft erstdiagnostizierte Glukosetoleranzstörung) sowie spezifischen Diabetestypen (z.B. monogenetische Syndrome, Erkrankungen des exokrinen Pankreas) unterschieden. In 90 – 95 % der Fälle liegt ein T2DM vor [1]. Dabei bildet Diabetes eine ernst zu nehmende Public Health Krise [2]. Aktuell leben etwa 537 Millionen Menschen weltweit mit dieser Erkrankung, die International Diabetes Federation (IDF) prognostiziert jedoch, dass die Anzahl der weltweit Betroffenen (20-79-Jährige) voraussichtlich auf 643 Millionen im Jahr 2030 und 783 Millionen im Jahr 2045 steigt [3]. In Deutschland sind aktuell etwa 8,9 Millionen Menschen betroffen und vom Deutschen Diabetes Zentrum sowie Robert-Koch-Institut wird prognostiziert, dass im Jahr 2040 bis zu 12 Millionen Menschen in Deutschland an T2DM erkrankt sein könnten [4].

Dem T2DM liegt eine defizitäre Insulinwirkung (Insulinresistenz peripherer Gewebe) und/oder ein fortschreitender Verlust der pankreatischen β-Zell-Insulinsekretion zugrunde. Klinisch resultiert ein erhöhter Blutzuckerspiegel (Hyperglykämie) [1, 5]. Eine mangelhafte Blutzuckerkontrolle erhöht dabei das Risiko des Auftretens verschiedener Organschädigungen, u.a. aufgrund atherosklerotischer Gefäßveränderungen, insb. des Herz-Kreislaufsystems, der Augen (Retinopathie und möglicher Sehverlust), Nieren (Nephropathie mit dem Risiko eines Nierenversagens) und Nerven (periphere und autonome Neuropathie) [5, 6]. Zu den Risikofaktoren bezüglich Entwicklung eines T2DM zählen Übergewicht (Body Mass Index, BMI  $\ge$  25 kg/m<sup>2</sup>) und körperliche Inaktivität, Alter, Rauchen, Diabetes in der Familienanamnese und die Ethnizität, wobei u.a. Übergewicht sowie körperliche Inaktivität eine starke Assoziation hierzu zeigen [1, 7]. Diabetes-Folgeerkrankungen können allerdings durch akkurate medikamentöse Therapie und Lifestyle-Modifikationen (Ernährung und körperliche Aktivität) verzögert werden. Körperliche Aktivität ist demnach sowohl ein wichtiger Eckpfeiler in der T2DM-Prävention als auch -Therapie. Zu den zahlreichen positiven Effekten zählt u.a. die Verbesserung der Insulinresistenz [8, 9]. Darüber hinaus kann die Kombination aus Sport und gesunder Ernährung (Diät) sogar den Ausbruch von T2DM bei übergewichtigen Personen verhindern und stellt somit eine Alternative zur pharmakologischen Behandlung mit Metformin dar [10]. Leider profitieren jedoch nicht alle T2DM-Patienten in gleichem Maße von Sport-Interventionen, es existieren ebenso Non-Responder. In Studien konnte ein erheblicher Unterschied in der Fähigkeit der Probanden aufgezeigt werden, infolge von Trainingsprogrammen ihren HbA<sub>1c</sub>

(Hämoglobin A<sub>1c</sub>) -Wert oder BMI zu verringern [11]. Für die individuelle T2DM-Therapie ist es demnach relevant, zelluläre Signalwege und biologische Mechanismen aufzudecken, welche der Erkrankung und möglichen sportinduzierten Verbesserungen unterliegen. Jedoch scheitert die Verschreibung von Bewegung als Therapie häufig an mangelnder Bereitschaft von Patienten, ein dauerhaftes Trainingsprogramm durchzuführen. Darüber hinaus können sich viele Menschen aufgrund von T2DM-Komorbiditäten nicht ausreichend bewegen, einschließlich Erkrankungen, die aber durch eine sitzende Lebensweise verschlimmert werden. Dementsprechend besteht großes Forschungsinteresse an der Entwicklung neuer Therapien, die die Wirkung von körperlicher Betätigung imitieren [12, 13].

#### 1.1.1 Insulin-Signaling und Insulinresistenz der Skelettmuskulatur

Die Insulinresistenz (IR) ist ein entscheidender Faktor in der T2DM-Pathophysiologie. Unter "Insulinresistenz" versteht man die verminderte Sensitivität der Zellen peripherer Gewebe gegenüber dem Hormon Insulin. IR ist ein bedeutendes Kennzeichen von Adipositas, häufig begleitet von Bewegungsmangel und ein T2DM-Vorläufer, zudem nimmt die Prävalenz in allen Altersstufen zu [8, 14, 15]. Die Fähigkeit von Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe, Glukose aufzunehmen bzw. insulinabhängig Glukose zu speichern, wird beeinträchtigt. Zusätzlich kommt es zum Verlust der insulinvermittelten, hemmenden Wirkung auf die hepatische Glukoseproduktion - mit der Folge einer Hyperglykämie [16]. Um eine vorhandene IR zu kompensieren, produzieren pankreatische β-Zellen zunächst mehr Insulin, sodass eine Hyperinsulinämie resultiert, bevor ein sukzessives β-Zell-Versagen eintritt und ein manifester T2DM entsteht [17]. Zusätzlich schädigen erhöhte Glukosespiegel die pankreatischen β-Zellen über die Induktion von oxidativem Stress [18]. Die IR der Skelettmuskulatur gilt als wichtigste extrapankreatische Ursache für die T2DM-Entwicklung und kann Jahrzehnte vor einem  $\beta$ -Zell-Versagen und einem T2DM auftreten [12, 16, 19]. Die Skelettmuskulatur ist das größte Organ unseres Körpers und essenzieller Bestandteil des Glukosestoffwechsels. Über 80 % der oral zugeführten Glukose wird von der Skelettmuskulatur aufgenommen [12, 19]. Im Gegensatz zu den beiden anderen humanen Muskelgewebetypen (glatte Muskulatur und Herzmuskulatur) kann die guergestreifte Skelettmuskulatur außerdem willentlich über das somatische Nervensystem kontrolliert werden [12]. Unter physiologischen Bedingungen stimuliert Insulin im Skelettmuskel den

Glukosetransport über den Glukosetransporter 4 (GLUT-4), die Glykogensynthese sowie die Proteinsynthese [20]. Nachdem Insulin an seinen Rezeptor an der Muskelzelloberfläche gebunden hat, wird GLUT-4 aus intrazellulären Speicher-Vesikeln zur Plasmamembran transloziert. Damit Insulin auf den Glukosestoffwechsel wirkt, ist die Aktivierung der Insulinsignalkaskade folglich essenziell [16]. Abbildung 1 zeigt dabei eine vereinfachte Darstellung der Reaktionen des Insulinsignalweges sowie die GLUT-4-Translokation aus intrazellulären Vesikeln zur Plasmamembran. Jeder Schritt der Signalkaskade ist eine reversible enzymatische Reaktion durch das Vorhandensein von Proteinphosphatasen [21]. Beim Insulinrezeptor handelt sich um ein aus zwei α- und zwei β-Untereinheiten bestehendes Tetramer aus der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Die beiden a-Untereinheiten liegen extrazellulär und bilden die insulinbindende Domäne. Die beiden β-Untereinheiten weisen jeweils eine extrazelluläre, eine transmembrane sowie eine intrazelluläre Domäne auf, wobei letztere die für die Signaltransduktion notwendige Tyrosinkinase-Aktivität enthält. Die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor führt durch Konformationsänderungen der intrazellulären β-Untereinheiten zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase. Darauf folgt die Transphosphorylierung der β-Untereinheiten und multiple Tyrosin-Phosphorylierungen innerhalb des Rezeptors sowie der IRS (insulin receptor substrate) - Proteine [22]. Säugetiere weisen vier Isoformen der IRS-Proteine (IRS1 – 4) auf. Menschen fehlt IRS3 [23]. Vor allem sind IRS1 und 2 an der Stoffwechselhomöostase beteiligt [24]. Phosphotyrosin-Reste der IRS-Proteine ermöglichen die Bindung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), welche Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) an der Plasmamembran synthetisiert. PIP<sub>3</sub> bindet dann die Phosphoinositid-abhängige Kinase (PDK), welche die Proteinkinase B (AKT) am Threonin<sup>308</sup>-Rest phosphoryliert. Eine zweite Phosphorylierung aktiviert AKT nun vollständig und erfolgt durch mTORC2 (mechanistic target of rapamycin complex 2) am Serin<sup>473</sup>-Rest [20]. Aktiviertes AKT phosphoryliert wiederum einige Substrate an deren Serin-/Threonin-Resten, darunter die FOXO (forkhead family box O) -Transkriptionsfaktoren, das Protein TSC2 (tuberous sclerosis complex 2), die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) sowie die beiden verwandten RabGAPs (Rab GTPase activating proteins) TBC1D1 (TBC1 domain family member 1) und TBC1D4 (TBC1 domain family member 4, auch bekannt als AS160 = AKT substrate of 160 kDa) [21, 22, 25]. Die Serin-/Threonin-Kinase AKT nimmt demnach eine wichtige Position innerhalb der Insulinsignalkaskade ein (vgl. Abb.1). Man unterscheidet bei Säugetieren drei Isoformen (AKT1 - 3), wobei AKT1 ubiquitär exprimiert wird, AKT2 vornehmlich in der Leber, im Fettgewebe und in der Muskulatur und AKT3 besonders im Gehirn und im Hoden [26]. Es konnte gezeigt werden, dass die AKT-Kinase-Aktivität nach Insulinstimulation im Skelettmuskel von Menschen und Mäusen mit T2DM und IR vermindert war. Dies unterstreicht die Rolle von AKT als zentralen Regulator der Insulinwirkung [27, 28]. AKT-Phosphorylierung ist dementsprechend ein häufig genutztes Readout der zellulären Wirkung von Insulin [17].



## Abb.1: Vereinfachte Darstellung der Insulinsignalkaskade und der GLUT-4-Translokation zur Plasmamembran.

Simplifizierte Darstellung der intrazellulären Reaktionen nach Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor sowie Translokation von Glukosetransporter 4 zur Plasmamembran. IRS = insulin receptor substrate; PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase; PIP2 = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PIP3 = Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat; mTORC2 = mechanistic target of rapamycin complex 2; PDK = Phosphoinositid-abhängige Kinase; AKT = Proteinkinase B; P-Ser473 = Phosphorylierung (von AKT) am Serin473-Rest; P-Thr308 = Phosphorylierung (von AKT) am Threonin308-Rest; TSC2 = tuberous sclerosis complex 2; FOXO = forkhead family box O; GSK3 = Glykogensynthase-Kinase 3; TBC1D1/4 = TBC1 domain family member 1/4; GLUT-4 = Glukosetransporter 4. Die Abbildung wurde mittels BioRender.com (2024) erstellt und basiert auf zuvor publizierten Beschreibungen und Abbildungen [20, 21].

#### 1.1.2 Insulinresistenz auf molekularer Ebene

Im Rahmen von Stoffwechselerkrankungen wie T2DM ist die Skelettmuskulatur abnormalen systemischen Konzentrationen an Fettsäuren, Zytokinen, Insulin und Glukose ausgesetzt. Die Insulinsignalübertragung kann dabei durch verschiedene molekulare Mechanismen beeinträchtigt werden, wobei die genauen Prozesse, die der IR zugrunde liegen, noch nicht vollständig geklärt sind [29].

IR und Übergewicht stehen hierbei in einem Zusammenhang, vor allem bei vorliegender viszeraler Adipositas. Viszerales Fettgewebe ist anfällig für eine chronische Entzündungsreaktion und gilt als mitverantwortlich für die Entstehung von IR und T2DM. Zudem sind IR und T2DM mit einem erhöhten Anteil freier Fettsäuren im Blut sowie zirkulierenden pro-inflammatorischen Zytokinen assoziiert [12, 30]. Das Fettgewebe sowie vor allem dort anwesende Makrophagen werden als Quelle dieser sekretierten Zytokine angesehen. Ein Anstieg der Konzentration dieser von Makrophagen stammenden Faktoren bei Adipositas führt wiederum zu einer chronischen, niedriggradigen Entzündung, auch *low-grade inflammation* genannt, welche mit der Entstehung von IR und T2DM assoziiert wird. Das Protein TNF-α (*tumor necrosis factor a*) war dabei der erste aus dem Fettgewebe stammende Faktor, von dem angenommen wurde, dass er eine Verbindung zwischen Übergewicht, Entzündung und T2DM darstellt. TNF-α führt auf molekularer Ebene zu einer Beeinträchtigung des Insulin-*Signalings*, indem die IRS-Signalweiterleitung über Serin-

Phosphorylierung inhibiert wird. [31-33]. Chemerin, ein weiteres mit T2DM assoziiertes Protein, zählt ebenfalls zu den sog. Adipokinen. Die Freisetzung korreliert mit dem BMI. Zudem konnte eine Assoziation zwischen Chemerin und Entzündungsmarkern wie CRP (C-reaktives Protein) sowie dem metabolischen Syndrom gezeigt werden. Zusätzlich wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass artifiziell eine Insulinresistenz mittels Chemerin in humanen Skelettmuskelzellen induziert werden konnte [34, 35].

Zu den im Blut übergewichtiger Personen erhöhten freien Fettsäuren zählen u.a. gesättigte Fettsäuren wie Palmitinsäure (PA, palmitic acid), einfach ungesättigte Fettsäuren wie Ölsäure und mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure [36]. Über die Nahrung aufgenommene gesättigte Fettsäuren wie PA werden dabei als Verursacher einer muskulären IR betrachtet. Sie weisen eine verminderte ß-Oxidationsrate auf und werden vermehrt in der Muskulatur in Form von intramyozellulären Lipiddepots gespeichert. Darüber hinaus wird der zelluläre Gehalt an Ceramiden und Diacylglycerinen (DAG) durch PA erhöht. Gesättigte Fettsäuren weisen eine geringere Affinität für die Diacylglycerin-Acyltransferase 2 (DGAT2) auf, welche die Umwandlung von DAG zu TAG (Triacylglycerin) katalysiert. Zusätzlich sind langkettige gesättigte Fettsäuren das geschwindigkeitsbegrenzende Substrat der Serin-Palmitoyltransferase, welche die Ceramid-Bildung katalysiert [37]. Ceramide und DAG sind proinflammatorische Moleküle, die sich nachweislich in peripheren Geweben insulinresistenter Nagetiere anreichern und das Insulin-Signaling in verschiedenen isolierten Geweben und Zellen (einschließlich C2C12-Zellen, vgl. Abschnitt 1.3 "Das C2C12-Modell") über die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) hemmen [38, 39]. Langkettige Fettsäuren wie PA gelangen über Diffusion oder Protein-vermittelten Transport in die Muskelzelle, bei Letzterem vor allem über die Translokase FAT/CD36 (fatty acid translocase/cluster of differentiation 36) sowie die Transportproteine FATP1 und FATP4 (fatty acid transport protein 1 and 4) [40]. Auch eine Hyperinsulinämie wird mit IR assoziiert, wobei die Ursache-Wirkung-Beziehung diskutiert wird. Das vorherrschende Paradigma lautet, dass eine IR den primären Defekt in der T2DM-Pathogenese ausmacht und kompensatorisch eine Hyperinsulinämie entsteht, um die verminderte Insulinwirkung auszugleichen [41]. Andererseits beeinträchtigt eine Hyperinsulinämie ihrerseits die Insulinsignalübertragung in verschiedenen metabolischen Zelltypen wie beispielsweise in Myozyten und Adipozyten, induziert wird folglich eine IR [29].

### 1.2 Skelettmuskulatur als endokrines Organ

Da die Skelettmuskulatur als größtes Organ unseres Körpers den vorherrschenden Ort der postprandialen Glukose-*Clearance* bildet, wird angenommen, dass die muskuläre IR eine der Hauptursachen für T2DM ist. Neben der Glukose-Aufnahme dient die Skelettmuskulatur der Fortbewegung, Haltungsunterstützung, Atmung und Thermogenese. Die Skelettmuskulatur ist jedoch nicht nur Bestandteil unseres Bewegungsapparates, sondern fungiert auch als sekretorisches Organ. Zytokine, Proteine oder Peptide, die von Muskelfasern produziert, exprimiert und freigesetzt werden, werden als "Myokine" bezeichnet. Myokine wirken autokrin im Muskel selbst und sind an der parakrinen sowie endokrinen Regulation anderer Organe beteiligt, einschließlich des Pankreas, des Fettgewebes, der Leber, des Gehirns und Herzens [42]. Viele Myokine werden zudem kontraktionsabhängig sezerniert, daher tragen sie wahrscheinlich zur Vermittlung des gesundheitlichen Nutzens von Bewegung bei, inklusive der Verbesserung einer IR. T2DM ist darüber hinaus mit einer dysfunktionalen Myokin-Sekretion assoziiert [42, 43]. Bis 2016 wurden schätzungsweise über 3000 mögliche Myokine in Menschen und Nagetieren identifiziert, und in den vergangenen 10 – 15 Jahren ist das Myokin-Forschungsfeld weiterhin expandiert [44]. Forschung zur Rolle der Myokine innerhalb des Energiestoffwechsels könnte in Zukunft zur Entwicklung neuer Diabetes-Therapiemöglichkeiten beitragen, z.B. durch Entwicklung von Myokin-Mimetika [45]. Außerdem könnten Myokine, die bewegungsabhängig sezerniert werden, als prognostische Biomarker dienen. Expressionsprofile der Myokine könnten die Grundlage individueller Trainingsprogramme bilden und somit den gesundheitsfördernden Nutzen von Bewegung auf den Stoffwechsel erhöhen [43, 45].

#### 1.2.1 Das Myokin-Konzept

Schon vor etwa 60 Jahren wurde vermutet, dass Skelettmuskelzellen einen "humoralen Faktor" während der Kontraktion infolge eines erhöhten Glukosebedarfs freisetzen [46]. Diese Ansicht wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass eine elektrische Stimulation der gelähmten Muskulatur Rückenmarksverletzter für 1 Jahr einige der gleichen physiologischen Veränderungen ausgelöst hat wie bei gesunden Personen [47]. Somit musste die kontrahierende Skelettmuskulatur in der Lage sein, über Freisetzung entsprechender "Bewegungs-Faktoren" mit anderen Organen zu kommunizieren. Im Jahr 2000 konnte dann gezeigt werden, dass die menschliche Skelettmuskulatur bei längerer Belastung signifikante Mengen Interleukin 6 (IL-6) in den Kreislauf freisetzt und somit als erstes Myokin als sogenannter "exercise factor" beschrieben wurde [42, 48]. Weitere Studien bestätigten die Tatsache, dass IL-6 metabolische Funktionen einnahm. Ebenso wie Adipozyten sind folglich auch Myozyten (Muskelzellen) wichtige endokrine Zellen [42, 49]. Der Begriff "Myokin" sowie dessen Definition wurde schließlich von Pedersen et al. geprägt, um Zytokine oder andere Peptide, die von Muskelfasern produziert, exprimiert und freigesetzt werden sowie endokrine, parakrine oder autokrine Wirkung besitzen, zu klassifizieren [42]. Myokine können darüber hinaus positive Effekte von Bewegung vermitteln - eine wichtige Funktion im Hinblick auf Erkrankungen, die mit einer körperlich inaktiven Lebensweise einhergehen, wie beispielsweise T2DM [42, 50, 51].

#### 1.2.2 Beispiele bekannter Myokine

Die Liste neuer Myokine hat in den letzten Jahren stark zugenommen [52]. Umfassende Analysen von Myokin-Netzwerken, welche das Zusammenspiel auf sowohl autokrinem als auch para- und endokrinem Level in Gesundheit und Krankheit analysieren, werden in Zukunft dazu beitragen, auserwählte Myokine als potenzielle Therapeutika oder Biomarker bestimmen zu können [43].

Im Folgenden sollen beispielhaft drei der bekanntesten Myokine und ihre Wirkungen näher beschrieben werden.

#### 1.2.2.1 Interleukin-6

IL-6 ist das am meisten untersuchte und das erste Myokin, bei dem eine Sekretion in den Blutkreislauf infolge muskulärer Kontraktion gezeigt werden konnte [53]. Nach sportlicher Betätigung kann die IL-6-Plasmakonzentration auf das bis zu 100-fache ansteigen. Laufen scheint die Sportart zu sein, bei der mehrere große Muskelgruppen beteiligt sind und die zum höchsten IL-6-Anstieg im Plasma führt [54]. IL-6 erhöht in Myozyten die basale und insulinstimulierte Glukoseaufnahme, die GLUT-4-Translokation zur Plasmamembran sowie die Fettsäure-Oxidation. Die Infusion von rekombinantem humanem IL-6 in-vivo verbesserte außerdem bei gesunden Probanden die periphere insulinstimulierte Glukoseaufnahme [55]. IL-6 wird aber auch mit T2DM und IR in Verbindung gebracht. Kim et al. untersuchten die Auswirkungen einer IL-6-Behandlung auf die Insulinwirkung und den Glukosestoffwechsel bei Mäusen in-vivo während euglykämischer Insulin-Clamps. Dabei verminderte IL-6 die Insulinwirkung in der Leber und verringerte die Glukoseaufnahme in der Skelettmuskulatur [56]. In der Literatur wurde auch beschrieben, dass eine durch Palmitat induzierte IL-6-Produktion in Myozyten ebenfalls mit einer verminderten Glukoseaufnahme assoziiert werden konnte [57]. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass IL-6-defiziente Mäuse zunehmen und eine IR entwickeln [58]. Die positiven Auswirkungen von IL-6 auf den Fettstoffwechsel im Sinne einer erhöhten Lipolyse und Fettsäure-Oxidation konnten sowohl in-vitro als auch in-vivo gezeigt werden [59]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die muskuläre IL-6-Sekretion durch Sport stimuliert wird, aber die Rolle von IL-6 bei T2DM noch nicht eindeutig definiert ist [43].

#### 1.2.2.2 Irisin

Bei Irisin handelt es sich ebenfalls um ein Myokin, dessen Freisetzung aus der Skelettmuskulatur bewegungsabhängig stattfindet [60]. Es wurde berichtet, dass Irisin weißes Fettgewebe phänotypisch umwandeln kann und dies zu einem Anstieg des Gesamtenergieverbrauchs und der Thermogenese führt. Dieses Phänomen wird *"browning"* genannt und beschreibt die Umwandlung von weißem in braunes Fettgewebe [60, 61]. Der *Browning*-Effekt von Irisin konnte bisher allerdings nicht beim Menschen nachgewiesen werden, nur bei Nagetieren und Primaten [62]. Das entsprechende Gen kodiert für das Transmembranprotein FNDC5 *(fibronectin type III domain-containing protein 5)*, welches proteolytisch gespalten und dann als Irisin sekretiert wird. Boström et al. zeigten erstmals in Mäusen, dass der Transkriptionskoaktivator PGC1-a (peroxisome proliferator-activated receptor-y coactivator 1a) eine erhöhte FNDC5-Expression im Muskel induziert. PGC1-a wird durch Bewegung stimuliert und vermittelt einige positive Effekte von Sport wie eine erhöhte mitochondriale Biogenese sowie Angiogenese im Skelettmuskel. In der Studie konnte eine erhöhte FNDC5-Expression in von trainierten Mäusen gewonnen Muskeln gezeigt werden, ebenso erhöhte Irisin-Plasmaspiegel bei Mäusen und Menschen nach Ausdauer-Training. Irisin ist zu 100 % identisch zwischen beiden Spezies, ein Rezeptor ist in den meisten Geweben jedoch noch nicht bekannt [61]. In Osteozyten und Adipozyten konnten bestimmte Integrine jedoch als funktionelle Irisin-Rezeptoren ausgemacht werden [63]. Darüber hinaus haben klinische Studien gezeigt, dass die zirkulierenden Irisin-Spiegel bei T2DM-Patienten vermindert sind [43, 64]. Eine Irisin-Behandlung verbesserte zudem die Insulin-stimulierte Glukoseaufnahme von C2C12-Muskelzellen, die einem T2DM-imitierenden Milieu aus hohen Palmitat-Spiegeln ausgesetzt waren [65]. Auch auf pankreatische β-Zellen scheint Irisin positiven Einfluss zu haben. In einer Studie konnte Irisin die Proliferation von kommerziell erhältlichen β-Zellen aus Ratten (INS 1E) verbessern, ihre Insulinproduktion steigern sowie die Zellen vor Hyperglykämie-induzierter Apoptose schützen [66].

#### 1.2.2.3 Myostatin

Myostatin war das erste Myokin, das 1997 identifiziert wurde und ist Mitglied der TGF (*transforming growth factor*) -  $\beta$ -Superfamilie [53, 67]. Insgesamt wird es als Myokin mit vornehmlich negativen Wirkungen beschrieben, das die Glukoseaufnahme und das Muskelwachstum sowie die -funktion beeinträchtigt [43]. Mäuse und Rinder mit einem Myostatin-Mangel aufgrund von Genmutationen sind größer als Kontrolltiere, was darauf hindeutet, dass Myostatin übermäßiges Muskelwachstum verhindert [68, 69]. Menschen mit Mutationen in beiden Kopien des Myostatin-Gens wiesen im Vergleich zu normalen Personen eine signifikant erhöhte Muskelmasse und Muskelkraft auf [53, 70]. Außerdem erhöht die muskelspezifische Hemmung von Myostatin die GLUT1 und GLUT4 Spiegel im Rattenmuskel, verbessert somit die Glukosetoleranz [71]. Myostatin ist darüber hinaus mit Muskelatrophie und -dystrophie assoziiert. Es wurden mehrere Medikamente getestet, z.B. der Myostatin-Antikörper Stamulumab (MYO-029), jedoch konnte bisher keine ausreichende klinische Wirksamkeit erzielt werden [72, 73].

#### 1.2.3 Sekretomanalyse

Ein Sekretom beinhaltet Proteine, die von Zellen und Organen zu einem bestimmten Zeitpunkt sezerniert werden. Sekretorische Proteine sind essenziell für die Signaltransduktion und Zell-Zell-Kommunikation. Die Massenspektrometrie bildet dabei eine leistungsstarke Methode zur Identifizierung, Charakterisierung und Quantifizierung sekretorischer Proteine. Folglich versteht man unter *Secretomics* (Sekretomik) ein Teilgebiet der *Proteomics* (Proteomik), da Proteine analysiert werden, die von Zellen sekretiert werden. Es werden folgende Hauptmethoden unterschieden, um sekretorische Proteine aus der Gesamtheit identifizierter Proteine zu differenzieren: über entsprechende Suchbegriffe wie *"extracellular"* bei *Gene Ontology Cellular Component* und über die Vorhersage von Signalsequenzen mittels *SignalP* und bestimmter Aminosäuresequenzen anhand von *SecretomeP* [74]. Neben *SecretomeP* ist *OutCyte* darüber hinaus ein *Tool* zur Vorhersage der sog. unkonventionellen Proteinsekretion (vgl. Abschnitt 1.2.3.1 "Mechanismen der Proteinsekretion") [75]. Mittlerweile haben viele Forschungsgruppen mit verschiedenen Arten der Proteomanalyse zur Identifikation des Muskelzell-Sekretoms beigetragen [52]. Die Gruppe um *Deshmukh et al.* hat beispielsweise insulinresistente murine C2C12-Muskelzellen mittels Palmitat-Stimulation generiert und 1073 potenziell sekretierte Proteine identifiziert, darunter 32 Wachstumsfaktoren, 25 Zytokine und 29 Metalloproteinasen [76]. Auch die Gruppe um *Grube et al.* verwendete C2C12-Zellen und identifizierte 672 Proteine, die eine erhöhte Abundanz im Sekretom aufwiesen [77].

Mit jeder Sekretom-Studie erweitert sich unser Wissen über die Zusammensetzung des muskulären Myokinoms. Die meisten der identifizierten Myokine sind noch nicht vollständig hinsichtlich ihrer biologischen Funktion charakterisiert [42].

#### 1.2.3.1 Mechanismen der Proteinsekretion

Der klassische oder auch "konventionell" genannte Sekretionsweg (*conventional protein secretion*, CPS) beschreibt die Freisetzung von Proteinen an der Plasmamembran, nachdem diese durch das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat transportiert wurden. Klassisch sezernierte Proteine tragen ein Nterminales Signalpeptid, welches ko- oder posttranslational vom *signal recognition particle* (SRP) erkannt wird. Das SRP bindet sowohl an das Signalpeptid des Proteins als auch an den *signal recognition particle receptor* (SR), und gemeinsam vermitteln SRP und SR den Proteintransport ins ER. Über *coat protein complex II* (COP II)-Vesikel gelangen die gefalteten Proteine dann aus dem ER zum Golgi-Apparat und werden schließlich an der Plasmamembran über sekretorische Vesikel oder Granula freigesetzt [78, 79]. *SignalP* ist ein auf maschinellem Lernen basierender Algorithmus, welcher die Wahrscheinlichkeit eines vorhandenen Signalpeptids und damit die Wahrscheinlichkeit für CPS vorhersagen kann [80].

Auch Proteine ohne Signalpeptid können sezerniert werden und der zugehörige Sekretionsmechanismus wird dann als "unkonventionell" (*unconventional protein secretion*, UPS) bezeichnet. Proteine ohne Signalsequenz können z.B. über die Formierung von Poren in der Plasmamembran oder über membrangebundene Strukturen wie Mikrovesikel oder Endosomen in den Extrazellulärraum gelangen. Mikrovesikel entstehen durch Ausknospung der Plasmamembran und sind typischerweise 50 – 1000 nm groß. Davon zu unterscheiden sind Exosomen mit einer Größe von etwa 30 – 150 nm. Exosomen entstehen durch Endosomen, welche zunächst zu sog. *multivesicular bodies* (späte Endosomen) heranreifen. Zytosolische Proteine gelangen dann über Membran-Invagination ins Lumen der späten Endosomen und werden nach Fusion mit der Plasmamembran als Exosomen sezerniert [81]. Mikrovesikel und Exosomen werden als extrazelluläre Vesikel bezeichnet [82]. Insbesondere Transmembranproteine können neben CPS auch UPS nutzen, indem sie unter Umgehung des Golgi-Apparates vom ER direkt zur Plasmamembran transportiert werden, auch Golgi-*Bypass* genannt [83]. Manche Proteine werden auch mithilfe von sog. ABC (*ATP binding cassette*)-Transportproteinen durch die Plasmamembran exportiert [81]. Bei *SecretomeP* handelt es sich wie bei *SignalP* um einen auf maschinellem Lernen basierenden Algorithmus, allerdings wird durch *SecretomeP* die Wahrscheinlichkeit für UPS anhand bestimmter Aminosäuresequenzen bestimmt [84]. *OutCyte* dient ebenfalls der Vorhersage von UPS. In einem ersten Schritt werden dabei N-terminal Signalsequenzen und Transmembrandomänen enthaltende Proteine herausgefiltert, um in einem zweiten Schritt Proteine als UPS oder intrazelluläre Proteine zu klassifizieren [75].

Darüber hinaus kann die Freisetzung von Proteinen auch über *proteolytic ectodomain shedding* erfolgen. Dabei spaltet eine Protease ein Membranprotein nahe oder innerhalb seiner Transmembrandomäne. Dies führt zur Freisetzung der löslichen extrazellulären Domäne (*ectodomain*) und zum Zurückbleiben eines weiterhin an die Membran gebundenen Fragments. Je nach Lokalisation wird die lösliche extrazelluläre Domäne von der Plasmamembran in den extrazellulären Raum oder in das Lumen von Organellen (z.B. Endosomen, Golgi-Apparat) freigesetzt und von dort aus in den Extrazellulärraum sezerniert [85].

### 1.3 Das C2C12-Zellmodell

Bei der immortalisierten murinen C2C12-Zelllinie handelt es sich um ein häufig verwendetes *in vitro* Zellmodell für den Skelettmuskel, das für die präklinische und pharmazeutische Forschung unverzichtbar geworden ist. C2C12-Myoblasten werden in verschiedenen Forschungsgebieten eingesetzt und dienen u.a. der experimentellen Untersuchung metabolischer Erkrankungen wie T2DM, Adipositas und Hyperlipidämie sowie Alterungsprozessen und Muskelwachstum [86]. Diese Zelllinie ist ein Subklon der Myoblasten, die ursprünglich 1977 in Israel von D. Yaffe und O. Saxel aus der Oberschenkel-Muskulatur von 2 Monate alten C57BL/6J Mäusen gewonnen wurden [87]. Aufgrund des Vorhandenseins einer Querstreifung sowie bestimmter biochemischer Eigenschaften wie der Expression von GLUT-4 und einer Insulin-*Responsiveness* wird das Zellmodell häufig genutzt, um den Glukose- und Insulinstoffwechsel der Skelettmuskulatur zu untersuchen. Zudem weisen differenzierte Zellen Merkmale (Myosingehalt, Glykogengehalt, Kontraktionsfähigkeit) auf, die denen menschlicher Myotuben entsprechen, sodass C2C12-Zellen auch für Studien zur Muskelkontraktion geeignet sind [86, 88, 89].

C2C12-Zellen können unkompliziert kultiviert werden, da sie unter den hohen Serumkonzentrationen des Wachstums-Mediums rasch proliferieren und unter den niedrigen Serumkonzentrationen des Differenzierungs-Mediums innerhalb von 3 – 5 Tagen zu sog. Myotuben differenzieren (vgl. Abschnitt 2.9 "Zellkultur"). Myoblasten als mononukleäre und spindelförmige Zellen durchlaufen dabei zunächst mehrere Runden der Zellteilung, bis sie das Konfluenzstadium erreicht haben, gefolgt von einer terminalen Differenzierung zu Myozyten, welche dann sukzessive zu länglichen, mehrkernigen Myotuben fusionieren. Dieser Prozess wird Myogenese genannt [86, 88].

Im Vergleich zu humanen Skelettmuskelzellen weisen murine C2C12-Zellen darüber hinaus einige Vorteile auf wie eine schnellere Wachstums- und Differenzierungsrate und eine höhere Myokin-Sekretion infolge kontraktionsinduzierender Stimuli wie der Elektropulsstimulation (vgl. Abschnitt 1.4 "Sport *in-vitro*: Elektropulsstimulation"). Da es sich bei C2C12-Zellen um eine immortalisierte, klonale Zelllinie handelt, sind sie leicht kommerziell erhältlich [88]. Es stellt sich zudem als Herausforderung dar, eine ausreichend hohe Satellitenzell-Anzahl aus Muskelbiopsien zu gewinnen, um daraus genug Myoblasten (aktivierte Satellitenzellen) zu generieren, die für weitere Experimente zu Myotuben differenziert werden müssen. Zusätzlich ist die Proliferationsrate der Zellen älterer Spender oft in Kultur noch eingeschränkt [88]. Die Quelle primärer Skelettmuskelzellen kann außerdem variieren, z.B. *Musculus vastus lateralis, Musculus obliquus internus abdominis* oder *Musculi intercostales*. Detaillierte Hintergrundinformationen zum Gesundheitszustand der Spender fehlen häufig [90].

### 1.4 Sport in-vitro: Elektropulsstimulation

Eine große Anzahl von Veröffentlichungen belegt die wichtige Rolle von regelmäßiger Bewegung zur Vorbeugung und Therapie chronischer Erkrankungen wie beispielsweise T2DM. Sport verbessert die Glukosetoleranz, die Insulinsensitivität und das Lipidprofil im Blutplasma. Darüber hinaus begünstigt regelmäßiges Training die Myogenese, Oxidationskapazität sowie auch langfristig die Muskelhypertrophie [90-92]. Die Studien von *Petersen et al.* führten außerdem zur Identifizierung der Skelettmuskulatur als aktives endokrines Organ (vgl. Abschnitt 1.2 "Skelettmuskulatur als endokrines Organ") [42]. Mithilfe von *in vitro* Modellen, die *in vivo* Muskelkontraktionen nachahmen, konnten mittlerweile Fortschritte beim Verständnis der Rolle von Skelettmuskulatur innerhalb der komplexen, multidirektionalen Kommunikation zwischen verschiedenen Organen und den Auswirkungen auf die Stoffwechselregulation erzielt werden. Die elektrische Pulsstimulation (EPS) ist hierbei eine wichtige Methode, welche impliziert, die Kontraktion der Muskelzellen *in vitro* zu simulieren, um beispielsweise eine Identifizierung neuer kontraktionsregulierter Myokine in unterschiedlichen Zellmodellen zu ermöglichen. Die meisten EPS-Studien wurden bisher an C2C12-Zellen sowie primären Skelettmuskelzellen tierischen Ursprungs durchgeführt, die oft von Ratten stammen [90].

Die Geschichte der EPS lässt sich bis in die 1970er Jahre zurückverfolgen, als Muskelzellen von Hühnern mittels ins Zellkultur-Medium eingetauchter Platin-Elektroden stimuliert wurden, um die Rolle von Denervierung und Reinnervation auf die Regulierung des Acetylcholinrezeptors zu untersuchen [93]. Der erste Bericht über die Verwendung von EPS als Modell, um Sport *in vitro* nachzuahmen, erfolgte 2008 von Nedachi et al. im Rahmen von Experimenten an C2C12-Zellen. In dieser Studie führte EPS für 24 h bei 1 Hz zu einer sichtbaren Kontraktion der Myotuben, einer verbesserten Glukoseaufnahme, einer Aktivierung der AMPK

(Adenosinmonophosphat-abhängige Kinase) -Signalkaskade und zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität. Es wurde auch gezeigt, dass EPS die Expression von Myokinen induziert, welche schon als solche aus *in vivo* Studien bekannt waren wie IL-6, CXCL1 *(C-X-C Motif Ligand 1)* und CXCL5 [90, 94]. Aas et al. veröffentlichten 2002 die erste EPS-Studie, in der humane Myotuben verwendet wurden [95]. EPS induziert die Kontraktion einer Muskelzelle, indem es zu einer Depolarisation des Sarkolemms führt, die eine Konformationsänderung der spannungsaktivierten Dihydropyridin-Rezeptoren zur Folge hat. Es kommt zu einer direkten Interaktion des sarkoplasmatischen Retikulums), wodurch dieser aktiviert und durchlässig für Ca<sup>2+</sup>-Ionen wird. Dies führt zu einem Calciumeinstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ins Sarkoplasma und schließlich zur calciumabhängigen Aktin-Myosin-Interaktion im Rahmen der Kontraktion [90, 96, 97].

Inzwischen existiert eine Vielzahl an EPS-Protokollen mit verschiedenen Frequenzen und Zeitdauern, wobei allgemein zwischen *Short-term* EPS ( $\leq$  8 h) und *Long-term* EPS ( $\geq$  24 h) unterschieden werden kann sowie zwischen EPS mit niedriger ( $\leq$  5 Hz) und hoher Frequenz ( $\geq$  30 Hz). Einige allgemeine EPS-Effekte wie die Induktion einer sichtbaren Kontraktion der Myotuben, eine Stimulation des Glukose-*Uptakes* sowie die IL-6-Hochregulation können in fast allen Studien nachgewiesen werden, in denen EPS über 8 h appliziert wird. Allerdings ist ein direkter Vergleich von *in vitro* Protokollen mit *in vivo* Training schwierig. Es besteht kein Konsens darüber, ob ein bestimmtes Protokoll Ausdauertraining oder Krafttraining bzw. eine akute Trainingseinheit oder regelmäßiges Training repräsentiert. Protokolle mit einer konstanten Frequenz über 24 h oder 48 h spiegeln beispielsweise nicht die *in vivo* Situation des arbeitenden Muskels wider, weisen aber Ähnlichkeit zu Ultra-Langstreckenlauf auf. Potenzielle Biomarker wie IL-6 oder PGC-1 $\alpha$  könnten darüber hinaus helfen, relevante EPS-Protokolle zu etablieren [90, 98].

Zu den Einschränkungen des EPS-Systems zählen Merkmale, die *in vivo* essenziell für die Funktion der Muskulatur sind, aber *in vitro* fehlen wie Blutfluss und Innervation. Veränderungen der Mikroumgebung des Skelettmuskels wie Sauerstoff-Gehalt, Temperatur und Elektrolytkonzentration beeinflussen *in vivo* die Reaktion von

Muskelzellen, fehlen jedoch ebenfalls im EPS-Modell. Außerdem sind Muskelfasern *in vivo* von Bindegewebe und extrazellulärer Matrix umgeben, was die Genaktivierung und Proteinfreisetzung beeinflussen könnte [90, 99].

## 1.5 Ziele der Arbeit

Das Ziel der Arbeit besteht darin, die Sekretome insulinresistenter muriner C2C12-Muskelzellen nach EPS zu charakterisieren und miteinander zu vergleichen. Die Insulinresistenz der C2C12-Zellen wurde hierzu nach Testung verschiedener Protokolle durch letztlich zwei Methoden (Palmitat und *High insulin*, vergleiche Abschnitt 2.9.4 "Etablierung von *in-vitro*-Insulinresistenz-Protokollen") erfolgreich induziert. Im Anschluss erfolgte die EPS der Zellen, um Sport *in vitro* nachzuahmen und die Myokinsekretion anzuregen (vgl. Abschnitt 2.9.6 "Elektropulsstimulation"). Die Überstandsanalyse erfolgte mittels Massenspektrometrie (vgl. Abschnitt 2.11 "Probenaufbereitung, Massenspektrometrie und Bioinformatik"). Abbildung 2 veranschaulicht den experimentellen Ablauf.

Ein zelluläres Sekretom ändert sich infolge unterschiedlicher Umweltbedingungen und Stimuli. Es ist jedoch nicht bekannt, ob und inwieweit sich zwei verschiedene Sekretome insulinresistenter Muskelzellen nach einer EPS-Behandlung unterscheiden. Die Identifizierung kontraktionsregulierter Myokine im Rahmen zweier *in-vitro*-Insulinresistenz-Modelle trägt somit zu einem weitergehenden Verständnis der biochemischen Zusammenhänge von IR, T2DM und körperlicher Bewegung bei.



**Abb. 2: Zusammenfassende Darstellung des experimentellen Ablaufs.** IR = Insulinresistenz; h = Stunden; EPS = Elektropulsstimulation. Die Abbildung wurde mittels BioRender.com (2024) erstellt.

# **2 MATERIAL UND METHODEN**

In diesem Abschnitt werden die verwendeten Materialien, Chemikalien, Puffer, Lösungen, Antikörper, Geräte sowie Softwareprogramme inklusive ihrer Hersteller und dessen Firmensitz tabellarisch aufgelistet (vgl. Tabelle 1 bis 7). Anschließend erfolgt die Erläuterung sämtlicher der Arbeit zugrundeliegender Methoden (vgl. Abschnitt 2.9 bis 2.12). Verwendetes Reinstwasser wird nachfolgend als "Milli-Q-H<sub>2</sub>O" bezeichnet und entstammt dem *Milli-Q<sup>®</sup> Advantage A10* Wasseraufbereitungssystem (vgl. Tabelle 6 "Geräte").

## 2.1 Zelllinie

In diesem Projekt wurden C2C12-Zellen der Firma ATCC (American Type Culture Collection; Manassas, Virginia, Vereinigte Staaten; vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-) Materialien") verwendet. Diese lagen in der Arbeitsgruppe bei – 196°C in Flüssig-Stickstoff gelagert vor. Es handelt sich um eine immortalisierte, murine Myoblasten-Zelllinie. Für die im Folgenden beschriebenen Experimente (vgl. Abschnitt 2.9 "Zellkultur") wurden Zellen der Passagenzahl 6 – 14 verwendet.

## 2.2 (Verbrauchs-)Material

Tabelle 1: benötigte **(Verbrauchs-)Materialien**, deren Hersteller und dessen Firmensitz

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
1D Gel (Criterion <sup>™</sup> TGX Stain-Free <sup>™</sup> Precast Gel)	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
6-Well-Plates	TPP Techno Plastic Products AG	Trasadingen, Schweiz
6- <i>Well-Plates</i> für Elektropulsstimulation (EPS)	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
96-Well-Plates	Paul Boettger GmbH & Co. KG	Bodenmais, Deutschland
Amicon <sup>®</sup> Ultra – 4 <i>Centrifugal Filter</i> s	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Autosampler- Fläschchen 1 MM Glastic Crimp/Snap Vials 350 UL W/ GLS Insert	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
C2C12-Zellen	ATCC (American Type Culture Collection)	Manassas, Virginia, Vereinigte Staaten

Chemilumineszens-	PerkinElmer Inc.	Waltham,
Substrat		Massachusetts,
Western Lightning <sup>®</sup> ECL		Vereinigte Staaten
Pro		
Chemilumineszens-	PerkinElmer Inc.	Waltham,
Substrat		Massachusetts,
Western Lightning®		Vereinigte Staaten
Ultra		
Deckel für	Thermo Fisher Scientific	Waltham,
Autosampler-		Massachusetts,
Fläschchen 1MM		Vereinigte Staaten
Orange Snap PTFE/SIL		-
1000/CS Bulk		
Gelelektrophorese-	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien,
Zubehör: Glasplatten		Vereinigte Staaten
und Kämme (1.0 mm,		-
1.5 mm). Halterungen.		
Spacer		
Glaspipetten (5 ml, 10	SARSTEDT AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
ml, 25 ml, 50 ml)		
Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific	Waltham,
-		Massachusetts,
		Vereinigte Staaten
Neubauer-	Assistent, Glaswarenfabrik	Sondheim vor der Röhn,
Zählkammern	Karl Hecht GmbH & Co. KG	Deutschland
	Paul Marienfeld GmbH &	Lauda-Königshofen,
	Co. KG	Deutschland
Nitrozellulose-	Cytiva Europe GmbH	Freiburg im Breisgau,
Membran		Deutschland
Pierce <sup>™</sup> BCA Protein	Thermo Fisher Scientific	Waltham,
Assay Kit		Massachusetts,
-		Vereinigte Staaten
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
(verschiedene Größen)		
	SARSTEDT AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
LoBind®		
Reaktionsgefäße Safe-	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Lock		-
Zellkulturflaschen mit	TPP Techno Plastic	Trasadingen, Schweiz
75 cm <sup>2</sup>	Products AG	-
Wachstumsfläche (T75)		
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen.
(15 ml, 50 ml)		Deutschland
Zentrifugenröhrchen für	Beckman Coulter	Brea, Kalifornien
Ultrazentrifuge		Vereinigte Staaten
$(Optima-M\Delta X-XP)$		

## 2.3 Chemikalien

Tabelle 2: verwendete Chemikalien, ihr Hersteller und dessen Firmensitz

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
0,1 % Trifluoressigsäure (TFA,	Thermo Fisher	Waltham,
<i>trifluoroacetic acid</i> ) in	Scientific	Massachusetts,
Acetonitril		Vereinigte Staaten
0,1 % Trifluoressigsäure in	Thermo Fisher	Waltham,
Wasser	Scientific	Massachusetts,
		Vereinigte Staaten
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri,
ethansulfonsäure (HEPES)		Vereinigte Staaten
Acetonitril	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri,
		Vereinigte Staaten
Acrylamid (30 %)	AppliChem GmbH	Darmstadt,
		Deutschland
Acrylamid 40 % (Mix 37, 5:1)	AppliChem GmbH	Darmstadt,
A		Deutschland
Ammoniumpicardonat		Damisiaut,
Ammoniumporsulfat (ADS)	MP Riomedicals	Solon Obio
Annoniumpersulat (AFS)	MF DIOMEDICAIS	Vereiniate Staaten
		Vereinigte Otaaten
	AppliChem GmbH	Darmstadt
		Deutschland
Ammoniumsulfat BioChemica	AppliChem GmbH	Darmstadt.
		Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Merck KGaA	Darmstadt,
		Deutschland
	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri,
		Vereinigte Staaten
Bromphenolblau	AppliChem GmbH	Darmstadt,
	<b>•</b> ••••••	Deutschland
Calcium-Chlorid (CaCl <sub>2</sub> )-	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri,
Dihydrat		Vereinigte Staaten
Chemerin human	Merck KGaA	Darmstadt,
- Orren lata™ (Duata and Indikitan	Deebe	Deutschland
Complete (Protease-inhibitor-	Roche	Dasel, Schweiz
Coomassie <sup>®</sup> Brilliant Blau	AppliChem GmbH	Darmstadt
Coomassie Drimant Diau		Deutschland
Dinatriumhydrogennhosnhat	Merck KGaA	Darmstadt
(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )		Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe.
( ,	KG	Deutschland
DTT BioChemica	AppliChem GmbH	Darmstadt,
	·	Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modified	Gibco, Thermo Fisher	Waltham,
Eagle Medium) 4,5g/I Glukose,	Scientific	Massachusetts,
mit Phenolrot		Vereinigte Staaten

DMEM <i>(Dulbecco's Modified Eagle Medium)</i> 4,5g/I Glukose, ohne Phenolrot	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
DPBS mit Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup> (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Ethanol	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethyl- ether)-N,N,N',N'-tetraessig- säure (EGTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
, , ,	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Fötales Kälberserum (FBS, fetal bovine serum)	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
GlutaMAX <sup>™</sup> (L-Glutamin)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Glyzerin	MP Biomedicals	Solon, Ohio, Vereinigte Staaten
	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Glyzin	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Insulin	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Iodacetamid	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCI)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Magnesium-Sulfat-Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> x 7 $H_2$ O)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland

N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Natrium-Pyruvat (100 mM)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Natriumlauryl-Sulfat (SDS, sodium dodecyl sulfate)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
SDS ultrapure	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Ortho (o)-Phosphorsäure (85 %)	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
PageRuler <sup>™</sup> Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Palmitat	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Penicillin/ Streptomycin (P/S) - 10.000 Units/ml P, 10.000 µg/ml S	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Pferdeserum (HS, horse serum)	ATCC	Manassas, Virginia, Vereinigte Staaten
PhosSTOP <sup>™</sup> (Phosphatase-Inhibitor- Tabletten)	Roche	Basel, Schweiz
Precision Plus Protein <sup>™</sup> All Blue Prestained Protein Standard	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Precision Plus Protein <sup>™</sup> Standards - All Blue	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Precision Plus Protein <sup>™</sup> Standards - Unstained	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Salzsäure (HCI)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
HCI 6 M	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
TNF-α (Tumornekrosefaktor α)	Bio-Techne Corporation	Minneapolis, Minnesota, Vereinigte Staaten
Trifluoressigsäure (100 %)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)amino-	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe.

Tris <i>ultrapure</i>	AppliChem GmbH	Darmstadt,
		Deutschland
Triton <sup>™</sup> X-100	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri,
	5	Vereinigte Staaten
Trypanblau (0,4 %)	Gibco, Thermo Fisher	Waltham,
	Scientific	Massachusetts,
		Vereinigte Staaten
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco, Thermo Fisher	Waltham,
	Scientific	Massachusetts,
		Vereinigte Staaten
Trypsin/Lys-C Mix	Promega Corporation	Madison, Wisconsin,
		Vereinigte Staaten
<i>TWEEN<sup>®</sup> 20</i> (Polysorbat 20)	MP Biomedicals	Solon, Ohio,
		Vereinigte Staaten
Water filtered at 0,2 µm	VWR Chemicals	Radnor, Pennsylvania,
		Vereinigte Staaten

## 2.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: **Puffer und Lösungen** sowie deren Konzentration bzw. Zusammensetzung; Herstellerangaben der einzelnen Inhaltsstoffe sind in Tabelle 2 "Chemikalien" gelistet.

Bezeichnung	Konzentration/Zusammensetzung	
APS-Stocklösung (Western Blot)	50 mg APS + 100 μl Milli-Q-H₂O	
BSA-Stocklösung	10 g BSA in 100 ml KRBH-Puffer gelöst	
<i>cOmplete</i> <sup>™</sup> -Stocklösung	1 Tablette in 2 ml H <sub>2</sub> O gelöst	
Elektrophorese-Puffer (10x)	250 mM Tris, 1,92 M Glyzin, 1 % SDS	
	(w/v)	
	Für 1L Gebrauchslösung werden 100 ml	
	des Elektrophorese-Puffers mit 900 ml	
	Milli-Q-H <sub>2</sub> O gemischt.	
Ethanol-Gebrauchslösung	1L 70%ige Lösung: 700 ml Ethanol +	
	300 ml Milli-Q-H₂O	
Fling-Gregerson-Puffer (1x)	50 mM Tris, 192 mM Glyzin, 0,1 % SDS	
HPLC (High Performance Liquid	0,1 % Ameisensäure in Wasser gelöst	
Chromatography)-Puffer A		
	(Thermo Fisher Scientific, Waltham,	
	Massachusetts, Vereinigte Staaten)	
HPLC-Puffer B	80 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure	
	Verdünnung von 0,1 % Ameisensäure in	
	Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure in	
	Wasser	
	(Thermo Fisher Scientific, Waltham,	
	Massachusetts, Vereinigte Staaten)	
Insulin-Stocklösung	100 µM Insulin in 5 mM HCl	

Krebs-Ringer-Bikarbonat-HEPES (KRBH)-Puffer	120 mM NaCl (3,5 g), 4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (272,2 mg), 1 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (123,2 mg), 1 mM CaCl <sub>2</sub> -Dihydrat (73,5 mg), 10 mM NaHCO <sub>3</sub> (420 mg), 30 mM HEPES (3,57 g); pH = 7,4
Laemmli-Laufpuffer (1x)	25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 0,1 % SDS
Laemmli-Puffer (4x)	250 mM Tris, 20 g% Glyzerin, 10 mM EDTA, 6 g% DTT, 0,2 g% Bromphenol- blau; pH = 6,8
Oberer Gelpuffer	0,5 M Tris, 0,4 % SDS; pH = 6,8
Palmitat-Stocklösung	10 %ige BSA-Lösung: Herstellung mit 1x PBS, dann Inkubation über Nacht bei 4°C; 20 mM Palmitat-Lösung: 7,7 mg Palmitat werden zu 1,5 ml 0,1 M NaOH hinzugegeben; Palmitat-Lösung wird zur BSA-Lösung hinzugegeben (Endkonzentration Palmitat-Stocklösung 5 mM)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, <i>phosphate buffered saline</i> ) ohne Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup>	136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,06 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; pH = 7,4
PhosSTOP <sup>™</sup> -Stocklösung	1 Tablette in 1 ml H <sub>2</sub> O gelöst
Sammelgel-Puffer (4x)	0,5 M Tris/HCl (pH = 6,8), 0,8 % SDS
SDS-Probenpuffer (1x)	62,5 mM Tris/HCL (pH = 6,8), 10 % Glyzerin, 2 mM EDTA, 2 % SDS, 100 mM DTT, 0,01 % Bromphenolblau
SDS-Probenpuffer (5x)	312,5 mM Tris/HCL (pH = 6,8), 50 % Glyzerin, 10 mM EDTA, 10 % SDS, 500 mM DTT, 0,05 % Bromphenolblau
Transfer-Puffer (10x)	250 mM Tris, 1,92 M Glyzin Für 1L Gebrauchslösung werden 100 ml des Transfer-Puffers mit 700 ml Milli-Q- H <sub>2</sub> O und 200 ml Methanol gemischt.
Trenngel-Puffer (4x)	3 M Tris/HCl (pH = 8,8), 0,8 % SDS
Trypanblau-Arbeitslösung	1:2 (v/v) Verdünnung des Trypanblaus mit 1x PBS zur Herstellung der 0,2 %igen Arbeitslösung
Unterer Gelpuffer	1,5 M Tris, 0,4 % SDS; pH = 8,8
Wasch-Puffer (10x)	100 mM Tris, 1,5 M NaCl; pH = 8 Für 1L Gebrauchslösung werden 100 ml des Wasch-Puffers mit 900 ml Milli-Q- H <sub>2</sub> O und 500 $\mu$ l Polysorbat 20 (0,05 %) gemischt
Zell-Lysepuffer	20 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH = 8), 1 mM EGTA (pH = 8), 1 % Triton Vor dem Lysieren der Zellen werden pro ml Lysepuffer 40 µl der <i>cOmplete</i> <sup>™</sup> - Lösung und 100 µl der <i>PhosSTOP</i> <sup>™</sup> - Lösung frisch hinzugefügt

## 2.5 Zellkultur-Medien

Tabelle 4: **Zellkultur-Medien** und ihre Zusammensetzung; Herstellerangaben der einzelnen Inhaltsstoffe finden sich in Tabelle 2 "Chemikalien".

Bezeichnung	Zusammensetzung
C2C12-Differenzierungs-Medium	DMEM 4,5 g/l Glukose mit Phenolrot, L-
	Pferdeserum und 1 % P/S
C2C12-Hunger-Medium	DMEM 4,5 g/l Glukose mit Phenolrot, L-
	Glutamin, 110 mg Natrium-Pyruvat und
	1 % P/S
	DMEM 4.5 all Glukose obne Phenolrot
	mit 2 % GlutaMAX <sup>™</sup> . 1 % P/S und 1 %
	Natrium-Pyruvat
C2C12-Wachstums-Medium	DMEM 4,5 g/l Glukose mit Phenolrot, L-
	Glutamin, 110 mg Natrium-Pyruvat, 10
	% FBS und 1 % P/S
Insulin-Medium-Suspension zur	C2C12-Differenzierungs-Medium
Insulinresistenz-Induktion	(DMEM 4,5 g/l Glukose mit Phenolrot, L-
	Glutamin, 110 mg Natrium-Pyruvat, 2 %
	Pferdeserum, 1 % P/S) + 100 μM Insulin
	(Insulin-Endkonzentration: 100 nM)
Palmitat-Medium-Suspension zur	C2C12-Hunger-Medium (DMEM 4,5 g/l
Insulinresistenz -Induktion	Glukose mit Phenolrot, L-Glutamin, 110
	mg Natrium-Pyruvat, 1 % P/S) + 5 mM
	Palmitat (Palmitat-Endkonzentration: 500
	μM)

## 2.6 Antikörper

Tabelle 5: **Antikörper** für die *Western Blot* Analyse mit Produktnummer, verwendeter Verdünnung und Hersteller sowie dessen Firmensitz

Antikörper	Produkt- nummer	Verdünnung	Hersteller/Firmensitz
Primärantikörper			
Rabbit-anti-AKT	9272	1:1000 (v/v) 5 % MP	Cell Signaling Technology
			Danvers, Massachusetts, Vereinigte Staaten
<i>Rabbit</i> -anti-GAPDH (14C10)	2118	1:2000 (v/v) 5 % MP	Cell Signaling Technology
			Danvers, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Rabbit-anti- phospho-AKT	9271	1:1000 (v/v) 5 % MP	Cell Signaling Technology
---	-------------	--------------------------	--
(Ser473)			Danvers, Massachusetts, Vereinigte Staaten
<i>Rabbit</i> -anti- phospho-AKT	9275	1:1000 (v/v) 5 % MP	Cell Signaling Technology
(Thr308)			Danvers, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Sekundärantikörper			
<i>Goat</i> -anti- <i>rabbit</i> IgG	111-035-003	1:20.000 (v/v) 5 % MP	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
			West Grove, Pennsylvania, Vereinigte Staaten

## 2.7 Geräte

Tabelle 6: im Rahmen der Experimente genutzte **Geräte**, deren Hersteller und dessen Firmensitz

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Analysenwaage MC1 Research RC 250 S	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
C-Dish <sup>™</sup> for 6 well plate	IonOptix LLC	Westwood, Massachusetts, Vereinigte Staaten
C-PACE EP Cell Culture Stimulator	IonOptix LLC	Westwood, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Elektrophoresekammer Criterion <sup>™</sup> Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Feinwaage <i>Analytic AC</i> 210 S	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
<i>Hamilton<sup>®</sup></i> Spritze	Hamilton Company	Reno, Nevada, Vereinigte Staaten
Heizblock ThermoMixer <sup>®</sup>	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
HERAcell 240i-CO <sub>2</sub> -	Thermo Fisher	Waltham, Massachusetts,
Inkubator	Scientific	Vereinigte Staaten
<i>HERAcell 240-</i> CO₂- Inkubator	Heraeus	Hanau, Deutschland
iMark <sup>™</sup> Microplate	Bio-Rad	Hercules, Kalifornien,
Absorbance Reader	Laboratories, Inc.	Vereinigte Staaten
Ionenquelle Nanospray Flex <sup>™</sup>	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
LaminAir <sup>®</sup> HB 2448	Heraeus	Hanau, Deutschland
HERASAFE KS	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten

Massenspektrometer Orbitrap Exploris <sup>™</sup> 480	Thermo Fisher Waltham, Massachu Scientific Vereinigte Staaten	
Mikroskop IM Mikroskop AE31	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Milli-Q <sup>®</sup> Advantage A10	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH +	Karlsruhe, Deutschland
MULTIFUGE 3S+ MULTIFUGE X3 FR	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Multipette®	Eppendorf AG	Hamburg. Deutschland
NanoDrop <sup>™</sup> 2000c Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Optima-MAX-XP Ultrazentrifuge	Beckman Coulter	Brea, Kalifornien, Vereinigte Staaten
PowerPac <sup>™</sup> Basic Power Supply Stromgebor für	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Elektrophorese und Transfer		
Research plus Pipetten	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Rotor MLS-50 für Optima- MAX-XP Ultrazentrifuge	Beckman Coulter	Brea, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Stickstoff-Tank <i>BIOSAFE</i> <sup>®</sup> zur Zelleinlagerung	Cryotherm GmbH & Co. KG	Kirchen/Sieg, Deutschland
Tisch-Zentrifuge 5417 R	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Transilluminator ChemiDoc Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Trennsäule (Aurora series UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) column, 25 cm)	IonOpticks	Fitzroy, Victoria, Australien
UltiMate 3000 High performance liquid chromatograph	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Ultraschallbad Sonorex RK 102 H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG	Berlin, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex RK 102 H Vorsäule ( <i>Acclaim<sup>™</sup></i> <i>PepMap<sup>™</sup></i> 100 C18-LC- Säule)	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG Thermo Fisher Scientific	Berlin, Deutschland Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Ultraschallbad Sonorex RK 102 H Vorsäule ( <i>Acclaim<sup>™</sup></i> <i>PepMap<sup>™</sup></i> 100 C18-LC- Säule) Zentrifugal- Vakuumkonzentrator <i>Savant<sup>™</sup> SpeedVac<sup>™</sup> SPD</i> 1030	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific	Berlin, Deutschland Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Ultraschallbad Sonorex RK 102 H Vorsäule ( <i>Acclaim</i> <sup>™</sup> <i>PepMap</i> <sup>™</sup> 100 C18-LC- Säule) Zentrifugal- Vakuumkonzentrator <i>Savant</i> <sup>™</sup> <i>SpeedVac</i> <sup>™</sup> <i>SPD</i> 1030 Zentrifuge 5810 R	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific	Berlin, Deutschland Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten Hamburg, Deutschland

### 2.8 Softwareprogramme

Programm	Hersteller	Version
GraphPad Prism 9	GraphPad Software	9.0.0
	San Diego, Kalifornien,	
	Vereinigte Staaten	
Image Lab	Bio-Rad Laboratories, Inc.	5.2.1
	Hercules, Kalifornien,	
	Vereinigte Staaten	
Microplate Manager 6	Bio-Rad Laboratories, Inc.	6
	Hercules, Kalifornien,	
	Vereinigte Staaten	
Microsoft <sup>®</sup> Excel für Mac	Microsoft	16.62
	Redmond, Washington,	
	Vereinigte Staaten	
NanoDrop <sup>™</sup> 2000/2000c	Thermo Fisher Scientific	
	Waltham, Massachusetts,	
	Vereinigte Staaten	
Proteome Discoverer <sup>™</sup> 3.0	Thermo Fisher Scientific	3.0
	Waltham, Massachusetts	
	Vereinigte Staaten	

Tabelle 7: verwendete Softwareprogramme, deren Hersteller und ihre Version

## 2.9 Zellkultur

Alle der Arbeit zugrundeliegenden Versuche wurden mit C2C12-Zellen durchgeführt (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien" und Abschnitt 2.1 "Zelllinie"). Das Wachstumsverhalten, die Zellmorphologie sowie der Differenzierungsgrad wurden regelmäßig lichtmikroskopisch untersucht. Die Zell-Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt der Brutschrank-Umgebung (vgl. Tabelle 6 "Geräte"). Verwendete Zellkultur-Medien (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien") wurden vor Benutzung im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Gleiches galt für weitere Lösungen und Chemikalien vor Verwendung in der Zellkultur, sofern nicht anders angegeben. Darüber hinaus wurden vor Arbeitsbeginn alle neu unter die Sterilbank (vgl. Tabelle 6 "Geräte") abgesetzten Materialen mit 70%iger Ethanol-Lösung (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") desinfiziert.

#### 2.9.1 Auftauen von C2C12-Zellen

Nach kurzem Auftauen eines Kryoröhrchens mit jeweils 0,5 Millionen Zellen pro ml Inhalt bei 37°C wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugen-Röhrchen (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") überführt, in welches vorher 9 ml Wachstums-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien") gegeben wurden. Anschließend wurde die Suspension mittels Pipette (vgl. Tabelle 6 "Geräte") homogenisiert, es wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und mit Trypanblau (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien" und Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") im Verhältnis 1:5 (Trypanblau/Zellsuspension) versetzt. Die Trypanblau-Färbemethode basiert auf dem Prinzip, dass tote Zellen Trypanblau aufgrund ihrer perforierten Zellmembran aufnehmen, die intakte Zellmembran lebendiger Zellen jedoch das Anfärben dieser verhindert. So lassen sich tote Zellen von lebendigen Zellen differenzieren. Die Trypanblau-haltige Suspension wurde im Anschluss auf eine Neubauer-Zählkammer (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") gegeben, um die Anzahl lebender Zellen mikroskopisch zu bestimmen. Nach der Zellzählung wurde das Zentrifugen-Röhrchen (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") bei 216 x g für 5 Minuten zentrifugiert, damit sich die Zellen als Pellet am Röhrchen-Boden absetzen. In der Zwischenzeit wurde die gewünschte Zellmenge kalkuliert, die für die Expansion der Zellen in die T75- Zellkulturflaschen (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") ausgesät werden sollte. Das alte Medium wurde nach der Zentrifugation abgesaugt, das Zellpellet in der zuvor berechneten Menge Wachstums-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien") resuspendiert und zum Schluss wurden 0,5 Millionen Zellen pro T75-Flasche ausgesät und im Brutschrank (vgl. Tabelle 6 "Geräte") inkubiert.

#### 2.9.2 Passage und Aussaat

Die verwendeten C2C12-Zellen (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") wurden alle 3 bis 4 Tage passagiert, bei einer Konfluenz von 60 – 80 %.

Für die Passage einer T75-Zellkulturflasche (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") wurde zunächst das Wachstums-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien") abgesaugt und es erfolgte ein Waschschritt mittels 10 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen"). Anschließend wurde 1 ml Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") auf den Zellrasen gegeben und es erfolgte eine 3-minütige Inkubation der Zellen im Brutschrank (vgl. Tabelle 6 "Geräte"), um diese von der T75-Oberfläche zu lösen. Trypsin ist eine Serinprotease, deren Wirkung nun durch Zugabe von Wachstums-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien") gestoppt wurde. Im Anschluss wurde die gesamte Zellsuspension aller T75-Flaschen in ein 50 ml-Zentrifugen-Röhrchen (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") zu ermitteln, wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblau (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien" und Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") im Verhältnis 1:2 versetzt.

Mithilfe folgender Formel wurde die Zellzahl aller passagierter Zellkulturflaschen (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") berechnet:

Zellzahl × Trypanblau–Verdünnungsfaktor × Zählkammer–Faktor × Volumen passagierter Flaschen Anzahl der Zählquadrate

Das nachfolgend benötigte Volumen an frischem Wachstums-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien") wurde dann bestimmt, indem die errechnete Zellzahl durch die gewünschte Zellzahl pro ml dividiert wurde.

Die Zellen wurden bei 216 x g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend erfolgte eine Resuspension des Pellets in frischem Wachstums-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien"). Je nach Versuchsbedingungen wurden 100.000 oder 200.000 Zellen pro T75-Zellkulturflasche oder 6-*Well-Plate* (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") ausgesät. Eine Aussaat in 6-*Well-Plates* (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") erfolgte hierbei im Rahmen der Experimente, mit 200.000 Zellen pro *Well*.

#### 2.9.3 Differenzierung zu Myotuben

Alle für einen Versuch in 6-*Well-Plates* (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") ausgesäte Zellen erhielten einen Tag nach der im obigen Abschnitt 2.9.2 "Passage und Aussaat" beschriebenen Zellaussaat einen Medium-Wechsel, bei dem das Wachstums-Medium durch Differenzierungs-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien") ersetzt wurde. Nach 3 Tagen erfolgte ein erneuter Mediumwechsel mittels Differenzierungs-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien"). Nach drei Tagen Differenzierung wurde in der Regel mit den Experimenten begonnen, außer bei den Versuchen zur Insulinresistenz-Induktion durch ein hyperinsulinämisches Milieu (nachfolgend *"High insulin"* genannt) oder durch eine erhöhte Chemerin-Konzentration (vgl. Abschnitt 2.9.4 "Etablierung von *in-vitro* Insulinresistenz-Protokollen"). Hier wurde dem Differenzierungs-Medium von Anfang an Insulin-Stocklösung (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") bzw. Chemerin (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") hinzugefügt, sodass eine Endkonzentration von 100 nM Insulin oder 1 µg/ml Chemerin erreicht wurde.

#### 2.9.4 Etablierung von in-vitro-Insulinresistenz-Protokollen

Im folgenden Abschnitt wird die Etablierung insulinresistenter C2C12-Zellen anhand von vier Methoden beschrieben, orientiert an Primärliteratur [29, 33, 34, 76].

#### 2.9.4.1 Palmitat-Behandlung

Nachdem die Zellen für drei Tage Differenzierungs-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien") erhielten (vgl. Abschnitt 2.8.3 "Differenzierung zu Myotuben"), wurde die Insulinresistenz mittels Palmitat (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") induziert. Hierfür wurde eine 5 mM-Palmitat-Stocklösung (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") verwendet. Die oberen drei *Wells* einer 6-*Well-Plate* (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") erhielten eine Lösung aus phenolrothaltigem Hunger-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien") mit einer Palmitat-Konzentration von 500 µM (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien"). Die unteren drei *Wells* dienten folglich als Kontrolle und wurden mit Hungermedium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien") versetzt, welches 0,1 % Bovines Serum Albumin (BSA, vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") enthielt. Ein Wechsel zu Hungermedium wird grundsätzlich durchgeführt, um die Wirkung des Insulins während der akuten Insulinstimulation (vgl. Abschnitt 2.9.5 "Akute Insulinstimulation") zu verbessern. Anschließend wurden die Zellen für 16 Stunden inkubiert. Während für die *Western Blot* Analyse sowohl insulinresistente Zellen als auch Kontrollzellen verwendet wurden (vgl. Abschnitt 2.10 "*Western Blot* Analyse"), wurden im Rahmen der EPS-Versuche (vgl. Abschnitt 2.9.6 "Elektropulsstimulation") ausschließlich insulinresistente Zellen genutzt. Das Ziel bestand darin, eine massenspektrometrische Sekretom-Analyse (vgl. Abschnitt 2.11 "Probenaufbereitung, Massenspektrometrie und Bioinformatik") der Überstände insulinresistenter C2C12-Zellen nach EPS durchzuführen.

#### 2.9.4.2 Insulin-Behandlung "High insulin"

Im zweiten Ansatz wurde die Insulinresistenz anhand eines hyperinsulinämischen Milieus induziert. Die oberen drei *Wells* wurden für 3 Tage mit Differenzierungs-Medium versetzt, welches eine Insulin-Konzentration von 100 nM aufwies (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien"). Die Kontroll-Zellen der unteren drei *Wells* erhielten reines Differenzierungs-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien"). Am dritten Tag erfolgte regulär ein Medium-Wechsel.

Auch hier wurden für die *Western Blot* Analyse sowohl insulinresistente Zellen als auch Kontrollzellen generiert, während im Rahmen der EPS-Versuche (vgl. Abschnitt 2.9.6 "Elektropulsstimulation") nur insulinresistente Zellen erzeugt wurden, um die Überstände massenspektrometrisch zu analysieren (vgl. Abschnitt 2.11 "Probenaufbereitung, Massenspektrometrie und Bioinformatik") und schließlich die Sekretome zweier Methoden (Palmitat und *High insulin*) zur Insulinresistenz-Induktion miteinander zu vergleichen.

#### 2.9.4.3 Chemerin-Behandlung

Auch bei der Chemerin-Behandlung erfolgten Insulinresistenz-Induktion und Differenzierung zeitgleich (vgl. Abschnitt 2.9.4.2 "Insulin-Behandlung *High insulin"*). Dem Differenzierungs-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien") der oberen drei *Wells* wurde Chemerin (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") in der Konzentration 1 µg/ml hinzugefügt. Die Kontroll-Zellen der unteren drei *Wells* erhielten reines Differenzierungs-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien"). Das Medium wurde am dritten Tag gewechselt.

#### 2.9.4.4 TNF-α-Behandlung

Die Insulinresistenz-Induktion durch TNF- $\alpha$  (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") fand nach der dreitägigen Differenzierung der Zellen statt, analog zur Palmitat-Behandlung (vgl. Abschnitt 2.9.4.1 "Palmitat-Behandlung"). Die TNF- $\alpha$ -Stimulation selbst erfolgte

allerdings nur für eine Stunde. Zunächst wurde das Differenzierungs-Medium durch Hunger-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien") ersetzt, um eine bessere Insulinwirkung im Rahmen der akuten Insulinstimulation (vgl. Abschnitt 2.9.5 "Akute Insulinstimulation") zu erzielen. Nach diesem fünfstündigen Hungerschritt wurden drei 6-Well-Plates (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") mit in jeweils anderer Konzentrierung TNF- $\alpha$ -haltigem Hunger-Medium befüllt, während die Kontroll-Zellen reines Hunger-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien") erhielten. Die TNF- $\alpha$ -Konzentration betrug jeweils 10 ng/ml, 15 ng/ml und 20 ng/ml. Nach einer Stunde erfolgte die akute, 15-minütige Insulinstimulation (vgl. Abschnitt 2.9.5 "Akute Insulinstimulation").

#### 2.9.5 Akute Insulinstimulation

Um später mittels Western Blot (vgl. Abschnitt 2.10 "Western Blot Analyse") die Serin-/Threonin-Kinase AKT sowie deren Phosphorylierungsstellen an Serin-473 und Threonin-308 nachzuweisen, ist eine akute Insulinstimulation der Zellen erforderlich gewesen. Für diese 15-minütige Insulinstimulierung erhielt jede 6-Well-Plate (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") mit 100 nM Insulin (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") versetztes phenolrothaltiges Hungermedium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien"). Zu einem biologischen Replikat (n) wurde jeweils eine mit Insulin stimulierte und eine nicht-stimulierte 6-Well-Plate (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") gezählt ("Insulin-Plate" und "Basal-Plate"), außer bei der Testung verschiedener Konzentrationen im Rahmen des TNF-α-Versuchs (vgl. Abschnitt 2.9.4.4 "TNF-α-Behandlung"). Hierbei erfolgte die Gabe von Insulin in die oberen drei Wells, während die untere Well-Reihe nicht durch Insulin stimuliert wurde. Nach Ablauf der 15 min wurden die 6-Well-Plates (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") auf Eis weiterbearbeitet, indem das Medium abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit kaltem PBS (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") gewaschen wurden. Die Lagerung der Zellen in 6-Well-Plates erfolgte bei -20°C für wenige Tage bis zur Lyse (vgl. Abschnitt 2.10.1 "Lyse der Zellen").

Bei den mit Palmitat behandelten Zellen erfolgte die Insulinstimulation nach Ablauf der 16 Stunden (vgl. Abschnitt 2.9.4.1 "Palmitat-Behandlung"). Differenzierten die Zellen hingegen für drei Tage in einem hyperinsulinämischen Milieu oder in einem mit Chemerin versetzten Medium (vgl. Abschnitt 2.9.4 "Etablierung von *in-vitro* Insulinresistenz-Protokollen"), wurde der akuten Insulinstimulation ein sechsstündiger Hungerschritt vorgeschaltet, indem das alte Medium abgesaugt und phenolrothaltiges Hunger-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien") gegeben wurde. Mit TNF- $\alpha$ behandelte Zellen erhielten schon vor dem einstündigen TNF- $\alpha$ -*treatment* Hunger-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien") für 5 Stunden (vgl. Abschnitt 2.9.4.4 "TNF- $\alpha$ -Behandlung"). Die Insulinstimulation erfolgte dann im Anschluss an die TNF- $\alpha$ -Behandlung.

#### 2.9.6 Elektropulsstimulation

Die Elektropulsstimulation (EPS) ist eine Methode, um Zellen *in-vitro* zur Kontraktion zu bringen. Elektrische Impulse führen hierbei zur Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum mit der Folge einer Muskelkontraktion. Die EPS-Versuche wurden sowohl mit Palmitat- als auch Insulin-behandelten Zellen durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.9.4.1 "Palmitat-Behandlung" und 2.9.4.2 "Insulin-Behandlung *High insulin*"). Im Gegensatz zu den anderen Versuchen wurden hier *6-Well-Plates* der Firma Greiner (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") verwendet, welche der Passform der EPS-Elektroden entsprachen. Außerdem enthielt das eingesetzte Hunger-Medium kein Phenolrot (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien"), da dieser pH-Indikator die massenspektrometrische Analyse des Mediums beinflussen würde. Ebenso musste darauf geachtet werden, nur Reaktionsgefäße und Zentrifugenröhrchen (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") ohne Weichmachungsmittel zu verwenden, da diese ebenfalls die Analyse beeinträchtigen könnten. Die EPS-Behandlung erfolgte für 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> Inkubation.

Zunächst wurden die EPS-Elektroden (vgl. Tabelle 6 "Geräte") für etwa 5 Minuten in phenolrotfreiem Hunger-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien") vorinkubiert. Das Medium der 6-Well-Plates wurde abgesaugt (bei den Palmitat-behandelten Zellen nach Ablauf der 16 Stunden, vgl. Abschnitt 2.9.4.1 "Palmitat-Behandlung") und die Zellen wurden drei Mal mit ionenhaltigem DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") gewaschen. Im Anschluss wurden 1 ml phenolrotfreies Hunger-Medium (vgl. Tabelle 4 "Zellkultur-Medien") pro Well pipettiert, die Elektroden (vgl. Tabelle 6 "Geräte") wurden auf die 6-Well-Plates (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") gesetzt und mit dem Deckel der 6-Well-Plate verschlossen. Waren alle eingesetzten Elektroden mit dem Hunger-Medium der Wells benetzt, erfolgte ein Anschluss der Elektroden mittels Kabel an den EPS-Pulsgenerator (vgl. Tabelle 6 "Geräte"). Der Pulsgenerator wurde für folgendes EPS-Protokoll eingestellt: 2 ms, 11, 5 V, 1 Hz. Die Kontroll-Zellen waren ebenfalls mit Elektroden versehen, wurden jedoch nicht an den Pulsgenerator angeschlossen. Jeweils eine mit EPS-stimulierte und eine unstimulierte 6-Well-Plate (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") wurden als ein biologisches Replikat (n) gezählt.

#### 2.9.7 Sammlung der Zellüberstände und Zell-Pelleting

Nach Ablauf der 24 Stunden EPS-Behandlung (vgl. Abschnitt 2.9.6 "Elektropulsstimulation") wurde der Pulsgenerator (vgl. Tabelle 6 "Geräte") abgeschaltet und das Kabel entfernt. Der Überstand der Zellen pro 6-*Well-Plate* betrug ca. 4 bis 6 ml und wurde in jeweils ein Zentrifugenröhrchen (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") überführt. Fortan wurden die Proben und 6-*Well-Plates* auf Eis gelagert. Die Überstände wurden bei 1000 x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, um eine Trennung des Mediums von Zellresten zu erreichen. Anschließend wurde der zentrifugierte Überstand eines Röhrchens in ein jeweils neues Zentrifugenröhrchen überführt (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien"). Die Überstände wurden bei -80°C gelagert bis zur Weiterverarbeitung durch Frau Martina Schiller, Mitarbeiterin der von Herrn Dr. Stefan Lehr geleiteten "Plattform Proteomanalyse" des Instituts. Die 6-Well-Plates (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") wurden auf Eis einmalig mit kaltem ionenhaltigem DPBS (vgl. Tabelle 2 Chemikalien") gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen kurzzeitig in den 6-Well-Plates bei -20°C gelagert, falls sie für die Weiterverarbeitung für den Western Blot vorgesehen waren (vgl. Abschnitt 2.10.1 "Lyse der Zellen").

Alternativ wurden zur Generierung trockener Zell-Pellets die Zellen zwei Mal mit kaltem PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") gewaschen. Im Anschluss wurden 200 µl PBS pro *Well* hinzugefügt und die Zellen vorsichtig vom *Well*-Boden geschabt. Die PBS-Zellsuspension wurde anschließend in Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") überführt, welche bei 1000 x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert wurden. Der PBS-Überstand wurde entfernt und die Zell-Pellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um einen schonenden Einfrierprozess zu gewährleisten. Schließlich wurden die Zell-Pellets bei -80°C gelagert. Für die Weiterbearbeitung der für einen *Western Blot* benötigten Zell-Pellets wurden diese wie in Abschnitt 2.10.1 "Lyse der Zellen" lysiert.

## 2.10 Western Blot Analyse

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte einer Western Blot Analyse erläutert.

#### 2.10.1 Lyse der Zellen

Um eine Proteinextraktion der Zellen durchzuführen, mussten die 6-Well-Plates bzw. die Zell-Pellets (vgl. Abschnitt 2.9.5 "Akute Insulinstimulation" und 2.9.7 "Sammlung der Zellüberstände und Zell-Pelleting") zunächst auf Eis auftauen. Währenddessen wurden 40 µl der cOmplete<sup>™</sup>-Stocklösung und 100 µl der PhosSTOP<sup>™</sup>-Stocklösung pro Milliliter der Lysepuffer-Gebrauchslösung (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") hinzugefügt. Die benötigte Lysepuffer-Menge wurde berechnet, indem die Anzahl der zu lysierenden Wells mit 200 µl (Lysepuffer-Volumen pro Well) multipliziert bzw. die Anzahl der zu lysierenden Zell-Pellets mit 6 und im Anschluss mit 200 µl multipliziert wurde. Die Wells wurden dementsprechend jeweils in 200 µl (200 µl pro Well) und die Zell-Pellets in jeweils 1,2 ml Lysepuffer (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") lysiert. Nach 2 min Einwirkzeit wurden die Zellen vom Boden der 6-Well-Plates (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") überführt. Die Lysepuffer-Zellsuspension der ursprünglichen Zell-Pellets wurde nach gründlichem Homogenisieren bei 18.000 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren und Zellreste zu entfernen. Schließlich wurde die klare Phase (Überstand mitsamt den zytosolischen und nukleären Proteinen) in ein jeweils neues Reaktionsgefäß (vgl. Tabelle 1

"(Verbrauchs-)Materialien") überführt, welches anschließend bei -20°C bis zur Weiterbearbeitung gelagert wurde.

#### 2.10.2 Proteinbestimmung

In der Biochemie wird die BCA-Analyse (*bicinchoninic acid*) zur photometrischen und quantitativen Proteinbestimmung genutzt. Hierbei reagieren Cu<sup>2+</sup>-Ionen quantitativ mit den vorhandenen Proteinen zu Cu<sup>+</sup>-Ionen. 2 Bicinchoninsäure-Moleküle bilden dann mit einem Cu<sup>+</sup>-Ion einen Chelat-Komplex, welcher die violette Färbung der Lösung verursacht. Die Absorption des violetten Farbstoffs kann bei einer Wellenlänge von ca. 560 nm photometrisch ausgewertet werden.

Die Proteinkonzentration in den Lysaten (vgl. Abschnitt 2.9.1 "Lyse der Zellen") wurde mittels *Pierce*<sup>™</sup> *BCA Protein Assay Kit* (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") bestimmt, gemäß den Hersteller-Anweisungen. Die im Kit enthaltene BSA- (Bovines Serum Albumin) Lösung wurde verwendet, um eine Standard-Verdünnungs-Reihe mit Milli-Q-H<sub>2</sub>O aus dem Wasseraufbereitungssystem des Instituts (vgl. Tabelle 6 "Geräte") zu erstellen. Die BSA-Konzentrationen der Standards sind in Tabelle 8 "BSA-Konzentration" aufgelistet:

Standard	BSA-Konzentration (µg/Well)	BSA-Konzentration (µg/ µl)
Standard 1	0,5	0,025
Standard 2	1,0	0,050
Standard 3	2,0	0,100
Standard 4	3,0	0,150
Standard 5	4,0	0,200
Standard 6	5,0	0,250
Standard 7	6,0	0,300
Standard 8	7,0	0,350

Tabelle 8: **BSA-Konzentration** je Well und je Standard für die BCA-Proteinbestimmung

Die Zelllysat-Proben wurden im Verhältnis 1:10 mit Milli-Q-H<sub>2</sub>O verdünnt. Im Anschluss erfolgte der Auftrag der Standards (vgl. Tabelle 8 "BSA-Konzentration") und der Verdünnung der Proben mit einem Volumen von 20 µl pro *Well* als Doppelbestimmung auf die *96-Well-Plate* (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien"). Die im Kit enthaltenen Reagenzien A und B (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") wurden im Verhältnis 1:50 gemischt (50 Teile A und 1 Teil B) und die Lösung dann mittels Multipette<sup>®</sup> (vgl. Tabelle 6 "Geräte") in die *Wells* gegeben (200 µl pro *Well*). Schließlich wurde die *96-Well-Plate* (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") mit einer Klebefolie verschlossen und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte nach Abziehen der Folie am Mikroplatten-Absorptionsgerät (vgl. Tabelle 6 "Geräte") unter den Einstellungen "Filter = 560 nm, *Endpoint, Mix time* = 3, *Mix Speed* = M".

#### 2.10.3 Gel-Elektrophorese

Die SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) beschreibt eine Gelelektrophorese-Methode zur Protein-Auftrennung im elektrischen Feld. Trennmedium bildet ein Polyacrylamidgel, welches wie ein Sieb funktioniert. Das Detergens SDS (sodium dodecyl sulfate) überdeckt die Eigenladungen der Proteine, sodass diese eine gleichmäßige Ladungsverteilung aufweisen. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung erfolgt dann die Migration der negativ geladenen Proteine durch das Gel, wobei kleine Proteine schneller durch die Gelmaschen wandern, größere Proteine hingegen langsamer. Schließlich sind alle Proteine nach Größe sortiert.

Für die Durchführung einer denaturierenden SDS-PAGE wurden zunächst die Proteinproben verdünnt sowie Gele vorbereitet. Ein Polyacrylamidgel bestand hierbei aus einem oberen Sammel- sowie einem unteren Trenngel. Es wurden stets Gele mit einem 12 %igen Acrylamid-Anteil hergestellt, die Zusammensetzung kann der folgenden Tabelle 9 "Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels für die SDS-PAGE" entnommen werden. Die verwendeten Chemikalien und Puffer finden sich in Tabelle 2 "Chemikalien" sowie Tabelle 3 "Puffer und Lösungen".

Trenngel (12 %) 1,0 mm dick	Sammelgel 1,0 mm dick	Trenngel (12 %) 1,5 mm dick	Sammelgel 1,5 mm dick
2,04 ml Milli-Q-	1,22 ml Milli-Q-	3,06 ml Milli-Q-	1,83 ml Milli-Q-
H₂O	H <sub>2</sub> O	H₂O	H₂O
1,56 ml unterer	520 µl oberer	2,34 ml unterer	780 µl oberer
Gelpuffer	Gelpuffer	Gelpuffer	Gelpuffer
2,40 ml Acrylamid	260 µl Acrylamid	3,6 ml Acrylamid	390 µl Acrylamid
(30 %)	(30 %)	(30 %)	(30 %)
12 µl APS	4 µl APS	18 µl APS	6 µl APS
6 µl TEMED	2 µl TEMED	9 µl TEMED	3 µl TEMED

Tabelle Q: Zusammensetzung	ainas Da	lvaonulamido	ole für	dia SDS-DAG	E
Tabelle 9. Zusammensetzung	EIIIE2 FO	iyaci yiannug	jeis iui	ule SDS-FAG	

Zuerst wurde das Trenngel (vgl. Tabelle 9 "Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels") nach Anleitung hergestellt und auf einem Magnet-Rührgerät gemischt, um es dann zügig zwischen die Glasplatten (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") zu pipettieren. Dann wurde das Gel mit Isopropanol (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") für ca. 20 min überschichtet. Dies verhindert das Austrocknen des Gels sowie eine Blasenbildung. Nach Ablauf der 20 min wurde das Isopropanol ausgeschüttet, das Gel einmal mit Milli-Q-H<sub>2</sub>O gespült und anschließend wurden die Wasser-Reste mit Filterpapier entfernt. Daraufhin wurde das Sammelgel nach obiger Anleitung hergestellt (vgl. Tabelle 9 "Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels") und zwischen die Glasplatten (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") auf das Trenngel gegeben. Zum Schluss wurde pro Polyacrylamidgel ein Kamm mit 10 oder 15 Aussparungen (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") für die Geltaschen eingesetzt und nach etwa 20 min Aushärtungszeit war das Gel gebrauchsfertig.

Die Proteinlysate (vgl. Abschnitt 2.10.1 "Lyse der Zellen") wurden für die Elektrophorese so verdünnt, dass der Proteingehalt pro Geltasche 20 µg betrug. Die benötigte 4x-Laemmli-Puffer-Menge (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") wurde berechnet, indem das Gesamtvolumen pro Geltasche durch 4 dividiert wurde. Das Gesamtprobenvolumen wurde schließlich mit Milli-Q-H<sub>2</sub>O eingestellt. Meist wurde ein Dreifach-Ansatz gewählt, um eine ausreichende Probenmenge zu generieren. Die verdünnten Proben wurden dann nach kurzem Mischen für 5 Minuten bei 95°C denaturiert, um Sekundär- und Tertiärstrukturen (nicht-kovalente Bindungen) der Proteine aufzubrechen.

Um nun eine Elektrophorese durchzuführen, wurden je Halterung zwei Gele eingeklemmt und Elektrophorese-Puffer (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") in den Zwischenraum gefüllt. Nach Entfernung der Kämme (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") wurden nacheinander mittels Hamilton-Spritze (vgl. Tabelle 6 "Geräte") die Proben in die Geltaschen pipettiert. Zur Schätzung des Molekulargewichts der elektrophoretisch getrennten Proteinbanden wurden zusätzlich 1 – 2 Geltaschen pro Gel mit dem vorgefärbten Proteinstandard *PageRuler*<sup>™</sup> (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") beladen. Geltaschen, welche weder mit Probe noch Proteinstandard beladen wurden, enthielten 4x-Laemmli-Puffer (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") in einer Menge, die einem Viertel des Gesamtprobenvolumens entsprach.

Die Elektrophorese wurde mittels Elektrophorese-Puffer (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") für 15 Minuten bei 50 V und für etwa 45 Minuten bei 150 V durchgeführt, bis die Auftrennung der *PageRuler*<sup>™</sup>-Proteinstandard-Banden (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") deutlich sichtbar wurde. Es wurde das *Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell System* (vgl. Tabelle 6 "Geräte") verwendet.

#### 2.10.4 Transfer und Blocking

Nach Ablauf der Elektrophorese (vgl. Abschnitt 2.9.3 "Gel-Elektrophorese") erfolgte ein Transfer der Proteinbanden vom Polyacrylamid-Trenngel auf eine Nitrozellulose-Membran (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien"). Hierfür wurden nach Entfernung des Sammelgels Trenngel und Membran mittels Halterung, zwei Schwämmen und acht *Blotting*-Papieren in eine *Western Blot*-Transfer-Kammer eingeklemmt. Der Transfer wurde in Transfer-Puffer (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") bei 5 – 10°C und 0,2 Ampere für 2 Stunden durchgeführt.

Nach dem zweistündigen Transfer wurde die Membran kurz mittels Wasch-Puffer (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") gewaschen. Für das *Blocking* wurde die Nitrozellulose-Membran im Anschluss für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer 5 %igen Milchpulver-Waschpuffer-Lösung auf einem Wipp-Schüttler inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Nach Ablauf der Stunde wurde die Membran erneut gewaschen und anhand der Molekulargewichts-Banden des *PageRuler*<sup>™</sup>-Proteinstandards (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") geschnitten.

#### 2.10.5 Antikörper-Inkubation

Nach *Blocking* und Schneiden der Membran (vgl. Abschnitt 2.10.4 "Transfer und *Blocking*") wurden die Teilmembranen über Nacht bei 4°C mit einem der folgenden in 5 %iger Milchpulver-Waschpuffer-Lösung verdünnten Primär-Antikörper unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert: Anti-AKT (1:1000 (v/v) 5 % MP), Anti-pAKT-Ser473 (1:1000 (v/v) 5 % MP), Anti-pAKT-Thr308 (1:1000 (v/v) 5 % MP) oder Anti-GAPDH (1:2000 (v/v) 5 % MP, vgl. Tabelle 5 "Antikörper").

Am Folgetag wurden die Membranen zwei Mal kurz und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln mittels Wasch-Puffer (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") gewaschen. Danach wurden sie jeweils für 1 Stunde mit in 5 %iger Milchpulver-Waschpuffer-Lösung verdünntem Sekundär-Antikörper Anti-*rabbit* (1:20.000 (v/v) 5 % MP, vgl. Tabelle 5 "Antikörper") inkubiert, ebenfalls bei Raumtemperatur unter Schütteln. Nach der einstündigen Inkubation wurden die Membranen erneut zwei Mal kurz und im Anschluss für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln gewaschen.

#### 2.10.6 Detektion mit Chemilumineszens

Durch Inkubation der Membranen mit *Enhanced Chemiluminescence (ECL-)Substrate Western Lightning*<sup>®</sup> *ECL Pro* oder *Western Lightning*<sup>®</sup> *Ultra* (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") erfolgte der immunchemische Nachweis der mit Antikörpern konjugierten Proteinbanden. Die enthaltenen Reagenzien wurden im Verhältnis 1:1 angesetzt und die Detektion erfolgte mittels *ChemiDoc Imaging System* (vgl. Tabelle 6 "Geräte").

Die Chemilumineszens-Signale wurden schließlich mithilfe des Programms *Image Lab* (vgl. Tabelle 7 "Softwareprogramme") quantifiziert. Die Proteinbanden wurden auf die Ladungskontrolle GAPDH (Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) normalisiert.

# 2.11 Probenaufbereitung, Massenspektrometrie und Bioinformatik

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Probenaufbereitung, massenspektrometrischen und bioinformatischen Analyse der Überstände insulinresistenter C2C12-Zellen nach EPS (vgl. Abschnitt 2.9.6 "Elektropulsstimulation") zusammenfassend beschrieben. Die Insulinresistenz wurde durch Palmitat einerseits und durch ein hyperinsulinämisches Milieu andererseits induziert (vgl. Abschnitt 2.9.4.1 "Palmitat-Behandlung" und 2.9.4.2 "Insulin-Behandlung *High insulin*"). Die Probenvorbereitung wurde von Frau Martina Schiller und die massenspektrometrischen Analysen von Frau Dr. Sonja Hartwig vorgenommen, im Sinne einer Zusammenarbeit mit der von Herrn Dr. Stefan Lehr geleiteten "Plattform Proteomanalyse" unseres Instituts für Klinische Biochemie und Pathobiochemie.

#### 2.11.1 Probenaufbereitung

Die nächsten Abschnitte (2.11.1.1 – 2.11.1.7) geben einen Überblick bezüglich der Methodik der Probenaufbereitung.

#### 2.11.1.1 Ultrazentrifugation der Überstände

Zunächst wurden die Proben bei 85.000 x g für 30 Minuten und 4°C ultrazentrifugiert. Durch das hochtourige Zentrifugieren der Überstände (vgl. Abschnitt 2.9.7 "Sammlung der Zellüberstände und Zell-*Pelleting"*) werden große extrazelluläre Vesikel und Apoptosekörper pelletiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand zur Weiterbearbeitung in ein jeweils neues Reaktionsgefäß (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") überführt.

#### 2.11.1.2 Aufkonzentrierung ultrazentrifugierter Überstände

Nachdem die Überstände durch niedertouriges Zentrifugieren in der Zellkultur (vgl. Abschnitt 2.9.7 "Sammlung der Zellüberstände und Zell-Pelleting") und anschließendes hochtouriges Zentrifugieren (vgl. Abschnitt 2.11.1.1 "Ultrazentrifugation der Überstände") von Zellresten, Apoptosekörperchen und großen extrazellulären Vesikeln weitgehend befreit worden sind, wurde nun durch die Zentrifugation mit eingesetztem Amicon<sup>®</sup> - Filter (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") eine Aufkonzentrierung des Proteingehalts der Probe erzielt. Zunächst wurden die Amicon<sup>®</sup> -Filter (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") mit 1 ml DPBS (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") vorbenetzt und aktiviert, welches dann wieder entfernt wurde. Der Probenüberstand wurde dann auf die Filter gegeben und bei 3220 x g und 4°C für ca. 2 Stunden zentrifugiert. Dabei ist die Zentrifugationszeit abhängig vom Zielvolumen der jeweiligen Probe und kann folglich variieren. Nach Erreichen des Zielvolumens von 70 – 100 µl wurde die eingeengte Probe (Rückstand auf dem Amicon<sup>®</sup> -Filter) in ein neues Reaktionsgefäß (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") überführt. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration der eingeengten Überstände mittels NanoDrop<sup>™</sup>-Spektralphotometer (vgl. Tabelle 6 "Geräte") bestimmt (vgl. Abschnitt 2.11.1.3 "Proteinbestimmung (NanoDrop)").

#### 2.11.1.3 Proteinbestimmung (NanoDrop)

Die Messung der Proteinkonzentration mittels *NanoDrop*<sup>™</sup>-Spektralphotometer (vgl. Tabelle 6 "Geräte") erfolgt nach dem Prinzip der UV (ultraviolett)/VIS (*visible*)-Spektroskopie. Hierbei wird eine Probe mit elektromagnetischen Strahlen im ultravioletten und sichtbaren Bereich beleuchtet. Hier wurde eine Wellenlänge von 280 nm verwendet. Je nach Probenzusammensetzung werden die Lichtstrahlen teilweise absorbiert und das Restlicht wird von einem Detektor erfasst. Der Detektor erzeugt dann das Absorptionsspektrum der Probe. Bedingt durch das geringe Proben-Ausgangsvolumen bietet sich die Messung der Proteinkonzentration mittels *NanoDrop*<sup>™</sup>-Spektralphotometer (vgl. Tabelle 6 "Geräte") an, da hier nur 1,5 µl des Probenvolumens verbraucht werden.

#### 2.11.1.4 QC-Gel

Mithilfe eines QC-Gels *(quality control gel)* erhält man einen Überblick über die Proteinkomposition der Proben, welche sich in Form des resultierenden Bandenmusters hier weitgehend gleich darstellen sollte. Verwendet wurde das *Criterion*<sup>™</sup> *TGX Stain-Free*<sup>™</sup> *Precast* Gel (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien"). Die *stain-free imaging* Technologie dieses Polyacrylamidgels nutzt ein Fluorophor, das sog. *"trihalo compound"*, welches kovalent an Tryptophanreste der Proteine bindet und somit nach UV-Licht-Aktivierung die Fluoreszens von Tryptophan verstärkt. Dieses Fluoreszenssignal ermöglicht den Proteinnachweis nach UV-Licht-Exposition. Jeweils 2 µl der Proben wurden mit SDS-Puffer (5x) (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") und Milli-Q-H<sub>2</sub>O versetzt, sodass der Proteingehalt 20 µg pro Probe betrug. Ebenso wurde pro Gel je eine Geltasche mit einem 500 ng BSA-Standard und einem *Unstained* Protein-Marker beladen (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien"). Im Anschluss wurden die Proteine bei 50 mA in Laemmli-Laufpuffer (1x) (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") elektrophoretisch aufgetrennt und es erfolgte eine Chemilumineszens-Aufnahme der Proteinbanden.

#### 2.11.1.5 1D-Gel-Elektrophorese

In diesem Abschnitt wird die Herstellung eines Polyacrylamidgels und die Durchführung der 1D-Gelelektrophorese für den späteren In-Gel-Verdau (vgl. Abschnitt 2.11.1.7 "In-Gel-Verdau") beschrieben.

Ein Polyacrylamidgel bestand aus einem Trenngel mit 25 % Acrylamid-Anteil, einem darüberliegenden 10 % igen Trenngel und einem oberen 4 % igen Sammelgel. Die Zusammensetzung der Gel-Schichten ist in Tabelle 10 "Zusammensetzung der Gel-Schichten eines Polyacrylamidgels für den In-Gel-Proteinase-Verdau" aufgeführt. Die verwendeten Chemikalien und Puffer finden sich in Tabelle 2 "Chemikalien" sowie Tabelle 3 "Puffer und Lösungen".

In-Gel-Proteinase-Vero	dau		
Sammalaal 4 %	Tropped 10 %	Tropped 25 %	

Tabelle 10: Zusammensetzung der Gel-Schichten eines Polyacrylamidgels für den

Sammelgel 4 %	Trenngel 10 %	Trenngel 25 %
2,275 ml Milli-Q-H <sub>2</sub> O	0,75 ml Milli-Q-H <sub>2</sub> O	0,625 ml Milli-Q-H₂O
0,875 ml 0,5 M Tris pH 6,8	0,375 ml 3 M Tris pH 8,8 /	1,25 ml 3 M Tris pH 8,8 /
/ 0,8 % SDS (4x)	0,8 % SDS (4x)	0,8 % SDS (4x)
0,35 ml Acrylamid (40 %)	0,375 ml Acrylamid (40 %)	3,125 ml Acrylamid (40 %)
13,15 µl APS (10 %)	7,5 μl APS (10 %)	25 µl APS (10 %)
2,65 µl TEMED	1,5 µl TEMED	5 µl TEMED

Zunächst wurden die Gel-Abstände als Orientierung auf den Glasplatten markiert: 4 cm für das 25 %ige Trenngel, weitere 0,5 cm für das darüber liegende 10 %ige Trenngel und 2,5 cm für das 4 %ige Sammelgel. Nach Ansetzen des 25 %igen

Trenngels (vgl. Tabelle 10 "Zusammensetzung der Gel-Schichten eines Polyacrylamidgels für den In-Gel-Proteinase-Verdau") wurde dieses bis zur entsprechenden Markierung eingegossen und mit 750 µl 70 %igem Isopropanol (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") überschichtet. Die Auspolymerisierungszeit betrug eine Stunde. Nach Abgießen des Isopropanols und Abwaschen der Reste mittels Milli-Q-H<sub>2</sub>O wurde das 10 % ige Trenngel (vgl. Tabelle 10 "Zusammensetzung der Gel-Schichten eines Polyacrylamidgels für den In-Gel-Proteinase-Verdau") hergestellt, eingegossen und mit 750 µl 70 %igem Isopropanol (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") überschichtet. Nach einer Stunde wurde die obere Glaskante mit einem Tesafilm-Streifen abgedichtet und das Gel bei 4°C über Nacht gelagert. Am Folgetag wurde der Klebestreifen entfernt und der oben geschilderte Waschschritt wiederholt. Schließlich wurde das 4 %ige Sammelgel (vgl. Tabelle 10 "Zusammensetzung der Gel-Schichten eines Polyacrylamidgels für den In-Gel-Proteinase-Verdau") angemischt und eingegossen und nach Einsetzen eines Kammes mit Aussparungen für die Geltaschen (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") erfolgte die Auspolymerisierung erneut für eine Stunde.

Die Aufbereitung der Proben erfolgte anhand der mittels NanoDrop<sup>™</sup>-

Spektralphotometer (vgl. Tabelle 6 "Geräte") gemessenen Proteinkonzentration (vgl. Abschnitt 2.11.1.4 "QC-Gel"). Die Proben wurden mittels SDS-Probenpuffer (5x) (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") im Verhältnis 25 µg Protein pro *Lane* sowie Milli-Q-H<sub>2</sub>O verdünnt. Proben und BSA-Standard wurden dann für 5 Minuten bei 95°C unter Schütteln denaturiert und anschließend abgekühlt, bevor sie auf das Gel geladen wurden. Zudem wurde ein *All Blue* Marker (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") als Proteingrößen-Standard eingesetzt, welcher im Verhältnis 1:5 mit SDS-Probenpuffer (1x) (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") verdünnt wurde.

Die Gelelektrophorese wurde in Fling-Gregerson-Puffer (vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen") bei 100 V durchgeführt und gestoppt, sobald der *All Blue* Marker (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") anfing, sich aufzutrennen und die komprimierten Banden vollständig in das 10 %ige Trenngel (vgl. Tabelle 10 "Zusammensetzung der Gel-Schichten eines Polyacrylamidgels für den In-Gel-Proteinase-Verdau") hineingelaufen waren.

#### 2.11.1.6 Färbung des Gels

Durch die im vorherigen Abschnitt 2.11.1.5 "1D-Gelelektrophorese" beschriebene Gelelektrophorese wurden die Proteine einer Probe in jeweils einer Bande konzentriert. Mithilfe der *Coomassie*<sup>®</sup>-Blaufärbung (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") eines Gels wurden die Proteinbanden nun sichtbar gemacht, um sie aus dem Gel herausschneiden zu können. In Tabelle 11 "Vorgehensweise bei der *Coomassie*<sup>®</sup>-Blaufärbung" sind die Schritte der Färbung aufgeführt. Die benötigten Chemikalien sind zudem in Tabelle 2 "Chemikalien" gelistet.

Schritte der Färbung	Chemikalien	Vorgehensweise	
Fixierung	40 % Methanol 2 % o-Phosphorsäure Milli-Q-H₂O	<ul> <li>Auffüllen des Ansatzes mit Milli- Q-H<sub>2</sub>O</li> <li>Zeit: 1 Stunde</li> </ul>	
Wässerung	100 % Milli-Q-H₂O	<ul> <li>Gel wird 1 Stunde gewässert, dabei Wasserwechsel alle 20 Minuten</li> </ul>	
Äquilibrierung	34 % Methanol 2 % o-Phosphorsäure 17 % Ammoniumsulfat Milli-Q-H <sub>2</sub> O	<ul> <li>Auffüllen des Ansatzes mit Milli- Q-H<sub>2</sub>O</li> <li>Zeit: 1 Stunde</li> </ul>	
Färbung	34 % Methanol 2 % o-Phosphorsäure 17 % Ammoniumsulfat 0,066 % <i>Coomassie</i> <sup>®</sup> Blau Milli-Q-H <sub>2</sub> O	<ul> <li>Färbung über Nacht und am nächsten Tag mit neuem Ansatz für 3 bis 4 Stunden</li> </ul>	
Entfärbung	100 % Milli-Q-H <sub>2</sub> O	- Entfärben des Hintergrundes	
Die Angaben beziehen sich auf ein Gesamtvolumen von 100 ml.			

#### Tabelle 11: Vorgehensweise bei der Coomassie®-Blaufärbung

Jedes Gel wurde in 100 ml der entsprechenden Lösung (vgl. Tabelle 11 "Vorgehensweise bei der *Coomassie*<sup>®</sup>-Blaufärbung") bei Raumtemperatur auf einem Wipp-Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte eine Bildaufnahme am *ChemiDoc* (vgl. Tabelle 6 "Geräte").

#### 2.11.1.7 In-Gel-Verdau

Um eine *Bottom-up-Proteomics* Analyse mittels Massenspektrometrie durchführen zu können (vgl. Abschnitt 2.11.2 "Massenspektrometrische Messung"), müssen die sich in den komprimierten Gelbanden befindenden Proteine zuvor in einem Gel verdaut werden. Der Verdau der Proteine in Peptide erfolgte durch die Serin-Endoproteinase-Mischung Trypsin/Lys-C, welche eine effizientere Verdauung von Proteinen am Carboxyl-Ende der Lysin- und Arginin-Reste bietet als Trypsin alleine (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien").

Zuerst wurden die einzelnen Proteinbanden nach der *Coomassie*<sup>®</sup>-Blaufärbung (vgl. Abschnitt 2.11.1.6 "Färbung des Gels") aus dem Gel herausgeschnitten und in 4 gleich große Stücke zerkleinert, welche in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") gesammelt wurden. Dann wurden die Banden-Stücke abwechselnd mit 200 µl 25 mM Ammoniumbicarbonat und 200 µl 25 mM Ammoniumbicarbonat und 200 µl 25 mM Ammoniumbicarbonat und 200 µl 25 mM erkenntlich war. Anschließend wurden die Gel-Stücke mit 200 µl reinem Acetonitril (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") für 15 Minuten gewaschen, um die Gelstücke zu dehydratisieren. Der Überstand wurde entfernt und die Gel-Stücke trockneten für 10 –

15 Minuten. Danach wurde je Probe 80 µl in 25 mM Ammoniumbicarbonat gelöstes DTT (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") hinzugefügt. Durch Reduktion mit DTT werden die Disulfidbrücken des Proteins getrennt. Die Reaktionsgefäße (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") wurden dann bei 50°C für 15 Minuten unter Schütteln erhitzt. Nachdem sie im Anschluss für wenige Minuten im Eis abgekühlt waren, wurde die DTT-Lösung abpipettiert und die Proben mit 200 µl 100 %igem Acetonitril (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") für weitere 15 Minuten dehydratisiert. Anschließend trockneten die Proben bei geöffnetem Reaktionsgefäß-Deckel für 15 Minuten. Nun wurde je Probe 80 µl in 25 mM Ammoniumbicarbonat gelöstes Iodacetamid (216 mM) (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") hinzugegeben, um die Proben daraufhin für 15 Minuten im Dunkeln zu inkubieren. Die reduzierten Thiol-Bindungen werden durch lodacetamid irreversibel alkyliert. Erneut erfolgten Waschschritte abwechselnd mit 25 mM Ammoniumbicarbonat und 25 mM Ammoniumbicarbonat mit 50 % Acetonitril (v/v) (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien"), nun mit 500 µl der Lösungen. Anschließend wurden die Gel-Stücke dehydratisiert, indem sie mit 200 µl 100 %igem Acetonitril (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") für 15 Minuten inkubiert und im Anschluss für weitere 15 Minuten trocknen gelassen wurden. Der enzymatische Proteinverdau erfolgte schließlich für 16 Stunden über Nacht im Brutschrank (vgl. Tabelle 6 "Geräte") bei 37°C mittels 1:25 Lys-C/Trypsin-Mix als Verdünnung mit 50 mM Ammoniumbicarbonat und 2 % Acetonitril (v/v) (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien"). Am Folgetag wurden die resultierenden Peptide aus den Gel-Stückchen eluiert, indem zuerst für 45 - 60 Minuten 1 %ige Trifluoressigsäure und im Anschluss für 15 – 30 Minuten 0,1 % Trifluoressigsäure/90 % Acetonitril (v/v) (vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") hinzugefügt wurde. Die so gewonnenen Überstände (Eluate) wurden in einem LoBind<sup>®</sup>-Reaktionsgefäß (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") vereinigt und in einem Zentrifugal-Vakuumkonzentrator (vgl. Tabelle 6 "Geräte") bei 45°C lyophilisiert. Die Proben bis zur Weiterbearbeitung bei 4°C gelagert.

#### 2.11.1.8 Beladung der Autosampler-Vials

Für die nachfolgende massenspektrometrische Analyse (vgl. Abschnitt 2.11.2 "Massenspektrometrische Messung") wurden die Proben in 1 %iger TFA (Trifluoressigsäure, vgl. Tabelle 2 "Chemikalien") rekonstituiert. Die Proben wurden in je 30 µl der TFA-Lösung aufgenommen und anschließend für 5 Minuten durch die im Ultraschallbad (vgl. Tabelle 6 "Geräte") erzeugten Scherkräfte homogenisiert. Nach 10 Minuten Ruhen bei Raumtemperatur wurden die Proben luftblasenfrei in die *Vials* (vgl. Tabelle 1 "(Verbrauchs-)Materialien") überführt und in die vorgesehene Einrichtung des *Autosamplers* positioniert.

#### 2.11.2 Massenspektrometrische Messung

Frau Dr. Sonja Hartwig nahm die in diesem Abschnitt beschriebene massenspektrometrische Analyse nach dem *Bottom-up-Proteomics-Prinzip* vor. Der Ansatz besteht darin, Proteine in Peptidkomponenten enzymatisch zu verdauen (vgl. Abschnitt 2.11.1.7 "In-Gel-Verdau"), die Peptide mithilfe der Hochleistungs-Flüssigchromatographie zu trennen und sie final mittels Massenspektrometrie zu identifizieren. Die identifizierten Peptidsequenzen erlauben die Zuordnung der in der Probe ursprünglich enthaltenen Proteine. Je Probe wurden drei technische Replikate gemessen.

Die komplexe, zu analysierende Probe wurde über eine C18-Trennsäule (vgl. Tabelle 6 "Geräte") mittels des Hochleistungs-Flüssigchromatographen (HPLC, high performance liquid chromatography) UltiMate 3000 (vgl. Tabelle 6 "Geräte") fraktioniert. Hierzu wurden sie auf eine Acclaim<sup>™</sup> PepMap<sup>™</sup> C18-LC (liquid chromatography) -Vorsäule (Innendurchmesser: 75 µm, Länge: 2 cm, stationäre Phase: C18-Alkylreste, vgl. Tabelle 6 "Geräte") geladen, die Auftrennung erfolgte anschließend über eine C18-Trennsäule (Aurora series UPLC (ultra performance liquid chromatography) column, Innendurchmesser: 75 µm, Länge: 25 cm, stationäre Phase: C18-Alkylreste, vgl. Tabelle 6 "Geräte") bei einer Flussrate von 300 nl/min und einer Säulentemperatur von 40°C. Die mobile Phase A setzte sich aus Wasser mit 0,1 % (v/v) Ameisensäure und die mobile Phase B aus 80 % Acetonitril mit 0,1 % (v/v) Ameisensäure zusammen (HPLC-Puffer A und HPLC-Puffer B, vgl. Tabelle 3 "Puffer und Lösungen"). Die Konzentration des HPLC-Puffers B wurde zunächst über einen 72-minütigen linearen Gradienten von 2 % auf 19 %, gefolgt von einem 28-minütigen linearen Gradienten auf 29 % und schließlich über einen 20-minütigen linearen Gradienten auf 41 % erhöht, im Sinne einer Erhöhung des polaren Eluenten. Im Anschluss folgte eine dreimalige Spülung bei abwechselnd hoher (bis 95 %) und niedriger (bis 2 %) HPLC-Puffer B-Konzentration. HPLC (UltiMate 3000, vgl. Tabelle 6 "Geräte") und Massenspektrometer (Orbitrap Exploris<sup>™</sup> 480, vgl. Tabelle 6 "Geräte") sind über eine Ionenquelle (Nanospray Flex<sup>™</sup>, vgl. Tabelle 6 "Geräte") verbunden. Nach der hier stattfindenden Elektrospray-Ionisation, ein schonendes Ionisationsverfahren, erfolgte die Vermessung der Ionen im Orbitrap Exploris<sup>™</sup> 480 Massenspektrometer (vgl. Tabelle 6 "Geräte").

Die Massenspektrometrie-Daten wurden in der sog. datenabhängigen Akquisition (DDA, *Data-Dependent-Acquisition*) aufgenommen. Diese massenspektrometrische Akquisitionsmethode dient der datenabhängigen Auswahl der Vorläufer-Ionen, welche in einem MS1-Scan erfasst werden. Anschließend wird eine Auswahl dieser Vorläufer-Ionen unter Berücksichtigung zuvor definierter Kriterien der Fragmentierung zugeführt, welche im Anschluss in einem Fragment-Massenspektrum (MS2-Spektrum) dargestellt werden. MS1-Spektren (*Full Scan*) wurden alle 2 Sekunden bei einer Auflösung von 120.000, einem Masse/Ladung- (m/z, Verhältnis) Messbereich von 350 – 1200 und einem Zielwert von 300 % erstellt. Die Einstellung der maximalen Injektionszeit war *Auto Mode*. Die Peptidfragmentierung erfolgte unter folgenden Einstellungen: Filter für die *precursor ions* (Peptide, Ladungszustand zwischen 2 und 6, dynamische Ausschlusszeit von 45 Sekunden, Intensitätsschwelle 1,0 e<sup>4</sup>). Die Aufnahme der MS2-Spektren erfolgte nach Isolation im Quadrupol mit einem Fenster von 1,6 m/z und

Fragmentierung mit HCD (*higher energy collisional dissociation*) von 30 %, einem AGC- (*automatic gain control*) Zielwert von 100 %, einer maximalen Injektionszeit von 22 ms und einer Auflösung von 15.000 in der *Orbitrap*.

#### 2.11.3 Analyse der Rohdaten

Die Rohdaten-Analyse mittels *Proteome Discoverer*<sup>™</sup> 3.0 (vgl. Tabelle 7 "Softwareprogramme") wurde ebenfalls durch Frau Dr. Sonja Hartwig durchgeführt. Der *SpectrumRC node* wurde zur Rekalibrierung der Spektren verwendet. Über den *Minora feature detector node* in den Standard-Einstellungen konnte quantifiziert werden. Eine Datenbanksuche wurde über die Suchmaschine *Sequest-HT* gegen folgende *UniProtKB*-Datenbanken durchgeführt: *reviewed SwissProt, Mus musculus TaxID 10090 canonical and isoforms, Equus caballus* und *Bovinus taurus*. Bei der Analyse wurden darüber hinaus zwei verfehlte Spaltstellen durch die Endopeptidase Trypsin toleriert. Als statische Modifikationen wurden Carbamidomethylierungen von Cysteinen akzeptiert, als dynamische Modifikationen Acetylierungen, Methionin-Oxidation sowie die Kombination einer Acetylierung und eines Methionin-Verlustes am N-Terminus. Die Validierung der *Sequest-HT*-Suche erfolgte mithilfe des *Percolator node*. Darüber hinaus wurde eine labelfreie Quantifizierung mit maximalem *retention time alignment* von 10 Minuten, einer Massentoleranz von 10 ppm und einer minimalen *signal to noise ratio* von 5 durchgeführt.

#### 2.11.4 Bioinformatische Analyse, Gen-Ontologie-Analyse

Die Analyse sekretorischer Proteine erfolgte mithilfe der Algorithmen *SignalP 6.0*, *SecretomeP 2.0* und *OutCyte*. Klassisch sezernierte Proteine (N-terminales Signalpeptid, Sekretion über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat) werden von *SignalP 6.0* als SP+ (*putative secretory proteins with signal peptide*) klassifiziert. Unkonventionell sezernierte Proteine ohne Signalpeptid werden von *SecretomeP 2.0* als SP- (*putative secretory proteins without signal peptide*) oder von *OutCyte* als *OutCyte* positiv identifiziert. Weder durch *SignalP 6.0*, *SecretomeP 2.0* noch *OutCyte* als sekretorisch erfasste Proteine werden als NP (*non-putative secretory proteins*) kategorisiert. Ist eine Analyse z.B. aufgrund der langen Peptidsequenz mancher Proteine weder durch *SignalP* noch *SecretomeP* möglich, werden die Proteine als N/A (*no analysis*) eingeordnet.

Des Weiteren wurden Analysen zur Ermittlung von Funktionen der Gene der Proteine über Gene Ontology (GO) durchgeführt. Es wurden die GO-*terms "cellular component extracellular, non-structural extracellular, extracellular matrix"* angewandt.

## 2.12 Statistik und Software

Die im Rahmen aller Auswertungen und Analysen sowie für die Erarbeitung der Dissertation genutzten Softwareprogramme sind in Tabelle 7 "Softwareprogramme" aufgeführt. Falls unterhalb der Abbildungen nicht anders angegeben, wurden die Daten mithilfe des Standardfehlers (SEM, *standard error of the mean*) folgendermaßen präsentiert: Mittelwert ± SEM. Als statistischer Test wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse (*two-way* ANOVA) für multiple Vergleiche zwischen mehreren Gruppen appliziert, um signifikante Unterschiede zwischen den Datensätzen zu identifizieren. Die Statistik wurde mithilfe des Programms *GraphPad Prism* 9 (vgl. Tabelle 7 "Softwareprogramme") ausgeführt. Ein p-Wert < 0,05 galt stets als statistisch signifikant.

Die Massenspektrometrie-Rohdaten wurden mithilfe des Programms *Proteome Discoverer 3.0* (vgl. Tabelle 7 "Softwareprogramme") analysiert. Die Proteine wurden gefiltert, indem nur Masterproteine der Spezies Maus mit einem hohen Konfidenzlevel berücksichtigt wurden, welche mit mindestens 1 *unique peptide* identifiziert wurden. Proteine mit einem *fold change* von 1,035, entsprechend einem *log 2 fold change* von 0,05 sowie einem p-Wert  $\leq$  0,05 galten als signifikant in ihrer Abundanz verändert.

## **3 ERGEBNISSE**

In diesem Kapitel erfolgt die Schilderung der dieser Arbeit zugrundeliegenden Ergebnisse (vgl. Abschnitt 3.1 bis 3.3).

## 3.1 Analyse des Insulin *Signalings* in murinen Myotuben nach Behandlung mit Palmitat, *High insulin*, TNF-α und Chemerin

Zunächst wurden vier Protokolle zur *in vitro* IR-Induktion etabliert: Palmitat-, *High insulin*-, TNF-α- und Chemerin-Behandlung, als Zellmodell für die bei T2DM vorliegende IR der Skelettmuskulatur. Getestet wurden hierfür das Salz der Palmitinsäure Palmitat, ein hyperinsulinämisches Milieu sowie die Zytokine TNF-α und Chemerin (vgl. Abschnitt 2.9.4 "Etablierung von *In-vitro*-Insulinresistenz-Protokollen"). Eine Verifizierung der IR erfolgte anschließend mittels *Western Blot* (vgl. Abschnitt 2.10 "*Western Blot* Analyse") über den Nachweis einer verminderten Phosphorylierung von AKT an Serin-473 und Threonin-308. Die Phosphorylierung der Serin-Threonin-Kinase AKT bildet ein häufig verwendetes *Readout* der zellulären Insulinwirkung (vgl. Abschnitt 1.1.1 "Insulin-*Signaling* und Insulinresistenz der Skelettmuskulatur"). Als *Housekeeping*-Protein wurde GAPDH verwendet.

Die Abbildungen 3 und 4 zeigen, dass durch Palmitat- und *High insulin* - Behandlung eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung von AKT an beiden *Phosphosites* beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 3B, E und Abb. 4B, E). Daher wurden diese beiden Stimuli für die weitere Sekretomanalyse der murinen Myotuben nach EPS-Behandlung ausgewählt.

#### 3.1.1 Der Effekt von Palmitat auf die Insulinsignalkaskade in murinen Myotuben

Um eine zelluläre IR zu induzieren, wurden die Myotuben für 16 h in mit 500 µM Palmitat versetztem Hungermedium inkubiert (vgl. Abschnitt 2.9.4.1 "Palmitat-Behandlung"). Anschließend erfolgte die akute Insulinstimulation mit 100 nM Insulin für 15 min (vgl. Abschnitt 2.9.5 "Akute Insulinstimulation").

Abbildung 3 zeigt die *Western Blot* Analyse der Proteinkinase B (AKT), welche an ihren beiden Phosphorylierungsstellen Threonin-308 (vgl. Abb. 3A – C) und Serin-473 (vgl. Abb. 3D – F) untersucht wurde. Die Abbildungen 3A und 3D zeigen jeweils die AKT-Abundanz. Anhand der Abbildungen 3B – C und 3E - F wird deutlich, dass die akute Insulinstimulation zu einem Anstieg der AKT-Phosphorylierung geführt hat, sichtbar an einer erhöhten pAKT-Thr308-Abundanz in Abbildung 3B und einer erhöhten pAKT-Ser473-Abundanz in Abbildung 3E sowie an einem Anstieg des jeweiligen pAKT/AKT-*Ratios* in den Abbildungen 3C und 3F. Der Vergleich der insulinstimulierten Kontroll-und mit Palmitat versetzten Zellen zeigt zudem, dass Palmitat zu einer signifikant

verminderten AKT-Phosphorylierung beider Phosphorylierungsstellen geführt hat (vgl. Abb. 3B und 3E). Auch das Verhältnis von pAKT zu AKT zeigt sich nach Palmitat-Behandlung vermindert. Die AKT-Phosphorylierung an Threonin-308 ist um 22 % und an Serin-473 um 37 % reduziert (vgl. Abb. 3C und 3F). Somit führte die Palmitat-Behandlung der Myotuben zu einem signifikant verminderten Ansprechen der Zellen auf eine akute Insulinstimulierung im Vergleich zu den Kontrollzellen.





Weiße Balken repräsentieren Kontrollen, gelbe Balken die mit 500 µM Palmitat-behandelten C2C12-Zellen. Gestreifte Balken zeigen eine akute Insulinstimulation für 15 min an (Insulin), fehlende Streifung entspricht keiner Insulinstimulation (Basal). **A, D**: AKT-Abundanz in Kontroll- und mit Palmitat-

behandelten Zellen nach Insulinstimulation. **B**, **E**: Quantifizierung von pAKT-Thr308 (**B**) und pAKT-Ser473 (**E**) in Kontroll- und mit Palmitat-behandelten Zellen nach Insulinstimulation. **C**, **F**: Verhältnis von pAKT-Thr308 (**C**) und pAKT-Ser473 (**F**) zu AKT. Die Proteinabundanzen wurden auf GAPDH normalisiert und sind als Prozentsatz der insulinstimulierten Kontrollzellen angegeben. Daten sind als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) dargestellt, n = 3. *Two-way* ANOVA mit Sidak-Test (\*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*\*, p < 0,001): pAKT-Ser473 = an Serin-473 phosphorylierte Proteinkinase B; pAKT-Thr308 = an Threonin-308 phosphorylierte Proteinkinase B; GAPDH = Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

#### 3.1.2 Der Effekt von chronischer Insulinexposition auf die

#### Insulinsignalkaskade in murinen Myotuben

Ein weiteres Protokoll zur *in vitro* IR-Induktion stellte die Etablierung eines hyperinsulinämischen Mileus (*High insulin*) dar. Die mit *High insulin* behandelten Zellen wurden für 3 Tage in 100 nM Insulin enthaltendem Differenzierungs-Medium inkubiert (vgl. Abschnitt 2.9.4.2 "Insulin-Behandlung *"High insulin""*). Darauf folgte die 6 h Inkubation der Zellen in Hungermedium mit anschließender akuter Insulinstimulation (vgl. Abschnitt 2.9.5 "Akute Insulinstimulation").

Auch Abbildung 4 zeigt die *Western Blot* Analyse von AKT, welche an ihren beiden Phosphorylierungsstellen Threonin-308 (vgl. Abb. 4A – C) und Serin-473 (vgl. Abb. 4D – F) untersucht wurde. Die AKT-Abundanz wird in den Abbildungen 4A und 4D gezeigt. Die akute Insulinstimulation führte auch hier zu einem Anstieg der pAKT-Thr308-Abundanz in Abbildung 4B und der pAKT-Ser473-Abundanz in Abbildung 4E sowie zu einer Erhöhung des jeweiligen *Ratios* von pAKT zu AKT (vgl. Abb. 4C und 4F). Eine *High insulin* – Behandlung der Zellen führte darüber hinaus zu einer signifikant verminderten AKT-Phosphorylierung beider Phosphorylierungsstellen (vgl. Abb. 4B und 4E). Auch das pAKT/AKT-*Ratio* zeigt eine Verminderung, mit einer Reduktion der Phosphorylierung von AKT an Threonin-308 um 28 % und um 16 % an Serin-473 (vgl. Abb. 4C und 4F). Insgesamt führte dementsprechend sowohl das *High insulin* – als auch das Palmitat-*Treatment* der Zellen zu einem signifikant verminderten Ansprechen der Myotuben auf eine akute Insulinstimulierung im Vergleich zu den Kontrollzellen (vgl. Abschnitt 3.1.1 "Der Effekt von Palmitat auf die Insulinsignalkaskade in murinen Myotuben").





Weiße Balken repräsentieren Kontrollen, blaue Balken die mit 100 nM Insulin (*High insulin*) behandelten C2C12-Zellen. Gestreifte Balken zeigen eine akute Insulinstimulation für 15 min an (Insulin), fehlende Streifung entspricht keiner Insulinstimulation (Basal). **A**, **D**: AKT-Abundanz in Kontroll- und mit *High insulin* - behandelten Zellen nach Insulinstimulation. **B**, **E**: Quantifizierung von pAKT-Thr308 (**B**) und pAKT-Ser473 (**E**) in Kontroll- und mit *High insulin* - behandelten Zellen nach Insulinstimulation. **C**, **F**: Verhältnis von pAKT-Thr308 (**C**) und pAKT-Ser473 (**F**) zu AKT. Die Proteinabundanzen wurden auf GAPDH normalisiert und sind als Prozentsatz der insulinstimulierten Kontrollzellen angegeben. Daten sind als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) dargestellt, n = 3. *Two-way* ANOVA mit Sidak-Test (\*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*\*, p < 0,001; \*\*\*\*\*, p < 0,0001). pAKT-Ser473 = an Serin-473 phosphorylierte Proteinkinase B; pAKT-Thr308 = an Threonin-308 phosphorylierte Proteinkinase B; AKT = Proteinkinase B; GAPDH = Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

## 3.1.3 Der Effekt von TNF- $\alpha$ auf die Insulinsignalkaskade in murinen Myotuben

Bei diesem Ansatz wurde nach 5 h Inkubation der Zellen in Hungermedium TNF- $\alpha$  in drei verschiedenen Konzentrationen (10 ng/ml, 15 ng/ml, 20 ng/ml) hinzugefügt (vgl. Abschnitt 2.9.4.4 "TNF- $\alpha$ -Behandlung"). Nach 1 h wurden die Zellen für 15 min mit Insulin stimuliert (vgl. Abschnitt 2.9.5 "Akute Insulinstimulation").

Abbildung 5 zeigt die *Western Blot* Analyse von AKT an ihrer *Phosphosite* Serin-473 nach Behandlung der Zellen mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (vgl. Abb. 5A – C), 15 ng/ml TNF- $\alpha$  (vgl. Abb. 5 D – F) und 20 ng/ml TNF- $\alpha$  (vgl. Abb. 5G – I). Die Abbildungen 5A, 5D und 5G zeigen die jeweilige AKT-Abundanz. Bei Vergleich der pAKT-Ser473-Abundanz und des pAKT/AKT-Verhältnisses der insulinstimulierten mit den unstimulierten (basalen) Zellen scheint die akute Insulinstimulation im Sinne einer erhöhten AKT-Phosphorylierung gewirkt zu haben (vgl. Abb. 5B – C, 5E – F und 5H - I). Tendenziell konnte durch TNF- $\alpha$  führten zu einer Erhöhung von pAKT-Ser473 und pAKT/AKT (vgl. Abb. 5B und 5C). Weder 15 ng/ml noch 20 ng/ml TNF- $\alpha$  führten zu einer Abnahme der pAKT-Ser473-Abundanz oder des pAKT/AKT-*Ratios* (vgl. Abb. 5E – F und 5H - I).





pAKT-Ser473 zu AKT. Die Proteinabundanzen wurden auf GAPDH normalisiert und sind als Prozentsatz der insulinstimulierten Kontrollzellen angegeben; n = 2. pAKT-Ser473 = an Serin-473 phosphorylierte Proteinkinase B; AKT = Proteinkinase B; TNF- $\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ; GAPDH = Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

## 3.1.4 Der Effekt von Chemerin auf die Insulinsignalkaskade in murinen Myotuben

Im Rahmen der Etablierung von Protokollen zur *in vitro* IR-Induktion wurde auch Chemerin verwendet. Die mit Chemerin behandelten Zellen wurden für 3 Tage in 1 µg/ml Chemerin enthaltendem Differenzierungs-Medium inkubiert (vgl. Abschnitt 2.9.4.3 "Chemerin-Behandlung"). Es folgte eine Inkubation in Hungermedium für 6 h mit anschließender akuter Insulinstimulation (vgl. Abschnitt 2.9.5 "Akute Insulinstimulation").

Abbildung 6 zeigt ebenfalls die *Western Blot* Analyse von AKT, welche an ihrer Phosphorylierungsstelle Serin-473 untersucht wurde. Die AKT-Abundanz wird dabei in Abbildung 6A gezeigt. Die akute Insulinstimulation führte in diesem Versuchsdurchlauf zu einer Erhöhung der pAKT-Ser473-Abundanz sowie des pAKT/AKT-*Ratios* bei Vergleich der insulinstimulierten und unstimulierten (basalen) Zellen (vgl. Abb. 6B und 6C). Die pAKT-Ser473-Abundanz zeigt eine leichte Erhöhung und das pAKT/AKT-Verhältnis zwischen den insulinstimulierten Kontroll- und mit Chemerin behandelten Zellen ist annähernd unverändert (vgl. Abb. 6B und 6C). Tendenziell konnte durch Chemerin demnach keine verminderte AKT-Phosphorylierung an Serin-473 gezeigt werden.





Weiße Balken repräsentieren Kontrollen, orangefarbene Balken die mit 1  $\mu$ g/ml Chemerin behandelten C2C12-Zellen. Gestreifte Balken zeigen eine akute Insulinstimulation für 15 min an (Insulin), fehlende Streifung entspricht keiner Insulinstimulation (Basal). **A**: AKT-Abundanz in Kontroll- und mit Chemerin behandelten Zellen nach Insulinstimulation. **B**: Quantifizierung von pAKT-Ser473 in Kontroll- und mit Chemerin behandelten Zellen nach Insulinstimulation. **C**: Verhältnis von pAKT-Ser473 zu AKT. Die Proteinabundanzen wurden auf GAPDH normalisiert und sind als Prozentsatz der insulinstimulierten Kontrollzellen angegeben; n = 1. pAKT-Ser473 = an Serin-473 phosphorylierte Proteinkinase B; AKT = Proteinkinase B; GAPDH = Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

## 3.2 Messung der Proteinkonzentration und Qualitätskontrolle

Im Rahmen der massenspektrometrischen Probenaufbereitung der Überstände insulinresistenter C2C12-Zellen nach EPS wurden die Überstände nach nieder- und hochtourigem Zentrifugieren durch Amicon<sup>®</sup>-Filter aufkonzentriert (vgl. Abschnitt 2.11.1.2 "Aufkonzentrierung ultrazentrifugierter Überstände"). Die folgende Tabelle 12 zeigt den dabei erfolgten Volumenverlust der Überstände, um eine deutliche Konzentrierung der Proteine in der Probe zu erreichen (vgl. Tabelle 12 "Volumina der Überstände Palmitat-behandelter und *High insulin*-behandelter Zellen vor und nach Ultrafiltration"). Ein Replikat aus voneinander unabhängig durchgeführten Zellkultur-Experimenten besteht hierbei aus jeweils einer EPS-Probe sowie der dazugehörigen Kontrollprobe, welche keine EPS erhielt.

Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration der eingeengten Überstände mittels *NanoDrop*<sup>™</sup>-Spektralphotometer bestimmt (vgl. Tabelle 6 "Geräte"). Tabelle 13 zeigt dementsprechend die Proteinkonzentrationen der Proben nach Palmitat- bzw. *High insulin*-Behandlung und EPS (vgl. Tabelle 13 "Mittels *NanoDrop* gemessene Proteinkonzentrationen der eingeengten Überstände Palmitat-behandelter und *High insulin*-behandelter Zellen").

Probenbezeichnung	Volumen nach Gewinnung des Überstandes (ml)	Endvolumen nach Ultrafiltration mit Amicon <sup>®</sup> -Filter (µl)
Überstände Palmitat-behandelt	er Zellen nach EPS	
EPS, Replikat 1	2,6 ml	73 µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 1	4,5 ml	64 µl
EPS, Replikat 2	4,5 ml	68 µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 2	4,7 ml	74 µl
EPS, Replikat 3	4,7 ml	75 µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 3	4,8 ml	77 µl
EPS, Replikat 4	4,9 ml	80 µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 4	4,7 ml	80 µl
EPS, Replikat 5	4,9 ml	70 µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 5	5,1 ml	75 µl
EPS, Replikat 6	5,2 ml	42 µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 6	4,9 ml	78 µl
Überstände High insulin-behand	delter Zellen nach EPS	
EPS, Replikat 1	4,5 ml	80 µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 1	4,5 ml	83 µl
EPS, Replikat 2	4,9 ml	80 µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 2	4,9 ml	77 µl
EPS, Replikat 3	4,6 ml	65 µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 3	4,5 ml	82 µl

#### Tabelle 12: Volumina der Überstände Palmitat-behandelter und High insulinbehandelter Zellen vor und nach Ultrafiltration

EPS, Replikat 4	4,6 ml	70 µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 4	4,5 ml	74 µl
EPS, Replikat 5	4,7 ml	76 μl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 5	4,4 ml	58 µl
EPS, Replikat 6	4,8 ml	70 µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 6	4,4 ml	58 µl

Tabelle 13: Mittels NanoDrop gemessene Proteinkonzentrationen der eingeengten Überstände Palmitat-behandelter und High insulin-behandelter Zellen

Probenbezeichnung	Proteinkonzentration (µg/µl)
Eingeengte Überstände Palmitat-behandelter Zellen nach EPS	
EPS, Replikat 1	2,05 µg/µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 1	6,62 µg/µl
EPS, Replikat 2	6,03 µg/µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 2	2,67 µg/µl
EPS, Replikat 3	5,13 µg/µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 3	9,98 µg/µl
EPS, Replikat 4	4,14 µg/µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 4	3,85 µg/µl
EPS, Replikat 5	4,36 µg/µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 5	4,05 µg/µl
EPS, Replikat 6	4,95 µg/µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 6	3,48 µg/µl
Eingeengte Überstände High insulin-behandelter Zellen nach EPS	
EPS, Replikat 1	4,22 μg/μl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 1	4,34 µg/µl
EPS, Replikat 2	4,43 µg/µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 2	4,59 μg/μl
EPS, Replikat 3	4,90 μg/μl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 3	3,96 µg/µl
EPS, Replikat 4	4,51 μg/μl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 4	5,20 μg/μl
EPS, Replikat 5	4,82 μg/μl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 5	5,54 μg/μl
EPS, Replikat 6	2,09 µg/µl
Kein EPS (Kontrolle), Replikat 6	2,49 µg/µl

Im Zuge der massenspektrometrischen Probenaufbereitung wurden außerdem zwei QC-Gele zur Qualitätskontrolle der jeweiligen Stimuli angefertigt (vgl. Abschnitt 2.9.4.1 "Palmitat-Behandlung", 2.9.4.2 "Insulin-Behandlung *High insulin*" und 2.11.1.4 "QC-Gel"). Das QC-Gel repräsentiert an dieser Stelle eine In-Prozess-Kontrolle und dient zur Übersicht der Proteinkomposition der Proben. Es bietet die Möglichkeit zu überprüfen, ob eine BSA-Kontamination, verursacht durch die Behandlung der Zellen mit Palmitat bzw. durch die Anwesenheit von Serum im Differenzierungsmedium, vorliegt. Das Proteinbandenmuster beider angefertigter QC-Gele stellt sich hier innerhalb des jeweiligen Gels ähnlich aufgefächert dar. Eine die Proteinbanden überlagernde BSA-Serumkontamination ist im Vergleich mit den beiden BSA-Referenzbanden nicht zu erkennen (vgl. Abb. 7 und 8, Bande 14 und 15).



**Abb. 7: QC-Gel der eingeengten Überstände Palmitat-behandelter Zellen.** Auftrag von 20 μg Protein je Probe. Aufnahmemodus *ChemiDoc: Intense*, 5 Minuten, UV. **1** = *Unstained* Protein-Marker; **2** = EPS, Rep. 1; **3** = Kein EPS (Kontrolle), Rep. 1; **4** = EPS, Rep. 2; **5** = Kein EPS (Kontrolle), Rep. 2; **6** = EPS, Rep. 3; **7** = Kein EPS (Kontrolle), Rep. 3; **8** = EPS, Rep. 4; **9** = Kein EPS (Kontrolle), Rep. 4; **10** = EPS, Rep. = 5; **11** = Kein EPS (Kontrolle), Rep. 5; **12** = EPS, Rep. 6; **13** = Kein EPS (Kontrolle), Rep. 6; **14** = BSA 500 ng; **15** = BSA 1 μg. Rep. = Replikat aus voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten; BSA = Bovines Serum Albumin; EPS = Elektropulsstimulation.



#### Abb. 8: QC-Gel der eingeengten Überstände von High insulin behandelten Zellen.

Auftrag von 20 µg Protein je Probe. Aufnahmemodus *ChemiDoc: Intense*, 5 Minuten, UV. **1** = *Unstained* Protein-Marker; **2** = EPS, Rep. 1; **3** = Kein EPS (Kontrolle), Rep. 1; **4** = EPS, Rep. 2; **5** = Kein EPS (Kontrolle), Rep. 2; **6** = EPS, Rep. 3; **7** = Kein EPS (Kontrolle), Rep. 3; **8** = EPS, Rep. 4; **9** = Kein EPS (Kontrolle), Rep. 4; **10** = EPS, Rep. = 5; **11** = Kein EPS (Kontrolle), Rep. 5; **12** = EPS, Rep. 6; **13** = Kein

EPS (Kontrolle), Rep. 6; **14** = BSA 500 ng; **15** = BSA 1 µg. Rep. = Replikat aus voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten; BSA = Bovines Serum Albumin; EPS = Elektropulsstimulation.

## 3.3 Komparative Sekretomanalyse insulinresistenter C2C12-Zellen nach EPS

Nachdem die Proben wie in Abschnitt 2.11.2 "Probenaufbereitung" beschrieben vorbereitet wurden, erfolgte die massenspektrometrische Messung mit nachfolgender Aufbereitung der Rohdaten (vgl. Abschitt 2.11.2 "Massenspektrometrische Messung", 2.11.3 "Aufbereitung der Rohdaten"). Die Analyse der Daten erfolgte mittels Proteome Discoverer 3.0 Software (vgl. Tabelle 7 "Softwareprogramme"). Der Workflow für die Vorhersage der sekretierten Proteine ist in Abbildung 9 dargestellt. Vor Filterung der resultierenden Proteinlisten beinhaltete das Sekretom Palmitat-behandelter Zellen nach EPS (nachfolgend nur "Palmitat-Sekretom" genannt) insgesamt 8321 Proteine (vgl. Abb. 9). Das Sekretom der mit High insulin behandelten Zellen nach EPS (entsprechend "High insulin – Sekretom" genannt) umfasste 8318 Proteine (vgl. Abb. 9). Die Proteinlisten wurden wie in Abschnitt 2.13 "Statistik und Software" beschrieben gefiltert, sodass diese 2531 potenzielle Myokine im Palmitat-Sekretom und 2594 Proteine von Interesse im High insulin - Sekretom enthielten (vgl. Abb. 9). Die verwendeten Filtereinstellungen führten zu einer Filterung der Proteinlisten nach Masterproteinen mit einem hohen Konfidenzlevel, welche der Spezies Maus zugeordnet und mit mindestens einem eindeutigen Peptid identifiziert wurden. Abbildung 9 zeigt zudem, dass mittels bioinformatischer Analyse-Tools der Anteil potenziell sekretorischer Proteine identifiziert werden konnte. Die 2531 Proteine des Palmitat- und 2594 Proteine des High insulin - Sekretoms konnten als SP+ (putative secretory proteins with signal peptide, klassische Sekretion), SP- (putative secretory proteins without signal peptide, unkonventionelle Sekretion) und OutCyte positiv kategorisiert werden (vgl. Abb. 9 und Abschnitt 3.3.2 "Identifizierung potenziell sekretorischer Proteine anhand der bioinformatischen Algorithmen SignalP. SecretomeP und OutCyte"). Eine signifikante ( $p \le 0.05$ ) Regulation wiesen insgesamt 312 Proteine innerhalb des Palmitat-Sekretoms und 231 Proteine innerhalb des High insulin - Sekretoms auf (vgl. Abb. 9 und Abschnitt 3.3.4 "Vergleich der signifikant regulierten Proteine im Sekretom Palmitat-behandelter und High insulin-behandelter C2C12-Zellen").



## Abb. 9: *Workflow* für die Vorhersage von sekretierten Proteinen im Palmitat- und im *High insulin* – Sekretom nach EPS.

Gegenüberstellung der *Workflows* für die Vorhersage sekretierter Proteine innerhalb des Palmitat-Sekretoms (gelb, links abgebildet) und des *High insulin* – Sekretoms (blau, rechts abgebildet) nach EPS-Behandlung. EPS ist bildlich als Blitz-Figur dargestellt. Die Kontrollen erhielten keine EPS-Behandlung. Der Anteil potenziell sekretorischer Proteine konnte anhand der bioinformatischen Algorithmen *SignalP 6.0, SecretomeP 2.0* und *OutCyte* bestimmt werden. Die weitere Datenanalyse erfolgte anhand der signifikant regulierten Proteine ( $p \le 0.05$ ) beider Sekretome. EPS = Elektropulsstimulation; SP+ = *putative secretory proteins with signal peptide*; SP- = *putative secretory proteins without signal peptide*. Die Abbildung wurde mittels BioRender.com (2024) erstellt.

#### 3.3.1 Hauptkomponentenanalyse der normalisierten Proteinabundanzen im Sekretom von Palmitat – und mit *High insulin* behandelten C2C12-Zellen

Unter einer Hauptkomponentenanalyse (engl. *Principal Component Analysis*) versteht man eine Methode zur Dimensionsreduktion eines hochkomplexen Datensatzes. Die Transformierung der Daten erfolgt dabei unter Erhalt der wesentlichen Muster. Eine Hauptkomponentenanalyse hilft dabei, viele Datenpunkte ohne Verlust der wichtigsten Informationen zu analysieren und Faktoren zu identifizieren, die für die Varianz von Messgrößen verantwortlich sind [100].

Zunächst wurde zur Beurteilung der Datenqualität und -streuung für die normalisierten Proteinabundanzen beider Sekretome jeweils eine Hauptkomponentenanalyse der 2531 Proteine im Palmitat- bzw. 2594 Proteine im *High insulin* - Sekretom (vgl. Abb. 10 A, B) durchgeführt. Die Proteinabundanzen wurden in *Proteome Discoverer 3.0* auf die Gesamtheit der Peptide innerhalb einer Probe normalisiert (vgl. Tabelle 7 "Softwareprogramme"). Für das Palmitat-Sekretom wurden 6 Replikate und für das High insulin – Sekretom 5 Replikate aus voneinander unabhängig durchgeführten Zellkultur-Experimenten untersucht. Aufgrund technischer Probleme bei der Probenaufbereitung musste ein Replikat ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurde jede Probe drei Mal massenspektrometrisch vermessen, sodass pro Replikat aus den unabhängig durchgeführten Zellkultur-Experimenten jeweils drei "technische" Replikate existieren.

In beiden Hauptkomponentenanalysen zeigt sich eine Gruppierung der Proben, welche am selben Versuchstag generiert wurden und somit der gleichen Passage angehören, sodass eine größere Ähnlichkeit innerhalb einer Charge als zwischen allen EPS- bzw. Kontroll-Proben untereinander besteht, gekennzeichnet durch eine gelbgestrichelte Umkreisung für das Palmitat-Sekretom und eine blau-gestrichelte für das *High insulin* - Sekretom (vgl. Abb. 10 A, B). Wahrscheinlich liegt ein sog. *Batch*-Effekt vor (vgl. Abschnitt 4.1.2 "*Batch*-Effekt").

Nach entsprechender Filterung in *Proteome Discoverer 3.0* (vgl. Tabelle 7 "Softwareprogramme") wurde ebenfalls jeweils eine Hauptkomponentenanalyse der normalisierten Proteinabundanzen signifikant regulierter Proteine innerhalb beider Sekretome durchgeführt (Abundanzverhältnis der Proteine in EPS-Proben zu Kontrollen  $p \le 0,05$ ). Es wurden 312 signifikant regulierte Proteine im Palmitat- und 231 signifikant regulierte Proteine im *High insulin* – Sekretom analysiert. Auch hier zeigt sich annähernd die Gruppierung der Proben nach Versuchstag bzw. Passagenzahl (vgl. Abb. 11 A, B)., sodass von einem Chargeneffekt ausgegangen werden kann (vgl. Abschnitt 4.1.2 *"Batch*-Effekt").









## Abb. 10: Hauptkomponentenanalysen der normalisierten Proteinabundanzen im Palmitat- und im *High insulin* - Sekretom.

PCAs der normalisierten Proteinabundanzen im Palmitat-Sekretom (**A**) und im *High insulin* - Sekretom (**B**). Die orangefarbenen Punkte stellen die EPS-Proben dar, die blauen Punkte die Kontrollen (kein EPS). Jeweils drei gruppierte Punkte repräsentieren die technischen Replikate einer Probe; n = 6 (**A**), n = 5 (**B**). Die gestrichelte, für das Palmitat-Sekretom (**A**) gelbe und für das High insulin – Sekretom (**B**) blaue Umkreisung weist auf eine Gruppierung der Proben anhand des Versuchstags hin: (**A**) links Passage 10, rechts Passage 9; (**B**) links Passage 12, rechts Passage 14. EPS = Elektropulsstimulation; PCA = *Principal Component Analysis.* 



A) Hauptkomponentenanalyse der normalisierten Abundanzen der 312 signifikant regulierten Proteine im Palmitat - Sekretom

B) Hauptkomponentenanalyse der normalisierten Abundanzen der 231 signifikant regulierten Proteine im *High insulin* - Sekretom



## Abb. 11: Hauptkomponentenanalysen der normalisierten Proteinabundanzen signifikant regulierter Proteine im Palmitat- und im *High insulin -* Sekretom.

PCAs der normalisierten Proteinabundanzen signifikant regulierter Proteine im Palmitat (**A**) und *High insulin* – Sekretom (**B**). Die orangefarbenen Punkte stellen die EPS-Proben dar, die blauen Punkte die Kontrollen (kein EPS). Jeweils drei gruppierte Punkte repräsentieren die technischen Replikate einer Probe; n = 6 (**A**), n = 5 (**B**). Die gestrichelte, für das Palmitat-Sekretom (**A**) gelbe und für das High insulin – Sekretom (**B**) blaue Umkreisung weist auf eine Gruppierung der Proben anhand des Versuchstags hin: (**A**) links Passage 10, rechts Passage 9; (**B**) links Passage 12, rechts Passage 14. EPS = Elektropulsstimulation; PCA = *Principal Component Analysis*.
# 3.3.2 Identifizierung potenziell sekretorischer Proteine anhand der bioinformatischen Algorithmen SignalP, SecretomeP und OutCyte

Die Analyse des Anteils potenziell sekretorischer Proteine innerhalb der beiden Sekretome erfolgte mithilfe der bioinformatischen Algorithmen *SignalP 6.0*, *SecretomeP 2.0* und *OutCyte* (vgl. Abschnitt 2.11.4 "Bioinformatische Analyse, Gen-Ontologie-Analyse"). Die 2531 Proteine des Palmitat- und 2594 Proteine des *High insulin* – Sekretoms konnten als SP+, SP- und *OutCyte* positiv kategorisiert werden. Weder durch *SignalP 6.0*, *SecretomeP 2.0* noch *OutCyte* als sekretorisch erkannte Proteine wurden als NP *(non-putative secretory proteins)* bezeichnet. Der Anteil potenziell sekretorischer Proteine im Palmitat-Sekretom beträgt somit insgesamt 61 %, davon wurden 466 Proteine (19 %) als SP+, 496 Proteine (21 %) als SP- und 515 Proteine (21 %) als *OutCyte* + identifiziert (vgl. Abb. 12). Im *High insulin* - Sekretom beträgt dieser Proteinanteil 64 %, und es wurden 537 Proteine (22 %) als SP+, 506 Proteine (20 %) als SP- und 541 Proteine (22 %) als *OutCyte* + identifiziert (vgl. Abb. 13).



**Abb. 12: Klassifikation der Proteine im Palmitat-Sekretom mit SignalP, SecretomeP und OutCyte.** Links: Kreisdiagramm mit Darstellung der Anteile der als SP+, SP-, *OutCyte* + oder NP klassifizierten Proteine in %. Rechts: tabellarische Darstellung der analysierten Proteine als Anzahl. SP+ = putative secretory proteins with signal peptide; SP- = putative secretory proteins without signal peptide; NP = nonputative secretory proteins.



## Abb. 13: Klassifikation der Proteine im *High insulin* - Sekretom mit *SignalP, SecretomeP* und *OutCyte*.

Links: Kreisdiagramm mit Darstellung der Anteile der als SP+, SP-, *OutCyte* + oder NP klassifizierten Proteine in %. Rechts: tabellarische Darstellung der analysierten Proteine als Anzahl. SP+ = *putative* 

secretory proteins with signal peptide; SP- = putative secretory proteins without signal peptide; NP = nonputative secretory proteins.

### 3.3.3 Quantifizierung der kontraktionsabhängig regulierten Proteine im Sekretom von Palmitat- und mit *High insulin* – behandelten C2C12-Zellen anhand von Vulkandiagrammen

Bei einem *Volcano Plot* ("Vulkandiagramm") handelt es sich um ein Streudiagramm zur Veranschaulichung großer Datensätze. Die x-Achse repräsentiert den Logarithmus des *fold changes* zwischen den beiden betrachteten Bedingungen EPS versus Kontrolle. Änderungen erscheinen folglich rechts (rote Fläche) und links (grüne Fläche) vom Zentrum. Auf der y-Achse wird der negative dekadische Logarithmus des p-Wertes aufgetragen, sodass Datenpunkte hoher Signifikanz oben im Diagramm erscheinen. Proteine, die zum Signifikanzniveau p  $\leq$  0,05 eine Änderung ihrer Abundanz entsprechend eines *fold changes* von 1,035 (*log 2 fold change*  $\geq$  0,05 bzw.  $\leq$  -0,05) zeigten, werden im Rahmen dieser Arbeit als kontraktionsabhängig sekretierte Proteine angesehen. Somit waren innerhalb des Vergleichs von EPS- und Kontrollproben im Palmitat-Sekretom 154 Proteine hoch- und 158 Proteine herunterreguliert (vgl. Abb. 14 A), im *High insulin* – Sekretom 108 Proteine hoch- und 123 Proteine (vgl. Abb. 14 B) herunterreguliert. Die graphische Darstellung der signifikant regulierten Proteine beider Sekretome erfolgt über die in Abb. 14 gezeigten *Volcano Plots*.



A) Volcano Plot der kontraktionsabhängig sekretierten Proteine des Palmitat -Sekretoms





Abb. 14: Volcano Plots der kontraktionsabhängig sekretierten Proteine im Palmitat- und im High insulin - Sekretom.

Die Graphiken repräsentieren die zweidimensionale Verteilung der signifikant regulierten Proteine des Palmitat- (**A**) und des *High insulin* – Sekretoms (**B**) nach *log 2 fold change* und negativen log 10 – transformierten p-Werten. (**A**) Grüne Punkte (links): 158 herunterregulierte Proteine,  $p \le 0.05$ , *log 2 fold change*  $\le -0.05$ ; rote Punkte (rechts): 154 heraufregulierte Proteine,  $p \le 0.05$ , *log 2 fold change*  $\ge 0.05$ . (**B**) Grüne Punkte (links): 123 herunterregulierte Proteine,  $p \le 0.05$ , *log 2 fold change*  $\le -0.05$ . Rote Punkte (rechts): 108 heraufregulierte Proteine,  $p \le 0.05$ .

#### 3.3.4 Vergleich der signifikant regulierten Proteine im Sekretom Palmitatbehandelter und *High insulin*-behandelter C2C12-Zellen

Zur weiteren Analyse der Daten des Palmitat-Sekretoms und *High insulin* – Sekretoms wurden die signifikant regulierten Proteine ( $p \le 0.05$ ) miteinander verglichen. Von den insgesamt 312 Proteinen im Palmitat- und 231 Proteinen im *High insulin* – Sekretom konnten 27 Proteine in beiden Sekretomen identifiziert werden. 285 Proteine wurden nur innerhalb des Palmitat-Sekretoms identifiziert, 204 Proteine nur im *High insulin* – Sekretom (vgl. Abb. 15).



Abb. 15: Venn-Diagramm: Darstellung der überlappenden Proteine im Palmitat-Sekretom und High insulin - Sekretom.

Gelber Kreis (links): von den 312 Proteinen innerhalb des Palmitat-Sekretoms konnten 285 Proteine nur im Palmitat-Sekretom identifiziert werden. Blauer Kreis (rechts): von den 231 Proteinen innerhalb des *High insulin* - Sekretoms konnten 204 nur im *High insulin* - Sekretom identifiziert werden. 27 Proteine befinden sich im *Overlap*.

# 3.3.4.1 Analyse der potenziellen Myokine im *Overlap* von Palmitat- und *High insulin* - Sekretom

Die 27 Proteine im *Overlap* beider Sekretome wurden systematisch analysiert, indem Kontaminanten wie bovine Histon-Proteine und nicht-sekretorische Proteine (z.B. von *OutCyte* als intrazellulär erkannte Proteine) aus der Proteinliste eliminiert wurden. Die 15 übrig gebliebenen potenziellen Myokine wurden für beide Sekretome separat untersucht und sind in der folgenden Tabelle 14 "Gegenüberstellung der Proteine im *Overlap* von Palmitat- und *High insulin* – Sekretom" nach p-Wert sortiert aufgelistet. Die p-Werte der Abundanzverhältnisse (EPS versus Kontrolle) unterscheiden sich je nach Sekretom, ebenso das entsprechende *abundance ratio* der Proteine sowie deren Regulation (vgl. Tabelle 15 "Myokine im *Overlap*, analysiert innerhalb des Palmitat-Sekretoms" und 16 "Myokine im *Overlap*, analysiert innerhalb des *High insulin* – Sekretoms").

Nr.	Protein- name (Palmitat- Sekretom)	Gen- Symbol	p-Wert	Protein- name ( <i>High insulin –</i> Sekretom)	Gen- Symbol	p-Wert
1	Serotransferrin	Tf	1,00E- 17	Neutrophil gelatinase- associated lipocalin	Lcn2	1,00E- 17
2	Histone H1.2	H1-2	2,39E- 09	Golgi membrane protein 1	Golm1	4,06E- 13
3	CD63 Antigen	Cd63	5,35E- 08	Gremlin-1	Grem1	6,11E- 10
4	Fibronectin	Fn1	1,12E- 05	Complement C1s-1 subcomponent	C1s2	2,60E- 08
5	Histone H1.5	H1-5	4,71E- 05	Complement factor B	Cfb	2,27E- 07
6	Neutrophil gelatinase- associated lipocalin	Lcn2	1,76E- 03	CD63 antigen	Cd63	2,22E- 04
7	Glutathione S- transferase P 1	Gstp1	8,94E- 03	Histone H1.5	H1-5	5,50E- 03
8	Golgi membrane protein 1	Golm1	1,62E- 02	Glutathione S- transferase P 1	Gstp1	6,23E- 03
9	Troponin I, fast skeletal muscle	Tnni2	2,23E- 02	Histone H1.2	H1-2	7,18E- 03

#### Tabelle 14: Gegenüberstellung der Myokine im Overlap von Palmitat- und High insulin - Sekretom

10	Myeloid-associated differentiation marker	Myadm	2,76E- 02	Serotransferrin	Tf	2,07E- 02
11	Complement factor B	Cfb	3,73E- 02	Aldo-keto reductase family 1 member B1	Akr1b1	2,26E- 02
12	Gremlin-1	Grem1	3,90E- 02	Thrombospondin-2	Thbs2	3,72E- 02
13	Aldo-keto reductase family 1 member B1	Akr1b1	4,00E- 02	Fibronectin	Fn1	3,95E- 02
14	Complement C1s-1 subcomponent	C1s2	4,01E- 02	Myeloid-associated differentiation marker	Myadm	4,49E- 02
15	Thrombospondin-2	Thbs2	5,31E- 02	Troponin I, fast skeletal muscle	Tnni2	4,73E- 02

Die beiden nachfolgenden Tabellen 15 "Myokine im *Overlap*, analysiert innerhalb des Palmitat-Sekretoms" und 16 "Myokine im *Overlap*, analysiert innerhalb des *High insulin* -Sekretoms" zeigen zusätzlich die individuellen *Accession Numbers* der Proteine, deren Klassifikation durch die bioinformatischen Algorithmen *SignalP, SecretomeP* und *OutCyte*, das Abundanzverhältnis des jeweiligen Proteins in der EPS-Probe im Vergleich zur Kontrolle sowie den Logarithmus zur Basis 2 des Abundanz-Verhältnisses. Die Regulation der Proteine wird entsprechend mit einem nach oben (Hochregulation) bzw. nach unten (Herunterregulation) zeigenden Pfeil veranschaulicht.

UniProt Accession Number	Proteinname	p-Wert	Sekretorische Klassifikation	Abundanz- verhältnis absolut und Log₂(x)
Q92111	Serotransferrin	1,00E-17	SP+	100 6,64 ↑
P15864	Histone H1.2	2,39E-09	OutCyte positiv	1,297 0,38 ↑
P41731	CD63 Antigen	5,35E-08	SP-	0,81 -0,3 ↓
P11276	Fibronectin	1,12E-05	SP+	1,214 0,28 ↑
P43276	Histone H1.5	4,71E-05	OutCyte positiv	1,249 0,32 ↑
P11672	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	1,76E-03	SP+	1,275 0,35 ↑
P19157	Glutathione S- transferase P 1	8,94E-03	<i>OutCyte</i> positiv	0,905 -0,14 ↓
Q91XA2	Golgi membrane protein 1	1,62E-02	SP-	1,245 0,32 ↑

Tabelle 15: Myokine i	m <i>Overlap</i> ,	analysiert innerhalb	des Palmitat-Sekretoms
-----------------------	--------------------	----------------------	------------------------

P13412	Troponin I, fast skeletal muscle	2,23E-02	SP-	0,9 -0,15 ↓
O35682	Myeloid-associated differentiation marker	2,76E-02	SP-	0,915 -0,13 ↓
P04186	Complement factor B	3,73E-02	SP+	1,102 0,14 ↑
O70326	Gremlin-1	3,90E-02	SP+	1,109 0,15 ↑
P45376	Aldo-keto reductase family 1 member B1	4,00E-02	<i>OutCyte</i> positiv	0,926 -0,11 ↓
Q8CFG8	Complement C1s-1 subcomponent	4,01E-02	SP+	0,874 -0,19 ↓
Q03350	Thrombospondin-2	5,31E-02	SP+	1,096 0,13 ↑

### Tabelle 16: Myokine im Overlap, analysiert innerhalb des High insulin - Sekretoms

UniProt Accession Number	Proteinname	p-Wert	Sekretorische Klassifikation	Abundanz- Verhältnis absolut und Log₂(x)
P11672	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	1,00E-17	SP+	0,01 -6,64 ↓
Q91XA2	Golgi membrane protein 1	4,06E-13	SP-	0,535 -0,9 ↓
070326	Gremlin-1	6,11E-10	SP+	0,771 -0,37 ↓
Q8CFG8	Complement C1s-1 subcomponent	2,60E-08	SP+	1,273 0,35 ↑
P41731	Complement factor B	2,27E-07	SP+	1,253 0,33 ↑
P04186	CD63 antigen	2,22E-04	SP+	1,152 0,2 ↑
P43276	Histone H1.5	5,50E-03	<i>OutCyte</i> positiv	0,901 -0,15 ↓
P19157	Glutathione S- transferase P 1	6,23E-03	<i>OutCyte</i> positiv	0,897 -0,16 ↓
P15864	Histone H1.2	7,18E-03	<i>OutCyte</i> positiv	0,899 -0,15 ↓
Q921I1	Serotransferrin	2,07E-02	SP+	1,119 0,16 ↑
P45376	Aldo-keto reductase family 1 member B1	2,26E-02	<i>OutCyte</i> positiv	0,913 -0,13 ↓
Q03350	Thrombospondin-2	3,72E-02	SP+	1,076 0,11 ↑
P11276	Fibronectin	3,95E-02	SP+	0,921 -0,12 ↓
O35682	Myeloid-associated differentiation marker	4,49E-02	SP-	0,922 -0,12 ↓
P13412	Troponin I, fast skeletal muscle	4,73E-02	SP-	0,881 -0,18 ↓

#### 3.3.4.2 Analyse der am signifikantesten regulierten Proteine im Palmitat-Sekretom

Die tiefergehende Analyse der 312 signifikant regulierten Proteine des Palmitat-Sekretoms erfolgte nach einem ähnlichen Prinzip wie in Abschnitt 3.3.4.1 "Analyse der potenziellen Myokine im *Overlap* von Palmitat- und *High insulin* - Sekretom". Die folgende Tabelle 17 "Top 15 der signifikant regulierten Proteine im Palmitat-Sekretom" demonstriert die am signifikantesten regulierten 15 Proteine des Palmitat-Sekretoms mit entsprechender GO-*annotation* (vgl. Abschnitt 2.11.4 "Bioinformatische Analyse, Gen-Ontologie-Analyse").

UniProt Acces- sion Number	Proteinname	Gen- symbol	Sekretori- sche Klassifi- kation	GO- term	p- Wert	Abundanz- Verhältnis absolut und Log₂(x)
P97785	GDNF family receptor alpha-1	Gfra1	SP+	extra- cellular	1,00 E-17	0,01 -6,64 ↓
Q91Z92	Beta-1,3- galactosyltransfera se 6	B3galt6	SP-	extra- cellular	1,00 E-17	0,01 -6,64 ↓
O88452	Stanniocalcin-2	Stc2	SP+	extra- cellular	1,00 E-17	0,01 -6,64 ↓
P97351	40S ribosomal protein S3a	Rps3a	SP-	extra- cellular	1,36 E-07	1,253 0,32 ↑
P11276	Fibronectin	Fn1	SP+	extra- cellular	1,12 E-05	1,214 0,28 ↑
P04095	Prolactin-2C2	Prl2c2	SP+	extra- cellular	6,76 E-05	0,838 -0,25 ↓
P22437	Prostaglandin G/H synthase 1	Ptgs1	SP+	extra- cellular	6,95 E-05	1,71 0,77 ↑
Q8BHN3	Neutral alpha- glucosidase AB	Ganab	SP+	extra- cellular	7,36 E-05	0,675 -0,57 ↓
P48036	Annexin A5	Anxa5	<i>OutCyte</i> positiv	extra- cellular	1,31 E-04	0,814 -0,3 ↓
Q8R0F3	Formylglycine- generating enzyme	Sumf1	SP+	extra- cellular	6,83 E-04	0,818 -0,29 ↓
Q3TNH5	Cotranscriptional regulator FAM172A	Fam172 a	<i>OutCyte</i> positiv	extra- cellular	7,76 E-04	0,778 -0,36 ↓
Q8BH97	Reticulocalbin-3	Rcn3	SP+	extra- cellular	9,29 E-04	1,424 0,51 ↑
P08113	Endoplasmin	Hsp90b 1	SP+	extra- cellular	9,36 E-04	1,16 0,21 ↑
O09165	Calsequestrin-1	Casq1	SP+	extra- cellular	1,14 E-03	0,643 -0,64 ↓
Q9WUD1	E3 ubiquitin- protein ligase CHIP	Stub1	SP-	extra- cellular	1,40 E-03	1,214 0,28 ↑

#### Tabelle 17: Top 15 der signifikant regulierten Proteine im Palmitat-Sekretom

# 3.3.4.3 Analyse der am signifikantesten regulierten Proteine im *High insulin* – Sekretom

Die 231 signifikant regulierten Proteine im *High insulin* - Sekretom wurden analog zu Abschnitt 3.3.4.2 "Analyse der am signifikantesten regulierten Proteine im Palmitat-Sekretom" analysiert. Tabelle 18 "Top 15 der signifikant regulierten Proteine im *High insulin* - Sekretom" zeigt die am signifikantesten regulierten 15 Proteine des *High insulin* - Sekretoms mit entsprechendem GO-*term* (vgl. Abschnitt 2.11.4 "Bioinformatische Analyse, Gen-Ontologie-Analyse").

UniProt Acces- sion Number	Proteinname	Gen- symbol	Sekretori- sche Klassifi- kation	GO-term	p- Wert	Abundanz- Verhältnis absolut und Log <sub>2</sub> (x)
P11672	Neutrophil gelatinase- associated lipocalin	Lcn2	SP+	non- structural extracellular	1,00E- 17	0,01 -6,64 ↓
P70124	Serpin B5	Serpinb 5	<i>OutCyte</i> positiv	non- structural extracellular	1,00E- 17	100 6,64 ↑
A1L0T3	Scavenger receptor cysteine-rich domain- containing group B protein	Ssc4d	<i>OutCyte</i> positiv	non- structural extracellular	1,00E- 17	2,69 1,43 ↑
P10148	C-C motif chemokine 2	Ccl2	SP+	non- structural extracellular	8,21E- 11	1,264 0,34 ↑
Q9D1H9	Microfibril- associated glycoprotein 4	Mfap4	SP+	non- structural extracellular, extracellular matrix	1,52E- 10	2,093 1,07 ↑
O70326	Gremlin-1	Grem1	SP+	non- structural extracellular	6,11E- 10	0,771 -0,37 ↓
P01027	Complement C3	C3	SP+	non- structural extracellular	7,83E- 10	1,245 0,32 ↑
Q8CFG8	Complement C1s-1 subcompo- nent	C1s2	SP+	non- structural extracellular	2,60E- 08	1,273 0,35 ↑
P04186	Complement factor B	Cfb	SP+	non- structural extracellular	2,27E- 07	1,253 0,33 ↑

#### Tabelle 18: Top 15 der signifikant regulierten Proteine im High insulin - Sekretom

P55002	Microfibrillar -associated protein 2	Mfap2	SP+	non- structural extracellular, extracellular matrix	3,04E- 07	0,728 -0,46↓
Q9R0R1	Melano- transferrin	Meltf	SP+	non- structural extracellular	5,33E- 07	1,285 0,36 ↑
Q9WVM 6	Tolloid-like protein 2	TII2	SP+	non- structural extracellular	6,90E- 07	1,363 0,45 ↑
P32261	Antithrombin -III	Serpinc 1	SP+	non- structural extracellular	5,72E- 05	1,165 0,22 ↑
P41731	CD63 antigen	Cd63	SP-	non- structural extracellular	2,22E- 04	1,152 0,2 ↑
Q8VDV0	Integrin beta-like protein 1	ltgbl1	SP+	non- structural extracellular	2,40E- 04	0,667 -0,58 ↓

# **4 DISKUSSION**

T2DM als chronische Stoffwechselerkrankung bildet eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität weltweit [101]. Zu den Eckpfeilern der Therapie zählen *Lifestyle-*Änderungen wie Gewichtsreduktion und körperliche Bewegung [102]. Sport führt dabei zur muskulären Produktion bioaktiver Moleküle, welche wahrscheinlich die positiven Effekte von Bewegung vermitteln und unter dem Begriff "Myokine" bekannt sind. Myokine wirken autokrin im Muskel selbst und sind an der parakrinen sowie endokrinen Regulation anderer Organe beteiligt [42]. Jedoch profitieren nicht alle Patienten gleichermaßen von Bewegungsinterventionen, es existieren *Non-Responder* [11]. Ein besseres Verständnis der Pathophysiologie des T2DM ist somit notwendig, um eine individualisierte Therapie zu ermöglichen. Kontraktionsabhängig sezernierte Myokine könnten als Biomarker dienen und die Grundlage für individuelle Trainingsprogramme bilden [45, 101]. Die Liste an neu entdeckten Myokinen nimmt dabei stetig zu, wobei die meisten der identifizierten Myokine noch nicht vollständig hinsichtlich ihrer biologischen Funktion charakterisiert sind [42, 52].

Das Wissen um die Zusammensetzung des muskulären Myokinoms erweitert sich mit Sekretomstudien. Die Gruppe um *Deshmukh et al.* generierte im Jahr 2015 insulinresistente C2C12-Muskelzellen mittels Palmitat-Stimulation und identifizierte 1073 potenziell sekretierte Proteine [76]. 2021 hat die Gruppe um *Deshmukh* und *Gonzalez-Franquesa et al.* das Sekretom metabolisch gesunder C2C12-Zellen nach 24 h EPS analysiert und identifizierte 1724 potenziell sekretierte Proteine. Nur 67 % der 1724 Proteine waren zu dem Zeitpunkt schon als sekretorische Proteine bekannt. *Thymosin*  $\beta$ 4 stellte das am stärksten hochregulierte Protein, welches ausschließlich im Überstand der EPS-behandelten Zellen quantifiziert wurde, dar [103].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sekretome insulinresistenter C2C12-Muskelzellen nach 24 h EPS charakterisiert und miteinander verglichen. Das wesentliche Ziel bestand darin, durch Identifizierung und Vergleich kontraktionsregulierter Myokine im Rahmen zweier *in vitro* IR-Modelle, zu einem noch tieferen Verständnis der biochemischen Zusammenhänge von IR, T2DM und körperlicher Bewegung beizutragen. Zu diesem Zweck wurden in einem ersten Schritt vier Protokolle zur *in vitro* IR-Induktion etabliert: eine Palmitat-, *High insulin-*, TNF-αund Chemerin-Behandlung der Zellen (vgl. Abschnitt 2.9.4 "Etablierung von *in-vitro*-Insulinresistenz-Protokollen"). Durch Behandlung der Zellen mit dem Salz der Palmitinsäure (Palmitat) sowie einem hyperinsulinämischen Milieu (*High insulin*) konnte eine signifikante Beeinträchtigung des *Insulin-Signalings* im Sinne einer verminderten AKT-Phosphorylierung erzielt werden (vgl. Abschnitt 3.1.1 "Der Effekt von Palmitat auf die Insulinsignalkaskade in murinen Myotuben" und 3.1.2 "Der Effekt von chronischer Insulinexposition auf die Insulinsignalkaskade in murinen Myotuben"). Daraus lässt sich ableiten, dass eine IR induziert wurde (vgl. Abschnitt 4.1.1 "Etablierung der Insulinresistenz"). Um in vitro eine Muskelkontraktion zu induzieren und die Myokinsekretion anzuregen, erfolgte im Anschluss eine Stimulierung der Zellen mit elektrischen Impulsen (vgl. Abschnitt 2.9.6 "Elektropulsstimulation"). Die Analyse der Überstände insulinresistenter C2C12-Zellen nach 24-stündiger EPS-Behandlung wurde nach der entsprechenden Probenaufbereitung anhand von Massenspektrometrie und bioinformatischen Analyse-Tools durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.11 "Probenaufbereitung, Massenspektrometrie und Bioinformatik"). Dabei erfolgte die massenspektrometrische Analyse anhand des Bottom-up-Proteomics-Prinzips. In Peptidkomponenten enzymatisch verdaute Proteine wurden mittels HPLC getrennt und anschließend mittels Massenspektrometrie identifiziert. Die weitere Analyse der Proteine wurde anhand der Proteome Discoverer<sup>™</sup> 3.0 Software sowie anhand der bioinformatischen Algorithmen SignalP 6.0, SecretomeP 2.0 und OutCyte durchgeführt (vgl. Tabelle 7 "Softwareprogramme", Abschnitt 1.2.3.1 "Mechanismen der Proteinsekretion" und Abschnitt 4.2 "Das putative Sekretom von Palmitatbehandelten und mit High insulin behandelten Zellen nach EPS").

### 4.1 Das experimentelle Set-up

#### 4.1.1 Etablierung der Insulinresistenz

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand darin, insulinresistente C2C12-Zellen zu erzeugen. Hierfür wurden vier verschiedene Methoden getestet, bis eine statistisch signifikante Beeinträchtigung der Insulinsignalkaskade durch Palmitat sowie High insulin nachgewiesen werden konnte (vgl. Abschnitt 3.1 "Analyse des Insulin Signalings in murinen Myotuben nach Behandlung mit Palmitat, High insulin, TNF- $\alpha$ und Chemerin"). Erwartungsgemäß führten beide Methoden zu einer signifikant reduzierten pAKT-Thr308- und pAKT-Ser473-Abundanz. Eine entsprechende Verminderung zeigte auch das pAKT/AKT-Ratio (vgl. Abschnitt 3.1.1 "Der Effekt von Palmitat auf die Insulinsignalkaskade in murinen Myotuben" und 3.1.2 "Der Effekt von chronischer Insulinexposition auf die Insulinsignalkaskade in murinen Myotuben"). Hingegen konnte durch die Behandlung mit TNF-a und Chemerin tendenziell keine IR erzeugt werden (vgl. Abschnitt 3.1.3 "Der Effekt von TNF- $\alpha$  auf die Insulinsignalkaskade in murinen Myotuben" und 3.1.4 "Der Effekt von Chemerin auf die Insulinsignalkaskade in murinen Myotuben"). Da insgesamt nur zwei Versuchsdurchläufe mit TNF- $\alpha$  und nur ein Chemerin-Versuch durchgeführt wurden, könnte sich die Tendenz einer IR-Induktion bei mehrfacher Wiederholung der Versuche möglicherweise noch zeigen. Andererseits führte die dreifache Versuchswiederholung im Rahmen der Palmitat- und High insulin – Experimente zu einer signifikanten IR (vgl. Abschnitt 3.1.1 "Der Effekt von Palmitat auf die Insulinsignalkaskade in murinen Myotuben" und 3.1.2 "Der Effekt von chronischer Insulinexposition auf die Insulinsignalkaskade in murinen Myotuben").

Die Gruppe um Del Aguila et al. definierte IR nach TNF- $\alpha$ -Behandlung von C2C12-Zellen als Hemmung der IRS-1- und IRS-2-vermittelten PI3-Kinase-Aktivierung und konnte diese nachweisen [33]. Die Bindung von TNF- $\alpha$  an seine Rezeptoren führt zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren nuclear factor kappa B (NF-κB) und c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) [104]. Die JNK-Aktivierung führt dann zur Phosphorylierung von IRS-1 an Position Serin-307, wodurch die Insulinsignalweiterleitung behindert wird [105, 106]. Das in dieser Arbeit verwendete Readout der zellulären Insulinwirkung ist jedoch die AKT-Phosphorylierung, ein prominentes Downstream-Target von IRS-1. Da AKT in der Insulinsignalkaskade den IRS-Proteinen nachgeschaltet ist, ist der Nachweis einer in der Reihenfolge tiefer liegenden Beeinträchtigung des Insulin Signalings durch TNF-a wahrscheinlich nicht gelungen, auch nicht nach Erhöhung der Konzentration von 10 auf 15 und 20 ng/ml (vgl. Abschnitt 2.9.4.4 "TNF-α-Behandlung"). Möglicherweise ist eine ausgeprägtere Konzentrationserhöhung notwendig, um eine signifikant verminderte AKT-Phosphorylierung zu erzielen. Die Testung AKT nachgeschalteter Target-Proteine der Insulinsignalkaskade wie z.B. von Glykogensynthase-Kinase  $3\alpha$  (GSK3- $\alpha$ ) sowie der phosphorylierten Glykogensynthase-Kinase 3α (pGSK3-α) in weiteren Versuchen könnte ebenfalls Aufschluss bieten. Aktiviertes AKT phosphoryliert GSK3 und übt somit eine hemmende Wirkung auf die Kinase aus. Dies führt zur Enthemmung der Glykogensynthase (GS) [20].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine IR-Induktion auch mittels Chemerin erprobt, einem Protein, welches von humanen Adipozyten exprimiert und sekretiert wird ebenso dessen Rezeptor chemokine like receptor 1 (CMKLR1) [107, 108]. Die Gruppe um Sell et al. konnte unter anderem zeigen, dass die Behandlung humaner Skelettmuskelzellen mittels 1 µg/ml Chemerin über 24 h zu einer signifikant reduzierten AKT-Phosphorylierung an Serin-473 geführt hat [34]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch murine C2C12-Zellen verwendet, ein sich von humanen Skelettmuskelzellen unterscheidendes Zellmodell (vgl. Abschnitt 2.9 "Zellkultur"). Um eine signifikant reduzierte AKT-Phosphorylierung in C2C12-Zellen zu erzielen, wäre möglicherweise eine höhere Chemerin-Konzentration nötig gewesen als die verwendete Konzentration von 1 µg/ml. Zudem hätte der Versuch mindestens drei Mal wiederholt werden müssen, um eine statistische Signifikanz zu zeigen. Dass Chemerin auch in C2C12-Zellen eine IR induziert, konnte bislang nur von Huang und Xie nachgewiesen werden: die Behandlung der Myotuben mit Chemerin für 24 h verringerte die insulinstimulierte Glukoseaufnahme und erhöhte die Sekretion von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  [109, 110]. Ob Chemerin in C2C12-Zellen folglich zu einer verringerten AKT-Phosphorylierung führt, scheint bis dato unklar zu sein. Der Chemerin-Rezeptor wird indes von C2C12-Zellen exprimiert. Die CMKLR1-Expression stieg nach 3- und 5-tägiger Differenzierung der Zellen um das Dreifache an [111].

Da eine signifikante IR mittels Palmitat und *High insulin* etabliert werden konnte, wurde die Sekretomanalyse anhand dieser beiden *in vitro* IR-Modelle durchgeführt.

#### 4.1.2 Batch-Effekt

Unter dem Begriff "Batch-Effekt" oder "Chargeneffekt" versteht man nicht-biologische experimentelle Variation. Unterschiede bei experimentellen Messungen lassen sich demzufolge nicht auf die untersuchten biologischen Wirkungen zurückführen, sondern auf technische Faktoren, z.B. variierende Zellkulturbedingungen oder Reagenzien [112]. Sowohl in der Hauptkomponentenanalyse des Palmitat-Sekretoms als auch in derjenigen des High insulin - Sekretoms wird eine Gruppierung der Proben, welche am gleichen Versuchstag generiert wurden und somit einer Charge und der gleichen Passage angehören, ersichtlich (vgl. Abschnitt 3.3.1 "Hauptkomponentenanalyse der normalisierten Proteinabundanzen im Sekretom von Palmitat- und mit High insulin behandelten C2C12-Zellen"). Idealerweise hätten sich alle EPS-Proben und Kontrollproben gruppieren müssen, unabhängig von der Charge und Passagenzahl. Verschiedene Faktoren können zu Batch-Effekten führen, unter anderem Personalunterschiede oder die Tageszeit, zu der das Experiment durchgeführt wurde [113]. Ebenfalls Variationen in der Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien oder labortechnisch bedingte Unterschiede bei den verwendeten Zellpopulationen sind denkbar, beispielsweise aufgrund des Einfrierens und Auftauprozesses, obgleich es sich bei C2C12-Zellen um eine immortalisierte Zelllinie und somit um klonale Zellen handelt (vgl. Abschnitt 2.1 "Zelllinie" und Tabelle 4 "Zellkultur-Medien").

Obwohl alle Versuche in der Zellkultur nach Protokoll und durch die gleiche Person durchgeführt wurden, können leichte Abweichungen in der Handhabung an den verschiedenen Versuchstagen nicht völlig ausgeschlossen werden. In zukünftigen Experimenten sollten demzufolge alle Zellen am gleichen Tag ausgesät werden, um das Risiko von Chargeneffekten und den Einfluss unterschiedlicher Zellpassagen zu minimieren und somit Reproduzierbarkeit sowie Genauigkeit der Versuchsergebnisse zu verbessern.

## 4.2 Das putative Sekretom von Palmitat-behandelten und mit *High insulin* behandelten Zellen nach EPS

Nach massenspektrometrischer Messung der Überstände insulinresistenter Zellen nach EPS sowie Aufbereitung der resultierenden Rohdaten erfolgte die weitere Analyse über das *Proteome Discoverer* Softwareprogramm (vgl. Abschnitt 2.11.2 "Massenspektrometrische Messung", 2.11.3 "Aufbereitung der Rohdaten" und Tabelle 7 "Softwareprogramme"). Die Eingabe der in Abschnitt 2.13 "Statistik und Software" beschriebenen Filter führte dazu, dass 2531 potenzielle Myokine im Palmitat-Sekretom und 2594 Proteine im *High insulin* – Sekretom identifiziert wurden. Um den Anteil von klassischen sekretorischen Proteinen innerhalb beider Sekretome bestimmen zu können, erfolgte im Anschluss die Analyse anhand der bioinformatischen Algorithmen *SignalP 6.0, SecretomeP 2.0* und *OutCyte* (vgl. Abschnitt 1.2.3.1 "Mechanismen der Proteinsekretion"). Der Algorithmus SignalP 6.0 kann die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein eines Signalpeptids und folglich die Wahrscheinlichkeit für CPS vorhersagen [80]. CPS beschreibt die Freisetzung von Proteinen an der Plasmamembran, nachdem diese durch das ER und den Golgi-Apparat transportiert wurden [78]. Proteine ohne Signalpeptid können über den unkonventionellen Sekretionsweg (UPS) sezerniert werden, z.B. durch Porenformierung in der Plasmamembran, über extrazelluläre Vesikel oder direkten Transport vom ER zur Plasmamembran [81-83]. Sowohl SecretomeP 2.0 als auch OutCyte dienen der Vorhersage von UPS. SecretomeP 2.0 bestimmt die Wahrscheinlichkeit für UPS anhand spezifischer Aminosäureseguenzen [84]. Der 2018 erschienene Algorithmus OutCyte besteht aus zwei Modulen und filtert in einem ersten Schritt Signalseguenzen und Transmembrandomänen enthaltende Proteine heraus, um anschließend Proteine als unkonventionell sezernierte oder intrazelluläre Proteine zu klassifizieren [75]. 61 % der Proteine innerhalb des Palmitat-Sekretoms wurden als potenziell sekretorisch klassifiziert, davon 19 % als SP+, 21 % als SP- und wiederum 21 % als OutCyte +. Im High insulin – Sekretom beträgt der Anteil potenziell sekretorischer Proteine 64 %, mit 22 % SP+, 20 % SP- und 22 % OutCyte + (vgl. Abschnitt 3.3.2 "Identifizierung potenziell sekretorischer Proteine anhand der bioinformatischen Algorithmen SignalP, SecretomeP und OutCyte"). Zusammenfassend konnte demnach der überwiegende Anteil der Proteine in beiden Sekretomen als potenziell sekretorisch identifiziert werden. Den größten Anteil bilden dabei unkonventionell sekretierte Proteine. Wahrscheinlich besteht ein Zusammenhang mit der Verwendung des Analyse-Tools OutCyte zusätzlich zu SignalP und SecretomeP. Zhao et al. berichten, dass bisher bekannte computergestützte Tools zur Vorhersage von UPS wie SecretomeP auf der Hypothese basieren, alle sekretorischen Proteine würden unabhängig vom Sekretionsmechanismus gemeinsame Merkmale aufweisen. Für SecretomeP wurden folglich klassisch sekretierte Proteine als Positivkontrolle verwendet, deren Signalpeptid entfernt wurde [75, 84]. OutCyte hingegen sei aus zwei Modulen aufgebaut: OutCyte-UPS, welches mit hauseigenen Sekretom-Datensätzen erstellt wurde, wobei die Merkmale direkt aus Proteinsequenzen generiert wurden und dem vorgeschalteten OutCyte-SP, um Proteine mit N-terminalem Signalpeptid oder Transmembrandomäne herauszufiltern [75]. Möglicherweise ist die Vorhersage für unkonventionell sekretierte Proteine durch die Kombination der Algorithmen verbessert.

Für eine weitergehende Sekretomanalyse wurden Proteine, die zum Signifikanzniveau  $p \le 0.05$  eine Änderung ihrer Abundanz entsprechend eines *fold changes* von 1,035 (*log 2 fold change*  $\ge 0.05$  bzw.  $\le -0.05$ ) zeigten, als kontraktionsabhängig sekretierte Proteine betrachtet. Insgesamt zeigten sich 312 Proteine im Palmitat- und 231 Proteine im *High insulin* – Sekretom als signifikant reguliert. Im *Overlap* beider Sekretome konnten 27 Proteine identifiziert werden (vgl. Abschnitt 3.3.4 "Vergleich der

signifikant regulierten Proteine im Sekretom Palmitat-behandelter und *High insulin*behandelter C2C12-Zellen").

Im Folgenden sollen exemplarisch fünf der in Tabelle 14-18 genannten Myokine mittels wissenschaftlicher Literatur anhand der Schlüsselwörter *"diabetes, insulin resistance, obesity, exercise, skeletal muscle"* oder *"myokine"* charakterisiert und diskutiert werden.

# 4.2.1 Ausgewählte Myokine des Palmitat- und *High insulin-*Sekretoms 4.2.1.1 *Gremlin-1*

Das Protein Gremlin-1 wird über den klassischen Weg (SP+) sezerniert und konnte im Overlap des Palmitat- und High insulin - Sekretoms identifiziert werden (vgl. Tabelle 15 "Myokine im Overlap, analysiert innerhalb des Palmitat-Sekretoms" und Tabelle 16 "Myokine im Overlap, analysiert innerhalb des High insulin – Sekretoms"). Bezüglich der Proteinstruktur hat sich gezeigt, dass Gremlin-1 tatsächlich ein aus 24 Aminosäuren bestehendes Signalpeptid besitzt und insgesamt aus 184 Aminosäuren besteht. Es zählt zur TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) Superfamilie und spielt eine Rolle bei Wundheilung, Krebserkrankungen und Gewebefibrose, es gibt aber auch Hinweise darauf, dass Gremlin-1 an der Entstehung von T2DM beteiligt sein könnte [114, 115]. Grillo et al. berichteten, dass Gremlin-1 als Adipokin eine zentrale Rolle bei der Fettgewebsdysfunktion im Rahmen von Adipositas, T2DM und nichtalkoholischer Fettlebererkrankung einnehme [114]. Die Gremlin-1-Expression korreliert sowohl invitro als auch in-vivo mit der Adipozytengröße und dem BMI [114, 116]. Hedjazifar et al. zeigten zudem, dass Gremlin-1 in-vitro zu einer Beeinträchtigung des Insulin-Signalings in humanen Myozyten, Hepatozyten sowie Adipozyten führt, gemessen an einer reduzierten AKT-Phosphorylierung an Serin-473, und dass Gremlin-1 signifikant die zelluläre Glukoseaufnahme reduziert. Zusammenfassend scheint Gremlin-1 in-vivo zu einem Großteil aus dem Fettgewebe zu stammen und in den drei großen insulinsensitiven Zelltypen insulinantagonistisch zu wirken. Die Gruppe hat Gremlin-1 folglich als möglichen Biomarker sowie potenzielles Zielmolekül bei Adipositas und T2DM beschrieben [117].

Ob zusätzliche Hauptquellen für zirkulierendes *Gremlin-1* existieren und welcher genaue molekulare Mechanismus hinter dem Protein und einer IR steht, muss im Rahmen weiterer Experimente untersucht werden [114]. Dass *Gremlin-1* auch von murinen C2C12-Zellen sezerniert wird, konnte beispielsweise von *Henningsen et al.* gezeigt werden [118]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte darüber hinaus eine Sekretion des Proteins durch insulinresistente C2C12-Zellen dargestellt werden. EPS-Stimulierung führte bei Palmitat-behandelten Zellen zu einer Hoch- und bei *High insulin* - behandelten Zellen zu einer Herunterregulation von *Gremlin-1* im Vergleich zu den Zellen, die keine EPS-Stimulierung erhielten (vgl. Tabelle 15 "Myokine im *Overlap*, analysiert innerhalb des Palmitat-Sekretoms" und Tabelle 16 "Myokine im *Overlap*, vorrangig kontraktionsabhängig. Ein Zusammenhang von muskulärer *Gremlin-1-*Freisetzung und EPS *in-vitro* ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Es sind daher weitere Experimente zur Untersuchung des Einflusses von Sport *in-vitro* und *in-vivo* erforderlich.

Insgesamt scheint es sich bei *Gremlin-1* also um ein mit IR und T2DM assoziiertes Adipokin sowie Myokin ("Adipo-Myokin") zu handeln.

#### 4.2.1.2 C-C motif chemokine 2

C-C motif chemokine 2, auch bekannt als Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), ist ein Chemokin der CC-Familie, welches in Entzündungsprozesse sowie in der Rekrutierung von Immunzellen involviert ist und bezüglich seiner Rolle bei Stoffwechselstörungen wie Adipositas und T2DM untersucht wurde [119]. Anhand der Anzahl und Lage der N-terminalen Cysteinreste werden vier Chemokin-Unterfamilien unterschieden: C, CC, CXC und CX3C [119, 120]. C-C motif chemokine 2 wird von verschiedenen Zelltypen produziert, darunter Fibroblasten, Adipozyten, Endothelzellen, Muskelzellen, Monozyten und Makrophagen [119, 121]. Das Protein wird ebenso wie Gremlin-1 (s. Abschnitt 4.2.1.1 "Gremlin-1") über CPS sekretiert (SP+) und präsentiert sich im Sekretom High insulin – behandelter Zellen hochreguliert (vgl. Tabelle 18 "Top 15 der signifikant regulierten Proteine im High insulin -Sekretom"). Nakatsumi et al. zeigten, dass über die insulinvermittelte Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs mTORC1 die Dephosphorylierung von FOXK1 (forkhead box K1) induziert wird und dies zur CCL-2 (C-C motif chemokine ligand 2) -Expression führt [119, 122]. Vermutlich führte die Behandlung der Zellen in dieser Arbeit mit High insulin über einen ähnlichen Mechanismus zu einer signifikant vermehrten Expression des Proteins.

*C-C motif chemokine 2* zeigt sich bei Adipositas im Fettgewebe hochreguliert und fördert dort die Rekrutierung von Immunzellen und Makrophagen [119]. Dies kann zu einer chronischen, niedriggradigen Entzündung führen *(low-grade inflammation)*, von welcher angenommen wird, dass sie zur Entwicklung von IR und T2DM beiträgt (vgl. Abschnitt 1.1.2 "Insulinresistenz auf molekularer Ebene"). *Ahmad et al.* konnten einen Zusammenhang zwischen erhöhten freien Fettsäuren bei Adipositas, TNF- $\alpha$  und CCL-2-Produktion herstellen. Sie inkubierten humane Monozyten mit Palmitat und TNF- $\alpha$  und konnten nachweisen, dass dies zu einem signifikanten Anstieg der CCL-2-Produktion im Vergleich zu einer der beiden Methoden allein führt [123]. Im Sekretom Palmitat-behandelter C2C12-Zellen in dieser Arbeit konnte jedoch kein signifikanter reguliertes *C-C motif chemokine 2* nachgewiesen werden.

*Miyatake et al.* stimulierten C2C12-Zellen mittels EPS und konnten zeigen, dass CCL-2 kontraktionsabhängig sekretiert wird. Der Überstand der stimulierten Myotuben führte zudem zu einer Chemotaxis von Monozyten [124]. Makrophagen gelangen vor allem über Monozyten-Infiltration in verletzte Muskulatur, welche insbesondere auf die Sekretion von *C-C motif chemokine 2* zurückzuführen ist [125]. Das Myokin könnte folglich eine Rolle bei Muskelregeneration nach Bewegung spielen [124]. EPS führte auch in dieser Arbeit zu einer Hochregulation von *C-C motif chemokine 2* bei *High insulin* – behandelten Zellen (vgl. Tabelle 18 "Top 15 der signifikant regulierten Proteine im *High insulin* – Sekretom").

Insgesamt zeigt sich die Rolle von *C-C motif chemokine 2* im Stoffwechsel als komplex und noch nicht vollständig geklärt. Als Adipokin begünstigt es IR und ist im Serum adipöser Patienten erhöht, als kontraktionsreguliertes Myokin fördert es wiederum muskuläre Reparatur- und Adaptationsprozesse nach Sport [125-127].

#### 4.2.1.3 Neutrophil gelatinase-associated lipocalin

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), auch bekannt als Lipocalin-2 (LCN-2), ist ein klassisch sezerniertes Protein (SP+) und befindet sich im Overlap des Palmitat- und High insulin – Sekretoms (vgl. Tabelle 15 "Myokine im Overlap, analysiert innerhalb des Palmitat-Sekretoms" und Tabelle 16 "Myokine im Overlap, analysiert innerhalb des High insulin - Sekretoms"). Neben Muskelzellen wird es u.a. auch von Hepatozyten, Adipozyten, Makrophagen, Nierenzellen und neutrophilen Granulozyten exprimiert. In den Granula von Neutrophilen wurde NGAL erstmals identifiziert [128, 129]. Zu seinen vielseitigen Funktionen zählen eine antibakterielle und entzündungshemmende Wirkung, da NGAL durch Sequestrierung eisenhaltiger Siderophore bakterielles Wachstum hemmt [130, 131]. Allerdings ist NGAL bei Adipositas und T2DM erhöht. Dies lässt auf einen Zusammenhang zwischen dem Glykoprotein und dem Glukosestoffwechsel schließen, wobei seine genaue Funktion noch unklar bleibt [128]. Yan et al. zeigten, dass in Mausmodellen für Adipositas die NGAL-Serumspiegel erhöht waren und dass NGAL von Adipozyten in-vitro sowie invivo verstärkt exprimiert wird. Weißes Fettgewebe stellte die Hauptguelle für die Expression von NGAL dar, in braunem Fettgewebe männlicher Wildtyp-Mäuse fehlte es [128, 132]. Die Plasmakonzentration von NGAL zeigte sich auch bei menschlichen adipösen Probanden im Vergleich zu Normalgewichtigen erhöht [133]. Eine prospektive Studie von Liu et al. ergab jedoch keine Korrelation zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren, IR und zirkulierendem NGAL bei jungen männlichen Probanden [134]. Mosialou et al. zeigten hingegen, dass die NGAL-Spiegel adipöser Mäuse sowie menschlicher, prädiabetischer Probandinnen sowohl mit dem Insulinspiegel als auch der β-Zell-Funktion korrelieren. Ein Silencing der NGAL-Expression führte zu einer verstärkten metabolischen Dysfunktion bei adipösen Mäusen. Eine Erhöhung des zirkulierenden NGAL verbesserte darüber hinaus die Stoffwechselparameter sowie die β-Zell-Funktion in Mausmodellen für β-Zell-Versagen. Insgesamt deute dies auf eine protektive Rolle von NGAL bei Adipositas hin [135].

Die Bedeutung von NGAL im Kontext von körperlicher Bewegung scheint derzeit noch unbekannt zu sein. *Ponzetti et al.* untersuchten anhand eines globalen NGAL-*Knockout*-Mausmodells (*Lcn2 -/-*) die murine Muskelbiologie. Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen wiesen die Muskelfasern der *Knockout*-Mäuse einen kleineren Durchmesser auf, Muskelleistung und -gewicht blieben aber normwertig. *In-vitro*  führte NGAL zu einer verminderten Differenzierung von C2C12-Zellen und primären Maus-Myoblasten. Somit scheint NGAL die Muskelphysiologie *in-vitro* im Sinne einer reduzierten Myogenese negativ zu beeinflussen [136].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Funktion von NGAL im Stoffwechsel noch nicht eindeutig definiert ist und in der Literatur kontrovers diskutiert wird. Weitere Forschung ist nötig, um NGAL auch als Myokin zu charakterisieren.

#### 4.2.1.4 Complement Factor B

Complement Factor B (CFB) befindet sich im Sekretom-Overlap und wird über CPS sekretiert (SP+, vgl. Tabelle 15 "Myokine im Overlap, analysiert innerhalb des Palmitat-Sekretoms" und Tabelle 16 "Myokine im Overlap, analysiert innerhalb des High insulin - Sekretoms"). CFB wurde hauptsächlich im Zusammenhang mit Komplementsystem und Immunantwort untersucht, es gibt jedoch Hinweise darauf, dass das Protein auch beim Metabolischen Syndrom sowie T2DM eine Rolle spielen könnte [137]. Das Komplementsystem ist Teil der angeborenen Immunantwort. An der Aktivierung des Komplementsystems ist eine Kaskade von Proteasen beteiligt, wodurch Pathogene wie Bakterien eliminiert und apoptotische Zellen und Zelldetritus beseitigt werden. Es werden drei Komplement-Aktivierungswege beschrieben: der klassische Weg über Antigen-Antikörper-Komplexe, der Lektin-Weg über Bindung von Kohlenhydratstrukturen der mikrobiellen Oberfläche sowie der alternative Weg über spontane Hydrolyse und Aktivierung von Komplementfaktor C3 [138]. Komplementfaktoren werden überwiegend von Hepatozyten synthetisiert und sekretiert, aber manche Faktoren des klassischen und alternativen Weges wie CFB werden auch von Adipozyten gebildet und sezerniert [139]. Dabei ist das Protein CFB als Teil des alternativen Aktivierungsweges mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen assoziiert [137, 140]. Bei Diabetikern konnten zudem erhöhte zirkulierende CFB-Konzentrationen im Serum und bei adipösen Studienteilnehmern im Fettgewebe festgestellt werden [139, 141]. Die bei Adipositas auftretende Metainflammation könnte folglich mit einer erhöhten Genexpression und Aktivierung des Komplementsystems einhergehen [139]. Darüber hinaus demonstrierten Coan et al. eine CFB-Erhöhung im Serum und Fettgewebe der spontaneously hypertensive rat, einem etablierten Rattenmodell für das Metabolische Syndrom. CFB-Knockout führte hier u.a. zu einer verbesserten Insulinsensitivität und zu einer Verringerung der zirkulierenden Lipide bei Cfb -/-Ratten [137].

Eine Komplementaktivierung in Muskelfasern ist mit Fasernekrose assoziiert, außerdem wurden muskuläre Ablagerungen von Komplementfaktoren bei der chronisch-entzündlichen Erkrankung Polymyositis nachgewiesen [142]. Insgesamt handelt es sich bei CFB um ein wichtiges Protein der Komplementkaskade innerhalb der angeborenen Immunität. Ein kausaler Zusammenhang zwischen CFB, T2DM und IR konnte jedoch noch nicht gefunden werden [137]. Die Rolle von CFB als Myokin scheint ebenfalls noch unklar zu sein. Demnach ist weitere Forschungsarbeit nötig, um CFB auch als kontraktionsreguliertes Myokin im Rahmen von T2DM und IR zu charakterisieren.

#### 4.2.1.5 Thrombospondin-2

Das Protein *Thrombospondin-2* (TSP2) wird über CPS sekretiert und befindet sich im Sekretom-*Overlap* (SP+, vgl. Tabelle 15 "Myokine im *Overlap*, analysiert innerhalb des Palmitat-Sekretoms" und Tabelle 16 "Myokine im *Overlap*, analysiert innerhalb des *High insulin* – Sekretoms"). Thrombospondine umfassen fünf Glykoproteine (TSP1 - 5) und werden sezerniert. Sie binden an Rezeptoren der Zelloberfläche, Zytokine oder Komponenten der extrazellulären Matrix und sind somit an Zell-Zell-Interaktionen sowie an Interaktionen zwischen Zellen und der Interzellularsubstanz beteiligt [143, 144]. Thrombospondine sind gewebetypabhängig in Prozesse wie Angiogenese, Wundheilung und Bindegewebsorganisation involviert [144]. In der Literatur wurde TSP2 außerdem mit Adipositas, Leberverfettung und T2DM assoziiert [143, 145]. TSP-2-Serumspiegel wurden auch mit IR in Verbindung gebracht [146]. Bei Patienten mit Nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) und Nicht-alkoholischer Steatohepatitis (*non-acoholic* 

steatohepatitis, NASH) wurden signifikant erhöhte TSP2-Serumspiegel und eine verstärkte hepatische TSP2-Expression nachgewiesen [143]. *Kozumi et al.* haben TSP2 sogar als möglichen Biomarker für eine NASH und eine Leberfibrose bei Patienten mit histologisch gesicherter NAFLD beschrieben [147].

TSP2 wird neben Hepatozyten auch zu einem Großteil von Fibroblasten exprimiert [148, 149]. Eine klinisch relevante Komplikation bei Typ-2-Diabetikern bildet die verzögerte Wundheilung. *Kunkemoeller et al.* stellten eine erhöhte TSP2-Expression in der Haut von Diabetes-Patienten fest und entwickelten ein TSP2-defizientes Mausmodell, welches im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine deutlich verbesserte Hautheilung mit verstärkter Fibroblastenmigration, Blutgefäßreifung und Bildung von Granulationsgewebe aufwies [150].

Zusätzlich scheint TSP2 eine Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen zu spielen [151]. Zirkulierende TSP2-Spiegel wurden u.a. mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht [152]. Zudem sanken die TSP2-Spiegel nach einer Herztransplantation bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz deutlich ab [153].

In der Literatur wird TSP2 zusammenfassend als ein nicht-strukturelles extrazelluläres Matrixprotein beschrieben, dessen Funktionen insbesondere im Kontext mit Abbau und Umbau von extrazellulärer Matrix, Zellmigration und -dysfunktion zu verstehen sind [151]. Als Myokin wurde TSP2 noch nicht untersucht, weder *in-vitro* noch *in-vivo*. In der Tat sind die meisten der identifizierten Myokine noch unvollständig hinsichtlich ihrer biologischen Funktion charakterisiert (vgl. Abschnitt 1.2.3 "Sekretomanalyse").

*Gremlin-1*, *C-C motif chemokine 2*, NGAL, CFB und TSP2 stellen somit Kandidaten für weiterführende Studien mit Zellen, Labornagetieren und Menschen dar, um ihre Rolle

in der Pathophysiologie von IR und T2DM zu ergründen und das Wissen über das muskuläre Sekretom zu erweitern. Das zunehmende Verständnis über die Kommunikation der Skelettmuskulatur mit anderen Organen könnte in Zukunft die Entwicklung von pharmakologischen Myokin-Mimetika, im Sinne von *exercise mimetics*, fördern. Zudem könnten individuelle Myokin-Expressionsprofile eine Grundlage für Trainingsprogramme bilden [45]. Weiterführende Experimente könnten demzufolge *functional assays* darstellen, um die Rolle der Myokine im Stoffwechsel näher zu charakterisieren, indem ihre Auswirkungen auf relevante biologische Prozesse direkt gemessen werden.

### 4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

IR als T2DM-Vorläufer gilt als wichtigste extrapankreatische Ursache für die Entwicklung von T2DM und kann viele Jahre davor auftreten [19]. Körperliche Bewegung wiederum kann eine IR aufheben. In der Forschung wird folglich nach exercise mimetics gesucht, welche auf die Mechanismen abzielen, die den positiven Effekten von Sport zugrunde liegen [12]. Die Skelettmuskulatur wirkt dabei als endokrines Organ und sekretiert Myokine [42]. Eine Vielzahl von Myokinen wird kontraktionsabhängig sekretiert und trägt vermutlich zur Vermittlung positiver Effekte von Sport bei. T2DM führt allerdings zu einer dysfunktionalen Myokinsekretion [43]. Des Weiteren ist die Skelettmuskulatur abnormen systemischen Konzentrationen an Zytokinen, Fettsäuren und Insulin ausgesetzt, wodurch das Insulin Signaling beeinträchtigt wird. Die der IR zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind dabei noch nicht vollständig bekannt [29]. Die Anzahl neu entdeckter Myokine nimmt zudem stetig zu, wobei die meisten noch nicht vollständig hinsichtlich ihrer metabolischen Funktion untersucht sind [42]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher die Sekretome zweier in-vitro-IR-Modelle nach EPS charakterisiert und miteinander verglichen. Frühere Studien fokussierten auf die Analyse des zellulären Sekretoms basierend auf einer Versuchsbedingung, z.B. ± EPS (Gonzales-Franquesa et al.) oder ± Palmitat (Deshmukh et al.), während die hier vorgenommene Vergleichsanalyse (Palmitat ± EPS und *High insulin* ± EPS) die Neuartigkeit der Ergebnisse unterstreicht [76, 103]. Es konnte gezeigt werden, dass sich die beiden Sekretome Palmitatbehandelter und mit High insulin behandelter Zellen nach EPS unterscheiden, diese jedoch mit den 27 signifikant regulierten Myokinen im Overlap auch Gemeinsamkeiten aufweisen (vgl. Tabelle 15 "Myokine im Overlap, analysiert innerhalb des Palmitat-Sekretoms" und Tabelle 16 "Myokine im Overlap, analysiert innerhalb des High insulin - Sekretoms"). Zusätzlich konnten fünf der identifizierten Myokine anhand wissenschaftlicher Literatur näher im Kontext von T2DM und IR, Adipositas, Muskelbiologie oder Inflammation beschrieben werden: Gremlin-1, C-C motif chemokine 2, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), Complement Factor

*B* (CFB) und *Thrombospondin-2* (TSP2) (vgl. Abschnitt 4.2.1 "Ausgewählte Myokine des Palmitat- und *High insulin-*Sekretoms").

Im Rahmen zukünftiger Experimente könnten noch weitere Protokolle zur *in vitro* IR-Induktion etabliert werden, um auch diese Sekretome untereinander zu vergleichen. Darüber hinaus wäre auch ein Sekretomvergleich insulinresistenter mit metabolisch gesunden Kontroll-Zellen nach EPS-Stimulierung interessant, um den Einfluss von EPS als *in vitro* Modell für Sport auf gesunde sowie diabetische Muskelzellen zu untersuchen und pathologische Myokinsekretion zu charakterisieren.

Obwohl C2C12-Zellen ein häufig verwendetes und nützliches Zellmodell in der biomedizinischen Forschung darstellen, existieren Einschränkungen in der Übertragbarkeit der Ergebnisse muriner auf humane Zellen (vgl. Abschnitt 1.3 "Das C2C12-Zellmodell"). Es handelt sich um eine klonale Zelllinie, sodass z.B. keine Rückschlüsse über individuelle Unterschiede der EPS-Responsiveness und Myokinsekretion gezogen werden können. In vitro fehlen darüber hinaus Merkmale wie Blutfluss, Innervation, Bindegewebe und Veränderungen der Mikroumgebung der Skelettmuskulatur wie die Elektrolytkonzentration, welche in vivo essenziell für die muskuläre Funktion sind [90]. Außerdem profitieren nicht alle T2DM-Patienten gleichermaßen von körperlicher Bewegung [154]. Weiterführende Experimente könnten daher mittels humaner Skelettmuskelzellen nach Muskelbiopsien unterschiedlicher Spender durchgeführt werden. Die Gruppe um Batista et al. beispielsweise stellte die IR der Skelettmuskulatur mit pluripotenten Stammzellen nach Muskelbiopsie von Diabetikern und gesunden Probanden nach, welche viral reprogrammiert (induced pluripotent stem cells) und zu Myoblasten differenziert wurden. Eine globale Analyse der Proteinphosphorylierung (phosphoproteomic analysis) ergab, dass die zelluläre Signalübertragung bei T2DM über die Insulinsignalkaskade hinaus gestört ist. Auch wenn durch dieses in vitro Zellmodell nicht alle Aspekte der Zellbiologie in vivo nachgeahmt werden konnte, wurde ein mehrdimensionales Netzwerk von T2DM zugrundeliegenden Signaldefekten aufgedeckt [155].

Die Auswertung der Sekretome wurde anhand aktueller bioinformatischer Analyse-*Tools* durchgeführt, sollte jedoch als vorläufig betrachtet werden. Zukünftige Forschung wird zum Zuwachs von Daten und Publikationen führen und in der Folge die verwendeten statistischen Modelle aktualisieren. Daher werden Sekretome grundsätzlich als "putativ" bezeichnet. Es handelt sich um das "wahrscheinliche", "vermutliche" oder "vermeintliche" Sekretom zum Zeitpunkt der Analyse.

Bewegung (engl. *exercise*) stellt einen wichtigen Stimulus für die Sekretion von kontraktionsregulierten Myokinen wie IL-6 dar, welches als das am meisten

untersuchte exerkine gilt [53, 156]. Die Feststellung, dass IL-6 von Muskelzellen belastungsabhängig in den Blutkreislauf freigesetzt wird, definierte Skelettmuskulatur als endokrines Organ [48, 126]. Auch C2C12-Zellen können IL-6 infolge von EPS-Stimulierung sezernieren [94]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte in den Top-100 der signifikant regulierten Proteine beider Sekretome trotzdem kein IL-6 identifiziert werden (vgl. Tabelle 19 "Top 100 der signifikant regulierten Proteine im Palmitat-Sekretom" und Tabelle 20 "Top 100 der signifikant regulierten Proteine im High insulin - Sekretom"). Diesem Phänomen liegt wahrscheinlich die Ursache zugrunde, dass ein Sekretom hochkomplex und die Konzentration der darin enthaltenen Myokine sehr niedrig ist (bis Nanogramm pro ml) [157]. Die IL-6-Konzentration im Zellüberstand ist für eine massenspektrometrische Detektion häufig zu gering, sodass zum Nachweis spezifische Immunoassays wie ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) im Sinne eines targeted approach eingesetzt werden [156]. Die bestmögliche Lösung zur Detektion bekannter Myokine wie der in Abschnitt 1.2.2 "Beispiele bekannter Myokine" genannten IL-6, Irisin oder Myostatin bildet demnach die Kombination verschiedener technischer Ansätze (untargeted proteomics sowie targeted assays) [157].

Neben dem Myokin-Forschungsfeld existieren weitere präzisionsmedizinische Ansätze in der Diabetologie. T2DM ist eine komplexe Erkrankung, wobei die pathophysiologische Heterogenität von Leitlinien für Diagnose und Therapie noch nicht erfasst wird [158, 159]. Aktuell werden fünf T2DM-Subtypen vorgeschlagen, welche unterschiedliche klinische Merkmale, Krankheitsverläufe und ein unterschiedliches Auftreten von Begleiterkrankungen sowie Komplikationen aufweisen: der schwere Autoimmundiabetes (severe autoimmune diabetes, SAID), der schwere insulindefiziente Diabetes (severe insulin-deficient diabetes, SIDD), der schwere insulinresistente Diabetes (severe insulin-resistant diabetes, SIRD), der milde Adipositas-bedingte Diabetes (mild obesity-related diabetes, MOD) und der milde altersbedingte Diabetes (mild age-related diabetes, MARD). Ein SIRD weist das höchste Risiko für die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, einer chronischen Nierenerkrankung und NAFLD auf [158, 160]. Dies unterstreicht die Rolle der IR als entscheidenden Faktor in der T2DM-Pathophysiologie (vgl. Abschnitt 1.1.1 "Insulin-Signaling und Insulinresistenz der Skelettmuskulatur"). Inwieweit die individuelle Responsiveness von T2DM-Patienten auf körperliche Bewegung mit den unterschiedlichen Pathomechanismen der Diabetes-Untergruppen zusammenhängt, ist noch nicht bekannt [11, 158, 161]. Eine Erweiterung der Phänotypisierung durch Genomik, Metabolomik, Transkriptomik und Proteomik könnte dazu beitragen, die T2DM-Subtypisierung zu präzisieren und in Zukunft eine maßgeschneiderte Diagnostik und Therapie zu ermöglichen [158].

## **5 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS**

- 1. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. Diabetes Care, 2022. 45(Suppl 1): p. S17-s38.
- 2. Bin Rakhis, S.A., Sr., et al., *Glycemic Control for Type 2 Diabetes Mellitus Patients: A Systematic Review.* Cureus, 2022. 14(6): p. e26180.
- 3. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, Global Diabetes data report 2000 - 2045.* 2021 18 September 2022]; Available from: <u>https://diabetesatlas.org</u>.
- 4. Tönnies, T., et al., *Projected number of people with diagnosed Type 2 diabetes in Germany in 2040.* Diabet Med, 2019. 36(10): p. 1217-1225.
- 5. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus.* Diabetes Care, 2014. 37 Suppl 1: p. S81-90.
- 6. Evans, M., et al., Adherence to and persistence with antidiabetic medications and associations with clinical and economic outcomes in people with type 2 diabetes mellitus: A systematic literature review. Diabetes Obes Metab, 2022. 24(3): p. 377-390.
- 7. Ismail, L., H. Materwala, and J. Al Kaabi, *Association of risk factors with type 2 diabetes: A systematic review.* Comput Struct Biotechnol J, 2021. 19: p. 1759-1785.
- 8. Sampath Kumar, A., et al., *Exercise and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis.* Ann Phys Rehabil Med, 2019. 62(2): p. 98-103.
- 9. Motahari-Tabari, N., et al., *The effect of 8 weeks aerobic exercise on insulin resistance in type 2 diabetes: a randomized clinical trial.* Glob J Health Sci, 2014. 7(1): p. 115-21.
- 10. Knowler, W.C., et al., *Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin.* N Engl J Med, 2002. 346(6): p. 393-403.
- 11. Stephens, N.A., et al., *A transcriptional signature of "exercise resistance" in skeletal muscle of individuals with type 2 diabetes mellitus.* Metabolism, 2015. 64(9): p. 999-1004.
- 12. Merz, K.E. and D.C. Thurmond, *Role of Skeletal Muscle in Insulin Resistance and Glucose Uptake.* Compr Physiol, 2020. 10(3): p. 785-809.
- 13. Jarvie, J.L., et al., Aerobic Fitness and Adherence to Guideline-Recommended Minimum Physical Activity Among Ambulatory Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. Diabetes Care, 2019. 42(7): p. 1333-1339.
- 14. Keshel, T.E. and R.H. Coker, *Exercise Training and Insulin Resistance: A Current Review.* J Obes Weight Loss Ther, 2015. 5(Suppl 5).
- 15. Czech, M.P., *Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes.* Nat Med, 2017. 23(7): p. 804-814.
- 16. Galicia-Garcia, U., et al., *Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus.* Int J Mol Sci, 2020. 21(17).
- 17. Petersen, M.C. and G.I. Shulman, *Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance*. Physiol Rev, 2018. 98(4): p. 2133-2223.
- Halban, P.A., et al., β-cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. Diabetes Care, 2014. 37(6): p. 1751-8.
- 19. DeFronzo, R.A. and D. Tripathy, *Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes.* Diabetes Care, 2009. 32 Suppl 2(Suppl 2): p. S157-63.
- 20. Huang, X., et al., *The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes.* Int J Biol Sci, 2018. 14(11): p. 1483-1496.

- 21. Haeusler, R.A., T.E. McGraw, and D. Accili, *Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. 19(1): p. 31-44.
- 22. Batista, T.M., N. Haider, and C.R. Kahn, *Defining the underlying defect in insulin action in type 2 diabetes.* Diabetologia, 2021. 64(5): p. 994-1006.
- 23. Björnholm, M., et al., *Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans.* Diabetologia, 2002. 45(12): p. 1697-702.
- 24. Boucher, J., A. Kleinridders, and C.R. Kahn, *Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. 6(1).
- 25. Eickelschulte, S., et al., *AKT/AMPK-mediated phosphorylation of TBC1D4 disrupts the interaction with insulin-regulated aminopeptidase.* J Biol Chem, 2021. 296: p. 100637.
- 26. Jaiswal, N., et al., *The role of skeletal muscle Akt in the regulation of muscle mass and glucose homeostasis.* Mol Metab, 2019. 28: p. 1-13.
- 27. Tonks, K.T., et al., *Impaired Akt phosphorylation in insulin-resistant human muscle is accompanied by selective and heterogeneous downstream defects.* Diabetologia, 2013. 56(4): p. 875-85.
- 28. Shao, J., et al., *Decreased Akt kinase activity and insulin resistance in C57BL/KsJ-Leprdb/db mice.* J Endocrinol, 2000. 167(1): p. 107-15.
- 29. Turner, M.C., et al., *The effect of chronic high insulin exposure upon metabolic and myogenic markers in C2C12 skeletal muscle cells and myotubes.* J Cell Biochem, 2018. 119(7): p. 5686-5695.
- 30. Hardy, O.T., M.P. Czech, and S. Corvera, *What causes the insulin resistance underlying obesity*? Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2012. 19(2): p. 81-7.
- 31. Galic, S., J.S. Oakhill, and G.R. Steinberg, *Adipose tissue as an endocrine organ.* Mol Cell Endocrinol, 2010. 316(2): p. 129-39.
- Yoon, J.H., et al., Proteomic analysis of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)induced L6 myotube secretome reveals novel TNF- α-dependent myokines in diabetic skeletal muscle. J Proteome Res, 2011. 10(12): p. 5315-25.
- del Aguila, L.F., K.P. Claffey, and J.P. Kirwan, *TNF-alpha impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells.* Am J Physiol, 1999. 276(5): p. E849-55.
- 34. Sell, H., et al., *Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells.* Diabetes, 2009. 58(12): p. 2731-40.
- 35. Lehrke, M., et al., Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis. Eur J Endocrinol, 2009. 161(2): p. 339-44.
- 36. Korbecki, J. and K. Bajdak-Rusinek, *The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms.* Inflamm Res, 2019. 68(11): p. 915-932.
- 37. DiNicolantonio, J.J. and J.H. O'Keefe, Good Fats versus Bad Fats: A Comparison of Fatty Acids in the Promotion of Insulin Resistance, Inflammation, and Obesity. Mo Med, 2017. 114(4): p. 303-307.
- 38. Chavez, J.A. and S.A. Summers, *Characterizing the effects of saturated fatty* acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. Arch Biochem Biophys, 2003. 419(2): p. 101-9.
- 39. Mahfouz, R., et al., *Characterising the inhibitory actions of ceramide upon insulin signaling in different skeletal muscle cell models: a mechanistic insight.* PLoS One, 2014. 9(7): p. e101865.
- 40. Watt, M.J. and A.J. Hoy, *Lipid metabolism in skeletal muscle: generation of adaptive and maladaptive intracellular signals for cellular function.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. 302(11): p. E1315-28.

- 41. Abdul-Ghani, M. and R.A. DeFronzo, *Insulin Resistance and Hyperinsulinemia: the Egg and the Chicken.* J Clin Endocrinol Metab, 2021. 106(4): p. e1897-e1899.
- 42. Pedersen, B.K., *Muscle as a secretory organ.* Compr Physiol, 2013. 3(3): p. 1337-62.
- 43. Balakrishnan, R. and D.C. Thurmond, *Mechanisms by Which Skeletal Muscle Myokines Ameliorate Insulin Resistance.* Int J Mol Sci, 2022. 23(9).
- 44. Whitham, M. and M.A. Febbraio, *The ever-expanding myokinome: discovery challenges and therapeutic implications.* Nat Rev Drug Discov, 2016. 15(10): p. 719-29.
- 45. Huh, J.Y., *The role of exercise-induced myokines in regulating metabolism.* Arch Pharm Res, 2018. 41(1): p. 14-29.
- 46. Goldstein, M.S., *Humoral nature of the hypoglycemic factor of muscular work.* Diabetes, 1961. 10: p. 232-4.
- 47. Mohr, T., et al., *Long-term adaptation to electrically induced cycle training in severe spinal cord injured individuals.* Spinal Cord, 1997. 35(1): p. 1-16.
- 48. Steensberg, A., et al., *Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6.* J Physiol, 2000. 529 Pt 1(Pt 1): p. 237-42.
- 49. Steensberg, A., et al., Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. J Physiol, 2001. 537(Pt 2): p. 633-9.
- 50. Pedersen, B.K., et al., *Role of myokines in exercise and metabolism.* J Appl Physiol (1985), 2007. 103(3): p. 1093-8.
- 51. Pedersen, B.K., et al., *Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate?* J Muscle Res Cell Motil, 2003. 24(2-3): p. 113-9.
- 52. Florin, A., et al., *The secretome of skeletal muscle cells: A systematic review.* Osteoarthritis and Cartilage Open, 2020. 2(1).
- 53. Lee, J.H. and H.S. Jun, *Role of Myokines in Regulating Skeletal Muscle Mass and Function.* Front Physiol, 2019. 10: p. 42.
- 54. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6.* Physiol Rev, 2008. 88(4): p. 1379-406.
- 55. Carey, A.L., et al., Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. Diabetes, 2006. 55(10): p. 2688-97.
- 56. Kim, H.J., et al., *Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo.* Diabetes, 2004. 53(4): p. 1060-7.
- 57. Senn, J.J., *Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitateinduced insulin resistance in myotubes.* J Biol Chem, 2006. 281(37): p. 26865-75.
- 58. Matthews, V.B., et al., *Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance.* Diabetologia, 2010. 53(11): p. 2431-41.
- 59. Severinsen, M.C.K. and B.K. Pedersen, *Muscle-Organ Crosstalk: The Emerging Roles of Myokines.* Endocr Rev, 2020. 41(4).
- 60. Leal, L.G., M.A. Lopes, and M.L. Batista, Jr., *Physical Exercise-Induced Myokines and Muscle-Adipose Tissue Crosstalk: A Review of Current Knowledge and the Implications for Health and Metabolic Diseases.* Front Physiol, 2018. 9: p. 1307.
- 61. Boström, P., et al., *A PGC1- α*-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. Nature, 2012. 481(7382): p. 463-8.
- 62. Raschke, S., et al., *Evidence against a beneficial effect of irisin in humans.* PLoS One, 2013. 8(9): p. e73680.

- 63. Kim, H., et al., *Irisin Mediates Effects on Bone and Fat via αV Integrin Receptors.* Cell, 2018. 175(7): p. 1756-1768.e17.
- 64. Alis, R., et al., Association between irisin and homocysteine in euglycemic and diabetic subjects. Clin Biochem, 2014. 47(18): p. 333-5.
- 65. Yano, N., et al., *Irisin counteracts high glucose and fatty acid-induced cytotoxicity by preserving the AMPK-insulin receptor signaling axis in C2C12 myoblasts.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2020. 318(5): p. E791-e805.
- 66. Liu, S., et al., *Effects and underlying mechanisms of irisin on the proliferation and apoptosis of pancreatic*  $\beta$  *cells.* PLoS One, 2017. 12(4): p. e0175498.
- 67. McPherron, A.C., A.M. Lawler, and S.J. Lee, *Regulation of skeletal muscle* mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. Nature, 1997. 387(6628): p. 83-90.
- 68. Amthor, H., et al., *Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(6): p. 1835-40.
- 69. McPherron, A.C. and S.J. Lee, *Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(23): p. 12457-61.
- 70. Schuelke, M., et al., *Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child.* N Engl J Med, 2004. 350(26): p. 2682-8.
- 71. Cleasby, M.E., et al., *Local overexpression of the myostatin propeptide increases glucose transporter expression and enhances skeletal muscle glucose disposal.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014. 306(7): p. E814-23.
- 72. Leung, D.G., et al., *Whole-body magnetic resonance imaging evaluation of facioscapulohumeral muscular dystrophy.* Muscle Nerve, 2015. 52(4): p. 512-20.
- 73. Mariot, V., et al., *Downregulation of myostatin pathway in neuromuscular diseases may explain challenges of anti-myostatin therapeutic approaches.* Nat Commun, 2017. 8(1): p. 1859.
- 74. Song, P., et al., *Secretomics to Discover Regulators in Diseases.* Int J Mol Sci, 2019. 20(16).
- 75. Zhao, L., et al., *OutCyte: a novel tool for predicting unconventional protein secretion.* Sci Rep, 2019. 9(1): p. 19448.
- 76. Deshmukh, A.S., et al., Secretome Analysis of Lipid-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle Cells by a Combined Experimental and Bioinformatics Workflow. J Proteome Res, 2015. 14(11): p. 4885-95.
- Grube, L., et al., Mining the Secretome of C2C12 Muscle Cells: Data Dependent Experimental Approach To Analyze Protein Secretion Using Label-Free Quantification and Peptide Based Analysis. J Proteome Res, 2018. 17(2): p. 879-890.
- 78. Akopian, D., et al., *Signal recognition particle: an essential protein-targeting machine.* Annu Rev Biochem, 2013. 82: p. 693-721.
- 79. Sun, Z. and J.L. Brodsky, *Protein quality control in the secretory pathway.* J Cell Biol, 2019. 218(10): p. 3171-3187.
- 80. Nielsen, H., et al., *A Brief History of Protein Sorting Prediction.* Protein J, 2019. 38(3): p. 200-216.
- 81. Cohen, M.J., W.J. Chirico, and P.N. Lipke, *Through the back door: Unconventional protein secretion.* Cell Surf, 2020. 6: p. 100045.
- 82. van Niel, G., G. D'Angelo, and G. Raposo, *Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. 19(4): p. 213-228.
- 83. Rabouille, C., *Pathways of Unconventional Protein Secretion.* Trends Cell Biol, 2017. 27(3): p. 230-240.
- 84. Bendtsen, J.D., et al., *Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion.* Protein Eng Des Sel, 2004. 17(4): p. 349-56.

- 85. Lichtenthaler, S.F., M.K. Lemberg, and R. Fluhrer, *Proteolytic ectodomain* shedding of membrane proteins in mammals-hardware, concepts, and recent developments. Embo j, 2018. 37(15).
- 86. Wong, C.Y., H. Al-Salami, and C.R. Dass, *C2C12 cell model: its role in understanding of insulin resistance at the molecular level and pharmaceutical development at the preclinical stage.* J Pharm Pharmacol, 2020. 72(12): p. 1667-1693.
- 87. Yaffe, D. and O. Saxel, Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. Nature, 1977. 270(5639): p. 725-7.
- 88. Chen, W., et al., *In vitro exercise model using contractile human and mouse hybrid myotubes.* Sci Rep, 2019. 9(1): p. 11914.
- 89. Abdelmoez, A.M., et al., *Comparative profiling of skeletal muscle models reveals heterogeneity of transcriptome and metabolism.* Am J Physiol Cell Physiol, 2020. 318(3): p. C615-c626.
- 90. Nikolić, N., et al., *Electrical pulse stimulation of cultured skeletal muscle cells as a model for in vitro exercise possibilities and limitations.* Acta Physiol (Oxf), 2017. 220(3): p. 310-331.
- 91. Pedersen, B.K. and B. Saltin, *Exercise as medicine evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases.* Scand J Med Sci Sports, 2015. 25 Suppl 3: p. 1-72.
- 92. Hawley, J.A., et al., *Integrative biology of exercise.* Cell, 2014. 159(4): p. 738-49.
- 93. Shainberg, A. and M. Burstein, *Decrease of acetylcholine receptor synthesis in muscle cultures by electrical stimulation.* Nature, 1976. 264(5584): p. 368-9.
- 94. Nedachi, T., H. Fujita, and M. Kanzaki, *Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. 295(5): p. E1191-204.
- 95. Aas, V., et al., *Electrical stimulation improves insulin responses in a human skeletal muscle cell model of hyperglycemia.* Ann N Y Acad Sci, 2002. 967: p. 506-15.
- 96. Eltit, J.M., et al., *Slow calcium signals after tetanic electrical stimulation in skeletal myotubes.* Biophys J, 2004. 86(5): p. 3042-51.
- 97. Gehlert, S., W. Bloch, and F. Suhr, *Ca2+-dependent regulations and signaling in skeletal muscle: from electro-mechanical coupling to adaptation.* Int J Mol Sci, 2015. 16(1): p. 1066-95.
- 98. Nikolić, N., et al., *Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an in vitro model of exercise.* PLoS One, 2012. 7(3): p. e33203.
- 99. Purslow, P.P., *The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle.* Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2002. 133(4): p. 947-66.
- 100. Jolliffe, I.T. and J. Cadima, *Principal component analysis: a review and recent developments.* Philos Trans A Math Phys Eng Sci, 2016. 374(2065): p. 20150202.
- 101. García-Hermoso, A., et al., *Exercise training-induced changes in exerkine concentrations may be relevant to the metabolic control of type 2 diabetes mellitus patients: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.* J Sport Health Sci, 2023. 12(2): p. 147-157.
- 102. 5. Facilitating Behavior Change and Well-being to Improve Health Outcomes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. Diabetes Care, 2022. 45(Suppl 1): p. S60-s82.
- 103. Gonzalez-Franquesa, A., et al., *Discovery of thymosin*  $\beta 4$  as a human exerkine and growth factor. Am J Physiol Cell Physiol, 2021. 321(5): p. C770-c778.

- 104. Aguirre, V., et al., *The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307).* J Biol Chem, 2000. 275(12): p. 9047-54.
- 105. Borst, S.E., *The role of TNF-alpha in insulin resistance.* Endocrine, 2004. 23(2-3): p. 177-82.
- 106. Akash, M.S.H., K. Rehman, and A. Liaqat, *Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus.* J Cell Biochem, 2018. 119(1): p. 105-110.
- 107. Bozaoglu, K., et al., *Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome.* Endocrinology, 2007. 148(10): p. 4687-94.
- 108. Goralski, K.B., et al., *Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism.* J Biol Chem, 2007. 282(38): p. 28175-88.
- 109. Huang, Z. and X. Xie, [Chemerin induces insulin resistance in C2C12 cells through nuclear factor- *κ* B pathway-mediated inflammatory reaction]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2015. 31(6): p. 725-9.
- 110. Nicholson, T., et al., *The role of adipokines in skeletal muscle inflammation and insulin sensitivity.* J Inflamm (Lond), 2018. 15: p. 9.
- 111. Issa, M.E., et al., *Chemokine-like receptor 1 regulates skeletal muscle cell myogenesis.* Am J Physiol Cell Physiol, 2012. 302(11): p. C1621-31.
- 112. Leek, J.T., et al., *Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data.* Nat Rev Genet, 2010. 11(10): p. 733-9.
- 113. Lazar, C., et al., *Batch effect removal methods for microarray gene expression data integration: a survey.* Brief Bioinform, 2013. 14(4): p. 469-90.
- 114. Grillo, E., et al., *Role of gremlin-1 in the pathophysiology of the adipose tissues.* Cytokine Growth Factor Rev, 2023. 69: p. 51-60.
- 115. Elemam, N.M., et al., *Insights into the Role of Gremlin-1, a Bone Morphogenic Protein Antagonist, in Cancer Initiation and Progression.* Biomedicines, 2022. 10(2).
- 116. Gustafson, B., et al., *BMP4 and BMP Antagonists Regulate Human White and Beige Adipogenesis.* Diabetes, 2015. 64(5): p. 1670-81.
- 117. Hedjazifar, S., et al., *The Novel Adipokine Gremlin 1 Antagonizes Insulin Action and Is Increased in Type 2 Diabetes and NAFLD/NASH.* Diabetes, 2020. 69(3): p. 331-341.
- 118. Henningsen, J., B.K. Pedersen, and I. Kratchmarova, *Quantitative analysis of the secretion of the MCP family of chemokines by muscle cells.* Mol Biosyst, 2011. 7(2): p. 311-21.
- 119. Dommel, S. and M. Blüher, *Does C-C Motif Chemokine Ligand 2 (CCL2) Link Obesity to a Pro-Inflammatory State?* Int J Mol Sci, 2021. 22(3).
- 120. Miller, M.C. and K.H. Mayo, *Chemokines from a Structural Perspective*. Int J Mol Sci, 2017. 18(10).
- 121. Cushing, S.D., et al., *Minimally modified low density lipoprotein induces* monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(13): p. 5134-8.
- 122. Nakatsumi, H., M. Matsumoto, and K.I. Nakayama, *Noncanonical Pathway for Regulation of CCL2 Expression by an mTORC1-FOXK1 Axis Promotes Recruitment of Tumor-Associated Macrophages.* Cell Rep, 2017. 21(9): p. 2471-2486.
- 123. Ahmad, R., et al., *The Synergy between Palmitate and TNF- α for CCL2 Production Is Dependent on the TRIF/IRF3 Pathway: Implications for Metabolic Inflammation.* J Immunol, 2018. 200(10): p. 3599-3611.
- 124. Miyatake, S., et al., *Contracting C2C12 myotubes release CCL2 in an NF- κBdependent manner to induce monocyte chemoattraction.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2016. 310(2): p. E160-70.

- 125. Lu, H., et al., Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair. Faseb j, 2011. 25(10): p. 3344-55.
- 126. Raschke, S. and J. Eckel, *Adipo-myokines: two sides of the same coin-mediators of inflammation and mediators of exercise.* Mediators Inflamm, 2013. 2013: p. 320724.
- 127. Hubal, M.J., et al., *Inflammatory gene changes associated with the repeatedbout effect.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. 294(5): p. R1628-37.
- 128. Jaberi, S.A., et al., *Lipocalin-2: Structure, function, distribution and role in metabolic disorders.* Biomed Pharmacother, 2021. 142: p. 112002.
- 129. Kjeldsen, L., et al., *Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase.* J Biol Chem, 1993. 268(14): p. 10425-32.
- 130. Flo, T.H., et al., *Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestrating iron.* Nature, 2004. 432(7019): p. 917-21.
- 131. Moschen, A.R., et al., *Lipocalin-2: A Master Mediator of Intestinal and Metabolic Inflammation.* Trends Endocrinol Metab, 2017. 28(5): p. 388-397.
- 132. Yan, Q.W., et al., *The adipokine lipocalin 2 is regulated by obesity and promotes insulin resistance.* Diabetes, 2007. 56(10): p. 2533-40.
- 133. Wang, Y., et al., *Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance, and hyperglycemia in humans.* Clin Chem, 2007. 53(1): p. 34-41.
- 134. Liu, X., et al., *Circulating lipocalin 2 is associated with body fat distribution at baseline but is not an independent predictor of insulin resistance: the prospective Cyprus Metabolism Study.* Eur J Endocrinol, 2011. 165(5): p. 805-12.
- 135. Mosialou, I., et al., *Lipocalin-2 counteracts metabolic dysregulation in obesity and diabetes.* J Exp Med, 2020. 217(10).
- 136. Ponzetti, M., et al., *Lipocalin 2 increases after high-intensity exercise in humans and influences muscle gene expression and differentiation in mice.* J Cell Physiol, 2022. 237(1): p. 551-565.
- 137. Coan, P.M., et al., *Complement Factor B Is a Determinant of Both Metabolic and Cardiovascular Features of Metabolic Syndrome.* Hypertension, 2017. 70(3): p. 624-33.
- 138. Ling, M. and M. Murali, *Analysis of the Complement System in the Clinical Immunology Laboratory*. Clin Lab Med, 2019. 39(4): p. 579-590.
- 139. Moreno-Navarrete, J.M., et al., *Complement factor H is expressed in adipose tissue in association with insulin resistance.* Diabetes, 2010. 59(1): p. 200-9.
- 140. Ricklin, D., et al., *Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis.* Nat Immunol, 2010. 11(9): p. 785-97.
- 141. Somani, R., et al., *Elevated properdin and enhanced complement activation in first-degree relatives of South Asian subjects with type 2 diabetes.* Diabetes Care, 2012. 35(4): p. 894-9.
- 142. Legoedec, J., et al., *Expression of the complement alternative pathway by human myoblasts in vitro: biosynthesis of C3, factor B, factor H and factor I.* Eur J Immunol, 1995. 25(12): p. 3460-6.
- 143. Wu, X., et al., Serum Thrombospondin-2 Levels Are Closely Associated With the Severity of Metabolic Syndrome and Metabolic Associated Fatty Liver Disease. J Clin Endocrinol Metab, 2022. 107(8): p. e3230-e3240.
- 144. Adams, J.C. and J. Lawler, *The thrombospondins.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. 3(10): p. a009712.
- 145. Lee, C.H., et al., *Circulating Thrombospondin-2 as a Novel Fibrosis Biomarker* of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Type 2 Diabetes. Diabetes Care, 2021. 44(9): p. 2089-2097.

- 146. Morikawa, N., et al., *Thrombospondin-2 as a Potential Risk Factor in a General Population.* Int Heart J, 2019. 60(2): p. 310-317.
- 147. Kozumi, K., et al., *Transcriptomics Identify Thrombospondin-2 as a Biomarker* for NASH and Advanced Liver Fibrosis. Hepatology, 2021. 74(5): p. 2452-2466.
- 148. Kimura, T., et al., Serum thrombospondin 2 is a novel predictor for the severity in the patients with NAFLD. Liver Int, 2021. 41(3): p. 505-514.
- 149. Bornstein, P., et al., *Thrombospondin 2, a matricellular protein with diverse functions.* Matrix Biol, 2000. 19(7): p. 557-68.
- 150. Kunkemoeller, B., et al., *Elevated Thrombospondin 2 Contributes to Delayed Wound Healing in Diabetes.* Diabetes, 2019. 68(10): p. 2016-2023.
- 151. Zhang, K., et al., *Role of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 in cardiovascular diseases (Review)*. Int J Mol Med, 2020. 45(5): p. 1275-1293.
- 152. Lee, C.H., et al., *Prospective associations of circulating thrombospondin-2 level with heart failure hospitalization, left ventricular remodeling and diastolic function in type 2 diabetes.* Cardiovasc Diabetol, 2022. 21(1): p. 231.
- 153. Egerstedt, A., et al., *Profiling of the plasma proteome across different stages of human heart failure.* Nat Commun, 2019. 10(1): p. 5830.
- 154. Stephens, N.A., et al., *Exercise Response Variations in Skeletal Muscle PCr Recovery Rate and Insulin Sensitivity Relate to Muscle Epigenomic Profiles in Individuals With Type 2 Diabetes.* Diabetes Care, 2018. 41(10): p. 2245-2254.
- 155. Batista, T.M., et al., A Cell-Autonomous Signature of Dysregulated Protein Phosphorylation Underlies Muscle Insulin Resistance in Type 2 Diabetes. Cell Metab, 2020. 32(5): p. 844-859.e5.
- 156. Scheler, M., et al., *Methods for proteomics-based analysis of the human muscle secretome using an in vitro exercise model.* Methods Mol Biol, 2015. 1295: p. 55-64.
- 157. Hartwig, S., et al., *Secretome profiling of primary human skeletal muscle cells*. Biochim Biophys Acta, 2014. 1844(5): p. 1011-7.
- 158. Herder, C. and M. Roden, *A novel diabetes typology: towards precision diabetology from pathogenesis to treatment.* Diabetologia, 2022. 65(11): p. 1770-1781.
- 159. Redondo, M.J., et al., *The clinical consequences of heterogeneity within and between different diabetes types.* Diabetologia, 2020. 63(10): p. 2040-2048.
- 160. Ahlqvist, E., et al., *Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables.* Lancet Diabetes Endocrinol, 2018. 6(5): p. 361-369.
- 161. Contrepois, K., et al., *Molecular Choreography of Acute Exercise.* Cell, 2020. 181(5): p. 1112-1130.e16.

# 6 ANHANG

UniProt Acces- sion Number	Proteinname	Gen- symbol	Sekreto- rische Klassifi- kation	p-Wert	Abundanz- verhältnis absolut	Abundanz- verhältnis Log2(x)
Q61781	Keratin, type I cytoskeletal 14	Krt14	OutCyte: intracellular	1,00E- 17	100,00	6,64
P19001	Keratin, type l cytoskeletal 19	Krt19	OutCyte: intracellular	1,00E- 17	100,00	6,64
Q9CS42	Ribose-phosphate pyrophospho- kinase 2	Prps2	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	1,00E- 17	0,01	-6,64
P00687	Alpha-amylase 1	Amy1	SP+	1,00E- 17	0,33	-1,60
P97785	GDNF family receptor alpha-1	Gfra1	SP+	1,00E- 17	0,01	-6,64
P02088	Hemoglobin subunit beta-1	Hbb-b1	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	1,00E- 17	100,00	6,64
Q8BIV3	Ran-binding protein 6	Ranbp6	OutCyte positiv (UPS)	1,00E- 17	100,00	6,64
P48962	ADP/ATP translocase 1	Slc25a4	OutCyte positiv (UPS)	1,00E- 17	100,00	6,64
Q91Z92	Beta-1,3- galactosyl- transferase 6	B3galt6	SP-	1,00E- 17	0,01	-6,64
Q91V57	N-chimaerin	Chn1	OutCyte: intracellular	1,00E- 17	0,01	-6,64
O88452	Stanniocalcin-2	Stc2	SP+	1,00E- 17	0,01	-6,64
O35114	Lysosome membrane protein 2	Scarb2	SP-	1,00E- 17	0,01	-6,64
Q9CQG1	Putative glutathione- specific gamma- glutamylcyclo- transferase 2	Chac2	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	1,00E- 17	100,00	6,64
Q91V09	WD repeat- containing protein 13	Wdr13	SP-	1,00E- 17	0,01	-6,64
Q922B1	ADP-ribose glycohydrolase MACROD1	Macrod1	SP-	1,00E- 17	0,01	-6,64
Q3UCV8	Ubiquitin thioesterase otulin	Otulin	OutCyte: intracellular	1,00E- 17	100,00	6,64
Q9JJK2	LanC-like protein 2	Lancl2	OutCyte: intracellular	1,00E- 17	100,00	6,64
Q921I1	Serotransferrin	Tf	SP+	1,00E- 17	100,00	6,64
Q9JLF6	Protein-glutamine gamma-glutamyl- transferase K	Tgm1	OutCyte: intracellular	1,00E- 17	0,01	-6,64
Q91VJ4	Serine/threonine- protein kinase 38	Stk38	OutCyte: intracellular	1,00E- 17	0,01	-6,64

#### Tabelle 19: Top 100 der signifikant regulierten Proteine im Palmitat-Sekretom

Q6A0A9	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	FAM12A	OutCyte: intracellular	1,00E- 17	100,00	6,64
P11862	Growth arrest-	Gas2	SP-	1,00E- 17	0,01	-6,64
Q8K2Z2	Pre-mRNA- processing factor 39	Prpf39	OutCyte: intracellular	1,00E- 17	100,00	6,64
Q69ZF3	Non-lysosomal glucosylcera- midase	Gba2	OutCyte: intracellular	1,00E- 17	0,01	-6,64
O35143	ATPase inhibitor, mitochondrial	Atp5if1	SP-	1,00E- 17	100,00	6,64
Q9Z1W8	Potassium- transporting ATPase alpha chain 2	Atp12a	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	2,69E- 14	0,66	-0,59
Q0VBK2	Keratin, type II cytoskeletal 80	Krt80	OutCyte: intracellular	5,56E- 12	0,76	-0,40
P07146	Anionic trypsin-2	Prss2	SP+	5,63E- 12	0,69	-0,53
P35569	Insulin receptor substrate 1	lrs1	OutCyte: intracellular	7,51E- 11	0,70	-0,51
P15864	Histone H1.2	H1-2	OutCyte positiv (UPS)	2,39E- 09	1,30	0,38
P35980	60S ribosomal protein L18	Rpl18	OutCyte: intracellular	3,50E- 09	1,40	0,49
Q8CFG9	Complement C1r- B subcomponent	C1rb	SP+	1,89E- 08	1,61	0,68
P41731	CD 63 antigen	Cd63	SP-	5,35E- 08	0,81	-0,30
P97351	40S ribosomal protein S3a	Rps3a	SP-	1,36E- 07	1,25	0,32
Q9D832	DnaJ homolog subfamily B member 4	Dnajb4	SP-	1,55E- 07	0,79	-0,34
Q05CL8	La-related protein 7	Larp7	OutCyte: intracellular	2,30E- 07	1,41	0,50
Q80YX1- 2	lsoform 2 of Tenascin	Tnc	SP+	3,69E- 07	1,56	0,64
Q80YX1	Tenascin	Tnc	SP+	7,37E- 07	1,24	0,31
P19137	Laminin subunit alpha-1	Lama1	SP+	7,93E- 07	0,70	-0,51
Q9CPP0	Nucleoplasmin-3	Npm3	SP-	1,29E- 06	0,67	-0,59
Q99L47	Hsc70-interacting protein	St13	SP-	1,51E- 06	1,23	0,30
P43275	Histone H1.1	H1-1	OutCyte positiv (UPS)	1,99E- 06	1,33	0,41
Q6PFR5	Transformer-2 protein homolog alpha	Tra2a	OutCyte: intracellular	2,97E- 06	1,49	0,57
P47962	60S ribosomal protein L5	Rpl5	OutCyte: intracellular	3,08E- 06	1,23	0,30
P07356	Annexin A2	Anxa2	SP-	3,23E- 06	0,83	-0,27
Q8K3K8	Optineurin	Optn	OutCyte: intracellular	9,10E- 06	1,47	0,55
Q8VHN7	Adhesion G- protein coupled receptor V1	Adgrv1	SP+	9,72E- 06	0,77	-0,38

E9Q557	Desmoplakin	Dsp	OutCyte: intracellular	1,00E- 05	0,79	-0,34
P70349	Adenosine 5'- monophos- phoramidase HINT1	Hint1	SP-	1,04E- 05	0,84	-0,25
P11276	Fibronectin	Fn1	SP+	1,12E- 05	1,21	0,28
O35103	Osteomodulin	Omd	SP+	1,36E- 05	0,80	-0,32
P47911	60S ribosomal protein L6	Rpl6	OutCyte: intracellular	2,14E- 05	1,28	0,35
P14069	Protein S100-A6	S100a6	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	3,88E- 05	0,85	-0,24
Q61247	Alpha-2- antiplasmin	Serpinf2	SP+	3,90E- 05	1,72	0,78
P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha	Hsp90aa 1	OutCyte: intracellular	4,48E- 05	1,20	0,26
P14824	Annexin A6	Anxa6	OutCyte: intracellular	4,70E- 05	0,85	-0,23
P43276	Histone H1.5	H1-5	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	4,71E- 05	1,25	0,32
P43274	Histone H1.4	H1-4	OutCyte: intracellular	4,94E- 05	1,26	0,34
P35492	Histidine ammonia-lyase	Hal	OutCyte: intracellular	5,28E- 05	1,49	0,58
Q8BGZ7	Keratin, type II cytoskeletal 75	Krt75	OutCyte: intracellular	6,43E- 05	0,72	-0,47
P04095	Prolactin-2C2	Prl2c2	SP+	6,76E- 05	0,84	-0,25
P22437	Prostaglandin G/H synthase 1	Ptgs1	SP+	6,95E- 05	1,71	0,77
Q8BHN3	Neutral alpha- glucosidase AB	Ganab	SP+	7,36E- 05	0,68	-0,57
O35295	Transcriptional activator protein Pur-beta	Purb	OutCyte: intracellular	9,30E- 05	1,19	0,25
Q5FW85	Extracellular matrix protein 2	Ecm2	SP+	9,57E- 05	0,63	-0,67
Q9CZU6	Citrate synthase, mitochondrial	Cs	SP-	1,14E- 04	0,86	-0,22
P48036	Annexin A5	Anxa5	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	1,31E- 04	0,81	-0,30
P43277	Histone H1.3	H1-3	OutCyte: intracellular	1,35E- 04	1,31	0,39
Q9DB26	Phytanoyl-CoA dioxygenase domain-containing protein 1	Phyhd1	SP-	1,38E- 04	1,61	0,69
P62908	40S ribosomal protein S3	Rps3	OutCyte: intracellular	1,68E- 04	1,18	0,24
Q8BMB3	Eukaryotic translation initiation factor 4E type 2	Eif4e2	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	2,33E- 04	1,60	0,68
Q9D7A8	Armadillo repeat- containing protein 1	Armc1	SP-	2,61E- 04	0,65	-0,62
O08677- 2	lsoform LMW of Kininogen-1	Kng1	SP+	2,73E- 04	0,69	-0,53
Q8BMS2	Spondin-2	Spon2	SP+	2,92E- 04	0,84	-0,24

Q8VHK9	ATP-dependent DNA/RNA helicase DHX36	Dhx36	OutCyte: intracellular	3,33E- 04	0,65	-0,61
P26350	Prothymosin alpha	Ptma	OutCyte: intracellular	3,51E- 04	1,42	0,50
Q8VCN9	Tubulin-specific chaperone C	Tbcc	OutCyte: intracellular	3,94E- 04	0,62	-0,69
P28656	Nucleosome assembly protein 1-like 1	Nap1I1	OutCyte: intracellular	4,45E- 04	1,23	0,30
P11499	Heat shock protein HSP 90-beta	Hsp90ab 1	OutCyte: intracellular	4,74E- 04	1,17	0,23
Q8R0F3	Formylglycine- generating enzyme	Sumf1	SP+	6,83E- 04	0,82	-0,29
Q8R3C0	Mini-chromosome maintenance complex-binding protein	Mcmbp	OutCyte: intracellular	6,99E- 04	1,53	0,61
Q3TNH5	Cotranscriptional regulator FAM172A	Fam172a	OutCyte positiv (signal peptide)	7,76E- 04	0,78	-0,36
Q8BH97	Reticulocalbin-3	Rcn3	SP+	9,29E- 04	1,42	0,51
P08113	Endoplasmin	Hsp90b1	SP+	9,36E- 04	1,16	0,21
Q9D018	mRNA turnover protein 4 homolog	Mrto4	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	1,09E- 03	0,81	-0,30
O09165	Calsequestrin-1	Casq1	SP+	1,14E- 03	0,64	-0,64
Q920B9	FACT complex subunit SPT16	Supt16h	OutCyte: intracellular	1,16E- 03	1,17	0,22
O54901	OX-2 membrane glycoprotein	Cd200	SP+	1,23E- 03	0,87	-0,20
P43025	Tetranectin	Clec3b	SP+	1,31E- 03	0,85	-0,24
Q08189	Protein-glutamine gamma-glutamyl- transferase E	Tgm3	OutCyte: intracellular	1,37E- 03	0,67	-0,58
Q9WUD1	E3 ubiquitin- protein ligase CHIP	Stub1	SP-	1,40E- 03	1,21	0,28
P01942	Hemoglobin subunit alpha	Hba	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	1,57E- 03	1,39	0,48
P07214	SPARC	Sparc	SP+	1,67E- 03	0,89	-0,18
Q9JJN1	Fibroblast growth factor 21	Fgf21	SP+	1,70E- 03	0,86	-0,22
Q91WG4	Elongator complex protein 2	Elp2	OutCyte: intracellular	1,70E- 03	1,39	0,48
P11672	Neutrophil gelatinase- associated lipocalin	Lcn2	SP+	1,76E- 03	1,28	0,35
O55060	Thiopurine S- methyltrans- ferase	Tpmt	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	1,78E- 03	0,86	-0,22
Q8BX35	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 27	Eda2r	SP-	1,98E- 03	0,75	-0,42

Q9CY45	EEF1A lysine methyltrans- ferase 1	Eef1akmt 1	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	2,03E- 03	1,31	0,39
A2AMM0	Caveolae- associated protein 4	Cavin4	SP-	2,24E- 03	1,30	0,38

### Tabelle 20: Top 100 der signifikant regulierten Proteine im High insulin -

#### Sekretom

UniProt Acces- sion Number	Proteinname	Gen- symbol	Sekreto- rische Klassifi- kation	p-Wert	Abundanz- verhältnis absolut	Abundanz- verhältnis Log2(x)
P47757	F-actin-capping protein subunit beta	Capzb	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	1,00E- 17	0,59	-0,76
P97864	Caspase-7	Casp7	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	1,00E- 17	100,00	6,64
E9PVA8	elF-2-alpha kinase activator GCN1	Gcn1	OutCyte: intracellular	1,00E- 17	0,01	-6,64
P97402	N-acetyl- lactosaminide beta-1,6-N- acetylglucosami- nyl-transferase	Gcnt2	SP-	1,00E- 17	100,00	6,64
Q91VW5	Golgin subfamily A member 4	Golga4	OutCyte: intracellular	1,00E- 17	1,57	0,65
Q5DTN8	Janus kinase and microtubule- interacting protein 3	Jakmip3	OutCyte: intracellular	1,00E- 17	100,00	6,64
Q8BGZ7	Keratin, type II cytoskeletal 75	Krt75	OutCyte: intracellular	1,00E- 17	1,70	0,76
P11672	Neutrophil gelatinase- associated lipocalin	Lcn2	SP+	1,00E- 17	0,01	-6,64
Q8CD10	Calcium uptake protein 2, mitochondrial	Micu2	SP-	1,00E- 17	100,00	6,64
P70124	Serpin B5	Serpinb5	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	1,00E- 17	100,00	6,64
A1L0T3	Scavenger receptor cysteine- rich domain- containing group B protein	Ssc4d	OutCyte positiv (signal peptide)	1,00E- 17	2,69	1,43
Q148W8	Serine/threonine/ tyrosine- interacting-like protein 2	Styxl2	OutCyte: intracellular	1,00E- 17	100,00	6,64
Q9D5V6	Synapse- associated protein 1	Syap1	OutCyte: intracellular	1,00E- 17	0,01	-6,64
Q08189	Protein-glutamine gamma- glutamyltrans- ferase E	Tgm3	OutCyte: intracellular	1,00E- 17	100,00	6,64
Q99PM9	Uridine-cytidine kinase 2	Uck2	SP-	1,00E- 17	0,01	-6,64

Q64430	Copper- transporting ATPase 1	Atp7a	OutCyte: intracellular	2,22E- 15	0,68	-0,56
Q91XA2	Golgi membrane protein 1	Golm1	SP-	4,06E- 13	0,54	-0,90
P02802	Metallothionein-1	Mt1	SP-	4,04E- 12	0,62	-0,69
P10148	C-C motif chemokine 2	Ccl2	SP+	8,21E- 11	1,26	0,34
Q9D1H9	Microfibril- associated alvcoprotein 4	Mfap4	SP+	1,52E- 10	2,09	1,07
O70326	Gremlin-1	Grem1	SP+	6,11E- 10	0,77	-0,37
P01027	Complement C3	C3	SP+	7,83E- 10	1,25	0,32
P63254	Cysteine-rich protein 1	Crip1	OutCyte: intracellular	1,06E- 09	0,81	-0,31
P97447	Four and a half LIM domains protein 1	Fhl1	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	2,85E- 09	0,81	-0,31
P29533- 2	Isoform 2 of Vascular cell adhesion protein 1	Vcam1	SP+	2,05E- 08	0,75	-0,42
Q8CFG8	Complement C1s- 1 subcomponent	C1s2	SP+	2,60E- 08	1,27	0,35
Q6P6M7	O-phosphoseryl- tRNA(Sec) selenium transferase	Sepsecs	OutCyte: intracellular	3,27E- 08	1,41	0,49
Q9CYI0	Protein Njmu-R1		OutCyte: intracellular	1,03E- 07	1,26	0,33
Q9QXX0	Protein jagged-1	Jag1	SP+	1,86E- 07	0,55	-0,87
P04186	Complement factor B	Cfb	SP+	2,27E- 07	1,25	0,33
P55002	Microfibrillar- associated protein 2	Mfap2	SP+	3,04E- 07	0,73	-0,46
Q9R0R1	Melanotransferrin	Meltf	SP+	5,33E- 07	1,29	0,36
P97315	Cysteine and glycine-rich protein 1	Csrp1	OutCyte: intracellular	6,06E-	0,84	-0,26
Q9WVM6				07		
	Tolloid-like protein 2	TII2	SP+	6,90E- 07	1,36	0,45
Q9DCT8	Tolloid-like protein 2 Cysteine-rich protein 2	TII2 Crip2	SP+	6,90E- 07 1,27E- 06	1,36 0,84	0,45 -0,25
Q9DCT8 Q62371	Tolloid-like protein 2 Cysteine-rich protein 2 Discoidin domain- containing receptor 2	TII2 Crip2 Ddr2	SP+ SP- SP+	6,90E- 07 1,27E- 06 2,52E- 06	1,36 0,84 0,63	0,45 -0,25 -0,68
Q9DCT8 Q62371 Q9EPL8	Tolloid-like protein 2 Cysteine-rich protein 2 Discoidin domain- containing receptor 2 Importin-7	TII2 Crip2 Ddr2 Ipo7	SP+ SP- SP+ OutCyte positiv (UPS)	6,90E- 07 1,27E- 06 2,52E- 06 4,22E- 06	1,36 0,84 0,63 0,83	0,45 -0,25 -0,68 -0,26
Q9DCT8 Q62371 Q9EPL8 P00329	Tolloid-like protein 2 Cysteine-rich protein 2 Discoidin domain- containing receptor 2 Importin-7 Alcohol dehydrogenase 1	Tll2 Crip2 Ddr2 Ipo7 Adh1	SP+ SP- SP+ OutCyte positiv (UPS) SP-	6,90E- 07 1,27E- 06 2,52E- 06 4,22E- 06 6,19E- 06	1,36 0,84 0,63 0,83 0,83	0,45 -0,25 -0,68 -0,26 -0,28
Q9DCT8 Q62371 Q9EPL8 P00329 Q8K212	Tolloid-like protein 2 Cysteine-rich protein 2 Discoidin domain- containing receptor 2 Importin-7 Alcohol dehydrogenase 1 Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1	TII2 Crip2 Ddr2 Ipo7 Adh1 Pacs1	SP+ SP- SP+ OutCyte positiv (UPS) SP- OutCyte: intracellular	6,90E- 07 1,27E- 06 2,52E- 06 4,22E- 06 6,19E- 06 1,22E- 05	1,36 0,84 0,63 0,83 0,83 1,31	0,45 -0,25 -0,68 -0,26 -0,28 0,39
Q9DCT8 Q62371 Q9EPL8 P00329 Q8K212 Q91Z83	Tolloid-like protein 2 Cysteine-rich protein 2 Discoidin domain- containing receptor 2 Importin-7 Alcohol dehydrogenase 1 Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1 Myosin-7	TII2 Crip2 Ddr2 Ipo7 Adh1 Pacs1 Myh7	SP+ SP- SP+ OutCyte positiv (UPS) SP- OutCyte: intracellular OutCyte: intracellular	6,90E- 07 1,27E- 06 2,52E- 06 4,22E- 06 6,19E- 06 1,22E- 05 1,42E- 05	1,36 0,84 0,63 0,83 0,83 1,31 1,19	0,45 -0,25 -0,68 -0,26 -0,28 0,39 0,25
Q9DCT8 Q62371 Q9EPL8 P00329 Q8K212 Q91Z83 P56873	Tolloid-like protein 2 Cysteine-rich protein 2 Discoidin domain- containing receptor 2 Importin-7 Alcohol dehydrogenase 1 Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1 Myosin-7 Protein ZNRD2	TII2 Crip2 Ddr2 Ipo7 Adh1 Pacs1 Myh7 Znrd2	SP+ SP- SP+ OutCyte positiv (UPS) SP- OutCyte: intracellular OutCyte: intracellular SP-	6,90E- 07 1,27E- 06 2,52E- 06 4,22E- 06 6,19E- 06 1,22E- 05 1,42E- 05 3,57E- 05	1,36 0,84 0,63 0,83 0,83 1,31 1,19 0,80	0,45 -0,25 -0,68 -0,26 -0,28 0,39 0,25 -0,32
P97461	40S ribosomal protein S5	Rps5	SP-	4,67E- 05	0,78	-0,36
--------------	--	--------------	---------------------------------	--------------	------	-------
Q62084	Protein phosphatase 1 regulatory subunit	Ppp1r 14b	SP-	4,95E- 05	0,80	-0,33
P32261	Antithrombin-III	Serpinc1	SP+	5,72E-	1,17	0,22
Q9CWY8	Ribonuclease H2 subunit A	Rnaseh2 a	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	9,41E- 05	1,19	0,25
Q9QZ23	NFU1 iron-sulfur cluster scaffold homolog, mitochondrial	Nfu1	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	1,10E- 04	1,18	0,24
Q9D1J3	SAP domain- containing ribonucleoprotein	Samp	OutCyte: intracellular	1,78E- 04	1,18	0,24
P41731	CD63 antigen	Cd63	SP-	2,22E- 04	1,15	0,20
Q8VDV0	Integrin beta-like protein 1	ltgbl1	SP+	2,40E- 04	0,67	-0,58
O08746- 2	lsoform 2 of Matrilin-2	Matn2	SP+	2,40E- 04	1,19	0,24
P02468	Laminin subunit gamma-1	Lamc1	SP+	4,26E- 04	1,14	0,19
Q61554	Fibrillin-1	Fbn1	SP+	6,51E- 04	0,87	-0,19
Q9D1D4	Transmembrane emp24 domain- containing protein 10	Tmed10	SP+	7,89E- 04	1,15	0,20
Q9JJ00	Phospholipid scramblase 1	Plscr1	SP-	8,23E- 04	1,31	0,39
O54692	Centromere/kine- tochore protein zw10 homolog	Zw10	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	1,10E- 03	1,25	0,32
Q9DB43	Zinc finger protein-like 1	Zfpl1	OutCyte: intracellular	1,43E- 03	0,80	-0,32
P70697	Uroporphyrinogen decarboxylase	Urod	OutCyte: intracellular	1,71E- 03	0,86	-0,22
Q8C7U7	Polypeptide N- acetylgalactosa- minyltransferase 6	Galnt6	OutCyte: trans- membrane	2,11E- 03	0,76	-0,39
O70578	Voltage- dependent calcium channel gamma-1 subunit	Cacng1	OutCyte: trans- membrane	2,32E- 03	1,41	0,49
P49182	Heparin cofactor 2	Serpind1	SP+	2,35E- 03	1,14	0,19
P67984	60S ribosomal protein L22	Rpl22	SP-	2,38E- 03	0,88	-0,18
O89086	RNA-binding protein 3	Rbm3	SP-	2,50E- 03	0,90	-0,15
Q9D358	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	Acp1	SP-	2,58E- 03	0,88	-0,18
Q8BT42	Small integral membrane protein 5	Smim5	OutCyte: trans- membrane	2,67E- 03	0,76	-0,40

A2AAY5	SH3 and PX domain-containing protein 2B	Sh3pxd 2b	OutCyte: intracellular	2,87E- 03	1,39	0,48
Q921I9	Exosome complex component RRP41	Exosc4	OutCyte: intracellular	2,87E- 03	1,21	0,27
Q8VDC1	FYVE and coiled- coil domain- containing protein 1	Fyco1	OutCyte: intracellular	2,92E- 03	0,89	-0,17
Q91VH6	Protein MEMO1	Memo1	SP-	3,23E- 03	0,88	-0,18
P35821	Tyrosine-protein phosphatase non- receptor type 1	Ptpn1	OutCyte: intracellular	3,31E- 03	1,38	0,46
P09411	Phosphoglycerate kinase 1	Pgk1	OutCyte: intracellular	3,77E- 03	0,89	-0,17
Q9D0F3	Protein ERGIC-53	Lman1	SP+	3,79E- 03	1,12	0,16
Q9CQ86	Migration and invasion enhancer 1	Mien1	SP-	4,68E- 03	1,26	0,33
Q91VI7	Ribonuclease inhibitor	Rnh1	OutCyte: intracellular	5,46E- 03	0,90	-0,16
P43276	Histone H1.5	H1-5	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	5,50E- 03	0,90	-0,15
P02798	Metallothionein-2	Mt2	SP-	6,07E- 03	0,85	-0,23
P19157	Glutathione S- transferase P 1	Gstp1	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	6,23E- 03	0,90	-0,16
Q9ES97- 3	lsoform 3 of Reticulon-3	Rtn3	SP-	6,58E- 03	0,79	-0,34
P15864	Histone H1.2	H1-2	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	7,18E- 03	0,90	-0,15
Q8VHP6	Cadherin-related family member 1	Cdhr1	SP+	7,27E- 03	1,12	0,17
Q9D115	Zinc finger protein 706	Znf706	SP-	7,48E- 03	0,84	-0,26
Q9CQI3	Glia maturation factor beta	Gmfb	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	7,56E- 03	0,91	-0,14
Q8VI56	Low-density lipoprotein receptor-related protein 4	Lrp4	SP+	8,05E- 03	1,11	0,15
Q80WB5	Protein N-terminal glutamine amidohydrolase	Ntaq1	SP-	8,21E- 03	1,20	0,26
Q62433	Protein NDRG1	Ndrg1	SP-	8,35E- 03	0,90	-0,15
P56213	FAD-linked sulfhydryl oxidase ALR	Gfer	SP-	8,63E- 03	0,82	-0,29
Q04519	Sphingomyelin phosphodi- esterase	Smpd1	SP-	8,77E- 03	1,12	0,17
Q9EQH2	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	Erap1	SP+	9,37E- 03	1,10	0,13
Q9DCK3	Tetraspanin-4	Tspan4	OutCyte: trans- membrane	9,54E- 03	1,12	0,17
Q03526	Tyrosine-protein kinase ITK/TSK	ltk	OutCyte: intracellular	9,88E- 03	1,18	0,24

Q99JW4	LIM and senescent cell antigen-like- containing domain protein 1	Lims1	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	1,03E- 02	0,86	-0,21
Q60994	Adiponectin	Adipoq	SP+	1,06E- 02	1,11	0,15
P70274	Selenoprotein P	Selenop	SP+	1,06E- 02	1,13	0,17
Q61475	Complement decay- accelerating factor, GPI- anchored	Cd55	SP+	1,11E- 02	1,15	0,20
O54879	High mobility group protein B3	Hmgb3	OutCyte: intracellular	1,16E- 02	0,90	-0,16
Q61838	Pregnancy zone protein	Pzp	SP+	1,21E- 02	1,12	0,16
Q91Z53	Glyoxylate reductase/ hydroxypyruvate reductase	Grhpr	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	1,21E- 02	0,90	-0,15
P40240	CD9 antigen	Cd9	OutCyte: trans- membrane	1,25E- 02	0,91	-0,13
O89112	Glutathione S- transferase LANCL1	Lancl1	<i>OutCyte</i> positiv (UPS)	1,25E- 02	0,89	-0,17
P61164	Alpha-centractin	Actr1a	OutCyte: intracellular	1,26E- 02	0,92	-0,12

## DANKSAGUNG

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Hadi Al-Hasani für seine freundliche Betreuung und die Unterstützung im Rahmen dieser Doktorarbeit sowie für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu forschen.

Frau Univ.-Prof. Dr. Regina Ensenauer danke ich für die Übernahme der Zweitbetreuung.

Ich danke ebenfalls Frau Dr. Alexandra Chadt für ihre Hilfe und Koordination über die gesamte Laborphase.

Ein großes Dankeschön geht auch an Frau Dr. Sonja Hartwig und Herrn Dr. Stefan Lehr für ihre Hilfe rund um das Thema *Proteomics* sowie für die freundliche Zusammenarbeit und Durchführung der Massenspektrometrie. Frau Martina Schiller möchte ich für die Probenaufbereitung danken.

Insbesondere Frau Pia Förster danke ich aus tiefstem Herzen für ihre Hilfe, Freundschaft und unermüdliche Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit!

Auch möchte ich mich bei Frau Dagmar Grittner und Frau Carina Heitmann für ihre freundliche Einarbeitung in der Zellkultur sowie im *Western Blot* Labor bedanken.

Insgesamt möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen für die besondere Zeit im Institut bedanken.

Bei meinem Freund Jona Kasfeld und meinen Eltern bedanke ich mich für ihre Unterstützung, Liebe und emotionalen *Support*.