

Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie
des Deutschen Diabetes-Zentrums (DDZ),
Leibniz-Zentrum für Diabetes-Forschung
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor des Instituts: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hadi Al-Hasani

**Sekretomanalyse muriner Skelettmuskelzellen
nach 6- und 24-stündiger elektrischer Pulsstimulation**

Dissertation

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

vorgelegt von

Carolin Laura Brügge

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hadi Al-Hasani

Zweitgutachter: PD Dr. med. Maximilian Spieker

Für meine Eltern
und meine Großeltern

Zusammenfassung

Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) ist eine weit verbreitete Stoffwechselerkrankung, die zu schweren Folgekomplikationen führen kann. Übergewicht und körperliche Inaktivität zählen zu den Hauptrisiken für die Entstehung eines T2DM. Durch regelmäßige sportliche Betätigung lässt sich das Erkrankungsrisiko minimieren und der Krankheitsverlauf positiv beeinflussen. Die förderlichen Einflüsse von körperlicher Aktivität auf den Stoffwechsel sind seit langem bekannt, jedoch sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch wenig verstanden. Von besonderem Interesse sind hierbei zirkulierende Biomoleküle, die sogenannten Myokine, welche von den Skelettmuskeln sekretiert werden. Ihre Sekretion wird unter anderem durch Muskelkontraktion beeinflusst.

Das Ziel dieser Arbeit war die globale Identifizierung der sekretierten Myokine kultivierter, muriner Skelettmuskelzellen nach Behandlung mit elektrischer Pulsstimulation (EPS). Dies sollte sowohl einer allgemeinen Erweiterung der Datenbasis bekannter Myokine als auch der Ermittlung potenziell neuer Myokine dienen, die kontraktionsabhängig reguliert werden. Die EPS stellt ein etabliertes Modell für die Erzeugung von Kontraktionen in kultivierten Skelettmuskelzellen dar. In der Literatur sind jedoch verschiedene, zum Teil in mehreren Parametern voneinander abweichende Protokolle zu finden, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert. Um den spezifischen Einfluss der Stimulationszeit in diesem Kontext besser abschätzen zu können, wurde in dieser Arbeit die Auswirkung von zwei unterschiedlichen Stimulationsdauern bei ansonsten gleichem EPS- und Versuchsprotokoll auf das globale, kontraktionsabhängige Sekretionsprofil der Skelettmuskelzellen untersucht.

Für die Durchführung wurden Myoblasten der kommerziellen C2C12-Zelllinie über mehrere Tage zu kontraktilen Myotuben differenziert und anschließend mit EPS behandelt. Es wurde ein EPS-Protokoll von 11,5 V, 2 ms und 1 Hz für die Dauer von 6 versus 24 Stunden gewählt. Durch quantitative Echtzeit-PCR-Analysen bekannter Marker wurde die Differenzierung und Kontraktion der Zellen evaluiert. Die explorative Analyse der Zellüberstände hinsichtlich der sekretierten Proteine erfolgte mittels Massenspektrometrie.

In den Überständen der C2C12-Zellen wurden nach Auswertung 2917 Proteine als mögliche Myokine identifiziert. Mithilfe bioinformatischer Tools wurden davon 1159 Proteine als potenziell sekretorisch klassifiziert. 356 der identifizierten Proteine waren kontraktionsabhängig in ihrer Abundanz verändert (Signifikanzniveau $p < 0,01$), darunter befanden sich sowohl herauf- als auch herunterregulierte Proteine. Die Schnittmenge der kontraktionsabhängig sekretierten Myokine nach 6 und 24 Stunden betrug lediglich 27, was auf einen deutlichen Einfluss der Stimulationsdauer auf das C2C12-Sekretom hindeutet. Osteopontin (OPN) war als einziges klassisch sekretorisches Protein sowohl nach 6 als auch nach 24 Stunden EPS heraufreguliert und wurde daher für eine vertiefte Recherche und Diskussion ausgewählt. OPN wird von verschiedenen Zelltypen exprimiert und ein Zusammenhang mit dem Glukosemetabolismus sowie eine Sekretion durch Skelettmuskelzellen sind in der Literatur beschrieben. In dieser Arbeit konnte zudem eine kontraktionsabhängige Regulation der OPN-Sekretion durch Skelettmuskelzellen gezeigt werden. Die bekannten Funktionen von OPN sind vielfältig und variieren in verschiedenen Geweben. Ein Ansatzpunkt für weitere Studien könnte somit die Ergründung des spezifischen Einflusses von kontraktionsabhängig sekretiertem OPN auf den Glukosemetabolismus sein.

Abstract

Diabetes mellitus type 2 (T2DM) is a widespread metabolic disease that can lead to severe long-term complications. An increased body weight and physical inactivity are counted among the main risks for the development of T2DM. Regular physical exercise can minimize the risk and positively influence the course of the disease. The positive effects of physical activity on metabolism have been well-known for a long time, but the underlying molecular mechanisms still are deficiently understood. Circulating biomolecules that are secreted by skeletal muscle cells are of special interest in this context, the so-called myokines. Their secretion is influenced by muscle contraction, among others.

The aim of this study was the global identification of the secreted myokines of cultivated, murine skeletal muscle cells after treatment with electrical pulse stimulation (EPS). This was to generally extend the database of known myokines as well as to identify potential new myokines that are regulated by contraction. EPS represents an established model to generate contractions in cultivated skeletal muscle cells. Nevertheless, a variety of protocols can be found in the literature, which partly differ in several parameters and thereby impede the comparability of the results. To better assess the specific influence of the stimulation time in this context, this study explored the effect of two different stimulation durations on the global, contraction-dependent secretion profile of skeletal muscle cells, while the other EPS parameters and the general experimental setup remained consistent.

For the realization, myoblasts of the commercial C2C12 cell line were differentiated to contractile myotubes over several days and afterwards treated with EPS. An EPS protocol of 11.5 V, 2 ms and 1 Hz for the duration of 6 versus 24 hours was selected. The differentiation and contraction of the cells were evaluated via quantitative real-time PCR analyses of common markers. The subsequent untargeted analysis of the cell supernatants with regards to the secreted proteins was carried out using mass spectrometry.

After analysis of the resulting data, 2917 proteins were identified as possible myokines in the supernatants of the C2C12 cells. Using bioinformatic tools, 1159 of these proteins were classified as potentially secretory. 356 of the identified proteins were found to be altered in their abundance by contraction (level of significance $p < 0.01$). This included up- and downregulated proteins. The overlap of myokines regulated by contraction after 6 and 24 hours was only 27, which indicates a distinct influence of the two different stimulation times on the C2C12 secretome. In this study, Osteopontin (OPN) was the only classically secreted protein to be found upregulated after both 6 and 24 hours of stimulation and was therefore chosen for an in-depth investigation and discussion. OPN is expressed by different cell types and a linkage with glucose metabolism as well as a secretion by skeletal muscle cells has been described in the literature. This study could furthermore demonstrate a contraction-dependent secretion of OPN by skeletal muscle cells. The known functions of OPN are multifaceted and can vary in different tissues. An approach for further studies could therefore be the exploration of the specific impact of a contraction-dependent secretion of OPN on glucose metabolism.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AGC	<i>automatic gain control</i>
Act B	Beta-Aktin
AICAR	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleosid
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bR	biologisches Replikat
BSA	bovines Serumalbumin
cdNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> / komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
Ct	<i>cycle threshold</i>
Ctrl	Kontrolle
CVD	<i>cardiovascular disease</i> / kardiovaskuläre Erkrankung
Da	Dalton
DDA	<i>data dependent acquisition</i>
DDZ	Deutsches Diabetes-Zentrum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTPs	<i>deoxynucleoside triphosphate set</i>
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EPS	elektrische Pulsstimulation
ER	endoplasmatisches Retikulum
EV	extrazelluläres Vesikel
FBS	<i>fetal bovine serum</i> / fetales Kälberserum
FDR	<i>false discovery rate</i>
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung (bei Angaben zu Zentrifugen)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GLUT4	Glukosetransporter Typ 4
h	Stunde
HbA1c	Hämoglobin A1c
HCD	<i>higher energy collisional dissociation</i>
HCL	<i>hydrochloric acid</i> / Salzsäure
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> / Hochleistungsflüssigchromatographie
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
Hz	Hertz
ICH	<i>intracerebral hemorrhage</i> / intrazerebrale Blutung
IL-6	Interleukin-6
kD	Kilodalton
ksM	kontraktionsabhängig sekretiertes Myokin
l	Liter
LC	<i>liquid chromatography</i> / Flüssigchromatographie
LDH	Laktatdehydrogenase
M	molare Masse

mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRF	<i>myogenic regulatory factor</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> / Boten-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
ms	Millisekunde
MW	Mittelwert
Myf5	<i>Myogenic factor 5</i>
Myh2	<i>Myosin heavy chain 2</i>
MyoD	<i>Myoblast determination protein 1</i>
MyoG	Myogenin
n	Größe der Stichprobe
ng	Nanogramm
NK	nicht klassifizierbar
nl	Nanoliter
NP	klassifiziert als potenziell nicht-sekretorisch (Protein)
OPN	Osteopontin
p/p-Wert	Signifikanzniveau
PCA	<i>principal component analysis</i> / Hauptkomponentenanalyse
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> / Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PD	Proteome Discoverer (Software)
ppm	<i>parts per million</i>
PSM	<i>peptide spectrum match</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real-time PCR</i> / quantitative Echtzeit-PCR
RNA	<i>ribonucleic acid</i> / Ribonukleinsäure
RP-UPLC	<i>reversed-phase ultra-performance liquid chromatography</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> / Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	<i>sodium lauryl sulfate</i> / Natriumlaurylsulfat
SK	sekretorische Klassifikation
SP-	klassifiziert als potenziell unkonventionell sekretorisch (Protein)
SP+	klassifiziert als potenziell klassisch sekretorisch (Protein)
T	Tag
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
Tbl.	Tabelle
Tbp	TATA-Bindeprotein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt
WHO	World Health Organisation
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Diabetes mellitus Typ 2 und körperliche Aktivität	1
1.1.1	Diabetes mellitus Typ 2	1
1.1.2	Positive Effekte von körperlicher Aktivität und Folgen von Inaktivität	2
1.1.3	Wirkmechanismen von körperlicher Aktivität	3
1.1.4	Charakteristika der Skelettmuskeln und Ablauf der Kontraktion	4
1.1.5	Myokine	5
1.2	EPS von C2C12-Zellen als <i>in-vitro</i>-Modell für körperliche Aktivität	6
1.2.1	Elektrische Pulsstimulation von C2C12-Zellen	6
1.2.2	EPS-Parameter und ihr Bezug zu verschiedenen Trainingsmodalitäten	7
1.3	Sekretomanalyse	9
1.3.1	Beschreibung und Einordnung des Sekretoms	9
1.3.2	Arten der Sekretion	10
1.4	Ziele der Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Zelllinie	12
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	12
2.1.3	Puffer und Medien	15
2.1.4	Reaktions-Kits	17
2.1.5	Primer	17
2.1.6	Verbrauchsmaterialien	18
2.1.7	Geräte und Hilfsmittel	20
2.1.8	Software	22
2.2	Methoden	24
2.2.1	Zellkultur	24
2.2.1.1	Auftauen der Zellen aus der Kryokonservierung	24
2.2.1.2	Passage und Kultivierung	24
2.2.1.3	Differenzierung zu Myotuben	25
2.2.1.4	Elektrische Pulsstimulation und Sammeln der Zellüberstände	26
2.2.1.5	Stoppen und Einfrieren der Zellen für die RNA-Extraktion	27
2.2.2	Quantitative Echtzeit-PCR	27
2.2.2.1	RNA-Extraktion	27
2.2.2.2	RNA-Aufreinigung	28

2.2.2.3	cDNA-Synthese	29
2.2.2.4	qRT-PCR	29
2.2.2.5	Auswertung der qRT-PCR	30
2.2.3	Probenaufbereitung für die Massenspektrometrie	31
2.2.3.1	Ultrazentrifugation	31
2.2.3.2	Aufkonzentrierung mittels Zentrifugationsfilter	31
2.2.3.3	Gelelektrophorese und Färbung des Übersichtsgels	32
2.2.3.4	Gelelektrophorese und Färbung der Gele für den In-Gel-Verdau	33
2.2.3.5	In-Gel-Verdau	35
2.2.3.6	Probenauftrag in die Autosampler-Fläschchen	37
2.2.4	Massenspektrometrie und Aufbereitung der Daten	37
2.2.4.1	Messung im Massenspektrometer	37
2.2.4.2	Aufbereitung der Rohdaten	38
2.2.4.3	Auswertung der MS-Daten	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Quantitative Echtzeit-PCR von Differenzierungsmarkern und <i>IL-6</i>	41
3.1.1	Vorstudie zur Expression von Differenzierungsmarkern in C2C12-Zellen	41
3.1.2	Expression der Differenzierungsmarker in den Zellen der EPS-Versuche	43
3.1.3	Expression von <i>IL-6</i> in den Zellen der EPS-Versuche	45
3.2	Sekretomanalyse aus den Zellüberständen	46
3.2.1	1D-Gel zur visuellen Qualitätskontrolle	46
3.2.2	Identifizierte Proteine nach Basisfilterung	47
3.2.3	Marker der Zellvitalität in den Sekretomen	49
3.2.4	Klassifikation sekretierter Proteine mithilfe bioinformatischer Algorithmen	49
3.2.5	Kontraktionsabhängig sekretierte Proteine	50
3.2.6	Schnittmengen der kontraktionsabhängig sekretierten Proteine nach 6 und 24 Stunden	52
4	Diskussion	56
4.1	Diskussion der Methoden	56
4.1.1	Wahl einer <i>in-vitro</i> -Analyse zur Untersuchung des kontraktionsabhängigen Sekretoms	56
4.1.2	Wahl des EPS-Systems als <i>in-vitro</i> -Modell für körperliche Aktivität	57
4.1.3	Wahl der C2C12-Zelllinie	58
4.1.4	Wahl des Stimulationsprotokolls und der Stimulationsdauern	59
4.1.5	Wahl einer ungerichteten MS-Analyse	61
4.2	Diskussion der Ergebnisse	62
4.2.1	Evaluation des Differenzierungsstatus	62
4.2.2	Evaluation der Auslösung von Kontraktionen durch die EPS	64
4.2.3	Gesamtanzahl der gefundenen Proteine im Zellüberstand	65

4.2.4	Evaluation der Zellvitalität nach 6- und 24-stündiger Behandlung	66
4.2.5	Evaluation möglicher Kontaminationen	68
4.2.6	Klassifikation sekretierter Proteine durch bioinformatische Algorithmen	69
4.2.7	Kontraktionsabhängig sekretierte Proteine	70
4.2.7.1	Anzahl und Art der gefundenen kontraktionsabhängig sekretierten Proteine	70
4.2.7.2	Vergleich kontraktionsabhängig sekretierter Proteine nach 6- und 24-stündiger EPS	71
4.2.7.3	Osteopontin	73
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	76
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	78
6	Anhang	90
6.1	Auflistung der durch die EPS regulierten Proteine in den Überständen	90
6.2	Tabellenverzeichnis	103
6.3	Abbildungsverzeichnis	104

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus Typ 2 und körperliche Aktivität

1.1.1 Diabetes mellitus Typ 2

Der Diabetes mellitus fasst eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen zusammen, bei denen durch eine Störung der Insulinsekretion, der Insulinwirkung oder einer Kombination aus beidem chronisch erhöhte Blutzuckerwerte entstehen (Petersmann et al., 2019). Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) macht mit 90-95 % der Diabetes-Fälle die häufigste Form aus. Er ist besonders mit erhöhtem Alter, körperlicher Inaktivität und Übergewicht assoziiert, aber auch genetische Faktoren spielen bei der Entstehung eine bedeutsame Rolle (American Diabetes Association, 2020). Die Anzahl von T2DM-Patienten ist bereits heute hoch und wird prognostisch in den nächsten Jahren weiter steigen: Für Deutschland schätzt eine Studie den Anstieg der Prävalenz von T2DM von 6,9 Millionen im Jahr 2015 unter Annahme verschiedener Entwicklungsszenarien auf bis zu 12,3 Millionen im Jahr 2040 (Tönnies et al., 2019). Ruegsegger und Booth (2018) bezeichnen den T2DM bereits als Pandemie.

Den T2DM kennzeichnet sowohl eine Insulinresistenz peripherer Gewebe als auch eine fortschreitende, inadäquate Insulinproduktion durch die β -Zellen des Pankreas (American Diabetes Association, 2020). Die daraus resultierende andauernde Hyperglykämie kann zu schwerwiegenden Folgeerkrankungen und Funktionsstörungen in multiplen Organsystemen führen. Dazu gehören etwa Retinopathien, Nephropathien, Neuropathien, und kardiovaskuläre Komplikationen (Pantalone et al., 2015), sowie eine erhöhte Infektanfälligkeit (Berbudi et al., 2020). Ebenso kann ein Bezug von einer T2DM-Erkrankung zu einer erhöhten Prävalenz von Depressionen hergestellt werden (Farooqi et al., 2022). Im Durchschnitt ist die Lebensqualität bei Patienten mit T2DM in diversen Bereichen vermindert (Zurita-Cruz et al., 2018).

Für das Gesundheitswesen stellt der T2DM zudem eine wirtschaftliche Belastung dar: Soares Andrade et al. (2023) analysierten in einem systematischen Review verfügbare Studien zur Krankheitslast und der resultierenden wirtschaftlichen Belastung durch T2DM aus 15 EU-Staaten. Hier zeigte sich insgesamt der Trend, dass sowohl Inzidenz, Prävalenz und Mortalität des T2DM, als auch die Kosten durch die Erkrankung über die letzten Jahrzehnte angestiegen sind. Auf Deutschland bezogen zeigten Stegbauer et al. (2020) in einer Übersichtsarbeit, dass durch T2DM für das Gesundheitswesen direkte Kosten in Höhe von etwa 3000 € bis über

30.000 € pro Patient und Jahr entstanden, wobei Hospitalisierungen und Folgekomplikationen zu den größten Kostentreibern gehörten.

Therapeutisch wichtige Ziele in der Behandlung des T2DM sind die Kontrolle des Blutglukosespiegels, des Lipidprofils, des Blutdrucks und anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren, sowie letztendlich das Vermeiden von Folgekomplikationen (Inzucchi et al., 2015; Leon und Maddox, 2015).

1.1.2 Positive Effekte von körperlicher Aktivität und Folgen von Inaktivität

Körperliches Training fördert nicht nur das allgemeine Wohlbefinden, sondern hat auch in Bezug auf chronische Erkrankungen wie T2DM multiple gesundheitsfördernde Effekte (Amanat et al., 2020; Ruegsegger und Booth, 2018). Dies lässt sich sowohl präventiv als auch kurativ beobachten: Eine Studie zur Prävention von T2DM in einer Hochrisikopopulation konnte zeigen, dass eine intensive Lebensstilintervention, welche unter anderem mindestens 150 Minuten moderates körperliches Training und eine gesunde Ernährung umfasste, in der Zeit des Follow-ups von durchschnittlich 2,8 Jahren die T2DM-Inzidenzrate im Vergleich zu einer Placebo-Gruppe signifikant stärker senken konnte, als die Verabreichung von Metformin (Knowler et al., 2002). Wenn eine T2DM-Erkrankung bereits vorliegt, können sportliche Trainingsprogramme beispielsweise die Blutglukosekontrolle (Chudyk und Petrella, 2011; Sampath Kumar et al., 2019), kardiovaskuläre Risikofaktoren wie das Lipidprofil, den systolischen Blutdruck und den Hüftumfang (Chudyk und Petrella, 2011) und die Lebensqualität (Sabag et al., 2023) verbessern. Eine Meta-Analyse von Zhang et al. (2023) zeigte, dass allein durch Interventionen mit verbesserter Ernährung und/oder körperlicher Aktivität neben einem Gewichtsverlust und einer gesteigerten Lebensqualität auch eine gesteigerte Remissionsrate bei T2DM-Patienten erreicht werden kann. Das Wissen um die gesundheitsförderlichen Einflüsse von körperlichem Training bei T2DM spiegelt sich auch in Therapieempfehlungen wider: Wenn medikamentöse Interventionen eingesetzt werden um den T2DM zu behandeln, so sollten diese nicht als Ersatz sondern wenn möglich stets unterstützend zu einer Lebensstiländerung mit besserer Ernährung und mehr körperlicher Aktivität angewendet werden (Colberg et al., 2010). Dabei sind nicht nur geplante Trainingseinheiten, sondern jegliche Art von Bewegung und Reduzierung der sitzenden Lebensweise für die Gesundheit der Betroffenen förderlich (Kanaley et al., 2022).

Studien basierend auf strikter Bettruhe weisen umgekehrt auf einen direkten Zusammenhang zwischen körperlicher Inaktivität und der Entwicklung eines gestörten Fettstoffwechsels und einer Insulinresistenz hin (Bergouignan et al., 2009; Hamburg et al., 2007).

Die World Health Organisation (WHO) empfiehlt der allgemeinen erwachsenen Bevölkerung ein Äquivalent von mindestens 150 Minuten moderater oder 75 Minuten intensiver körperlicher Aktivität pro Woche (Bull et al., 2020). Ungeachtet der vielen positiven Effekte blieb rund ein Viertel der globalen erwachsenen Bevölkerung im Jahr 2016 hinter den WHO-Empfehlungen zurück, wobei westliche Staaten mit hohem Einkommen zu den Ländern mit den höchsten Inaktivitätsraten gehörten (Guthold et al., 2018). Lee et al. (2012) ermittelten, dass 7 % der T2DM-Fälle verhindert werden könnten, wenn alle zuvor inaktiven Personen sich gemäß den WHO-Empfehlungen sportlich betätigen würden.

1.1.3 Wirkmechanismen von körperlicher Aktivität

Die hinter den gesundheitsfördernden Effekten von physischer Betätigung stehenden Wirkmechanismen sind vielfältig und komplex (Hawley et al., 2014) und auf molekularer Ebene in vieler Hinsicht noch nicht verstanden (Delezie und Handschin, 2018; Lautaoja et al., 2023). Vor allem aerobes Training kann klassische Risikofaktoren metabolischer und kardiovaskulärer Erkrankungen wie einen Bluthochdruck, eine Hyperglykämie, eine Hyperlipidämie oder einen zu großen Hüftumfang mindern (Chudyk und Petrella, 2011; Wewege et al., 2018). Auch die kardiorespiratorische Fitness verbessert sich durch Ausdauertraining (Rueggsegger und Booth, 2018). Nach Aktivität bzw. Muskelkontraktion kann darüber hinaus eine insulinunabhängige Glukoseaufnahme in die Muskelzellen stimuliert werden (Kjøbsted et al., 2019). In einer prospektiven Studie mit über 27 000 gesunden Frauen ermittelten Mora et. al (2007) jedoch, dass nur 59 % des beobachteten protektiven Effekts von körperlicher Betätigung auf kardiovaskuläre Erkrankungen durch die Reduktion der hier untersuchten, klassischen Risikofaktoren wie Entzündungsmarker, Blutdruck, Blutfette und Blutglukosestörungen zu erklären war.

Ansätze zur Erklärung solcher Beobachtungen bieten die Erkenntnisse, dass viele Gewebe auf physische Aktivität mit einer speziellen Sekretion von Biomolekülen reagieren, zum Beispiel der Muskel, die Leber oder das Fettgewebe. Diese Biomoleküle interagieren im Organismus in einem *crossstalk* miteinander und können in einer Vielzahl an Organen verschiedene Effekte vermitteln (Magliulo et al., 2022). Die Gesamtheit solcher durch körperliche Betätigung humoral sekretierter Faktoren wird unter dem Begriff der Exerkine

zusammengefasst (Safdar und Tarnopolsky, 2018). Ein Teilforschungsfeld in diesem Zusammenhang ist das Netzwerk der von den Skelettmuskeln ausgeschütteten, sogenannten Myokine (Ruegsegger und Booth, 2018) (vgl. 1.1.5).

Wahrscheinlich scheint, dass verschiedene und überlappende Mechanismen an der Vermittlung der multisystemischen und protektiven Effekte von körperlichem Training beteiligt sind (Safdar und Tarnopolsky, 2018). Auch wenn aufgrund dieser großen Komplexität die Entwicklung eines allumfassenden Sport-Mimetikums unwahrscheinlich bleibt (Hawley et al., 2014), bietet ein verbessertes Verständnis auf diesem Gebiet viel Potential für die Medizin: Es kann dabei helfen, personalisierte Aktivitäts- und Lifestyle-Empfehlungen auszusprechen und neue molekulare Zielstrukturen für Therapien zu identifizieren und darüber hinaus zur Entwicklung neuer Medikamente beitragen, welche in Zukunft zumindest spezifische Teilaspekte von Sport nachahmen könnten (Fiuza-Luces et al., 2013; Hawley et al., 2014; Neuffer et al., 2015). Letzteres ist nicht nur vor dem Hintergrund des zuvor beschriebenen, globalen Problems körperlicher Inaktivität relevant, sondern ebenfalls wichtig für Menschen, die aus verschiedenen Gründen keinen Sport treiben können (Sanford et al., 2020).

1.1.4 Charakteristika der Skelettmuskeln und Ablauf der Kontraktion

Die Skelettmuskeln machen etwa 40 % des menschlichen Körpergewichts aus und enthalten einen Großteil aller Proteine des Körpers. Sie sind für Bewegung und Haltung zuständig, haben aber auch viele metabolische Funktionen wie Wärmeerzeugung und dienen als Reservoir für Kohlenhydrate und Aminosäuren (Frontera und Ochala, 2015). Sie sind außerdem das größte insulin-sensitive Gewebe des Körpers und spielen eine wichtige Rolle in der Glukosehomöostase (Stump et al., 2006).

Ein Muskel setzt sich aus vielen Muskelfasern zusammen. Einzelne Muskelfasern sind mehrkernig, post-mitotisch und enthalten eine komplexe innere Struktur aus kontraktilen Myofibrillen. Darüber hinaus enthält der Muskel mehrere geordnete Schichten Bindegewebe, Muskelstammzellen und weitere Zellpopulationen wie beispielsweise Zellen des Blutgefäßsystems (Frontera und Ochala, 2015; Mukund und Subramaniam, 2020). Die Fasern eines Muskels sind in Bündeln zu motorischen Einheiten organisiert, welche jeweils von einem Motoneuron innerviert werden. Das Motoneuron leitet den nervlichen Impuls auf die Muskelfasern über, was über die Auslösung eines Aktionspotentials letztendlich zur Muskelkontraktion führt (Schiaffino und Reggiani, 2011). Zur Kontraktion kommt es durch

den von einem solchen Aktionspotential ausgelösten Calcium-Einstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Sarkoplasma der Muskelzelle und der dadurch vermittelten Querbrückenbildung zwischen den Aktin- und Myosinfilamenten, aus denen die Muskelfibrille aufgebaut ist. Die Kraft, die durch diese basale Querbrückenbildung erzeugt wird, leitet sich longitudinal und lateral entlang der Muskelfaser weiter und führt durch die Übertragung auf Sehnen und Gelenke letztendlich zu Bewegung (Frontera und Ochala, 2015).

Es gibt verschiedene Typen von Muskelfasern, welche auf verschiedene Arten von Bewegung optimiert sind. Eine gängige Klassifikation für die Muskeln von Säugetieren unterscheidet dabei langsam zuckende, oxidative Typ I-Fasern, die vornehmlich ausdauernd arbeiten, von schnell zuckenden, oxidativ bis glykolytischen Typ II-Fasern, welche in weitere Untertypen eingeteilt werden können (Schiaffino und Reggiani, 2011). Letztere sind auf schnelle Krafterzeugung spezialisiert, ermüden jedoch schneller. Die relative Verteilung dieser Fasern variiert von Muskel zu Muskel und auch bei unterschiedlichen Spezies (Schiaffino und Reggiani, 2011). Durch regelmäßiges Training kann der Muskel Adaptionen durchlaufen, die je nach Trainingsart variieren: So führt Ausdauertraining vor allem zu einer verbesserten metabolischen Kapazität, während Krafttraining vornehmlich die Krafterzeugung verbessert und zu Hypertrophie des Muskels führt (Frontera und Ochala, 2015)

1.1.5 Myokine

Neben den im vorherigen Absatz beschriebenen Funktionen der Skelettmuskeln entstand bereits vor über 50 Jahren die Vorstellung, dass von der kontrahierenden Muskulatur auch hormonähnliche Faktoren ausgeschüttet werden, die auf andere Gewebe wirken (Goldstein, 1961). Seit der Anerkennung von Interleukin-6 (IL-6) als ein solcher Faktor wird der Muskel als endokrin aktives Gewebe angesehen (Febbraio und Pedersen, 2005). Für vom Muskel hergestellte und sekretierte Zytokine mit Effekten in entfernten Geweben wurde der Begriff der Myokine etabliert (Pedersen et al., 2003). Neben Peptiden und Proteinen können auch weitere Moleküle wie Lipide, Nukleinsäuren oder Metabolite vom Muskel sekretiert werden, welche ein weiteres interessantes Forschungsfeld darstellen (Aguer et al., 2020; Weigert et al., 2014). Aguer et al. (2020) schlagen jedoch im Sinne einer einheitlichen Definition vor, nur die von Skelettmuskelzellen sekretierten Proteine und Peptide als Myokine zu bezeichnen.

Inzwischen sind mehrere Hundert solcher Myokine identifiziert (Khan und Ghafoor, 2019; Weigert et al., 2014). Diese haben vielfältige Funktionen im Körper, deren Verständnis jedoch noch lückenhaft ist und erst für einen kleinen Teil der bekannten Myokine beschrieben wurde

(Bay und Pedersen, 2020). Die Myokine können sowohl auto-, para- und/oder endokrin aktiv sein (Pedersen und Febbraio, 2012). Zu den bekannten Effekten zählen unter anderem Einflüsse auf die Gehirnfunktion, die Blutgefäße, die Haut, das Immunsystem, den Fettstoffwechsel und den Glukosemetabolismus (Severinsen und Pedersen, 2020). Einige Myokine haben in den letzten Jahren besondere Aufmerksamkeit bezüglich ihrer Rolle in der Prävention und Therapie des T2DM erlangt. Hierzu gehören neben dem zuvor erwähnten IL-6 (Lin et al., 2023) auch Myokine wie Angiogenin und Osteoprotegrin (Rutti et al., 2018), IL-13, Follistatin-Like-1, Fibroblast Growth Faktor-21 und weitere (Carson, 2017).

Die Sekretion von Myokinen erfolgt sowohl akut, zum Beispiel als Reaktion auf Kontraktion, als auch basal in Ruhe (Perrin et al., 2015) und kann sich darüber hinaus zwischen den verschiedenen Muskelfasertypen unterscheiden (Rutti et al., 2018). Viele weitere Faktoren können Einfluss auf die Myokinsekretion nehmen, so besteht zum Beispiel ein Zusammenhang zwischen der basalen Sekretion einiger Myokine mit dem zirkadianen Rhythmus (Perrin et al., 2015). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass kultivierte Muskelzellen von diabetischen Spendern ein anderes Sekretionsprofil aufweisen als von nicht-diabetischen Spendern (Ciaraldi et al., 2016). Kürzlich wurde auch das Sauerstoffangebot als modulierender Faktor auf das Myokinprofil von primären humanen Muskelzellen ermittelt (van Meijel et al., 2023). Mit Bezug zu den molekularen Wirkmechanismen körperlicher Aktivität konnte die Sekretion mehrerer Myokine in direkten Zusammenhang mit Kontraktion gebracht werden (Raschke et al., 2013a; Scheler et al., 2013). Es ist jedoch anzunehmen, dass es viele weitere kontraktionsabhängig regulierte Myokine gibt, die bisher noch nicht entdeckt wurden (Weigert et al., 2014).

1.2 EPS von C2C12-Zellen als *in-vitro*-Modell für körperliche Aktivität

1.2.1 Elektrische Pulsstimulation von C2C12-Zellen

Viele der bekannten kontraktionsabhängigen Myokine können auch von anderen Geweben des Körpers ausgeschüttet werden oder sind im Blutplasma nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden. Reduzierte *in-vitro*-Modelle können hier nützlich sein, um in dem komplexen Zusammenspiel aktivitätsinduzierter Reaktionen einzelne Aspekte wie die Rolle der Muskelzelle besser zu verstehen (Nikolić et al., 2017; Scheler et al., 2013).

Ein solches *in-vitro*-Modell für die Imitation ausgewählter Aspekte des körperlichen Trainings ist die elektrische Pulsstimulation (EPS). Bei der EPS werden durch die Applikation

von elektrischen Strömen über Elektroden kultivierte Muskelzellen zur Kontraktion angeregt (Scheler et al., 2013). Elektrische Stimulation wurde bereits in den 70er Jahren für *in-vitro*-Versuche an Muskelzellkulturen eingesetzt (Shainberg und Burstein, 1976) und erstmals explizit als *in-vitro*-Modell zur Imitation von körperlicher Aktivität von Nedachi et al. im Jahr 2008 an C2C12-Zellen verwendet (Nedachi et al., 2008).

Die murine Myoblasten-Zelllinie C2C12 fand in den 1970er Jahren ihre Anfänge. Die ursprünglichen Zellen wurden aus mononukleären, myogenen Zellen eines Mausoberschenkels einer zwei Monate alten weiblichen C3H-Maus gewonnen und kultiviert (Yaffe und Saxel, 1977). Aus einem Subklon dieser Zellen generierten Blau et al. (1983) die C2C12-Zelllinie. C2C12-Zellen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, nach der Induktion, etwa durch Serumentzug, in wenigen Tagen zu mehrkernigen, kontraktionsfähigen Myotuben mit gut organisierten Sarkomeren zu differenzieren (McMahon et al., 1994). Die Stadien der Differenzierung hin zu kontraktilen Myotuben können unter anderem durch charakteristische Veränderungen in den Expressionsmustern verschiedener Gene wie den MRFs (*myogenic regulatory factors*) nachverfolgt werden (Bajaj et al., 2011; Kitzmann und Fernandez, 2001). In den EPS-Studien der letzten Jahre wurden C2C12-Zellen vielfach eingesetzt (Nintou et al., 2022). Sie zeichnen sich durch ein robustes Wachstum aus, sind leicht verfügbar sowie konsistent in der Handhabung. Zudem reagieren sie gut auf die elektrische Stimulation (Nikolić et al., 2017).

Durch das EPS-Modell können einige der bekannten, molekularen Effekte von körperlicher Aktivität reproduziert werden: So konnte beispielsweise eine signifikant gesteigerte Expression von AMPK (Adenosimonophosphat-aktivierte Proteinkinase), eine vermehrte Expression von *IL-6* (Interleukin-6) und eine gesteigerte Glukoseaufnahme durch die Applikation von EPS erreicht werden, wie eine Meta-Analyse von Nintou et al. (2022) ermittelte. Ein *in-vivo*-Effekt, der durch das EPS-Modell in dieser Meta-Analyse keine Signifikanz erreichte, war die Expression von GLUT4 (Glukosetransporter Typ 4), jedoch zeigte sich auch hier insgesamt die Tendenz zu einer Expressionssteigerung (Nintou et al., 2022).

1.2.2 EPS-Parameter und ihr Bezug zu verschiedenen Trainingsmodalitäten

In vivo führen verschiedene Trainingsmodalitäten durch unterschiedliche physiologische Stressoren im Muskel zu spezifisch angepassten Adaptionen auf molekularer Ebene (Nikolić et al., 2017). Ausdauertraining führt vor allem zu einer Verbesserung der oxidativen Kapazität

und effizienten Energienutzung, während Krafttraining vorrangig eine Steigerung der Krafterzeugung durch Muskelhypertrophie zur Folge hat (Booth und Thomason, 1991). Auch wenn sowohl Ausdauer- als auch Krafttraining beide effektiv die Gesundheit fördern können, sind die Effekte der Trainingsarten auf spezifische gesundheitliche Parameter unterschiedlich (Egan und Zierath, 2013). In einer Meta-Analyse aus dem Jahr 2018 konnte für T2DM-Patienten beispielsweise gezeigt werden, dass kombiniertes Kraft- und Ausdauertraining am effektivsten den HbA1c-Wert (Hämoglobin A1c-Wert) senken konnte, während es für den Faktor Gewichtsreduktion keinen signifikanten Unterschied zwischen kombiniertem Training und überwachtem Ausdauer- oder Krafttraining allein gab (Pan et al., 2018). Der Einfluss unterschiedlicher Trainingsmodalitäten lässt sich auch auf der Ebene der Myokine beobachten: So schlussfolgern Domin et al. (2021) in ihrem Review, dass die Ausschüttung verschiedener Myokine unter anderem mit der Trainingsart, der Intensität, der Dauer und dem metabolischen Modus während des Sports variiert. Zunner et al. (2022) stellen in ihrem Review diese Variabilität in der Myokinsekretion auch für unterschiedliche Formen des Krafttrainings heraus, betonten darüber hinaus jedoch den zeitgleichen Einfluss weiterer interindividueller Faktoren auf das resultierende Myokinprofil.

Studien, welche das EPS-Modell einsetzen, variieren unterschiedlich stark in den verwendeten Parametern wie Frequenz, Spannung, Pulsdauer und Gesamtdauer der Stimulation (Nintou et al., 2022). Die verwendeten Parameter können einen Einfluss auf die Reaktionen der Zellen haben: Naumann und Pette (1994) konnten diesbezüglich bereits in den neunziger Jahren zeigen, dass verschiedene elektrische Stimulationsmuster zu unterschiedlichen Expressionen der Isoformen der schweren Myosin-Kette führten. Nikolić et al. (2012) haben in einer Studie an humanen Muskelzellen akute, hochfrequente Stimulationsprotokolle mit chronischen, niederfrequenten Protokollen verglichen und konnten in den erzeugten molekularen Effekten Parallelen zu den Einflüssen von einer akuten Trainingseinheit (z.B. erhöhte Laktatkonzentration und gesteigerte Glukoseaufnahme) und regelmäßigem Training (z.B. insgesamt erhöhte oxidative Kapazität, sowie ein verbesserter Lipid- und Glukosestoffwechsel) *in vivo* erkennen. Eine Studie von Burch et al. aus dem Jahr 2010 verglich die relative Expression einiger Gene in EPS-stimulierten C2C12-Zellen und Muskeln aus trainierten Mäusen. Für die chronischen Stimulationsprotokolle der Zellreihe (90 Minuten an vier aufeinanderfolgenden Tagen oder 24 Stunden kontinuierlich) im Vergleich mit den chronisch trainierten Mausmuskeln (nach einem 6-wöchigen Trainingsprogramm) konnten hier qualitativ ähnliche Expressionsmuster festgestellt werden.

Für die getesteten kurzzeitigen Stimulationsreize im Vergleich zu den Effekten einer Akuteinheit Sport im Mausmuskel galt dies eher nicht (Burch et al., 2010).

Letztendlich gibt es Hinweise, dass durch jede Art von Stimulationsprotokoll sowohl äquivalente als auch divergierende Effekte zu Kraft- oder Ausdauertraining *in vivo* hervorgerufen werden können (Carter und Solomon, 2019). Unter den vorhandenen EPS-Studien ist zudem eine große Heterogenität zu verzeichnen, sowohl was die verwendeten Stimulationsprotokolle und Stimulationsdauern als auch die jeweilige Zuordnung zu einer Trainingsmodalität angeht (Nintou et al., 2022). Einen allgemeinen Konsens einer solchen Zuordnung gibt es nicht, sodass in diesem Bereich noch mehr Forschung nötig ist (Nikolić et al., 2017). Carter und Solomon (2019) schlagen vor, EPS daher eher als ein allgemeines, akut oder chronisch anwendbares Modell für Skelettmuskelkontraktion anzusehen und es nicht spezifisch einer Trainingsmodalität zuzuordnen.

1.3 Sekretomanalyse

1.3.1 Beschreibung und Einordnung des Sekretoms

Agrawal et al. (2010) bezeichnen das Sekretom als die Gesamtheit der sekretierten Proteine, die eine Zelle (oder ein Gewebe, Organ oder Organismus) zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter bestimmten Bedingungen durch einen bekannten oder unbekanntem Mechanismus in den Extrazellularraum abgibt. Zellen können je nach Typ konstitutiv und/oder reguliert als Reaktion auf externe Stimuli sekretieren, wobei für jedes sekretierte Protein in einer bestimmten Zelle eine präferierte Sekretionsart besteht (Burgess und Kelly, 1987). Die von Muskelzellen sekretierten Proteine können auto-, para- und/oder endokrin ihre Funktion vermitteln und so am systemischen *crossstalk* zwischen den Geweben teilnehmen (Pedersen und Febbraio, 2012). Umfassende Methoden wie die Massenspektrometrie (MS) können bei der Entschlüsselung dieses *crossstalks* einen wichtigen Beitrag leisten, da sie in einem globalen Ansatz nicht nur bekannte, sondern auch neuartige und niedrig-abundante Moleküle erfassen und identifizieren können (Hoffman, 2017). Insgesamt wird den ungerichteten *omics*-Technologien viel Potential zugesprochen, die komplexen biologischen Netzwerke in Zusammenhang mit körperlicher Betätigung weiter zu entschlüsseln (Zierath und Wallberg-Henriksson, 2015). Hoffman (2017) nennt in Zusammenhang mit den durch körperliche Betätigung vermittelten Effekten acht Haupt-Forschungsfelder aus dem *omics*-Bereich, wobei er neben dem Genom/Epigenom, dem Transkriptom, dem Proteom, dem Phosphoproteom, dem Acetylom, dem Metabolom und dem Lipidom auch das Sekretom hier einordnet.

Lautaoja et al. (2023) bieten in ihrem Review einen aktuellen Überblick über die Erkenntnisse aus verschiedenen *omics*-Studien, bei denen Skelettmuskelzellen mit EPS oder mit mechanischer Dehnung behandelt wurden und auch diese Autoren betonen, dass die Kombination solch verschiedener *omics*-Ansätze vielversprechend dabei sein kann, das Verständnis der gesundheitsfördernden Effekte von Bewegung zu erweitern.

1.3.2 Arten der Sekretion

Es gibt verschiedene Arten der Sekretion von Proteinen und Biomolekülen. Der klassische sekretorische Weg in eukaryotischen Zellen ist durch die Freisetzung von Proteinen durch sekretorische Vesikel oder Granula nach ihrem Weg über das Endoplasmatische Retikulum (ER), den Golgi-Apparat und das trans-Golgi-Netzwerk gekennzeichnet (Burgess und Kelly, 1987; Viotti, 2016). Naszierende, klassisch sekretierte Proteine sind durch ein Signalpeptid am N-terminalen Ende gekennzeichnet (Delic et al., 2013).

Proteine, die nicht durch diese Stationen geleitet aber dennoch sekretiert werden, ordnet man dem nicht-klassischen oder unkonventionellen sekretorischen Weg zu (Dimou und Nickel, 2018). Diese werden zum Beispiel direkt durch Porenbildung über die Zellmembran transportiert oder nutzen spezielle Transporter. Teils handelt es sich auch um Endosom- oder Autophagosom-basierte Sekretion, und teils um Proteine, die nach dem Weg über das ER bei der Sekretion den Golgi-Apparat umgehen. Sekretierte Proteine, die den letztgenannten Weg nehmen, enthalten trotz unkonventioneller Sekretion ebenfalls ein Signalpeptid oder eine Transmembrandomäne (Rabouille, 2017). Darüber hinaus kommt dem Forschungsfeld der von Zellen in Form von Exosomen oder Mikrovesikeln freigesetzten extrazellulären Vesikel (EV) Aufmerksamkeit zu, welche neben Proteinen und Peptiden auch Nukleinsäuren und Lipide transportieren können (Raposo und Stoorvogel, 2013). Auch von Membranproteinen durch sogenanntes *protein ectodomain shedding* abgespaltene Fragmente können an der interzellulären Kommunikation teilnehmen (Tien et al., 2017). Es werden darüber hinaus noch einige weitere unkonventionelle Sekretionsmechanismen vermutet, die bisher unbekannt sind (Dimou und Nickel, 2018). Bioinformatische Tools können dabei helfen, Proteine aus großen Datensätzen als potenziell klassisch oder unkonventionell sekretiert zu klassifizieren und so von nicht-sekretierten Proteinen zu unterscheiden. Beispiele für derartige Algorithmen sind SignalP 5.0 (Almagro Armenteros et al., 2019) und SecretomeP 2.0 (Bendtsen et al., 2004), welche in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden.

1.4 Ziele der Arbeit

Das Gesamtbild der Myokine, insbesondere in Zusammenhang mit körperlicher Betätigung und Kontraktion, ist noch immer in vielen Aspekten unvollständig und wird als ein wichtiges Forschungsfeld angesehen (Laurens et al., 2020; Severinsen und Pedersen, 2020). Seiner weiteren Entschlüsselung - hinsichtlich der Identifizierung neuer Myokine, als auch der Beschreibung ihrer Funktionen - wird ein besonderes Potenzial für das Verständnis der molekularen Mechanismen hinter den positiven Auswirkungen körperlicher Aktivität auf den Metabolismus zugesprochen (Weigert et al., 2014).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war vor diesem Hintergrund die globale Identifizierung des Sekretoms von C2C12-Zellen nach EPS als Modell für körperliche Aktivität, zur potenziellen Erweiterung der Datenbasis bekannter, kontraktionsabhängig sekretierter Myokine (ksM). Angesichts der Heterogenität der eingesetzten EPS-Parameter und der Dauer ihrer Applikation in bisherigen EPS-Studien (Nintou et al., 2022), sollte auch der Einfluss von zwei verschiedenen Stimulationsdauern bei ansonsten gleichem Protokoll und Versuchsaufbau auf das kontraktionsabhängige Sekretom verglichen werden. Den spezifischen Einfluss der Stimulationsdauer auf das globale Sekretom nach EPS besser zu verstehen, könnte bei dem Vergleich und der Beurteilung vorhandener und zukünftiger EPS-Studien helfen.

Zur Durchführung der Studie wurde an differenzierten C2C12-Zellen für 6 oder 24 Stunden ein kontinuierliches EPS-Protokoll mit den Parametern 11,5 V, 2 ms und 1 Hz angewendet. Die Kontrollzellen wurden mit Elektroden, jedoch ohne die Applikation von Strom inkubiert. Die Differenzierung der Zellen zu Myotuben wurde durch visuelle Kontrollen und eine qRT-PCR-Analyse auf bekannte Marker überprüft. Darüber hinaus wurde mittels qRT-PCR auch die mRNA-Expression von *IL-6* nach der EPS ermittelt, was zur Einschätzung der Kontraktion der Zellen dienen sollte. Zur Ermittlung der sekretierten Proteine wurde an den aufbereiteten Zellüberständen eine MS-Analyse durchgeführt. Das so erfasste Myokinom wurde anschließend mithilfe der bioinformatischen Tools SignalP und SecretomeP auf den Anteil der Proteine mit bekannten sekretorischen Signalsequenzen analysiert. Des Weiteren wurden die Sekretome nach beiden Stimulationsdauern hinsichtlich der jeweils kontraktionsabhängig regulierten Proteine verglichen. Ein in der Analyse interessant erscheinendes, potenziell neues ksM wurde ausgewählt und hinsichtlich seines möglichen Einflusses auf die Glukosehomöostase vertieft recherchiert und diskutiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinie

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden mit der kommerziellen Myoblasten-Zelllinie C2C12 aus der Maus durchgeführt. Die C2C12-Zellen (CRL-1772) wurden von der Firma ATCC (Manassas, VA, USA) erworben.

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Verdünnungen von Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, mit Reinstwasser erstellt, welches mit dem Milli-Q® Advantage A10 Wasseraufbereitungssystem der Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) aufbereitet wurde.

Tabelle 1: **Chemikalien und Reagenzien für die Zellkultur**

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
DMEM mit 4,5 g/l Glukose, ohne Phenolrot, ohne Glutamin (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco von Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
DPBS ohne Magnesium, ohne Calcium (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Gibco von Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
FBS (Fetales Kälberserum)	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
GlutaMAX™ (100X)	Gibco von Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Natriumpyruvat (100mM)	Gibco von Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Pen/Strep (10.000 Units/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)	Gibco von Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Pferdeserum	ATCC Manassas, VA, USA
Trypanblaue Lösung (0,4 %)	Gibco von Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 %), ohne Phenolrot (10X) (EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure)	Gibco von Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien für die qRT-PCR

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
Chloroform, reinst	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
dNTPs (<i>deoxynucleoside triphosphate set, PCR grade</i>)	Roche Diagnostics Mannheim, Deutschland
Ethanol, reinst	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
GlycoBlue™ Co-Fällungsmittel	Invitrogen von Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Hexanukleotidprimer-Mix (<i>primer random p(dN)₆</i>)	Roche Diagnostics Mannheim, Deutschland
Isopropanol, reinst	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA
nukleasefreies Wasser	Promega Corporation Madison, WI, USA
TRIzol® Reagenz	Ambion von Life Technologies Carlsbad, CA, USA

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien für die MS-Probenaufbereitung

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
1D-Gel (Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast Gel)	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA
Acetonitril	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Acrylamid 40 % (Mix 37,5:1)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Ammoniumbicarbonat	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Ammoniumsulfat	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland

APS (Ammoniumperoxodisulfat)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
BSA Stocklösung (bovines Serumalbumin, 200 mg/ml)	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Coomassie Brilliant Blau	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
DPBS mit Mg ²⁺ und Ca ²⁺ (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Gibco von Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
DTT (Dithiothreitol)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Glycerol	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Glycin	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
HCL (Salzsäure, 6M)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Iodacetamid	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Isopropanol (2-Propanol)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Methanol	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Ortho-Phosphorsäure 85 %	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Precision Plus Protein™ Standards – All Blue Marker	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA
Precision Plus Protein™ Standards – Unstained Marker	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA

Ruthenium-Fluoreszenz-Farbstoff (Ruthenium II tris (Bathophenanthrolin Disulfonat))	Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie, DDZ; hergestellt nach dem Protokoll von Rabilloud et al. (2001)
SDS (Natriumlaurylsulfat)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
TFA (Trifluoressigsäure 0,1 %) in Acetonitril	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
TFA (Trifluoressigsäure 0,1 %) in Wasser	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
TFA (Trifluoressigsäure 100 %)	Merck KgaA Darmstadt, Deutschland
TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Trypsin/Lys-C Mix	Promega Corporation Madison, WI, USA
Wasser filtriert über einen 0,2 µm-Filter	VWR International, LLC Radnor, PA, USA

Tabelle 4: **Chemikalien und Reagenzien für die Massenspektrometrie**

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
0,1 % Ameisensäure in Acetonitril	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
0,1 % Ameisensäure in Wasser	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA

2.1.3 Puffer und Medien

Für das Auffüllen von Puffern wurde, soweit nicht anders angegeben, Reinstwasser aus dem Milli-Q® Advantage A10-Wasseraufbereitungssystem der Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Die Herstellerangaben zu den einzelnen Inhaltsstoffen der Puffer finden sich in den entsprechenden Tabellen des Kapitels „Chemikalien und Reagenzien“ (vgl. 2.1.2)

Tabelle 5: Medien für die Zellkultur

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
Differenzierungsmedium (4,5 g/l Glukose)	DMEM (4,5 g/l Glukose, ohne Phenolrot) + 2 % Pferdeserum + 2 % GlutaMAX™ + 1 % Pen/Strep + 1 % Natriumpyruvat
Hungermedium (4,5 g/l Glukose)	DMEM (4,5 g/l Glukose, ohne Phenolrot) + 2 % GlutaMAX™ + 1 % Pen/Strep + 1 % Natriumpyruvat
Wachstumsmedium (4,5 g/l Glukose)	DMEM (4,5 g/l Glukose, ohne Phenolrot) + 10 % FBS + 2 % GlutaMAX™ + 1 % Pen/Strep + 1 % Natriumpyruvat

Tabelle 6: Puffer für die MS-Probenaufbereitung

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
Fling-Gregerson-Laufpuffer (1x)	50 mM TRIS 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Trenngel-Puffer (4x)	3 M TRIS / HCL (pH 8,8) 0,8 % SDS
Lämmli-Laufpuffer (1x)	25 mM TRIS 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Sammelgel-Puffer (4x)	0,5 M TRIS / HCL (pH 6,8) 0,8 % SDS
SDS-Probenpuffer (5x)	312,5 mM TRIS / HCL (pH 6,8) 50 % Glycerol 10 mM EDTA 10 % SDS 500 mM DTT 0,05 % Bromphenolblau

SDS-Probenpuffer (1x)	62,5 mM TRIS / HCL (pH 6,8) 10% Glycerol 2 mM EDTA 2 % SDS 100 mM DTT 0,01 % Bromphenolblau
-----------------------	--

Tabelle 7: Puffer für die Massenspektrometrie

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
Puffer A (als mobile Phase bei der Flüssigchromatographie)	0,1 % Ameisensäure + Wasser Es wurde das fertige Produkt „0,1 % Ameisensäure in Wasser“ von Thermo Fisher Scientific verwendet.
Puffer B (als mobile Phase bei der Flüssigchromatographie)	80 % Acetonitril; 0,1 % Ameisensäure Es wurde das fertige Produkt „0,1 % Ameisensäure in Acetonitril“ mit „0,1 % Ameisensäure in Wasser“ (beides von Thermo Fisher Scientific) verdünnt.

2.1.4 Reaktions-Kits

Tabelle 8: Reaktions-Kits für die qRT-PCR

Kits	Hersteller
GoScript™ Reverse Transcriptase	Promega Corporation Madison, WI, USA
GoTaq® qPCR Master Mix	Promega Corporation Madison, WI, USA

2.1.5 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer waren innerhalb der Arbeitsgruppe bereits etabliert und wurden von der Firma Kaneka Eurogentecs S.A. (Seraing, Belgien) bezogen.

Tabelle 9: **Primer für die qRT-PCR**

Primer		Sequenz (5'→3')
18 S	<i>forward</i>	ATCATGCAGAACCCACGACA
	<i>reverse</i>	GCAAAGGCCCCAGAGACTCATT
Act B	<i>forward</i>	CCACCATGTACCCAGGCATT
	<i>reverse</i>	AGGGTGTAAAACGCAGCTCA
Desmin	<i>forward</i>	AGGCTCAAGGCCAAACTACA
	<i>reverse</i>	TCTGCGCTCCAGGTCAATAC
GAPDH	<i>forward</i>	CCAGGTTGTCTCCTGCGACT
	<i>reverse</i>	ATACCAGGAAATGAGCTTGACAAAAGT
HPRT	<i>forward</i>	AAGCTTGCTGGTGAAAAGGAA
	<i>reverse</i>	TTGCGCTCATCTTAGGCTTT
MyoD	<i>forward</i>	CTTCTATCGCCGCCACTC
	<i>reverse</i>	AAGTCGTCTGCTGTCTCAA
Myf5	<i>forward</i>	CCACCTCCAAGTCTCTGAC
	<i>reverse</i>	GCACATGCATTTGATACATCAGG
MyoG	<i>forward</i>	GTGCCCAGTGAATGCAACTC
	<i>reverse</i>	CGAGCAAATGATCTCCTGGGA
Myh2	<i>forward</i>	GCCCTGGACAAGAAGCAGAGAA
	<i>reverse</i>	TCGCTTCAGGGTTTCTAGCT
Tbp	<i>forward</i>	GCGGCACTGCCATTTATTT
	<i>reverse</i>	GGCGGAATGTATCTGGCACA

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: **Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur**

Material	Hersteller
6-well-Platte (Zellkulturtestplatte 6)	TPP Techno Plastic Products AG Trasadingen, Schweiz
6-well-Platte, kompatibel mit den EPS-Elektroden (Cellstar® Multiwellplatte für die Zellkultur mit 6 Wells)	Greiner Bio-One International GmbH Kremsmünster, Österreich

konisches Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Greiner Bio-One International GmbH Kremsmünster, Österreich
sterile Glaspipetten (verschiedene Größen)	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche (75 cm ² Wachstumsfläche mit Filter-Schraubkappe)	TPP Techno Plastic Products AG Trasadingen, Schweiz

Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien für die qRT-PCR

Material	Hersteller
384- <i>well</i> -Platte für PCR	4titude Ltd Wotton, Surrey, UK
optische Klebefolie für Real-time PCR	Applied biosystems von Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA

Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien für die MS-Probenaufbereitung

Material	Hersteller
Amicon® Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten (Filtergröße 3K)	Merck Millipore Ltd. Carrigtwohill, Co. Cork, Irland
<i>Autosampler</i> -Fläschchen	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Deckel für die <i>Autosampler</i> -Fläschchen	SUN SRi Rockwood, TN, USA
LoBind® Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Safe-Lock Reaktionsgefäße (verschiedene Größen)	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen für die Ultrazentrifuge (5 ml)	Beckman Coulter, Inc. Brea, CA, USA

2.1.7 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 13: **In der Zellkultur genutzte Geräte und Hilfsmittel**

Gerät / Hilfsmittel	Hersteller
EPS-Elektroden (C-dishes)	IonOptix LLC Westwood, MA, USA
Inkubator (HERAcell 240)	Heraeus Hanau, Deutschland
Inkubator (HERACell 240i)	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Pulsgeber für die EPS-Elektroden (C-Pace EP)	IonOptix LLC Westwood, MA, USA
Schüttelwasserbad (Typ 1092)	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH Burgwedel, Deutschland
Zählkammer (Neubauer improved)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG Lauda Königshofen, Deutschland
Zellkulturwerkbank (Herasafe KS 18)	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Zentrifuge (Heraeus Multifuge 3S+)	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA

Tabelle 14: **Für die qRT-PCR genutzte Geräte**

Gerät	Hersteller
Heizblock (ThermoMixer F1.5)	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Plattenzentrifuge (PCR Plate Spinner)	VWR International, LLC Radnor, PA, USA
qRT-PCR Maschine (Quant Studio™ 7 Flex Real-Time PCR System)	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Spektralphotometer (NanoDrop 2000)	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Thermocycler (Mastercycler)	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge (Micro Centrifuge SD 220VAC)	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland

Vortex-Schüttler (Reax 2000)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG Schwabach, Deutschland
Zentrifuge (Centrifuge 5424 R)	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland

Tabelle 15: Für die MS-Probenaufbereitung genutzte Geräte und Hilfsmittel

Gerät / Hilfsmittel	Hersteller
Brutschrank (Heraeus Oven)	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Chemilumineszenz-Imager (Chemidoc TM MP)	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA
Gelelektrophoresekammer und Zubehör (Mini-PROTEAN [®] Tetra System)	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA
Heizblock (ThermoMixer [®] C)	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Spektralphotometer (NanoDrop 2000c)	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Stromgeber für die Elektrophorese (PowerPac TM Basic)	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA
Ultraschallbad (Sonorex RK 102 H)	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG Berlin, Deutschland
Ultrazentrifuge (Optima-MAX-XP) mit Rotor (MLS-50)	Beckman Coulter Brea, CA, USA
Vakuumkonzentrator (Savant SpeedVac SPD 1030 Integrated Vacuum Concentrator)	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Wippschüttler	Infors AG Bottmingen, Schweiz
Zentrifuge (Centrifuge 5810R)	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland

Tabelle 16: Für die Massenspektrometrie genutzte Geräte und Hilfsmittel

Gerät / Hilfsmittel	Hersteller
Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph (UltiMate 3000 HPLC)	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Ionenquelle (Nanospray Flex™)	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Massenspektrometer (Orbitrap Exploris™ 480)	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Trennsäule (Aurora series UPLC column)	ionOpticks Fitzroy, VIC, Australien
Vorsäule (Acclaim™ PepMap™ 100 C18-LC-Säule)	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA

2.1.8 Software

Tabelle 17: Verwendete Software

Software	Hersteller
EndNote 20	Clarivate Analytics London, UK
Image Lab 6.0.1	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA
Microsoft Excel 2019	Microsoft Redmond, WA, USA
Microsoft Word für Mac	Microsoft Redmond, WA, USA
NanoDrop 2000/ 2000c - Software	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Proteome Discoverer 2.5	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR - Software	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Tune / Xcalibur 3.0	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA

Tabella 18: **Verwendete Webtools**

Webtool mit Version	URL
SecretomeP 2.0 (Bendtsen et al., 2004)	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SecretomeP-2.0/
SignalP 5.0 (Almagro Armenteros et al., 2019)	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Soweit nicht anders angegeben, wurden standardmäßig alle Medien und Lösungen vor ihrer Anwendung in der Zellkultur im Wasserbad (vgl. Tbl. 13) bei 37 °C für 10-15 Minuten vorgewärmt. Alle Arbeiten mit vitalen Zellen bei geöffneten Kulturflaschen oder Zentrifugenröhrchen wurden an der Zellkulturwerkbank durchgeführt (vgl. Tbl. 13). Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO²-Gehalt in einem Inkubator (vgl. Tbl. 13).

2.2.1.1 *Auftauen der Zellen aus der Kryokonservierung*

Die kommerziell erworbenen C2C12-Zellen (vgl. 2.1.1) lagen in der Arbeitsgruppe zur Konservierung in Flüssigstickstofftanks gelagert vor. Zum Auftauen der Zellen aus der Kryokonservierung wurden 19 ml Wachstumsmedium (vgl. Tbl. 5) in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen vorbereitet (vgl. Tbl. 10). Das dem Stickstofftank entnommene Kryoröhrchen wurde zunächst in der Hand vorgewärmt und kurzzeitig bei 37 °C ins Wasserbad gestellt. Im Anschluss wurde die aufgetaute Zellsuspension zügig in das Zentrifugenröhrchen mit dem Wachstumsmedium überführt und alles mit der Glaspipette vermischt (vgl. Tbl. 10). Es folgte eine Zählung, Zentrifugation und Aussaat der Zellen wie im folgenden Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben. Bei der ersten Aussaat nach dem Auftauen wurde eine Zellzahl von 5×10^5 pro Flasche gewählt.

Vor der Aussaat für eine Versuchsdurchführung wurden die Zellen nach dem Auftauen noch mindestens einmal passagiert (vgl. 2.2.1.2).

2.2.1.2 *Passage und Kultivierung*

Zur Kultivierung wurden die C2C12-Zellen in Zellkulturflaschen (vgl. Tbl. 10) mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² in Wachstumsmedium inkubiert (vgl. Tbl. 5). Alle 3-4 Tage wurden die Zellen passagiert, um eine spontane Differenzierung zu Myotuben bei großflächiger Konfluenz des Zellrasens zu verhindern. Zu diesem Zeitpunkt hatten sie in der Regel eine Wachstumsdichte von etwa 60-70 % erreicht. Es erfolgten regelmäßige Begutachtungen der Zellen unter einem Mikroskop hinsichtlich visueller Vitalitätszeichen und des erfolgten Wachstums.

Für die Durchführung der Passage einer Zellkulturflasche wurden die Zellen mit 10 ml PBS ohne Mg²⁺ und Ca²⁺ gewaschen (vgl. Tbl. 1) und nach Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA-

Lösung (0,05 % Verdünnung in PBS ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} , vgl. Tbl. 1) für 3 Minuten im Brutschrank inkubiert (Tbl. 13). Durch anschließende Zugabe von 9 ml frischem Wachstumsmedium wurde die Trypsin-Reaktion gestoppt. Mit einer Glaspipette wurde die Zellsuspension zur Vermischung und zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden mehrmals vorsichtig auf- und abgespült und in ein konisches, 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt (vgl. Tbl. 10). Wurden viele Zellen benötigt (z.B. für eine Versuchsaussaat) wurde an dieser Stelle gegebenenfalls der Inhalt mehrerer Zellkulturflaschen derselben Passage zusammengeführt.

Die Errechnung der Zellzahl pro Milliliter erfolgte mithilfe der Anfärbung eines Anteils der Zellsuspension (25 μ l) durch Trypanblaue Lösung (vgl. Tbl. 1) und anschließender Zählung in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop (vgl. Tbl. 13). Die restliche Zellsuspension wurde unterdessen bei 216 x g für 5 Minuten zentrifugiert (vgl. Tbl. 13), sodass eine Trennung des Zellpellets vom Medium, welches nun den Überstand bildete, erfolgte. Nach Abnehmen des Überstands wurde das Zellpellet je nach angestrebter neuer Zellzahl pro Milliliter mit Hilfe einer Glaspipette in einer entsprechenden Menge frischen Wachstumsmediums resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen in gewünschter Anzahl in eine neue Zellkulturflasche ausgesät. Das Gesamtvolumen des Mediums in der Flasche wurde auf 10 ml aufgefüllt. In der Regel wurde für die Aussaat nun eine Zellzahl von $1 - 2 \times 10^5$ Zellen pro Flasche gewählt.

2.2.1.3 Differenzierung zu Myotuben

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden die in Kultur genommenen C2C12-Myoblasten in 6-well-Platten (vgl. Tbl. 10) ausgesät und über mehrere Tage zu Myotuben differenziert. Dies geschah durch den Entzug des Wachstumsmediums und die Zugabe von Differenzierungsmedium (vgl. Tbl. 5). Es wurden nur Zellen mit einer Passagenzahl zwischen 8 und 15 für die Versuchsdurchführung verwendet. Zellen aus einer spezifischen Passage wurden dabei für einen Versuch jeweils als ein biologisches Replikat (n) gewertet.

Wie im Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben, wurden die Zellen dazu zunächst aus den Zellkulturflaschen passagiert und anschließend zu je 2×10^5 Zellen in 2 ml Wachstumsmedium (vgl. Tbl. 5) pro well in die 6-well-Platten ausgesät. Zellen, welche für einen EPS-Versuch ausgesät wurden, wurden aufgrund der Kompatibilität mit den EPS-Elektroden in die 6-well-Platten des Herstellers Greiner Bio-one ausgesät, Zellen für die Versuche ohne EPS in die 6-well-Platten des Herstellers TPP (vgl. Tbl. 10). Am zweiten Tag erfolgte der Entzug des Wachstumsmediums und der Ersatz durch 2 ml

Differenzierungsmedium pro *well*. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Zellen eine Wachstumskonfluenz von etwa 70-80 % erreicht. Weitere drei Tage später wurde das Differenzierungsmedium einmalig gewechselt. Am sechsten Tag nach erstmaliger Zugabe des Differenzierungsmediums wurde jeweils die Versuchsdurchführung begonnen. Eine schematische Übersicht über die Schritte der Differenzierung zeigt die folgende Abbildung:

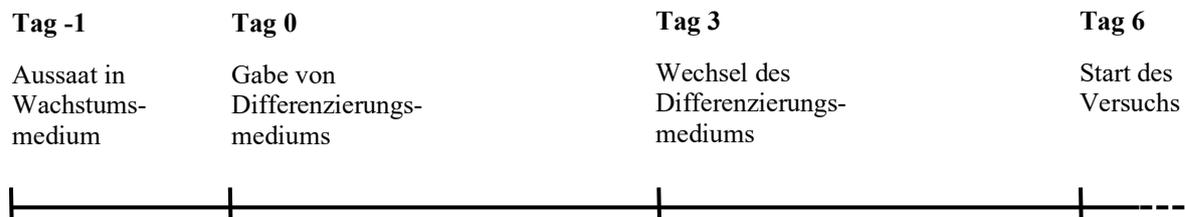


Abb. 1: Schematische Darstellung des Differenzierungsprotokolls

Vor jedem Mediumwechsel sowie vor Versuchsbeginn wurden die Zellen unter dem Mikroskop begutachtet und hinsichtlich optischer Vitalitätszeichen und der Ausbildung von Myotuben (Differenzierungsstatus) beurteilt.

2.2.1.4 Elektrische Pulsstimulation und Sammeln der Zellüberstände

Für die Durchführung der elektrischen Pulsstimulation (EPS) wurden zunächst pro Experiment vier *6-well*-Platten mit Zellen wie im Absatz 2.2.1.3 beschrieben differenziert. Zusätzlich wurden in jedem Versuchsdurchlauf Zellen ausgesät, welche nach einem Tag, und somit vor Erhalt des Differenzierungsmediums, wie in 2.2.1.5 beschrieben gestoppt und eingefroren wurden. Diese Zellen dienten später als undifferenzierte Referenzzellen für die Genexpressionsanalyse der Differenzierungsmarker mittels qRT-PCR (vgl. 2.2.2). Nach Abschluss des Differenzierungsprotokolls wurde die EPS wie im Folgenden beschrieben gestartet:

Die EPS-Elektroden (vgl. Tbl. 13) wurden für 2-10 Minuten in reinem Hungermedium vorbenetzt (vgl. Tbl. 5). Währenddessen wurden die ausdifferenzierten Zellen einmal mit je 2 ml PBS ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} pro *well* gewaschen (vgl. Tbl. 1). Anschließend wurde in jedes *well* 1 ml frisches Hungermedium gegeben und die Elektroden auf die *6-well*-Platten aufgesetzt, sodass diese in das Medium eintauchten. Die Elektroden von zwei der auf diese Weise vorbereiteten *6-well*-Platten wurden mit einem Kabel an den Pulsgeber (vgl. Tbl. 13) angeschlossen und dieser auf 11,5 V, 2 ms und 1 Hz eingestellt (vgl. Tbl. 13). Während der elektrischen Pulsstimulation wurden die Zellen in einem Brutschrank inkubiert (vgl. Tbl. 13). Die zwei weiteren *6-well*-Platten, mit den Zellen für die Kontrollgruppe, wurden zeitgleich

inkubiert und erhielten ebenfalls Elektroden, diese wurden jedoch nicht an den Pulsgeber angeschlossen. Pro Versuchsdurchlauf wurden dabei jeweils zwei der Platten für 6 Stunden und zwei Platten für 24 Stunden inkubiert, von denen wiederum jeweils eine Platte in dieser Zeit mittels EPS stimuliert wurde, während die andere als nicht-stimulierte Kontrolle diente.

Nach dem jeweiligen Zeitintervall wurde der Pulsgeber abgeschaltet und die Elektroden von den *6-well*-Platten entfernt. Mit einer Pipette wurde der gesamte Zellüberstand abgenommen, und jeweils nach Kondition gesammelt in ein Reaktionsgefäß von der Firma Eppendorf überführt (vgl. Tbl. 12). Anschließend wurde er bei 800 x g für 5 Minuten zentrifugiert, um größere Zellreste zu pelletieren. Nach erneuter Abnahme des Überstands über dem Pellet und Überführung in ein frisches Reaktionsgefäß wurde dieses auf Eis gestellt und anschließend im Gefrierschrank bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die in den *6-well*-Platten verbliebenen Zellen wurden nach 2.2.1.5 gestoppt und eingefroren.

2.2.1.5 Stoppen und Einfrieren der Zellen für die RNA-Extraktion

Zum Stoppen und Einfrieren von Zellen für eine anschließende RNA-Extraktion und qRT-PCR (vgl. 2.2.2) wurden diese nach Abnahme des Überstands zweimal mit je 2 ml kaltem PBS ohne Mg²⁺ und Ca²⁺ gewaschen (vgl. Tbl. 1). Anschließend wurden sie bei -20 °C mit der Platte im Gefrierschrank eingefroren, wobei eine zeitnahe Weiterverarbeitung angestrebt wurde.

2.2.2 Quantitative Echtzeit-PCR

2.2.2.1 RNA-Extraktion

Für die Extraktion der RNA wurden die in den *6-well*-Platten eingefrorenen Zellen (vgl. 2.2.1.5) zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend mit 0,5 ml TRIzol®-Reagenz lysiert (vgl. Tbl. 2). Das TRIzol®-Reagenz wurde dazu im *well* mehrfach gründlich auf- und abpipettiert und über den Zellrasen gespült, bevor das Zell-Reagenz-Gemisch in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Im Anschluss wurden die Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei Bedarf konnten die lysierten Zellen zu diesem Zeitpunkt bei -80 °C zwischengelagert werden. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform (vgl. Tbl. 2) und gründlicher Vermischung der Phasen mit einem Vortex Schüttler erfolgte eine weitere Inkubationszeit von 2-3 Minuten bei Raumtemperatur (vgl. Tbl. 14).

Im Anschluss wurden die Proben für 15 Minuten bei 15.871 x g und 4 °C zentrifugiert (vgl. Tbl. 14), wodurch sich drei verschiedene Phasen bildeten. Nur die wässrige Phase des Überstands, welche die RNA enthielt, wurde anschließend in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese wurde daraufhin mit 250 µl Isopropanol und 2 µl des Co-Präzipitationsmittels GlycoBlue™ (1:2 Verdünnung mit nukleasefreiem Wasser) versetzt (vgl. Tbl. 2), gevortext und für 10 Minuten bei -20 °C ruhen gelassen.

Es folgte eine weitere Zentrifugation bei gleicher Einstellung und Dauer. Die RNA lag nun als sichtbares, bläuliches Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes vor. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch Zugabe von 500 µl 75%igem Ethanol gewaschen (vgl. Tbl. 2). Durch vorsichtiges vortexen wurde das Pellet vom Boden gelöst und abermals für 5 Minuten bei gleicher Einstellung zentrifugiert. Nach der Zentrifugation hatte sich das RNA-Pellet wieder am Boden abgesetzt und das Ethanol konnte vorsichtig abgegossen werden. Der Waschvorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt.

Nach dem abermaligen Abgießen des Ethanols wurden vorhandene Flüssigkeitsreste vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und die Proben auf dem Heizblock (vgl. Tbl. 14) bei 55 °C und 550 rpm für 10-12 Minuten bei geöffnetem Deckel getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl nukleasefreiem Wasser (vgl. Tbl. 2) aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren sowie eine erneute 2-minütige Erwärmung auf dem Heizblock bei 55 °C gelöst. Zum Mischen wurde das Reaktionsgefäß kurz mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert.

Mit dem NanoDrop-Spektralphotometer und der zugehörigen Software (vgl. Tbl. 14, Tbl. 17) wurde die RNA-Konzentration bestimmt, sowie die Probe auf etwaige Phenolkontaminationen geprüft. Eine Phenolkontamination wurde angenommen, wenn der Quotient „A260/A230“ der Messung unter 1,0 lag und/oder in der Messkurve ein deutlicher Ausschlag im Absorptionsbereich des Phenols erkennbar war. Im Falle einer Phenolkontamination wurden alle Proben dieser Extraktion wie im nachfolgenden Abschnitt beschrieben aufgereinigt.

Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

2.2.2.2 RNA-Aufreinigung

Zur Aufreinigung der RNA im Falle einer Phenolkontamination wurden die Proben zunächst mit dem 0,1-fachen Volumen Natriumacetat und dem 2,5-fachen Volumen an 100%igem Ethanol (vgl. Tbl. 2) versetzt und für mindestens 2 Stunden bei -20 °C inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation (vgl. Tbl. 14) bei 12.000 x g und 4 °C, wodurch sich am Boden ein Pellet absetzte. Nach Abgießen des Überstands wurde die Probe mit 500 µl 70%igem Ethanol versetzt, das Pellet durch kurzes vortexen vom Boden des Reaktionsgefäßes gelöst und die Proben für 2 Minuten bei denselben Einstellungen nochmals zentrifugiert. Das Ethanol wurde verworfen und anschließend der Waschvorgang ein weiteres Mal wiederholt.

Es folgten die Trocknung und Wiederaufnahme der RNA in nukleasefreiem Wasser wie in 2.2.2.1 beschrieben. Die RNA-Konzentration wurde nach der Aufreinigung erneut mit dem Spektralphotometer bestimmt (vgl. Tbl. 14, Tbl. 17).

2.2.2.3 *cDNA-Synthese*

Für die Erstellung der komplementären DNS (cDNA) aus den zuvor extrahierten und gegebenenfalls aufgereinigten RNA-Proben wurde das GoScript™ Reverse Transcriptase-Kit von Promega verwendet (vgl. Tbl. 8). Pro Probe wurde dabei 1 µg RNA eingesetzt und diese mit nukleasefreiem Wasser (vgl. Tbl. 2) auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Für die Berechnung der RNA-Menge wurde die Messung der RNA-Konzentration mit dem Spektralphotometer nach dem Auftauen bzw. nach der Aufreinigung, jedoch stets unmittelbar vor der cDNA-Synthese, zugrunde gelegt.

Zu der erstellten RNA-Verdünnung wurde im nächsten Schritt je 1 µl dNTPs (1:2,5 Verdünnung der Stocklösung mit nukleasefreiem Wasser) und je 2 µl Hexanukleotidprimer (1:10 Verdünnung mit nukleasefreiem Wasser) hinzugegeben (vgl. Tbl. 2). Die Proben wurden bei 65 °C für 5 Minuten auf dem Thermocycler inkubiert (vgl. Tbl. 14), anschließend für 1 Minute auf Eis gelagert und 10 s geschüttelt. Daraufhin wurde zu jeder Probe 4 µl GoScript™ Reaction buffer 5X, 2 µl MgCl₂ und 1 µl GoScript™ Reverse Transcriptase aus dem verwendeten Kit gegeben. Nach gründlicher Vermischung auf dem Vortex-Schüttler und anschließender kurzer Zentrifugation in einer Tischzentrifuge wurde die cDNA im Thermocycler nach dem folgenden Protokoll synthetisiert: *Annealing* bei 25°C für 5 Minuten, *Synthesis* bei 42°C für 60 Minuten und *RT-Inactivation* bei 70°C für 15 Minuten. Die cDNA wurde anschließend bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.2.4 *qRT-PCR*

Die Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR) erfolgte auf einer 384-well-Platte (vgl. Tbl. 11) in einem QuantStudio™ 7 Flex System (vgl. Tbl. 14) mit Hilfe des GoTaq® qPCR Master Mix Kits (vgl. Tbl. 8).

Zunächst wurden die verwendeten Primer (vgl. Tbl. 9) im Verhältnis 1:10 und die cDNA-Proben (nach vortexen der aufgetauten Probe) im Verhältnis 1:40 mit nukleasefreiem Wasser (vgl. Tbl. 2) verdünnt und auf dem Vortex-Schüttler vermischt (Tbl. 14). Im Anschluss wurden je 4 µl der verdünnten Probe auf die 384-*well*-Platte pipettiert. Dabei wurde jede Probe pro Primer-Paar in Dreifachbestimmung aufgetragen und gemessen. Pro verwendetem Primer-Paar wurde außerdem 4 µl nukleasefreies Wasser als Kontroll-Triplikat aufgetragen.

Gemäß den Vorgaben des Kits wurden dem dort enthaltenen Master Mix pro Milliliter 20 µl der im Kit enthaltenen *Reference Dye CXR* zugegeben. Für jedes Primer-Paar wurde anschließend eine Mischung, bestehend aus 5 µl Master Mix (inklusive *Reference Dye CXR*), 0,5 µl *Forward*-Primer und 0,5 µl *Reverse*-Primer pro *well*, erstellt und dem Probenschema aus dem vorherigen Abschnitt entsprechend auf die Platte aufgetragen.

Mit einer optischen Klebefolie (vgl. Tbl. 11) wurde die Platte sorgfältig abgeklebt und in einer Plattenzentrifuge für 20 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert (vgl. Tbl. 14).

Das Gerät wurde für die Messung auf *Comparative C_t* ($\Delta\Delta C_t$) eingestellt. Das qRT-PCR-Programm auf dem Quant Studio™ 7 Flex Real-Time PCR System (vgl. Tbl. 14) erfolgte wie in Tabelle 19 beschrieben:

Tabelle 19: **Protokoll des qRT-PCR-Programms**

	Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl der Zyklen
<i>Hold Stage</i>	95	2 Minuten	1
<i>PCR Stage</i>	95	15 Sekunden	40
	60	1 Minute	
<i>Melt Curve Stage</i>	95	15 Sekunden	1
	60	1 Minute	
	95	15 Sekunden	

2.2.2.5 Auswertung der qRT-PCR

Die Auswertung der qRT-PCR-Daten wurde mit Microsoft Excel 2019 durchgeführt (vgl. Tbl. 17). Sie erfolgte anhand der ermittelten Ct-Werte (*cycle threshold*) auf Basis der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) unter Normalisierung auf das *TATA*-

Bindeprotein (Tbp) als *Housekeeping-Gen* (vgl. 3.1.1). Es werden Mittelwerte gezeigt. Die Anzahl der biologischen Replikate in den Abbildungen wurde mit n gekennzeichnet und in den Bildunterschriften angegeben. Bei $n > 1$ wurde zusätzlich der Standardfehler berechnet. Die Signifikanzberechnungen erfolgten mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test zwischen je zwei Konditionen. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ gewählt. In den Abbildungen sind signifikante Änderungen der Mittelwerte zwischen zwei Konditionen mit einem * gekennzeichnet.

2.2.3 Probenaufbereitung für die Massenspektrometrie

Die Zellüberstände, die wie im Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben, gewonnen worden waren, wurden im Anschluss für die Vermessung mittels Massenspektrometrie weiter aufbereitet. Während dieser Probenaufbereitung wurden ausschließlich Reaktionsgefäße sowie Pipettenspitzen der Firma Eppendorf (vgl. Tbl. 12) verwendet, da am Institut gute Erfahrungswerte hinsichtlich der Verwendung mit einer anschließenden MS-Messung vorlagen.

Zur Vermeidung von Replikat-Effekten wurden die Proben aus den drei Wiederholungen des Experiments außerdem in einer zufälligen Reihenfolge der weiteren Aufbereitung zugeführt.

2.2.3.1 *Ultrazentrifugation*

Die bei -80 °C gelagerten Zellüberstände wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden diese in die speziellen Zentrifugenröhrchen (vgl. Tbl. 12) für die Ultrazentrifuge (vgl. Tbl. 15) überführt. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei $85.000 \times g$ und 4 °C für 30 Minuten. Der Überstand über dem Pellet wurde nach der Zentrifugation vorsichtig abgenommen, in ein 5 ml Reaktionsgefäß überführt und wieder auf Eis gelagert.

2.2.3.2 *Aufkonzentrierung mittels Zentrifugationsfilter*

Die Aufkonzentrierung erfolgte direkt im Anschluss. Zunächst wurden die Filtereinheiten des Zentrifugationsfilters (vgl. Tbl. 12) zur Befeuchtung durch Einfüllen und anschließendes Abgießen von je 1 ml DPBS vorbenetzt (vgl. Tbl. 3). Daraufhin wurde der ultrazentrifugierte Überstand auf die Filter gegeben. Die Zentrifugation erfolgte bei $3220 \times g$ und 4 °C (vgl. Tbl. 15). Es wurde so lange zentrifugiert, bis das Volumen des aufkonzentrierten Überstands im Filter 70-90 μl betrug. Dies dauerte etwa 2 h und 15-30 min. War das Zielvolumen erreicht wurde der Überstand mit einer Pipette aus dem Filter entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (vgl. Tbl. 12) übertragen. Dieses wurde direkt auf Eis gelagert.

Nach der Aufkonzentrierung wurde die Proteinkonzentration mit dem Spektralphotometer und der zugehörigen Software bestimmt (vgl. Tbl. 15, Tbl. 17) und die Proben bei Bedarf bei -80 °C zwischengelagert.

2.2.3.3 Gelelektrophorese und Färbung des Übersichtsgels

Für einen Gesamtüberblick über die Proteinzusammensetzung der Proben wurde eine 1D-Gelelektrophorese mit anschließender Fluoreszenz-Färbung und Chemilumineszenz-Aufnahme durchgeführt. Dazu wurde ein vorgefertigtes 1D-Gel von Bio-Rad verwendet (vgl. Tbl. 3). Es wurden 10 µg Protein von jeder Probe gemäß der zuvor mit dem Spektralphotometer gemessenen Proteinkonzentration für die Erstellung der Aufnahme eingesetzt.

Zur Vorbereitung wurde für jede Geltasche zunächst das entsprechende Probenvolumen des aufkonzentrierten Überstands mit 3 µl SDS-Probenpuffer (5x) (vgl. Tbl. 6) und Reinstwasser auf ein Gesamtvolumen von 15 µl gebracht. Zusätzlich wurde ein BSA-Standard (vgl. Tbl. 3) in einer Konzentration von 500 ng als Referenz vorbereitet. Dieser wurde ebenfalls mit 3 µl SDS-Probenpuffer (5x) und Reinstwasser auf ein Volumen von 15 µl gebracht. Die so aufbereiteten Proben sowie der BSA-Standard wurden im Anschluss für 5 Minuten bei 95 °C und 440 rpm auf dem Heizblock denaturiert (vgl. Tbl. 15) und mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Sobald alle Proben etwa Raumtemperatur erreicht hatten, wurden die Taschen des Gels einmal mit Lämmli-Puffer (1x) gespült (vgl. Tbl. 6) und das Gel beladen. In die erste Tasche wurde 10 µl eines Unstained Markers aufgetragen (vgl. Tbl. 3). Die weiteren Taschen wurden mit dem BSA-Standard und den Proben befüllt. Frei gebliebene Taschen wurden mit 10 µl SDS-Probenpuffer (1x) befüllt.

Die folgende Gelelektrophorese wurde mit einem Lämmli-Laufpuffer (1x, vgl. Tbl. 6) in der Gelelektrophoresekammer durchgeführt (vgl. Tbl. 15). Die ersten 20 Minuten erfolgte die Einstellung des Stromgebers mit 20 mA, danach wurde auf 50 mA umgestellt. Die Elektrophorese wurde so lange laufen gelassen, bis die blaue Bande des SDS-Puffers unten aus dem Gel gerade vollständig ausgetreten war (etwa 50 Minuten).

Für eine detaillierte Aufnahme mit dem Chemidoc wurde von Ulrike Kettel im Anschluss eine Färbung des Gels mit einem Ruthenium-Fluoreszenz-Farbstoff (vgl. Tbl. 3) durchgeführt. Die Schritte der Färbung sind in folgender Übersicht dargestellt:

Tabelle 20: Schritte der Fluoreszenz-Färbung

Nr.	Schritt	Zusammensetzung der Reagenzien	Zyklen	Dauer
1.	Fixieren	30 % Methanol 7 % Essigsäure → auffüllen auf 100 % mit Reinstwasser	1x 1x	1 h über Nacht
2.	Färben	10 % Methanol 7 % Essigsäure 0,6 µl / 100 ml Ruthenium-Fluoreszenz-Farbstoff → auffüllen auf 100 % mit Reinstwasser	1x	6 h
3.	Entfärben	10 % Methanol → auffüllen auf 100 % mit Reinstwasser	1x 1x 1x	1 h über Nacht 1 h

Für die Herkunft der Chemikalien siehe Tabelle 3. Das Gel wurde für die Färbung in 100 ml der jeweiligen Lösung gegeben und während der jeweiligen Dauer auf den Wippschüttler gestellt (vgl. Tbl. 15). Im Anschluss an die Färbung wurde eine Aufnahme am Chemidoc (vgl. Tbl. 15) erstellt und mit der Software Image Lab 6.0.1. dargestellt (vgl. Tbl. 17)

2.2.3.4 Gelelektrophorese und Färbung der Gele für den In-Gel-Verdau

Für den In-Gel-Verdau der aufkonzentrierten Überstände (vgl. 2.2.3.2) wurden zunächst Polyacrylamid-Gele gegossen. Diese Gele setzten sich aus 3 Schichten zusammen: Der untere Teil bestand aus einem 25%igen Trenngel. Der darüber liegende Teil aus einem 10%igen Trenngel. Der obere Teil bestand aus dem 4%igen Sammelgel.

Die eingesetzte Zusammensetzung der jeweiligen Schichten dieser Trenngele ist in der folgenden Tabelle dargestellt (für die Herkunft der Reagenzien vgl. Tbl. 3 und Tbl. 6):

Tabelle 21: Zusammensetzung der Schichten eines Gels für den In-Gel-Verdau

Trenngel 25 %	Trenngel 10 %	Sammelgel 4 %
0,625 ml Reinstwasser	0,5 ml Reinstwasser	2,275 ml Reinstwasser
1,25 ml Trenngel-Puffer (4x)	0,25 ml Trenngel-Puffer (4x)	0,875 ml Sammelgel-Puffer (4x)
3,125 ml Acrylamid 40 %	0,25 ml Acrylamid 40 %	0,35 ml Acrylamid 40 %
25 µl APS 10 %	5 µl APS 10 %	13,15 µl APS 10 %
5 µl TEMED	1 µl TEMED	2,65 µl TEMED

Zunächst wurde das 25%ige Trenngel angesetzt und auf eine Höhe von 4 cm in die Gelhalterung des Mini-PROTEAN® Tetra Systems eingegossen (vgl. Tbl. 15). Die Schicht wurde mit 750 µl 70%igem Isopropanol (vgl. Tbl. 3) übergossen und bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Nach einer Stunde wurde das Isopropanol abgegossen, 3- bis 4-mal mit Reinstwasser nachgespült und anschließend das in dieser Zeit frisch angesetzte 10%ige Trenngel in einer 0,5 cm dicken Schicht eingefüllt. Auch diese Schicht wurde zur Auspolymerisation mit 750 µl 70%igem Isopropanol überdeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Anschließend wurde die obere Glaskante der Gelhalterung mit einem Klebestreifen abgedichtet und das Gel über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurde der Klebestreifen wieder entfernt, abermals das Isopropanol ausgegossen und erneut 3- bis 4-mal mit Reinstwasser nachgespült. Im letzten Schritt wurde nun das Sammelgel angesetzt und bis zur oberen Kante der Gelkammer eingefüllt. Der Gelkamm wurde eingesetzt und die Aushärtung erfolgte abermals für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Gemäß der gemessenen Proteinkonzentration mittels Spektralphotometer (vgl. 2.2.3.2) wurden 15 µg von jeder Probe für den In-Gel-Verdau eingesetzt. Die Aufbereitung der Proben und der BSA Referenz vor dem Auftrag auf das Gel erfolgte analog zur Beschreibung im Abschnitt 2.2.3.3. Als Marker wurde in diesem Fall All Blue eingesetzt (vgl. Tbl. 3), welcher im Verhältnis 1:5 mit SDS-Probenpuffer (1x) verdünnt (vgl. Tbl. 6) und zu je 10 µl in die erste Tasche jedes Gels aufgetragen wurde. Zwischen den Proben wurde hier je eine Tasche mit 10 µl SDS-Probenpuffer (1x) befüllt, um das spätere Ausschneiden der einzelnen Banden zu erleichtern.

Für die anschließende Gelelektrophorese in der Gelelektrophoresekammer wurde dieses Mal ein Fling-Gregerson-Laufpuffer (1x) verwendet (vgl. Tbl. 6), welcher seinen Namen von seinen ursprünglichen Entwicklern Fling und Gregerson (1986) hat. Der Stromgeber wurde auf 100 V eingestellt und die Spannung so lange angesetzt, bis die komprimierte Bande vollständig in das 10%ige Trenngel eingelaufen war. Dies wurde angenommen, sobald sich der All Blue Marker begann aufzutrennen.

Die Gele wurde im Anschluss zur Sichtbarmachung der Proteinbanden im Gel mittels Coomassie Blau gefärbt (vgl. Tbl. 3). Die Coomassie-Blau-Färbung erfolgte in mehreren Schritten. Diese sind in der folgenden Übersichtstabelle dargestellt:

Tabelle 22: Schritte der Coomassie-Blau-Färbung

Nr.	Schritt	Zusammensetzung der Reagenzien	Zyklen	Dauer
1.	Fixierung	40 % Methanol 2 % Ortho-Phosphorsäure → auffüllen auf 100 % mit Reinstwasser	1x	1 h
2.	Wässerung	100 % Reinstwasser	3x	20 min
3.	Äquilibrierung	34 % Methanol 2 % Ortho-Phosphorsäure 17 % Ammoniumsulfat → auffüllen auf 100% mit Reinstwasser	1x	1 h
4.	Färbung	34 % Methanol 2 % Ortho-Phosphorsäure 17 % Ammoniumsulfat 0,066 % Coomassie-Blau-Farbstoff → auffüllen auf 100 % mit Reinstwasser	1x 1x	über Nacht 3 h
5.	Wässerung	100 % Reinstwasser	Mehrmals, bis der Hintergrund des Gels nicht mehr blau erschien.	

Für die Herkunft der Chemikalien siehe Tabelle 3. Während der Einwirkzeit jedes Schrittes wurden die Gele in je 100 ml der jeweiligen Lösung bei Raumtemperatur auf den Wippschüttler gestellt (vgl. Tbl. 15).

2.2.3.5 In-Gel-Verdau

Für den In-Gel-Verdau wurden die zuvor angefärbten Gelbanden vorsichtig ausgeschnitten, in vier Teile zerkleinert und alle vier Teile zusammen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (vgl. Tbl. 12).

Aus Ammoniumbicarbonat (vgl. Tbl. 3) wurde mit Reinstwasser eine 25 mM Lösung erstellt. Separat wurde eine Lösung bestehend aus 25 mM Ammoniumbicarbonat und 50 % Acetonitril erstellt (vgl. Tbl. 3). Abwechselnd wurden nun zuerst 200 µl der reinen Ammoniumbicarbonatlösung und dann 200 µl der Ammoniumbicarbonatlösung mit Acetonitril für jeweils zehn Minuten auf die Gelstücke gegeben und danach wieder mit einer Pipette abgenommen. Diese Waschschrte wurden so oft durchgeführt, bis die Gelstücke nicht mehr sichtbar blau gefärbt waren. Dies erforderte in der Regel fünf Wiederholungen.

Im Anschluss wurden jeweils 200 µl 100%iges Acetonitril auf die Gelstücke gegeben. Dieses wurde nach zehn Minuten wieder abgenommen und die Gelstücke für 10-15 Minuten bei geöffnetem Deckel des Reaktionsgefäßes und Raumtemperatur trocknen gelassen.

Nun wurden je 80 µl DTT (vgl. Tbl. 3), welches zuvor zu 10 mg/ml in der 25 mM Ammoniumbicarbonatlösung gelöst worden war, in die Reaktionsgefäße gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden dann für 15 Minuten bei 50 °C und 350 rpm auf dem Heizblock erwärmt (vgl. Tbl. 15). Im Anschluss kamen sie für zwei bis drei Minuten auf Eis und das DTT wurde wieder mit einer Pipette abgenommen. Daraufhin wurden für 15 Minuten jeweils 200 µl des 100%igen Acetonitrils zugegeben und der Überstand anschließend abermals abgenommen. Es folgte ein weiterer Trocknungsschritt bei geöffnetem Deckel für 10-15 Minuten.

Danach wurden je 80 µl einer 216 mM Iodacetamid-Lösung (vgl. Tbl. 3, ebenfalls in 25 mM Ammoniumbicarbonat gelöst) in jedes Reaktionsgefäß gegeben und diese für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und es folgten wieder zwei Waschschritte wie im zweiten Absatz dieses Unterkapitels beschrieben, diesmal jedoch mit jeweils 500 µl der entsprechenden Lösungen bei fünfminütiger Einwirkzeit. Anschließend wurden für 15 Minuten 200 µl 100%iges Acetonitril zugegeben und wieder abgenommen. Es erfolgte wieder eine Trocknung der Gelstücke bei Raumtemperatur und geöffnetem Deckel für etwa 15 Minuten.

Zur Spaltung der Proteine in Peptide wurde nun das LysC-Trypsin vorbereitet (vgl. Tbl. 3). Pro Reaktionsgefäß wurden 600 ng des Trypsin-Mixes mit 20 µl von einer 25 mM Ammoniumbicarbonatlösung mit 2 % Acetonitrilanteil gemischt (vgl. Tbl. 3). Diese 20 µl wurden dann in die Reaktionsgefäße mit den nun trockenen Gelstücken gegeben und diese quellen gelassen. Nach zehn Minuten wurden nochmals 30 µl der 25 mM Ammoniumbicarbonatlösung mit 2 % Acetonitril dazu gegeben und nach weiteren zehn Minuten noch einmal 10 µl. Über Nacht (maximal 16 h) wurden die Proben in einer geschlossenen und mit feuchten Tüchern ausgelegten Box im Brutschrank bei 37 °C inkubiert (vgl. Tbl. 15).

Am darauffolgenden Tag wurden die Proben aus dem Brutschrank entnommen und die Peptide mit 60 µl 1%iger TFA-Lösung (vgl. Tbl. 3) für eine Stunde aus den Gelstücken eluiert. Das Eluat über den Gelstücken wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein spezielles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (LoBind®-Reaktionsgefäß von Eppendorf, vgl. Tbl. 12). Die Gelstücke wurden anschließend noch mit je 50 µl 90%iger Acetonitril Lösung

(vgl. Tbl. 3) mit 0,1 % TFA-Zugabe ausgewrungen. Nach 30 Minuten wurden noch einmal weitere 10 µl derselben Lösung für 10 Minuten hinzugegeben. Der auf diese Weise gewonnene Überstand über den Gelstücken wurde dem Eluat in den LoBind®-Reaktionsgefäßen zugeführt.

Das gesamte Eluat wurde zum Abschluss im Rotations-Vakuumkonzentrator (vgl. Tbl. 15) bei 45 °C lyophilisiert, bis keine Flüssigkeit mehr vorhanden war. Dies dauerte ungefähr 2 Stunden. Die lyophilisierten Proben wurden bis zum Auftrag in die *Autosampler*-Fläschchen für die Massenspektrometrie im Kühlschrank gelagert.

2.2.3.6 *Probenauftrag in die Autosampler-Fläschchen*

Unmittelbar vor der Messung im Massenspektrometer wurden die lyophilisierten Proben in einer 1%igen TFA-Lösung rekonstituiert und in *Autosampler*-Fläschchen gegeben (vgl. Tbl. 12).

Zur Herstellung der 1%igen TFA-Lösung wurde hier 100%iges TFA mithilfe des bei 0,2 µm gefilterten Wassers verdünnt (vgl. Tbl. 3). Die lyophilisierten Proben wurden dann in je 30 µl dieser Verdünnung aufgenommen. Nach 3-maligem Auf- und Abpipettieren im Reaktionsgefäß zur ersten Vermischung wurden die Proben zur weiteren Rekonstitution für fünf Minuten in ein Ultraschallbad gestellt (vgl. Tbl. 15). Anschließend wurden sie für zehn Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Im letzten Schritt wurden sie mit einer Pipette luftblasenfrei in das *Autosampler*-Fläschchen überführt und mit einem Deckel versehen (vgl. Tbl. 12).

2.2.4 Massenspektrometrie und Aufbereitung der Daten

2.2.4.1 *Messung im Massenspektrometer*

Die Messung der Proben im Massenspektrometer wurde durch Dr. Sonja Hartwig durchgeführt. Die Messung erfolgte je Probe in Form von drei technischen Replikaten. Pro Replikat wurden dabei je 3 µl der rekonstituierten Proben eingesetzt (vgl. 2.2.3.6). Zunächst erfolgte eine Auftrennung des Peptidgemischs mittels RP-UPLC (*reverse phase ultra performance liquid chromatography*) auf dem UltiMate 3000 Hochleistungs-Flüssigchromatographen (vgl. Tbl. 16). Nach Elektrospray-Ionisation durch eine Nanospray Flex™ Ionenquelle wurden die Ionen anschließend in einem Orbitrap Exploris 480 Massenspektrometer vermessen (vgl. Tbl. 16 und Software: Tune / Xcalibur 3.0, Tbl. 17).

Für die RP-UPLC wurden die gelösten Peptide in einem ersten Schritt auf die Acclaim™ PepMap™ C18-LC-Vorsäule geladen (Innendurchmesser: 75 µm, Länge: 2 cm, vgl. Tbl. 16). Die chromatographische Trennung erfolgte im Anschluss über einen zweistündigen Gradienten mit einer Aurora series-UPLC-Trennsäule (Innendurchmesser: 75 µm, Länge: 25 cm, stationäre Phase: C18, vgl. Tbl. 16). Als mobile Phasen wurden die beiden Puffer A und B eingesetzt (vgl. Tbl. 7). Es wurde zunächst ein 72-minütiger Gradient auf eine 19%ige Konzentration des Puffers B aufgebaut, gefolgt von einem 28-minütigen Gradienten auf eine 29%ige Konzentration des Puffers B und zuletzt ein 20-minütiger linearer Gradient auf eine 41%ige Konzentration des Puffers B. In den jeweiligen Zeitintervallen verliefen die Gradienten linear. Danach folgten drei Spülschritte bei alternierend hoher (bis 95 %) und niedriger (bis 2 %) Konzentration des Puffers B. Die Flussrate betrug 300 nl pro Minute, die Säulentemperatur 40 °C.

Die massenspektrometrische Datenerhebung erfolgte durch das Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie im DDA *cycle time*-Modus (*data dependent acquisition*) nach der *Bottom-Up* Methode. Dabei wurden alle 2 Sekunden *Full Scan*-Spektren mit einer Auflösung von 120.000 erstellt. Der m/z-Messbereich des Scans betrug 350-1200 bei einem Zielwert von 300 %. Die maximale Injektionszeit wurde auf *Auto Mode* eingestellt. Für die Auswahl der Precursor-Ionen wurden unter anderem folgende Filter angewendet: Peptide, Ladungsstatus 2-6, dynamische Ausschlusszeit 45 Sekunden und eine Intensitätsschwelle von $1.0 \cdot 10^4$. Die Isolierung der Ionen erfolgte im Quadrupol mit einem tolerierten m/z-Bereich von 1,6. Die Fragmentierung erfolgte durch das HCD-Verfahren (*higher energy collisional dissociation*) mit einer Kollisionsenergie von 30 % und die Fragmente wurden in der Orbitrap mit einer Auflösung von 15.000 vermessen. Das AGC-Ziel (*automatic gain control*) wurde auf den Standardmodus eingestellt, mit einem Zielwert von 100 % und einer maximalen Injektionszeit von 22 ms.

2.2.4.2 *Aufbereitung der Rohdaten*

Die Rohdaten der MS-Messung wurden mithilfe der Software Proteome Discoverer 2.5 (PD) weiter aufbereitet (vgl. Tbl. 17). Die Schritte der in diesem Unterkapitel (2.2.4.2) beschriebenen Aufbereitung erfolgten ebenfalls durch Dr. Sonja Hartwig.

Für die Rekalibrierung der Spektren wurde der *SpectrumRC node* mit der UniProtKB-FASTA-Datenbank ‚*reviewed SwissProt, Mus musculus TaxID 10090 canonical*‘ vom 31.03.2021 genutzt.

Der *Sequest HT node* im *processing step* suchte gegen die folgenden UniProtKB-Datenbanken: *reviewed SwissProt*, *Mus musculus TaxID 10090*, *canonical and isoforms* vom 31.03.2021, sowie *Equus caballus TaxID 9796* und *Bovinus taurus TaxID 9913*. Das verwendete Spaltenzym war Trypsin, in der Analyse wurden dabei zwei verpasste Spaltstellen erlaubt. Bei der Fragmentierung mittels HCD entstanden vornehmlich b und y Ionen, die gewählte Massentoleranz betrug 0,02 Dalton. Als fixe Modifikationen wurden die Carbamidomethylierung der Cysteine zugelassen, als variable Modifikationen die Acetylierung, der Methionin-Verlust und die Acetylierung in Kombination mit einem Methionin-Verlust am N-Terminus. Die Oxidation von Methionin wurde ebenfalls erlaubt. Die Validierung der Daten mittels dem *percolator node* erfolgte mit einem maximalen delta-Cn von 0,05. Für die labelfreie Quantifizierung wurde der *Minora feature detector node* in den Standard-Einstellungen genutzt (Minimale Spurlänge = 5, max. delta RT der Isotopen-Multipletts = 0,2 min., für das *feature to ID linking* wurden nur *peptide spectrum matches* (PSM) der Kategorie „*high confident*“ zugelassen)

Im ‚*consensus step*‘ erfolgte anschließend eine labelfreie Quantifizierung. Die maximal erlaubte Retentionszeitverschiebung wurde dabei auf 10 Minuten eingestellt, mit einer Massentoleranz von 10 ppm und einem minimalen Signal- zu Rausch-Verhältnis von 5 für *linked und mapped features*. Die Quantifizierung der Precursor basierte auf der Intensität. Mindestens 50 % sind in den *replicate features* enthalten.

2.2.4.3 Auswertung der MS-Daten

Die weitere Auswertung der so aufbereiteten Rohdaten erfolgte anschließend ebenfalls mit der Software Proteome Discoverer 2.5 (PD, vgl. Tbl. 17). Zunächst wurde der Datensatz gefiltert: nur Masterproteine der Spezies *Mus musculus*, welche mit mindestens zwei eindeutigen Peptiden und mit einer *false discovery rate* (FDR) < 1 % („*confidence high*“) identifiziert wurden, wurden in der weiteren Analyse zugelassen. Kontaminanten wurden ausgeschlossen. Ebenfalls sollte das Protein in mindestens drei unabhängigen Proben identifiziert worden sein.

Für die Definition eines signifikant regulierten Proteins zwischen zwei Konditionen wurde in dieser Arbeit jede Abundanzänderung zu einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$ gewählt.

Die Analyse der sekretorischen Signalsequenzen und dadurch Einteilung in die vier Kategorien klassisch sekretorisch (SP+), unkonventionell sekretorisch (SP-), kein Anhalt für

eine sekretorische Sequenz (NP) und nicht klassifizierbar (NK) erfolgte anhand der bioinformatischen Algorithmen SignalP 5.0 und SecretomeP 2.0 (vgl. Tbl. 18).

Zur weiteren Analyse und Darstellung der Daten wurde darüber hinaus Microsoft Excel 2019 eingesetzt (vgl. Tbl. 17).

3 Ergebnisse

3.1 Quantitative Echtzeit-PCR von Differenzierungsmarkern und *IL-6*

Mithilfe der qRT-PCR sollte eine ausreichende Differenzierung der C2C12-Myoblasten zu Myotuben eingeschätzt werden. Die Untersuchung der *IL-6*-Expression diente zur Einschätzung der Kontraktion der Zellen in Reaktion auf die EPS. Die Aufbereitung der Proben und Durchführung der qRT-PCR erfolgte gemäß Kapitel 2.2.2.

3.1.1 Vorstudie zur Expression von Differenzierungsmarkern in C2C12-Zellen

Im Sinne einer Vorstudie wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der C2C12-Zellen in drei biologischen Replikaten, wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben, differenziert und jeweils an Tag 0 vor Gabe des Differenzierungsmediums sowie an Tag 3 und Tag 6 gestoppt wurden (vgl. 2.2.1.5). All diese Zellen zeigten an Tag 6 in der visuellen Begutachtung unter dem Mikroskop, ausgehend von Erfahrungswerten der Arbeitsgruppe mit der C2C12-Kultivierung, einen als angemessen eingeschätzten Differenzierungsgrad mit ausgeprägten und gleichmäßigen Myotubenformationen. Aus diesen Zellen wurde die mRNA isoliert und eine quantitative Echtzeit-PCR mit den Differenzierungsmarkern *Desmin*, *Myogenic factor 5 (Myf5)*, *Myogenin (MyoG)*, *Myoblast determination protein 1 (MyoD)* und *Myosin heavy chain 2 (Myh2)* durchgeführt, um Referenzwerte für die Beurteilung der Differenzierung zu ermitteln.

Bei der Auswertung wurde auf die Expression von *TATA-Bindeprotein (Tbp)* normalisiert. *Tbp* wurde aus den ebenfalls getesteten Genen *18 S*, *Beta-Aktin (ActB)*, *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)* und *Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)* als *Housekeeping-Gen* ausgewählt, da sich hier zum Signifikanzniveau von $p < 0,05$ keine signifikante Expressionsänderung zwischen den Konditionen zeigte. Dies traf ebenfalls auf *18 S* zu. Bei *Tbp* war die Abweichung der Ct-Werte zwischen den Konditionen jedoch im Vergleich geringer, sodass *Tbp* im Folgenden als *Housekeeping-Gen* eingesetzt wurde.

Abbildung 2 zeigt die relativen mRNA-Expressionen der getesteten Differenzierungsmarker im Vergleich zu Tag 0:

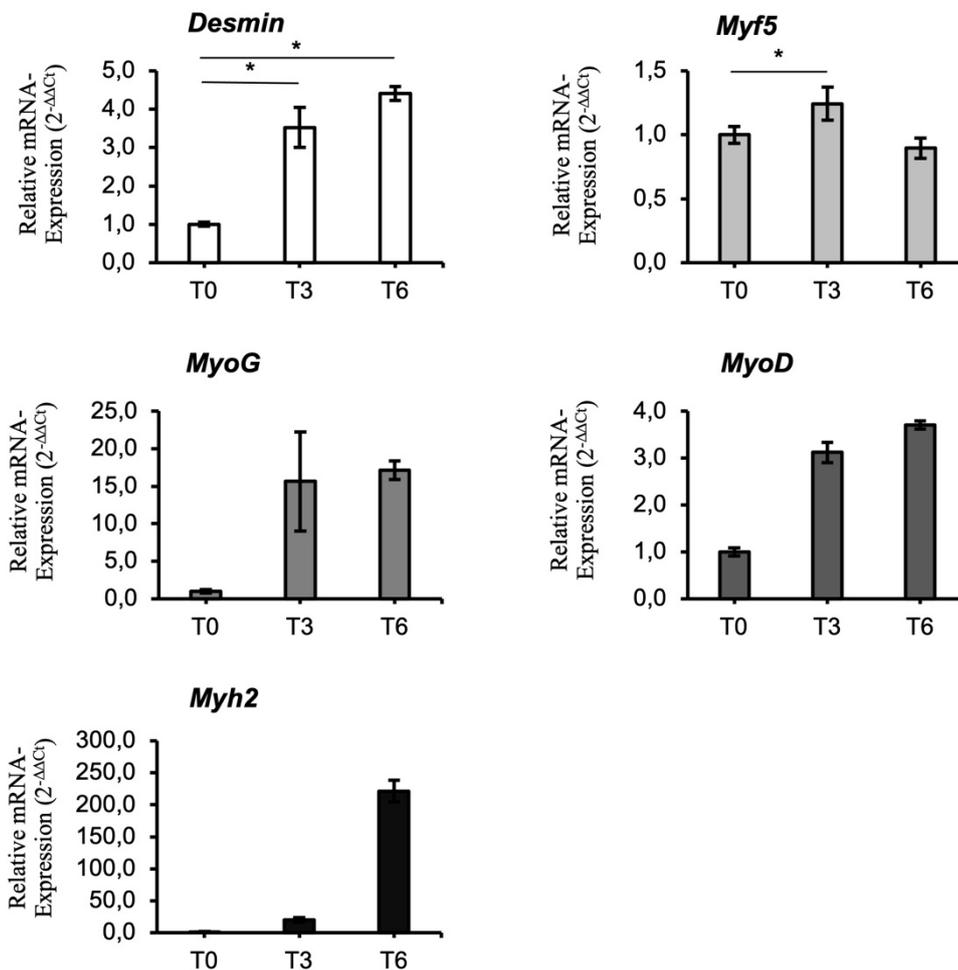


Abb. 2: Expression von Differenzierungsmarkern in der Vorstudie

Das Expressionslevel an Tag 0 (T0) wurde als Referenz auf 1,0 gesetzt und die relativen Expressionslevel des jeweiligen Gens von Tag 3 (T3) und Tag 6 (T6) hierauf normiert. Das * kennzeichnet eine zu $p < 0,05$ signifikante Änderung der relativen Genexpression nach Ermittlung durch einen zweiseitigen, ungepaarten t-Test. (Mittelwert \pm Standardfehler; $n = 3$)

Für die Differenzierungsmarker *Desmin*, *MyoG*, *MyoD* und *Myh2* zeigte sich im Mittel ein Anstieg der mRNA-Expression von Tag 0 über Tag 3 hin zu Tag 6. Die Expression von *Myf5* stieg von Tag 0 zu Tag 3 an, während die mittlere Expression an Tag 6 wieder unter den Wert von Tag 0 abfiel (vgl. Abbildung 2).

Zum Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zeigte sich für die Expression von *Desmin* sowohl von Tag 0 zu Tag 3 (3,5-facher mittlerer Anstieg), als auch von Tag 0 zu Tag 6 (4,4-facher mittlerer Anstieg) und für *Myf5* von Tag 0 zu Tag 3 (1,2-facher mittlerer Anstieg) eine

signifikante Änderung. *MyoG* und *Myh2* zeigten einen nicht signifikanten, jedoch ausgeprägten Anstieg von Tag 0 zu Tag 6 mit einem mittleren Anstieg der relativen Expression um etwa das 15- bzw. über 200-fache. *MyoD* erreichte eine Steigerung um etwa den Faktor 3,5 (vgl. Abbildung 2). Der Unterschied in der Genexpression einiger dieser fünf Marker schwankte zwischen den drei biologischen Replikaten deutlich, so zeigte insbesondere *Myh2* an Tag 6 im ersten Replikat eine etwa 80-fache Steigerung der mRNA-Expression im Vergleich zu Tag 0, während diese im zweiten Replikat etwa das 300-fache und im dritten Replikat das etwa 130-fache erreichte. Für *MyoG* betragen diese Expressionssteigerungen für das erste Replikat in etwa das 5-fache, für das zweite Replikat das ungefähr 15-fache und für das dritte Replikat in etwa das 30-fache.

Für den folgenden Versuch wurden als Referenzgene die drei Differenzierungsmarker *Desmin*, *MyoG* und *Myh2* ausgewählt, da diese in der Vorstudie einen signifikanten (*Desmin*) beziehungsweise den deutlichsten (*MyoG*, *Myh2*) Anstieg der Genexpression nach Differenzierung gezeigt hatten.

3.1.2 Expression der Differenzierungsmarker in den Zellen der EPS-Versuche

Basierend auf den zuvor beschriebenen Ergebnissen (vgl. 3.1.1) sollten auch die für die Sekretomanalyse mit EPS stimulierten Zellen hinsichtlich ihres Differenzierungsstatus beurteilt werden. Hierbei handelte es sich ebenfalls um drei biologische Replikate. Bei der visuellen Beurteilung mit dem Mikroskop waren dabei die ersten beiden biologischen Replikate in Übereinstimmung mit der Beschreibung in 3.1.1 als angemessen differenziert beurteilt worden, während das dritte Replikat weniger und schwächer ausgeprägte Myotubenformationen gezeigt hatte.

Die folgende Abbildung stellt die relativen Expressionen der Differenzierungsmarker für diese drei Replikate im Einzelnen dar:

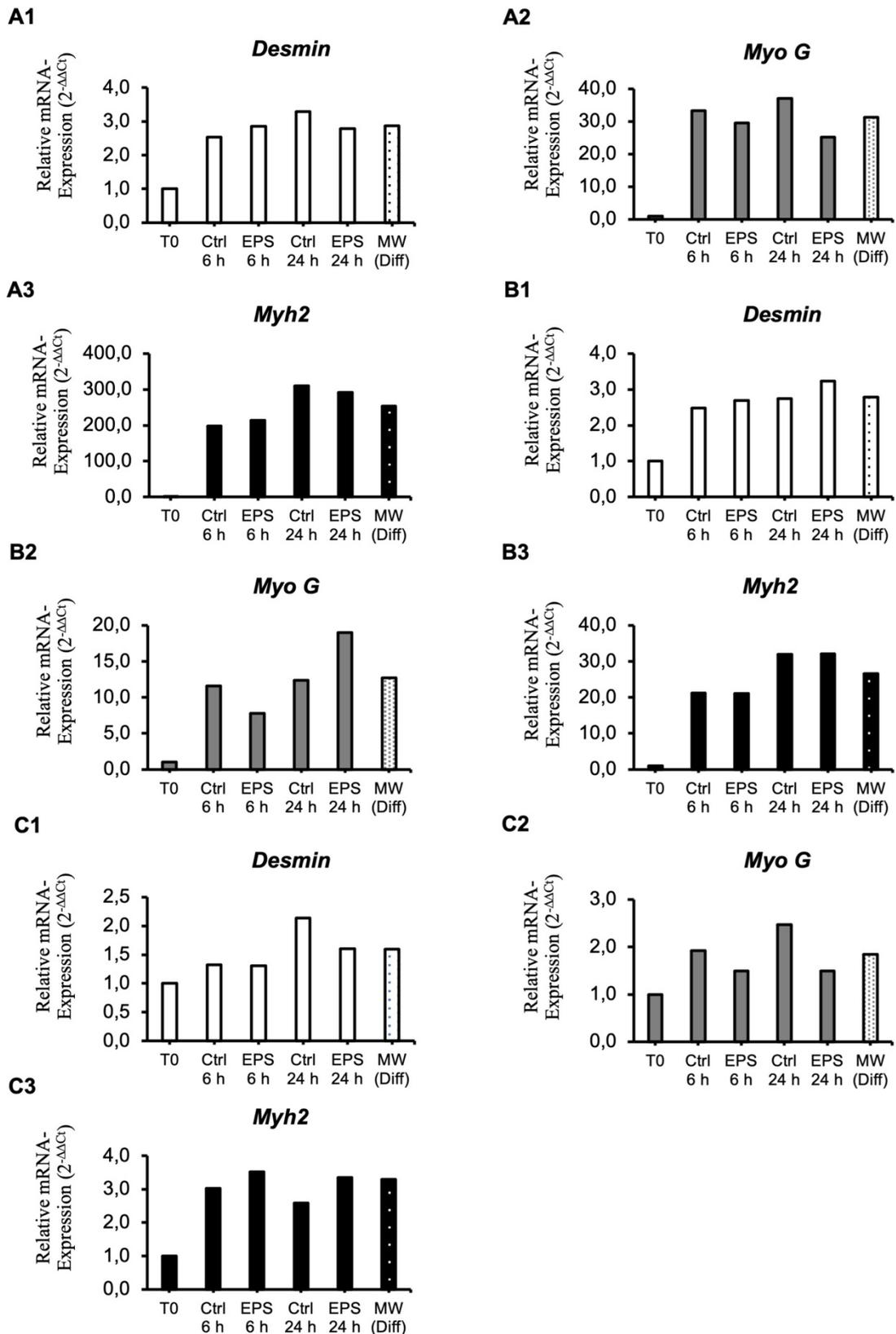


Abb. 3: Expression der Differenzierungsmarker vor der Differenzierung und nach EPS

Das Expressionslevel des entsprechenden Gens an Tag 0 (T0) vor der Differenzierung wurde als Referenz auf 1,0 gesetzt und die relativen Expressionslevel der EPS- und Kontrollzellen hierauf normiert. EPS = Proben der Zellen, welche mit EPS behandelt wurden; Ctrl = Proben der nicht stimulierten Kontrollzellen; A1-A3 = Zellen des ersten biologischen Replikats; B1-B3 = Zellen des zweiten biologischen Replikats; C1-C3 = Zellen des dritten biologischen Replikats. Der letzte Balken (MW(Diff)) stellt jeweils den Mittelwert aus allen vier Konditionen nach der Differenzierung dar.

Für alle drei untersuchten Differenzierungsmarker *Desmin*, *MyoG* und *Myh2* und in allen drei biologischen Replikaten zeigte sich wie in der Vorstudie ein relativer Anstieg der Genexpression im Vergleich zum jeweiligen Tag 0. Dieser Anstieg war besonders bei den Genen *MyoG* und *Myh2* in den drei biologischen Replikaten sehr unterschiedlich ausgeprägt, wie dies zuvor auch im Referenzversuch beobachtet worden war. Auch zwischen den verschiedenen Konditionen innerhalb eines Replikats zeigten sich bei *MyoG* und *Myh2* etwas deutlichere Unterschiede in der Genexpression als bei *Desmin* (vgl. Abbildung 3).

In dem ermittelten Durchschnitt aller vier Konditionen (MW(Diff), vgl. Abbildung 3) zeigte sich für das erste Replikat eine etwa 3-fache Erhöhung der mRNA-Expression von *Desmin*, eine etwa 30-fache Erhöhung von *MyoG* und eine über 200-fache Erhöhung von *Myh2*. Für das zweite biologische Replikat betrug die Steigerungen ebenfalls etwa das 3-fache für *Desmin*, etwa das 15-fache für *MyoG* und etwa das 30-fache für *Myh2*. Im dritten Replikat fiel ein deutlich verminderter Anstieg der Expression aller drei Gene mit relativen Expressionsänderungen von nur etwa dem Faktor 1,5 für *Desmin*, weniger als 2 für *MyoG* und etwa 3 für *Myh2* auf (vgl. Abbildung 3).

3.1.3 Expression von *IL-6* in den Zellen der EPS-Versuche

Zur Einschätzung der Kontraktion durch die elektrische Pulsstimulation wurde mit den Proben aus 3.1.2 zusätzlich eine qRT-PCR hinsichtlich der Expression von *Interleukin-6* (*IL-6*) durchgeführt.

Es zeigt sich für alle drei Replikate ein Anstieg der *IL-6*-mRNA-Expression nach Tag 0. Für die Zellen des ersten und zweiten biologischen Replikats zeigte sich jeweils ein vermehrter Anstieg der *IL-6*-Expression in den mit EPS behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (vgl. Abbildung 4). In den Zellen des dritten Replikats war dieser Expressionsanstieg durch EPS nach 6 Stunden Behandlung im Vergleich zur Kontrolle nur minimal ausgeprägt. Nach 24 Stunden Behandlung zeigte sich hier ein stärkerer Anstieg in den Kontrollzellen als in den EPS-behandelten Zellen. Generell stellte sich die Gesamtsteigerung der Expression von *IL-6* nach 24 Stunden in diesem Replikat sehr ausgeprägt dar (vgl. Abbildung 4).

Abbildung 4 zeigt die auf den jeweiligen Tag 0 normierten relativen Expressionssteigerungen der mRNA von *IL-6* in allen drei biologischen Replikaten:

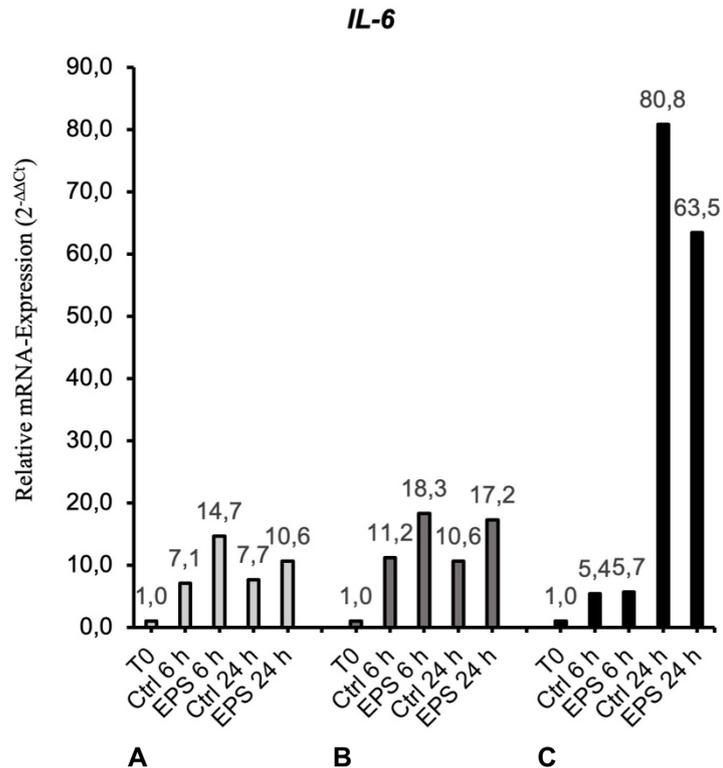


Abb. 4: **Relative Expression von *IL-6* vor der Differenzierung und nach EPS**

Das jeweilige Expressionslevel von *IL-6* an Tag 0 (T0) wurde auf den Wert 1,0 gesetzt und die Expressionslevel der vier Konditionen hierzu in Referenz gesetzt; EPS = Proben der Zellen, welche mit EPS behandelt wurden; Ctrl = Proben der nicht stimulierten Kontrollzellen; A = Zellen des ersten biologischen Replikats; B = Zellen des zweiten biologischen Replikats; C = Zellen des dritten biologischen Replikats.

3.2 Sekretomanalyse aus den Zellüberständen

3.2.1 1D-Gel zur visuellen Qualitätskontrolle

Die Analyse des Sekretoms wurde aus den Zellüberständen der mit EPS behandelten Zellen und deren jeweiliger Kontrollzellen durchgeführt (vgl. 2.2.1.4).

Um einen Überblick für die Qualität der Probenzusammensetzung nach der Ultrazentrifugation und Aufkonzentrierung zu bekommen (vgl. 2.2.3.1 – 2.2.3.2), sowie zur Beurteilung, ob sich grobe Rückstände von bovinem Serumalbumin (BSA) als Zeichen einer überlagernden Serumkontamination in den Proben befanden, wurde zunächst ein 1D-Gel gemäß 2.2.3.3 angefertigt.

Abbildung 5 zeigt eine Aufnahme des 1D-Gels nach Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff:

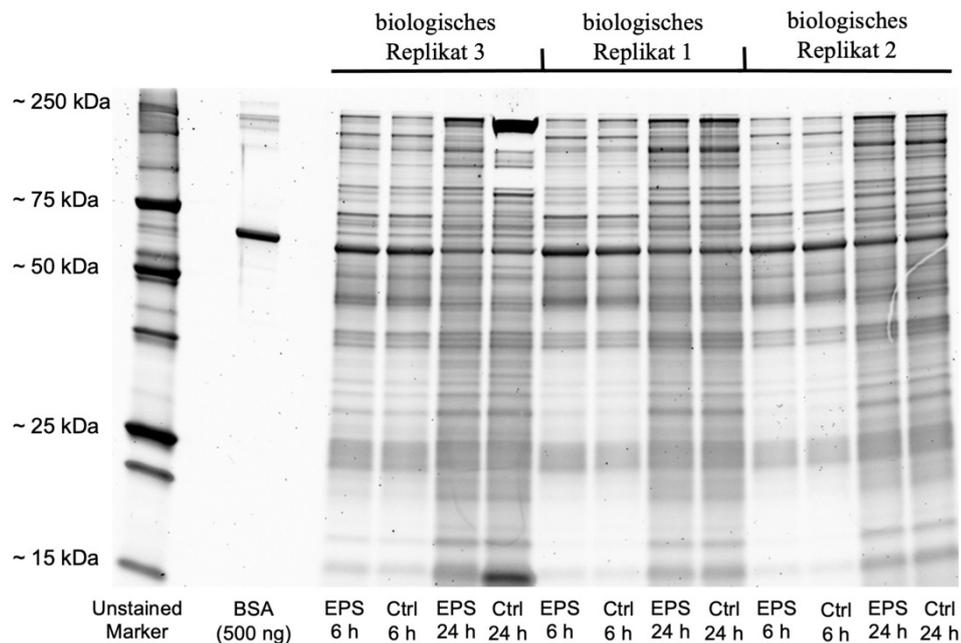


Abb. 5: 1D-Gel der aufkonzentrierten Zellüberstände.

Es wurden je Probe jeweils 10 µg Protein aufgetragen. Das Gel wurde mit einem Ruthenium-Fluoreszenz-Farbstoff gefärbt (vgl. Tbl. 3). Aufnahmemodus am Chemidoc: 0-5 Sekunden; Unstained Marker (Hersteller: Bio Rad, vgl. Tbl. 3); BSA 500 ng (Hersteller: Sigma-Aldrich, vgl. Tbl. 3); EPS = Proben der Zellen, welche mit EPS behandelt wurden; Ctrl = Proben der Kontrollzellen

Es zeigte sich eine gleichmäßige Auffächerung der Proteinbanden in allen Proben über die Gesamtlänge des 1D-Gels. Eine mittelgradig ausgeprägte Bande auf Höhe des BSA war in allen Proben in etwa ähnlicher Stärke zu erkennen. Der Unterschied der Probenzusammensetzung zwischen den Überständen der 6-Stunden-Gruppe und der 24-Stunden-Gruppe war nach visuellem Anschein stärker ausgeprägt als zwischen den Proben aus der jeweiligen EPS- und Kontrollgruppe. Zudem zeigten sich die biologischen Replikate 1 und 2 visuell etwas ähnlicher als das Replikat 3, besonders in Bezug auf die Proben der 24-Stunden-Gruppe. Die Probe „Ctrl 24 h“ des Replikats 3 stach in Form von unspezifischen Verdichtungen etwa auf Höhe der 250 kDa- und der 15 kDa-Bande des Markers visuell hervor (vgl. Abbildung 5).

3.2.2 Identifizierte Proteine nach Basisfilterung

Um die Sekretome der C2C12-Zellen nach der EPS-Behandlung zu analysieren, wurden die Zellüberstände zunächst gemäß 2.2.3.4 – 2.2.3.6 weiter aufbereitet und anschließend wie in

2.2.4.1 beschrieben im Massenspektrometer vermessen. Aus Qualitätsgründen wurde entschieden, das dritte biologische Replikate von der weiteren Sekretomanalyse auszuschließen, da eine erfolgreiche Differenzierung und damit auch Reaktion auf die EPS nicht in ausreichendem Maße angenommen werden konnte. Diese Entscheidung wird im Diskussionsteil näher erläutert und diskutiert (vgl. 4.2.1 und 4.2.2).

Nach Aufbereitung der Rohdaten gemäß 2.2.4.2 erfolgte die anschließende Filterung der Proteinliste in der PD-Software (vgl. 2.1.8) nach zuvor festgelegten Basisparametern (vgl. 2.2.4.3). Nach Applikation dieser Filter ergaben sich insgesamt 2917 identifizierte Masterproteine. Diese waren alle ausschließlich der Spezies Maus zugeordnet und mit mindestens zwei eindeutigen Peptiden in mindestens drei der technischen und/oder biologischen Replikaten identifiziert worden. Mit nur einem eindeutigen Peptid wurden weitere 288 Proteine identifiziert. Diese Angabe soll hier jedoch nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden, da die weiteren Analysen ausschließlich mit den Masterproteinen erfolgten, welche mit mindestens zwei eindeutigen Peptiden identifiziert worden waren.

Eine Hauptkomponentenanalyse der normalisierten Proteinabundanz zeigte eine größere Unterschiedlichkeit der ermittelten Sekretome nach 6 und 24 Stunden als der Sekretome der jeweiligen EPS- und Kontrollzellen bei gleicher Stimulationszeit (vgl. Abbildung 6):

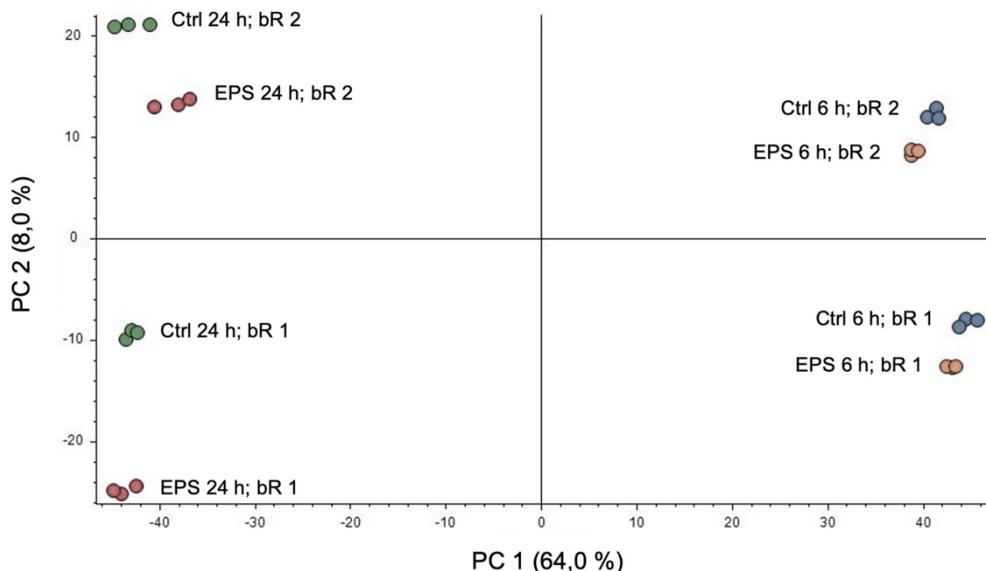


Abb. 6: **Hauptkomponentenanalyse der normalisierten Proteinabundanz**

Die farbig ausgefüllten Punkte, welche nah beieinander liegen, markieren die drei technischen Replikate der jeweiligen Kondition. EPS = Proben der Zellen, welche mit EPS behandelt wurden; Ctrl = Proben der Kontrollzellen; bR = biologisches Replikate; PC = *principal component* / Hauptkomponente

Die jeweiligen technischen Replikate lagen im Cluster nahe beieinander, die biologischen Replikate zeigten bei der 24-Stunden-Gruppe untereinander eine etwas größere Unterschiedlichkeit als bei der 6-Stunden-Gruppe (vgl. Abbildung 6).

3.2.3 Marker der Zellvitalität in den Sekretomen

Um einen Anhaltspunkt für die Zellintegrität während der Behandlung und eine daraus möglicherweise resultierende Kontamination des Sekretoms durch intrazelluläre Proteine zu erhalten, wurden die Abundanzen der Laktatdehydrogenase (LDH) in den durch die MS ermittelten Sekretomen der verschiedenen Konditionen verglichen. In allen Konditionen wurde sowohl die LDH-A, als auch die LDH-B identifiziert und quantifiziert.

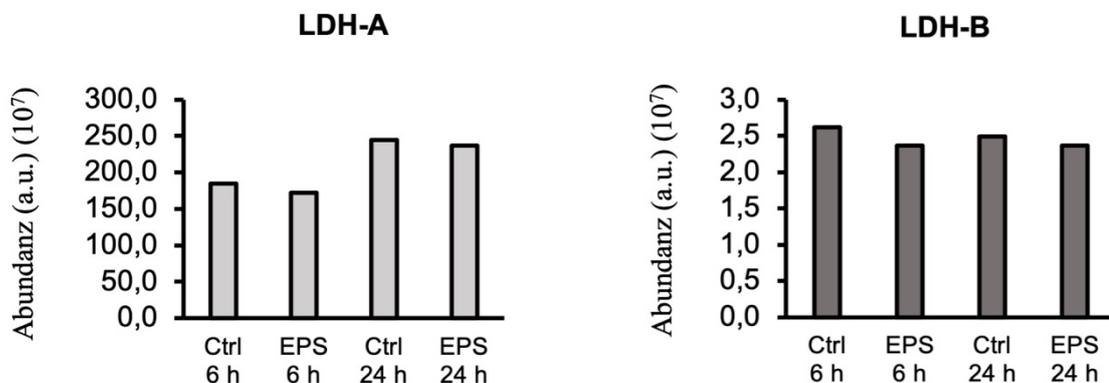


Abb. 7: **Durchschnittliche Abundanzen der Laktatdehydrogenase A und B in den Sekretomen**

Ctrl = Zellen der jeweiligen Kontrollgruppe, EPS = Zellen der jeweils mit EPS stimulierten Gruppe

Die LDH-A zeigte durchschnittlich erhöhte Abundanzen in den Sekretomen der 24-Stunden-Gruppe im Vergleich zu den Sekretomen der 6-Stunden-Gruppe. Zwischen den Konditionen EPS und Kontrolle einer Stimulationsdauer unterschied sie sich weniger in ihrer Abundanz. Die LDH-B unterschied sich durchschnittlich weniger deutlich zwischen den verschiedenen Stimulationsdauern als die LDH-A, und zeigte insgesamt geringere Abundanzen (vgl. Abbildung 7). Zwischen den Konditionen EPS und Kontrolle einer Stimulationsdauer war die Abundanzänderung der LDH-A und der LDH-B zum gewählten Niveau von $p < 0,01$ dabei nicht signifikant (vgl. Tbl. 27-30)

3.2.4 Klassifikation sekretierter Proteine mithilfe bioinformatischer Algorithmen

Für eine Einschätzung des Anteils tatsächlich sekretorischer Proteine im hier analysierten Zellüberstand wurden die bioinformatischen Algorithmen SignalP 5.0 und SecretomeP 2.0

auf die identifizierten Masterproteine angewendet (vgl. Tbl. 18 und 2.2.4.3). Resultierend konnte eine Zuordnung der Proteine in die Kategorien SP+ (klassischer Sekretionsweg mit Signalpeptid), SP- (nicht-klassischer Sekretionsweg), NP (kein Hinweis auf eine Sekretion nach Analyse durch SignalP 5.0 und SecretomeP 2.0) und NK (durch SignalP 5.0 und SecretomeP 2.0 nicht analysierbar) erfolgen.

In die Kategorie SP+ fielen 592 (~ 20 %) der Proteine, in die Kategorie SP- 567 (~ 19 %) und in die Kategorie NP 1748 (~ 60 %) der Proteine (vgl. Abbildung 8). Zehn Proteine konnten nicht klassifiziert werden (NK).

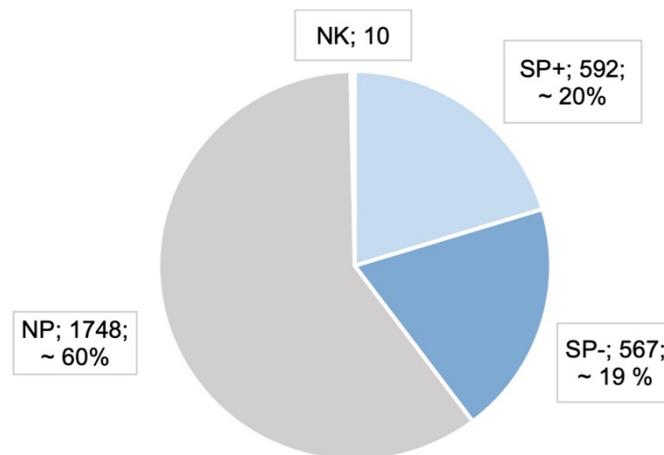


Abb. 8: Sekretorische Klassifikation der identifizierten Masterproteine

Helles Blau = SP+; dunkleres Blau = SP-; Grau = NP; Weiß = NK; Reihenfolge der Beschriftung: 1. Sekretorische Klassifikation; 2. Absolute Anzahl der dieser Kategorie zugeordneten Proteine, 3. Gerundete, prozentuale Angabe der Proteine in dieser Kategorie.

3.2.5 Kontraktionsabhängig sekretierte Proteine

Als kontraktionsabhängig sekretierte Myokine (ksM) wurden in dieser Arbeit alle Proteine definiert, die im Sekretom eine Abundanzänderung zu einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$ zwischen den Proben der EPS- und Kontrollzellen einer jeweiligen Stimulationsdauer aufwiesen. Insgesamt wurden von dieser Art 356 verschiedene Proteine gefunden. Die ermittelten ksMs wurden den vier Kategorien „nach 6 h heraufreguliert“, „nach 6 h herunterreguliert“, „nach 24 h heraufreguliert“ und „nach 24 h herunterreguliert“ zugeordnet, je nachdem, ob die Abundanz der ermittelten Proteine in den Proben der EPS-behandelten Zellen im Vergleich zu den Proben der Kontrollzellen erhöht oder erniedrigt war. In diesen

Kategorien wurden jeweils 116, 78, 148 und 41 Proteine gefunden (vgl. Tbl. 27-30 im Anhang). 27 Proteine wurden in zwei der Kategorien gefunden (vgl. 3.2.6, Tbl. 23-26). Damit waren die meisten kontraktionsabhängig regulierten Proteine der Kategorie „nach 24 h heraufreguliert“ zugeordnet. Für beide Stimulationsdauern war jeweils die Anzahl der heraufregulierten Proteine größer als die der herunterregulierten Proteine.

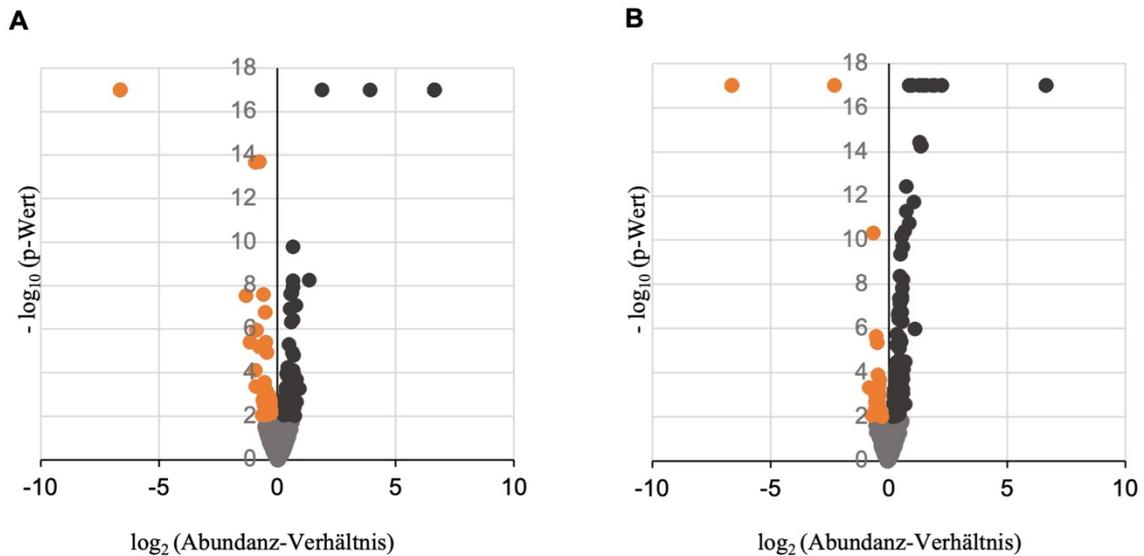


Abb. 9: *Volcano plots* der kontraktionsabhängig sekretierten Proteine

A = EPS 6 h versus Kontrolle 6 h; **B** = EPS 24 h versus Kontrolle 24 h; Orange = durch EPS in der Abundanz herunterregulierte Proteine zu $p < 0,01$; Dunkelgrau = durch EPS in der Abundanz heraufregulierte Proteine zu $p < 0,01$, Hellgrau = Proteine, die nicht signifikant reguliert waren

Die vollständigen Tabellen mit der Listung der gefundenen ksMs finden sich in den Tabellen 27-30 im Anhang (vgl. 6.1).

Die Anteile der als SP+ oder SP- klassifizierten Proteine unterschieden sich in den vier Kategorien. Dabei waren die entsprechenden Gesamtanteile der als potenziell sekretorisch klassifizierten Myokine (SP+/SP-) jeweils höher in der Gruppe der heraufregulierten Proteine als in der Gruppe der herunterregulierten Proteine und insgesamt prozentual höher nach 24-stündiger Behandlung (vgl. Abbildung 10).

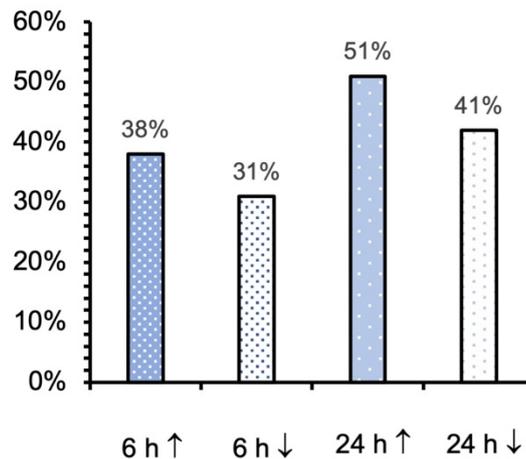


Abb. 10: Sekretorische Klassifikation der gefundenen ksMs in Prozent

Prozentualer Anteil der als SP+ bzw. SP- klassifizierten Proteine an allen ksMs in der jeweiligen Kategorie; 6 h ↑ = nach 6 h EPS heraufregulierte Proteine, 6 h ↓ = nach 6 h EPS herunterregulierte Proteine; 24 h ↑ = nach 24 h EPS heraufregulierte Proteine; 24 h ↓ = nach 24 h EPS herunterregulierte Proteine; ksM = kontraktionsabhängig sekretiertes Myokin;

3.2.6 Schnittmengen der kontraktionsabhängig sekretierten Proteine nach 6 und 24 Stunden

Insgesamt wurden von den 356 verschiedenen identifizierten ksMs nur 27 Proteine (~ 8 %) gefunden, deren Abundanzen im Zellüberstand sowohl nach einer Stimulationsdauer von 6 als auch nach 24 Stunden signifikant verändert waren.

Acht davon waren nach 6 und 24 Stunden gleichgerichtet heraufreguliert und sieben waren gleichgerichtet herunterreguliert. Zwölf Proteine waren gegensätzlich reguliert, davon waren neun Proteine nach 6 Stunden zunächst herunterreguliert und nach 24 Stunden heraufreguliert und drei Proteine nach 6 Stunden zunächst heraufreguliert und nach 24 Stunden herunterreguliert. Der Anteil an als SP+/SP- klassifizierter Myokine war am höchsten in der Gruppe der Proteine, die sowohl nach 6 als auch nach 24 Stunden heraufreguliert waren (50%). Die Tabellen 23-26 auf den folgenden Seiten zeigen die Schnittmengen der kontraktionsabhängig regulierten Proteine nach 6 und 24 Stunden:

Tabelle 23: Proteine, die durch EPS sowohl nach 6 h als auch nach 24 h heraufreguliert waren

	UniProt Accession	Proteinname	Gen- symbol	Abundanz- Verhältnis 6 h EPS vs. 6 h Kontrolle	Abundanz- Verhältnis 24 h EPS vs. 24 h Kontrolle	Sekretorische Klassifikation
1	P10923	Osteopontin	<i>Spp1</i>	3,687	3,566	SP+
2	Q99P72-5	Isoform B of Reticulon-4	<i>Rtn4</i>	15,158	1,275	SP-
3	Q9D0J8	Parathymosin	<i>Ptms</i>	100	1,422	SP-
4	A2AMM0	Caveolae-associated protein 4	<i>Cavin4</i>	100	1,608	SP-
5	P63158	High mobility group protein B1	<i>Hmgbl</i>	1,349	1,972	NP
6	Q61176	Arginase-1	<i>Arg1</i>	1,389	2,447	NP
7	P35980	60S ribosomal protein L18	<i>Rpl18</i>	1,506	1,237	NP
8	Q6ZWN5	40S ribosomal protein S9	<i>Rps9</i>	1,595	1,347	NP

Tabelle 24: Proteine, die durch EPS sowohl nach 6 h als auch nach 24 h herunterreguliert waren

	UniProt Accession	Proteinname	Gen- symbol	Abundanz- Verhältnis 6 h EPS vs. 6 h Kontrolle	Abundanz- Verhältnis 24 h EPS vs. 24 h Kontrolle	Sekretorische Klassifikation
1	Q8BPG6	Inactive C-alpha-formylglycine-generating enzyme 2	<i>Sumf2</i>	0,645	0,01	SP+
2	P48024	Eukaryotic translation initiation factor 1	<i>Eif1</i>	0,01	0,01	SP-

3	P70207	Plexin-A2	<i>Plxna2</i>	0,01	0,01	NP
4	Q80VJ2	Steroid receptor RNA activator 1	<i>Sra1</i>	0,01	0,722	NP
5	Q80V26	Golgi-resident adenosine 3',5'-bisphosphate 3'-phosphatase	<i>Bpnt2</i>	0,545	0,01	NP
6	P97447	Four and a half LIM domains protein 1	<i>Fhl1</i>	0,741	0,638	NP
7	Q99JW4	LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1	<i>Lims1</i>	0,759	0,732	NP

Tabelle 25: Proteine, die durch EPS nach 6 h herunterreguliert und nach 24 h heraufreguliert waren

	UniProt Accession	Proteinname	Gen- symbol	Abundanz- Verhältnis 6 h EPS vs. 6 h Kontrolle	Abundanz- Verhältnis 24 h EPS vs. 24 h Kontrolle	Sekretorische Klassifikation
1	O35988	Syndecan-4	<i>Sdc4</i>	0,822	1,269	SP+
2	Q8BUN5	Mothers against decapentaplegic homolog 3	<i>Smad3</i>	0,01	1,456	SP-
3	Q9JJ00	Phospholipid scramblase 1	<i>Plscr1</i>	0,694	1,436	SP-
4	Q9EPL8	Importin-7	<i>Ipo7</i>	0,777	1,413	NP
5	Q8R349	Cell division cycle protein 16 homolog	<i>Cdc16</i>	0,805	1,149	NP
6	Q920Q6	RNA-binding protein Musashi homolog 2	<i>Msi2</i>	0,01	2,604	NP

7	Q8VCF0	Mitochondrial antiviral-signaling protein	<i>Mavs</i>	0,528	2,078	NP
8	E9Q557	Desmoplakin	<i>Dsp</i>	0,59	1,171	NP
9	Q9D8B3	Charged multivesicular body protein 4b	<i>Chmp4b</i>	0,01	1,388	NP

Tabelle 26: Proteine, die durch EPS nach 6 h heraufreguliert und nach 24 h herunterreguliert waren

	UniProt Accession	Proteinname	Gen- symbol	Abundanz- Verhältnis 6 h EPS vs. 6 h Kontrolle	Abundanz- Verhältnis 24 h EPS vs. 24 h Kontrolle	Sekretorische Klassifikation
1	P12388	Plasminogen activator inhibitor 2, macrophage	<i>Serpinb2</i>	100	0,01	SP-
2	Q9EP82	tRNA (guanine-N(7)-methyltransferase non-catalytic subunit WDR4	<i>Wdr4</i>	1,653	0,204	NP
3	F6VAN0	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 alpha	<i>Atf6</i>	2,541	0,562	NP

Die in PD ermittelten Proteine sind in den Tabellen mit der UniProt Accession, dem englischen Proteinnamen, dem Gensymbol und dem Abundanzverhältnis nach 6 und 24 Stunden im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe aufgelistet. In der letzten Spalte ist die sekretorische Klassifikation angegeben (SK, vgl. 2.2.4.3). Als maximal bzw. minimal ausgegebener Wert für das Abundanzverhältnis wurde in PD ein Wert von 100 bzw. 0,01 gewählt. Dies kann in der Regel so interpretiert werden, dass die entsprechenden Proteine nur in einer der beiden Gruppen detektierbar bzw. quantifizierbar waren.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

Ziel dieser Arbeit war die explorative Analyse und der Vergleich des kontraktionsabhängigen Sekretoms von C2C12-Skelettmuskelzellen nach Behandlung mit EPS für 6 versus 24 Stunden. Vorteile und Limitationen der in dieser Arbeit eingesetzten Zellreihe und der Methoden sollen im Folgenden diskutiert werden.

4.1.1 Wahl einer *in-vitro*-Analyse zur Untersuchung des kontraktionsabhängigen Sekretoms

Bei körperlicher Betätigung wirken im Körper viele Einflüsse auf viele Gewebe in komplexen Wechselwirkungen zusammen. Neben sekretorischen und zirkulierenden Faktoren betrifft dies beispielsweise auch einen gesteigerten Blutfluss, Temperatur- und pH-Änderungen und Signale des autonomen Nervensystems (Hawley et al., 2014). Um die viel- und wechselseitigen systemischen Effekte von körperlicher Aktivität zu untersuchen, bieten humane *in-vivo*-Studien daher prinzipiell den ganzheitlichsten Ansatz (Carter und Solomon, 2019). Weitere exemplarische Vorteile liegen in den hier noch intakten neuromuskulären und myotendinösen Verbindungen des Muskels und der großen Breite an unterschiedlichen Sportarten und Populationen, die untersucht werden können (Lautaoja et al., 2023).

In-vivo-Studien haben jedoch spezifische Limitationen, welche zum Teil aus ethischen Gründen, als auch aus Gründen der praktischen Durchführbarkeit resultieren (Carter und Solomon, 2019). Ein Nachteil bei der Sekretomanalyse aus Blutproben besteht beispielsweise darin, dass es sich dabei um komplexe Proben mit großen Unterschieden in den Konzentrationen der vorhandenen Proteine handelt (Hathout, 2007). Myokine werden potenziell in sehr geringen Konzentrationen sezerniert (Hartwig et al., 2014). Die systemischen Spiegel sind oft an der Nachweisgrenze, was ihre Identifikation aus Blutproben schwierig macht. Zudem lässt sich aus den ermittelten sekretorischen Proteinen im Blut nicht zweifelsfrei auf die Muskelzelle als Ursprungsort rückschließen, da etliche als Myokine klassifizierte Faktoren auch von anderen Geweben sezerniert werden können (Weigert et al., 2021). Myokine, welche vornehmlich auto- oder parakrine Effekte haben, sind in ihrer Plasmakonzentration nach Sport möglicherweise gar nicht verändert. Diese auto- und parakrinen Effekte könnten jedoch eine wichtige Rolle hinsichtlich der gesundheitsfördernden Auswirkungen regelmäßiger körperlicher Aktivität spielen (Ost et al.,

2016; Weigert et al., 2014). Auch bei der Analyse aus Muskelbiopsien ist ein Rückschluss auf die Muskelzelle als Ursprungsort der Sekretion erschwert, da auch hier noch verschiedene Zelltypen enthalten sind, welche ebenfalls Zytokine sekretieren (Peake et al., 2015).

In der Zellkultur gibt es im Gegensatz dazu einige Einschränkungen hinsichtlich der Übertragbarkeit auf die *in-vivo*-Physiologie, welche unter anderem mit den eingesetzten Zellen und dem jeweiligen Versuchsaufbau zusammenhängen (siehe hierzu auch 4.1.2 – 4.1.4). Generell ist das Mikromillieu durch die hohen Nährstoffkonzentrationen in den mit tierischen Seren versetzten Kulturmedien eher unphysiologisch (Allen et al., 2023). Jedoch können in der Zellkultur alle Parameter und Umgebungskonditionen kontrolliert werden, es wird eine hohe Zellspezifität abgebildet und die Durchführung ist tendenziell einfacher und schneller (Lautaoja et al., 2023). Die Stärke von *in-vitro*-Modellen etwa im Vergleich zu Serumproben liegt demnach darin, durch die reduzierte Komplexität den Beitrag spezifischer Zellen zum Sekretom zu untersuchen (Weigert et al., 2014), was auch dem Ziel dieser Arbeit entsprach.

4.1.2 Wahl des EPS-Systems als *in-vitro*-Modell für körperliche Aktivität

Um die muskelzellspezifischen Effekte von körperlicher Aktivität in *in-vitro*-Modellen zu untersuchen, werden verschiedene Methoden angewendet. Diese umfassen neben dem hier gewählten EPS-System beispielsweise den Einsatz von verschiedenen pharmakologischen Substanzen wie dem 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleotid (AICAR), einem AMPK-Aktivator (Carter und Solomon, 2019). Auch mechanische Belastung bzw. Dehnung von Muskelzellen wurde in diesem Kontext bereits eingesetzt (Turner et al., 2021). Während pharmakologische Substanzen einzelne mit Sport assoziierte Signalwege in den stimulierten Zellen aktivieren oder durch körperliche Aktivität induzierte metabolische Zustände nachbilden sollen, werden bei der elektrischen Pulsstimulation tatsächliche Kontraktionen in den Zellen ausgelöst, welche wiederum multiple Signalkaskaden und metabolische Reaktionen zur Folge haben (Carter und Solomon, 2019).

In der Einleitung wurde bereits exemplarisch darauf eingegangen, dass der Einfluss von EPS auf Muskelzellen *in vitro* mit einigen der molekularen *in-vivo*-Effekte von Sport korreliert (vgl. 1.2.1). Hinsichtlich der Vergleichbarkeit mit der *in-vivo*-Physiologie sollte jedoch stets bedacht werden, dass bei EPS keine echte mechanische Last auf die Zellen wirkt, keine Kommunikation mit anderen Zelltypen oder Hormonen aus dem Blutkreislauf in Feedback-Mechanismen stattfinden kann und auch keine Änderung der zirkulierenden Level

von Nährsubstraten oder Änderung der Mikroumgebung gegeben sind, wie sie im echten Muskelgewebe stattfindet (z.B. hinsichtlich der Temperatur oder des Sauerstoffangebots). All dies und mehr kann *in vivo* zusätzlich die Reaktion der Muskelzelle auf körperliche Aktivität beeinflussen (Nikolić et al., 2017). Es gibt zudem Hinweise, dass bei EPS-Studien auch ein möglicher Einfluss der Elektroden selbst auf die Substanzen im Zellüberstand bedacht werden muss (Evers-van Gogh et al., 2015). Daher empfehlen einige Autoren im Medium der Kontrollzellen ebenfalls Elektroden zu platzieren, ohne hierbei einen Strom zu applizieren (Nikolić et al., 2017; Weigert et al., 2021), was auch in dieser Arbeit umgesetzt wurde. Insgesamt bietet das EPS-System ein wertvolles und vielfach verwendetes Tool, um einige Kernaspekte der Muskelbiologie im Kontext von körperlicher Aktivität *in vitro* nachzubilden (Carter und Solomon, 2019).

4.1.3 Wahl der C2C12-Zelllinie

Viele der vorhandenen EPS-Studien wurden an C2C12-Zellen durchgeführt. Auch primäre humane und murine Muskelzellen wurden mehrfach eingesetzt (Nikolić et al., 2017; Nintou et al., 2022).

Ein Vorteil im Einsatz von primären humanen Muskelzellen liegt darin, dass diese bezogen auf ihren genetischen und physiologischen Hintergrund am besten für die Untersuchung menschlicher Erkrankungen geeignet sind (Aas et al., 2013). Sie können darüber hinaus spenderspezifische Eigenschaften wie beispielsweise metabolische Störungen bewahren, welche dann gezielt in die Untersuchungen mit einbezogen werden können (Aas et al., 2013; Ørtenblad et al., 2005). Dies könnte aber auch zu der bereits beobachteten Variation der Ergebnisse bei der elektrischen Stimulation von Zellen verschiedener Spender beitragen (Nikolić et al., 2017; Scheler et al., 2013). Nicht immer liegen die medizinischen Hintergrundinformationen der Spender vor, was vor allem bei kommerziell erworbenen primären humanen Muskelzellen zutreffen kann (Nikolić et al., 2017). Auch eine variierende Reaktion auf EPS bei verschiedenen Spendern wurde beobachtet (Nikolić et al., 2017), wobei im Allgemeinen den primären humanen Muskelzellen ein langsames Wachstum und eine geringere Kontraktilität im Vergleich zu den C2C12-Zellen zugesprochen wird (Chen et al., 2019). Hinzu kommt, dass bei primären Zellen die Zellkultur aufwendiger sein kann, als dies bei Zelllinien der Fall ist (Manabe et al., 2012).

Immortalisierte Zelllinien können stärker von der *in-vivo*-Physiologie abweichen, jedoch zeigen sich ihre Vorteile unter anderem in ihrer leichten Verfügbarkeit, Handhabbarkeit und

Beständigkeit (Nikolić et al., 2017). Für C2C12-Zellen konnte mehrfach gezeigt werden, dass diese auf EPS mit Kontraktionen reagieren (Chang und Kong, 2020; Evers-van Gogh et al., 2015). Neben dem etablierten Einsatz von C2C12-Zellen in EPS-Studien wurden diese auch bereits des Öfteren für Untersuchungen ausgewählt, welche das Sekretom von Muskelzellen mittels Massenspektrometrie analysierten (Deshmukh et al., 2015; Gonzalez-Franquesa et al., 2021a; Gonzalez-Franquesa et al., 2021b; Grube et al., 2018; Gueugneau et al., 2018), sodass hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Methoden und Ergebnisse von C2C12-Studien und dieser Arbeit eine gewisse Wissensbasis vorhanden ist.

4.1.4 Wahl des Stimulationsprotokolls und der Stimulationsdauern

Für den Einsatz der EPS wurde ein Stimulationsprotokoll hinsichtlich Spannung, Pulsdauer, Frequenz, Gesamtdauer und Applikationsart festgelegt. In dieser Arbeit wurden die Parameter 11,5 V, 2 ms und 1 Hz gewählt und kontinuierlich für 6 oder 24 Stunden appliziert. Dieses chronische Stimulationsprotokoll wurde bereits mehrfach für eine Dauer von bis zu 24 Stunden in EPS-Studien sowohl an primären humanen Muskelzellen (Görgens et al., 2016; Hjorth et al., 2015; Lambernd et al., 2012; Raschke et al., 2013a; Raschke et al., 2013b), als auch an C2C12-Zellen eingesetzt (Chang und Kong, 2020; Evers-van Gogh et al., 2015; Gonzalez-Franquesa et al., 2021b). Wie bereits in der Einleitung beschrieben ist die Zuordnung von einem Stimulationsprotokoll zu einer spezifischen Trainingsart nicht eindeutig zu treffen (vgl. 1.2.2). Jedoch werden die hier verwendeten Parameter, vor allem bei 24-stündiger Applikation, von manchen Autoren eher als Protokoll für die Imitation von regelmäßigem Training angesehen (Raschke et al., 2013a).

Die grundsätzlichen Kombinationsmöglichkeiten der EPS-Parameter sind mannigfaltig, jedoch bot die Wahl eines etablierten Stimulationsprotokolls für diese Arbeit Vorteile. Dazu gehören zum einen eine bessere Vergleichbarkeit der gewonnenen Ergebnisse, denn die EPS-Protokoll-Variationen in den publizierten Studien sind schon jetzt sehr groß (Nintou et al., 2022). Zum anderen gibt es dadurch bereits Erfahrungswerte hinsichtlich der Verträglichkeit und Reaktion von Muskelzellen auf dieses Protokoll. Für die Kombination der Parameter 11,5 V und 2 ms konnte in Kombination mit verschiedenen Frequenzen gezeigt werden, dass ein Wert von 1 Hz die stärkste reaktive AMPK-Aktivierung und IL-6-Sekretion in humanen Muskelzellen auslöst (Lambernd et al., 2012). Auch in C2C12-Zellen konnte zuvor mit dem hier verwendeten Stimulationsmuster nach 24 Stunden eine Steigerung des p-AMPK/AMPK-Verhältnisses, sichtbare Kontraktionen, sowie etwa eine gesteigerte IL-6-Sekretion im

Vergleich zu den Kontrollzellen erreicht werden, ohne dass bedeutende morphologische Veränderungen der Zellen auftraten (Chang und Kong, 2020; Evers-van Gogh et al., 2015).

Als Stimulationsdauern wurden in dieser Arbeit 6 und 24 Stunden gewählt. Die Analyse des Zellüberstands im Massenspektrometer macht während der EPS eine Inkubation in serumfreiem Medium nötig, um eine Kontamination des Sekretoms durch Serumproteine zu vermeiden (Scheler et al., 2015). In vorherigen Studien wurde ein gewisser Vitalitätsabfall oder eine Änderung der Morphologie von C2C12-Zellen durch lange Inkubationszeiten von 24 Stunden in serumfreiem Medium beobachtet (Burch et al., 2010; Grube et al., 2018). Ein Verlust der Zellintegrität durch Serumentzug könnte wiederum zur Leckage von intrazellulären Proteinen in den Überstand führen (Florin et al., 2020). In der vorliegenden Arbeit zeigten die Ergebnisse der qRT-PCR von *IL-6* eine Tendenz zu einer geringeren Expression nach 24-stündiger Behandlung (vgl. 3.1.3). Der Trend, dass biologische *exercise*-Parameter mit längerer Stimulationsdauer in ihrer Expression abnehmen können, wurde auch in einer Meta-Analyse von Nintou et al. (2022) über EPS-Studien an verschiedenen Zellen ermittelt und war hier in Bezug auf die AMPK-Expression signifikant. Dies wurde von den Autoren als Zeichen gewertet, dass sich der Effekt von EPS bei längerer Stimulationsdauer verringern könnte (Nintou et al., 2022). Diese Überlegungen sprechen für eine kürzere, im Falle dieser Arbeit für die 6-stündige Behandlungszeit der Zellen mit EPS.

Es gibt hingegen auch einige Argumente für eine längere, in diesem Fall die 24-stündige Stimulation. Ein Vorteil liegt zum einen in den oben beschriebenen, positiven Erfahrungswerten hinsichtlich der Reaktion der C2C12-Zellen auf ebendieses Protokoll in dieser Dauer, auch unter serumfreien Konditionen (Evers-van Gogh et al., 2015). Des Weiteren zeigten die Reaktionen von C2C12-Zellen nach 24-stündiger Stimulation teilweise eine höhere Übereinstimmung mit der *in-vivo*-Physiologie nach Training als nach kürzeren Stimulationszeiten, etwa was den Glukosestoffwechsel oder die Genexpression betraf (Burch et al., 2010; Nedachi et al., 2008). Während die Sekretion einiger Myokine schon innerhalb der ersten Stunde nach dem EPS-Start einsetzt (Nedachi et al., 2009), gibt es Hinweise darauf, dass etwa die Sekretion von IL-6 durch C2C12-Zellen erst nach 20 Stunden kontinuierlichem EPS signifikant ansteigt (Farmawati et al., 2013). Eine Studie, welche die IL-6-Sekretion nach EPS-Stimulation von C2C12-Zellen nach 6 und 24 Stunden mit denselben Stimulationsparametern wie in dieser Arbeit verglich, konnte ebenfalls erst nach 24 Stunden einen messbaren Anstieg im Überstand messen. In dieser Studie wurde daher entschieden, alle weiteren Analysen mit den für 24 Stunden stimulierten Zellen durchzuführen (Gonzalez-

Franquesa et al., 2021b). Der soeben beschriebene Einfluss einer Stimulationszeit von mindestens 20 Stunden auf die IL-6-Sekretion könnte im Kontext dieser Arbeit auch auf andere, noch unbekanntere Myokine zutreffen, die man entsprechend bei der ausschließlichen Untersuchung des Sekretoms nach 6-stündiger Stimulation nicht finden würde.

Generell sollte bedacht werden, dass in den soeben erwähnten Studien teils unterschiedliche Versuchs- und EPS-Protokolle als in dieser Arbeit verwendet wurden, welche neben dem Einfluss der Stimulationsdauer ebenfalls für einen Teil der beobachteten Effekte verantwortlich sein könnten. Somit gibt es sowohl Argumente für eine kürzere als auch für eine längere Stimulationszeit. Ein direkter Vergleich des globalen, durch MS-ermittelten, kontraktionsabhängigen Sekretoms nach 6 und 24 Stunden bei ansonsten gleichen Stimulationsparametern und gleichem Versuchsaufbau wie in dieser Arbeit, könnte daher hilfreich sein, um den spezifischen Einfluss der Stimulationsdauer auf das Sekretom abzuschätzen. Es wurde bei der Literaturrecherche keine andere Studie gefunden, die einen solchen Vergleich zuvor durchführte.

4.1.5 Wahl einer ungerichteten MS-Analyse

Mehrere Studien, die EPS an Skelettmuskelzellen einsetzten, um auf diese Weise nach neuen kontraktionsabhängig sekretierten Myokinen zu suchen, nutzten als Versuchsmethode verschiedene Antikörper-Arrays (Ishiuchi et al., 2018; Raschke et al., 2013a; Scheler et al., 2013). Durch Array-basierte Ansätze können auch in kleinen oder komplexen Proben Zielproteine erfasst und quantifiziert werden (Weigert et al., 2014). Dazu zählen beispielsweise die Interleukine. Interleukine werden häufig in Proteomik-basierten Analysen nicht gefunden (Raschke et al., 2013a), obwohl einige von ihnen, wie unter anderem IL-6, bereits als Myokine identifiziert wurden (Severinsen und Pedersen, 2020). Ein weiterer Vorteil ist, dass ein mittels Antikörper-Array untersuchter Zellüberstand noch Kulturseren enthalten darf, was bei der MS aus technischen Gründen nicht möglich ist (Scheler et al., 2015).

Ein Vorteil der Massenspektrometrie im Vergleich zu den Antikörper-Arrays ist wiederum, dass nicht nur die durch das gewählte Assay festgelegte Teilmenge, sondern prinzipiell alle und somit auch unerwartete Proteine in einer komplexen Probe gefunden werden können (Mann et al., 2013; Weigert et al., 2014). Dabei stehen verschiedene MS-Analysemethoden je nach genauer Fragestellung zur Verfügung (Li et al., 2017). Für globale Proteinanalysen werden bisher häufig *bottom-up*-Methoden gewählt. Diese sind sensitiv, haben einen hohen

Durchsatz und decken ein breites dynamisches Spektrum ab, wohingegen *top-down*-Methoden besser für die Identifikation verschiedener Isoformen von Proteinen geeignet sind (Weigert et al., 2014; Zhang und Ge, 2011). Durch MS-basierte Proteomik wurde in den letzten Jahren das Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge in den Muskelzellen deutlich erweitert (Ohlendieck, 2011).

Alles in allem haben die verschiedenen Methoden ihre jeweiligen Stärken und Schwächen. Es ist für die umfassende Erforschung des Myokinoms daher umso wichtiger, das Potenzial verschiedener Ansätze zu nutzen und gegebenenfalls zu kombinieren, um das gesamte Sekretom bestmöglich zu erfassen (Weigert et al., 2014).

Zum Abschluss dieses Kapitels sollte als eine allgemeine Limitation dieser Studie noch die geringe Stichprobe ($n = 2$) bei der MS-Analyse bedacht werden, welche aus dem hohen Versuchsaufwand und dem Ausschluss eines der drei biologischen Replikate aus Qualitätsgründen resultierte.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Im Anschluss sollen die Ergebnisse der qRT-PCR und der MS-Sekretomanalyse diskutiert werden.

4.2.1 Evaluation des Differenzierungsstatus

Vor der Applikation von EPS wurden die C2C12-Zellen über einen Zeitraum von 6 Tagen zu mehrkernigen Myotuben differenziert (vgl. 2.2.1.3). Eine erfolgreiche Differenzierung war für die Versuchsdurchführung wichtig, da das Sekretom von kontrahierenden Muskelzellen untersucht werden sollte. Undifferenzierte C2C12-Myoblasten zeigen bei Stimulation durch EPS keine Anzeichen von Kontraktion, so reagieren sie auf EPS beispielsweise nicht mit einer Änderung des Calcium-Transienten (Fujita et al., 2007) und sekretieren im Gegensatz zu Myotuben auch kein IL-6 (Farmawati et al., 2013). Auch konnte bereits gezeigt werden, dass sich insgesamt das Sekretionsprofil von C2C12-Zellen während des Differenzierungsprozesses merklich ändert (Chan et al., 2011; Henningsen et al., 2010). Als Kriterium einer erfolgreichen Differenzierung wurde in dieser Arbeit die visuelle Einschätzung unter dem Mikroskop auf Basis von Erfahrungswerten der Arbeitsgruppe gewertet. Zusätzlich sollte diese durch eine qRT-PCR-Analyse von bekannten C2C12-Differenzierungsmarkern durchgeführt werden, um die Wahrscheinlichkeit einer späteren

Verfälschung des kontraktionsabhängigen Sekretoms durch den Einfluss undifferenzierter Myoblasten möglichst gering zu halten.

Zunächst wurden dazu in einer Vorstudie drei biologische Replikate in unterschiedlichen Passagen nach dem verwendeten Protokoll differenziert und die RNA der Zellen an Tag 0, 3 und 6 extrahiert. Im Anschluss wurde mit den weiter aufbereiteten RNA-Extrakten eine qRT-PCR auf fünf Differenzierungsmarker durchgeführt: *Desmin*, *Myogenic factor 5 (Myf5)*, *Myogenin (MyoG)*, *Myoblast determination protein 1 (MyoD)* und *Myosin heavy chain 2 (Myh2)*. *Desmin* ist als Intermediärfilament ein Protein des Zytoskeletts reifer Muskelzellen, welches wichtige strukturgebende und funktionale Eigenschaften hat (Capetanaki et al., 2007). *Myf5*, *MyoG* und *MyoD* gehören zur Gruppe der sogenannten MRFs (*myogenic regulatory factors*), einer Klasse von Transkriptionsfaktoren, welche elementar an der Regulation der Myogenese und Differenzierung von Skelettmuskelzellen beteiligt sind (Asfour et al., 2018). *Myf5* und *MyoD* werden bereits in frühen Stadien der Myogenese exprimiert, während *MyoG* die terminalen Stadien der Differenzierung von Muskelzellen charakterisiert. Die Expression von *MyoD* bleibt auch in späteren Stadien der Differenzierung erhalten (Asfour et al., 2018). *Myh2* wiederum kodiert für eine Form der schweren Ketten des Myosin-Moleküls und ist somit Teil des kontraktiven Apparats differenzierter Muskelzellen (Oldfors, 2007; Smerdu et al., 1994). Die Expression dieser Marker wurde in verschiedenen Studien bereits für die Evaluation der Differenzierung von C2C12-Zellen eingesetzt (Chen et al., 2015; Li et al., 2021).

Die Ausbildung von Myotuben aller drei Replikate der Vorstudie war an Tag 6 unter dem Mikroskop visuell als erfolgreich eingeschätzt worden. Daher sollten die Werte aus dieser Vorstudie als Referenz für die tendenzielle Entwicklung der Differenzierungsmarker bei dem hier verwendeten Differenzierungsprotokoll dienen. Eine Signifikanz der Expressionsänderung zu $p < 0,05$ konnte dabei nur für den Marker *Desmin* und für *Myf5* von Tag 0 zu Tag 3 erreicht werden, jedoch ist die geringe Stichprobe von $n = 3$ zu beachten. Trotz größerer Schwankungen zwischen den Replikaten zeigten sich die deutlichsten Gesamtsteigerungen in der Expression für *Myh2*, gefolgt von *MyoG*. Vor diesem Hintergrund wurden die Entwicklungen der Marker *Desmin*, *MyoG* und *Myh2* während der Differenzierung als Referenz für die Zellen der EPS-Versuche ausgewählt.

Bei den für die EPS-Behandlung differenzierten Zellen zeigte sich in der visuellen Begutachtung unter dem Mikroskop bei zwei von den drei Replikaten eine gleichmäßige und ausgeprägte Myotubenbildung, analog zu den differenzierten Zellen aus der Vorstudie, bei

dem dritten Replikat war die Differenzierung visuell geringer ausgeprägt und nur vereinzelte kurze Myotuben waren zu erkennen. Die Ergebnisse der qRT-PCR standen im Einklang mit diesem Eindruck: Zwei der Replikate zeigten für die Marker Expressionssteigerungen in einem Umfang, der mit der Vorstudie als vereinbar bewertet wurde und wurden damit insgesamt als angemessen differenziert bewertet. Bei dem bereits visuell wenig differenziert erscheinenden dritten Replikat zeigten alle drei untersuchten Marker hingegen so geringe Expressionsanstiege, dass eine erfolgreiche Differenzierung nicht glaubhaft erschien (vgl. 3.1.2). Hierbei kann diskutiert werden, dass die in der qRT-PCR verwendeten Differenzierungsmarker auch in den visuell als erfolgreich differenziert beurteilten Replikaten teilweise stark schwankten. Zudem war die Stichprobe mit $n = 3$ sehr gering und es konnte kein signifikanzbasierter Grenzwert für die Expressionssteigerung eines Markers durch erfolgreiche Differenzierung festgelegt werden. In der Zusammenschau der Ergebnisse fiel jedoch das dritte biologische Replikat mit einer deutlich geringeren Ausprägung der Expression aller drei untersuchten Differenzierungsmarker auf. *Desmin*, das Gen, für welches in der Vorstudie bereits bei einem $n = 3$ durch Differenzierung die Expressionsänderung Signifikanz erreichte (im Mittel mit einer vierfachen Steigerung), erreichte in diesem Replikat im Mittel nicht einmal eine zweifache Expressionssteigerung.

In einer zuvor bereits erwähnten Studie wurde eine gesteigerte IL-6-Sekretion als Reaktion auf EPS bei Myotuben, jedoch nicht bei Myoblasten, beobachtet und in den entsprechenden Myotuben zudem eine Expressionssteigerung von *IL-6* nach Behandlung mit EPS beobachtet (Farmawati et al., 2013). Damit vereinbar zeigte auch die mRNA-Expression von *IL-6* ausschließlich im dritten biologischen Replikat nicht den im Vergleich zu den Kontrollzellen erwarteten Anstieg nach elektrischer Pulsstimulation (vgl. 3.1.3 und 4.2.2), was als ein weiterer Hinweis auf eine unzureichende Differenzierung und folglich unzureichende Reaktion auf die EPS mit Kontraktion durch die Zellen dieses Replikats angesehen werden kann.

Vor dem Hintergrund der obigen Überlegungen wurde daher die Entscheidung getroffen, das entsprechende dritte Replikat von der massenspektrometrischen Sekretomanalyse auszuschließen.

4.2.2 Evaluation der Auslösung von Kontraktionen durch die EPS

Neben der Frage, ob die Zellen ausreichend differenziert waren, war es von Interesse, ob die elektrische Pulsstimulation zu Kontraktionen in den behandelten Zellen führte.

In dieser Arbeit wurde ein Stimulationsprotokoll angewendet, für welches bereits in anderen Studien gezeigt wurde, dass es Kontraktionen in C2C12-Zellen auslösen kann (Chang und Kong, 2020; Evers-van Gogh et al., 2015), sowie eine erhöhte IL-6-Sekretion zur Folge hat (Evers-van Gogh et al., 2015). IL-6 ist als Faktor, der bei Kontraktion vermehrt von Muskelzellen exprimiert und freigesetzt wird, bekannt (Pedersen et al., 2003). Dass EPS von Muskelzellen zur Steigerung der Sekretion von IL-6 führen kann, zeigt neben der zuvor erwähnten Studie auch die Meta-Analyse von Nintou et al. (2022). Die Überprüfung von IL-6 als Biomarker wird vor diesem Hintergrund als eine mögliche Positivkontrolle für die Erzeugung von Kontraktionen durch EPS beschrieben (Nikolić et al., 2017).

In der vorliegenden Arbeit wurde die relative mRNA-Expression von *IL-6* mittels qRT-PCR gemessen. Es zeigte sich in den beiden biologischen Replikaten, welche als angemessen differenziert eingestuft wurden, dass die *IL-6*-mRNA-Expression nach EPS im Vergleich zu den Kontrollen gesteigert war (vgl. 3.1.3). In verschiedenen Studien konnte zuvor ebenfalls in C2C12-Zellen eine Steigerung der *IL-6*-mRNA-Expression als Reaktion auf EPS gezeigt werden (Farmawati et al., 2013; Miyatake et al., 2016; Nedachi et al., 2008). Insgesamt wird dies als Hinweis angesehen, dass die elektrische Pulsstimulation in dieser Arbeit zu Kontraktionen in den für die Analyse verwendeten Zellen führte. Im Folgenden wird daher, bezogen auf die gemessenen Veränderungen der Proteine im Überstand der EPS-behandelten Zellen, von einer kontraktionsabhängigen Regulation gesprochen. Es ist jedoch zu bedenken, dass die *IL-6*-mRNA-Expression nur einer von mehreren möglichen Markern für die erfolgreiche Erzeugung von Kontraktionen ist und zudem die kleine Stichprobengröße auch an dieser Stelle keine verlässlichen Aussagen zur Signifikanz der Ergebnisse zuließ.

4.2.3 Gesamtanzahl der gefundenen Proteine im Zellüberstand

Im Anschluss an die elektrische Pulsstimulation erfolgte die Probenaufbereitung der Zellüberstände und deren MS-Analyse. Nach Anwendung der Basisfilter auf die erhaltene Proteinliste (vgl. 2.2.4.3) wurden insgesamt 2917 Masterproteine im Zellüberstand identifiziert.

Die Angaben zu der Gesamtanzahl der gefundenen Proteine in globalen MS-Sekretomanalysen von Skelettmuskelzellen aus den letzten Jahren variieren: Studien, in denen ebenfalls C2C12-Zellen eingesetzt wurden, nannten beispielsweise Anzahlen von 1724 bzw. 1192 quantifizierte Proteinen (Gonzalez-Franquesa et al., 2021b; Gonzalez-Franquesa et al., 2021a). Gueugneau et al. (2018) identifizierten 739 Proteine und Deshmukh et al.

(2015) nennen 4491 detektierte Proteingruppen. Ein direkter Vergleich dieser Zahlen mit der Gesamtanzahl der in dieser Arbeit identifizierten Proteine scheint jedoch nur bedingt sinnvoll. Einerseits, da nur in einer der beschriebenen Studien auch das Sekretom EPS-behandelter C2C12-Zellen untersucht wurde. In dieser Studie wurde auch das Sekretom nach 24 Stunden EPS und mit dem gleichen Stimulationsprotokoll wie in dieser Arbeit untersucht, jedoch wurden die Zellen hier nur 5 Tage differenziert und eine andere Methode der Probenaufbereitung gewählt (Gonzalez-Franquesa et al., 2021b). In den anderen Studien erhielten die C2C12-Zellen Behandlungen mit AICAR bzw. Insulin (Gonzalez-Franquesa et al., 2021a), Dexamethason (Gueugneau et al., 2018) oder Palmitat (Deshmukh et al., 2015). Desweiteren wurden die Zellen für sehr unterschiedliche Zeiten von 6 h (Gonzalez-Franquesa et al., 2021a), 12 h (Deshmukh et al., 2015) oder 24 h (Gonzalez-Franquesa et al., 2021b; Gueugneau et al., 2018) in dem Medium inkubiert, welches als konditionierter Zellüberstand für die MS-Analyse gesammelt wurde. Zusätzlich variierten die soeben genannten Studien auch in weiteren Punkten der Protokolle und eingesetzten Materialien unterschiedlich stark, was eine direkte Vergleichbarkeit zusätzlich erschweren könnte. Eine frühere Studie aus dem eigenen Institut zum Sekretom von primären humanen Myozyten zeigte in diesem Kontext, dass dieselbe Probe - mit drei verschiedenen massenspektrometrischen Methoden untersucht - lediglich eine Überschneidung der mit allen drei Methoden gefundenen Proteine von 19 % aufwies (Hartwig et al., 2014). Die eher geringen Schnittmengen ermittelter Proteine in verschiedenen Sekretom-Studien an C2C12-Zellen unterstreichen die Notwendigkeit zur Kombination verschiedener Methoden, um bestmöglich das gesamte Sekretom abzubilden (Hartwig et al., 2014; Weigert et al., 2014).

4.2.4 Evaluation der Zellvitalität nach 6- und 24-stündiger Behandlung

Eine Herausforderung bei der Analyse des Sekretoms aus konditionierten Zellüberständen ist die Unterscheidung zwischen echten sekretierten Proteinen und solchen, die aus dem Inhalt defekter Zellen in das Medium gelangt sind (Grube et al., 2018). Von einigen Autoren wurde nach 24 Stunden im serumfreien Medium ein Rückgang der Vitalität von C2C12-Zellen beobachtet (Burch et al., 2010; Grube et al., 2018). Auch ungeeignete EPS-Protokolle können zu Zellschäden führen (Nikolić et al., 2017). Neben der in Abschnitt 4.1.4 bereits diskutierten Auswahl der Stimulationsparameter wurde hier aus diesen Gründen zusätzlich die Abundanz der Laktatdehydrogenase (LDH) aus dem MS-Datensatz in die Auswertung der Ergebnisse mit einbezogen. Die LDH ist ein Enzym, welches unter anaeroben Bedingungen die reversible Reaktion von Pyruvat zu Laktat katalysiert (Miao et al., 2013). Ihre Freisetzung gilt als

Marker für einen möglichen Vitalitätsabfall von Zellen (Nikolić et al., 2017). In der Literatur wurden mehrfach spezifische Assays zur Detektion der LDH im Zellüberstand eingesetzt (Brown et al., 2015; Nedachi et al., 2008; Nikolić et al., 2012). Aber auch die mittels MS gemessene, relative LDH-A-Abundanz im konditionierten Medium von C2C12-Zellen wurde bereits als Marker für die Leckage intrazellulärer Proteine herangezogen (Gonzalez-Franquesa et al., 2021a).

In dieser Arbeit wurde im Zellüberstand mittels der MS-Analyse sowohl die LDH-A als auch die LDH-B quantifiziert (vgl. 3.2.3). LDH-A- und LDH-B stellen Untereinheiten der LDH dar, deren variierende Kombination zu Tetrameren verschiedene Isoenzyme generiert. In den meisten Zellen sind beide Untereinheiten präsent, jedoch gilt die LDH-A als prädominant im Muskel (Miao et al., 2013; Osis et al., 2021). Die LDH-A zeigte in dieser Analyse im Durchschnitt eine erhöhte Abundanz im Überstand der Zellen, die für 24 h behandelt worden waren, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweils EP-stimulierten und nicht stimulierten Zellen gefunden wurde (vgl. 3.2.3). Dies könnte bedeuten, dass nach der 24-stündigen Inkubation in serumfreiem Medium mehr avitale Zellen vorhanden waren, welche ihren Zellinhalt in den Überstand abgegeben hatten. Dagegen spricht, dass nur die LDH-A in den Proben nach 24 h merklich erhöht war, während die LDH-B, als ebenfalls intrazelluläres Protein, deutlich geringere Unterschiede zwischen den Proben zeigte und nach 24-stündiger Behandlung die Abundanz im Überstand eher vermindert schien.

Die LDH-A-Expression wird vor allem durch Hypoxie induziert, während die LDH-B Expression konstitutiv erfolgt (Osis et al., 2021; Porporato et al., 2011). Dies könnte darauf hindeuten, dass die für 24 h in Hungermedium inkubierten Zellen einem höheren hypoxischen Stress ausgesetzt waren und dadurch insgesamt mehr LDH-A exprimierten. Ein generell erhöhter intrazellulärer Anteil an LDH-A in den Zellen der 24 h-Gruppe könnte relativ gesehen zu einem erhöhten Gehalt des Enzyms im Zellüberstand geführt haben, ohne dass dabei ein tatsächlicher Vitalitätsabfall zu verzeichnen war, wie zuvor beschrieben bei Scheler et al. (2013). Der Zellgehalt der LDH wurde in dieser Arbeit allerdings nicht erfasst. Jedoch wurden die Zellen vor und nach der EPS-Behandlung stets unter dem Mikroskop visuell begutachtet, wobei keine relevant erscheinenden morphologischen Unterschiede erkennbar waren, welche auf ein erhöhtes Zellsterben hingedeutet hätten. Dies war im Einklang mit den Beobachtungen in ähnlich aufgebauten EPS-Versuchen (Chang und Kong, 2020; Evers-van Gogh et al., 2015).

Alles in allem lässt sich ein gewisser Abfall der Vitalität in den für 24 Stunden behandelten Zellen nicht ausschließen. Jedoch unterschied sich weder die LDH-A noch die LDH-B signifikant im Überstand der EPS- und Kontrollzellen einer Stimulationsdauer (vgl. Tbl. 27-30). Somit gibt es keine Hinweise darauf, dass die EPS selbst zu einer erhöhten Leckage intrazellulärer Proteine geführt hat. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus anderen Studien, welche den LDH-Gehalt im Überstand von EPS-stimulierten C2C12-Zellen mit den jeweiligen Kontrollzellen verglichen (Manabe et al., 2012; Nedachi et al., 2008). Da es somit keine Anhaltspunkte für ein erhöhtes Zellsterben durch die EPS selbst gab, scheint relativ gesehen eine Verfälschung bei der Analyse der kontraktionsabhängig sekretierten Myokine durch Proteine aus avitalen Zellen im konditionierten Medium unwahrscheinlich. Diese Einschätzung teilen auch Gonzalez-Franquesa et al. (2021a) in ihrer MS-Studie an C2C12-Zellen.

4.2.5 Evaluation möglicher Kontaminationen

Wie im vorherigen Abschnitt bereits angesprochen, liegt eine der Herausforderungen bei ungerichteten Sekretomanalysen darin, tatsächlich sekretierte Proteine von Kontaminanten zu unterscheiden. Neben der Leckage aus avitalen Zellen können solche Kontaminanten auch aus Resten der während der Kultivierung eingesetzten Seren resultieren (Hartwig et al., 2014). Um dies möglichst zu vermeiden wurden die Zellen vor der Applikation der EPS zunächst mit PBS gewaschen. Die EPS-Behandlung erfolgte anschließend in serumfreiem Medium ohne Phenolrot, mit zwei anschließenden Zentrifugations- und einem Aufkonzentrierungsschritt der Proben, in Anlehnung an die Empfehlungen von Weigert et al. (2021). Desweiteren wurden die konditionierten Medien vor der MS-Analyse auf ein Gel aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Eine Gelelektrophorese ist eine simple und effektive Methode, um einen Überblick über die Qualität und Zusammensetzung der Proben zu bekommen und eine Serumkontamination zu erkennen (Weigert et al., 2021). Auf dem 1D-Gel zeigte sich eine breite und gleichmäßige Auffächerung der Proteinbanden in allen Proben (vgl. 3.2.1), was für eine komplexe Probenzusammensetzung sprach. Lediglich die Banden des Überstandes der Kontrollzellen (24 h) aus dem dritten biologischen Replikat zeigten unspezifische Verdichtungen im oberen und unteren Teil des Gels, welche nicht genau zugeordnet werden konnten. Das dritte Replikat wurde jedoch ohnehin aufgrund des zweifelhaften Differenzierungsstatus von der Sekretomanalyse ausgeschlossen (vgl. 4.2.1). Im Einklang mit der PCA (vgl. 3.2.2) unterschieden sich die Proben der unterschiedlichen Stimulationsdauern visuell deutlicher als die jeweiligen EPS- und Kontrollproben (vgl. 3.2.1).

Albumin stellt einen Hauptanteil der Serumproteine dar (Doweiko und Nompleggi, 1991). Es wurde auf dem 1D-Gel eine BSA-Bande in allen Proben detektiert. Insgesamt lässt sich somit das Vorhandensein von Serumresten nicht ganz ausschließen, jedoch wäre bei einer ausgeprägten Verunreinigung eine deutliche Überlagerung der anderen Banden durch das BSA angenommen worden. Die BSA-Bande war zudem in allen Proben visuell ähnlich stark ausgeprägt, sodass in Analogie zu der möglichen Kontamination durch zytosolische Proteine auch hier, bei potenziell gleichmäßig vorhandenen Serumresten in allen Überständen, eine relative Verfälschung der kontraktionsabhängig regulierten Proteine unwahrscheinlich erscheint (vgl. 4.2.4). Durch den zusätzlichen Einsatz von Filtern in der resultierenden Proteinliste nach der MS-Analyse wurden darüber hinaus ausschließlich Proteine aus der Maus für die Auswertung zugelassen, während die verwendeten Zellkulturseren Proteine aus dem Pferd oder dem Rind enthielten (vgl. 2.2.4.3).

4.2.6 Klassifikation sekretierter Proteine durch bioinformatische Algorithmen

Um einen weiteren Anhaltspunkt für tatsächlich sekretierte Myokine in den Proben zu bekommen, wurden auf die gefundenen und gefilterten Proteine die bioinformatischen Tools SignalP 5.0 (Almagro Armenteros et al., 2019) und SecretomeP 2.0 (Bendtsen et al., 2004) angewendet, welche eine Vorhersage dazu treffen können, ob ein Protein auf klassischem (SignalP 5.0) oder unkonventionellem Weg (SecretomeP 2.0) sekretiert wird (vgl. Tbl. 18).

Bezogen auf die 2917 in dieser Arbeit identifizierten Proteine wurden ca. 20 % der Kategorie SP+, ca. 19 % der Kategorie SP- und etwa 60 % der Kategorie NP zugeordnet. Zehn Proteine konnten nicht analysiert werden (vgl. 3.2.4). Daraus lässt sich ableiten, dass es sich bei den 1159 hier als SP+ oder SP- klassifizierten Proteine mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit tatsächlich um sekretierte Myokine handelt. Bei den als NP klassifizierten Proteinen gibt es auf Basis der Algorithmen vorerst keinen Hinweis auf eine Sekretion, jedoch lässt sich diese auch nicht ausschließen. So wird bei globalen Sekretomanalysen etwa durch SignalP- und SecretomeP-Filterung regelmäßig eine höhere Anzahl an nicht als sekretorisch klassifizierten Proteinen ausgewiesen, wobei jedoch nicht alle Sekretionswege von den Algorithmen erfasst werden können (Weigert et al., 2014). Für Adipozyten etwa wurde gezeigt, dass Exosomen einen essenziellen Teil zum Sekretom beitragen können, wobei mehrere der auf diese Weise transportierten Proteine kein Signalpeptid enthielten (Hartwig et al., 2019). Es wird zudem angenommen, dass es noch einige unbekannte Sekretionsmechanismen gibt (Dimou und Nickel, 2018).

Auch wenn Tools wie SignalP und SecretomeP wichtige Anhaltspunkte bieten können, um den Anteil sekretierter Proteine einzuschätzen, sollten ihre Vorhersagen daher unter Vorbehalt interpretiert werden, um keine potenziell relevanten Myokine von der weiteren Betrachtung auszuschließen (Weigert et al., 2014). Aus diesem Grund wurden die in dieser Arbeit gefundenen Proteine zwar nach SP+, SP- und NP klassifiziert, jedoch auch die als NP klassifizierten Proteine in der weiteren Analyse als potenzielle Myokine mit aufgeführt.

4.2.7 Kontraktionsabhängig sekretierte Proteine

4.2.7.1 *Anzahl und Art der gefundenen kontraktionsabhängig sekretierten Proteine*

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 356 verschiedene signifikant kontraktionsabhängig sekretierte Myokine gefunden (ksM), darunter waren sowohl nach 6 Stunden als auch nach 24 Stunden EPS- Behandlung jeweils einige herauf- und herunterregulierte Myokine (vgl. 3.2.5, Tbl. 27-30).

Wie bereits in 4.1 angesprochen, werden in der Literatur verschiedene Methoden in diversen *in-vitro*- und *in-vivo*-Modellen angewendet, um das Sekretom der Skelettmuskelzellen im Rahmen körperlicher Aktivität weiter zu entschlüsseln. Eine Studie setzte im Rahmen einer solchen Analyse ebenfalls C2C12-Zellen in Kombination mit EPS als *in-vitro*-Modell für Sport ein und untersuchte das Sekretom mittels Massenspektrometrie (Gonzalez-Franquesa et al., 2021b). Diese Studie stimulierte die Zellen für 24 Stunden und listete 75 signifikant durch EPS regulierte Myokine auf. Dabei wurden dieselben Stimulations-Parameter wie in der vorliegenden Arbeit verwendet. Unterschiede lagen unter anderem in einem nur 5-tägigen Differenzierungsprotokoll der Zellen und in der Methode der Probenaufbereitung der Zellüberstände. Es wurde darüber hinaus ein anderer Wert für das Signifikanzniveau gewählt (Gonzalez-Franquesa et al., 2021b). Eine weitere MS-Studie an C2C12-Zellen setzte den AMPK-Aktivator AICAR ein und fand dabei 118 regulierte Proteine, jedoch wurde hier nicht explizit die Absicht genannt, die Wirkung von körperlicher Aktivität auf das Sekretom zu untersuchen (Gonzalez-Franquesa et al., 2021a).

Interessant scheint die insgesamt dreistellige Anzahl an herunterregulierten ksMs in dieser Arbeit. Diese könnte potenziell einige neue ksMs enthalten, denn über die durch Sport inhibierte Sekretion von Myokinen ist weniger bekannt, als über deren Steigerung (Peake et al., 2015). Florin et al. (2020) und Weigert et al. (2014) berichten in ihren Übersichtsarbeiten in der Zusammenschau verschiedener MS- und Nicht-MS-Studien im humanen und murinen *in-vitro*-Modell von keinen bzw. einer einstelligen Anzahl an herunterregulierten Myokinen

im Kontext von körperlicher Aktivität. Peake et al. (2015) heben die diesbezügliche Wissenslücke hervor und vermuten, dass negative *feedback*-Mechanismen dabei eine Rolle spielen könnten. In den zuvor erwähnten Studien, welche ebenfalls global durch eine MS-Analyse das C2C12-Sekretom nach Behandlung mit AICAR oder EPS untersuchten, wurden mit 83 (Gonzalez-Franquesa et al., 2021a) und 49 Proteinen (Gonzalez-Franquesa et al., 2021b) ebenfalls einige herunterregulierte Proteine gefunden. Diese beiden Studien listeten sogar mehr herunter- als heraufregulierte Proteine durch die jeweilige Behandlung auf. Eine weitere Exploration solcher in der Sekretion inhibierten Myokine könnte daher interessante Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen bieten.

Die in dieser Arbeit ermittelten Sekretome nach 6 und 24 Stunden zeigten unterschiedliche Charakteristika hinsichtlich der ksMs. So zeigten sich insgesamt höhere Anteile an als SP+ oder SP- klassifizierten Myokinen nach 24 Stunden EPS-Behandlung, während nach 6 Stunden EPS mehr Proteine mit einer höheren Abundanzänderung im Sekretom vorhanden waren. Insgesamt zeigte sich der Anteil der SP+/SP- Myokine höher unter den nach EPS heraufregulierten Proteinen im Vergleich zu den herunterregulierten Proteinen (vgl. Abbildung 10). Dies könnte in diesem Fall etwa darauf hinweisen, dass jeweils eine andere Art der Sekretion im Vordergrund stand.

4.2.7.2 *Vergleich kontraktionsabhängig sekretierter Proteine nach 6- und 24-stündiger EPS*

Insgesamt wurden in dieser Analyse von den 356 identifizierten ksMs lediglich 27 Proteine gefunden, deren Abundanzen im Zellüberstand nach beiden Stimulationsdauern signifikant verändert waren. Davon waren 15 Proteine nach 6 und 24 Stunden gleichgerichtet und zwölf Proteine gegensätzlich reguliert (vgl. 3.2.6).

Es wurde bei der Literaturrecherche keine weitere Studie gefunden, welche zuvor das globale, kontraktionsabhängige Sekretom von C2C12-Zellen nach zwei Stimulationsdauern bei ansonsten gleichen EPS-Parametern und Versuchsprotokollen verglich. Die geringen Schnittmengen in dieser Arbeit geben dabei Hinweise auf den großen Einfluss, den die gewählte Stimulationsdauer auf die Ergebnisse der ermittelten ksMs haben kann. Die Betrachtung des 1D-Gels und die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse (vgl. Abbildungen 5 und 6) deuten ebenfalls in diese Richtung. Sie zeigen zudem, dass sich die Sekretome nach 6 und 24 Stunden Inkubation im zu konditionierenden Medium generell merklich zu unterscheiden scheinen. Dies kann einerseits dafür sprechen, dass mit variierenden EPS-Protokollen noch einige neue ksMs ermittelt werden könnten, unterstreicht

jedoch auch die von Nikolić et al. (2017) und Nintou et al. (2022) beschriebene erschwerte Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus verschiedenen EPS-Studien bei gänzlich unterschiedlichen Protokollen, EPS-Parametern und Zelltypen. Vor diesem Hintergrund könnte die Gruppe der 15 Proteine, welche in dieser Arbeit nach beiden Stimulationsdauern gleichgerichtet reguliert waren, von besonderem Interesse sein. Es könnte es sich dabei um Myokine handeln, die in einer universelleren Art durch verschiedene Trainingsreize sekretiert bzw. in ihrer Sekretion inhibiert werden.

Der Effekt einer initialen Inhibition der Sekretion eines Myokins durch kürzere EP-Stimulationsdauern und der anschließenden Umkehr hin zu einer Verstärkung der Sekretion nach längeren Stimulationsdauern, wie es in dieser Studie auf 9 Proteine zutraf, wurde von Vianney et al. (2014) für das Protein GDNF (*Glial cell line-derived neurotrophic factor*) in C2C12-Zellen beschrieben. Einer der Erklärungsansätze dieser Autoren ist, dass ein Wechsel der dominanten Muskelfasertypen nach längerer EPS für die veränderte Richtung der GDNF-Sekretion verantwortlich sein könnte (Vianney et al., 2014). Ein Wandel vom schnellen zum vermehrt langsamen Fasertyp wurde von Nedachi et al. (2008) nach 24-stündigem EPS in C2C12-Zellen beschrieben.

Die insgesamt deutlichen Unterschiede in den kontraktionsabhängigen Sekretomen nach 6 Stunden im Vergleich zu 24 Stunden könnten auch auf eine unterschiedliche Regulation der entsprechenden Myokine bei einer akuten Trainingseinheit im Vergleich zu chronischem Training hindeuten, jedoch sollte ein Vergleich von EPS-Protokollen zu Trainingseinheiten *in vivo* nur vorsichtig vorgenommen werden (vgl. 1.2.2). Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz ist, dass einige der Myokine erst nach mehreren Stunden der Stimulation sekretiert wurden, wie es in anderen Studien bereits für IL-6 beschrieben wurde (Farmawati et al., 2013; Gonzalez-Franquesa et al., 2021b). Auch könnte es sein, dass die erhöhte Abundanz der LDH-A im Überstand der für 24 Stunden behandelten Zellen aus einer Veränderung des Stoffwechsels hin zu einem eher anaeroben Milieu resultierte (vgl. 4.2.4), welches sich wiederum generell auf das Sekretom ausgewirkt haben und dessen Unterschiedlichkeit erklären könnte. Dass eine Hypoxie-Exposition Einfluss auf das Sekretom von Muskelzellen nehmen kann, wurde kürzlich gezeigt (van Meijel et al., 2023). Um diese Hypothesen zu überprüfen wären jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

4.2.7.3 *Osteopontin*

Unter den nach 6 als auch nach 24 Stunden gleichgerichtet heraufregulierten Myokinen hob sich in dieser Arbeit Osteopontin (OPN) ab, da es als einziges Protein dieser Kategorie zusätzlich als klassisch sekretorisch (SP+) klassifiziert war und zudem in beiden Kategorien eine mehr als 3-fache Abundanzänderung zeigte. Osteopontin wurde daher für eine vertiefte Recherche und Diskussion ausgewählt. Im folgenden Abschnitt soll OPN und seine mögliche Rolle als ksM im Zusammenhang mit T2DM näher diskutiert werden.

Eine der ersten Beschreibungen von OPN erfolgte im Jahr 1985 als Sialoprotein 1 durch Franzén und Heinegård (1985), welche es im Rinderknochen aus der extrazellulären Matrix isolierten. Inzwischen hat sich gezeigt, dass OPN in vielen verschiedenen Geweben exprimiert wird (Icer und Gezmen-Karadag, 2018). OPN ist ein Bestandteil der Knochenmatrix und spielt wichtige Rollen im Knochenstoffwechsel (Si et al., 2020). Es ist unter anderem eine Expression im Fettgewebe beschrieben (Gómez-Ambrosi et al., 2007; Sawaki et al., 2018) und auch eine Expression und Sekretion durch C2C12-Skelettmuskelzellen wurde bereits gezeigt (Uaesoontrachoon et al., 2008). Im Menschen befindet sich das OPN-Gen auf Chromosom 4 (Young et al., 1990). OPN existiert in sekretorischer als auch in intrazellulär aktiver Form (Shinohara et al., 2008). Zu seinen Rezeptoren gehören verschiedene Integrine, CD44 und der EGF-Rezeptor (Chen et al., 2022).

Zu den vielfältigen Funktionen von OPN zählen eine Beteiligung an der Wundheilung, der zellulären Immunantwort, an Adhäsion und Chemotaxis von Zellen, an Umbauprozessen und Mineralisierungen in Geweben, bei der Regulation des Überlebens diverser Zellen und weitere (Denhardt et al., 2001; Mazzali et al., 2002). In den letzten Jahren wurde OPN in Bezug auf verschiedenste Erkrankungen erforscht. Diese betreffen etwa den Knochen (Si et al., 2020), das Gehirn (Zhou et al., 2020), diverse Krebserkrankungen (Chen et al., 2022; Zhao et al., 2018) und Infektionserkrankungen (Hattori et al., 2021). OPN wird häufig mit proinflammatorischen Eigenschaften in Verbindung gebracht (Lund et al., 2009; Zeyda et al., 2011). Im Fettgewebe etwa exprimieren neben Adipozyten und anderen Zellen auch Makrophagen einen maßgeblichen Anteil des OPN (Gómez-Ambrosi et al., 2007; Kiefer et al., 2008). Es gibt Evidenz, dass OPN auch direkt an der Pathogenese des T2DM beteiligt ist. Ein Review von Weng et al. (2022) fasst den aktuellen Wissensstand über die Rolle des CD44-Rezeptors und seiner klassischen Liganden, Osteopontin und Hyaluronan, im Glukose- und Lipidmetabolismus zusammen. Insgesamt betonen die Autoren, dass CD44 und OPN an der Insulinresistenz und Inflammation in mehreren Geweben beteiligt sind. Die Rolle von

OPN als CD44-Ligand bei der Entwicklung von Insulinresistenz spezifisch im Muskel sei jedoch noch unklar (Weng et al., 2022).

Die zirkulierenden OPN-Spiegel sind bei Übergewicht erhöht, während ein Gewichtsverlust diese wieder verringert (Gómez-Ambrosi et al., 2007). Ebenso verminderten sich die OPN-Plasmaspiegel bei Übergewichtigen nach einer einjährigen Lifestyle-Intervention bestehend aus Sport und Diät (Karampatsou et al., 2022) und nach einer sportlichen Kurzintervention, wobei sie hier nach 25 Stunden wieder zum Ausgangswert zurückkehrten (Raman et al., 2023). In OPN-*Knockout*-Mäusen auf Hochfettdiät ist die Inflammation im Fettgewebe im Vergleich zum Wildtyp trotz gleicher totaler Fettmasse abgeschwächt, außerdem zeigt sich eine verbesserte Insulinsensitivität und Glukosetoleranz (Nomiyama et al., 2007). Kahles et al. (2014) halten die Inhibition der OPN-Expression für einen möglichen pharmakologischen Angriffspunkt für die Behandlung des T2DM und seiner Folgeerkrankungen.

Interessanterweise zeigte eine andere Studie in diesem Kontext jedoch, dass bei Patienten mit metabolischem Syndrom höhere OPN-Spiegel zu Beginn der Untersuchungen ein Prädiktor für die Normalisierung des Blutzuckerspiegels nach einjähriger Lifestyle-Intervention mittels Diät sein können (Caserza et al., 2021). Des Weiteren wurde mehrfach eine erhöhte OPN-Expression und Sekretion im diabetischen bzw. hyperglykämischen Pankreas beschrieben, wobei OPN hier vornehmlich einen β -Zell-protectiven Effekt zu haben scheint (Cai et al., 2018; Katakam et al., 2005; Lyssenko et al., 2011). Dies äußerte sich in diesen Untersuchungen unter anderem in einer gesteigerten Glukose-vermittelten Insulinsekretion (Cai et al., 2018) und einer Stimulation der Proliferation sowie einem antiapoptotischen Effekt auf die β -Zellen (Lyssenko et al., 2011).

Die Rolle von OPN im Muskel und/oder als Myokin zeigt sich in der Forschung weniger repräsentiert. Es ist bekannt, dass OPN von Muskelzellen exprimiert und sezerniert werden kann (Uaesoontrachoon et al., 2008) und dass Muskelzellen CD44-Rezeptoren und Integrine exprimieren (Cachaco et al., 2005; Mylona et al., 2006). In Zusammenhang mit Skelettmuskeln wurde OPN mehrfach im Kontext von regenerativen Prozessen und muskulären Erkrankungen wie den Dystrophien untersucht (Bello und Pegoraro, 2019; Pagel et al., 2014; Tidball et al., 2018). Hoffman et al. (2013) zeigen, dass nach Muskelverletzungen die OPN-Expression im Mausmuskel akut um mehr als das 100-fache ansteigt und während der Regenerationsphase erhöht bleibt, bevor nach etwas über zwei Wochen wieder das basale Level erreicht wird. Generell scheint OPN durch viele Schlüsselfaktoren reguliert zu werden, die während der frühen Stadien von Muskelschädigung ausgeschüttet werden, so sekretieren

auch C2C12-Zellen mehr OPN, wenn sie zuvor mit bestimmten Zytokinen aus dem Kontext der Muskelschädigung oder dem Entzündungsmediator Interleukin-1 β behandelt wurden (Uaesoontrachoon et al., 2008). Die Abwesenheit von OPN im Muskel kann wiederum zu einer verminderten Regeneration nach akuter Schädigung führen (Uaesoontrachoon et al., 2013). Bei chronischer Schädigung, wie durch Dystrophien vom Typ Duchenne, ist ohne OPN jedoch eine verminderte Fibrosierung und eine verbesserte Muskelkraft zu beobachten (Vetrone et al., 2009).

Es wurde bei der Literaturrecherche keine Studie gefunden, welche zuvor explizit die kontraktionsabhängige Regulation der OPN-Sekretion durch Skelettmuskelzellen thematisierte. Es handelt sich bei OPN somit potenziell um ein in dieser Arbeit neu beschriebenes ksM. *In vivo* zeigte eine aktuelle Studie, dass regelmäßiges, moderates, körperliches Training bei einer Gruppe von Studenten die Plasmalevel von OPN im Vergleich zur nicht-trainierenden Kontrollgruppe steigern kann, was hier mit Bezug zu den Mechanismen der Muskelregeneration untersucht wurde (Wang et al., 2023). Auch im Plasma von Mäusen wurden nach mehrwöchigem Laufrad-Training und einer anschließend induzierten, intrazerebralen Blutung (ICH) erhöhte OPN-Spiegel im Vergleich zur untrainierten Kontrollgruppe detektiert. Die trainierten Mäuse zeigten daraufhin eine bessere Erholung von der ICH und ein besseres neurologisches *outcome* (Kinoshita et al., 2021). In keiner der beiden letztgenannten Studien wurden jedoch Aussagen zum zellulären Ursprungsort des im Plasma detektierten OPN getroffen.

Welche Funktionen ein kontraktionsabhängig durch Skelettmuskelzellen sekretiertes OPN haben könnte bleibt somit vorerst hypothetisch. Es könnte der oben angesprochenen akuten Regeneration des Muskels nach sportlicher Aktivität dienen. So ist Muskelaktivität selbst schon länger als Möglichkeit bekannt, dem verzögert einsetzenden Muskelkater entgegen zu wirken (Armstrong, 1984). Die Studie von Wang et al. (2023) zeigte zudem, dass Muskelfaserverletzungen in OPN-*Knockout*-Mäusen langsamer regenerieren als im Wildtyp.

Ansichts der oben beschriebenen Einflüsse von OPN auf den Glukosemetabolismus wäre es denkbar, dass auch kontraktionsabhängig sekretiertes OPN auf diese Signalwege Einfluss nimmt. Ein direkter Rückschluss der zuvor beschriebenen eher pro-inflammatorischen Funktionen von OPN im Fettgewebe auf den Metabolismus scheint dabei nicht angemessen. So wurden etwa bei IL-6 divergierende Wirkungen als Adipokin und als Myokin gezeigt: IL-6 verschlimmert als pro-inflammatorisches Adipokin beispielsweise Krankheiten wie die Atherosklerose (Liu et al., 2022), während seine Ausschüttung als Myokin im Kontext

körperlicher Aktivität eher als anti-inflammatorisch angesehen wird (Nara und Watanabe, 2021; Petersen und Pedersen, 2005). Es wäre möglich, dass es sich mit OPN als ksM ähnlich verhält und seine Ausschüttung im Rahmen körperlicher Aktivität positive Effekte auf die Gesundheit hat. Die im vorherigen Abschnitt erwähnten Studien zur Steigerung der Plasmaspiegel von OPN nach Sport könnten für diese These sprechen (Kinoshita et al., 2021; Wang et al., 2023). Grundsätzlich divergente gesundheitliche Einflüsse von OPN wurden bereits in anderen Kontexten beschrieben (Du et al., 2022; Icer und Gezmen-Karadag, 2018; Pagel et al., 2014).

Verschiedene Wirkungen von OPN können sich durch die Ausbildung unterschiedlicher Isoformen begründen: So existieren neben der Unterscheidung von intrazellulären und extrazellulären Formen auch verschiedene bekannte Splice-Varianten, Spaltprodukte, Polymerisationen und posttranskriptionale bzw. posttranslationale Modifikationen von OPN, welche allesamt die Funktion des Proteins beeinflussen können (Bastos et al., 2023; Gimba und Tilli, 2013; Hattori et al., 2021; Nishimichi et al., 2011). Auch die akute oder chronische Sekretion von OPN scheint in verschiedenen Kontexten teils ambivalente Wirkungen zu haben (Pagel et al., 2014; Levy et al., 2023). In Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen (CVDs) gibt es beispielsweise Hinweise, dass akut erhöhtes OPN protektive Effekte hat, während es bei chronischer Erhöhung in Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose vieler wichtiger CVDs steht (Shirakawa und Sano, 2021). Hier könnten weitere Untersuchungen interessant sein, um die entsprechenden Isoformen von OPN als potenzielles ksM näher zu definieren, den zeitlichen Verlauf der Sekretion und Elevation nach Kontraktion zu beobachten und die spezifischen auto-, para- und endokrinen Funktionen hinsichtlich des Glukosemetabolismus zu ergründen.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Diese Arbeit untersuchte das Sekretom von murinen C2C12-Skelettmuskelzellen nach 6- und 24-stündiger elektrischer Pulsstimulation als *in-vitro*-Modell für körperliche Aktivität mittels ungerichteter MS-Analyse. Dabei wurde eine dreistellige Anzahl an potenziellen ksM in den Überständen identifiziert, welche einen umfangreichen Datensatz für weitere mögliche Analysen darstellen können. Besonders die insgesamt dreistellige Anzahl an Myokinen, die durch Kontraktion herunterreguliert wurden, könnte hier interessant sein. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Stimulationsdauern von 6 und 24 Stunden, bei ansonsten gleichem Stimulations- und Behandlungsprotokoll, einen großen Einfluss auf das

kontraktionsabhängige, globale Sekretionsprofil von C2C12-Zellen nach EPS hatten. Als interessanter Kandidat für ein potenziell neues, kontraktionsabhängig sekretiertes Myokin wurde Osteopontin vorgestellt. Die Hintergründe dieses Proteins und seiner bekannten Effekte auf den Glukosemetabolismus in anderen Kontexten wurden vertiefend recherchiert und mögliche Einflüsse als ksM diskutiert.

Die gefundenen Ergebnisse sind vor dem Hintergrund zu betrachten, dass in dieser Arbeit aufgrund des hohen Versuchsaufwands und nach Ausschluss eines biologischen Replikats aus Qualitätsgründen nur die Überstände von zwei biologischen Replikaten analysiert wurden (vgl. 4.2.1). In einem nächsten Schritt wäre daher zunächst eine Validierung von als interessant erachteten, kontraktionsabhängigen Myokinen aus dieser Studie sinnvoll, falls diese noch nicht zuvor als ksM beschrieben waren. Dies könnte zum Beispiel durch Antikörper-Assays oder gezielte *Western-Blot*-Analysen erfolgen. Die Validierungsschritte könnten an primären humanen Skelettmuskelzellen wiederholt oder direkt mit diesen durchgeführt werden, um zu ermitteln, ob sich die gewonnenen Ergebnisse auf das humane System übertragen lassen. Vielversprechende Kandidaten könnten auf ihre Funktionen im Stoffwechsel untersucht werden. In Bezug auf Osteopontin zeigen die bisher bekannten Funktionen je nach Kontext sowohl positive als auch negative Effekte auf den Glukosemetabolismus (vgl. 4.2.7.3). Nach der Validierung von OPN als ksM könnte daher die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Sekretion nach Kontraktion, die Ermittlung der kontraktionsabhängig sekretierten Proteoformen, sowie eine Untersuchung deren jeweiliger Effekte bei akuter und chronischer Applikation auf die Insulinsensitivität verschiedener Gewebe von Interesse sein. Hieraus könnten sich neue Erkenntnisse in Bezug auf die gesundheitsfördernden Effekte von körperlicher Aktivität auf den T2DM ergeben.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- AAS, V., BAKKE, S. S., FENG, Y. Z., KASE, E. T., JENSEN, J., BAJPEYI, S., THORESEN, G. H. & RUSTAN, A. C. 2013. Are cultured human myotubes far from home? *Cell Tissue Res*, 354, 671-682.
- AGRAWAL, G. K., JWA, N. S., LEBRUN, M. H., JOB, D. & RAKWAL, R. 2010. Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics*, 10, 799-827.
- AGUER, C., LORO, E. & DI RAIMONDO, D. 2020. Editorial: The Role of the Muscle Secretome in Health and Disease. *Front Physiol*, 11, 1101.
- ALLEN, S. L., ELLIOTT, B. T., CARSON, B. P. & BREEN, L. 2023. Improving physiological relevance of cell culture: the possibilities, considerations, and future directions of the ex vivo coculture model. *Am J Physiol Cell Physiol*, 324, C420-C427.
- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J., TSIRIGOS, K. D., SØNDERBY, C. K., PETERSEN, T. N., WINTHER, O., BRUNAK, S., VON HEIJNE, G. & NIELSEN, H. 2019. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol*, 37, 420-423.
- AMANAT, S., GHAHRI, S., DIANATINASAB, A., FARAROUEI, M. & DIANATINASAB, M. 2020. Exercise and Type 2 Diabetes. *Adv Exp Med Biol*, 1228, 91-105.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION 2020. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2020. *Diabetes Care*, 43, S14-S31.
- ARMSTRONG, R. B. 1984. Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review. *Med Sci Sports Exerc*, 16, 529-538.
- ASFOUR, H. A., ALLOUH, M. Z. & SAID, R. S. 2018. Myogenic regulatory factors: The orchestrators of myogenesis after 30 years of discovery. *Exp Biol Med (Maywood)*, 243, 118-128.
- BAJAJ, P., REDDY, B. J., MILLET, L., WEI, C., ZORLUTUNA, P., BAO, G. & BASHIR, R. 2011. Patterning the differentiation of C2C12 skeletal myoblasts. *Integr Biol (Camb)*, 3, 897-909.
- BASTOS, A. C. S. D. F., GOMES, A. V. P., SILVA, G. R., EMERENCIANO, M., FERREIRA, L. B. & GIMBA, E. R. P. 2023. The Intracellular and Secreted Sides of Osteopontin and Their Putative Physiopathological Roles. *Int J Mol Sci*, 24, 2942.
- BAY, M. L. & PEDERSEN, B. K. 2020. Muscle-Organ Crosstalk: Focus on Immunometabolism. *Front Physiol*, 11, 567881.
- BELLO, L. & PEGORARO, E. 2019. The "Usual Suspects": Genes for Inflammation, Fibrosis, Regeneration, and Muscle Strength Modify Duchenne Muscular Dystrophy. *J Clin Med*, 8, 649.
- BENDTSEN, J. D., JENSEN, L. J., BLOM, N., VON HEIJNE, G. & BRUNAK, S. 2004. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel*, 17, 349-356.
- BERBUDI, A., RAHMADIKA, N., TIAHJADI, A. I. & RUSLAMI, R. 2020. Type 2 Diabetes and its Impact on the Immune System. *Curr Diabetes Rev*, 16, 442-449.
- BERGOUIGNAN, A., TRUDEL, G., SIMON, C., CHOPARD, A., SCHOELLER, D. A., MOMKEN, I., VOTRUBA, S. B., DESAGE, M., BURDGE, G. C., GAUQUELIN-KOCH, G., NORMAND, S. & BLANC, S. 2009. Physical inactivity differentially alters dietary oleate and palmitate trafficking. *Diabetes*, 58, 367-376.
- BLAU, H. M., CHIU, C. P. & WEBSTER, C. 1983. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell*, 32, 1171-1180.
- BOOTH, F. W. & THOMASON, D. B. 1991. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev*, 71, 541-585.

- BROWN, A. E., JONES, D. E., WALKER, M. & NEWTON, J. L. 2015. Abnormalities of AMPK activation and glucose uptake in cultured skeletal muscle cells from individuals with chronic fatigue syndrome. *PLoS One*, 10, e0122982.
- BULL, F. C., AL-ANSARI, S. S., BIDDLE, S., BORODULIN, K., BUMAN, M. P., CARDON, G., CARTY, C., CHAPUT, J. P., CHASTIN, S., CHOU, R., DEMPSEY, P. C., DIPIETRO, L., EKELUND, U., FIRTH, J., FRIEDENREICH, C. M., GARCIA, L., GICHU, M., JAGO, R., KATZMARZYK, P. T., LAMBERT, E., LEITZMANN, M., MILTON, K., ORTEGA, F. B., RANASINGHE, C., STAMATAKIS, E., TIEDEMANN, A., TROIANO, R. P., VAN DER PLOEG, H. P., WARI, V. & WILLUMSEN, J. F. 2020. World Health Organization 2020 guidelines on physical activity and sedentary behaviour. *Br J Sports Med*, 54, 1451-1462.
- BURCH, N., ARNOLD, A. S., ITEM, F., SUMMERMATTER, S., BROCHMANN SANTANA SANTOS, G., CHRISTE, M., BOUTELLIER, U., TOIGO, M. & HANDSCHIN, C. 2010. Electric pulse stimulation of cultured murine muscle cells reproduces gene expression changes of trained mouse muscle. *PLoS One*, 5, e10970.
- BURGESS, T. L. & KELLY, R. B. 1987. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu Rev Cell Biol*, 3, 243-293.
- CACHACO, A. S., PEREIRA, C. S., PARDAL, R. G., BAJANCA, F. & THORSTEINSDOTTIR, S. 2005. Integrin repertoire on myogenic cells changes during the course of primary myogenesis in the mouse. *Dev Dyn*, 232, 1069-1078.
- CAI, M., BOMPADA, P., SALEHI, A., ACOSTA, J. R., PRASAD, R. B., ATAC, D., LAAKSO, M., GROOP, L. & DE MARINIS, Y. 2018. Role of osteopontin and its regulation in pancreatic islet. *Biochem Biophys Res Commun*, 495, 1426-1431.
- CAPETANAKI, Y., BLOCH, R. J., KOULOUMENTA, A., MAVROIDIS, M. & PSARRAS, S. 2007. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp Cell Res*, 313, 2063-2076.
- CARSON, B. P. 2017. The Potential Role of Contraction-Induced Myokines in the Regulation of Metabolic Function for the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 8, 97.
- CARTER, S. & SOLOMON, T. P. J. 2019. In vitro experimental models for examining the skeletal muscle cell biology of exercise: the possibilities, challenges and future developments. *Pflugers Arch*, 471, 413-429.
- CASERZA, L., CASULA, M., ELIA, E., BONAVENTURA, A., LIBERALE, L., BERTOLOTTO, M., ARTOM, N., MINETTI, S., CONTINI, P., VERZOLA, D., PONTREMOLI, R., VIAZZI, F., VIVIANI, G. L., BERTOLINI, S., PENDE, A., PISCIOTTA, L., MONTECUCCO, F. & CARBONE, F. 2021. Serum osteopontin predicts glycaemic profile improvement in metabolic syndrome: A pilot study. *Eur J Clin Invest*, 51, e13403.
- CHAN, C. Y., MASUI, O., KRAKOVSKA, O., BELOZEROV, V. E., VOISIN, S., GHANNY, S., CHEN, J., MOYEZ, D., ZHU, P., EVANS, K. R., MCDERMOTT, J. C. & SIU, K. W. 2011. Identification of differentially regulated secretome components during skeletal myogenesis. *Mol Cell Proteomics*, 10, M110.004804.
- CHANG, J. S. & KONG, I. D. 2020. Irisin prevents dexamethasone-induced atrophy in C2C12 myotubes. *Pflugers Arch*, 472, 495-502.
- CHEN, L., HUAN, X., XIAO, G. H., YU, W. H., LI, T. F., GAO, X. D. & ZHANG, Y. C. 2022. Osteopontin and its downstream carcinogenic molecules: regulatory mechanisms and prognostic value in cancer progression. *Neoplasma*, 69, 1253-1269.
- CHEN, W., NYASHA, M. R., KOIDE, M., TSUCHIYA, M., SUZUKI, N., HAGIWARA, Y., AOKI, M. & KANZAKI, M. 2019. In vitro exercise model using contractile human and mouse hybrid myotubes. *Sci Rep*, 9, 11914.

- CHEN, Y., STEGAEV, V., KOURI, V. P., SILLAT, T., CHAZOT, P. L., STARK, H., WEN, J. G. & KONTTINEN, Y. T. 2015. Identification of histamine receptor subtypes in skeletal myogenesis. *Mol Med Rep*, 11, 2624-2630.
- CHUDYK, A. & PETRELLA, R. J. 2011. Effects of exercise on cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*, 34, 1228-1237.
- CIARALDI, T. P., RYAN, A. J., MUDALIAR, S. R. & HENRY, R. R. 2016. Altered Myokine Secretion Is an Intrinsic Property of Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *PLoS One*, 11, e0158209.
- COLBERG, S. R., ALBRIGHT, A. L., BLISSMER, B. J., BRAUN, B., CHASAN-TABER, L., FERNHALL, B., REGENSTEINER, J. G., RUBIN, R. R. & SIGAL, R. J. 2010. Exercise and type 2 diabetes: American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. Exercise and type 2 diabetes. *Med Sci Sports Exerc*, 42, 2282-2303.
- DELEZIE, J. & HANDSCHIN, C. 2018. Endocrine Crosstalk Between Skeletal Muscle and the Brain. *Front Neurol*, 9, 698.
- DELIC, M., VALLI, M., GRAF, A. B., PFEFFER, M., MATTANOVICH, D. & GASSER, B. 2013. The secretory pathway: exploring yeast diversity. *FEMS Microbiol Rev*, 37, 872-914.
- DENHARDT, D. T., NODA, M., O'REGAN, A. W., PAVLIN, D. & BERMAN, J. S. 2001. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest*, 107, 1055-1061.
- DESHMUKH, A. S., COX, J., JENSEN, L. J., MEISSNER, F. & MANN, M. 2015. Secretome Analysis of Lipid-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle Cells by a Combined Experimental and Bioinformatics Workflow. *J Proteome Res*, 14, 4885-4895.
- DIMOU, E. & NICKEL, W. 2018. Unconventional mechanisms of eukaryotic protein secretion. *Curr Biol*, 28, R406-R410.
- DOMIN, R., DADEJ, D., PYTKA, M., ZYBEK-KOCIK, A., RUCHAŁA, M. & GUZIK, P. 2021. Effect of Various Exercise Regimens on Selected Exercise-Induced Cytokines in Healthy People. *Int J Environ Res Public Health*, 18, 1261.
- DOWEIKO, J. P. & NOMPLEGGI, D. J. 1991. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 15, 207-211.
- DU, Y., MAO, L., WANG, Z., YAN, K., ZHANG, L. & ZOU, J. 2022. Osteopontin - The stirring multifunctional regulatory factor in multisystem aging. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 13, 1014853.
- EGAN, B. & ZIERATH, J. R. 2013. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab*, 17, 162-184.
- EVERS-VAN GOGH, I. J., ALEX, S., STIENSTRA, R., BRENKMAN, A. B., KERSTEN, S. & KALKHOVEN, E. 2015. Electric Pulse Stimulation of Myotubes as an In Vitro Exercise Model: Cell-Mediated and Non-Cell-Mediated Effects. *Sci Rep*, 5, 10944.
- FARMAWATI, A., KITAJIMA, Y., NEDACHI, T., SATO, M., KANZAKI, M. & NAGATOMI, R. 2013. Characterization of contraction-induced IL-6 up-regulation using contractile C2C12 myotubes. *Endocr J*, 60, 137-147.
- FAROOQI, A., GILLIES, C., SATHANAPALLY, H., ABNER, S., SEIDU, S., DAVIES, M. J., POLONSKY, W. H. & KHUNTI, K. 2022. A systematic review and meta-analysis to compare the prevalence of depression between people with and without Type 1 and Type 2 diabetes. *Prim Care Diabetes*, 16, 1-10.
- FEBBRAIO, M. A. & PEDERSEN, B. K. 2005. Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? *Exerc Sport Sci Rev*, 33, 114-119.
- FIUZA-LUCES, C., GARATACHEA, N., BERGER, N. A. & LUCIA, A. 2013. Exercise is the real polypill. *Physiology (Bethesda)*, 28, 330-358.

- FLING, S. P. & GREGERSON, D. S. 1986. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem*, 155, 83-88.
- FLORIN, A., LAMBERT, C., SANCHEZ, C., ZAPPIA, J., DURIEUX, N., TIEPPO, A. M., MOBASHERI, A. & HENROTIN, Y. 2020. The secretome of skeletal muscle cells: A systematic review. *Osteoarthritis and Cartilage Open*, 2, 100019.
- FRANZÉN, A. & HEINEGÅRD, D. 1985. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J*, 232, 715-724.
- FRONTERA, W. R. & OCHALA, J. 2015. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int*, 96, 183-195.
- FUJITA, H., NEDACHI, T. & KANZAKI, M. 2007. Accelerated de novo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes. *Exp Cell Res*, 313, 1853-1865.
- GIMBA, E. R. & TILLI, T. M. 2013. Human osteopontin splicing isoforms: known roles, potential clinical applications and activated signaling pathways. *Cancer Lett*, 331, 11-17.
- GOLDSTEIN, M. S. 1961. Humoral nature of hypoglycemia in muscular exercise. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 200, 67-70.
- GÓMEZ-AMBROSI, J., CATALÁN, V., RAMÍREZ, B., RODRÍGUEZ, A., COLINA, I., SILVA, C., ROTELLAR, F., MUGUETA, C., GIL, M. J., CIENFUEGOS, J. A., SALVADOR, J. & FRÜHBECK, G. 2007. Plasma osteopontin levels and expression in adipose tissue are increased in obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 3719-3727.
- GONZALEZ-FRANQUESA, A., PEIJS, L., CERVONE, D. T., KOÇANA, C., J. R. Z. & DESHMUKH, A. S. 2021a. Insulin and 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleotide (AICAR) Differentially Regulate the Skeletal Muscle Cell Secretome. *Proteomes*, 9, 37.
- GONZALEZ-FRANQUESA, A., STOCKS, B., BORG, M. L., KUEFNER, M., DALBRAM, E., NIELSEN, T. S., AGRAWAL, A., PANKRATOVA, S., CHIBALIN, A. V., KARLSSON, H. K. R., GHEIBI, S., BJÖRNHOLM, M., JØRGENSEN, N. R., CLEMMENSEN, C., TREEBAK, J. T., HOSTRUP, M., KROOK, A., ZIERATH, J. R. & DESHMUKH, A. S. 2021b. Discovery of Thymosin Beta-4 as a Human Exerkine and Growth Factor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 321, C770-C778.
- GÖRGENS, S. W., HJORTH, M., ECKARDT, K., WICHERT, S., NORHEIM, F., HOLEN, T., LEE, S., LANGLEITE, T., BIRKELAND, K. I., STADHEIM, H. K., KOLNES, K. J., TANGEN, D. S., KOLNES, A. J., JENSEN, J., DREVON, C. A. & ECKEL, J. 2016. The exercise-regulated myokine chitinase-3-like protein 1 stimulates human myocyte proliferation. *Acta Physiol (Oxf)*, 216, 330-345.
- GRUBE, L., DELLEN, R., KRUSE, F., SCHWENDER, H., STÜHLER, K. & POSCHMANN, G. 2018. Mining the Secretome of C2C12 Muscle Cells: Data Dependent Experimental Approach To Analyze Protein Secretion Using Label-Free Quantification and Peptide Based Analysis. *Journal of Proteome Research*, 17, 879-890.
- GUEUGNEAU, M., D'HOSE, D., BARBÉ, C., DE BARSY, M., LAUSE, P., MAITER, D., BINDELS, L. B., DELZENNE, N. M., SCHAEFFER, L., GANGLOFF, Y. G., CHAMBON, C., COUDY-GANDILHON, C., BÉCHET, D. & THISSEN, J. P. 2018. Increased Serpina3n release into circulation during glucocorticoid-mediated muscle atrophy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 9, 929-946.
- GUTHOLD, R., STEVENS, G. A., RILEY, L. M. & BULL, F. C. 2018. Worldwide trends in insufficient physical activity from 2001 to 2016: a pooled analysis of 358 population-based surveys with 1.9 million participants. *Lancet Glob Health*, 6, e1077-e1086.

- HAMBURG, N. M., MCMACKIN, C. J., HUANG, A. L., SHENOUDA, S. M., WIDLANSKY, M. E., SCHULZ, E., GOKCE, N., RUDERMAN, N. B., KEANEY, J. F., JR. & VITA, J. A. 2007. Physical inactivity rapidly induces insulin resistance and microvascular dysfunction in healthy volunteers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 2650-2656.
- HARTWIG, S., DE FILIPPO, E., GODDEKE, S., KNEBEL, B., KOTZKA, J., AL-HASANI, H., RODEN, M., LEHR, S. & SELL, H. 2019. Exosomal proteins constitute an essential part of the human adipose tissue secretome. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 1867, 140172.
- HARTWIG, S., RASCHKE, S., KNEBEL, B., SCHELER, M., IRMLER, M., PASSLACK, W., MULLER, S., HANISCH, F. G., FRANZ, T., LI, X., DICKEN, H. D., ECKARDT, K., BECKERS, J., DE ANGELIS, M. H., WEIGERT, C., HÄRING, H. U., AL-HASANI, H., OUWENS, D. M., ECKEL, J., KOTZKA, J. & LEHR, S. 2014. Secretome profiling of primary human skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, 1844, 1011-1017.
- HATHOUT, Y. 2007. Approaches to the study of the cell secretome. *Expert Rev Proteomics*, 4, 239-248.
- HATTORI, T., IWASAKI-HOZUMI, H., BAI, G., CHAGAN-YASUTAN, H., SHETE, A., TELAN, E. F., TAKAHASHI, A., ASHINO, Y. & MATSUBA, T. 2021. Both Full-Length and Protease-Cleaved Products of Osteopontin Are Elevated in Infectious Diseases. *Biomedicines*, 9, 1006.
- HAWLEY, J. A., HARGREAVES, M., JOYNER, M. J. & ZIERATH, J. R. 2014. Integrative biology of exercise. *Cell*, 159, 738-749.
- HENNINGSEN, J., RIGBOLT, K. T., BLAGOEV, B., PEDERSEN, B. K. & KRATCHMAROVA, I. 2010. Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation. *Mol Cell Proteomics*, 9, 2482-2496.
- HJORTH, M., NORHEIM, F., MEEN, A. J., POURTEYMOUR, S., LEE, S., HOLEN, T., JENSEN, J., BIRKELAND, K. I., MARTINOV, V. N., LANGLEITE, T. M., ECKARDT, K., DREVON, C. A. & KOLSET, S. O. 2015. The effect of acute and long-term physical activity on extracellular matrix and serglycin in human skeletal muscle. *Physiol Rep*, 3, e12473.
- HOFFMAN, E. P., GORDISH-DRESSMAN, H., MCLANE, V. D., DEVANEY, J. M., THOMPSON, P. D., VISICH, P., GORDON, P. M., PESCATELLO, L. S., ZOELLER, R. F., MOYNA, N. M., ANGELOPOULOS, T. J., PEGORARO, E., COX, G. A. & CLARKSON, P. M. 2013. Alterations in osteopontin modify muscle size in females in both humans and mice. *Med Sci Sports Exerc*, 45, 1060-1068.
- HOFFMAN, N. J. 2017. Omics and Exercise: Global Approaches for Mapping Exercise Biological Networks. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7, a029884.
- ICER, M. A. & GEZMEN-KARADAG, M. 2018. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clin Biochem*, 59, 17-24.
- INZUCCHI, S. E., BERGENSTAL, R. M., BUSE, J. B., DIAMANT, M., FERRANNINI, E., NAUCK, M., PETERS, A. L., TSAPAS, A., WENDER, R. & MATTHEWS, D. R. 2015. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centred approach. Update to a Position Statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia*, 58, 429-442.
- ISHIUCHI, Y., SATO, H., KOMATSU, N., KAWAGUCHI, H., MATSUWAKI, T., YAMANOUCHI, K., NISHIHARA, M. & NEDACHI, T. 2018. Identification of CCL5/RANTES as a novel contraction-reducible myokine in mouse skeletal muscle. *Cytokine*, 108, 17-23.
- KAHLES, F., FINDEISEN, H. M. & BRUEMMER, D. 2014. Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Mol Metab*, 3, 384-393.

- KANALEY, J. A., COLBERG, S. R., CORCORAN, M. H., MALIN, S. K., RODRIGUEZ, N. R., CRESPO, C. J., KIRWAN, J. P. & ZIERATH, J. R. 2022. Exercise/Physical Activity in Individuals with Type 2 Diabetes: A Consensus Statement from the American College of Sports Medicine. *Med Sci Sports Exerc*, 54, 353-368.
- KARAMPATSOU, S. I., PALTOGLOU, G., GENITSARIDI, S. M., KASSARI, P. & CHARMANDARI, E. 2022. The Effect of a Comprehensive Life-Style Intervention Program of Diet and Exercise on Four Bone-Derived Proteins, FGF-23, Osteopontin, NGAL and Sclerostin, in Overweight or Obese Children and Adolescents. *Nutrients*, 14, 3772.
- KATAKAM, A. K., CHIPITSYNA, G., GONG, Q., VANCHA, A. R., GABBETA, J. & ARAFAT, H. A. 2005. Streptozotocin (STZ) mediates acute upregulation of serum and pancreatic osteopontin (OPN): a novel islet-protective effect of OPN through inhibition of STZ-induced nitric oxide production. *J Endocrinol*, 187, 237-247.
- KHAN, S. U. & GHAFOR, S. 2019. Myokines: Discovery Challenges and Therapeutic Impediments. *J Pak Med Assoc*, 69, 1014-1017.
- KIEFER, F. W., ZEYDA, M., TODORIC, J., HUBER, J., GEYEREGGER, R., WEICHHART, T., ASZMANN, O., LUDVIK, B., SILBERHUMER, G. R., PRAGER, G. & STULNIG, T. M. 2008. Osteopontin expression in human and murine obesity: extensive local up-regulation in adipose tissue but minimal systemic alterations. *Endocrinology*, 149, 1350-1357.
- KINOSHITA, K., HAMANAKA, G., OHTOMO, R., TAKASE, H., CHUNG, K. K., LOK, J., LO, E. H., KATSUKI, H. & ARAI, K. 2021. Mature Adult Mice With Exercise-Preconditioning Show Better Recovery After Intracerebral Hemorrhage. *Stroke*, 52, 1861-1865.
- KITZMANN, M. & FERNANDEZ, A. 2001. Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cell Mol Life Sci*, 58, 571-579.
- KJØBSTED, R., ROLL, J. L. W., JØRGENSEN, N. O., BIRK, J. B., FORETZ, M., VIOLLET, B., CHADT, A., AL-HASANI, H. & WOJTASZEWSKI, J. F. P. 2019. AMPK and TBC1D1 Regulate Muscle Glucose Uptake After, but Not During, Exercise and Contraction. *Diabetes*, 68, 1427-1440.
- KNOWLER, W. C., BARRETT-CONNOR, E., FOWLER, S. E., HAMMAN, R. F., LACHIN, J. M., WALKER, E. A. & NATHAN, D. M. 2002. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*, 346, 393-403.
- LAMBERND, S., TAUBE, A., SCHOBER, A., PLATZBECKER, B., GÖRGENS, S. W., SCHLICH, R., JERUSCHKE, K., WEISS, J., ECKARDT, K. & ECKEL, J. 2012. Contractile activity of human skeletal muscle cells prevents insulin resistance by inhibiting pro-inflammatory signalling pathways. *Diabetologia*, 55, 1128-1139.
- LAURENS, C., BERGOUIGNAN, A. & MORO, C. 2020. Exercise-Released Myokines in the Control of Energy Metabolism. *Front Physiol*, 11, 91.
- LAUTAOJA, J. H., TURNER, D. C., SHARPLES, A. P., KIVELÄ, R., PEKKALA, S., HULMI, J. J. & YLÄ-OUTINEN, L. 2023. Mimicking exercise in vitro: effects of myotube contractions and mechanical stretch on omics. *Am J Physiol Cell Physiol*, 324, C886-C892.
- LEE, I. M., SHIROMA, E. J., LOBELO, F., PUSKA, P., BLAIR, S. N., KATZMARZYK, P. T. & LANCET PHYSICAL ACTIVITY SERIES WORKING GROUP 2012. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet*, 380, 219-229.
- LEON, B. M. & MADDOX, T. M. 2015. Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World J Diabetes*, 6, 1246-1258.

- LEVY, E., MARCIL, V., TAGHARIST ÉP BAUMEL, S., DAHAN, N., DELVIN, E. & SPAHIS, S. 2023. Lactoferrin, Osteopontin and Lactoferrin-Osteopontin Complex: A Critical Look on Their Role in Perinatal Period and Cardiometabolic Disorders. *Nutrients*, 15, 1394.
- LI, X., WANG, W. & CHEN, J. 2017. Recent progress in mass spectrometry proteomics for biomedical research. *Sci China Life Sci*, 60, 1093-1113.
- LI, X., ZHANG, S., ZHANG, Y., LIU, P., LI, M., LU, Y. & HAN, J. 2021. Myoblast differentiation of C2C12 cell may related with oxidative stress. *Intractable Rare Dis Res*, 10, 173-178.
- LIN, W., SONG, H., SHEN, J., WANG, J., YANG, Y., YANG, Y., CAO, J., XUE, L., ZHAO, F., XIAO, T. & LIN, R. 2023. Functional role of skeletal muscle-derived interleukin-6 and its effects on lipid metabolism. *Front Physiol*, 14, 1110926.
- LIU, L., SHI, Z., JI, X., ZHANG, W., LUAN, J., ZHR, T. & QIANG, L. 2022. Adipokines, adiposity, and atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci*, 79, 272.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.
- LUND, S. A., GIACHELLI, C. M. & SCATENA, M. 2009. The role of osteopontin in inflammatory processes. *J Cell Commun Signal*, 3, 311-322.
- LYSSENKO, V., ELIASSON, L., KOTOVA, O., PILGAARD, K., WIERUP, N., SALEHI, A., WENDT, A., JONSSON, A., DE MARINIS, Y. Z., BERGLUND, L. M., TANEERA, J., BALHUIZEN, A., HANSSON, O., OSMARK, P., DUNER, P., BRONS, C., STANCAKOVA, A., KUUSISTO, J., BUGLIANI, M., SAXENA, R., AHLQVIST, E., KIEFFER, T. J., TUOMI, T., ISOMAA, B., MELANDER, O., SONESTEDT, E., ORHO-MELANDER, M., NILSSON, P., BONETTI, S., BONADONNA, R., MICCOLI, R., DELPRATO, S., MARCHETTI, P., MADSBAD, S., POULSEN, P., VAAG, A., LAAKSO, M., GOMEZ, M. F. & GROOP, L. 2011. Pleiotropic effects of GIP on islet function involve osteopontin. *Diabetes*, 60, 2424-2433.
- MAGLIULO, L., BONDI, D., PINI, N., MARRAMIERO, L. & DI FILIPPO, E. S. 2022. The wonder exerkines-novel insights: a critical state-of-the-art review. *Mol Cell Biochem*, 477, 105-113.
- MANABE, Y., MIYATAKE, S., TAKAGI, M., NAKAMURA, M., OKEDA, A., NAKANO, T., HIRSHMAN, M. F., GOODYEAR, L. J. & FUJII, N. L. 2012. Characterization of an acute muscle contraction model using cultured C2C12 myotubes. *PLoS One*, 7, e52592.
- MANN, M., KULAK, N. A., NAGARAJ, N. & COX, J. 2013. The coming age of complete, accurate, and ubiquitous proteomes. *Mol Cell*, 49, 583-590.
- MAZZALI, M., KIPARI, T., OPHASCHAROENSUK, V., WESSON, J. A., JOHNSON, R. & HUGHES, J. 2002. Osteopontin--a molecule for all seasons. *QJM*, 95, 3-13.
- MCMAHON, D. K., ANDERSON, P. A., NASSAR, R., BUNTING, J. B., SABA, Z., OAKELEY, A. E. & MALOUF, N. N. 1994. C2C12 cells: biophysical, biochemical, and immunocytochemical properties. *Am J Physiol*, 266, C1795-C1802.
- MIAO, P., SHENG, S., SUN, X., LIU, J. & HUANG, G. 2013. Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life*, 65, 904-910.
- MIYATAKE, S., BILAN, P. J., PILLON, N. J. & KLIP, A. 2016. Contracting C2C12 myotubes release CCL2 in an NF-kappaB-dependent manner to induce monocyte chemoattraction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 310, E160-E170.
- MORA, S., COOK, N., BURING, J. E., RIDKER, P. M. & LEE, I. M. 2007. Physical activity and reduced risk of cardiovascular events: potential mediating mechanisms. *Circulation*, 116, 2110-2118.

- MUKUND, K. & SUBRAMANIAM, S. 2020. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 12, e1462.
- MYLONA, E., JONES, K. A., MILLS, S. T. & PAVLATH, G. K. 2006. CD44 regulates myoblast migration and differentiation. *J Cell Physiol*, 209, 314-321.
- NARA, H. & WATANABE, R. 2021. Anti-Inflammatory Effect of Muscle-Derived Interleukin-6 and Its Involvement in Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci*, 22, 9889.
- NAUMANN, K. & PETTE, D. 1994. Effects of chronic stimulation with different impulse patterns on the expression of myosin isoforms in rat myotube cultures. *Differentiation*, 55, 203-211.
- NEDACHI, T., FUJITA, H. & KANZAKI, M. 2008. Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295, E1191-E1204.
- NEDACHI, T., HATAKEYAMA, H., KONO, T., SATO, M. & KANZAKI, M. 2009. Characterization of contraction-inducible CXC chemokines and their roles in C2C12 myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297, E866-E878.
- NEUFER, P. D., BAMMAN, M. M., MUOIO, D. M., BOUCHARD, C., COOPER, D. M., GOODPASTER, B. H., BOOTH, F. W., KOHRT, W. M., GERSZTEN, R. E., MATTSON, M. P., HEPPLE, R. T., KRAUS, W. E., REID, M. B., BODINE, S. C., JAKICIC, J. M., FLEG, J. L., WILLIAMS, J. P., JOSEPH, L., EVANS, M., MARUVADA, P., RODGERS, M., ROARY, M., BOYCE, A. T., DRUGAN, J. K., KOENIG, J. I., INGRAHAM, R. H., KROTOSKI, D., GARCIA-CAZARIN, M., MCGOWAN, J. A. & LAUGHLIN, M. R. 2015. Understanding the Cellular and Molecular Mechanisms of Physical Activity-Induced Health Benefits. *Cell Metab*, 22, 4-11.
- NIKOLIĆ, N., BAKKE, S. S., KASE, E. T., RUDBERG, I., FLO HALLE, I., RUSTAN, A. C., THORESEN, G. H. & AAS, V. 2012. Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an in vitro model of exercise. *PLoS One*, 7, e33203.
- NIKOLIĆ, N., GÖRGENS, S. W., THORESEN, G. H., AAS, V., ECKEL, J. & ECKARDT, K. 2017. Electrical pulse stimulation of cultured skeletal muscle cells as a model for in vitro exercise - possibilities and limitations. *Acta Physiol (Oxf)*, 220, 310-331.
- NINTOU, E., KARLIGIOTOU, E., VLIORA, M., IOANNOU, L. G. & FLOURIS, A. D. 2022. Characteristics of the Protocols Used in Electrical Pulse Stimulation of Cultured Cells for Mimicking In Vivo Exercise: A Systematic Review, Meta-Analysis, and Meta-Regression. *Int J Mol Sci*, 23, 13446.
- NISHIMICHI, N., HAYASHITA-KINOH, H., CHEN, C., MATSUDA, H., SHEPPARD, D. & YOKOSAKI, Y. 2011. Osteopontin undergoes polymerization in vivo and gains chemotactic activity for neutrophils mediated by integrin alpha9beta1. *J Biol Chem*, 286, 11170-11178.
- NOMIYAMA, T., PEREZ-TILVE, D., OGAWA, D., GIZARD, F., ZHAO, Y., HEYWOOD, E. B., JONES, K. L., KAWAMORI, R., CASSIS, L. A., TSCHOP, M. H. & BRUEMMER, D. 2007. Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *J Clin Invest*, 117, 2877-2888.
- OHLENDIECK, K. 2011. Skeletal muscle proteomics: current approaches, technical challenges and emerging techniques. *Skelet Muscle*, 1, 6.
- OLDFORS, A. 2007. Hereditary myosin myopathies. *Neuromuscul Disord*, 17, 355-367.
- ØRTENBLAD, N., MOGENSEN, M., PETERSEN, I., HØJLUND, K., LEVIN, K., SAHLIN, K., BECK-NIELSEN, H. & GASTER, M. 2005. Reduced insulin-mediated citrate synthase activity in cultured skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes: evidence for an intrinsic oxidative enzyme defect. *Biochim Biophys Acta*, 1741, 206-214.

- OSIS, G., TRAYLOR, A. M., BLACK, L. M., SPANGLER, D., GEORGE, J. F., ZARJOU, A., VERLANDER, J. W. & AGARWAL, A. 2021. Expression of lactate dehydrogenase A and B isoforms in the mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 320, F706-F718.
- OST, M., COLEMAN, V., KASCH, J. & KLAUS, S. 2016. Regulation of myokine expression: Role of exercise and cellular stress. *Free Radic Biol Med*, 98, 78-89.
- PAGEL, C. N., WASGEWATTE WIJESINGHE, D. K., TAGHAVI ESFANDOUNI, N. & MACKIE, E. J. 2014. Osteopontin, inflammation and myogenesis: influencing regeneration, fibrosis and size of skeletal muscle. *J Cell Commun Signal*, 8, 95-103.
- PAN, B., GE, L., XUN, Y. Q., CHEN, Y. J., GAO, C. Y., HAN, X., ZUO, L. Q., SHAN, H. Q., YANG, K. H., DING, G. W. & TIAN, J. H. 2018. Exercise training modalities in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and network meta-analysis. *Int J Behav Nutr Phys Act*, 15, 72.
- PANTALONE, K. M., HOBBS, T. M., WELLS, B. J., KONG, S. X., KATTAN, M. W., BOUCHARD, J., YU, C., SAKURADA, B., MILINOVICH, A., WENG, W., BAUMAN, J. M. & ZIMMERMAN, R. S. 2015. Clinical characteristics, complications, comorbidities and treatment patterns among patients with type 2 diabetes mellitus in a large integrated health system. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 3, e000093.
- PEAKE, J. M., DELLA GATTA, P., SUZUKI, K. & NIEMAN, D. C. 2015. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exerc Immunol Rev*, 21, 8-25.
- PEDERSEN, B. K. & FEBBRAIO, M. A. 2012. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*, 8, 457-465.
- PEDERSEN, B. K., STEENSBERG, A., FISCHER, C., KELLER, C., KELLER, P., PLOMGAARD, P., FEBBRAIO, M. & SALTIN, B. 2003. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J Muscle Res Cell Motil*, 24, 113-119.
- PERRIN, L., LOIZIDES-MANGOLD, U., SKARUPELOVA, S., PULIMENO, P., CHANON, S., ROBERT, M., BOUZAKRI, K., MODOUX, C., ROUX-LOMBARD, P., VIDAL, H., LEFAI, E. & DIBNER, C. 2015. Human skeletal myotubes display a cell-autonomous circadian clock implicated in basal myokine secretion. *Mol Metab*, 4, 834-845.
- PETERSEN, A. M. & PEDERSEN, B. K. 2005. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol (1985)*, 98, 1154-1162.
- PETERSMANN, A., MÜLLER-WIELAND, D., MÜLLER, U. A., LANDGRAF, R., NAUCK, M., FRECKMANN, G., HEINEMANN, L. & SCHLEICHER, E. 2019. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 127, S1-S7.
- PORPORATO, P. E., DHUP, S., DADHICH, R. K., COPETTI, T. & SONVEAUX, P. 2011. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol*, 2, 49.
- RABILLOUD, T., STRUB, J. M., LUCHE, S., VAN DORSSELAER, A. & LUNARDI, J. 2001. A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics*, 1, 699-704.
- RABOUILLE, C. 2017. Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends Cell Biol*, 27, 230-240.
- RAMAN, A., PEIFFER, J. J., HOYNE, G. F., LAWLER, N. G., CURRIE, A. & FAIRCHILD, T. J. 2023. Exercise-induced responses in matrix metalloproteinases and osteopontin are not moderated by exercise format in males with overweight or obesity. *Eur J Appl Physiol*, 123, 1115-1124.

- RAPOSO, G. & STOORVOGEL, W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 200, 373-383.
- RASCHKE, S., ECKARDT, K., BJØRKLUND HOLVEN, K., JENSEN, J. & ECKEL, J. 2013a. Identification and validation of novel contraction-regulated myokines released from primary human skeletal muscle cells. *PLoS One*, 8, e62008.
- RASCHKE, S., ELSÉN, M., GASSENHUBER, H., SOMMERFELD, M., SCHWAHN, U., BROCKMANN, B., JUNG, R., WISLØFF, U., TJØNNA, A. E., RAASTAD, T., HALLÉN, J., NORHEIM, F., DREVON, C. A., ROMACHO, T., ECKARDT, K. & ECKEL, J. 2013b. Evidence against a beneficial effect of irisin in humans. *PLoS One*, 8, e73680.
- RUEGSEGGER, G. N. & BOOTH, F. W. 2018. Health Benefits of Exercise. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8, a029694.
- RUTTI, S., DUSAULCY, R., HANSEN, J. S., HOWALD, C., DERMITZAKIS, E. T., PEDERSEN, B. K., PINGET, M., PLOMGAARD, P. & BOUZAKRI, K. 2018. Angiogenin and Osteoprotegerin are type II muscle specific myokines protecting pancreatic beta-cells against proinflammatory cytokines. *Sci Rep*, 8, 10072.
- SABAG, A., CHANG, C. R., FRANCOIS, M. E., KEATING, S. E., COOMBES, J. S., JOHNSON, N. A., PASTOR-VALERO, M. & REY LOPEZ, J. P. 2023. The Effect of Exercise on Quality of Life in Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Med Sci Sports Exerc*, 55, 1353-1365.
- SAFDAR, A. & TARNOPOLSKY, M. A. 2018. Exosomes as Mediators of the Systemic Adaptations to Endurance Exercise. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8, a029827.
- SAMPATH KUMAR, A., MAIYA, A. G., SHASTRY, B. A., VAISHALI, K., RAVISHANKAR, N., HAZARI, A., GUNDMI, S. & JADHAV, R. 2019. Exercise and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Ann Phys Rehabil Med*, 62, 98-103.
- SANFORD, J. A., NOGIEC, C. D., LINDHOLM, M. E., ADKINS, J. N., AMAR, D., DASARI, S., DRUGAN, J. K., FERNÁNDEZ, F. M., RADOM-AIZIK, S., SCHENK, S., SNYDER, M. P., TRACY, R. P., VANDERBOOM, P., TRAPPE, S. & WALSH, M. J. 2020. Molecular Transducers of Physical Activity Consortium (MoTrPAC): Mapping the Dynamic Responses to Exercise. *Cell*, 181, 1464-1474.
- SAWAKI, D., CZIBIK, G., PINI, M., TERNACLE, J., SUFFEE, N., MERCEDES, R., MARCELIN, G., SURENAUD, M., MARCOS, E., GUAL, P., CLÉMENT, K., HUE, S., ADNOT, S., HATEM, S. N., TSUCHIMOCCHI, I., YOSHIMITSU, T., HÉNÉGAR, C. & DERUMEAUX, G. 2018. Visceral Adipose Tissue Drives Cardiac Aging Through Modulation of Fibroblast Senescence by Osteopontin Production. *Circulation*, 138, 809-822.
- SCHELER, M., DE ANGELIS, M. H., AL-HASANI, H., HÄRING, H. U., WEIGERT, C. & LEHR, S. 2015. Methods for proteomics-based analysis of the human muscle secretome using an in vitro exercise model. *Methods Mol Biol*, 1295, 55-64.
- SCHELER, M., IRMLER, M., LEHR, S., HARTWIG, S., STAIGER, H., AL-HASANI, H., BECKERS, J., DE ANGELIS, M. H., HÄRING, H. U. & WEIGERT, C. 2013. Cytokine response of primary human myotubes in an in vitro exercise model. *Am J Physiol Cell Physiol*, 305, C877-C886.
- SCHIAFFINO, S. & REGGIANI, C. 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*, 91, 1447-1531.
- SEVERINSEN, M. C. K. & PEDERSEN, B. K. 2020. Muscle-Organ Crosstalk: The Emerging Roles of Myokines. *Endocr Rev*, 41, 594-609.
- SHAINBERG, A. & BURSTEIN, M. 1976. Decrease of acetylcholine receptor synthesis in muscle cultures by electrical stimulation. *Nature*, 264, 368-369.

- SHINOHARA, M. L., KIM, H. J., KIM, J. H., GARCIA, V. A. & CANTOR, H. 2008. Alternative translation of osteopontin generates intracellular and secreted isoforms that mediate distinct biological activities in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 7235-7539.
- SHIRAKAWA, K. & SANO, M. 2021. Osteopontin in Cardiovascular Diseases. *Biomolecules*, 11, 1047.
- SI, J., WANG, C., ZHANG, D., WANG, B. & ZHOU, Y. 2020. Osteopontin in Bone Metabolism and Bone Diseases. *Med Sci Monit*, 26, e919159.
- SMERDU, V., KARSCH-MIZRACHI, I., CAMPIONE, M., LEINWAND, L. & SCHIAFFINO, S. 1994. Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *Am J Physiol*, 267, C1723-C1728.
- SOARES ANDRADE, C. A., SHAHIN, B., DEDE, O., AKPEJI, A. O., AJENE, C. L., ALBANO ISRAEL, F. E. & VARGA, O. 2023. The burden of type 2 diabetes mellitus in states of the European Union and United Kingdom at the national and subnational levels: A systematic review. *Obes Rev*, 24, e13593.
- STEGBAUER, C., FALIVENA, C., MORENO, A., HENTSCHEL, A., ROSENMÖLLER, M., HEISE, T., SZECSENYI, J. & SCHLISS, F. 2020. Costs and its drivers for diabetes mellitus type 2 patients in France and Germany: a systematic review of economic studies. *BMC Health Services Research*, 20, 1043.
- STUMP, C. S., HENRIKSEN, E. J., WEI, Y. & SOWERS, J. R. 2006. The metabolic syndrome: role of skeletal muscle metabolism. *Ann Med*, 38, 389-402.
- TIDBALL, J. G., WELC, S. S. & WEHLING-HENRICKS, M. 2018. Immunobiology of Inherited Muscular Dystrophies. *Compr Physiol*, 8, 1313-1356.
- TIEN, W. S., CHEN, J. H. & WU, K. P. 2017. SheddomeDB: the ectodomain shedding database for membrane-bound shed markers. *BMC Bioinformatics*, 18, 42.
- TÖNNIES, T., RÖCKL, S., HOYER, A., HEIDEMANN, C., BAUMERT, J., DU, Y., SCHEIDT-NAVE, C. & BRINKS, R. 2019. Projected number of people with diagnosed Type 2 diabetes in Germany in 2040. *Diabet Med*, 36, 1217-1225.
- TURNER, D. C., GORSKI, P. P., SEABORNE, R. A., VIGGARS, M., MURPHY, M., JARVIS, J. C., MARTIN, N. R. W., STEWART, C. E. & SHARPLES, A. P. 2021. Mechanical loading of bioengineered skeletal muscle in vitro recapitulates gene expression signatures of resistance exercise in vivo. *J Cell Physiol*, 236, 6534-6547.
- UAESOONTRACHOON, K., WASGEWATTE WIJESINGHE, D. K., MACKIE, E. J. & PAGEL, C. N. 2013. Osteopontin deficiency delays inflammatory infiltration and the onset of muscle regeneration in a mouse model of muscle injury. *Dis Model Mech*, 6, 197-205.
- UAESOONTRACHOON, K., YOO, H. J., TUDOR, E. M., PIKE, R. N., MACKIE, E. J. & PAGEL, C. N. 2008. Osteopontin and skeletal muscle myoblasts: association with muscle regeneration and regulation of myoblast function in vitro. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 2303-2314.
- VAN MEIJEL, R. L. J., VLIEX, L. M. M., HARTWIG, S., LEHR, S., AL-HASANI, H., BLAAK, E. E. & GOOSSENS, G. H. 2023. The impact of mild hypoxia exposure on myokine secretion in human obesity. *Int J Obes (Lond)*, 47, 520-527.
- VETRONE, S. A., MONTECINO-RODRIGUEZ, E., KUDRYASHOVA, E., KRAMEROVA, I., HOFFMAN, E. P., LIU, S. D., MICELI, M. C. & SPENCER, M. J. 2009. Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF-beta. *J Clin Invest*, 119, 1583-1594.
- VIANNEY, J. M., MILLER, D. A. & SPITSBERGEN, J. M. 2014. Effects of acetylcholine and electrical stimulation on glial cell line-derived neurotrophic factor production in skeletal muscle cells. *Brain Res*, 1588, 47-54.

- VIOTTI, C. 2016. ER to Golgi-Dependent Protein Secretion: The Conventional Pathway. *Methods Mol Biol*, 1459, 3-29.
- WANG, Y., HONG, L., JIANG, J., ZHANG, X., CHEN, J. & DIAO, H. 2023. Osteopontin May Improve Postinjury Muscle Repair Via Matrix Metalloproteinases And $\text{tgf-}\beta$ Activation in Regular Exercise. *Int J Med Sci*, 20, 1202-1211.
- WEIGERT, C., HARTWIG, S. & LEHR, S. 2021. Methods for Proteomics-Based Analysis of the Human Muscle Secretome Using an In Vitro Exercise Model. *Methods Mol Biol*, 2261, 433-442.
- WEIGERT, C., LEHMANN, R., HARTWIG, S. & LEHR, S. 2014. The secretome of the working human skeletal muscle--a promising opportunity to combat the metabolic disaster? *Proteomics Clin Appl*, 8, 5-18.
- WENG, X., MAXWELL-WARBURTON, S., HASIB, A., MA, L. & KANG, L. 2022. The membrane receptor CD44: novel insights into metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 33, 318-332.
- WEWEGE, M. A., THOM, J. M., RYE, K. A. & PARMENTER, B. J. 2018. Aerobic, resistance or combined training: A systematic review and meta-analysis of exercise to reduce cardiovascular risk in adults with metabolic syndrome. *Atherosclerosis*, 274, 162-171.
- YAFFE, D. & SAXEL, O. 1977. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270, 725-727.
- YOUNG, M. F., KERR, J. M., TERMINE, J. D., WEWER, U. M., WANG, M. G., MCBRIDE, O. W. & FISHER, L. W. 1990. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics*, 7, 491-502.
- ZEYDA, M., GOLLINGER, K., TODORIC, J., KIEFER, F. W., KECK, M., ASZMANN, O., PRAGER, G., ZLABINGER, G. J., PETZELBAUER, P. & STULNIG, T. M. 2011. Osteopontin is an activator of human adipose tissue macrophages and directly affects adipocyte function. *Endocrinology*, 152, 2219-2227.
- ZHANG, H. & GE, Y. 2011. Comprehensive analysis of protein modifications by top-down mass spectrometry. *Circ Cardiovasc Genet*, 4, 711.
- ZHANG, Y., YANG, Y., HUANG, Q., ZHANG, Q., LI, M. & WU, Y. 2023. The effectiveness of lifestyle interventions for diabetes remission on patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Worldviews Evid Based Nurs*, 20, 64-78.
- ZHAO, H., CHEN, Q., ALAM, A., CUI, J., SUEN, K. C., SOO, A. P., EGUCHI, S., GU, J. & MA, D. 2018. The role of osteopontin in the progression of solid organ tumour. *Cell Death Dis*, 9, 356.
- ZHOU, Y., YAO, Y., SHENG, L., ZHANG, J., ZHANG, J. H. & SHAO, A. 2020. Osteopontin as a candidate of therapeutic application for the acute brain injury. *J Cell Mol Med*, 24, 8918-8929.
- ZIERATH, J. R. & WALLBERG-HENRIKSSON, H. 2015. Looking Ahead Perspective: Where Will the Future of Exercise Biology Take Us? *Cell Metab*, 22, 25-30.
- ZUNNER, B. E. M., WACHSMUTH, N. B., ECKSTEIN, M. L., SCHERL, L., SCHIERBAUER, J. R., HAUPT, S., STUMPF, C., REUSCH, L. & MOSER, O. 2022. Myokines and Resistance Training: A Narrative Review. *Int J Mol Sci*, 23, 3501.
- ZURITA-CRUZ, J. N., MANUEL-APOLINAR, L., ARELLANO-FLORES, M. L., GUTIERREZ-GONZALEZ, A., NAJERA-AHUMADA, A. G. & CISNEROS-GONZÁLEZ, N. 2018. Health and quality of life outcomes impairment of quality of life in type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study. *Health Qual Life Outcomes*, 16, 94.

6 Anhang

6.1 Auflistung der durch die EPS regulierten Proteine in den Überständen

Im Folgenden finden sich die Tabellen mit den in PD ermittelten, nach EPS zu $p < 0,01$ in ihrer Abundanz veränderten und somit potenziell kontraktionsabhängig sekretierten Proteinen (ksM) aus den Zellüberständen (vgl. 2.2.4, 3.2.5). In den Tabellen sind die Proteine entsprechend mit der UniProt Accession, dem englischen Proteinnamen, dem Gensymbol und dem jeweiligen Abundanzverhältnis aufgeführt. In der letzten Spalte ist die sekretorische Klassifikation angegeben (SK, vgl. 3.2.4). Ein Wert von 100 bzw. 0,01 wurde in PD als maximal bzw. minimal ausgegebener Wert für das Abundanzverhältnis gewählt und kann in der Regel so interpretiert werden, dass die entsprechenden Proteine nur in einer der beiden Gruppen detektierbar bzw. quantifizierbar waren.

Tabelle 27: Proteine, die durch EPS nach 6 Stunden heraufreguliert waren

	UniProt Accession	Proteinname	Gensymbol	Abundanz- Verhältnis 6h EPS vs. 6h Kontrolle	SK
1	Q8BI84	Transport and Golgi organization protein 1 homolog	<i>Mia3</i>	100	SP+
2	Q91WP6	Serine protease inhibitor A3N	<i>Serpina3n</i>	100	SP+
3	O88572	Low-density lipoprotein receptor-related protein 6	<i>Lrp6</i>	100	SP+
4	Q2PZL6	Protocadherin Fat 4	<i>Fat4</i>	100	SP+
5	P12388	Plasminogen activator inhibitor 2, macrophage	<i>Serpib2</i>	100	SP-
6	Q9D2M8	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	<i>Ube2v2</i>	100	SP-
7	Q8R1F6	Protein HID1	<i>Hid1</i>	100	SP-
8	Q8VCJ6	Mas-related G-protein coupled receptor member F	<i>Mrgprf</i>	100	SP-
9	Q8BKE6	Cytochrome P450 20A1	<i>Cyp20a1</i>	100	SP-
10	O35127	Protein C10	<i>Grcc10</i>	100	SP-
11	P62309	Small nuclear ribonucleoprotein G	<i>Snrpg</i>	100	SP-
12	Q8R429	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	<i>Atp2a1</i>	100	SP-
13	Q8BJU2	Tetraspanin-9	<i>Tspan9</i>	100	SP-
14	Q9D0J8	Parathyrosin	<i>Ptms</i>	100	SP-
15	A2AMM0	Caveolae-associated protein 4	<i>Cavin4</i>	100	SP-
16	Q8BY71	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	<i>Hat1</i>	100	NP
17	P43275	Histone H1.1	<i>H1-1</i>	100	NP

18	Q569Z5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	<i>Ddx46</i>	100	NP
19	Q8K212	Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1	<i>Pacs1</i>	100	NP
20	O88520	Leucine-rich repeat protein SHOC-2	<i>Shoc2</i>	100	NP
21	Q9JJZ4	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J1	<i>Ube2j1</i>	100	NP
22	Q3TDD9	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 21	<i>Ppp1r21</i>	100	NP
23	Q80SY5	Pre-mRNA-splicing factor 38B	<i>Prpf38b</i>	100	NP
24	Q9CR95	Adaptin ear-binding coat-associated protein 1	<i>Necap1</i>	100	NP
25	Q61183	Poly(A) polymerase alpha	<i>Papola</i>	100	NP
26	P70671	Interferon regulatory factor 3	<i>Irf3</i>	100	NP
27	Q9D753	Exosome complex component RRP43	<i>Exosc8</i>	100	NP
28	O35638	Cohesin subunit SA-2	<i>Stag2</i>	100	NP
29	Q8BHW2	Protein OSCP1	<i>Oscp1</i>	100	NP
30	P97310	DNA replication licensing factor MCM2	<i>Mcm2</i>	100	NP
31	Q78JE5	F-box only protein 22	<i>Fbxo22</i>	100	NP
32	P68181	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta	<i>Prkacb</i>	100	NP
33	Q76N33	AMSH-like protease	<i>Stambpl1</i>	100	NP
34	Q80X50	Ubiquitin-associated protein 2-like	<i>Ubp2l</i>	100	NP
35	Q80SW1	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like protein 1	<i>Ahcy1l</i>	100	NP
36	Q9D1N4	Protein myomaker	<i>Mymk</i>	100	NP
37	Q61687	Transcriptional regulator ATRX	<i>Atrx</i>	100	NP
38	Q9D8C4	Interferon-induced 35 kDa protein homolog	<i>Ifi35</i>	100	NP
39	P48377	MHC class II regulatory factor RFX1	<i>Rfx1</i>	100	NP
40	Q9D6Z1	Nucleolar protein 56	<i>Nop56</i>	100	NP
41	A2BH40	AT-rich interactive domain-containing protein 1A	<i>Arid1a</i>	100	NP
42	O88512	AP-1 complex subunit gamma-like 2	<i>Ap1g2</i>	100	NP
43	Q99P72-5	Isoform B of Reticulon-4	<i>Rtn4</i>	15,158	SP-
44	P10923	Osteopontin	<i>Spp1</i>	3,687	SP+
45	F6VAN0	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 alpha	<i>Atf6</i>	2,541	NP
46	Q8VHK9	ATP-dependent DNA/RNA helicase DHX36	<i>Dhx36</i>	1,913	NP
47	Q9Z0F8	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17	<i>Adam17</i>	1,768	SP+
48	Q8BHA9	2-phosphoxylose phosphatase 1	<i>Pxylp1</i>	1,752	SP-
49	Q8BHT6	Beta-1,3-glucosyltransferase	<i>B3glct</i>	1,754	SP+
50	Q8CI95	Oxysterol-binding protein-related protein 11	<i>Osbpl11</i>	1,734	NP
51	Q8R5A6	TBC1 domain family member 22A	<i>Tbcd22a</i>	1,656	SP-
52	Q9EP82	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase non-catalytic subunit WDR4	<i>Wdr4</i>	1,653	NP

53	Q9D6S7	Ribosome-recycling factor, mitochondrial	<i>Mrrf</i>	1,618	SP-
54	Q8BX10	Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial	<i>Pgam5</i>	1,608	SP-
55	Q9JI10	Serine/threonine-protein kinase 3	<i>Stk3</i>	1,606	NP
56	Q6DIB5	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 10	<i>Megf10</i>	1,596	SP+
57	P47955	60S acidic ribosomal protein P1	<i>Rplp1</i>	1,589	NP
58	Q6ZWN5	40S ribosomal protein S9	<i>Rps9</i>	1,595	NP
59	P00687	Alpha-amylase 1	<i>Amy1</i>	1,584	SP+
60	Q8VE97	Serine/arginine-rich splicing factor 4	<i>Srsf4</i>	1,571	NP
61	P99027	60S acidic ribosomal protein P2	<i>Rplp2</i>	1,563	SP+
62	Q05CL8	La-related protein 7	<i>Larp7</i>	1,539	NP
63	P17156	Heat shock-related 70 kDa protein 2	<i>Hspa2</i>	1,529	NP
64	Q61189	Methylosome subunit pICln	<i>Clns1a</i>	1,525	NP
65	P52793	Ephrin-A1	<i>Efnal</i>	1,521	SP+
66	P35980	60S ribosomal protein L18	<i>Rpl18</i>	1,506	NP
67	Q64475	Histone H2B type 1-B	<i>H2bc3</i>	1,484	NP
68	Q9JKY0	CCR4-NOT transcription complex subunit 9	<i>Cnot9</i>	1,48	SP-
69	Q923D4	Splicing factor 3B subunit 5	<i>Sf3b5</i>	1,463	SP-
70	P62806	Histone H4	<i>H4c1;</i> <i>H4c11;</i> <i>H4c12;</i> <i>H4c14;</i> <i>H4c2;</i> <i>H4c3;</i> <i>H4c4;</i> <i>H4c6;</i> <i>H4c8;</i> <i>H4c9;</i> <i>H4f16;</i> <i>Hist1h4m</i>	1,455	NP
71	Q80TJ1	Calcium-dependent secretion activator 1	<i>Cadps</i>	1,448	NP
72	Q9ERU9	E3 SUMO-protein ligase RanBP2	<i>Ranbp2</i>	1,444	NP
73	P61290	Proteasome activator complex subunit 3	<i>Psmc3</i>	1,43	NP
74	Q810A7	ATP-dependent RNA helicase DDX42	<i>Ddx42</i>	1,42	NP
75	P47911	60S ribosomal protein L6	<i>Rpl6</i>	1,413	NP
76	Q91WU5	Arsenite methyltransferase	<i>As3mt</i>	1,397	NP
77	Q61176	Arginase-1	<i>Arg1</i>	1,389	NP
78	Q9EST5	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	<i>Anp32b</i>	1,384	NP
79	P63024	Vesicle-associated membrane protein 3	<i>Vamp3</i>	1,386	SP-
80	Q9DCB1	High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 3	<i>Hmgn3</i>	1,389	SP-
81	P61358	60S ribosomal protein L27	<i>Rpl27</i>	1,375	SP-

82	Q5FW85	Extracellular matrix protein 2	<i>Ecm2</i>	1,376	SP+
83	P09535	Insulin-like growth factor II	<i>Igf2</i>	1,366	SP+
84	Q6A4J8	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	<i>Usp7</i>	1,358	NP
85	P63158	High mobility group protein B1	<i>Hmgb1</i>	1,349	NP
86	A2AGT5	Cytoskeleton-associated protein 5	<i>Ckap5</i>	1,341	NP
87	Q8R1A4	Dedicator of cytokinesis protein 7	<i>Dock7</i>	1,34	NP
88	Q9CXY6	Interleukin enhancer-binding factor 2	<i>Ilf2</i>	1,333	NP
89	P14869	60S acidic ribosomal protein P0	<i>Rplp0</i>	1,322	NP
90	Q9CQ89	Protein CutA	<i>Cuta</i>	1,315	SP-
91	P49717	DNA replication licensing factor MCM4	<i>Mcm4</i>	1,313	NP
92	Q5SUR0	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	<i>Pfas</i>	1,305	NP
93	Q9CYZ2	Tumor protein D54	<i>Tpd52l2</i>	1,305	SP-
94	Q8BL97	Serine/arginine-rich splicing factor 7	<i>Srsf7</i>	1,294	NP
95	P61202	COP9 signalosome complex subunit 2	<i>Cops2</i>	1,29	NP
96	P18760	Cofilin-1	<i>Cfl1</i>	1,283	SP-
97	P12023	Amyloid-beta A4 protein	<i>App</i>	1,281	SP+
98	O55234	Proteasome subunit beta type-5	<i>Psb5</i>	1,281	SP-
99	P70288	Histone deacetylase 2	<i>Hdac2</i>	1,281	NP
100	Q9WU20	Methylenetetrahydrofolate reductase	<i>Mthfr</i>	1,275	NP
101	O08663	Methionine aminopeptidase 2	<i>Metap2</i>	1,271	NP
102	Q8VBV7	COP9 signalosome complex subunit 8	<i>Cops8</i>	1,271	NP
103	Q922Q8	Leucine-rich repeat-containing protein 59	<i>Lrrc59</i>	1,262	SP-
104	Q9Z2Q6	Septin-5	<i>Septin5</i>	1,27	NP
105	Q60605	Myosin light polypeptide 6	<i>Myl6</i>	1,256	NP
106	Q8BMJ3	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal	<i>Eif1ax</i>	1,247	NP
107	P84091	AP-2 complex subunit mu	<i>Ap2m1</i>	1,24	NP
108	Q9DCC4	Pyrroline-5-carboxylate reductase 3	<i>Pycr3</i>	1,237	NP
109	P49722	Proteasome subunit alpha type-2	<i>Psm2</i>	1,233	NP
110	P97461	40S ribosomal protein S5	<i>Rps5</i>	1,229	SP-
111	O88544	COP9 signalosome complex subunit 4	<i>Cops4</i>	1,234	NP
112	Q60715-2	Isoform 2 of Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	<i>P4ha1</i>	1,23	SP+
113	P19221	Prothrombin	<i>F2</i>	1,233	SP+
114	O88545	COP9 signalosome complex subunit 6	<i>Cops6</i>	1,22	NP
115	Q9R1E6	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2	<i>Enpp2</i>	1,216	SP+
116	P11983	T-complex protein 1 subunit alpha	<i>Tcp1</i>	1,207	NP

Tabelle 28: Proteine, die durch EPS nach 6 Stunden herunterreguliert waren

	UniProt Accession	Proteinname	Gensymbol	Abundanz- Verhältnis 6h EPS vs. 6h Kontrolle	SK
1	Q9Z0J7	Growth/differentiation factor 15	<i>Gdf15</i>	0,01	SP+
2	Q8BSU2	C-X-C motif chemokine 16	<i>Cxcl16</i>	0,01	SP+
3	P48024	Eukaryotic translation initiation factor 1	<i>Eif1</i>	0,01	SP-
4	P62331	ADP-ribosylation factor 6	<i>Arf6</i>	0,01	SP-
5	Q3TIX9	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2	<i>Usp39</i>	0,01	SP-
6	Q9DCJ1	Target of rapamycin complex subunit LST8	<i>Mlst8</i>	0,01	SP-
7	Q9D906	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7	<i>Atg7</i>	0,01	SP-
8	Q9ER73	Elongator complex protein 4	<i>Elp4</i>	0,01	SP-
9	Q9CQE6	Histone chaperone ASF1A	<i>Asf1a</i>	0,01	SP-
10	Q9D1R9	60S ribosomal protein L34	<i>Rpl34</i>	0,01	SP-
11	Q8BUN5	Mothers against decapentaplegic homolog 3	<i>Smad3</i>	0,01	SP-
12	P70207	Plexin-A2	<i>Plxna2</i>	0,01	NP
13	Q80VJ2	Steroid receptor RNA activator 1	<i>Sra1</i>	0,01	NP
14	Q9CSH3	Exosome complex exonuclease RRP44	<i>Dis3</i>	0,01	NP
15	Q921W0	Charged multivesicular body protein 1a	<i>Chmp1a</i>	0,01	NP
16	Q3TLH4	Protein PRRC2C	<i>Prrc2c</i>	0,01	NP
17	Q6PDH0	Pleckstrin homology-like domain family B member 1	<i>Phldb1</i>	0,01	NP
18	Q3TJZ6	Protein FAM98A	<i>Fam98a</i>	0,01	NP
19	Q8VDM6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	<i>Hnrnpull1</i>	0,01	NP
20	Q61881	DNA replication licensing factor MCM7	<i>Mcm7</i>	0,01	NP
21	Q8BWU5	Probable tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase	<i>Osgep</i>	0,01	NP
22	Q9CPT3	N-acylneuraminate-9-phosphatase	<i>Nanp</i>	0,01	NP
23	O08911	Mitogen-activated protein kinase 12	<i>Mapk12</i>	0,01	NP
24	Q91W67	Ubiquitin-like protein 7	<i>Ubl7</i>	0,01	NP
25	Q6NZB1	Protein arginine N-methyltransferase 6	<i>Prmt6</i>	0,01	NP
26	Q8R105	Vacuolar protein sorting-associated protein 37C	<i>Vps37c</i>	0,01	NP
27	Q9R1Z8	Vinexin	<i>Sorbs3</i>	0,01	NP
28	P97820	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	<i>Map4k4</i>	0,01	NP
29	Q61235	Beta-2-syntrophin	<i>Sntb2</i>	0,01	NP
30	P56546	C-terminal-binding protein 2	<i>Ctbp2</i>	0,01	NP

31	Q9R0U0	Serine/arginine-rich splicing factor 10	<i>Srsf10</i>	0,01	NP
32	Q8C754	Vacuolar protein sorting-associated protein 52 homolog	<i>Vps52</i>	0,01	NP
33	Q9CS42	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2	<i>Prps2</i>	0,01	NP
34	Q80VP1	Epsin-1	<i>Epn1</i>	0,01	NP
35	Q8BZM1	Glomulin	<i>Glmn</i>	0,01	NP
36	O08800	Serpin B8	<i>Serpinb8</i>	0,01	NP
37	Q148W8	Serine/threonine/tyrosine-interacting-like protein 2	<i>Styl2</i>	0,01	NP
38	Q9Z2P8	Vesicle-associated membrane protein 5	<i>Vamp5</i>	0,01	NP
39	Q9D8B3	Charged multivesicular body protein 4b	<i>Chmp4b</i>	0,01	NP
40	Q920Q6	RNA-binding protein Musashi homolog 2	<i>Msi2</i>	0,01	NP
41	Q9Z2V5	Histone deacetylase 6	<i>Hdac6</i>	0,01	NP
42	P97393	Rho GTPase-activating protein 5	<i>Arhgap5</i>	0,402	NP
43	Q9R0M5	Thiamin pyrophosphokinase 1	<i>Tpk1</i>	0,449	NP
44	Q3V1M1	Immunoglobulin superfamily member 10	<i>Igsf10</i>	0,523	SP+
45	Q8VCF0	Mitochondrial antiviral-signaling protein	<i>Mavs</i>	0,528	NP
46	Q6ZWR6	Nesprin-1	<i>Syne1</i>	0,538	NK
47	Q80V26	Golgi-resident adenosine 3',5'-bisphosphate 3'-phosphatase	<i>Bpnt2</i>	0,545	NP
48	Q6PEE3	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 B	<i>Rrm2b</i>	0,588	SP-
49	E9Q557	Desmoplakin	<i>Dsp</i>	0,59	NP
50	Q8BPG6	Inactive C-alpha-formylglycine-generating enzyme 2	<i>Sumf2</i>	0,645	SP+
51	Q91XF0	Pyridoxine-5'-phosphate oxidase	<i>Pnpo</i>	0,653	SP-
52	Q9EQK5	Major vault protein	<i>Mvp</i>	0,665	NP
53	Q8R2U0	Nucleoporin SEH1	<i>Seh1</i>	0,673	NP
54	P23475	X-ray repair cross-complementing protein 6	<i>Xrcc6</i>	0,675	NP
55	Q9WUB4	Dynactin subunit 6	<i>Dctn6</i>	0,681	SP-
56	Q9JJ00	Phospholipid scramblase 1	<i>Plscr1</i>	0,694	SP-
57	P41731	CD63 antigen	<i>Cd63</i>	0,698	SP-
58	Q3TIV5	Zinc finger CCCH domain-containing protein 15	<i>Zc3h15</i>	0,707	NP
59	Q9JLB9	Nectin-3	<i>Nectin3</i>	0,709	SP+
60	Q91VW5	Golgin subfamily A member 4	<i>Golga4</i>	0,714	NP
61	Q8VEE0	Ribulose-phosphate 3-epimerase	<i>Rpe</i>	0,725	NP
62	P97447	Four and a half LIM domains protein 1	<i>Fhl1</i>	0,741	NP
63	P05480	Neuronal proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	<i>Src</i>	0,752	NP
64	Q8BXX8	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	<i>Agap1</i>	0,752	NP

65	Q99JW4	LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1	<i>Lims1</i>	0,759	NP
66	Q9EPL8	Importin-7	<i>Ipo7</i>	0,777	NP
67	P61967	AP-1 complex subunit sigma-1A	<i>Ap1s1</i>	0,777	NP
68	P18572	Basigin	<i>Bsg</i>	0,784	SP+
69	Q9CQE1	Protein NipSnap homolog 3B	<i>Nipsnap3b</i>	0,786	SP-
70	Q9DB05	Alpha-soluble NSF attachment protein	<i>Napa</i>	0,795	NP
71	Q9D1H7	Golgi to ER traffic protein 4 homolog	<i>Get4</i>	0,802	NP
72	Q8R349	Cell division cycle protein 16 homolog	<i>Cdc16</i>	0,805	NP
73	Q9ES30	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3	<i>C1qtnf3</i>	0,811	SP+
74	P54116	Stomatin	<i>Stom</i>	0,816	NP
75	Q99LP6	GrpE protein homolog 1, mitochondrial	<i>Grpel1</i>	0,817	SP-
76	O35988	Syndecan-4	<i>Sdc4</i>	0,822	SP+
77	P05202	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	<i>Got2</i>	0,826	NP
78	O70250	Phosphoglycerate mutase 2	<i>Pgam2</i>	0,829	NP

Tabelle 29: Proteine, die durch EPS nach 24 Stunden heraufreguliert waren

	UniProt Accession	Proteinname	Gensymbol	Abundanz- Verhältnis 24h EPS vs. 24h Kontrolle	SK
1	Q61245	Collagen alpha-1(XI) chain	<i>Coll1a1</i>	100	SP+
2	Q9JHF9	Lymphocyte antigen 96	<i>Ly96</i>	100	SP+
3	Q62028	Secretory phospholipase A2 receptor	<i>Pla2r1</i>	100	SP+
4	P62843	40S ribosomal protein S15	<i>Rps15</i>	100	SP-
5	P30275	Creatine kinase U-type, mitochondrial	<i>Ckmt1</i>	100	SP-
6	G3X9C2	F-box only protein 50	<i>Nccrpl</i>	100	SP-
7	Q8BHL8	Proteasome inhibitor PI31 subunit	<i>Psmf1</i>	100	SP-
8	Q9D1K2	V-type proton ATPase subunit F	<i>Atp6v1f</i>	100	SP-
9	Q6P9J9	Anoctamin-6	<i>Ano6</i>	100	NP
10	Q6PGC1	ATP-dependent RNA helicase DHX29	<i>Dhx29</i>	100	NP
11	F8VPU2	FERM, ARHGEF and pleckstrin domain-containing protein 1	<i>Farp1</i>	100	NP
12	Q9EQU5-2	Isoform 2 of Protein SET	<i>Set</i>	100	NP
13	Q922H4	Mannose-1-phosphate guanyltransferase alpha	<i>Gmppa</i>	100	NP
14	Q9QYR6	Microtubule-associated protein 1A	<i>Map1a</i>	100	NP
15	A2ABU4	Myomesin-3	<i>Myom3</i>	100	NP

16	Q9CQ19	Myosin regulatory light polypeptide 9	<i>Myl9</i>	100	NP
17	Q91XL9	Oxysterol-binding protein-related protein 1	<i>Osbp11a</i>	100	NP
18	P07742	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	<i>Rrm1</i>	100	NP
19	Q91ZM2	SH2B adapter protein 1	<i>Sh2b1</i>	100	NP
20	Q6PGL7	WASH complex subunit 2	<i>Washc2</i>	100	NP
21	O09161	Calsequestrin-2	<i>Casq2</i>	4,719	SP+
22	Q9EQU5	Protein SET	<i>Set</i>	4,676	NP
23	Q61937	Nucleophosmin	<i>Npm1</i>	3,8	SP-
24	P10923	Osteopontin	<i>Spp1</i>	3,566	SP+
25	Q8BTZ4	Anaphase-promoting complex subunit 5	<i>Anapc5</i>	2,965	NP
26	Q8BHG1	Nardilysin	<i>Nrdc</i>	2,744	NP
27	Q920Q6	RNA-binding protein Musashi homolog 2	<i>Msi2</i>	2,604	NP
28	Q9CPP0	Nucleoplasmin-3	<i>Npm3</i>	2,559	SP-
29	Q61176	Arginase-1	<i>Arg1</i>	2,447	NP
30	Q3TEA8	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	<i>Hp1bp3</i>	2,405	NP
31	O08784	Treacle protein	<i>Tcof1</i>	2,149	NP
32	Q8VCF0	Mitochondrial antiviral-signaling protein	<i>Mavs</i>	2,078	NP
33	P63158	High mobility group protein B1	<i>Hmgbl</i>	1,972	NP
34	O35381	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	<i>Anp32a</i>	1,851	NP
35	P97822	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	<i>Anp32e</i>	1,82	NP
36	P46061	Ran GTPase-activating protein 1	<i>Rangap1</i>	1,797	NP
37	P19788	Matrix Gla protein	<i>Mgp</i>	1,669	SP+
38	Q3TVI8	Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1	<i>Pbxip1</i>	1,672	SP-
39	A2AMM0	Caveolae-associated protein 4	<i>Cavin4</i>	1,608	SP-
40	O35242	Protein FAN	<i>Nsmaf</i>	1,602	NP
41	Q9ER69	Pre-mRNA-splicing regulator WTAP	<i>Wtap</i>	1,578	NP
42	Q8VHP6	Cadherin-related family member 1	<i>Cdhr1</i>	1,525	SP+
43	P28656	Nucleosome assembly protein 1-like 1	<i>Nap111</i>	1,515	NP
44	O70622-2	Isoform 2 of Reticulon-2	<i>Rtn2</i>	1,517	NP
45	Q6ZPJ3	(E3-independent) E2 ubiquitin-conjugating enzyme UBE2O	<i>Ube2o</i>	1,512	NP
46	Q6PDM2	Serine/arginine-rich splicing factor 1	<i>Srsf1</i>	1,504	NP
47	Q8C854-1	Isoform 3 of Myelin expression factor 2	<i>Myef2</i>	1,51	NP
48	Q8R1U2	Cell growth regulator with EF hand domain protein 1	<i>Cgref1</i>	1,49	SP+
49	P48759	Pentraxin-related protein PTX3	<i>Ptx3</i>	1,487	SP+

50	P30681	High mobility group protein B2	<i>Hmgb2</i>	1,489	NP
51	Q7TSK7	ADAMTS-like protein 2	<i>Adamtsl2</i>	1,478	SP+
52	Q9CQ45	Neudesin	<i>Nerf</i>	1,476	SP+
53	Q78ZA7	Nucleosome assembly protein 1-like 4	<i>Nap1l4</i>	1,464	NP
54	P17125	Transforming growth factor beta-3 proprotein	<i>Tgfb3</i>	1,465	SP+
55	Q61810	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 3	<i>Ltbp3</i>	1,463	SP+
56	Q02257	Junction plakoglobin	<i>Jup</i>	1,452	NP
57	P09405	Nucleolin	<i>Ncl</i>	1,452	NP
58	O08997	Copper transport protein ATOX1	<i>Atox1</i>	1,458	SP-
59	Q8CHW4	Translation initiation factor eIF-2B subunit epsilon	<i>Eif2b5</i>	1,456	NP
60	Q61749	Translation initiation factor eIF-2B subunit delta	<i>Eif2b4</i>	1,45	NP
61	Q8BUN5	Mothers against decapentaplegic homolog 3	<i>Smad3</i>	1,456	SP-
62	O09118	Netrin-1	<i>Ntn1</i>	1,435	SP+
63	Q9JJ00	Phospholipid scramblase 1	<i>Plscr1</i>	1,436	SP-
64	A3KMP2	Tetratricopeptide repeat protein 38	<i>Ttc38</i>	1,435	NP
65	Q9D0J8	Parathyrosin	<i>Ptms</i>	1,422	SP-
66	Q9EPL8	Importin-7	<i>Ipo7</i>	1,413	NP
67	Q8BWB1	Synaptopodin 2-like protein	<i>Synpo2l</i>	1,409	NP
68	Q06335	Amyloid-like protein 2	<i>Aplp2</i>	1,4	SP+
69	P04202	Transforming growth factor beta-1 proprotein	<i>Tgfb1</i>	1,384	SP+
70	O35074	Prostacyclin synthase	<i>Ptgis</i>	1,383	SP+
71	P01902	H-2 class I histocompatibility antigen, K-D alpha chain	<i>H2-K1</i>	1,389	SP+
72	Q9D8B3	Charged multivesicular body protein 4b	<i>Chmp4b</i>	1,388	NP
73	P47931	Follistatin	<i>Fst</i>	1,363	SP+
74	Q80XU3	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1	<i>Nucks1</i>	1,369	NP
75	P10148	C-C motif chemokine 2	<i>Ccl2</i>	1,359	SP+
76	P97457	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	<i>Mylpf</i>	1,36	NP
77	Q9JI58	Retinoic acid early-inducible protein 1-delta	<i>Raet1d</i>	1,36	NP
78	Q921I2	Kelch domain-containing protein 4	<i>Klhdc4</i>	1,359	NP
79	Q8VHY0	Chondroitin sulfate proteoglycan 4	<i>Cspg4</i>	1,344	SP+
80	Q6ZWN5	40S ribosomal protein S9	<i>Rps9</i>	1,347	NP
81	Q61495	Desmoglein-1-alpha	<i>Dsg1a</i>	1,348	SP+
82	P50608	Fibromodulin	<i>Fmod</i>	1,347	SP+
83	P07356	Annexin A2	<i>Anxa2</i>	1,337	SP-
84	Q99MQ4	Asporin	<i>Aspn</i>	1,33	SP+

85	Q9Z0G4	CCN family member 5	<i>Ccn5</i>	1,321	SP+
86	Q80VW7	Microtubule organization protein AKNA	<i>Akna</i>	1,307	NP
87	O70326	Gremlin-1	<i>Grem1</i>	1,311	SP+
88	P09541	Myosin light chain 4	<i>Myl4</i>	1,299	SP-
89	P05017	Insulin-like growth factor I	<i>Igf1</i>	1,291	SP-
90	P12850	Growth-regulated alpha protein	<i>Cxcl1</i>	1,291	SP+
91	Q9D8E6	60S ribosomal protein L4	<i>Rpl4</i>	1,29	NP
92	Q99LD9	Translation initiation factor eIF-2B subunit beta	<i>Eif2b2</i>	1,288	NP
93	Q8C9W3	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 2	<i>Adams2</i>	1,288	SP+
94	P70663	SPARC-like protein 1	<i>Sparcl1</i>	1,282	SP+
95	A2AN08	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	<i>Ubr4</i>	1,273	NK
96	P25444	40S ribosomal protein S2	<i>Rps2</i>	1,271	SP-
97	Q64511	DNA topoisomerase 2-beta	<i>Top2b</i>	1,275	NP
98	P62242	40S ribosomal protein S8	<i>Rps8</i>	1,271	NP
99	Q99P72-5	Isoform B of Reticulon-4	<i>Rtn4</i>	1,275	SP-
100	Q03366	C-C motif chemokine 7	<i>Ccl7</i>	1,269	SP+
101	O35988	Syndecan-4	<i>Sdc4</i>	1,269	SP+
102	Q64339	Ubiquitin-like protein ISG15	<i>Isg15</i>	1,266	SP-
103	Q9R1Q9	V-type proton ATPase subunit S1	<i>Atp6ap1</i>	1,257	SP+
104	Q8R5J9	PRA1 family protein 3	<i>Arl6ip5</i>	1,257	NP
105	O70194	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	<i>Eif3d</i>	1,253	NP
106	Q61074	Protein phosphatase 1G	<i>Ppm1g</i>	1,249	NP
107	Q9DAW6	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4	<i>Prpf4</i>	1,25	NP
108	Q01279	Epidermal growth factor receptor	<i>Egfr</i>	1,252	SP+
109	P27090	Transforming growth factor beta-2 proprotein	<i>Tgfb2</i>	1,235	SP+
110	Q9JK53	Prolargin	<i>Prelp</i>	1,239	SP+
111	P35980	60S ribosomal protein L18	<i>Rpl18</i>	1,237	NP
112	Q9ES97-3	Isoform 3 of Reticulon-3	<i>Rtn3</i>	1,238	SP-
113	Q9D695	Serpin B7	<i>Serpib7</i>	1,241	NP
114	Q9D892	Inosine triphosphate pyrophosphatase	<i>Itpa</i>	1,229	NP
115	O35295	Transcriptional activator protein Pur-beta	<i>Purb</i>	1,233	NP
116	P01027	Complement C3	<i>C3</i>	1,229	SP+
117	P28481	Collagen alpha-1(II) chain	<i>Col2a1</i>	1,228	SP+
118	Q62084	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B	<i>Ppp1r14b</i>	1,23	SP-
119	O70373	Xin actin-binding repeat-containing protein 1	<i>Xirp1</i>	1,23	NP
120	Q8QZY9	Splicing factor 3B subunit 4	<i>Sf3b4</i>	1,23	NP
121	Q99P72	Reticulon-4	<i>Rtn4</i>	1,221	NP

122	Q62093	Serine/arginine-rich splicing factor 2	<i>Srsf2</i>	1,217	NP
123	P50228	C-X-C motif chemokine 5	<i>Cxcl5</i>	1,214	SP+
124	O54724	Caveolae-associated protein 1	<i>Cavin1</i>	1,218	SP-
125	Q91XL3	UDP-glucuronic acid decarboxylase 1	<i>Uxs1</i>	1,211	SP-
126	Q00780	Collagen alpha-1(VIII) chain	<i>Col8a1</i>	1,202	SP+
127	Q8BMK4	Cytoskeleton-associated protein 4	<i>Ckap4</i>	1,201	NP
128	P14069	Protein S100-A6	<i>S100a6</i>	1,193	NP
129	Q02248	Catenin beta-1	<i>Ctnnb1</i>	1,188	SP-
130	Q64152	Transcription factor BTF3	<i>Btf3</i>	1,191	NP
131	Q9Z121	C-C motif chemokine 8	<i>Ccl8</i>	1,186	SP+
132	P04186	Complement factor B	<i>Cfb</i>	1,179	SP+
133	P0DP27	Calmodulin-2	<i>Calm2</i>	1,179	SP-
134	E9Q557	Desmoplakin	<i>Dsp</i>	1,171	NP
135	P63166	Small ubiquitin-related modifier 1	<i>Sumo1</i>	1,171	SP-
136	Q9EP52	Twisted gastrulation protein homolog 1	<i>Twsg1</i>	1,166	SP+
137	P01887	Beta-2-microglobulin	<i>B2m</i>	1,165	SP+
138	P22777	Plasminogen activator inhibitor 1	<i>Serpine1</i>	1,154	SP+
139	Q8R349	Cell division cycle protein 16 homolog	<i>Cdc16</i>	1,149	NP
140	P28653	Biglycan	<i>Bgn</i>	1,145	SP+
141	Q9CR35	Chymotrypsinogen B	<i>Ctrb1</i>	1,142	SP+
142	Q9Z204-2	Isoform C1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	<i>Hnrnpc</i>	1,142	NP
143	Q6P4T2	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	<i>Snrnp200</i>	1,141	NP
144	P48441	Alpha-L-iduronidase	<i>Idua</i>	1,143	SP+
145	Q4KML4	Costars family protein ABRACL	<i>Abracl</i>	1,132	SP-
146	Q04998	Inhibin beta A chain	<i>Inhba</i>	1,132	SP+
147	Q9JMH9-1	Isoform 1 of Unconventional myosin-XVIIIa	<i>Myo18a</i>	1,122	NP
148	P55288	Cadherin-11	<i>Cdh11</i>	1,126	SP+

Tabelle 30: Proteine, die durch EPS nach 24 Stunden herunterreguliert waren

	UniProt Accession	Proteinname	Gensymbol	Abundanz- Verhältnis 24h EPS vs. 24h Kontrolle	SK
1	Q8BPG6	Inactive C-alpha-formylglycine-generating enzyme 2	<i>Sumf2</i>	0,01	SP+
2	Q9JM99	Proteoglycan 4	<i>Prg4</i>	0,01	SP+
3	P48024	Eukaryotic translation initiation factor 1	<i>Eif1</i>	0,01	SP-
4	P12388	Plasminogen activator inhibitor 2, macrophage	<i>Serpinb2</i>	0,01	SP-
5	Q91WK1	SPRY domain-containing protein 4	<i>Spryd4</i>	0,01	SP-
6	Q99L13	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	<i>Hibadh</i>	0,01	NP
7	P97760	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB3	<i>Polr2c</i>	0,01	NP
8	Q80ZI6	E3 ubiquitin-protein ligase LRSAM1	<i>Lrsam1</i>	0,01	NP
9	Q80V26	Golgi-resident adenosine 3',5'-bisphosphate 3'-phosphatase	<i>Bpnt2</i>	0,01	NP
10	P35492	Histidine ammonia-lyase	<i>Hal</i>	0,01	NP
11	P70207	Plexin-A2	<i>Plxna2</i>	0,01	NP
12	Q8BYU6	Torsin-1A-interacting protein 2	<i>Tor1aip2</i>	0,01	NP
13	Q9EP82	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase non-catalytic subunit WDR4	<i>Wdr4</i>	0,204	NP
14	F6VAN0	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 alpha	<i>Atf6</i>	0,562	NP
15	Q7TPD0	Integrator complex subunit 3	<i>Ints3</i>	0,607	NP
16	P97447	Four and a half LIM domains protein 1	<i>Fhl1</i>	0,638	NP
17	P01899	H-2 class I histocompatibility antigen, D-B alpha chain	<i>H2-D1</i>	0,665	SP+
18	Q9JKP5	Muscleblind-like protein 1	<i>Mbnl1</i>	0,676	SP-
19	Q9CYR0	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	<i>Ssbp1</i>	0,679	SP-
20	Q3UFF7	Lysophospholipase-like protein 1	<i>Lyplal1</i>	0,685	SP-
21	Q61024	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	<i>Asns</i>	0,69	NP
22	P97315	Cysteine and glycine-rich protein 1	<i>Csrp1</i>	0,711	NP
23	P11862	Growth arrest-specific protein 2	<i>Gas2</i>	0,712	SP-
24	Q80VJ2	Steroid receptor RNA activator 1	<i>Sra1</i>	0,722	NP
25	P36552	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	<i>Cpox</i>	0,723	NP
26	P48758	Carbonyl reductase [NADPH] 1	<i>Cbr1</i>	0,725	NP
27	Q99JW4	LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1	<i>Lims1</i>	0,732	NP

28	Q9Z2M7	Phosphomannomutase 2	<i>Pmm2</i>	0,743	SP-
29	Q9D964	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	<i>Gatm</i>	0,746	SP-
30	Q99KI0	Aconitate hydratase, mitochondrial	<i>Aco2</i>	0,757	NP
31	P32020	Sterol carrier protein 2	<i>Scp2</i>	0,758	NP
32	P68134	Actin, alpha skeletal muscle	<i>Acta1</i>	0,76	NP
33	P70362	Ubiquitin recognition factor in ER-associated degradation protein 1	<i>Ufd1</i>	0,768	NP
34	Q9D358	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	<i>Acp1</i>	0,771	SP-
35	P14901	Heme oxygenase 1	<i>Hmox1</i>	0,786	SP-
36	Q8BTZ7	Mannose-1-phosphate guanyltransferase beta	<i>Gmppb</i>	0,788	SP-
37	Q8K2Q7	BRO1 domain-containing protein BROX	<i>Brox</i>	0,789	NP
38	Q9D7X3	Dual specificity protein phosphatase 3	<i>Dusp3</i>	0,792	SP-
39	Q9WVQ5	Methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	<i>Apip</i>	0,792	NP
40	Q62422	Osteoclast-stimulating factor 1	<i>Ostf1</i>	0,806	SP-
41	P09411	Phosphoglycerate kinase 1	<i>Pgk1</i>	0,813	NP

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien für die Zellkultur	12
Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien für die qRT-PCR	13
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien für die MS-Probenaufbereitung	13
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien für die Massenspektrometrie	15
Tabelle 5: Medien für die Zellkultur	16
Tabelle 6: Puffer für die MS-Probenaufbereitung	16
Tabelle 7: Puffer für die Massenspektrometrie	17
Tabelle 8: Reaktions-Kits für die qRT-PCR	17
Tabelle 9: Primer für die qRT-PCR	18
Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur	18
Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien für die qRT-PCR	19
Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien für die MS-Probenaufbereitung	19
Tabelle 13: In der Zellkultur genutzte Geräte und Hilfsmittel	20
Tabelle 14: Für die qRT-PCR genutzte Geräte	20
Tabelle 15: Für die MS-Probenaufbereitung genutzte Geräte und Hilfsmittel	21
Tabelle 16: Für die Massenspektrometrie genutzte Geräte und Hilfsmittel	22
Tabelle 17: Verwendete Software	22
Tabelle 18: Verwendete Webtools	23
Tabelle 19: Protokoll des qRT-PCR-Programms	30
Tabelle 20: Schritte der Fluoreszenz-Färbung	33
Tabelle 21: Zusammensetzung der Schichten eines Gels für den In-Gel-Verdau	33
Tabelle 22: Schritte der Coomassie-Blau-Färbung	35
Tabelle 23: Proteine, die durch EPS sowohl nach 6 h als auch nach 24 h heraufreguliert waren	53
Tabelle 24: Proteine, die durch EPS sowohl nach 6 h als auch nach 24 h herunterreguliert waren	53
Tabelle 25: Proteine, die durch EPS nach 6 h herunterreguliert und nach 24 h heraufreguliert waren	54
Tabelle 26: Proteine, die durch EPS nach 6 h heraufreguliert und nach 24 h herunterreguliert waren	55
Tabelle 27: Proteine, die durch EPS nach 6 Stunden heraufreguliert waren	90
Tabelle 28: Proteine, die durch EPS nach 6 Stunden herunterreguliert waren	94
Tabelle 29: Proteine, die durch EPS nach 24 Stunden heraufreguliert waren	96
Tabelle 30: Proteine, die durch EPS nach 24 Stunden herunterreguliert waren	101

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des Differenzierungsprotokolls	26
Abb. 2: Expression von Differenzierungsmarkern in der Vorstudie	42
Abb. 3: Expression der Differenzierungsmarker vor der Differenzierung und nach EPS	44
Abb. 4: Relative Expression von <i>IL-6</i> vor der Differenzierung und nach EPS	46
Abb. 5: 1D-Gel der aufkonzentrierten Zellüberstände.	47
Abb. 6: Hauptkomponentenanalyse der normalisierten Proteinabundanzen	48
Abb. 7: Durchschnittliche Abundanzen der Laktatdehydrogenase A und B in den Sekretomen	49
Abb. 8: Sekretorische Klassifikation der identifizierten Masterproteine	50
Abb. 9: <i>Volcano plots</i> der kontraktionsabhängig sekretierten Proteine	51
Abb. 10: Sekretorische Klassifikation der gefundenen ksMs in Prozent	52

Danksagung

Ich möchte mich hiermit sehr herzlich bei allen bedanken, die mich bei dieser experimentellen Dissertation unterstützt und begleitet haben. Insbesondere gebührt mein Dank folgenden Personen:

Prof. Dr. Hadi Al-Hasani, der mir diese Promotion an seinem Institut ermöglicht hat. Vielen Dank für die allzeitige Unterstützung und Beratung und die Möglichkeit, als medizinische Doktorandin so umfassend das experimentelle Arbeiten in einem Labor kennenlernen zu dürfen.

Prof. Dr. Regina Ensenaer, welche freundlicherweise die Co-Betreuung übernommen hat. Vielen Dank dafür und für die anregenden Gespräche bei verschiedenen Gelegenheiten.

Dr. Alexandra Chadt danke ich für die zusätzliche Betreuung. Vielen Dank für die Hilfestellung bei allen Herausforderungen rund um die Zellkultur und die Laborarbeit, die Ansprechbarkeit zu jeder Zeit und die Anregungen bei jeglichen Fragen.

Dr. Stefan Lehr und Dr. Sonja Hartwig danke ich für die Einführung in die Welt der Sekretom- und Proteomanalyse, die stetige Unterstützung, sowie die offene Tür bei allen Anliegen. Dr. Hartwig danke ich darüber hinaus für die Durchführung der Massenspektrometrie mit meinen Proben, sowie die anschließende erste Aufbereitung der Rohdaten für diese Arbeit.

Den technischen Assistentinnen der AG Pathobiochemie und der Plattform Proteomanalyse des Instituts danke ich für die Einarbeitung in die diversen Bereiche des Labors. Ulrike Kettel danke ich darüber hinaus für die Durchführung der Fluoreszenz-Färbung des 1D-Gels. Bei ihnen und bei allen weiteren Mitgliedern des Instituts möchte ich mich für die generelle Hilfsbereitschaft und die großartige und offene Atmosphäre bedanken. Ich habe mich von Anfang an gut aufgehoben gefühlt.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Organisatoren, Organisatorinnen, Mitwirkenden und weiteren Promovierenden des Graduiertenkollegs „vivid“ bedanken. Durch das Graduiertenkolleg erhielt ich nicht nur Einblicke in die wissenschaftliche Arbeit verschiedener Fachbereiche und neues Wissen durch die vielen Vorträge, sondern habe auch einige neue Freundschaften knüpfen können. Besonders danken möchte ich in diesem Sinne auch Pia Förster.

Zudem gebührt ein immens großer Dank meiner Mutter, die mich immer auf all meinen Lebenswegen vorbehaltlos unterstützt und motiviert hat. Vielen Dank an meine Familie, an meinen Freund und an all meine Freundinnen und Freunde für den stetigen seelischen Beistand, die guten Gespräche, den ein oder anderen Tipp zum wissenschaftlichen Arbeiten und all die schönen gemeinsamen Abende und Wochenenden.