

Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN)
Institut für Muskelbiologie und Wachstum

**Identifizierung und Charakterisierung
von Myokinen und Adipokinen mit Bedeutung für die
Körperzusammensetzung beim Rind**

**Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Ernährungswissenschaften (Dr. troph.)**

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III
Agrar- und Ernährungswissenschaften,
Geowissenschaften und Informatik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Lisa Schering
geboren am 24.03.1988
in Lutherstadt Wittenberg

Dekan:	Prof. Dr. Olaf Christen
1. Gutachter:	Prof. Dr. Steffen Maak
2. Gutachterin:	Prof. Dr. Gabriele Stangl
3. Gutachterin:	Prof. Dr. Susanne Klaus
Tag der Verteidigung:	12.12.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einführung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Fettgewebe als endokrines Organ	3
2.2 Skelettmuskelgewebe als endokrines Organ	6
2.3 Wechselwirkungen zwischen Skelettmuskel- und Fettgewebe	7
2.3.1 Adipokine	9
2.3.2 Myokine	11
2.3.3 Adipo-Myokine	14
2.4 Zielsetzung	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Probenmaterial	17
3.1.1 Rinder aus einer experimentellen F ₂ -Kreuzung	17
3.1.2 Rinderrassen mit differenter IMF-Akkumulation	17
3.1.3 Gewebe für molekularbiologische und proteinbiochemische Analysen	17
3.1.4 Zelllinie	18
3.1.5 Primäre bovine Zellen	18
3.1.5.1 Isolierung von stromavaskulären Zellen	18
3.1.5.2 Isolierung von bovinen Satellitenzellen	19
3.1.5.3 Gewinnung von Fettgewebe für Explant-Kulturen	19
3.1.6 Chemikalien, Puffer, Verbrauchsmaterialien, Software und Geräte	20
3.2 Methoden	20
3.2.1 Datenanalyse	20
3.2.2 Lasermikrodissektion	21
3.2.3 Molekularbiologische Analysen	22
3.2.3.1 RNA-Isolierung	22
3.2.3.2 Konzentrationsmessung der RNA	22
3.2.3.3 Isolierung von genomischer DNA	22
3.2.3.4 Proteinisolierung	23
3.2.3.5 Proteinfractionierung	23
3.2.3.6 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	24
3.2.3.7 Primerdesign	24
3.2.3.8 PCR und Agarosegelelektrophorese für Primertests	26
3.2.3.9 Quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR)	27

3.2.3.10	Strukturelle Analyse des <i>THRSP</i> -Locus.....	29
3.2.4	Zellkultur.....	30
3.2.4.1	Kultivierung und Differenzierung von 3T3-L1-Zellen.....	30
3.2.4.2	Kultivierung und Differenzierung von primären bovinen Präadipozyten.....	31
3.2.4.3	Ölrot-Färbung.....	31
3.2.4.4	Fettexplantkultur aus SCF.....	32
3.2.4.5	Kultivierung und Differenzierung von bovinen Satellitenzellen.....	32
3.2.5	Proteinbiochemische Methoden.....	33
3.2.5.1	Immunhistochemie.....	33
3.2.5.1.1	3T3-L1-Zellen.....	33
3.2.5.1.2	Gewebeschnitte der bovinen Leber, des Skelettmuskels und des subkutanen Fettgewebes.....	34
3.2.5.1.3	Kapillarfärbung vom bovinen Muskelquerschnitt.....	35
3.2.5.1.4	Primäre bovine Muskelzellen.....	36
3.2.5.2	Western Blot.....	36
4	Ergebnisse.....	41
4.1	Vergleichende Analyse von Transkriptom-, Proteom- und Sekretomdaten der Spezies Rind, Mensch und Maus.....	41
4.1.1	Evaluierung different exprimierter Transkripte im Fettgewebe und Skelettmuskel.....	41
4.1.2	Identifizierung von Adipokinen und Myokinen als Teilmenge der Transkripte mit High-Score.....	41
4.1.3	Identifizierung von Adipo-Myokinen.....	42
4.1.4	Netzwerk-Analyse der Gene mit High-Score.....	44
4.2	Vergleichende Expressionsanalysen von ausgewählten Kandidatengenen im Skelettmuskel- und Fettgewebe von Bullen der SEGFAM-Population.....	49
4.2.1	Analyse von THBS4 beim Rind.....	50
4.2.2	Analyse von <i>THRSP</i> beim Rind.....	54
4.2.2.1	mRNA-Expression von <i>THRSP</i> in verschiedenen bovinen Geweben.....	55
4.2.2.2	Analyse und vergleichende Sequenzierung des <i>THRSP</i> -Locus.....	56
4.2.2.3	Genexpression von <i>THRSP</i> auf mRNA- und Proteinebene in verschiedenen Zelltypen.....	56
4.2.2.4	mRNA-Expression während der adipogenen Differenzierung.....	62
4.2.2.5	Proteinlokalisierung in der 3T3-L1-Zelllinie.....	64
4.3	Etablierung von primären bovinen Zellkulturmodellen für funktionelle Untersuchungen.....	66

4.3.1	Kultivierung und adipogene Differenzierung von primären bovinen stromavaskulären Zellen	66
4.3.2	Relative mRNA-Expression von Genen in bovinen Fettexplants	68
4.3.3	Kultivierung von primären bovinen Myoblasten	70
5	Diskussion	73
5.1	Speziesübergreifende Genexpressionsdaten-Analyse	73
5.2	Initiale Charakterisierung ausgewählter, putativer Adipokine und Myokine beim Rind	80
5.3	Etablierung von primären bovinen Zellkulturmodellen zur funktionellen Untersuchung von potentiellen Adipokinen und Myokinen	88
5.4	Fazit	93
6	Zusammenfassung	94
7	Summary	95
8	Literaturverzeichnis	96
Anhang A - Tabellen und Abbildungen		118
Anhang B - Medien und Puffer		145
	Medien, Lösungen und Zusätze für die Zellkultur	145
	Lösungen für molekularbiologische Methoden	149
	Lösungen für die Proteinfractionierung und für proteinbiochemische Methoden.....	150
Eidesstattliche Erklärung		IX
Danksagung		X

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
×g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar (Mikromol/Liter)
Abb.	Abbildung
acc. no.	Zugangsnummer (<i>accession number</i>) im National Center for Biotechnology Information (NCBI)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMEM/F12	Dulbecco's modified eagle's medium/nutrient mixture F-12
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
g	Gramm
h	Stunde/n
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
Hoechst33258	2-[2-(4-Hydroxyphenyl)-6-benzimidazol]-6-(1-methyl-4-piperazy-9-benzimidazol) * 3 H ₂ O
IU	internationale Einheiten (<i>international units</i>)
kDa	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
l	Liter

Lsg.	Lösung
M	molar (Mol/Liter)
mA	Milliampere
min	Minute/n
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar (Millimol/Liter)
ng	Nanogramm
nM	nanomolar (Nanomol/Liter)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-D	Modifikation von Dulbeccos phosphatgepuffertes Kochsalzlösung nach Harper et al. 1987
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxylmethyl)-1,3-propandiol
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
vs.	gegen, im Vergleich zu (<i>versus</i>)
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Markierte Flächen von Fettzellen (a) und Muskelfasern (c) für die LCM und die dazugehörigen gesammelten Ausschnitte (b, d).....	21
Abbildung 2. Medienzusammensetzungen und Design der Experimente für die Differenzierung der primären bovinen Myoblasten.....	33
Abbildung 3. Detektion von THRSP im Western Blot mit Hilfe eines mausspezifischen polyklonalen Antikörpers	39
Abbildung 4. Western Blot verschiedener Gewebe vom Rind und dem subkutanem Fett der Maus. Detektion unspezifischer Bindungen der körpereigenen Antikörper der Kaninchen vor der Immunisierung.....	39
Abbildung 5. Western Blot verschiedener boviner Gewebe und des murinen subkutanen Fettgewebes. Markierung spezifischer und unspezifischer Proteinbanden mit dem rinderspezifischen polyklonalen Antikörper A zur Detektion von THRSP durch Blockierung der Bindungsstelle mit dem Immunisierungspeptid.....	40
Abbildung 6. Western Blot verschiedener Gewebe vom Rind und des subkutanen Fettgewebes der Maus. Unspezifische und spezifische Signale des rinderspezifischen polyklonalen Antikörpers B zur Detektion von THRSP durch Blockierung der Bindungsstellen mit dem Immunisierungspeptid	40
Abbildung 7. Netzwerk different exprimierter Gene in der funktionellen Kategorie „Zellaufbau und zelluläre Organisation, zelluläre Funktion und Aufrechterhaltung, Zellmorphologie“	46
Abbildung 8. Netzwerk unterschiedlich exprimierter Gene in der funktionellen Kategorie „Entwicklung und Funktion des kardiovaskulären Systems, Zellkommunikation und Interaktion, Gewebeentwicklung“	47
Abbildung 9. Veranschaulichung der wichtigsten identifizierten Faktoren, die bei der Entstehung von Fibrose involviert sind.....	48
Abbildung 10. Zelluläre Lokalisation von THBS4 in bovinen Serienschnitten des MLD.....	52
Abbildung 11. Zelluläre Detektion von THBS4 im bovinen Muskelquerschnitt.....	53
Abbildung 12. Detektion von THBS4 im MLD und Plasma von F ₂ -Bullen zum Zeitpunkt der Schlachtung mit Hilfe des Western Blots	54
Abbildung 13. mRNA-Expression von THRSP in verschiedenen bovinen Geweben.....	55
Abbildung 14. Untersuchte Regionen des THRSP-Locus.....	56
Abbildung 15. Zelluläre Lokalisation von THRSP in bovinen Serienschnitten des MLD	58
Abbildung 16. Zelluläre Lokalisation von THRSP in bovinen Geweben.....	59
Abbildung 17. Western Blot von Proteinfractionen der Leber und des subkutanen Fettgewebes vom Rind.....	60
Abbildung 18. Western Blot einer Verdünnungsreihe des murinen rekombinanten THRSP in Plasma oder PBS sowie von bovinem und murinem subkutanen Fettgewebe	61

Abbildung 19. THRSP Protein-Expression in verschiedenen bovinen Geweben der F ₂ -Bullen.....	62
Abbildung 20. Ölrot-Färbung von 3T3-L1-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung zu reifen Adipozyten	62
Abbildung 21. Relative mRNA-Expression von verschiedenen Genen in 3T3-L1-Zellen.....	63
Abbildung 22. Relative mRNA-Expression von verschiedenen Genen in primären bovinen stromavaskulären Zellen	64
Abbildung 23. Zelluläre Lokalisation von DLK1 in 3T3-L1-Zellen nach zwei Tagen (a, b, c) und 21 Tagen (d, e, f) Differenzierung	65
Abbildung 24. Zelluläre Lokalisation von CEBPB in 3T3-L1-Zellen nach 21 Tagen Differenzierung	65
Abbildung 25. Bildaufnahmen von THRSP in 3T3-L1-Zellen nach zwei Tagen (a, b, c) und 21 Tagen (d, e, f) Differenzierung	66
Abbildung 26. Mikroskopische Aufnahmen primärer boviner Adipozyten aus dem intermuskulären Fett einer Färsche nach 15 Tagen Differenzierung	67
Abbildung 27. Mikroskopische Aufnahmen primärer boviner Adipozyten aus dem intermuskulären Fett einer adulten Kuh nach 15 Tagen Differenzierung	67
Abbildung 28. Phasenkontrastaufnahmen primärer boviner Adipozyten aus dem subkutanen Fett einer ausgewachsenen Kuh nach 15 Tagen Differenzierung	68
Abbildung 29. Relative mRNA-Expression von HSL in bovinen Fettexplants aus dem SCF zu verschiedenen Zeitpunkten	69
Abbildung 30. Relative mRNA-Expression von PPARG in bovinen Fettexplants aus dem SCF zu verschiedenen Zeitpunkten	70
Abbildung 31. Phasenkontrastaufnahmen von bovinen Myoblasten, die zu vielkernigen Myotuben differenzieren.....	71
Abbildung 32. Fluoreszenzbilder von bovinen Myoblastenkulturen	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Ansatz für den Mastermix zur cDNA-Synthese	24
Tabelle 2. Primersequenzen für die RT-qPCR mit boviner cDNA.....	25
Tabelle 3. Primersequenzen für die RT-qPCR mit muriner cDNA	26
Tabelle 4. Ansatz für den Mastermix zur PCR	26
Tabelle 5. Programm für die PCR	27
Tabelle 6. Ansatz für den Mastermix zur RT-qPCR	28
Tabelle 7. Programm für die RT-qPCR	28
Tabelle 8. Primersequenzen für die Amplifizierung und Sequenzierung von Abschnitten des <i>THRSP</i> -Locus	30
Tabelle 9. Verwendete Primärantikörper für die Immunhistochemie der 3T3-L1-Zellen mit entsprechender Konzentration	34
Tabelle 10. Inkubationslösung für den Nachweis der alkalischen Phosphatase (pH=9,4).....	36
Tabelle 11. Validierung der Adipokin-Kandidaten aus der Scoring-Matrix mit bekannten Adipokinen.....	42
Tabelle 12. Liste der 22 Adipo-Myokine und ihre Regulation in den individuellen Datensätzen von Skelettmuskel und Fettgewebe	43
Tabelle 13. Liste der wichtigsten Netzwerke für Adipokine und Myokine inklusive Score aus der IPA	45
Tabelle 14. C _T -Werte von THBS4 und Zelltyp-Markern aus der Analyse der RT-qPCRs	51
Tabelle 15. C _T -Werte von THRSP und Zelltyp-Markern aus der Analyse der RT-qPCRs.....	57
Tabelle 16. Anzahl der Zellkerne in den Myotuben, Gesamtanzahl der Zellkerne und Differenzierungsgrad von bovinen Skelettmuskelzellen nach 72 h Differenzierung.....	71

1 Einführung

Fett wird im Tierkörper in unterschiedlichen Anteilen als Energiereserve gespeichert. Der größte Teil wird in Form von Triglyceriden in Adipozyten in verschiedenen Fettdepots eingelagert. Die größten Depots werden vom subkutanen und viszeralen Fettgewebe gebildet. Abhängig von variierenden Stoffwechselbedingungen und genetischen Voraussetzungen kann Fett aber auch in anderen Organen akkumulieren. Adipozyten sind u.a. in der Nachbarschaft von Skelettmuskeln entweder zwischen verschiedenen Muskeln als intermuskuläres Fett oder innerhalb eines Muskels zwischen Muskelfaserbündeln als intramuskuläres Fett (IMF) zu finden. Innerhalb der Muskelfasern gespeicherte Lipide werden als intramyozelluläres Fett bezeichnet (Übersicht in Komolka et al. 2014a). Darüber hinaus sind Lipide am Aufbau von Membranen aller Zellen beteiligt und werden von vielen Zellen abhängig von variierenden Stoffwechselbedingungen in Lipidtröpfchen gespeichert.

Das sichtbare IMF ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal für Rindfleisch und hat einen günstigen Einfluss auf dessen Zartheit (Platter et al. 2005, Dodson et al. 2010a). Es korreliert jedoch positiv mit einer erhöhten Menge der viszeralen und subkutanen Fettdepots, welche weder beim Produzenten noch Konsumenten erwünscht sind (Albrecht et al. 2006). Um den Verbraucheransprüchen gerecht zu werden, hat die Züchtung Rinderrassen hervorgebracht, die extreme Unterschiede im IMF-Gehalt aufweisen, sogar unter gleichen Fütterungs- und Haltungsbedingungen. Dies spricht für eine rassenspezifische Fähigkeit für Lipideinlagerungen im Skelettmuskel (Albrecht et al. 2011a). Die Mechanismen, die diese differierende Fettverteilung an den unterschiedlichen Körperstellen veranlassen und regulieren, sind größtenteils unbekannt (Hausman et al. 2009, Dodson et al. 2010b).

Beim Menschen ist die Fettdeposition im Muskel höchst relevant für Adipositas-assoziierte metabolische Erkrankungen. Die Fettmenge im Skelettmuskel korreliert nachweislich mit Stoffwechselstörungen wie Insulinresistenz und einer eingeschränkten metabolischen Anpassungsfähigkeit bei inaktiven Probanden (Samuel et al. 2010, Corpeleijn et al. 2009). Regelmäßige Bewegung hat einen wichtigen funktionellen Effekt auf den Körperfettgehalt und die –verteilung. Durch eine erhöhte körperliche Aktivität wird bei übergewichtigen Personen die Menge an viszeralem Fett reduziert und damit gleichzeitig die Insulinsensitivität gesteigert (Boulé et al. 2005, Stefan et al. 2007). Außerdem können intermuskuläre Adipozyten in einer vergleichbaren Masse wie viszerales Fettgewebe vorhanden sein und das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen steigern (Yim et al. 2007). Ältere Daten geben zusätzlich Hinweise darauf, dass das IMF bei übergewichtigen Personen erhöht ist (Gallagher et al. 2005). Ein hoher intramyozellulärer Fettgehalt wird ebenso mit negativen Folgen für den Glukosestoffwechsel in Verbindung gebracht (Schrauwen-Hinderling et al. 2007). Paradoxerweise haben trainierte Ausdauerathleten viel Fett im Muskel eingelagert und sind trotzdem sehr insulinsensitiv (Goodpaster et al. 2001). Kürzlich hat sich

herausgestellt, dass die Lipide, die im Muskel von Sportlern und inaktiven Individuen vorkommen, qualitativ weniger voneinander abweichen, als erwartet (Amati et al. 2011). Aus diesem Grund könnten insbesondere die zellulären Signalkaskaden während der Fettspeicherung und –mobilisierung für metabolische Fehlsteuerungen bei adipösen Menschen verantwortlich sein.

Viele Studien haben gezeigt, dass sich Muskel- und Fettgewebe gegenseitig beeinflussen und auf zellulärer Ebene interagieren (zusammengefasst in Komolka et al. 2014a, Indrakusuma et al. 2015). Auf molekularer Basis können Fett- und Muskelzellen über die Sekretion von hormonellen Faktoren kommunizieren, die eine auto-, para- und endokrine Wirkung haben können. Es ist bereits gut etabliert, dass Fettzellen als sekretorische Zellen agieren (Kim & Moustaid-Moussa 2000). In zahlreichen vergangenen Studien konnten viele Proteine, die von humanen und murinen Fettzellen freigesetzt werden, sogenannte Adipokine, identifiziert und teilweise auch näher beschrieben werden (Molina et al. 2009, Lehr et al. 2012a). Beim Rind gibt es diesbezüglich deutlich weniger Erkenntnisse.

Die Skelettmuskulatur nimmt im Körper klassischerweise Halte-, Stütz- und Bewegungsfunktionen ein. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass Muskelzellen darüber hinaus eine Vielzahl an bioaktiven Stoffen (Myokine) ausschütten, die auch Effekte auf andere Organe und Gewebe, wie das Fettgewebe, ausüben könnten (Trayhurn et al. 2011). Als größter induktiver Reiz für die Freisetzung von Myokinen gilt die Muskelkontraktion während körperlicher Betätigung (Pedersen et al. 2007). Das Wissen um die Einflüsse dieser hormonähnlichen Substanzen aus Fett- und Muskelgewebe auf physiologische Stoffwechselprozesse, die Gesundheit und die Entwicklung von Mensch und Tier ist jedoch noch immer sehr unvollständig. Obwohl es Unterschiede in der metabolischen Kontrolle zwischen Monogastriern und Wiederkäuern gibt, existieren auf zellulärer und molekularer Ebene generelle Regulationsprinzipien. Doch besonders die Fettdepot-spezifische Regulation des Lipidmetabolismus und der Adipogenese kann in Gewebe- und Zellkulturen nur begrenzt studiert werden. Daher sind große Versuchstiere wie Rinder geeignet, um grundlegende Prozesse des Stoffwechsels zu erforschen (Clarke 2008, Dodson et al. 2010b). Tiere, die für die Erzeugung von Fleisch gehalten werden, sind zudem einzigartig als Modelltiere, weil sie einen direkten ökonomischen Wert für die Tierproduktion haben. Die bovine Skelettmuskulatur mit einem unterschiedlichen IMF-Gehalt stellt ein nützliches Modell dar, um die Wechselwirkungen zwischen Adipozyten und Myozyten zu untersuchen.

Das Ziel der eigenen Untersuchungen war die Identifizierung und Charakterisierung von Adipokinen und Myokinen mit Bedeutung für die Körperzusammensetzung beim Rind. Dabei stand besonders ihr Beitrag zur Ausprägung der intramuskulären Fetteinlagerung im Fokus.

2 Literaturübersicht

2.1 Fettgewebe als endokrines Organ

Das Fettgewebe ist eines der größten endokrinen Organe. Bei normalgewichtigen Menschen (Body-Mass-Index (BMI) 22-23) nimmt es nahezu 20 % des Körpergewichts ein, wohingegen es bei fettleibigen Personen (BMI 30) sogar einen Anteil von über 50 % umfassen kann (Hassan et al. 2012). Morphologisch sowie funktionell werden vorrangig zwei Arten des Fettgewebes unterschieden: das „weiße“ und das „braune“ Fettgewebe. Den kleineren Teil macht das braune Fettgewebe aus. Es ist hauptsächlich für die Thermogenese zuständig und nutzt dafür die chemische Energie aus Lipiden und Glukose, um Wärme über die Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette zu erzeugen (Lidell & Enerbäck 2010). Ursprünglich wurde angenommen, dass braunes Fettgewebe nur bei Nagern und Säuglingen vorkommt, um sie vor Kälte zu schützen. Vor einigen Jahren wurden braune Fettzellen jedoch auch im adulten Menschen entdeckt (Cannon & Nedergaard 2004) und kurze Zeit später ihre physiologische Bedeutung beschrieben (Cypess et al. 2009). Seitdem wird das Potenzial des braunen Fettgewebes bei der Behandlung von Übergewicht intensiv erforscht und diskutiert (Granneman 2015).

In den folgenden Ausführungen liegt der Fokus ausschließlich auf dem dominierenden weißen Fettgewebe. Es wird bei landwirtschaftlichen Nutztieren, genau wie beim Menschen, noch einmal in verschiedene Fettdepots unterteilt. Diese werden entsprechend ihres Vorkommens im Körper unterschieden. Die Fettschicht, die sich direkt unter der Haut befindet, wird vom subkutanen Fett gebildet. Das viszerale Fett wird auch als „Organfett“ bezeichnet und ist hauptsächlich in der Bauchhöhle lokalisiert. Ursprünglich wurde das weiße Fettgewebe vorwiegend als passives Speicherorgan für überschüssige Energie in Form von Triglyceriden betrachtet. Zudem dient es als guter Isolator gegen Wärmeverlust und schützt die Organe vor mechanischen Einflüssen (Trayhurn & Beattie 2001). Heute findet das Fettgewebe zunehmend Beachtung als ein komplexes, essentielles, metabolisch aktives und endokrines Organ (Ahima & Flier 2000, Frühbeck et al. 2001). Neben den vorherrschenden lipid-gefüllten Fettzellen, den sogenannten Adipozyten, enthält es Bindegewebe, Nervenzellen, stroma-vaskuläre Zellen und Immunzellen (Kershaw & Flier 2004). All diese heterogenen Zelltypen ergeben zusammen eine funktionierende Einheit (Frayn et al. 2003). Deren Kommunikation findet nicht nur untereinander, sondern auch mit anderen Geweben statt. Die Zellen agieren lokal auf autokrine und parakrine Art und Weise, sind aber auch systemisch aktiv. Dadurch beeinflussen sie viele Organe, die kritisch für die Energiehomöostase sind (Deng & Scherer 2010). Von entscheidender Bedeutung bei landwirtschaftlichen Nutztieren ist neben dem subkutanen Fett, aus dem vom Schwein der Speck gewonnen wird, das muskuläre Fett (Bonnet et al. 2010), das sich aus inter- und

intramuskulärem Fett zusammensetzt. Das IMF, welches innerhalb der Muskelfaserbündel lokalisiert ist, wird auf zellulärer Ebene durch die Adipogenese, den Prozess der Proliferation und Differenzierung von Präadipozyten, gebildet. Ontogenetisch später folgt dann die Lipogenese, welche die sukzessive Ansammlung von Lipiden beinhaltet (Hausman et al. 2009). Bei Rindern macht das Fettgewebe 5-35 % der Körpergesamtmasse aus. Der Anteil schwankt in Abhängigkeit von Alter, Genotyp und Fütterung. Die chronologische Entwicklung der Fettgewebe hängt von der Spezies und von der anatomischen Lokalisation ab. Die Deposition der Fettgewebe geschieht bei Rindern in folgender Reihenfolge: viszeral, intermuskulär, subkutan und intramuskulär (Vernon 1986, Pethick et al. 2005). Während das intermuskuläre Fett bereits pränatal ausgebildet wird, ist das IMF erst nach der Geburt sichtbar (Vernon 1986). Anlagen zur Bildung intramuskulärer Fettzellen sind jedoch auch schon vor der Geburt zu erkennen (Albrecht et al. 2015). Das IMF ist ein wichtiges Fleischqualitätsmerkmal, das den Geschmack, die Saftigkeit, die Zartheit und damit auch die Verbraucherakzeptanz von Rindfleisch positiv beeinflusst (Platter et al. 2005). Da die Fetteinlagerung im Muskel bzw. Fleisch optisch der Struktur des Marmors ähnelt, wird das mit bloßem Auge sichtbare IMF auch als Marmorierung bezeichnet. Die traditionelle Selektion landwirtschaftlicher Nutztiere war lange Zeit bestrebt, den Körperfettgehalt zu minimieren und die Muskelmasse zu erhöhen. Das beim Verbraucher unbeliebte subkutane Fett konnte zwar deutlich reduziert werden, jedoch nahm gleichzeitig auch der Fettgehalt im Skelettmuskel ab, was zu einer verminderten Schmackhaftigkeit des Fleisches führte (Mörlein et al. 2007). Folglich ist es ein Ziel der modernen Tierzucht, eine ausreichende Marmorierung zu erreichen und gleichzeitig die unerwünschten und wirtschaftlich nachteiligen Fettdepots zu begrenzen. Je nach regionalen Präferenzen variieren die Anforderungen der Konsumenten, was den bevorzugten IMF-Gehalt von Rindfleisch betrifft (Dodson et al. 2010a). Aus diesem Grund arbeitet die Nutztierwissenschaft daran, adipogene Mechanismen für die Manipulation des IMF aufzuklären. Sowohl die Zusammensetzung als auch die Verteilung und die Menge des IMF sind Gegenstand der Forschung, weil diese Parameter die Fleischqualität beeinflussen (Albrecht et al. 2006). Außerdem spielt das IMF mit seiner Fettsäurezusammensetzung eine wichtige Rolle für die Beschaffenheit und den Nährstoffgehalt von Fleisch (Moloney et al. 2001). Eine höhere Ablagerung von Lipiden im Skelettmuskel geht mit einem höheren Gehalt an Ölsäure einher (Bureš et al. 2006, Hoehne et al. 2012). Rinderrassen mit einem hohen IMF-Gehalt haben sogar insgesamt mehr einfach ungesättigte Fettsäuren und weniger gesättigte Fettsäuren als Rassen mit einem niedrigen IMF-Gehalt bei gleichen Haltungs- und Fütterungsbedingungen (Shirouchi et al. 2014). Die Entwicklung der Marmorierung ist nicht unabhängig von anderen Körperfettdepots. Der IMF-Gehalt korreliert positiv mit dem subkutanen Fett (McPhee et al. 2006). Darüber hinaus variiert die Fettverteilung zwischen verschiedenen Fettdepots im Schlachtkörper abhängig

von Alter, Rasse, Geschlecht und Ernährung (Pethick et al. 2004, Robelin 1986). Es gibt sehr magere Rassen, wie z.B. die doppellendigen Weißblauen Belgier. Sie haben nur einen IMF-Gehalt von ~1 % (Albrecht et al. 2006). Eine Rasse mit der Fähigkeit, extrem viel Fett innerhalb des Muskels einzulagern, sind die japanischen Wagyu-Rinder mit IMF-Gehalten von mehr als 20 % (Gotoh et al. 2009). Um gut marmoriertes Fleisch zu erzeugen, ist ein energiereiches Futter für Kälber notwendig. Je länger Rinder mit Getreide gefüttert werden, desto mehr IMF wird akkumuliert und desto mehr einfach ungesättigte Fettsäuren sind im Fettgewebe enthalten (Smith et al. 2009). Albrecht et al. (2011a) haben außerdem festgestellt, dass die intramuskuläre Fetteinlagerung bei verschiedenen Rinderrassen unter gleichen Fütterungsbedingungen sehr unterschiedlich erfolgt. In älteren Studien wurde gezeigt, dass das IMF sich in den einzelnen Rassen zwar kontinuierlich mit dem Wachstum entwickelt, jedoch mit einer variierenden Intensität, was zu unterschiedlichen Marmorierungsgraden bei der Schlachtung führt (Albrecht et al. 2006, Bruns et al. 2004). Während die Marmorierung einen Einfluss auf Zartheitskomponenten haben soll, variiert deren Regulation enorm zwischen, aber auch innerhalb von Rinderrassen (Albrecht et al. 2006). Sie wird durch eine große Bandbreite von Faktoren determiniert; wie Genetik, Haltungsbedingungen und saisonale Temperaturschwankungen. Es wurde bereits gezeigt, dass die Marmorierung von Fleisch in positiver oder negativer Art und Weise beeinflusst werden kann. In einigen Ländern werden sogar Substanzen, wie Hormone oder β -Agonisten eingesetzt, um die Wachstumsrate und die Futterumsatzeffizienz der Rinder zu fördern (Macken et al. 2003, Sillence 2004). Obwohl das Potenzial und Strategien vorhanden sind, um die Marmorierung zu steigern, ist aktuell wenig zu den zugrunde liegenden Mechanismen der Fettablagerung und -verteilung bekannt (Dodson et al. 2010a). Da Rinderrassen unter gleichen Fütterungs- und Haltungsbedingungen ganz unterschiedliche Fettverteilung im Tierkörper aufweisen (Albrecht et al. 2011a), sind sie gut geeignet, um grundlegende Prinzipien der Fetteinlagerung aufzuklären. Die Ergebnisse einer Studie von Kern et al. (2014) indizieren, dass der Anstieg von Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARG*) am Ende der Fütterungsphase den IMF-Gehalt steigert. Der Transkriptionsfaktor soll zusätzliche Zellen rekrutieren, die proliferieren und letztendlich zu reifen Adipozyten differenzieren. Eine aktuelle Arbeit beschreibt die günstigen Effekte einer diätetischen Supplementation mit konjugierter Linolsäure auf die Einlagerung von IMF hauptsächlich durch die Aufregulation lipogener Gene und parallel dazu die Reduktion von subkutanem Fett durch die Aufregulation lipolytischer Gene in einer bovinen Kreuzungspopulation (Zhang et al. 2016). Es bestimmen jedoch viele externe und intrinsische Faktoren die Regulation des IMF-Gehalts und die Schlachtkörperqualität. Die im Folgenden erläuterten stoffwechselaktiven Adipokine, Myokine und Adipo-Myokine könnten ausschlaggebende

Aufgaben in den ablaufenden physiologischen Prozessen bei der Entwicklung der Marmorierung übernehmen.

2.2 Skelettmuskelgewebe als endokrines Organ

Die Skelettmuskulatur ist neben der glatten Muskulatur und der Herzmuskulatur einer der drei Hauptmuskeltypen im Organismus. Ihr Anteil beträgt durchschnittlich zwischen 30-40 % des humanen Gesamtkörpergewichts (Janssen et al. 2000). Bei Nutztieren nimmt die Skelettmuskelmasse in der Regel mehr als die Hälfte des Gewichts ein (Bonnet et al. 2010). Damit stellt der Skelettmuskel das größte Organ von Säugern dar. Es handelt sich dabei um quergestreiftes Muskelgewebe, das der willkürlichen Kontrolle des somatischen Nervensystems unterliegt. Skelettmuskeln bestehen aus Muskelfaserbündeln, die von mehreren Muskelfasern gebildet werden. Muskelfasern an sich entstehen durch die Verschmelzung einzelner Myoblasten im Prozess der Myogenese und besitzen dementsprechend mehrere Zellkerne (Hick & Hartmann 2006). Die Anzahl und Größe der Muskelfasern sind wichtige Determinanten der Muskelmasse (Bonnet et al. 2010). Jede Muskelfaser ist aus Myofibrillen aufgebaut, die sich wiederum aus Aktin und Myosin-Filamenten zusammensetzen. Die Anordnung dieser Myofilamente erfolgt in Sarkomeren, welche die grundlegenden Funktionseinheiten der Muskelfasern bilden. Diese Sarkomer-Strukturen sind auch für das Aussehen der quergestreiften Muskulatur verantwortlich (Hick & Hartmann 2006). Funktionell zeichnen sich die Skelettmuskeln in erster Linie durch ihre mechanische Aktivität aus. Diese ist u.a. für Körperhaltung, Bewegung und Atmung notwendig. Nur durch die Kontraktionsfähigkeit der Muskelfasern kann der Skelettmuskel seine klassischen Aufgaben erfüllen. Die Muskelfasern können in „rote“ und „weiße“ Fasertypen unterteilt werden. Für die langsamen ausdauernden Bewegungen sind eher die roten, oxidativen Muskelfasern zuständig. Der weiße, glykolytische Fasertyp kann kurzfristig stärkere Bewegungen ausführen, ermüdet aber schnell. Außerdem gibt es einen Intermediärtyp, der in seinen Eigenschaften zwischen roter und weißer Muskulatur angesiedelt ist (Appell & Stang-Voss 2013). Der Skelettmuskel ist allerdings nicht nur ein wichtiger Bestandteil des Bewegungsapparates. Bei Nutztieren, die zur Fleischgewinnung verwendet werden, ist er eng mit Variablen der Fleischquantität und –qualität verknüpft (Gotoh 2003). Seine Energieproduktion und sein Energieverbrauch sind ebenso essentiell für das metabolische Gleichgewicht, wie die hormonähnlichen Moleküle, die vom Skelettmuskel produziert und sezerniert werden. Diese sogenannten Myokine werden in einem gesonderten Abschnitt ausführlich beschrieben.

2.3 Wechselwirkungen zwischen Skelettmuskel- und Fettgewebe

Die biologische Interaktion zwischen zwei Organen kann entweder direkt auf parakrine Art und Weise oder über das Blut auf endokrinem Weg erfolgen. Das Skelettmuskelgewebe und das weiße Fettgewebe zählen zu den größten Organen von Menschen oder tierischen Lebewesen. Als endokrine Organe exprimieren beide Gewebe eine vielfältige Auswahl an Proteinen und anderen bioaktiven Molekülen und setzen diese in die Zirkulation frei. Sie tragen so zum multidirektionalen Austausch bei. Die Faktoren des Fettgewebes werden als Adipokine, die des Skelettmuskelgewebes werden entsprechend als Myokine bezeichnet. Deren Sekretion spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation bestimmter Prozesse der Energiehomöostase vieler Organe oder Gewebe (Trayhurn et al. 2011). Die Wechselwirkungen zwischen Fett- und Skelettmuskelgewebe haben vor allem an Beachtung gewonnen, seit sie beim Menschen in einen Zusammenhang mit der Pathogenese der Insulinresistenz gebracht werden konnten (Eckardt et al. 2008).

Bei Rindern ist die adäquate Entwicklung von Muskel- und Fettgewebe eine wichtige Zielgröße in der Fleischerzeugung. Nur mit Hilfe einer optimalen Nährstoffanpassung können tierische Produkte effizient hergestellt werden. Das Muskel-Fett-Verhältnis bezeichnet die relative Relation von Fett- und Muskelmasse und ist Resultat des dynamischen Gleichgewichts von Zellanzahl und -größe. Es stellt ein wichtiges Kriterium für den Schlachtkörperertrag und die Qualität von Rindfleisch dar. Es gibt Hinweise, dass Muskel- und Fettgewebe ontogenetische und funktionelle Gemeinsamkeiten besitzen (Du et al. 2013). Muskelzellen und braune Fettzellen haben ihren Ursprung in derselben multipotenten mesenchymalen Stammzelllinie (Zuk et al. 2002, Hassan et al. 2012). Die Anlagen für Muskel- und Fettgewebe von Rindern werden hauptsächlich in der fötalen Phase durch die Rekrutierung und Vermehrung der entsprechenden Zelltypen (Hyperplasie) gebildet. Während die Gesamtanzahl an Muskelfasern und deren morphologische und funktionelle Eigenschaften noch vor der Geburt festgelegt werden, ist die Anzahl der Adipozyten nicht limitiert (Picard et al. 2002). Postnatal soll die steigende Nährstoffspeicherung in ausdifferenzierten Muskelfasern und Fettzellen der Hauptgrund für die Zunahme von Muskel- bzw. Fettgewebsmasse sein. Dabei kommt es zur Größenzunahme der Zellen (Hypertrophie). Es besteht vermutlich ein Wettbewerb bezüglich der Nährstoffaufnahme zwischen beiden Geweben, der über zelluläre Signalwege und sezernierte Proteine ausgetragen wird. Das Muskel-Fett-Verhältnis variiert u.a. abhängig von Rasse und Geschlecht. Im fötalen Zustand scheint es sogar durch die Fütterung der Mutterkuh beeinflusst zu werden. Muskelhypertrophie begleitet von Fettatrophie in den doppelendigen Weißblauen Belgiern hat ein extrem hohes Muskel-Fett-Verhältnis zur Folge (Bellinge et al. 2005). Das umgekehrte Verhältnis ist bei der Rasse Japanese Black (Wagyu) der Fall (Zembayashi 1994). Auch der Einfluss der Fütterung auf das Muskel-Fett-Verhältnis ist

bereits bekannt. Der Energiegehalt und die Zusammensetzung einer Diät spielen dabei eine wichtige Rolle hinsichtlich der Wachstumsraten von Muskel- und Fettgewebe (Greenwood & Cafe 2007). Bei einer restriktiven Diät von Rindern geht ein gutes Muskelwachstum mit einer verzögerten Vermehrung des Fettgewebes einher. Das Wachstum von Fettgewebe ist bevorzugt in wachsenden Tieren festzustellen, die nach einer fötalen oder postnatalen Versorgungseinschränkung eine Hochkonzentrat-Diät verabreicht bekommen (Bonnet et al. 2010). Die Abweichungen im Muskel-Fett-Verhältnis sind demnach eher auf Größe und Anzahl der Adipozyten und weniger auf die Muskelfasergröße zurückzuführen. Das gibt Anlass zur Annahme, dass Anpassungsstrategien im Energiestoffwechsel zu Gunsten des Muskelwachstums ablaufen. Beide Gewebearten unterliegen während ihres Wachstums spezifischen Differenzierungsprozessen. Zusätzlich zu ihrer gewebespezifischen metabolischen und endokrinen Regulation führt die Interaktion zwischen Fett- und Muskelzellen auch zur gegenseitigen Regulation der Zelldifferenzierung. Dies wurde durch einige in-vitro Studien belegt. Cassar-Malek et al. (2006) konnten beobachten, dass die Myogenese unter Verwendung von präadipozyten-konditioniertem Proliferationsmedium gehemmt wird. In einem anderen Zellkultorexperiment konnte die Differenzierung von fötalen Präadipozyten in Ko-Kultur mit primären bovinen Myoblasten gesteigert werden (Bonnet et al. 2008). Taube et al. (2012) demonstrierten die Funktion der Adipokine bei der Vermittlung von lipotoxischen Effekten von Palmitinsäure auf Muskelzellen. Geringe Dosen Palmitinsäure wirkten toxisch, wenn Muskelzellen mit konditioniertem Medium inkubiert wurden, das von kultivierten subkutanen Adipozyten stammte. Die Autoren vermuteten, dass das konditionierte Kulturmedium das gesamte Adipokinom darstellen könnte. Koreanische Wissenschaftler konstatierten, dass eine Ko-Kultur aus bovinen Adipozyten und muskulären Satellitenzellen die adipogene Genexpression in den Myoblasten anregt (Choi et al. 2013). Parakrine Signale und/oder physikalische Prozesse könnten dafür verantwortlich sein. Eine aktuelle Publikation erwähnt erstmals auch intrazelluläre Organellen, wie das Inflammasom, als regulierende Größen der Organkommunikation, wenngleich auf indirektem und unbekanntem Weg (Indrakusuma et al. 2015). Das Inflammasom ist ein spezialisierter Proteinkomplex in Immunzellen, der Gefahrensignale erkennt und eine entsprechende Abwehr- und Entzündungsreaktion einleitet. Damit repräsentiert das Inflammasom einen wichtigen Teil des angeborenen Immunsystems. Ein weiteres Element des Gewebeaustauschs scheint die Autophagozytose darzustellen. Der Prozess bezeichnet den Abbau und die Verwertung eigener Zellbestandteile wie z.B. fehlgefalteter Proteine (Indrakusuma et al. 2015). Während das Inflammasom vor allem im Fettgewebe wirksam sein soll, scheint die Autophagie die Wechselbeziehungen in Muskel- und Fettgewebe zu beeinflussen. Schließlich sollen auch zirkulierende microRNAs als eine Klasse kleiner, nicht-kodierender RNAs die vielschichtigen Möglichkeiten der zellulären Interaktion der Organe

ergänzen. Sie können erstens die Genexpressionsprofile in entfernten Organen ändern, zweitens die Expression anderer beteiligter Moleküle regulieren oder drittens selbst von anderen Proteinen gesteuert werden (Indrakusuma et al. 2015). All diese Ergebnisse unterstreichen die Komplexität der Signalvermittlung zwischen Muskel- und Fettgewebe, da sowohl sezernierte Faktoren, Zell-Zell-Kontakte, als auch intrazelluläre Organellen und Vorgänge daran beteiligt sein können.

2.3.1 Adipokine

Das Fettgewebe reagiert nicht nur auf eingehende Signale des Hormon- und Nervensystems, es exprimiert und sezerniert auch hormonähnliche Faktoren mit wichtigen endokrinen Aufgaben. Zu ihnen gehören z.B. Leptin (*LEP*), Adiponectin (*ADIPOQ*), Tumor necrosis factor alpha (*TNFA*), Interleukin-6 (*IL6*), C-C motif chemokine-2 (*CCL2*), Serpin peptidase inhibitor, clade F, member 1 (*SERPINF1*), Complement factor D (*CFD*), Proteine des Renin-Angiotensin-Systems und Resistin (*RETN*) (Kershaw & Flier 2004). Mit der Entdeckung von Adipsin (*CFD*) wurde das Fettgewebe im Jahr 1987 erstmalig als Quelle von sezernierten Signalmolekülen beschrieben (Cook et al. 1987, Flier et al. 1987). Das größte sekretorische Potenzial hat der weiße Adipozyt selbst. Reife Adipozyten sind unilokuläre Zellen, die einen einzigen großen Lipidtropfen enthalten, der den Zellkern an den Rand der Plasmamembran drückt. Sie erreichen durchschnittlich eine Größe von 25-200 µm (Hassan et al. 2012). Solche bioaktiven Moleküle, die direkt von den Adipozyten produziert und freigesetzt werden, werden als Adipokine definiert. Viele sezernierte Proteine entstammen allerdings der nicht-adipozytären Fraktion des Fettgewebes (Fain et al. 2004). Diese sind im eigentlichen Sinne keine Adipokine, werden jedoch trotzdem oft als solche bezeichnet (Trayhurn et al. 2011). Das Fettgewebe ist demzufolge kein homogenes endokrines Organ, sondern eine Gruppe von Geweben mit bestimmten Gemeinsamkeiten und einzigartigen Eigenschaften entsprechend der anatomischen Herkunft (Kershaw & Flier 2004, Yamamoto et al. 2010). Jedes Fettdepot hat sein individuelles Adipokinprofil, welches je nach zellulärer Zusammensetzung und Ernährungszustand variiert (Ouchi et al. 2011). Eine Fehlsteuerung der Produktion von Adipokinen und freien Fettsäuren leistet einen entscheidenden Beitrag zur Entstehung von Stoffwechselerkrankungen, wie Typ-2-Diabetes. Die Veränderungen jedes einzelnen Adipokins sind das Ergebnis eines koordinierten Ablaufs von spezifischen transkriptionellen Programmen, die ganze Gruppen von adipozytären Genprodukten steuern. Ebenso verantwortlich sind posttranslationale Mechanismen, die die Ausschüttung von speziellen Proteinen unterschiedlich beeinflussen (Deng & Scherer 2010). Das Fettgewebe ist damit ein Schlüsselorgan zur Regulation des Energieausgleichs und der Ernährungshomöostase. Das verdeutlichen die beiden klassischen Vertreter Adiponectin und Leptin. Das Adipokin Leptin wurde 1994 identifiziert und charakterisiert und wird proportional

zur totalen Fettgewebssmasse in die Zirkulation abgegeben (Zhang et al. 1994, Considine et al. 1996). Es moduliert die Nahrungsaufnahme über das zentrale Nervensystem, indem es hungerauslösende Proteine supprimiert und appetithemmende Faktoren hochreguliert. Ein Leptinmangel oder eine –resistenz verursachen Hyperphagie, Adipositas, Diabetes, neuroendokrine Störungen und eine Dysfunktion des Immunsystems (Friedman & Halaas 1998). Adiponectin ist eines der wirksamsten Moleküle hinsichtlich seiner Aktivität bei der Insulinsensibilisierung. Es hat eine günstige Wirkung auf den gesamten Metabolismus und tiefgreifende protektive Effekte gegen viele metabolische und kardiovaskuläre Erkrankungen. Die Adiponectinspiegel in der Blutzirkulation zeigen eine inverse Korrelation mit dem BMI (zusammengefasst in Esfahani et al. 2015). Menschen mit einem geringen Level an Adiponectin neigen also vermehrt dazu, am metabolischen Syndrom zu erkranken (Kondo et al. 2002). Die große Bedeutung der endokrinen Funktion des Fettgewebes wird zudem durch die gesundheitsgefährdenden metabolischen Konsequenzen von Fettsucht und Fettmangel deutlich. Übergewicht, speziell im viszeralen Bereich, hat ein Ungleichgewicht des Adipokinprofils zur Folge und wird deshalb mit Insulinresistenz, Hyperglykämie, Dyslipidämie, Bluthochdruck und weiteren entzündlichen Zuständen in Verbindung gebracht (Kershaw & Flier 2004, Deng & Scherer 2010). Die Prävalenz von Fettleibigkeit und den eben genannten Begleitkrankheiten, die das metabolische Syndrom kennzeichnen, hat bereits epidemische Ausmaße angenommen (O'Neill & O'Driscoll 2015). Interessanterweise wird der Mangel an Fettgewebe bei Menschen und Nagern, wie er bei Lipodystrophie- bzw. Lipoatrophie-Syndromen auftritt, gleichermaßen mit Insulinresistenz und Hypertriglyceridämie assoziiert (Arioglu et al. 2000). Ein tieferer Einblick in das gesamte Proteom und Sekretom würde demnach zum besseren Verständnis der endokrinen Funktion des Fettgewebes führen und neue Ansätze für die Therapie von zahlreichen Stoffwechselkrankheiten bieten. Die Charakterisierung des Fettgewebssekretoms gestaltet sich jedoch als große Herausforderung. Die oft geringen Konzentrationen der Adipokine (ng/ml) und die Kontamination mit Fremdproteinen während der Probennahme und Zellkultur beeinträchtigen die Qualität der Probe und machen eine zuverlässige Analyse sehr schwer (Alvarez-Llamas et al. 2007). Die Anzahl der neu entdeckten Adipokine steigt trotzdem stetig an. Bisher wurden über 600 Adipokine beschrieben, die u.a. in die physiologische Kontrolle der Nahrungsaufnahme, Energiehomöostase, Reproduktion, Inflammation und des Zellwachstums involviert sind (Lehr et al. 2012b, Ouchi et al. 2011). Trotz der weitreichenden physiologischen Effekte der Adipokine findet bisher nur Leptin Anwendung als Therapeutikum (Quarta et al. 2016). Das liegt einerseits daran, dass viele dieser Faktoren erst kürzlich entdeckt worden sind und reflektiert andererseits ihre überwiegend komplexe Wirkungsweise.

Adipokine modulieren auch bei Nutztieren zahlreiche biologische Funktionen wie den Energiestoffwechsel und die Immunantwort (Baik et al. 2014, Kang et al. 2015). Bei Wiederkäuern ist Leptin das am besten untersuchte Adipokin. Die Leptinplasmaspiegel werden kurz-, mittel- und langfristig von Futteraufnahme, Nährstoffen, Hormonen, Energiebalance und Umweltfaktoren reguliert. Auch die frühere Nährstoffversorgung scheint sich auf den gegenwärtigen Zustand der Leptinantwort auszuwirken. Der Körperfettanteil als Schlüsselfaktor spiegelt demnach die nutritive Vergangenheit wider (Chilliard et al. 2005). Das Gesamtfettgewebe von Rindern scheint positiv mit der Leptinkonzentration im Plasma zu korrelieren. Es existieren darüber hinaus Hinweise, dass die Leptinregulation von Insulin und insulinähnlichen Wachstumsfaktoren beeinflusst wird, aber die direkten molekularen Wirkungsmechanismen bleiben weiterhin unklar (Roh et al. 2016). Mit dem Agouti-signaling protein (*ASIP*) wurde 2012 ein weiteres Protein als putatives Adipokin in Rindern postuliert, welches ursprünglich vorwiegend mit der Pigmentierung von Haut und Haaren in Zusammenhang gebracht wurde (Albrecht et al. 2012). Die mRNA-Expressionsunterschiede im IMF verschiedener Rinderrassen konnten in der eigenen Arbeitsgruppe auf das Vorhandensein eines spezifischen Transkripts zurückgeführt werden. Weiterhin konnte die Proteinsekretion und die zelluläre Lokalisation von ASIP in bovinen Fettdepots gezeigt werden. Es wurde allerdings kein klarer Zusammenhang zwischen Genexpression und Proteinmenge von ASIP festgestellt. Über die Wirkung des Proteins in der Peripherie sind momentan noch keine Aussagen möglich. Dass das Wissen über die Wirkung von Adipokinen in Wiederkäuern allgemein sehr limitiert ist, zeigt eine aktuelle Übersichtsarbeit von Roh et al. 2016. Sie führt für das Rind lediglich vier näher charakterisierte Adipokine auf (Roh et al. 2016).

2.3.2 Myokine

Zahlreiche publizierte Arbeiten der letzten 15 Jahre weisen darauf hin, dass es sich beim Skelettmuskel auch um ein sekretorisches Organ handelt. Myostatin (*MSTN*), ein Mitglied der Transforming growth factor beta (*TGFB*)-Familie, welches das Muskelwachstum hemmt, war das erste beschriebene Myokin in einer murinen Studie (McPherron et al. 1997). In Rindern existieren genetische Varianten von *MSTN*, die Körperzusammensetzung und Fleischqualität stark beeinflussen (McPherron & Lee 1997, Grobet et al. 1998). Mutationen in der kodierenden Sequenz des Gens führen im Skelettmuskel zur Doppellendigkeit bei Weißblauen Belgiern und Piemontesern (McPherron & Lee 1997).

Im Jahr 2000 entdeckten Steensberg et al. erstmalig, dass die menschliche Skelettmuskulatur signifikante Mengen an IL6 sezerniert. Nach Muskelkontraktion wird IL6 in die Zirkulation abgegeben, wobei die Menge von Trainingsintensität und -dauer abhängig ist. Außerdem stellen der Energiestatus des Muskels und der Ausgangsglykogengehalt

entscheidende Determinanten dar (Steensberg et al. 2001). Seitdem gilt *IL6* als Myokin-Prototyp. Es ist das meist untersuchte Myokin, wird während einer akuten Trainingsphase extrem hochreguliert und soll eine Schlüsselrolle in der anti-entzündlichen Wirkung von akuter Belastung spielen (Pedersen & Febbraio 2012). Zytokine und andere Peptide, die von Skelettmuskelfasern exprimiert und freigesetzt werden und entweder auto-, para- oder endokrine Wirkungen entfalten, werden als „Myokine“ klassifiziert (Pedersen et al. 2007). Der Terminus wird allerdings ausschließlich für die Proteine benutzt, die von Skelettmuskelzellen ausgeschüttet werden. Hormonelle Faktoren, die von anderen Zelltypen des Skelettmuskelgewebes sezerniert werden oder nur auf mRNA-Ebene beschrieben sind, werden nicht als Myokine bezeichnet (Trayhurn et al. 2011). Vor allem Bewegungsreize sollen deren Produktion induzieren und bemerkenswerte Einflüsse auf das Immunsystem haben (Pedersen & Hoffmann-Goetz 2000, Pedersen et al. 2001). Das gesamte Skelettmuskelsekretom besteht aus einigen Hundert von solchen sezernierten Peptiden, die als Teil eines komplexen Kommunikationsnetzwerkes im Organismus gelten. Diese Erkenntnisse bieten eine Basis und ein ganz neues Paradigma für das Verständnis des Informationsaustauschs von Muskeln mit anderen Organen, wie z.B. mit dem Fettgewebe, Gehirn und der Leber. Hormonelle Veränderungen durch Myokine können metabolische Auswirkungen auf andere Gewebe haben. Es gibt jedoch auch Myokine, die nur lokale Effekte innerhalb des Muskels ausüben. Viele Muskelproteine werden kontraktionsabhängig ausgeschüttet und zumindest teilweise für die positive Wirkung von physischer Aktivität verantwortlich gemacht (Eckardt et al. 2014). Es wurden bereits humane Muskelzellkulturmodelle entwickelt, in denen mit elektrischen Impulsen die Kontraktion anregt wird (Lambernd et al. 2012, Nikolic et al. 2012). Diese Modelle sind exzellent dazu geeignet, kontraktionsinduzierte Myokine zu erforschen. Sie sollen vor chronisch-entzündlichen Krankheiten wie z.B. Typ-2-Diabetes, Insulinresistenz und dem metabolischen Syndrom schützen. *IL6* und *IL8* werden beispielsweise durch konzentrische Muskelkontraktionen auf mRNA- und Proteinebene reguliert (Febbraio & Pedersen 2002, Chan et al. 2004). Nielsen et al. (2007) konnten zeigen, dass auch die Genexpression von *IL15* durch Krafttraining beeinflusst wird. Es waren aber keine Veränderungen im Proteingehalt des Skelettmuskels oder im Plasma festzustellen. Außerdem sind Trainingsdauer, Intensität, Trainingszustand und Gesundheitsstatus limitierende Faktoren der Genexpression dieses Myokins (Görgens et al. 2015). Schon ein Bewegungszyklus kann zum Auftreten von Interleukinen in der Zirkulation führen (Febbraio & Pedersen 2002, Petersen & Pedersen 2005). Die Freisetzung von z.B. TNFA stieg jedoch erst nach intensivem Training an, wahrscheinlich in Folge von Muskelzerstörung (Pedersen et al. 2007). Diese initiale Entzündungsreaktion ist erforderlich für den Regenerations- und Reparatursprozess des Muskels, um einen positiven Effekt auf die Muskelentwicklung zu

erzielen (Paulsen et al. 2012). Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass Myokine einen Beitrag zu der Vermittlung der gesundheitsfördernden Wirkung von Bewegung leisten. Die Identifizierung des Skelettmuskels als Zytokin-produzierendes Organ führte zu der Annahme, dass Faktoren, die vom Muskel stammen, nicht nur bewegungsassoziierte Änderungen der Immunantwort hervorrufen, sondern auch eine Rolle als Mediatoren dieser Immunreaktion einnehmen (Pedersen et al. 2007). Wenn der Skelettmuskel nicht durch Kontraktionen beansprucht wird, hat das eine eingeschränkte Funktion anderer Organe zur Folge (Pedersen & Febbraio 2008). Pedersen und Febbraio (2012) postulieren, dass die protektiven Effekte von körperlicher Bewegung durch die Sekretion von Myokinen vermittelt werden, die den gefährlichen Effekten der proinflammatorischen Adipokine entgegenwirken. Obwohl mehrere Hundert Myokine schon in Proteomstudien beschrieben wurden, bleibt der Wissensstand über deren Regulation oder spezifische biologische Funktion gegenwärtig noch limitiert.

Erst kürzlich haben neue Myokine, wie z.B. Irisin, von dem angenommen wird, dass es weiße Fettzellen in braune Fettzellen umwandeln kann und somit zum Gewichtsverlust beiträgt, bemerkenswertes Interesse als potentielle therapeutische Faktoren erlangt. Im Skelettmuskel eines transgenen Mausmodells haben Boström et al. (2012) eine erhöhte mRNA-Menge des transmembranen Vorläuferproteins Fibronectin type III domain containing 5 (*Fndc5*) beobachtet. Daraufhin stellten sie die These auf, dass der extrazelluläre Teil des Proteins proteolytisch abgespalten wird, um als zirkulierendes Peptid mit dem Namen Irisin freigesetzt und biologisch aktiv zu werden. Unterstützend dazu wurden Western Blot Analysen dargestellt, die hohe Mengen an zirkulierendem Irisin in Menschen und Mäusen nach körperlicher Belastung zeigten. Diese Ergebnisse lösten eine kontroverse Debatte über die Relevanz von Irisin im Fettstoffwechsel und die Spezifität der verfügbaren enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) aus. Die ersten Zweifel an der Richtigkeit der These äußerten Timmons et al. (2012), die keinen Anstieg der humanen mRNA-Expression von *FNDC5* nach verschiedenen Trainingseinheiten feststellen konnten. Weiterhin besitzt das humane *FNDC5* ein mutiertes Start-Codon und der Antikörper, der in der Ausgangsstudie genutzt wurde, ist gar nicht geeignet, um Irisin zu detektieren, weil er an den nicht-sezernierten Part von *FNDC5* bindet (Raschke et al. 2013a, Erickson 2013). Zudem stützte sich der Beweis für im Blut zirkulierendes Irisin in den zahlreich publizierten Arbeiten größtenteils auf kommerziell angebotene ELISA Kits, deren Antikörper stark unspezifische Bindungen im Western Blot zeigten (zusammengefasst in Albrecht et al. 2015). Ob Irisin also tatsächlich therapeutisches Potenzial für den Menschen hat, ist weiterhin nicht eindeutig geklärt.

Das Verständnis der physiologischen Regulationskaskaden von Hormonen, die von endokrinen Organen freigesetzt werden, ist entscheidend für die Optimierung der

Tiergesundheit und -produktion. Die Futterraufnahme und die Nährstoffverwertung werden wahrscheinlich stark von einigen Zytokingruppen kontrolliert (Roh et al. 2016). Während der Forschungen rund um Irisin wurde auch die Muskelmasse als Hauptprädiktor für die Menge des zirkulierenden Moleküls genannt (Huh et al. 2012, Stengel et al. 2013). Dieses Ergebnis hat *FNDC5* und sein vermeintliches Spaltprodukt Irisin für Untersuchungen in fleischproduzierenden landwirtschaftlichen Nutztieren prädestiniert. Es konnten allerdings keine Zusammenhänge zwischen der *FNDC5*-Expression und des Muskelansatzes in Rindern gefunden werden, obwohl auch hier mehrere Transkriptvarianten des Gens existieren. Weder *FNDC5* noch Irisin konnten im bovinen Plasma nachgewiesen werden (Komolka et al. 2014b). Lediglich im Muskel und Plasma von Mäusen wurde Irisin erfolgreich detektiert (Brenmoehl et al. 2014).

Die positiven Effekte der Myokine auf die Aufrechterhaltung der Homöostase von Nagern und Menschen sind gut belegt. In der Nutztierforschung gibt es kaum Studien über deren physiologische Wirkung, daher besteht hier weiterer Forschungsbedarf. Der Energiemetabolismus von Wiederkäuern hat einen erheblichen Einfluss auf ökonomische Eigenschaften sowie den Fleischansatz in Fleischrindern. In einer aktuellen Übersichtsarbeit von Roh et al. 2016 wird deutlich, dass die Kenntnisse zu Myokinen - von Myostatin abgesehen - bisher nur aus der Grundlagenforschung an Mäusen und aus der Humanmedizin stammen.

2.3.3 Adipo-Myokine

Es existieren auch Faktoren, die von beiden Geweben produziert und sezerniert werden (Raschke & Eckel 2013). Solche Adipo-Myokine können andere Organe ebenfalls auf parakrine oder autokrine Weise beeinflussen. Sie haben außerdem endokrine Effekte und stellen Mediatoren der bidirektionalen Gewebekommunikation dar. Die Genexpression der Adipo-Myokine ändert sich bei Übergewicht oder nach körperlicher Anstrengung, was sich wiederum auf zirkulierende Mengen und die Wechselbeziehung zwischen Fett- und Muskelgewebe auswirkt. Die Produktion vieler Adipo-Myokine wird durch Training induziert und beeinflusst. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass sie einen Beitrag zur Vermittlung der gesundheitsfördernden Effekte von sportlicher Betätigung leisten. Physische Inaktivität hingegen führt zu einem veränderten Adipo-Myokin-Profil, welches einen möglichen Ansatz für den Zusammenhang von sitzenden Tätigkeiten und vielen chronischen Krankheiten bieten könnte (Raschke & Eckel 2013). Bisher sind nur wenige Informationen über die direkten physiologischen Effekte der Adipo-Myokine verfügbar.

IL6 ist ein gutes Beispiel für ein Adipo-Myokin, welches von Skelettmuskel- und Fettgewebe ausgeschüttet wird und somit einen potentiellen Effekt auf beide Organe hat. Es agiert in auto- bzw. parakriner Art und Weise innerhalb des Skelettmuskels und endokrin in

hormonähnlicher Art, um metabolische und anti-inflammatorische Effekte zu vermitteln (Pedersen 2013). Der Spiegel an zirkulierendem IL6 steigt nach einmaliger physischer Anstrengung exponentiell an (Steensberg et al. 2000, Nieman et al. 1998, Starkie et al. 2001) und sinkt in der Zeit danach wieder (Steensberg et al. 2001). Eigentlich korreliert die quantitative Freisetzung von IL6 aus dem Fettgewebe positiv mit einem erhöhten Körperfettgehalt. Das spiegelt sich in einer systemischen Steigerung der IL6-Plasmalevel wider (Vozarova et al. 2001). Das Zytokin ist in humanen Fettzellen von insulinresistenten Probanden überexprimiert (Rotter et al. 2003) und mit Typ-2-Diabetes assoziiert (Vozarova et al. 2001, Bastard et al. 2002). Daher scheint es paradox, dass *IL6* auch nach körperlicher Betätigung ansteigen soll, obwohl angenommen wird, dass physisches Training die Insulinsensitivität steigert. Die Regulation der intrazellulären Signalwege, die die *IL6*-Expression in kontrahierenden Muskelzellen vermitteln, soll von den klassischen proinflammatorischen Signalwegen abweichen (Whitham et al. 2012). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass das Myokin *IL6* wichtig für den Metabolismus des Skelettmuskels während der Kontraktion ist, wohingegen die chronische Erhöhung des Adipokins *IL6* die muskuläre Insulinresistenz induzieren könnte. Darüber hinaus weisen Weigert et al. (2005) darauf hin, dass die *IL6*-Wirkung vom Zielgewebe abhängt. In energieliefernden Geweben, wie dem Fettgewebe und der Leber, ist die Insulinantwort abgeschwächt, in energieverbrauchenden Geweben hingegen verbessert. Das Ausmaß des *IL6*-Anstiegs hängt zudem von Sportart, Trainingsdauer, Intensität und den beanspruchten Muskeln ab, wird jedoch nicht von Muskelschädigung beeinflusst.

Neben den gut charakterisierten Adipo-Myokinen *IL6* und *IL15* wurden in den letzten Jahren einige neue Faktoren identifiziert, wie Follistatin-related protein 1 (*FSTL1*), Plasminogen activator inhibitor 1 (*PAI1*), Apelin (*APLN*) und Fibroblast growth factor 21 (*FGF21*) (Raschke & Eckel 2013). Sogar Myostatin gilt heute als Adipo-Myokin. Schon seit 2002 wird es als wichtiges Verbindungsmolekül zwischen Skelettmuskel- und Fettgewebe betrachtet, weil festgestellt wurde, dass Tiere mit einem Myostatinmangel neben einem vermehrten Muskelwachstum auch eine verminderte Körperfettansammlung aufwiesen (McPherron & Lee 2002). Es könnten dementsprechend viel mehr solcher hormoneller Faktoren eine bisher unterschätzte Funktion in der Kommunikation beider Gewebe einnehmen. Adipo-Myokine sollen zudem eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Skelettmuskel-Fett-Verhältnisses einnehmen.

2.4 Zielsetzung

Sowohl Fett- als auch Skelettmuskelgewebe werden seit einiger Zeit als wichtige endokrine Organe betrachtet. Die von ihren Zellen gebildeten und sezernierten Proteine, die sogenannten Adipo- bzw. Myokine, können auto-, para- und endokrine Wirkungen entfalten. Mehrere Hundert solcher hormoneller Faktoren konnten bereits in zahlreichen Experimenten mit humanen und murinen Zellkulturen identifiziert werden. Ihre physiologische Funktion ist allerdings nur in sehr wenigen Fällen bekannt. Erkenntnisse beim Rind sind diesbezüglich kaum vorhanden. Die vorliegende Arbeit verfolgte daher das Ziel, neue genetische Faktoren zu identifizieren, die den Muskel- und Fettstoffwechsel von Mensch, Modelltieren und Rindern beeinflussen. Dazu wurde eine spezieübergreifende Datenanalyse vorgenommen. Dabei wurde die zentrale Hypothese aufgestellt, dass über eine umfassende Auswertung von Transkriptom- und Sekretomdaten neue potentielle Adipokin- und Myokinkandidaten identifiziert werden können. Ausgewählte Kandidatengene, die für die Produktqualität und Tiergesundheit beim Rind von Bedeutung sein könnten, sollten initial charakterisiert werden. Durch die Etablierung von Zellkulturmodellen sollten zusätzlich methodische Voraussetzungen geschaffen werden, um den Einfluss ausgewählter Zytokine auf das Wachstums- und Differenzierungsverhalten in bovinen Primärzellen zu untersuchen. Die Arbeit leistet somit einen Beitrag zur Aufklärung der Ursachen der Variabilität der bovinen Schlachtkörperzusammensetzung. Außerdem trägt sie dazu bei, neue Biomarker für die züchterische Selektion zu entwickeln, um die Fleischqualität von Nutztieren weiter zu optimieren.

3 Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

3.1.1 Rinder aus einer experimentellen F₂-Kreuzung

Für die Untersuchungen standen Proben und Daten von 248 Bullen der F₂-Generation einer Kreuzung aus der Fleischrindrasse Charolais (CH) und der Milchrindrasse Deutsche Holstein (HS) zur Verfügung (Kühn et al. 2002). Sie entstammen einer Rinderpopulation aus einem Langzeitexperiment zur Erforschung der Merkmalsausprägung in segregierenden Familienstrukturen (SEGFAM). Diese F₂-Nachkommen zeichnen sich durch eine hohe Variabilität im IMF-Gehalt und einen gut definierten genetischen Hintergrund aus. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten, im Alter von 18 Monaten geschlachtet und umfangreich phänotypisiert (Pfuhl et al. 2007, Hoehne et al. 2012). Von je zehn Tieren mit erhöhtem IMF-Gehalt (6,8±2,4 %) oder niedrigem IMF-Gehalt (1,7±0,4 %) wurden vergleichende Expressionsprofile der isolierten RNA des Skelettmuskels mit dem GeneChip® Bovine Genome Array (Affymetrix, Santa Clara, USA) erstellt (Kamolka et al. 2015). Die Expressionshöhe der Transkripte wurde für weitere Analysen herangezogen.

3.1.2 Rinderrassen mit differenter IMF-Akkumulation

Um die Fähigkeit verschiedener Rinderrassen zur Fetteinlagerung im Skelettmuskel vergleichen zu können, wurden je sechs Ochsen der Rassen Japanese Black (JB, Wagyu), HS sowie CH ab dem Alter von zehn Monaten mit einer hochenergetischen Diät gefüttert. Die Tiere wurden nach 26 Monaten unter gleichen Haltungsbedingungen geschlachtet (Albrecht et al. 2011a). Gewebeproben aus dem Musculus longissimus dorsi (MLD), subkutanen Fett (SCF) und intramuskulären Fett (IMF) wurden entnommen, sofort schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert (Albrecht et al. 2011a). Die Erstellung vergleichender Expressionsprofile der isolierten RNA des MLD und des SCF erfolgte von je drei Tieren (Albrecht et al. 2015). Um das Transkriptom des IMF zu untersuchen, wurde die RNA von sechs JB-Ochsen und drei HS-Ochsen isoliert und mit dem GeneChip® Bovine Genome Array (Affymetrix) hybridisiert. Diese Daten flossen ebenfalls in die eigenen Analysen ein.

3.1.3 Gewebe für molekularbiologische und proteinbiochemische Analysen

Von allen 248 Bullen der F₂-Generation des SEGFAM-Experiments wurden MLD-, SCF- und Leberproben gewonnen, schockgefroren und bis zum weiteren Gebrauch in Flüssigstickstoff verwahrt. Für die eigenen Untersuchungen wurden hauptsächlich die Gewebeproben der Bullen mit hohem und niedrigem IMF-Gehalt genutzt, deren RNA auch für die Erstellung des Arrays verwendet wurde.

3.1.4 Zelllinie

Für die Untersuchungen zur adipogenen Differenzierung wurde die murine Präadipozyten-Zelllinie 3T3-L1 von ATCC (LGC Standards, Wesel, Deutschland) verwendet.

3.1.5 Primäre bovine Zellen

3.1.5.1 Isolierung von stromavaskulären Zellen

Bei regulär durchgeführten Schlachtungen im Versuchsschlachthaus des FBN Dummerstorf wurde SCF aus der MLD-Region von Rindern entnommen und in raumwarmem Entnahmemedium ins Zelllabor transportiert. Alle nachfolgenden Arbeiten zur Zellisolierung und -kultivierung erfolgten unter streng sterilen Bedingungen. Zunächst wurde das Fettgewebe mit PBS-D+10 % Penicillin/Streptomycin (1000 IU/ml Penicillin, 1 mg/ml Streptomycin) gewaschen und von sichtbarem Fremdgewebe befreit. Mittels Scheren und/oder Skalpell wurde das SCF in kleine Stücke geschnitten und in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Um die stromavaskulären Zellen aus dem Gewebeverband herauszulösen, erfolgte ein enzymatischer Verdau mit einer Collagenase I-Lösung in Verdauungsmedium (siehe Anhang B) für 1 h bei 37 °C im Wasserbad unter ständigem Schütteln. Es wurden 2 ml Verdauungsmedium je g Gewebe eingesetzt, wobei 1 ml Medium 2 mg Collagenase I enthielt. Nach Abschluss des Gewebeverdaus wurde die Suspension in einen Erlenmeyerkolben überführt und mit dem fünffachen Volumen an Post-Verdauungsmedium (siehe Anhang B) verdünnt. Danach erfolgte die Filtration der Suspension durch einen 180 µm Nylon-Netzfilter. Das gewonnene Filtrat wurde dann bei 300×g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, bestehend aus reifen Adipozyten, wurde verworfen. Das Pellet, welches die stromavaskulären Zellen enthält, wurde mit Kulturmedium (siehe Anhang B) versetzt und darin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nun durch einen Nylon-Netzfilter mit einer Maschenweite von 30 µm gefiltert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 300×g für 10 min bei 4 °C. Nachdem das Pellet wieder in Kulturmedium aufgenommen wurde, erfolgte die Einsaat der Zellen mit einer Dichte von ca. 1×10^5 Zellen/cm² in Kulturmedium auf unbeschichteten 10 mm-Zellkulturschalen. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert (37 °C, 6 % CO₂, 90 % Luftfeuchte). Nach 24 h wurden die adhärenen Zellen mit PBS-D+10 % Penicillin/Streptomycin (1000 IU/ml Penicillin, 1 mg/ml Streptomycin) gewaschen und mit frischem Kulturmedium versorgt. Nach einer Inkubationszeit von 48 oder 72 h erfolgte das Passagieren der Zellen mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/ 0,02 %) in PBS. Die passagierten Zellen proliferierten dann in Kulturmedium bis zu einer Konfluenz von 60-80 % und wurden anschließend wieder unter Verwendung der Trypsin/EDTA-Lösung geerntet. Die Zellzahl und der Anteil der vitalen Zellen wurden mittels Invitrogen™ Countess™ automated cell counter bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen in Aliquots (1 ml) mit einer Zellzahl von $0,5-1,0 \times 10^6$

Zellen/ml in Einfriermedium bestehend aus Kulturmedium mit 30 % fötalem Kälberserum (FKS) und 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.1.5.2 Isolierung von bovinen Satellitenzellen

Die Isolierung der bovinen Satellitenzellen erfolgte aus dem Skelettmuskelgewebe des linken Vorderbeins eines Fötus der Rasse HS im Alter von 135 Tagen. Aufgrund der kleinen Gewebemenge (9,74 g) wurde kein spezieller Muskel für die Zellisolierung entnommen. Das Gewebe wurde zunächst in PBS gegeben und dort mit Scheren zerkleinert. Im Anschluss wurden die Zellen unter Verwendung von 0,3 % Trypsin in PBS für 1 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad enzymatisch aufgeschlossen. Der Verdau wurde mit 20 % FKS gestoppt. Danach wurde die Zellsuspension in drei Durchgängen durch sterile Nygonsiebe gefiltert (2×60 µm, 1×20 µm Maschenweite), 1:1 mit PBS verdünnt und bei 250×g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und die Zellzahl wurde mit dem Invitrogen™ Countess™ automated cell counter nach Trypanblau-Färbung bestimmt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen wiederholt resuspendiert und mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/cm² auf 100-mm Primaria Zellkulturschalen mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ergänzt mit 4 mmol/l Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % FKS eingesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen (37 °C, 6 % CO₂, 90 % Luftfeuchte). Nach 24 h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und neues Medium hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 48 h wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %) in PBS geerntet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen nach der Zellzahlbestimmung mit dem Invitrogen™ Countess™ automated cell counter in Aliquots (2,0 ml) mit $1,08 \times 10^6$ Zellen/ml in Einfriermedium aus Kulturmedium, 20 % FKS und 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.5.3 Gewinnung von Fettgewebe für Explant-Kulturen

Die bovinen Fettexplants wurden aus dem SCF eines Ochsen der Rasse JB im Alter von 37 Monaten gewonnen. Während der Schlachtung im Versuchsschlachthaus des FBN Dummerstorf wurde dafür zunächst Fettgewebe aus der MLD-Region entnommen und in Entnahmemedium ins Zellkulturlabor transportiert. Das Gewebe wurde dann gründlich mit PBS-D+1000 IU/ml Penicillin+1000 µg/ml Streptomycin gewaschen. Anschließend wurde das SCF manuell mit der Schere und/oder Skalpell zu kleinsten Fettstückchen (Explants) mit einer Größe von ca. 1-2 mm³ zerkleinert. Die Fettexplant-Kulturen wurden für maximal 48 h inkubiert (siehe Abschnitt 3.2.4.4) und deren RNA zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert (siehe Abschnitt 3.2.3.1).

3.1.6 Chemikalien, Puffer, Verbrauchsmaterialien, Software und Geräte

Die in den Versuchen verwendeten Geräte und Software sowie eingesetzte Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind im Anhang A (Tab. S1 und S2) aufgelistet. Hergestellte Lösungen, Medien, Zusätze und Testsubstanzen sind im Anhang B aufgeführt. Die genutzten Antikörper und Reinigungs- bzw. Detektions-Kits hingegen werden zum besseren Verständnis bereits im Methodenteil tabellarisch bzw. im Text unter Angabe des Herstellers und der eingesetzten Verdünnung genannt und erscheinen nicht im Anhang.

3.2 Methoden

3.2.1 Datenanalyse

Um speziesübergreifend neue Adipokine und Myokine zu identifizieren, wurde eine Auswertungsmatrix entworfen, in die die Expressionsdaten von unterschiedlichen murinen und bovinen Experimenten integriert wurden. Dieser Ansatz bietet die Möglichkeit, Daten zu kombinieren, die unter verschiedenen experimentellen Rahmenbedingungen generiert wurden (Schering et al. 2015). Damit diese heterogenen Daten vereint werden konnten, wurden die einzelnen Datensätze zunächst separat analysiert und vorerst unabhängig vom P-Wert nach different exprimierten Genen gefiltert. Ein Array enthält häufig „probe sets“, die verschiedene Transkripte und Varianten eines Gens repräsentieren. Allen sogenannten probe sets wurde ein gemeinsamer Identifikator zugeordnet. Details zum Algorithmus und den verwendeten Identifikatoren sind Schering et al. (2015) zu entnehmen. Infolgedessen wurden probe sets ohne eindeutigen Identifikator von weiteren Analysen ausgeschlossen. Um den speziesübergreifenden Vergleich der Expressionsprofile zu gewährleisten, wurden den verbleibenden probe sets HomoloGene IDs (HID; HomoloGene database NCBI) zugewiesen. Dadurch wurden erneut diejenigen probe sets ohne HID nicht für die weitere Datenverarbeitung verwendet. Bevor die nun vergleichbar gemachten Daten in eine gemeinsame Matrix einbezogen werden konnten, wurden die individuellen Datensätze nach signifikanten Expressionsunterschieden ($P < 0,05$) mit Hilfe des t-Tests gefiltert. Nicht-signifikante Datensätze wurden aus der Matrix entfernt. Jedes Array-Experiment mit signifikant unterschiedlicher Expression eines Gens erhielt einen Score von 1. Entsprechend der Anzahl der einbezogenen Experimente war der höchstmögliche Score für die Myokine 9 und für die Adipokine 8. Die humanen Daten wurden erst auf der Ebene der Proteinsekretion integriert. Daten von primären humanen Adipozyten und Skelettmuskelzellen wurden in die Matrix einbezogen, um sezernierte Faktoren zu identifizieren. Am Ende enthielt die generierte Matrix für beide Gewebe sowohl die Expressionsprofile von Mäusen und Rindern aus verschiedenen Versuchsanordnungen als auch das Sekretom von humanen Primärzellen entsprechend den Abbildungen A1 und A2 (Anhang A).

Mit einigen aus der Datenanalyse hervorgegangenen Kandidatengenomen wurden weiterführend vergleichende Genexpressionsanalysen in den Skelettmuskel- und Fettgewebsproben der IMF-differenzierten Bullen mittels Echtzeit-PCR (RT-qPCR) (siehe Abschnitt 3.2.3.9) durchgeführt. Diese Kandidaten wurden aus unterschiedlichen Gründen ausgewählt, die im Ergebnisteil (Abschnitt 4.2) kurz genannt und in der Diskussion (Abschnitt 5.2) erläutert werden.

Zielgene mit einem Score ≥ 5 wurden in einer Liste zusammengefasst und einer bioinformatischen Funktionsanalyse mittels Ingenuity Pathway Analyse (IPA) unterzogen.

3.2.2 Lasermikrodissektion

Um die zelltypspezifische Genexpression zu analysieren, wurden Muskelfasern und Fettzellen durch Lasermikrodissektion (laser capture microdissection, LCM) aus ungefärbten, dehydrierten Gewebeschnitten des MLD isoliert (Albrecht et al. 2011b). Hierfür wurden zunächst 12 μm dicke Serienschnitte von den Skelettmuskelproben am Kryostatmikrotom angefertigt. Ein Schnitt wurde als Kontrollschnitt genutzt, direkt in Lysepuffer überführt und eingefroren. Mehrere Serienschnitte wurden gleichzeitig auf einen PALM Membranobjektträger aufgetragen und kurz (10 s) angetrocknet. Die Objektträger wurden dann nacheinander je 30 s in 95 % Ethanol ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) und zweimal in frisches 100 % Ethanol (RT) getaucht. Am Ende des Dehydrierungsprozesses wurden die Objektträger in ein Gefäß mit Xylol gesetzt, vorsichtig auf und ab bewegt und dann für 5 min in ein zweites Gefäß mit Xylol gestellt. Abschließend wurden die Objektträger unter dem Abzug 5 min luftgetrocknet. Sie konnten nun für die LCM verwendet werden. Die Flächen aus Fettzellen und Muskelfasern wurden markiert und getrennt voneinander ausgeschnitten (Abb. 1). Für jede Probe wurden 100-300 Zellen in einem speziellen adhäsiven Deckel eines Reaktionsgefäßes gesammelt und in RLT-Puffer (RNeasy Micro Kit, Qiagen, Deutschland) gelöst, der entsprechend Herstellerangaben 20 ng Träger-RNA enthielt. Das Lysat wurde 30 s auf dem Vortex homogenisiert, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zum nächsten Verarbeitungsschritt bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

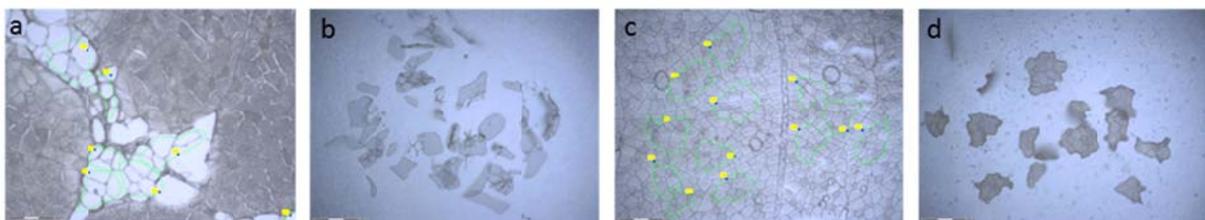


Abbildung 1. Markierte Flächen von Fettzellen (a) und Muskelfasern (c) für die LCM und die dazugehörigen gesammelten Ausschnitte (b, d)

3.2.3 Molekularbiologische Analysen

3.2.3.1 RNA-Isolierung

Um ein RNase-freies Arbeiten zu gewährleisten, wurden autoklavierte Verbrauchsmaterialien und Diethylpyrocarbonat versetztes Reinstwasser (DEPC-Wasser) verwendet. Außerdem wurden Pipetten und Pipettenspitzen benutzt, die ausschließlich für das Arbeiten mit RNA bestimmt sind.

Die Gesamt-RNA aus dem MLD wurde mittels QIAzol[®]-Lysereagenz und einer Chloroform-Isopropanol-Präzipitation nach Herstellerangaben isoliert. Dafür wurde das Probenmaterial im ersten Schritt eingewogen und mit dem Dispomix homogenisiert. Die extrahierte RNA jeder MLD-Probe wurde mit Hilfe des NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up-Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt.

Die RNA aus dem SCF, den primären bovinen Adipozyten, den Fettexplants und den 3T3-L1-Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Empfehlungen des Herstellers gewonnen und aufgereinigt. Für den Zellaufschluss des SCF wurde ein Polytron PT 1200 E verwendet. Die Isolierung und Aufreinigung von Leber-RNA erfolgte mit dem RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) wie vom Hersteller beschrieben. Im Fall der LCM-Proben wurden der RNeasy[®] Micro Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) und das RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Deutschland) laut Richtlinien des Herstellers für die Extraktion und Aufreinigung der RNA benutzt. Bis zum nächsten Verarbeitungsschritt wurden die RNA-Proben bei -80 °C gelagert.

3.2.3.2 Konzentrationsmessung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten und aufgereinigten RNA erfolgte am NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer. Die Reinheit der RNA wird dabei durch den Quotienten der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm angezeigt und soll idealerweise bei 2,0 liegen. Die Integrität der RNA wurde mit Hilfe des Experion[™] Automated Electrophoresis Systems und dem dazugehörigen RNA StdSens Analykit (Bio-Rad, München, Deutschland) bestimmt. RNA-Qualitätsindikator (RQI) Werte von >7 dokumentierten eine ausreichend gute RNA-Qualität.

3.2.3.3 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA aus der Leber wurde nach Standardprotokoll mit einer Proteinase K-Behandlung und anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen. Dafür wurden zuerst 700 µl Tris-Puffer in ein 2 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Dann wurden je Probe 30 mg Lebergewebe abgewogen und ebenfalls in das Gefäß gegeben. Zu den eingewogenen Gewebeproben wurden 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) pipettiert. Die Proben wurden über Nacht bei 55 °C und 750 rpm schüttelnd im Tmix Thermalmixer inkubiert. Am nächsten Tag

wurden sie mit 700 µl Phenol versetzt, 3 min über Kopf geschüttelt und 3 min bei 4 °C und 14000 rpm (20817×g) zentrifugiert. Die oberste Schicht wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß mit 700 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1, PCI) überführt, kopfüber 2 min lang geschüttelt und 3 min bei 4 °C bei 12000 rpm (15294×g) zentrifugiert. Erneut wurde die oberste wässrige Phase in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß mit 700 µl PCI gegeben und 2 min schüttelnd bewegt. Während einer 3-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 12000 rpm (15294×g) wurden 1000 µl 100 % Ethanol und 100 µl Natrium-Acetat (3 M, pH=6,0) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Die oberste wässrige Phase wurde dort hineingegeben und vorsichtig gemischt bis sich ein weißer Faden gebildet hatte. Dieser Faden wurde mittels Pipettenspitze in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml 70 % Ethanol überführt und gut geschüttelt. Nun wurde der Faden wieder abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und getrocknet. Nach Hinzufügen von 100-200 µl Tris-EDTA-Puffer wurden die Proben mehrere Tage in den Kühlschrank gestellt, damit sich die DNA lösen konnte. Die DNA-Konzentration wurde mittels NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer gemessen.

3.2.3.4 Proteinisolierung

Das Gesamtprotein wurde unter Verwendung des CellLytic MT Lysereagenz mit Protease-Inhibitor laut Herstellerangaben extrahiert. Im Verlauf der Arbeitsschritte wurden die bovinen Gewebeproben auf Eis gelagert. Zunächst mussten die Gewebeproben eingewogen und homogenisiert werden. Im Fall des Skelettmuskelgewebes und der Leber wurde dafür der Dispomix genutzt, das SCF wurde mit dem Polytron PT 1200 E zerkleinert. Die Gewebekomogenisate wurden anschließend bei 4 °C und 14000 rpm (20817×g) für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann jeweils in ein neues gekühltes Reaktionsgefäß überführt. Der Proteingehalt wurde mit dem Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer gegen bovines Serumalbumin (BSA) gemessen. Das isolierte Gewebeprotein wurde bei -80 °C eingefroren.

3.2.3.5 Proteinfractionierung

Die Zellfraktionierung wurde mit Hilfe des Nuclear/Cytosol Fractionation Kit (Promokine, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Das Probenmaterial wurde dafür zuerst eingewogen und mit 1 ml eiskaltem PBS und Protease Inhibitor Cocktail versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte auch hier entweder mit dem Dispomix oder mittels Polytron PT 1200 E. Alle weiteren Arbeitsschritte entsprachen den Richtlinien des Herstellers. Im Ergebnis wurden nukleare und zytosolische Fraktionen der Proteine eines Gewebes gewonnen. Die Proteinkonzentrationen der Zellfraktionen wurden mit dem Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer ermittelt. Die Extrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.3.6 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Um amplifiziert werden zu können, muss die mRNA der zu untersuchenden Gene zuerst in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben werden. Hierzu wird unter Verwendung von Oligo-dT-Primern und dNTPs aus einzelsträngiger RNA ein RNA-DNA-Hybridstrang mittels des Enzyms reverse Transkriptase synthetisiert.

Im ersten Schritt erfolgte die Einstellung der RNA-Konzentration auf 10 ng/µl durch Zugabe von RNase-freiem Wasser. Das ermittelte Volumen des RNase-freien Wassers wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 1 µl RNA-Lösung versetzt. Anschließend wurden die Komponenten des iScript™ cDNA Synthese-Kits (Bio-Rad, München, Deutschland) für den Mastermix entsprechend Tabelle 1 pipettiert. Jeweils 10 µl davon wurden zu ebenfalls 10 µl RNA der bovinen Gewebeproben, primären bovinen Adipozyten und murinen Zelllinie in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Insgesamt wurden also 100 ng RNA jeder Probe in cDNA umgeschrieben. Bezüglich der isolierten Zelltypen wurde die Gesamtmenge der RNA revers zu cDNA transkribiert, dementsprechend wurde weniger Nuklease-freies Wasser eingesetzt. Im Fall der Fettexplants war die gewonnene RNA-Menge so gering, dass komplett auf das Nuklease-freie Wasser verzichtet wurde und insgesamt nur 50 ng RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt wurden.

Tabelle 1. Ansatz für den Mastermix zur cDNA-Synthese

Komponente	Volumen in µl
Nuklease-freies Wasser	5
5× iScript Reaktionsmix ¹	4
iScript™ Reverse Transkriptase ¹	1

¹Bio-Rad, München, Deutschland

Die reverse Transkription wurde in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

5 min 25 °C

30 min 42 °C

5 min 85 °C

Nach Beendigung des Programms wurden die cDNA-Proben bei -20 °C gelagert.

3.2.3.7 Primerdesign

Die aufgelisteten Primer für die Quantifizierung der Genexpression in den Tabellen 2 und 3 wurden aus Hiller et al. 2013, Komolka et al. 2014b und Brenmoehl et al. 2014 ausgewählt oder neu mit der Software Primer 3web (Version 4.0.0, <http://primer3.ut.ee/>) (Untergasser et al. 2012) abgeleitet und von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) synthetisiert. Da die Exon-Intron-Struktur der Gene bekannt war, wurden die Primerpaare exonüberspannend

abgeleitet. Vor dem Einsatz in der RT-qPCR wurden die Primer mittels qualitativer PCR auf ihre Spezifität getestet.

Tabelle 2. Primersequenzen für die RT-qPCR mit boviner cDNA

Gen	Sequenz (5'→3') vorwärts Sequenz (5'→3') rückwärts	GenBank acc. no.	Produktgröße (bp)
<i>ANXA1</i>	GCCAGCCAATGTTCTTTGCT CCAGGATGGCTTGACAGAGA	NM_175784.3	168
<i>B2M</i>	CAGCTGCTGCAAGGATGG ATTTCAATCTGGGGTGGATG	NM_173893	184
<i>CIDEA</i>	CCGTATTCATGGTCCTCCAC TGCCATAGAGAGTTGCCTTC	NM_001076031.1	186
<i>FABP3</i>	GCGTTCTCTGTCTGCTTTCC CTTGGTCATATTGCCACCT	NM_174313	154
<i>FABP4</i>	GGATGGAAAATCAACCACCA TGGACAACGTATCCAGCAGA	NM_174314.2	174
<i>GDF15</i>	ACGCTACGAAGATCTGCTGA GCCCTCAGTTAAGTTGACC	NM_001206298.1	167
<i>HSL</i>	GCGGATCATTGAGAACCCTAGAC GGTCATAGGAGATGAGCCTGAC	NM_001080220.1	245
<i>MID1IP1</i>	CAGTTGCCCCGTCCTAAGTA GATAGAGGTGCCACAGGACA	NM_001076383.1	157
<i>MLXIPL</i>	CATCACACACATCTCTGCGG GCACAGGTTAATGGCAGCAT	NM_001205408.1	241
<i>PPARG</i>	AAAGCGTCAGGGTTCCACTAT ATCTCCGCTAACAGCTTCTCC	NM_181024	242
<i>RPS9</i>	GCTGATCGGCGAGTATGGGCT GCCGCCGCAACAGGGCATT	NM_001101152	152
<i>THBS4</i>	GATGAGTGTGCGAAACGGAGC TGCAAGGGTTTCAGTTCTGGA	NM_001034728.1	157
<i>THRSP</i>	GAGATGGAAGAGGCTGAGGA CAGGGTAAGATGGGTGAGGA	NM_001040533	108
<i>TOP2B</i>	AAGAAAACAGCACCGAAAGG GAGGTCTGAGGGGAAGAGGT	XM_002698750	174
<i>UXT</i>	TCATGGCGACGCCCCCTAAAC AAAGCCTCGTAGCGCAGCACT	NM_001037471	70
<i>WIF1</i>	GCTCACCACGATGCATGAAT TGTTTCACACTGCTCTCCCT	NM_001075996.1	185

Tabelle 3. Primersequenzen für die RT-qPCR mit muriner cDNA

Gen	Sequenz (5'→3')		GenBank acc. no.	Produktgröße (bp)
	vorwärts	rückwärts		
<i>B2m</i>	CCTGGTCTTTCTGGTGCTTG	TTTCCCGTTCTTCAGCATTT	NM_009735	175
<i>Cebpb</i>	TGCGGGGTTGTTGATGTTTT	TGCTCGAAACGGAAAAGGTT	NM_001287739.1	156
<i>Dlk1</i>	AGTATGGATTCTGCGAGGCT	GCAAGCCCGAACGTCTATTT	NR_033813.1	179
<i>Fabp4</i>	TTTCCTTCAAACCTGGGCGTG	CATTCCACCACCAGCTTGTC	NM_024406.2	166
<i>Hprt</i>	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	CCTGGTTCATCATCGCTAATC	NM_013556	90
<i>Thrsp</i>	TACCAGGAAATGACAGGGCA	TGCAACCAAGTCCACAGATG	NM_009381.2	183

3.2.3.8 PCR und Agarosegelelektrophorese für Primertests

Für die Durchführung der PCR wurden die Primer zuerst in einer Arbeitskonzentration von 10 µM aliquotiert. Aus einigen zufällig ausgewählten cDNA-Proben wurde ein cDNA-Mix hergestellt. Für jedes zu testende Primerpaar wurde 1 µl cDNA-Mix in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und im Anschluss mit 9 µl Mastermix entsprechend Tabelle 4 versetzt. Zusätzlich wurde ein Ansatz mit RNase-freiem Wasser als Negativkontrolle hergestellt.

Tabelle 4. Ansatz für den Mastermix zur PCR

Komponente	Volumen in µl
RNase-freies Wasser	3,6
Primer F (10 µM)	0,2
Primer R (10 µM)	0,2
PCR Master Mix (2X) ¹	5

¹Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland

Die Proben wurden im Thermocycler platziert und die PCR unter Ablauf des Programms in Tabelle 5 ausgeführt.

Tabelle 5. Programm für die PCR

Zyklusanzahl	Reaktion	Temperatur	Dauer
1	Initiale Denaturierung	94 °C	4 min
	Denaturierung	94 °C	30 s
40	Annealing	60 °C	45 s
	Elongation	72 °C	45 s
1	Terminale Denaturierung	94 °C	7 min

Nach Beendigung der PCR wurde mit der Agarosegelelektrophorese überprüft, ob das gewünschte Genprodukt entstanden ist. Dafür wurden zunächst 3 g Agarose mit 100 ml 1×TAE-Puffer gemischt und aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 65 °C wurden 5 µl des Fluoreszenzfarbstoffes Roti[®]-GelStain, welcher an die Nukleinsäuren bindet, zugegeben. Die Gellösung wurde dann in eine vorher ausgerichtete Gelschiene gegossen. Das 3 % Agarosegel wurde ca. 30 min an der Luft getrocknet und dann in die Elektrophoresekammer gelegt. Diese wurde anschließend mit 1×TAE-Puffer aufgefüllt. Die DNA-Proben bzw. die Negativkontrollen wurden mit 2 µl Bromphenolblau-Ladepuffer versetzt. Von jeder Probe wurden im nächsten Schritt 10 µl auf das Gel aufgetragen. Zur Ermittlung des Molekulargewichts wurden 4 µl eines Größenstandards (FastRuler) im Gel mitgeführt. Schließlich erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Doppelstränge für ca. 45 min bei 100 V und 250 mA. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde ein Bild des Gels unter UV-Licht mit dem Geldokumentationssystem Quantum Modell 1199 ‚Super-Bright‘ aufgenommen.

3.2.3.9 Quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR)

Für jedes zu untersuchende Gen wurde zuerst 1 µl der cDNA mit einer Konzentration von 10 ng/µl in ein Well einer 96-Well-Platte vorgelegt. Anschließend wurden 9 µl Mastermix (siehe Tab. 6) hinzugefügt. Dabei wurde von jeder Probe eine Doppelbestimmung mit einem Gesamtvolumen von je 10 µl durchgeführt. Ein Ansatz pro Gen wurde ohne cDNA mitgeführt und diente als Negativkontrolle (no template control, NTC), um Kontaminationen auszuschließen. Hier wurde anstelle der cDNA 1 µl RNase-freies Wasser pipettiert. Im Fall der LCM-Proben wurden 2 µl cDNA und nur 8 µl Mastermix verwendet. Für den Mastermix wurde dementsprechend weniger RNase-freies Wasser genommen.

Tabelle 6. Ansatz für den Mastermix zur RT-qPCR

Komponente	Volumen in μl
RNase-freies Wasser	3,6
Primer F (10 μM)	0,2
Primer R (10 μM)	0,2
iQ TM SYBR [®] Green Supermix ¹	5

¹Bio-Rad, München, Deutschland

Die RT-qPCR wurde mit Hilfe des MyiQTM2 Two Color Real-Time PCR Detection Systems durchgeführt (Programm siehe Tab. 7).

Tabelle 7. Programm für die RT-qPCR

Zyklus	Reaktion	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
1	Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1
2	Annealing	60 °C	30 s	1
	Elongation	70 °C	45 s	
3	Denaturierung	94 °C	10 s	45
	Annealing	60 °C	30 s	
	Elongation	70 °C	45 s	
4	Denaturierung	94 °C	10 s	1
	Annealing	60 °C	30 s	
	Elongation	70 °C	7 min	
5	Terminale Denaturierung	95 °C	1 min	1
6	Schmelzkurve	60-94 °C	10 s/°C	35

Zur Auswertung der erhaltenen Daten wurde die iQTM5 Optical System Software genutzt. Der Schwellenwert wurde dabei automatisch von der Software festgelegt und daraufhin wurden die C_T -Werte (C_T =cycle threshold) jeder Probe ermittelt. Der C_T -Wert beschreibt den Reaktionszyklus, in dem das genspezifische Fluoreszenzsignal erstmalig signifikant die Hintergrundfluoreszenz überschreitet.

Um die Zielgene quantifizieren zu können, müssen deren C_T -Werte mit denen der Referenzgene normalisiert werden. Referenzgene sind Gene, deren Produkte für den grundsätzlichen Zellerhalt notwendig sind. Sie zeichnen sich durch eine konstante Genexpression aus, da sie unabhängig von Zelltyp, Entwicklungsstadium und exogenen Einflüssen zur Aufrechterhaltung der Struktur und des Stoff- und Energiewechsels einer Zelle benötigt werden (Dundas & Ling 2012). In diesem Fall wurden DNA Topoisomerase 2-beta (*TOP2B*) und Beta-2-mikroglobulin (*B2M*) als Referenzgene für den MLD verwendet. Für die

Leber wurden Ubiquitously-expressed transcript protein (*UXT*) und 40S Ribosomal protein S9 (*RPS9*) als Referenzgene ausgewählt. Die Normalisierung der Expressionswerte aus dem SCF und den primären bovinen Adipozyten erfolgte mit *UXT* und *B2M*. Die Analyse der Genexpression in den Primärzellen wurde mit Hilfe der $2^{-\Delta CT}$ Methode für normalisierte individuelle Datenpunkte nach Schmittgen & Livak (2008) durchgeführt. Für jede RT-qPCR der bovinen Gewebe wurde die Amplifizierungseffizienz aus einer Standardkurve berechnet, die einer seriellen Verdünnungsreihe entstammte. Die Effizienz ergab sich hierbei aus dem Anstieg der Standardkurve. Mit Hilfe der C_T -Werte der Ziel- und Referenzgene wurden Expressionsunterschiede ermittelt. Die Ergebnisse wurden als „fold-changes“ der Bullen mit hohem IMF-Gehalt im Vergleich zu der Gruppe mit niedrigem IMF-Gehalt in einem Konfidenzintervall von 95 % angegeben. Die Berechnung der Signifikanz der Expressionsunterschiede zwischen beiden Gruppen erfolgte mit der REST 2009 Software nach Pfaffl et al. (2002).

Unter Verwendung der mittels LCM präparierten bovinen Zelltypen wurde neben *THRSP* auch die mRNA-Menge interner Kontrollgene mittels RT-qPCR quantifiziert, um die Zellspezifität zu validieren. Die Expression von fatty acid binding protein 3 (*FABP3*) ist zelltypisch für Muskelfasern, *FABP4* kommt ausschließlich in Fettzellen für das Binden von Fettsäuren vor.

In der murinen Zelllinie (3T3-L1) wurde die Expression folgender Gene gemessen: protein delta homolog (*Dlk1*), CCAAT/enhancer-binding protein beta (*Cebpb*), *Fabp4* und *Thrsp*. Die Normalisierung der Expressionswerte der Zellen wurde mit *B2m* und Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*Hprt*) durchgeführt. Die relative Genexpression wurde mittels der $2^{-\Delta CT}$ Methode für normalisierte individuelle Datenpunkte berechnet (Schmittgen & Livak 2008).

In den bovinen Fettexplants aus dem SCF wurden typische Gene gemessen, die während des Fettstoffwechsels aktiv sind: *FABP4*, Hormone-sensitive lipase (*HSL* bzw. *LIPE*) und *PPARG*. Um die Genexpressionswerte zu normalisieren, sollten ursprünglich, genau wie bei der Analyse der Werte aus dem SCF und den primären bovinen stromavaskulären Zellen, die Referenzgene *B2M* und *UXT* genutzt werden. Diese erwiesen sich jedoch als nicht konstant genug, sodass *FABP4* für die Normalisierung der Expressionswerte verwendet wurde, dessen Expression über den betrachteten Zeitraum stabil blieb. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der $2^{-\Delta CT}$ Methode für normalisierte individuelle Datenpunkte nach Schmittgen & Livak (2008).

3.2.3.10 Strukturelle Analyse des *THRSP*-Locus

Um potentiell genregulierende Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) zu finden, wurden Abschnitte des *THRSP*-Locus amplifiziert und

vergleichend sequenziert, inklusive 700 bp upstream des Transkriptionsstarts und über 1000 bp downstream des *THRSP*-Gens einschließlich der vollständigen 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) (siehe Abb. 14). Die Amplifikation der genomischen DNA-Regionen erfolgte mit einer Standard-PCR und spezifischen Primern (Tab. 8). Nach der Aufreinigung mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) wurden die PCR-Produkte mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer sequenziert. Für die Amplifizierung und die DNA-Sequenzierung wurden dieselben Primer für den jeweiligen Abschnitt eingesetzt (siehe Tab. 8). Die Genregion zwischen *THRSP_F1_Ex1* und *THRSP_R3_Ex1* wurde von allen 248 F₂-Bullen sequenziert (Abb. 14), wogegen alle anderen Genbereiche bei sechs ausgewählten Tieren innerhalb der F₂-Population verglichen wurden. Die Analyse der Gensequenzen wurde mit dem Programm CLC Main Workbench 7.0.3 durchgeführt.

Tabelle 8. Primersequenzen für die Amplifizierung und Sequenzierung von Abschnitten des *THRSP*-Locus

Primerpaar	Sequenz (5'→3') vorwärts	Produktgröße (bp)
	Sequenz (5'→3') rückwärts	
<i>THRSP_F1_Ex1</i>	ATCCTGTCAAAGCTGCTGTGC	195
<i>THRSP_R1_Ex1</i>	ATCATCACACCTGCTCCAT	
<i>THRSP_F2_Ex1</i>	GTGGTGATGATCCCCAGTCT	509
<i>THRSP_R2_Ex1</i>	TTCCTGGGTTGTGGTCTCAA	
<i>THRSP_F1_Ex1</i>	ATCCTGTCAAAGCTGCTGTGC	383
<i>THRSP_R3_Ex1</i>	CTTCAGTCTCAGCTCCCTCG	
<i>THRSP_F3_vEx1</i>	AGTGGGCAGCTTGGTCTTAG	475
<i>THRSP_R1_Ex1</i>	ATCATCACACCTGCTCCAT	
<i>THRSP_F4_vEx1</i>	ACTGGAGGTGAGAGAGAGGT	387
<i>THRSP_R4_vEx1</i>	CTAAGACCAAGCTGCCCACT	
<i>THRSP_F5_Ex2</i>	TTTTGCAGCTCTGACAACCA	550
<i>THRSP_R5_Ex2</i>	GACGAGGAAATTTAGGCCACA	
<i>THRSP_F6_Ex2</i>	AACAGTAAGTCAAAAGCATCTGG	491
<i>THRSP_R6_Ex2</i>	AAGATCCCACACAAGTAGAATGA	

3.2.4 Zellkultur

3.2.4.1 Kultivierung und Differenzierung von 3T3-L1-Zellen

Die murinen Präadipozyten wurden in 6-Well-Kulturplatten mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro Well eingesät und bei 37 °C, 6 % CO₂ und 90 % Luftfeuchte in 2 ml eines Proliferationsmediums (siehe Anhang B) kultiviert. Ein Mediumwechsel fand alle 48 h statt. Nach sechs Tagen waren die Zellen zu 100 % konfluent. Der Tag der kompletten Konfluenz wurde als Tag 0 der Differenzierung betrachtet. Die Zelldifferenzierung zu reifen Adipozyten

wurde mit Hilfe von Differenzierungsmedium (siehe Anhang B) induziert. Das Medium wurde alle zwei Tage erneuert. Die Zellen wurden insgesamt maximal 19 Tage lang zu reifen Adipozyten differenziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Ölrot angefärbt, für die RNA-Extraktion oder für immunhistochemische Färbungen genutzt.

3.2.4.2 Kultivierung und Differenzierung von primären bovinen Präadipozyten

Die stromavaskulären Zellen wurden aufgetaut, auf Kulturplatten bzw. -schalen in variierenden Zelldichten ausgesät und unter Standardbedingungen in Wachstumsmedium kultiviert (Tab. S3, Anhang A). Das Medium wurde alle 48 h gewechselt. Sobald die Zellen ihre vollständige Konfluenz erreicht hatten, wurden verschiedene Induktions- bzw. Differenzierungszusätze eingesetzt, um die Einlagerung von Lipiden zu induzieren. Es wurden zahlreiche Medien und Bedingungen getestet. Die detaillierten Zusammensetzungen der Medien und sonstige Parameter können in Tabelle S3, Anhang A nachverfolgt werden. Die Kultivierung in den unterschiedlichen Differenzierungsmedien erfolgte zwischen 8–24 Tagen. Bei einigen Versuchen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten RNA isoliert. Am Schluss der Experimente wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Ölrot angefärbt. Exemplarisch wurden für die Ergebnisdarstellung der Ölrot-Aufnahmen (siehe Abb. 26-28) reife Adipozyten der Protokolle 13-20 (siehe Tab. S3, Anhang A) ausgewählt. In den Ergebnissen (siehe Abb. 22) ist beispielhaft der Mittelwert der relativen Genexpressionen von differenzierten Zellen nach den Protokollen 27 b, 31 b und 34 b (siehe Tab. S3, Anhang A) ausgewertet und abgebildet.

3.2.4.3 Ölrot-Färbung

Ölrot ist ein fettlöslicher Azofarbstoff, der sich in die Lipidtröpfchen der Zellen einlagert und sie so sichtbar macht. An den Tagen 0 (Differenzierungsstart), 2, 7, 14 und 19 des Differenzierungsprozesses wurden die 3T3-L1-Zellen mit Ölrot angefärbt. Mit den primären bovinen Adipozyten wurde jeweils am Versuchsende eine Ölrot-Färbung durchgeführt. Für die Herstellung der Ölrot-Stammlösung wurden zunächst 0,5 % Ölrot in Isopropanol gegeben und über Nacht gerührt. Die frische Ölrot-Arbeitslösung wurde direkt vor Gebrauch angesetzt. Dafür wurden sechs Teile Ölrot-Stammlösung mit vier Teilen destilliertem Wasser gemischt, 10 min inkubiert und anschließend filtriert. Die Zellen wurden zuerst zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und 30 min bei RT mit 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nun wurde 60 % Isopropanol für 3 min auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen 5 min mit der frischen Ölrot-Arbeitslösung inkubiert. Die Wells bzw. Kulturschalen wurden dann einige Male mit destilliertem Wasser gespült, um die überschüssige Färbelösung auszuwaschen. Am Ende wurden die Zellen mit Gelatine und Deckglas abgedeckt und am inversen

Phasenkontrastmikroskop mit Hilfe einer CC12 Kamera und der Bildanalysesoftware Cell[^]F analysiert.

3.2.4.4 Fettexplantkultur aus SCF

Von den gewonnenen Fettexplants (siehe Abschnitt 3.1.5.3) wurden fünf bis acht Stück in je eins von sechs Wells einer 12-Well-Kulturplatte gegeben, mit 400 µl Kulturmedium versetzt und bei 37 °C, 6 % CO₂ und 90 % Luftfeuchte im Brutschrank inkubiert. Es wurden drei unterschiedliche Kulturmedien hergestellt. Kulturmedium (a) bestand aus DMEM/F12+4 mmol/l Glutamin+100 U/ml Penicillin+100 µg/ml Streptomycin+2,5 µg/ml Amphotericin B+50 nM rekombinantem humanem THBS4 (rhTHBS4) (2390-TH-050, R&D Systems, Minneapolis, USA). Kulturmedium (b) war ebenso zusammengesetzt, enthielt aber als unbehandeltes Kontrollmedium anstatt des rekombinanten Proteins das Placebo PBS-D. Kulturmedium (c) entsprach (b), wurde zusätzlich mit 10 % FKS angereichert und ebenfalls als Kontrolle genutzt. Für jede Behandlung wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Insgesamt wurden vier Kulturplatten für den Versuch belegt, um die RNA-Entnahme zu vier verschiedenen Zeitpunkten zu gewährleisten. Je eine Kulturplatte wurde nach 1 h, 2 h, 24 h und 48 h zur RNA-Isolierung aus dem Inkubator entnommen. Außerdem wurde zu Beginn des Versuchs RNA aus zwei Wells mit Fettexplants zum Startzeitpunkt 0 extrahiert.

3.2.4.5 Kultivierung und Differenzierung von bovinen Satellitenzellen

Die Zellen wurden aufgetaut, auf mit extrazellulärer Matrix (ECM)-Gel (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) beschichteten 24-Well-Kulturplatten mit einer Dichte von 5×10^3 Zellen/Well ausgesät und in Wachstumsmedium 1 (WM1; DMEM/F12) angereichert mit 4 mmol/l Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % FKS für fünf Tage kultiviert. Das Medium wurde nach 48 h erstmalig und danach jeden Tag erneuert. Sobald die Zellen eine vollständige Konfluenz erreicht hatten, wurden verschiedene Differenzierungsmedien eingesetzt, um die Myotubenbildung zu induzieren: (1) serumfreies Differenzierungsmedium (SFDM) ergänzt entsprechend Doumit et al. (1996); (2) serumfreies Medium bestehend aus DMEM/F12, 1 µM Dexamethason, 1 µg/ml Linolsäure und 0,1 µM Insulin (DLI Medium) adaptiert nach einem Protokoll von Allen et al. (1985); und (3) DMEM/F12 inklusive 2 % FKS, 1 µM Insulin und 1 µM Cytosinarabinosid (DM). Die detaillierten Medienzusammensetzungen können Abbildung 2 entnommen werden. Bei der Verwendung vom SFDM wurden die Zellen lediglich für vier Tage mit WM1 inkubiert, gefolgt von einer 24-stündigen Behandlung mit Wachstumsmedium 2 (WM2; DMEM/F12+10 % FKS+1 µM Insulin), um die Zellen für die Differenzierung vorzubereiten. Die Kultivierung in den unterschiedlichen Differenzierungsmedien erfolgte für 48, 72 oder 96 h. Um den Differenzierungsgrad zu bestimmen, wurden die differenzierten Zellen für Desmin und DNA angefärbt in Anlehnung an das beschriebene Protokoll für porcine Muskelzellen von Mau et

al. (2008), welches selbst eine Modifikation der Anleitung von Yablonka-Reuveni et al. (1999) darstellt. Am Ende der Experimente wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen wurden einmal mit vorgewärmtem PBS gewaschen bevor sie mit 100 % Methanol für 10 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert und bis zur Färbung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in PBS gelagert wurden.

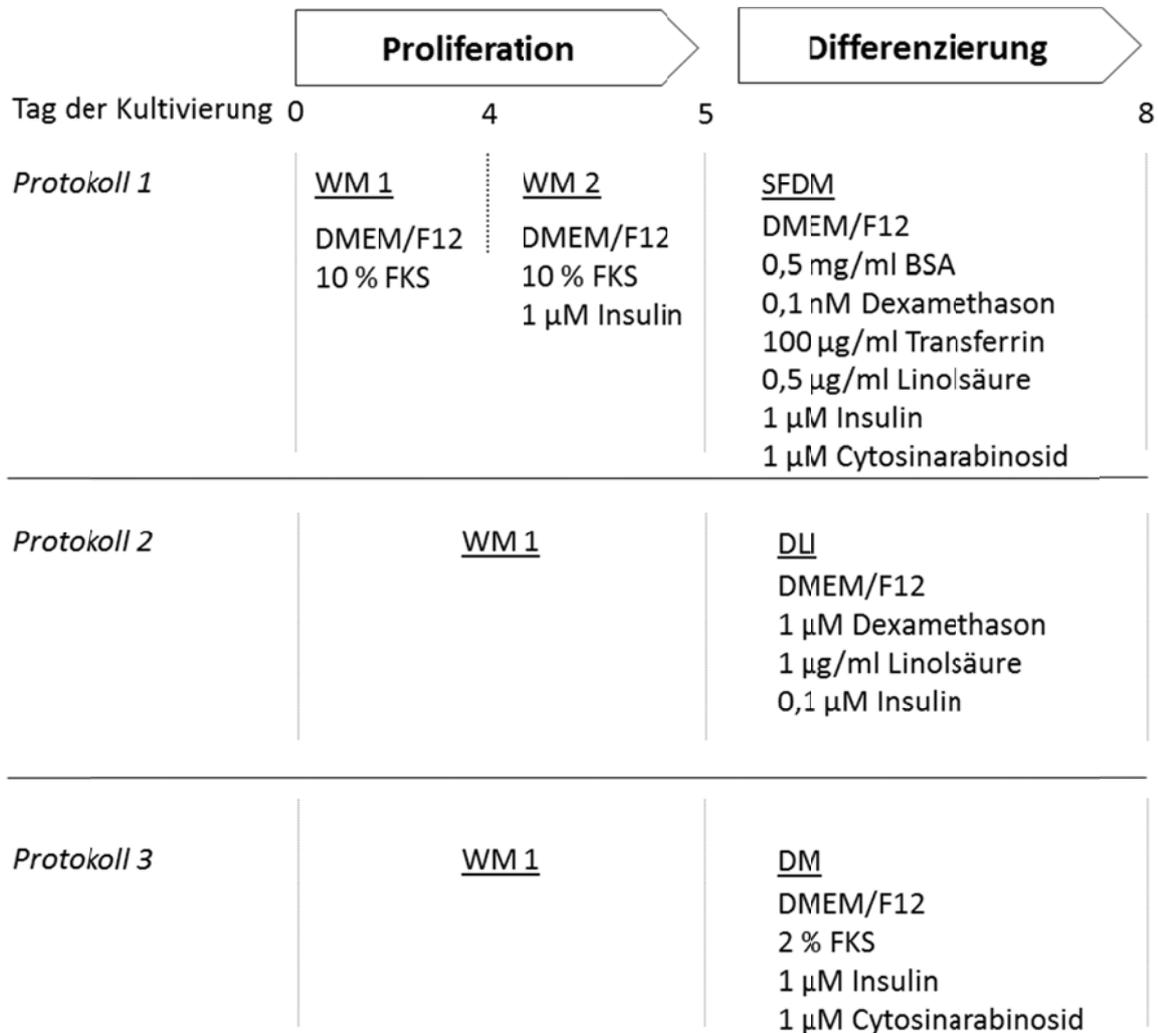


Abbildung 2. Medienzusammensetzungen und Design der Experimente für die Differenzierung der primären bovinen Myoblasten

Abkürzungen: WM1/WM2 - Wachstumsmedium 1/Wachstumsmedium 2, SFDM - serumfreies Differenzierungsmedium, DLI - Differenzierungsmedium mit Dexamethason, Linolsäure und Insulin, DM – Differenzierungsmedium, FKS - fötales Kälberserum; BSA - bovines Serumalbumin. (modifiziert nach Will et al. 2015)

3.2.5 Proteinbiochemische Methoden

3.2.5.1 Immunhistochemie

3.2.5.1.1 3T3-L1-Zellen

Mit Hilfe der Immunhistochemie können Proteine in Geweben identifiziert und lokalisiert werden, indem ein markierter Antikörper spezifisch an ein Epitop des vorhandenen Antigens bindet. An den Tagen 0 (Differenzierungsstart), 2, 7, 14 und 19 der Zelldifferenzierung

wurden an den 3T3-L1-Präadipozyten immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 15 min bei RT mit 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert und über Nacht in PBS im Kühlschrank aufbewahrt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen erneut 5 min mit frischem PBS gewaschen und anschließend mit PBS-TritonX-100 (PBS-T) für 10 min permeabilisiert. Im Fall von *FABP4* bzw. Adipocyte lipid-binding protein (*ALBP*) wurde kein TritonX-100 verwendet. Um unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers zu blockieren, wurden die Zellen 15 min mit 10 % Ziegen Serum in PBS-T bzw. PBS behandelt. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 2 h bei RT. Eine Liste der verwendeten Antikörper befindet sich in Tabelle 9. Bei der Negativkontrolle wurde kein Primärantikörper eingesetzt. Nach drei zehnmütigen Waschschritten mit PBS-T bzw. PBS wurden die Zellen dunkel für 45 min mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (1:500 in PBS-T, MoBiTec, Göttingen, Deutschland) inkubiert. Der verwendete Sekundärantikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und sehr empfindlich gegen UV-Strahlen. Aus diesem Grund wurden die Kulturplatten für alle Folgeschritte lichtgeschützt verpackt. Nach der Inkubation wurden die Zellen 10 min mit PBS-T bzw. PBS und dann zweimal je 5 min mit PBS gewaschen. Damit auch die Zellkerne sichtbar gemacht werden, wurden die einzelnen Wells 5 min mit Hoechst 33258 (1:10000 in PBS-T) gefärbt. Danach wurden die Zellen noch zweimal 5 min mit PBS und einmal 5 min mit destilliertem Wasser gespült. Abschließend wurden die Wells mit ProLong® Diamond Antifade Mountant eingedeckt. Nach 24 h erfolgte die mikroskopische Auswertung mittels der Software Cell[^]F am Nikon Microphot SA Fluoreszenzmikroskop.

Tabelle 9. Verwendete Primärantikörper für die Immunhistochemie der 3T3-L1-Zellen mit entsprechender Konzentration

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen anti-DLK (ab21682)	1:200	Abcam
Kaninchen anti- <i>THRSP</i> 8733	1:500	Life Technologies
Kaninchen anti- <i>THRSP</i> 8816	1:200	Life Technologies
Kaninchen anti-CEBPB C-19 (sc-150)	1:200	Santa Cruz
Kaninchen anti-ALBP (ab23693)	1:100	Abcam

3.2.5.1.2 Gewebeschnitte der bovinen Leber, des Skelettmuskels und des subkutanen Fettgewebes

Mit dem Kryostatmikrotom wurden Gefrierschnitte mit einer Schichtdicke von 10 µm (Leber), 12 µm (MLD) und 25 µm (SCF) angefertigt und auf Polysine®-Objektträger übertragen. Danach wurden sie entweder 15 min bei RT mit 4 % Paraformaldehyd in PBS (*THRSP*) oder 10 min mit eiskaltem Aceton (*THBS4*) fixiert. Anschließend wurden die Objektträger 5 min in

PBS getaucht und die Gewebeschnitte auf diese Art gewaschen. Die Serienschnitte der Leber wurden nun 30 min mit filtriertem Sudanschwarz (0,1 % in 70 % Ethanol) inkubiert und erneut 2×10 min mit PBS gewaschen. Aus den Gewebeschnitten des subkutanen Fettgewebes wurde mittels Chloroform das Fett extrahiert. Dazu wurden die Objektträger 5 min leicht auf dem Schüttler bewegt. Danach erfolgte für 10 min die Permeabilisierung aller Gewebeschnitte mit PBS-T. Um auch hier das Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen des Antikörpers zu gewährleisten, wurden sie im nächsten Schritt 15 min mit 10 % Ziegenserum in PBS-T behandelt. Damit die dünnen Gewebeschnitte nicht austrocknen, wurden die Objektträger während der Behandlungszeiten in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1 h (THBS4) bzw. 2 h (THRSP) bei RT. Für die Detektion von THRSP wurde der rinderspezifische polyklonale Antikörper Kaninchen anti-THRSP8816 (1:300, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) und im Fall von THBS4 der humanspezifische polyklonale Kaninchen anti-THBS4 Antikörper-c-terminal (ab 156258, 1:200, Abcam, Cambridge, England) verwendet. Nach drei zehnmütigen Waschschritten mit PBS-T wurden die Serienschnitte dunkel für 45 min mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (1:1000 in PBS-T, MoBiTec, Göttingen, Deutschland) inkubiert. Nun wurden die Objektträger 10 min mit PBS-T bzw. PBS und dann zweimal je 5 min mit PBS gewaschen. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Gewebeschnitte 5 min mit Hoechst 33258 (1:10000 in PBS-T) inkubiert. Danach wurden die Objektträger noch zweimal 5 min in PBS und einmal 5 min in destilliertem Wasser gewaschen. Schließlich wurden sie mit ProLong® Diamond Antifade Mountant eingedeckt. Nach 24 h wurden die Ergebnisse der Immunfärbung mit Hilfe der Software Cell[^]F am Nikon Microphot SA Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

3.2.5.1.3 Kapillarfärbung vom bovinen Muskelquerschnitt

Mit Hilfe des Kryostatmikrotoms wurden zunächst Gefrierschnitte des bovinen Skelettmuskels mit einer Stärke von 10 µm angefertigt, auf Objektträger überführt und 5 min liegen gelassen. Im nächsten Schritt wurden die Gewebeschnitte 5 min mit Formol-Calcium fixiert und danach 2-3 min mit destilliertem Wasser gespült. Nun erfolgte für 90 min bei 37 °C die Inkubation mit einem speziellen Gemisch für den Nachweis der alkalischen Phosphatase und einem pH=9,4 (Tab. 10). Die Objektträger wurden dann kurz in destilliertes Wasser getaucht und 5 min in 2%ige Kobaltchlorid-Lösung gestellt. Nach einem erneuten gründlichen Waschschriff wurden die Gewebeschnitte 3 min mit 1%iger Ammoniumsulfid-Lösung behandelt. Anschließend wurden sie wieder mit destilliertem Wasser gespült und für weitere immunhistochemische Färbungen genutzt. Schließlich wurden die Schnitte mit ProLong® Diamond Antifade Mountant eingedeckt. Die mikroskopische Auswertung wurde mit dem Nikon Microphot SA Fluoreszenzmikroskop und der Software Cell[^]F vorgenommen.

Tabelle 10. Inkubationslösung für den Nachweis der alkalischen Phosphatase (pH=9,4)

Komponente	Volumen in ml
3 % Natrium- β -Glycerophosphat	10
2 % Veronal-Natrium	10
Destilliertes Wasser	5
2 % Calciumchlorid	20
Magnesiumsulfat	1

3.2.5.1.4 Primäre bovine Muskelzellen

Die Zellen wurden zunächst 1 h mit sterilem TBS-Ziegenserum inkubiert, damit unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers vermieden werden. Danach wurden die Zellen zweimal mit TBS-Tween-20 (TBS-Tw20) gewaschen bevor sie über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper beprobt wurden. Der monoklonale Maus-Antikörper gegen Desmin (mAb DE-U-10, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) war 1:100 mit TBS-Ziegenserum verdünnt. Eine Negativkontrolle wurde von Zellen repräsentiert, die nicht mit dem Primärantikörper behandelt wurden. Am nächsten Tag wurden die Zellen viermal mit TBS-Tw20 gewaschen und nun 1 h mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (1:500 in TBS-Ziegenserum, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut viermal mit TBS-Tw20 gewaschen, gefolgt von einer Kernfärbung mit Hoechst 33258 in PBS (1 μ g/ml) für 5 min bei RT. Nach einem letzten Waschschrift mit TBS-Tw20 wurden die Zellkulturplatten bis zur mikroskopischen Evaluierung mit PBS im Kühlschrank gelagert. Die Muskelzellen wurden unter Verwendung der blauen bzw. UV-Anregung und den entsprechenden grünen und blauen Emissionsfiltern des Leica DM 24000 Fluoreszenzmikroskops analysiert. In 5-8 visuellen Feldern (0,84 mm²) wurden die Anzahl der Myotuben, die Menge der Kerne innerhalb der Myotuben und die Gesamtanzahl der Kerne pro Well mit Hilfe der QWin Software gezählt. Das Ausmaß der Differenzierung (Fusionsgrad) wurde als Verhältnis zwischen Anzahl der Myotubenzellkerne und Gesamtanzahl der Zellkerne angegeben.

3.2.5.2 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine auf eine Trägermembran übertragen, um sie für weitere Reaktionen zugänglich zu machen. Dazu wurden im ersten Schritt 10-50 μ g des Gewebeproteins bzw. 100, 50, 10, 5 und 1 ng des rekombinanten murinen Proteins Thrsp (Cusabio, CSB-EP726789MO, Wuhan, China) und 50 ng des rekombinanten humanen Proteins THBS4 (2390-TH-050, R&D Systems) in SDS-Probenpuffer mit β -Mercaptoethanol gelöst, bei 95 °C für 5 min denaturiert und mit Hilfe von 12 % Criterion™ TGX Stain-Free™ Fertig-Gelen der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Um das Molekulargewicht der

Proteinbanden bestimmen zu können, wurde gleichzeitig ein Molekulargewichtsmarker (PageRuler) mitgeführt. Die Proteine wurden unter Verwendung eines Semi-Dry-Blotters auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Um die Spezifität der Antikörperbindung zu überprüfen, wurden 12-15 % SDS-PAGE 10×10 cm Minigele genutzt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die gleichmäßige Beladung der Gelspuren und der Transfer der Proteine auf die Membran wurden im Anschluss mittels Coomassie-Färbung nach Standardprotokoll verifiziert. Die Membranen wurden, abhängig vom Antikörper, für 1 h entweder mit 5 % entfettetem Milchpulver in TBS oder mit Roti[®]-Block blockiert. Die Membranen wurden anschließend mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Spezifität der Antikörperbindung wurde in Parallelblots getestet, die mit dem Antikörper inkubiert wurden, dessen spezifische Bindungsstellen vorher mit dem entsprechenden Antigenpeptid blockiert worden waren. Dadurch konnten unspezifische Bindungen des Antikörpers ermittelt werden. Nach dem Waschen wurden die Membranen mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Kaninchen IgG TrueBlot, 1:25000; 18-8816, eBioscience, Frankfurt, Deutschland) inkubiert. Die Proteinbanden wurden mit Chemilumineszenz-Substrat und einem Chemocam HR-16 Imager detektiert. Zur Quantifizierung der Intensität der spezifischen Proteinbanden wurde die LabImage 1D Software verwendet. Bei der relativen Quantifizierung wurde zum Ausgleich der Unterschiede in der Beladung der einzelnen Spuren und beim Transfer der Proteine auf die Membran eine Korrektur des Bandenvolumens durchgeführt. Der Korrekturfaktor wurde aus dem Quotienten der Intensität der Coomassie-Färbung einer Spur und dem Mittelwert aller Spuren eines Blots berechnet. Die Normalisierung zur Vergleichbarkeit wiederholter Messungen erfolgte dann durch Bezug der Einzelwerte auf den Mittelwert der Gruppe mit niedrigem IMF-Gehalt, die damit als Vergleichsgruppe diente. Nach der Exposition wurde der Antikörper mit Hilfe eines Stripping-Puffers für 20 min bei RT von der Membran abgewaschen, um den Blot für weitere Antikörperbehandlungen zu nutzen.

Für die Detektion von THBS4 wurde der humanspezifische polyklonale Kaninchen anti-THBS4 Antikörper c-terminal (ab 156258, 1:10000, Abcam) verwendet. Um bovinen THRSP mit Hilfe des Western Blots nachweisen zu können, wurden zunächst verschiedene Antikörper validiert. Obwohl die Homologie zwischen dem bovinen und murinen THRSP-Protein bei nur 73 % liegt, wurden zunächst zwei kommerziell verfügbare Antikörper gegen murines Thrsp auf ihre Kreuzreaktivität mit dem bovinen Protein und somit ihre Eignung für bovine Gewebeproben getestet. Es wurden ein monoklonaler Antikörper (H00007069-M01, Abnova, Heidelberg, Deutschland) und ein polyklonaler Antikörper (PAB5939, Abnova, Heidelberg, Deutschland) überprüft. Der monoklonale Antikörper markierte nur unspezifische Banden. Unter Verwendung des mausspezifischen polyklonalen Antikörpers war eine klare Bande auf der erwarteten Höhe von 17 kDa im subkutanen Fett der Maus sichtbar und

diente als Positivkontrolle. Auch im Rindermuskel waren schwache Proteinbanden zu erkennen, jedoch auf Höhe des Molekulargewichts von 23-25 kDa (Abb. 3). Es handelte sich also hier vermutlich um ein unspezifisches Signal. Die Antikörper wurden somit als ungeeignet bewertet und nicht weiter verwendet. Im folgenden Schritt wurde die Firma Pierce Custom Antibody Service (Thermo Scientific, Rockford, USA) beauftragt, einen polyklonalen, rinderspezifischen Antikörper zu entwickeln und zu produzieren. Daraufhin wurden zwei Kaninchen mit dem synthetischen Peptid KAEVTRRYQEKMGA, das den Aminosäuren 134-149 entspricht, immunisiert und polyklonale Antikörper hergestellt: Kaninchen anti-THRSP8733 (Antikörper A) und Kaninchen anti-THRSP8816 (Antikörper B). Antiseren der beiden Kaninchen wurden in drei unterschiedlichen Stadien der Immunisierung zum Testen zur Verfügung gestellt: Tag 0 (Beginn der Immunisierung), Tag 35 und Tag 58. In dem Blot, der mit beiden Antikörpern am Tag 0 angefertigt wurde, können die unspezifischen Banden ausgemacht werden, die von körpereigenen Antikörpern der Kaninchen ohne spezifische Immunisierung erkannt werden. Diese Banden sind für die spätere Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen Bindungen ausschlaggebend. Abbildung 4 verdeutlicht, dass das Antiserum A zu diesem Zeitpunkt keine deutlichen Proteinbanden markiert. Der Blot mit Antiserum B hingegen zeigt eine Vielzahl an unspezifischen Markierungen. In beiden Kaninchen fand bis zum 58 Tag eine Immunreaktion statt, die zur Markierung von deutlichen Banden auf dem Blot führte. Da in beiden Fällen unterschiedliche Proteinbanden auftraten und die Spezifität nicht eindeutig geklärt werden konnte, wurden beide Antiseren nach 58 Tagen der Immunisierung zur weiteren Verwendung Affinitätsaufgereinigt. Mit den aufgereinigten Antikörpern wurden dann weitere Tests mit Western Blots durchgeführt. Die Abbildungen 5 und 6 zeigen die Blots unter direkter Verwendung des Antikörpers (links) oder nach Blockierung durch Inkubation mit ihrem synthetischen THRSP-Immunisierungspeptid (rechts). In beiden Fällen verlief die Blockierung erfolgreich, denn die vermeintlich spezifischen Proteinbanden waren nicht mehr sichtbar. Nach 58 Tagen der Immunisierung ohne Blockierung ließ sich mit Antikörper A ein scheinbar spezifisches Signal im subkutanen Fett der Maus und des Rinds detektieren, dieses lag jedoch unter der erwarteten Proteingröße (~10 vs. 17 kDa) (Abb. 5). Im Blot mit Antikörper B wurde im bovinen SCF eine spezifische Bande bei einem höheren Molekulargewicht, als erwartet, detektiert (~38 kDa vs. 17 kDa) (Abb. 6). Da sie sich aber fast genau auf doppelter Höhe befand, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei der markierten Bande um ein Dimer von THRSP handeln könnte. Aus der Literatur ist bekannt, dass THRSP zur Dimerisierung neigt (Cunningham et al. 1997, Colbert et al. 2010). Hinweise auf andere Proteinmodifikationen von THRSP mit Auswirkung auf das Molekulargewicht gibt es bisher nicht. Zusätzlich erschien aber auch eine klare Proteinbande bei ca. 17 kDa im SCF der Maus (Abb. 6). Eine Fraktionierung des Gesamtproteins in

zytoplasmatische und nukleare Proteine zeigte widersprüchliche Ergebnisse für den Antikörper A, sodass er nicht weiter verwendet wurde. Der Antikörper B war in der Lage, rekombinantes murines Thrsp zu erkennen und in den bovinen Proteinfraktionen eine Kernlokalisierung von THRSP zu bestätigen. Er wurde daher für die Proteinanalysen in bovinen Geweben eingesetzt. Die Resultate sind im Ergebnisteil dargestellt.

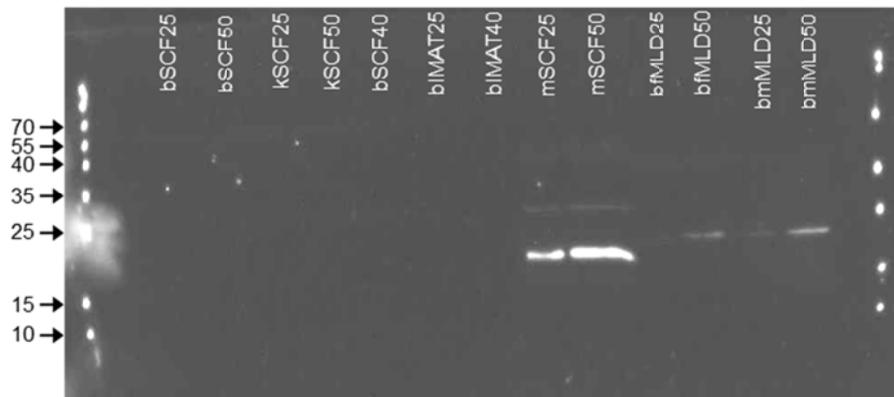


Abbildung 3. Detektion von THRSP im Western Blot mit Hilfe eines mausspezifischen polyklonalen Antikörpers

Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:2000 verwendet.

Abkürzungen: bSCF25 - 25 µg Protein von bovinem subkutanem Fettgewebe, bSCF50 - 50 µg Protein von bovinem subkutanem Fettgewebe, kSCF25 - 25 µg Protein von subkutanem Fett eines Kalbes, kSCF50 - 50 µg Protein von subkutanem Fett eines Kalbes, bSCF40 - 40 µg Protein von bovinem subkutanem Fettgewebe, bIMAT25 - 25 µg Protein von bovinem intermuskulärem Fett, bIMAT50 - 50 µg Protein von bovinem intermuskulärem Fett, mSCF25 - 25 µg von murinem subkutanem Fettgewebe, mSCF50 - 50 µg von murinem subkutanem Fettgewebe, bfMLD25 - 25 µg Protein des bovinen fetten M. longissimus dorsi, bfMLD50 - 50 µg Protein des bovinen fetten M. longissimus dorsi, bmMLD25 - 25 µg Protein des bovinen mageren M. longissimus dorsi, bmMLD50 - 50 µg Protein des bovinen mageren M. longissimus dorsi

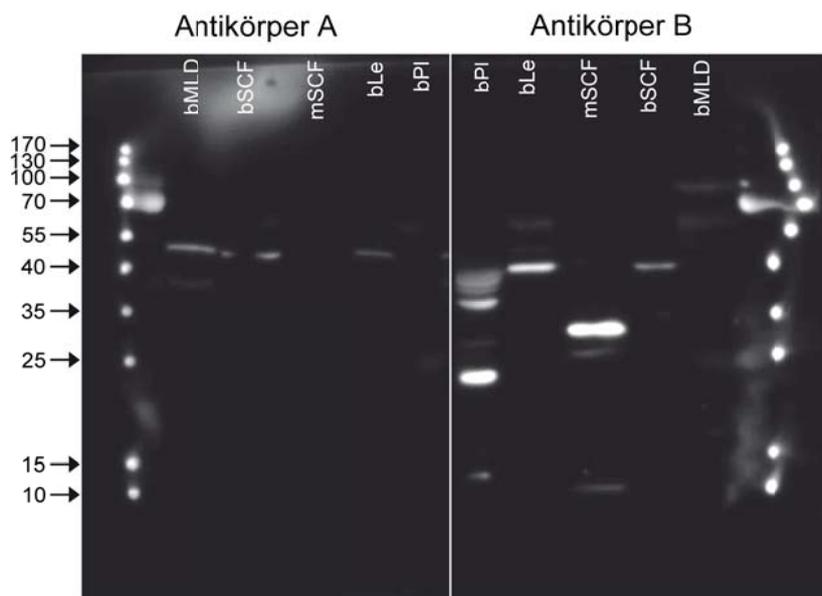


Abbildung 4. Western Blot verschiedener Gewebe vom Rind und dem subkutanem Fett der Maus. Detektion unspezifischer Bindungen der körpereigenen Antikörper der Kaninchen vor der Immunisierung

Die Antiseren wurden 1:1000 verdünnt.

Abkürzungen: bMLD - boviner M. longissimus dorsi, bSCF - bovines subkutanes Fettgewebe, mSCF - murines subkutanes Fettgewebe, bLe - bovine Leber, bPI - bovines Plasma

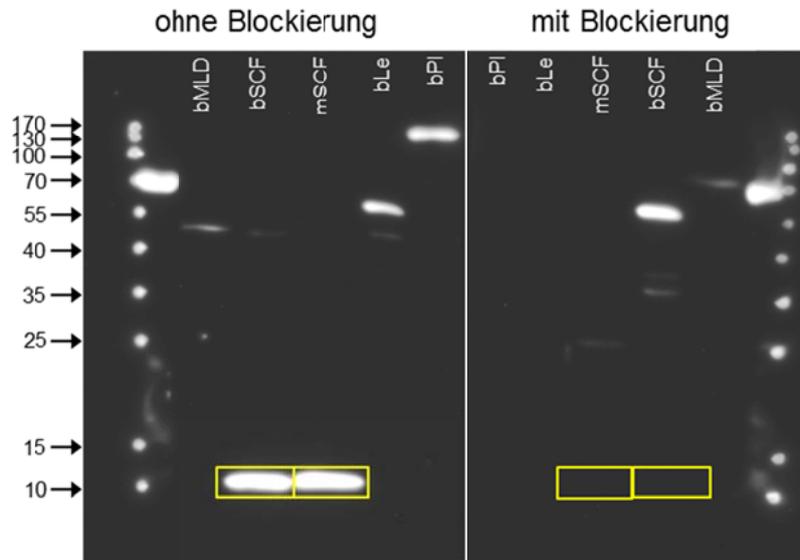


Abbildung 5. Western Blot verschiedener boviner Gewebe und des murinen subkutanen Fettgewebes. Markierung spezifischer und unspezifischer Proteinbanden mit dem rinderspezifischen polyklonalen Antikörper A zur Detektion von THRSP durch Blockierung der Bindungsstelle mit dem Immunisierungspeptid

Die Verdünnung des Antikörpers betrug 1:1000. Die gelben Rechtecke umrahmen die scheinbar spezifischen THRSP-Proteinbanden vor und nach der Blockierung mit dem Immunisierungspeptid.

Abkürzungen: bMLD - boviner M. longissimus dorsi, bSCF - bovines subkutanes Fettgewebe, mSCF - murines subkutanes Fettgewebe, bLe - bovine Leber, bPI - bovines Plasma

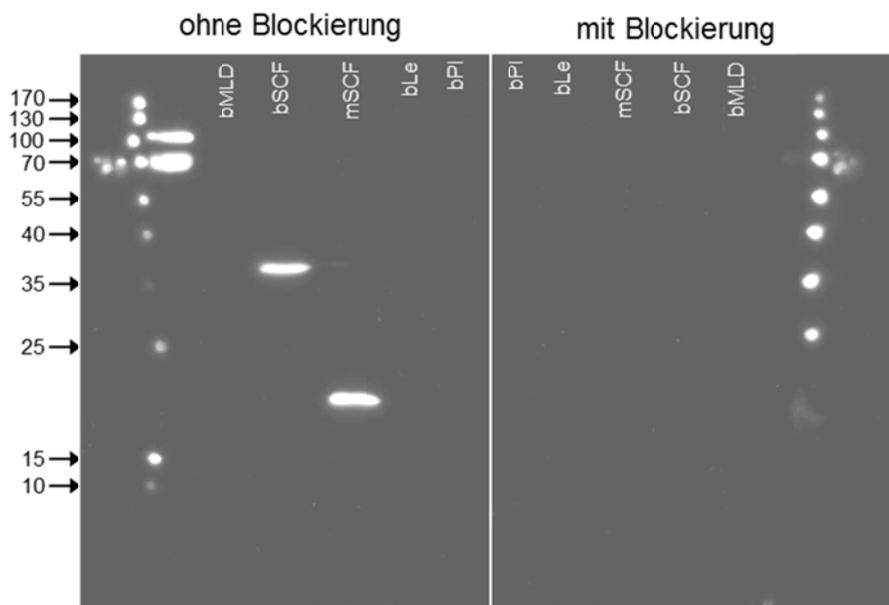


Abbildung 6. Western Blot verschiedener Gewebe vom Rind und des subkutanen Fettgewebes der Maus. Unspezifische und spezifische Signale des rinderspezifischen polyklonalen Antikörpers B zur Detektion von THRSP durch Blockierung der Bindungsstellen mit dem Immunisierungspeptid

Der Antikörper wurde 1:1000 verdünnt eingesetzt.

Abkürzungen: bMLD - boviner M. longissimus dorsi, bSCF - bovines subkutanes Fettgewebe, mSCF - murines subkutanes Fettgewebe, bLe - bovine Leber, bPI - bovines Plasma

4 Ergebnisse

4.1 Vergleichende Analyse von Transkriptom-, Proteom- und Sekretomdaten der Spezies Rind, Mensch und Maus

4.1.1 Evaluierung different exprimierter Transkripte im Fettgewebe und Skelettmuskel

Unterschiedlich regulierte und annotierte Transkripte aus verschiedenen murinen und bovinen Experimenten wurden zu zwei Matrices zusammengeführt. Eine Matrix umfasste neun Datensätze zum Skelettmuskel, die andere enthielt acht Datensätze zum Fettgewebe (Abb. A1 und A2, Anhang A). Entsprechend konnten 9 bzw. 8 als höchster Score erreicht werden. In der Matrix für den Skelettmuskel wurde der höchste Score von drei Kandidatengen erreicht. Unter ihnen war Chloride intracellular channel 4 (*CLIC4*), eine wesentliche Komponente des Signalwegs von *TGFB1* (Shukla et al. 2009). Außerdem hatten 25 potentielle Kandidaten einen Score von 7, 218 einen Score von 6 und 828 einen Score von 5. In der Matrix für das Fettgewebe wurde der höchste Score von 8 von zwei Kandidatengen erzielt, Protein S100-A11 bzw. Calgizzarin (*S100A11*) und Annexin A1 (*ANXA1*) (Akasheh et al. 2013a; Rehman et al. 2004). Ein Score von 7 wurde von einem Kandidaten erreicht, ein Score von 6 von 94 und 481 Kandidaten hatten einen Score von 5.

4.1.2 Identifizierung von Adipokinen und Myokinen als Teilmenge der Transkripte mit High-Score

Die Transkripte in den Matrices mit einem Score ≥ 5 wurden als Transkripte mit „High-Score“ definiert (1074 im Muskel und 578 im Fettgewebe). Um putative Adipo- und Myokine zu identifizieren, wurden die Transkripte aus den High-Score-Listen mit Informationen zu sezernierten Proteinen abgeglichen. Im Fall des Fettgewebes wurde für diesen Abgleich ein Proteomik-Datensatz genutzt, der die Daten aus acht Studien enthielt, in denen vielfältige Analysen an humanen Adipozyten, Präadipozyten, Fettgewebeentnahmen und Zellstämmen durchgeführt worden waren (Lehr et al. 2012a,b). Bezüglich des Skelettmuskels wurde ein Datensatz bestehend aus 13 Einzelstudien zu verschiedenen Nager-Zelllinien und primären humanen Myotuben herangezogen (Weigert et al. 2014). Weiterhin wurden gut bekannte sezernierte Faktoren manuell identifiziert und zu den Listen der Adipo- und Myokine hinzugefügt, die nicht in den Sekretom-Datensätzen vertreten waren. Dabei wurden sowohl klassisch sezernierte Proteine mit Signalpeptid als auch nicht-klassisch sezernierte Faktoren entsprechend SecretomeP berücksichtigt. Insgesamt konnten 119 potentielle Myokine und 79 vermeintliche Adipokine identifiziert werden (Tab. S4 und S5, Anhang A). Von den 79 vorhergesagten Adipokinen besitzen vermutlich 56 ein Signalpeptid und 23 werden höchstwahrscheinlich nicht-klassisch freigesetzt. Gleichmaßen gehen 58 Myokine wahrscheinlich aus der klassischen Sekretion hervor und 61 unterliegen der Annahme, in

nicht-klassischer Art und Weise sezerniert zu werden. Einige gut bekannte Adipokine, wie Apelin (*APLN*) und *LEP*, waren in der entwickelten Matrix unter den Genen mit High-Score vertreten. Für die Validierung der Ergebnisse wurden die gefundenen Adipokin-Kandidaten mit veröffentlichten Daten verglichen, die mit Hilfe von verschiedenen etablierten diabetischen Tiermodellen gewonnen wurden (Tab. 11). Die Bestätigung der Myokin-Kandidaten mit Hilfe von Literaturdaten war weitaus komplizierter, da bisher signifikant viel weniger validierte Myokine publiziert sind. Decorin (*DCN*) dient hier als gutes Beispiel für ein Myokin mit High-Score (Kanzleiter et al. 2014).

Tabelle 11. Validierung der Adipokin-Kandidaten aus der Scoring-Matrix mit bekannten Adipokinen

Bekannte Adipokine wurden aus der Liste der Gene mit High-Score und der beobachteten Regulation ausgewählt und mit Literaturdaten verglichen. Die Literaturdaten zeigen eine vergleichbare Regulation in diät-induzierten übergewichtigen Mäusen im Vergleich zu schlanken Kontrolltieren (a), in New Zealand obese (NZO)-Mäusen verglichen mit schlanken Kontrollmäusen (b) und in anderen genetischen Modellen von Übergewicht (wie *db/db* Mäuse und *ob/ob* Mäuse) im Vergleich zu normalgewichtigen Kontrollen (c). (modifiziert nach Schering et al. 2015)

	Score	DIO vs. Chow	NZO vs. B6
<i>Sfrp5</i>	6	Höher	Höher
<i>Lep</i>	5	Höher (a)	Höher (b,c)
<i>Lbp</i>	5	Höher (a)	Höher (c)
<i>Apln</i>	5	Höher (a)	Höher (c)
<i>Sparc</i>	5	Höher (a)	Höher (c)
<i>Bmp3</i>	5	Höher (a)	Höher
<i>Ccl11</i>	5	Höher (a)	Höher (b,c)

Abkürzungen: *Apln* - Apelin, B6 - C57BL/6J-Mäuse, *Bmp3* – Bone morphogenic protein 3, *Ccl11* - C-C motif chemokine 11 bzw. Eotaxin, Chow - Standardfutter, DIO - diet-induced obesity (diät-induziertes Übergewicht), *Lbp* - lipopolysaccharide-binding protein, *Lep* - Leptin, NZO - New Zealand obese, *Sfrp5* - Secreted frizzled-related protein 5, *Sparc* - Secreted protein acidic and rich in cysteine.

4.1.3 Identifizierung von Adipo-Myokinen

Beim Abgleich der zwei Listen mit vermeintlich sezernierten Faktoren wurden 22 neue potentielle Adipo-Myokine gefunden (Tabelle 12). Darunter waren u.a. *LEP*, Vascular endothelial growth factor c (*VEGFC*), Protein disulfide-isomerase bzw. Prolyl 4-hydroxylase subunit beta (*P4HB*) und Integrin beta-1 (*ITGB1*). All diese Gene sind in den Aufbau der extrazellulären Matrix und in die Entwicklung von Fibrose involviert.

Tabelle 12. Liste der 22 Adipo-Myokine und ihre Regulation in den individuellen Datensätzen von Skelettmuskel und Fettgewebe
(modifiziert nach Schering et al. 2015)

Muskel	aEX+0 vs. SED MS	aEX+3 vs. SED MS	cEX vs. SED MQF	B6 vs. DIO MQF	NZO vs. B6 MQF	NZO vs. DIO MQF	B6 vs. UCP1Tg MQF+MG	JB vs. CH MLD	SEGFAM H vs. N MLD
<i>CALU</i>	1,14	1,30		-1,28		-1,39		2,44	
<i>CCL11</i>	1,70	1,26	-1,24		-1,31	-1,50	-1,31		
<i>CELSR2</i>		1,77	-1,26		-2,05	-1,87	-1,33		
<i>CKAP4</i>	-1,70				-6,66	-7,67	1,29	1,78	
<i>CLIC4</i>	1,47	1,59	1,59		-5,97	-5,42	2,12	7,09	1,20
<i>DPT</i>	1,17	-1,11		-1,41	1,93	1,39	-1,17		
<i>EIF4B</i>		-1,12		-1,18	-1,14	-1,33	1,39	1,37	0,93
<i>FAM20C</i>	2,25				1,27		-1,54	0,73	1,12
<i>FSTL1</i>		1,06	-1,22		1,59	1,55		2,59	
<i>GPNMB</i>		-1,67	1,79	-1,75		-2,78	-1,35		
<i>HSPE1</i>		-1,86	1,16		1,43	1,45	1,37	1,88	
<i>ITGB1</i>	-1,08	1,23				-1,29	-1,30	5,24	
<i>LEP</i>	-1,76			-14,29	11,05		-1,23		2,16
<i>MXRA8</i>		-1,56		-1,46	3,01	2,11	1,44		
<i>P4HB</i>		1,20		-1,10	1,36	1,25	1,62	0,79	
<i>PRDX4</i>		-1,51			1,33	1,48	1,48	0,76	
<i>PRELP</i>		-1,22	1,41	-1,80	1,76			0,45	
<i>PRNP</i>	1,23	1,32			-1,54	-1,78	-1,18	5,29	
<i>REEP5</i>	1,14	1,03			1,17	1,17		5,49	
<i>TMEM132A</i>	-1,14	1,10				1,47	1,37	0,71	
<i>TMOD3</i>	1,32	1,82			-1,64	-1,72		6,14	
<i>VEGFC</i>		-1,76	-1,56		2,63	2,41		4,31	

Fett	B6 vs. DIO SCF	B6 vs. DIO GFG	NZO vs. B6 SCF	NZO vs. B6 GFG	NZO vs. DIO SCF	NZO vs. DIO GFG	JB vs. HS SCF	JB vs. HS IMF
<i>CALU</i>	-2,69	-1,95	1,53	1,43	-1,77	-1,23		
<i>CCL11</i>	-2,48	-3,35			-2,46	-1,80	3,20	
<i>CELSR2</i>	1,72	2,68	-4,18	-2,48	-2,47		-1,60	
<i>CKAP4</i>		-1,64	-17,98	-13,09	-19,17	-22,67		
<i>CLIC4</i>		-1,55	-4,32	-4,32	-5,29	-6,32		1,64
<i>DPT</i>	-4,34	-2,21	1,61	1,66	-2,72	-1,55		
<i>EIF4B</i>		1,28	-1,35	-1,32			1,18	1,47
<i>FAM20C</i>	-4,58	-3,38	5,12	4,23		1,61		
<i>FSTL1</i>	-2,77	-2,83	1,42	1,62	-1,97	-1,48		
<i>GPNMB</i>	-2,92	-28,44	-2,03		-6,02	-18,28		
<i>HSPE1</i>	1,41			1,71	1,80	1,47		1,59
<i>ITGB1</i>	-1,74	-1,94	1,26	1,48	-1,39	-1,18		
<i>LEP</i>	-15,91	-6,10	5,74	4,03	-2,82			
<i>MXRA8</i>	-4,12	-2,36	2,98	2,47	-1,38			
<i>P4HB</i>	-1,67	-1,49	1,29		-1,31	-1,20		
<i>PRDX4</i>	-1,75	-1,95	1,41	1,70			1,68	
<i>PRELP</i>	-9,64	-3,33	3,26	2,46	-2,86			
<i>PRNP</i>	-2,10	-1,84	1,43	1,57				2,50
<i>REEP5</i>	-3,26	-2,70	2,01	2,21	-1,64			
<i>TMEM132A</i>	-2,37	-2,39	1,49		-1,60	-1,49		
<i>TMOD3</i>		-1,23	-1,82	-1,63	-1,98	-2,08		1,97
<i>VEGFC</i>	-1,61	-1,85	2,34	2,34	1,47			

Abkürzungen: aEX0 - nach akuter Belastung, aEX3 - 3 Stunden nach akuter Belastung, B6 - C57BL/6J-Mäuse, CH - Charolais, cEX - nach chronischer Belastung, DIO - diet-induced obesity (diät-induziertes Übergewicht), GFG - gonadales Fettgewebe, H - hoher IMF-Gehalt, HS - Deutsche Holstein, IMF - intramuskuläres Fett, JB - Japanese Black, MG - musculus gastrocnemius, MLD - musculus longissimus dorsi, MQF - musculus quadriceps femoris, MS - musculus soleus, N - niedriger IMF-Gehalt, NZO - New Zealand obese, SCF - subkutanes Fettgewebe, SED - sedentary (inaktiv), SEGFAM - Bullen einer F₂-Kreuzung, UCP1Tg - UCP1-überexprimierende Mäuse, CALU - Calumenin, CCL11 - C-C motif chemokine 11, CELSR2 - Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2, CKAP4 - Cytoskeleton-associated protein 4, CLIC4 - Chloride intracellular channel 4, DPT - Dermatopontin, EIF4B - Eukaryotic translation initiation factor 4B, FAM20C - Extracellular serine/threonine protein kinase FAM20C, FSTL1 - Follistatin-related protein 1, GPNMB - Transmembrane glycoprotein NMB; HSPE1 - Heat shock protein 1, ITGB1 - Integrin beta-1 (fibronectin receptor beta), LEP - Leptin, MXRA8 - Matrix-remodeling-associated protein 8, P4HB - Prolyl 4-hydroxylase subunit beta, PRDX4 - Peroxiredoxin-4, PRELP - Proline-arginine-rich end leucine-rich repeat protein bzw. Prolargin, PRNP - Major prion protein, REEP5 - Receptor expression-enhancing protein 5, TMEM132A - Transmembrane protein 132A, TMOD3 - Tropomodulin-3, VEGFC - Vascular endothelial growth factor c.

4.1.4 Netzwerk-Analyse der Gene mit High-Score

Die Listen der different exprimierten Gene aus 79 potentiellen Adipokinen und 119 vermeintlichen Myokinen wurden zusätzlich einer funktionellen Netzwerkanalyse mit Hilfe von IPA unterzogen. Eine Übersicht der Netzwerke mit den höchsten Scores ist in Tabelle 13 aufgeführt. Die zwei Netzwerke mit dem höchsten Score und damit der größten Bedeutung waren laut Ingenuity-Score „Zellaufbau und zelluläre Organisation, zelluläre Funktion und Aufrechterhaltung, Zellmorphologie“ für Myokine und „Entwicklung und Funktion des kardiovaskulären Systems, Zellkommunikation und Interaktion, Gewebeentwicklung“ für die Adipokine. Diese beiden Netzwerke sind in Abbildung 7 und 8 dargestellt.

Tabelle 13. Liste der wichtigsten Netzwerke für Adipokine und Myokine inklusive Score aus der IPA

(modifiziert nach Schering et al. 2015)

	Score	Krankheiten und Funktionen
Sezernierte Myokine mit High-Score	41	Zellaufbau und zelluläre Organisation, zelluläre Funktion und Aufrechterhaltung, Zellmorphologie
	28	Zelltod und Überleben, Entwicklung und Funktion des kardiovaskulären Systems, Zellmorphologie
	28	Verhalten, neurologische Krankheiten, Verletzungen und Fehlbildungen des Organismus
	28	Lipidmetabolismus, Nukleinsäuremetabolismus, Biochemie kleiner Moleküle
	26	Entwicklung und Funktion des kardiovaskulären Systems, Zellbewegung, Embryonalentwicklung
Sezernierte Adipokine mit High-Score	45	Entwicklung und Funktion des kardiovaskulären Systems, Zellkommunikation und Interaktion, Gewebeentwicklung
	32	Entwicklung und Funktion des Nervensystems, Organmorphologie, Entwicklung des Organismus
	29	Aminosäuremetabolismus, molekularer Transport, Biochemie kleiner Moleküle
	24	Zellkommunikation und Interaktion, Entwicklung und Funktion des hämatologischen Systems, Überempfindlichkeitsreaktionen
	9	Zellaufbau und zelluläre Organisation, Zellzyklus, Entwicklungsstörungen
Myokine mit High-Score	50	Krebs, Entwicklungsstörungen, Erbkrankheiten
	47	Embryonalentwicklung, Entwicklung des Organismus, Gewebeentwicklung
	42	Entwicklungsstörungen, Erbkrankheiten, metabolische Krankheiten
	39	kardiovaskuläre Krankheiten, Erbkrankheiten, Verletzungen und Fehlbildungen des Organismus
	37	Nukleinsäuremetabolismus, Biochemie kleiner Moleküle, Struktur und Entwicklung des Lymphgewebes
Adipokine mit High-Score	37	Zelltod und Überleben, neurologische Krankheiten, Verletzungen und Fehlbildungen des Organismus
	37	Entwicklungsstörung, Erbkrankheiten, metabolische Krankheiten
	35	Kohlenhydratmetabolismus, molekularer Transport, Biochemie kleiner Moleküle
	35	Zellmorphologie, Zellverständigung, Posttranslationale Modifikation
	33	Entwicklungsstörung, neurologische Krankheiten, molekularer Transport

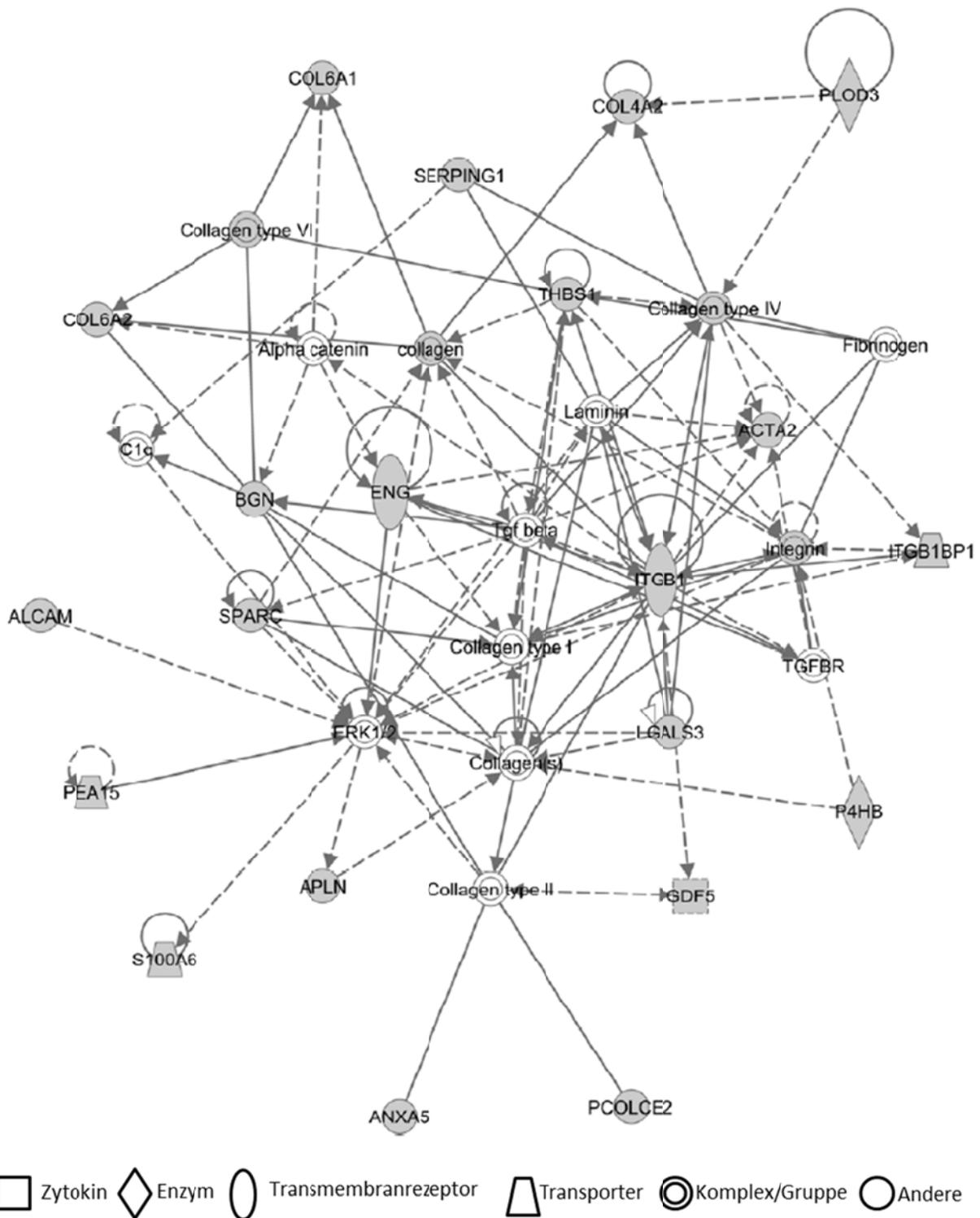


Abbildung 8. Netzwerk unterschiedlich exprimierter Gene in der funktionellen Kategorie „Entwicklung und Funktion des kardiovaskulären Systems, Zellkommunikation und Interaktion, Gewebeerwicklung“

Die Gene sind sezernierte Adipokine mit einem Score ≥ 5 . Die durchgezogenen Linien stehen für direkte Interaktionen zwischen den Genen, gestrichelte Linien weisen auf indirekte Wechselwirkungen hin. (modifiziert nach Schering et al. 2015)

Integrin *ITGB1* spielt eine zentrale Rolle im Netzwerk der sezernierten Adipokine mit dem höchsten Score (Abb. 8). Neben seiner Funktion als Zelladhäsionsmolekül übermittelt es auch Signale der Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) wie Kollagene, Integrine

und Laminine in die Zelle. Die dominierenden Kollagene im Fettgewebe sind u.a. die Kollagene Typ VI, die in enger Beziehung zu Biglycan (*BGN*) und den Kollagenen Typ IV stehen. Sie sind mit Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 (*PLOD3*) und Thrombospondin-1 (*THBS1*) assoziiert, wobei der letztere Kandidat auch ein Zielgen für *TGFB* repräsentiert und die Kollagene miteinander vernetzt. *TGFB* wird von Secreted protein acidic rich in cysteine (*SPARC*) moduliert. *P4HB* erscheint hier als Gen mit unklaren Einflüssen auf die Kollagenstruktur.

Interessanterweise befindet sich *ITGB1* auch im Zentrum des relevantesten Myokin-Netzwerks. Wie Abbildung 7 verdeutlicht, existieren enge Verbindungen zu den Kollagenen, Integrinen und zu Fibrinogen. Collagen alpha-1(I) chain (*COL1A1*) wird von *ITGB1* stimuliert und stellt wiederum ein Bindeglied zu Proline arginine-rich and leucine-rich repeat (*PRELPP*) dar. Ein anderer Faktor, der eventuell eine Verknüpfung mit Strukturmolekülen aufweist, ist *P4HB*, ein Protein mit einer direkten Verbindung zum Major prion protein (*PRNP*). Die Kollagene stehen in Wechselwirkung mit dem Zytokin *TGFB*. Seine Isoform *TGFB2* interagiert mit *DCN*, welches selbst hingegen den Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (*TIMP3*) als vermeintliches Zielgen hat.

Eine Erkenntnis der speziesübergreifenden Analyse war es, dass einige Adipokine, Myokine und Adipo-Myokine in fibrotische Prozesse involviert sind. Die maßgeblichsten fibrose-assoziierten Faktoren sind in einem vereinfachten Schema in Abbildung 9 hervorgehoben. Darin nehmen *VEGFA*, Insulin-like growth factor binding protein 5 (*IGFBP5*) und Bindegewebsfaktoren wie *COL1A1* eine zentrale Bedeutung ein.

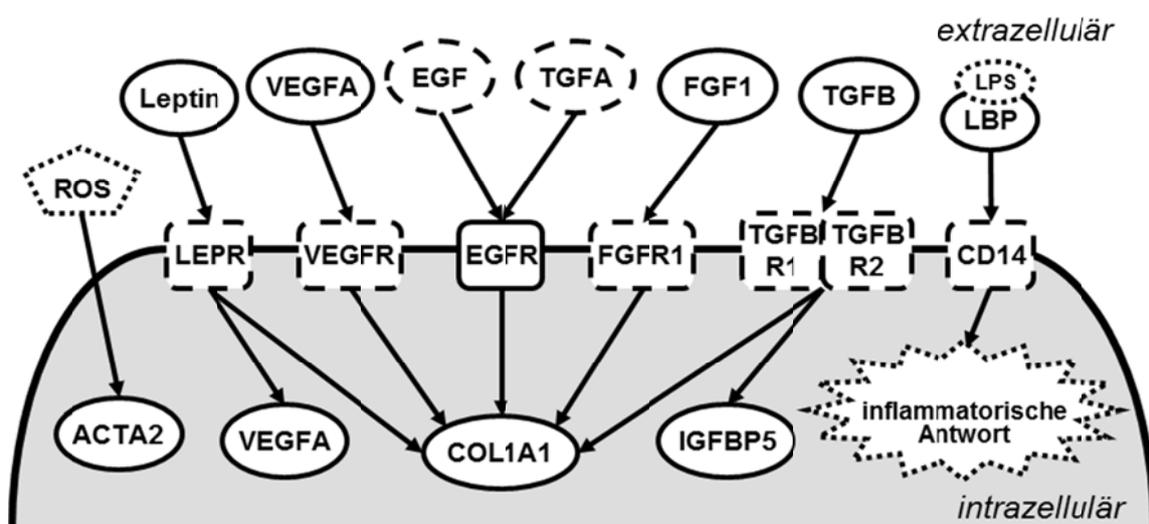


Abbildung 9. Veranschaulichung der wichtigsten identifizierten Faktoren, die bei der Entstehung von Fibrose involviert sind

Die durchgezogenen Linien deuten auf regulierte Transkripte hin, die in dem kombinierten Datensatz gefunden wurden. (modifiziert nach Schering et al. 2015)

4.2 Vergleichende Expressionsanalysen von ausgewählten Kandidatengen im Skelettmuskel- und Fettgewebe von Bullen der SEGFAM-Population

Nach der speziesübergreifenden Datenanalyse erfolgte eine Auswahl an Genen vor allem aufgrund ihrer potentiellen Bedeutung und Signifikanz bei Mensch und Maus oder aufgrund von Hinweisen aus Literaturquellen. Obwohl für die Erstellung der Auswertungsmatrices die Daten von zwei bovinen Arrays (Rinder einer F₂-Kreuzung, Rinderrassen mit differenter IMF-Akkumulation) einbezogen wurden, wurden für die weiteren Analysen hauptsächlich die Informationen aus der SEGFAM-Population betrachtet, da hierzu umfangreiches Probenmaterial für Verifizierungen zur Verfügung stand. In den MLD-Proben der F₂-Bullen mit unterschiedlichem IMF-Gehalt wurde die mRNA-Expression folgender Gene untersucht: Annexin A1 (*ANXA1*), Growth differentiation factor 15 (*GDF15*), WNT inhibitory factor 1 (*WIF1*), Cell death-inducing DNA-fragmentation-factor like effector c (*CIDEA*).

ANXA1 war in den Datensätzen zu den Fettgewebsdepots von Rind und Maus stark reguliert und hatte daher in der Adipokin-Konsensliste den höchstmöglichen Score von 8 erreicht. Außerdem wurde es als interessantes Kandidatengen angesehen, weil Literaturquellen auf seine Funktion in verschiedenen zellulären Prozessen hinweisen. *GDF15* hatte auf der Konsensliste der Adipokine in der vorliegenden Arbeit einen Score von 3. Obwohl es in der Matrix der Myokine lediglich einen Score von 1 erreichte, wurde *GDF15* als vielversprechender funktioneller Kandidat weiter betrachtet, weil Literaturdaten auf seine Bedeutung im humanen Stoffwechsel hinweisen. Beim Nutztier wiederum handelt es sich um ein gering konserviertes Gen mit völlig unklarer Expression und Bedeutung beim Rind. Laut Literatur liegt es aber in einer kartierten QTL-Region für Marmorierung und Fettdicke (McClure et al. 2010, Imumorin et al. 2011, Nalaila et al. 2012). Mit *WIF1* ergab sich nach der Auswertung der Matrices ein nächstes putatives Kandidatengen. Es hatte einen Myokin-Score von 5 und einen Adipokin-Score von 4. In beiden Fällen wurde das Gen signifikant in den murinen Modellen reguliert. Aus der Literatur ist zudem bekannt, dass *WIF1* im Rindengenom innerhalb von zwei QTLs zu Fettanteil und Fettdicke liegt (Casas et al. 2003, Casas et al. 2000), die jedoch durch eine sehr geringe Markerdichte gekennzeichnet sind (Hansen et al. 2007). Ein weiterer funktioneller Kandidat, der sich nach der Auswertung der bovinen SEGFAM-Muskel-Array-Daten und der Literatur ergab, war *CIDEA*. Es wurde zwar nicht über die Konsensliste für Adipokine herausgefiltert, denn es wies in der Fettgewebe-Matrix lediglich einen Adipokin-Score von 3 auf. Dieser kam jedoch durch die signifikante Genregulation in den Mausmodellen mit Diätintervention zu Stande und könnte somit auch beim Rind durch Fütterung modulierbar sein. Der Myokin-Score hingegen war auf die Genregulation in Mäusen und Rindern zurückzuführen und betrug 5. Zur Bedeutung von *CIDEA* bei Rindern gibt es bislang sehr wenige Erkenntnisse. Es ist lediglich bekannt, dass

es am Rand eines sehr großen QTL-Intervalls für Marmorierung bei Rindern lokalisiert ist (Gutiérrez-Gil et al. 2008, Gutiérrez-Gil et al. 2009).

In den Array-Daten, die zu den Rindern vorlagen, wies *ANXA1* signifikante Unterschiede in der Genexpression im MLD zwischen JB und HS (7,43-fach, $P=0,02$) und zwischen HS und CH (5,83-fach, $P=0,01$) auf. Zudem war das Gen im IMF zwischen JB und HS different exprimiert (1,78-fach, $P=0,03$). Mit Hilfe der RT-qPCR waren jedoch keine signifikanten Genexpressionsunterschiede von *ANXA1* in den MLD-Proben der 20 Bullen mit hohem oder niedrigem IMF-Gehalt festzustellen (1,028-fach, $P=0,707$). Deshalb wurden keine weiteren Untersuchungsschritte angeschlossen. Zu den mRNA-Konzentrationen von *GDF15* und *WIF1* im MLD der untersuchten Rinder konnte nach Auswertung der bovinen Arrays keine Aussage getroffen werden, da beide Gene nicht auf dem bovinen Array repräsentiert waren. Daher sollte deren Genexpression im MLD der beiden Bullen-Gruppen mit unterschiedlichem IMF-Gehalt überprüft werden. Dafür wurden zunächst Primer abgeleitet und positiv auf ihre Spezifität getestet. In den meisten Proben konnte mittels RT-qPCR trotzdem nur wenig oder gar kein Genprodukt nachgewiesen werden. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, dass *GDF15* und *WIF1* eine wichtige Rolle im Stoffwechsel des bovinen Skelettmuskels zum Untersuchungszeitpunkt spielen. Das Gen *CIDEA* war auf dem Array im MLD der Bullen mit erhöhtem IMF-Gehalt signifikant höher exprimiert im Vergleich zu den Bullen mit niedrigem IMF-Gehalt (3,22-fach, $P=0,02$). Mit Hilfe der RT-qPCR konnte die signifikant unterschiedliche Genexpression aus dem Microarray zwischen den Bullen mit hohem oder niedrigem IMF-Gehalt bestätigt werden (1,8-fach, $P=0,03$).

4.2.1 Analyse von *THBS4* beim Rind

Durch die speziesübergreifende Datenanalyse wurde Thrombospondin-4 (*THBS4*) als putatives, belastungsinduziertes und adipositas-assoziiertes Myokin identifiziert, welches mit der Körperzusammensetzung und dem Körpergewicht im Zusammenhang stehen könnte. Insgesamt hatte es einen Score von 5 und war signifikant im MLD zwischen JB und CH reguliert. In den Arrays lag allgemein eine relativ starke Expression im bovinen Skelettmuskel und IMF vor, im SCF wurde *THBS4* schwächer exprimiert. Außerdem könnte das Gen die Körperzusammensetzung von Rindern beeinflussen, da es in einer QTL-Region für Marmorierung und Fettanteil beim Rind lokalisiert ist (Gutiérrez-Gil et al. 2009, Nalaila et al. 2012).

Mit Hilfe der RT-qPCR wurde die Expression zweier Fragmente von *THBS4* im MLD der 20 SEGFAM-Bullen überprüft. Eine differentielle Expression des Gens zwischen den Gruppen konnte jedoch mit beiden Amplicons nicht nachgewiesen werden (Fragment 1: 1,013-fach, $P=0,901$; Fragment 2: 1,028-fach, $P=0,812$).

Da jedoch keinerlei Informationen zu diesem Gen beim Rind vorliegen, sollte mit Hilfe der LCM und anschließender Detektion der mRNA-Menge in den isolierten Zelltypen die Herkunft von *THBS4* ermittelt werden. Dazu wurden drei separate LCM-Experimente durchgeführt, in denen zusätzlich die Expression der Markergene *FABP3* für Muskelfasern und *FABP4* für Fettzellen gemessen wurde, um die Reinheit der Zelltyppräparate zu verifizieren. Während die Markergene erwartungsgemäß entweder nur in Adipozyten oder Myozyten exprimiert wurden, ergab sich für *THBS4* kein reproduzierbares Ergebnis. Somit keine konkrete Aussage über den exprimierenden Zelltyp des Gens möglich (Tab. 14).

Tabelle 14. C_T-Werte von *THBS4* und Zelltyp-Markern aus der Analyse der RT-qPCRs

	Gewebeschnitt 1		Gewebeschnitt 2		Gewebeschnitt 3	
	FZ	MF	FZ	MF	FZ	MF
<i>FABP3</i>	-	23,6	-	25,1	-	28,5
<i>FABP4</i>	19,7	-	23,7	-	22,8	-
<i>THBS4</i>	25,2	27,7	-	26,7	26,6	-

Abkürzungen: FZ - Fettzellen, MF - Muskelfasern

Um nachzuweisen, dass *THBS4* in den mittels LCM ausgeschnittenen Gewebeflächen vorhanden war, wurden Serienschnitte für immunhistochemische Färbungen verwendet. Beim bovinen *THBS4* handelt es sich um ein Protein aus 962 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 106 kDa (UniProtKB: Q3SWW8). Da das Protein eine Homologie von 92 % zum *THBS4* des Menschen aufweist, konnte für die proteinbiochemischen Methoden auf einen spezifischen humanen Antikörper zurückgegriffen werden. Abbildung 10 a, b zeigt die markierten Flächen in diesen angefertigten Serienschnitten des bovinen MLD während der LCM. Die Kernfärbung der Serienschnitte macht alle vorhandenen Nuklei sichtbar (Abb. 10 c, d). Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers wurde das *THBS4*-Protein im Serienschnitt mit Immunfluoreszenz detektiert. Auf diese Weise konnte derselbe Ausschnitt von einem Gewebe unterschiedlich dargestellt und verglichen werden. In den Adipozyten des intramuskulären Fetts war kein Signal festzustellen. Diffuse Signale konnten der extrazellulären Matrix zwischen Fett- und Muskelzellen und der Umgebung der Muskelfasern zugeordnet werden. Es gab keine eindeutigen Hinweise auf eine Lokalisation im Zellkern (Abb. 10 e, f).

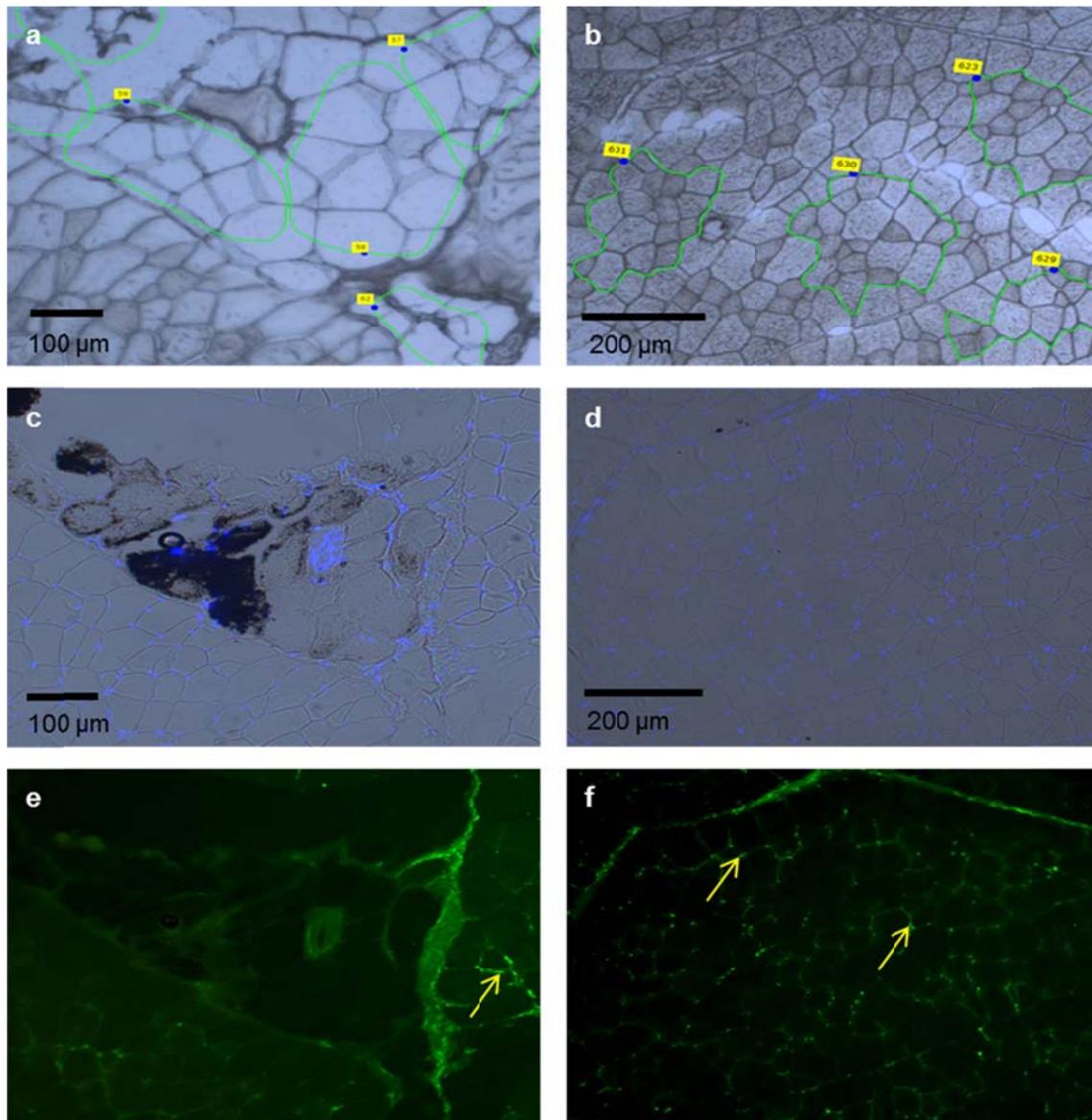


Abbildung 10. Zelluläre Lokalisation von THBS4 in bovinen Serienschritten des MLD

Das THBS4-Protein wurde mit dem humanspezifischen polyklonalen Kaninchen anti-THBS4 Primärantikörper und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG markiert und in der Umgebung von Fettzellen und Muskelfasern gefunden. Abgebildet sind die isolierten Flächen der Fettzellen und Muskelfasern für die LCM (a, b). Zur besseren Vergleichbarkeit sind parallel Aufnahmen der Serienschritte mit Kernfärbung dargestellt (c, d). Die gelben Pfeile weisen auf Farbsignale im Bereich der Muskelfasern hin (e, f).

Da THBS4 ein sezernierter Faktor ist, wurde vermutet, dass das Protein im Blut zirkuliert und daher im Muskel mit Blutgefäßen assoziiert ist. Um herauszufinden, ob das Farbsignal im Interstitium in Blutgefäßen lokalisiert ist, wurde die Immunfluoreszenz- und Kernfärbung zusätzlich mit einer Kapillarfärbung des Muskelquerschnitts kombiniert. In Abbildung 11 wird deutlich, dass der spezifische Antikörper nicht an die Kapillaren bindet. Nur in den Bindegewebszellen zwischen den Muskelfasern konnte THBS4 detektiert werden. Eine eindeutige Zuordnung des Signals zu einem bestimmten Zellorganell ist allerdings nicht möglich.

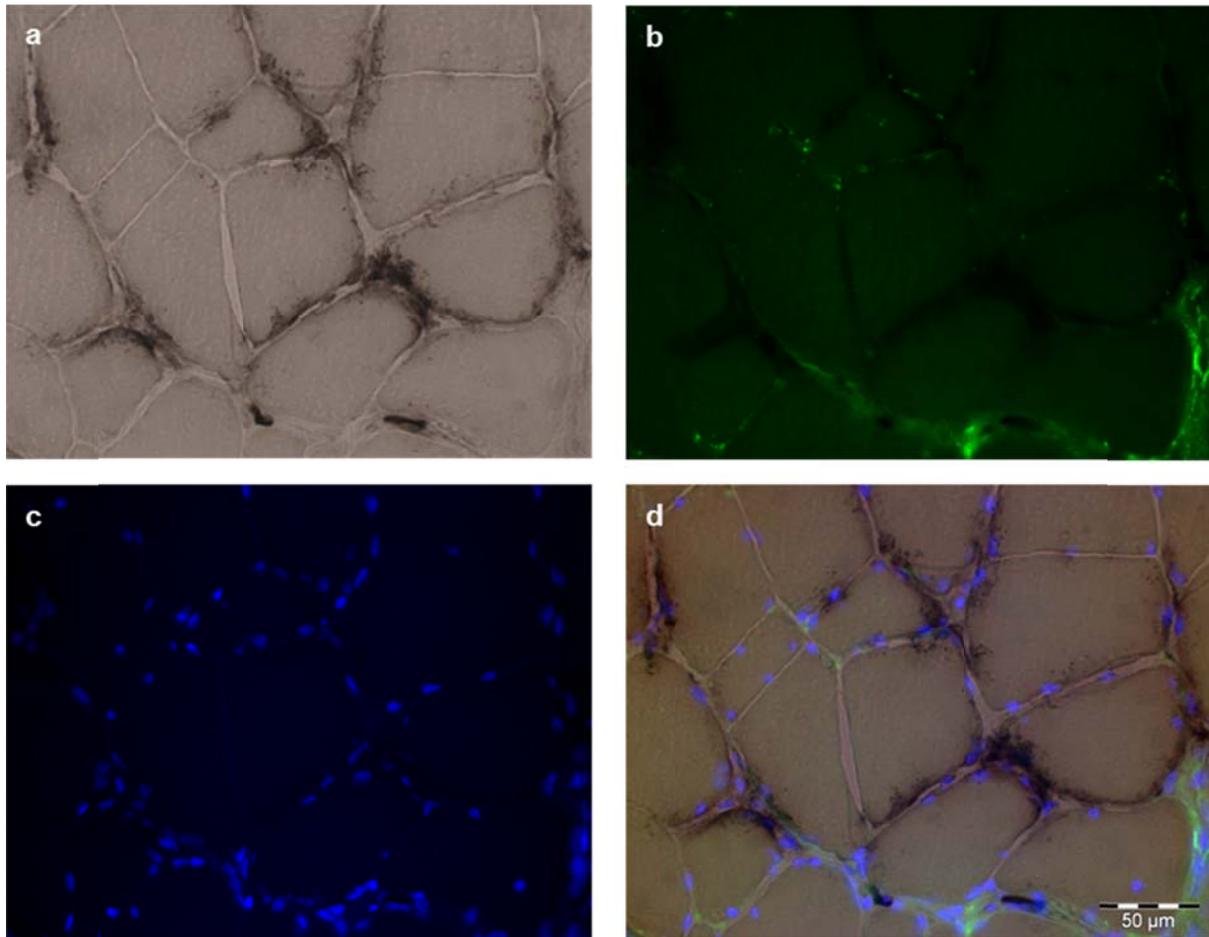


Abbildung 11. Zelluläre Detektion von THBS4 im bovinen Muskelquerschnitt

Das Protein war nicht in den Kapillaren lokalisiert. Ein deutliches Farbsignal ist im Bindegewebe zwischen den Muskelfasern erkennbar. (a) Kapillarfärbung, (b) Immunhistochemie, (c) Hoechst 33258 Kernfärbung, (d) Überlagerung der Bildaufnahmen.

Die Proteinmenge im MLD lag in allen Proben außer einer unterhalb des Detektionslimits. Eine Quantifizierung der THBS4-Menge war daher nicht möglich. Im Blut-Plasma der Rinder konnte dagegen ein auswertbares Signal gemessen und quantifiziert werden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression auf Proteinebene von THBS4 im Plasma der F₂-Bullen mit hohem bzw. niedrigem IMF-Gehalt (Abb. 12).

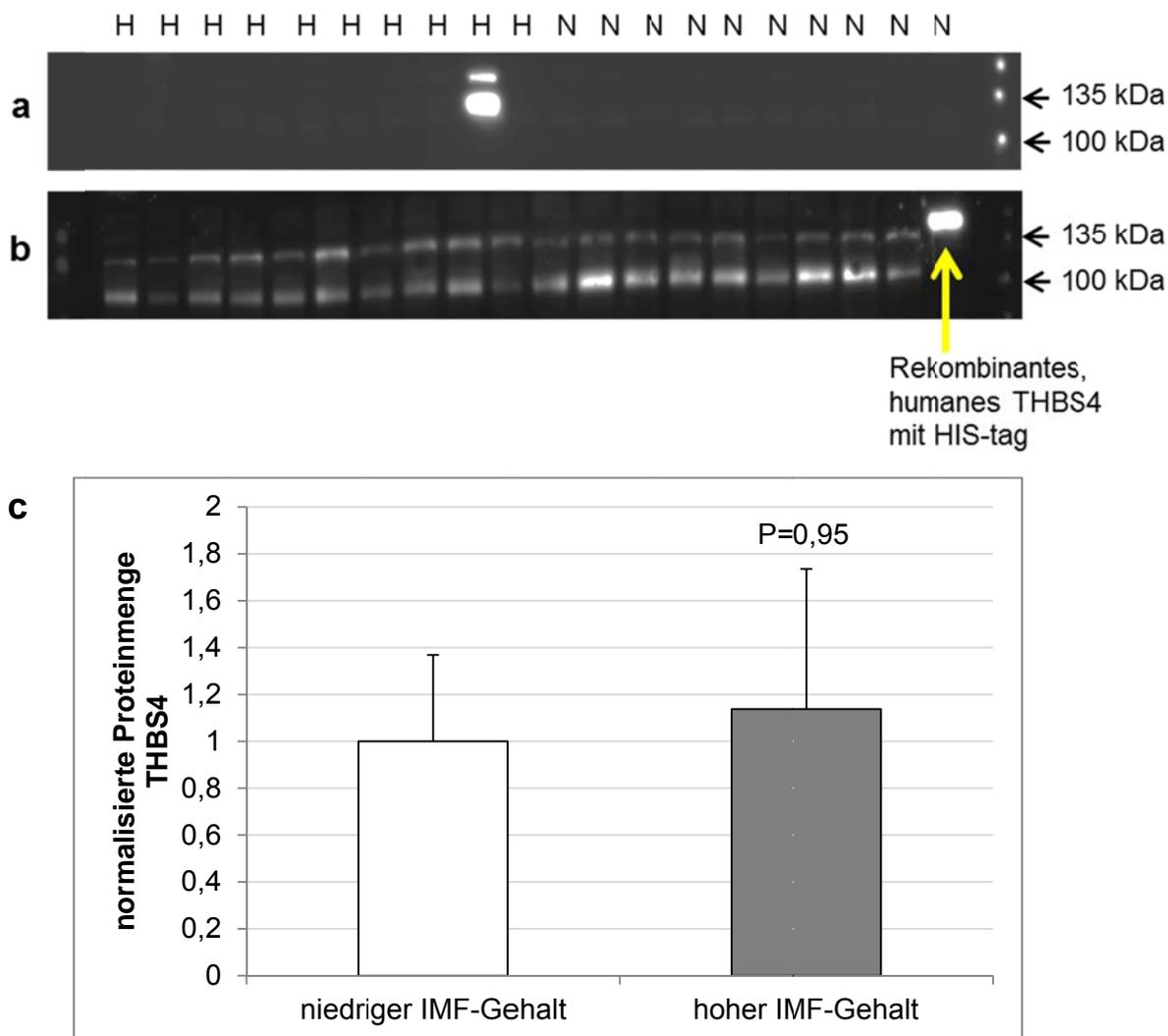


Abbildung 12. Detektion von THBS4 im MLD und Plasma von F₂-Bullen zum Zeitpunkt der Schlachtung mit Hilfe des Western Blots

In nur einem der 20 Tiere konnte eine THBS4-Proteinbande im Skelettmuskel detektiert werden (a). Zirkulierendes THBS4 wurde im Plasma der F₂-Bullen mit hohem (n=10) oder niedrigem (n=10) IMF-Gehalt gefunden (b). Die Menge des zirkulierenden THBS4 war zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (c).

Abkürzungen: HIS-tag - Polyhistidin-tag, H - hoher IMF-Gehalt, N - niedriger IMF-Gehalt

4.2.2 Analyse von *THRSP* beim Rind

Für die Auswahl von Thyroid hormone responsive protein (*THRSP*) als aussichtsreiches Kandidatengen sprachen in dem Fall die Muskel-Array-Daten der SEGFAM-Population und Kenntnisse aus der Literatur. Das Gen liegt nach Angaben von McClure et al. 2010 in einer kartierten QTL-Region für Fettdicke. Außerdem wird es seit einiger Zeit im Zusammenhang mit IMF bei Rindern diskutiert (Wang et al. 2009, de Jager et al. 2013, Hudson et al. 2015). Die eigene Transkriptomanalyse des MLD von den zehn Bullen der F₂-Generation einer Kreuzung aus Charolais × Deutsche Holstein mit hohem IMF im Vergleich zu den zehn Tieren mit niedrigem IMF zeigte eine sechsfach höhere Expression (Kamolka et al. 2014c). Der Score in der Fettgewebe-Matrix betrug 3 und wurde einzig durch signifikante Effekte auf

die Genexpression in den Mausmodellen mit Fütterungsintervention verursacht. In den bovinen Microarray-Daten des Fettgewebes war *THRSP* nicht signifikant unterschiedlich exprimiert. In der Muskel-Matrix war der Score aufgrund von signifikanten Expressionsunterschieden bei den Mäusen und Rindern ebenfalls 3. Auch wenn *THRSP* bei der Suche in den Konsenslisten nicht unter die Gene mit einem Top-Score fiel, wurde es als funktioneller Kandidat für die anschließenden Validierungsmethoden betrachtet, vor allem, weil die Transkriptmenge nicht bewegungsinduziert, sondern diätassoziiert reguliert zu sein schien.

4.2.2.1 mRNA-Expression von *THRSP* in verschiedenen bovinen Geweben

Die Expressionsunterschiede aus dem Microarray zwischen beiden Gruppen im MLD konnten mittels RT-qPCR verifiziert werden (1,7-fach, $P < 0,05$). Im Gegensatz dazu war die Menge der *THRSP*-mRNA im SCF zwischen beiden Gruppen trotz einer hohen Grundexpression nicht signifikant unterschiedlich (1,0-fach, $P = 0,93$). Auch in der Leber waren keine signifikanten Expressionsunterschiede der *THRSP*-mRNA festzustellen (1,1-fach, $P = 0,066$, Abb. 13).

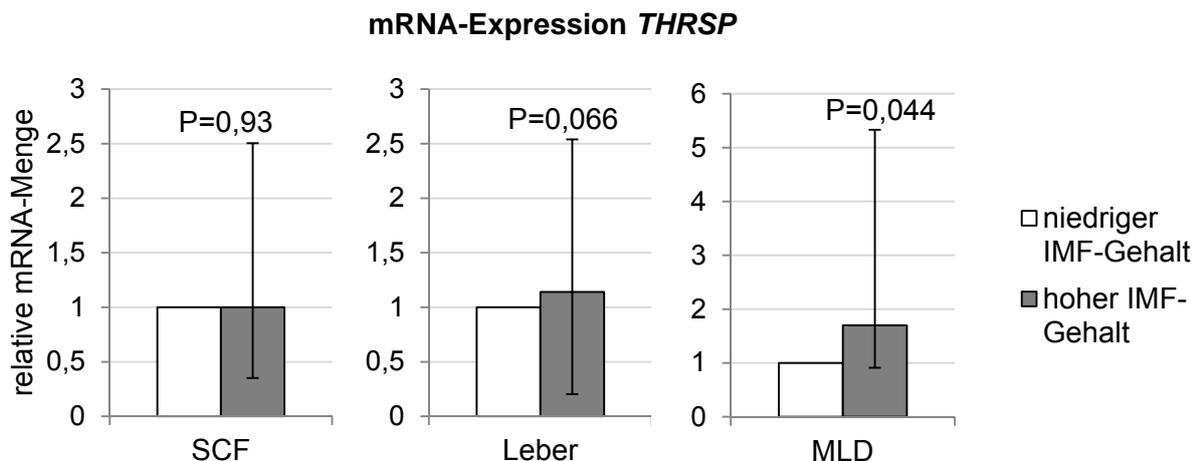


Abbildung 13. mRNA-Expression von *THRSP* in verschiedenen bovinen Geweben

Die Genexpressionslevel wurden mit Hilfe geeigneter Referenzgene normalisiert. Für das SCF wurden die mRNA-Expressionen von *UXT* und *B2M* gemessen, für die Leber die von *UXT* und *RPS9* und für den MLD wurden die mRNA-Konzentrationen von *B2M* und *TOP2B* detektiert. Die Säulen repräsentieren die Gruppenmittelwerte der Duplikate mit Fehlerindikatoren der REST Software (Pfaffl et al. 2002).

Als mögliche Ursache für die differente Expression von *THRSP* wurde die Aktivität des bekannten Interaktionspartners Mid1-interacting protein 1 (*MID1IP1*) und des potentiellen Regulators Carbohydrate-responsive element-binding protein (*MLXIPL* bzw. *ChREBP*) in die Untersuchungen einbezogen. Die mRNA-Konzentrationen beider Gene wurden im MLD gemessen. Aufgrund einer sehr schwachen Expression von *MLXIPL* konnte keine vergleichende Expressionsanalyse vorgenommen werden. Für den Interaktionspartner *MID1IP1* konnten hier keine Expressionsunterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt

werden (1,0-fach, $P=0,98$). In Übereinstimmung mit der *THRSP*-Expression wies *MID1IP1* im SCF eine hohe Basalexpression auf, war aber zwischen den SEGfAM-Bullen mit einem differenten IMF-Gehalt nicht signifikant unterschiedlich exprimiert (1,19-fach, $P=0,29$). Auch in der Genexpression des möglichen *THRSP*-Regulators *MLXIPL* gab es keine signifikanten Unterschiede (1,15-fach, $P=0,21$).

4.2.2.2 Analyse und vergleichende Sequenzierung des *THRSP*-Locus

Um SNPs mit potentiellen Effekten auf die Genregulation als eine mögliche Ursache für die differente Expression zu identifizieren, wurden mit Hilfe der DNA-Sequenzierung Abschnitte des *THRSP*-Locus bei jeweils drei Bullen mit hohem und niedrigem IMF-Gehalt verglichen (Abb. 14).

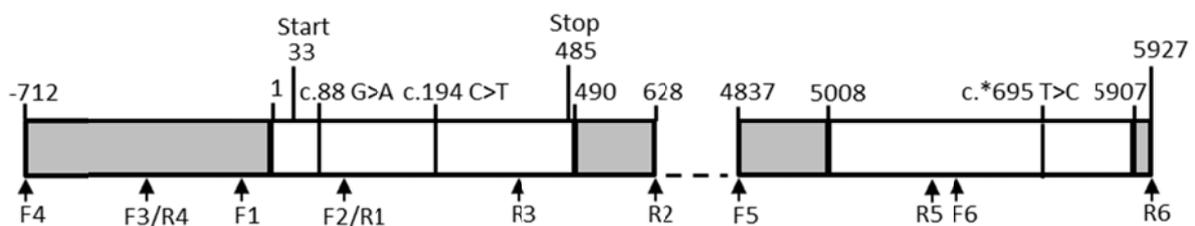


Abbildung 14. Untersuchte Regionen des *THRSP*-Locus

Die Pfeile kennzeichnen die Start- und Endpunkte der verwendeten Primer. Exons sind weiß, Introns sowie intergenische Sequenzen grau dargestellt.

In den analysierten Proben wurden drei SNPs gefunden. Davon waren zwei SNPs, c.88G>A und c.194C>T, bereits aus früheren Untersuchungen bekannt. Ein neuer SNP (c.*695T>C) wurde in der 3'-UTR identifiziert, jedoch segregierte dieser in nur einer Familie innerhalb der F₂-Population. Keiner der SNPs befand sich in Regionen mit potentiellen Effekten auf die Genexpression (Promotor oder micro-RNA-Bindungssequenzen in der 3'-UTR). Eine Analyse von vorhandenen micro-RNA-Expressionsdaten in den beiden untersuchten Gruppen ergab keine differente Expression von micro-RNAs, die *THRSP* als Zielgen aufweisen. In silico-Analysen zeigten darüber hinaus, dass in der Ratte und im Menschen beschriebene, konservierte upstream-regulatorische Elemente des *THRSP*-Gens beim Rind nicht in dieser Form vorhanden sind.

4.2.2.3 Genexpression von *THRSP* auf mRNA- und Proteinebene in verschiedenen Zelltypen

Da bislang keine genetische Ursachen für die beobachteten, signifikanten Genexpressionsunterschiede im MLD von Bullen beider IMF-Gruppen festgestellt wurden, sollte geklärt werden, ob die erhöhte mRNA-Menge von *THRSP* im Skelettmuskel von Bullen mit höherem IMF durch die größere Anzahl an Adipozyten in der Probe verursacht wurde. In drei unabhängigen LCM-Experimenten wurde eine exklusive Expression von *FABP3* in Muskelfasern und von *FABP4* in Adipozyten gefunden, was die Reinheit der Zelltyppräparate

dokumentiert. Eine *THRSP*-Expression konnte nur in Fettzellen, jedoch nicht in Muskelfasern beobachtet werden (Tab. 15).

Tabelle 15. C_T-Werte von *THRSP* und Zelltyp-Markern aus der Analyse der RT-qPCRs

	Gewebeschnitt 1		Gewebeschnitt 2		Gewebeschnitt 3	
	FZ	MF	FZ	MF	FZ	MF
<i>FABP3</i>	-	27,6	-	26,2	-	23,6
<i>FABP4</i>	19,9	-	21,6	-	19,7	-
<i>THRSP</i>	26,5	-	27,3	-	26,0	-

Abkürzungen: FZ - Fettzellen, MF - Muskelfasern

Um aufzuzeigen, dass neben der Genexpression von *THRSP* auf mRNA-Ebene auch eine Expression auf Proteinlevel im bovinen MLD stattfindet, wurden Serienschnitte angefertigt, die entweder für die LCM genutzt wurden, um Areale zu markieren und auszuschneiden (Abb. 15 a, b) oder für immunhistochemische Färbungen. Die Kernfärbung der Serienschnitte zeigt alle vorhandenen Zellkerne (Abb. 15, c, d). Unter Verwendung eines spezifischen bovinen Antikörpers wurde *THRSP* im Serienschnitt sichtbar gemacht. Auf diese Weise konnte derselbe Ausschnitt in einem Gewebe verschiedenartig abgebildet und verglichen werden. Es konnten spezifische Markierungen in den Nuklei von Adipozyten und fettgewebe-assoziierten Zellen festgestellt werden. In den Muskelzellen selbst wurde kein *THRSP*-Protein detektiert (Abb. 15 e, f).

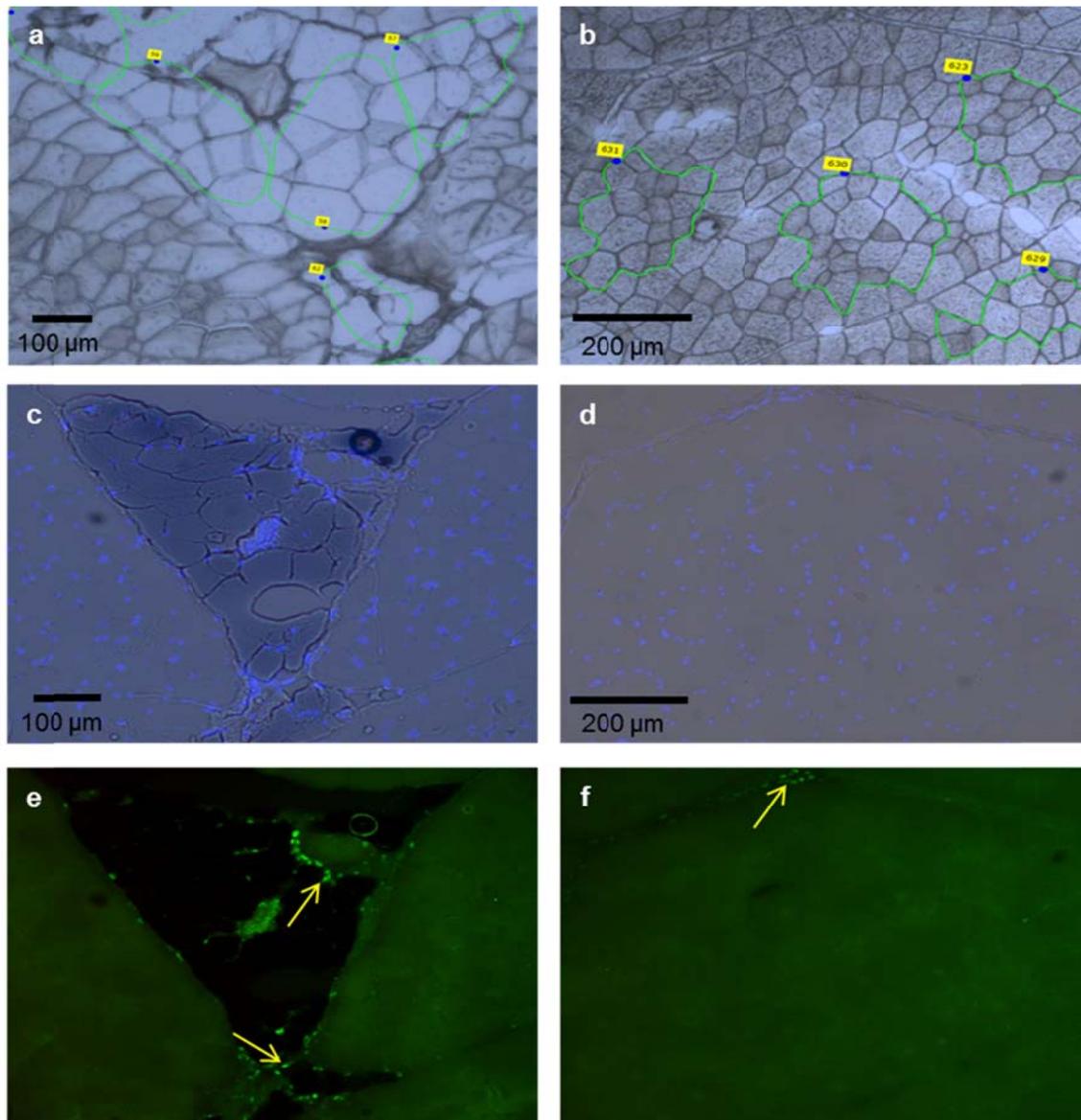


Abbildung 15. Zelluläre Lokalisation von THRSP in bovinen Serienschnitten des MLD

THRSP wurde mit einem spezifischen bovinen Primärantikörper und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG immunhistochemisch detektiert und in den Zellkernen von Fettzellen und fettgewebe-assoziierten Zellen gefunden. Vergleichend sind die markierten Ausschnitte der Fettzellen und Muskelfasern der LCM dargestellt (a, b). Zur direkten Gegenüberstellung der Aufnahmen sind parallel die Serienschnitte mit Kernfärbung abgebildet (c, d). Die gelben Pfeile weisen auf besonders auffällige fluoreszierende Nuklei hin (e, f).

Zusätzlich wurde THRSP in bovinen Gewebeschnitten durch eine Immunfärbung von subkutanem Fettgewebe, Leber und Skelettmuskelgewebe mit Hilfe eines spezifischen bovinen Antikörpers lokalisiert. Es wurden deutliche Fluoreszenzsignale in den Zellkernen von Fettgewebszellen, von Zellen im Interstitium und im Periportalfeld der Leber beobachtet (Abb. 16 a, c, e). Um gefärbte und ungefärbte Nuklei besser voneinander unterscheiden zu können, wurde eine Kernfärbung der Querschnitte durchgeführt (Abb. 16 b, d, f). Die Ergebnisse unterstützen die Aussage aus der Expressionsanalyse der Zelltyppräparate und der immunhistochemischen Färbung der Serienschnitte des MLD, dass THRSP nicht in

Muskelzellen exprimiert wird, jedoch in Fettzellen und assoziierten Zellen des Bindegewebes nachweisbar ist.

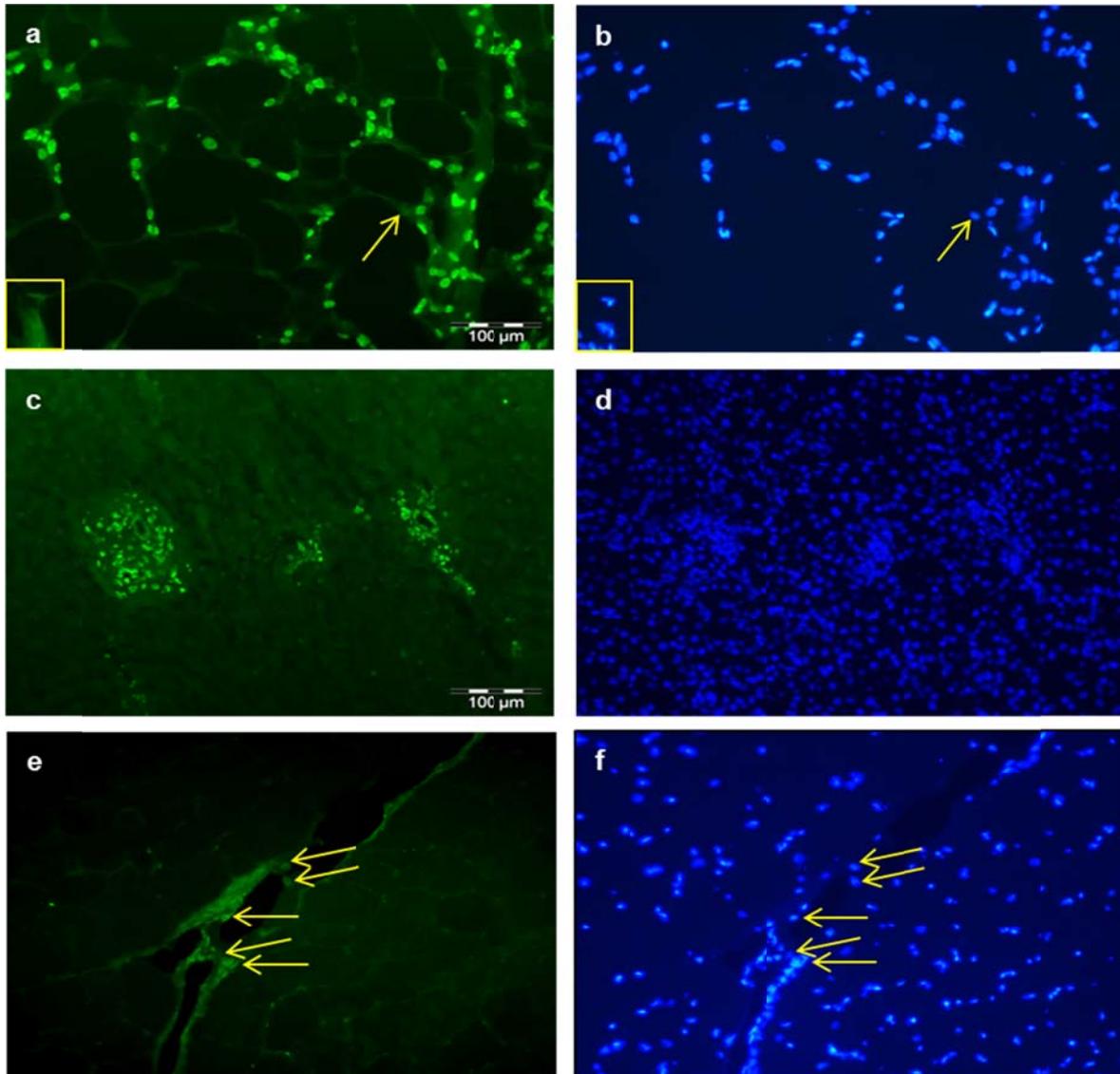


Abbildung 16. Zelluläre Lokalisation von THRSP in bovinen Geweben

Immunhistochemische Detektion von THRSP im Querschnitt von subkutanem Fettgewebe (a), Leber (b) und Skelettmuskelgewebe (c). THRSP wurde mit einem spezifischen bovinen Antikörper und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG detektiert und in den Zellkernen von Fettgewebe, Interstitium und vom Periportalfeld gefunden. Zum Vergleich sind parallel die identischen Aufnahmen der einzelnen Gewebe mit Kernfärbung dargestellt (b, d, f). Die gelben Pfeile und die gelben Kästen deuten auf besonders markante Stellen im Fettgewebe und Skelettmuskel hin.

Die Proteinmenge von THRSP in der Leber und im Muskelproteinextrakt lag im Western Blot unter der Nachweisgrenze. Da die immunhistochemischen Färbungen eine ausschließliche Lokalisation des THRSP-Proteins in den Zellkernen gezeigt hat, wurde eine fraktionierte Proteinextraktion durchgeführt, um Kernproteine und zytoplasmatische Proteine getrennt zu erhalten. So konnte auch in der Leber und im Muskel eine Bande detektiert werden. Wie Abbildung 17 verdeutlicht, konnte THRSP hauptsächlich in der Kernfraktion von Leber und

subkutanem Fett nachgewiesen werden. Im Gesamtprotein des subkutanen Fetts war ebenfalls eine deutliche Proteinbande zu erkennen. Die Zytoplasmafraktion wies in beiden Geweben kein Signal auf.

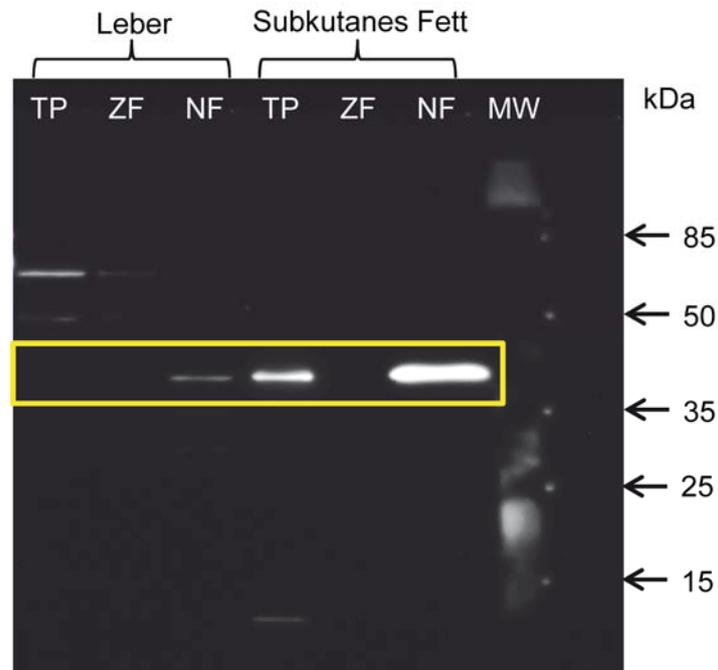


Abbildung 17. Western Blot von Proteinfractionen der Leber und des subkutanen Fettgewebes vom Rind

THRSP konnte bei Betrachtung des Gesamtproteins nur im subkutanen Fett gefunden werden. In der Nuklearfraktion war es sowohl in der Leber als auch im subkutanen Fett nachweisbar. In beiden Geweben konnte kein Protein in der Zytoplasmafraktion detektiert werden.

Abkürzungen: TP - Totalprotein, ZF - Zytoplasmafraktion, NF - Nuklearfraktion, MW - Größenmarker

Die THRSP-Proteinmenge wurde analysiert, um herauszufinden, ob die unterschiedlichen Ergebnisse der mRNA-Expression sich auch auf Proteinebene widerspiegeln. Das bovine THRSP ist ein Protein mit einer Größe von 150 Aminosäuren und einer Masse von ca. 17 kDa (UniProtKB: Q690M9). Auch wenn die Homologie mit dem humanen oder murinen THRSP nur bei 73 % liegt, wurden zunächst kommerziell verfügbare Antikörper gegen murines THRSP getestet. Sie stellten sich allerdings als nicht geeignet für Untersuchungen an bovinem Gewebe heraus. Die Testergebnisse sind ausführlich in Abschnitt 3.2.5.2 erläutert. Da ein spezieller Antikörper gegen das bovine Protein nicht erhältlich war, wurde die Firma Pierce Custom Antibody Service (Thermo Scientific, Rockford, USA) beauftragt, einen polyklonalen, rinderspezifischen Antikörper zu entwickeln und herzustellen. Die Reaktivität des Antikörpers wurde im Western Blot getestet und seine Spezifität wurde durch Blockierung mit dem synthetischen Immunisationspeptid bewiesen. Auch diese Vorversuche werden in Abschnitt 3.2.5.2 näher beschrieben. Weiterhin konnte auch gezeigt werden, dass der rinderspezifische Antikörper gegen THRSP ebenfalls in der Lage ist,

murines rekombinantes THRSP zu detektieren. In Abbildung 18 sind die spezifischen Proteinbanden des rekombinanten Proteins in einer Verdünnungsreihe dargestellt und die Signale im bovinen SCF. Obwohl die Größe von THRSP eigentlich bei 17 kDa liegt, wurden die Proteinbanden auf der Höhe von ca. 38 kDa detektiert. Beim rekombinanten Protein ist die Größe durch einen sogenannten SUMO-Tag zu erklären, der zur Stabilisierung an das Protein gebunden ist. Für das bovine THRSP liegt die Vermutung nahe, dass es in dimerisierter Form vorliegt. Bei der Untersuchung des THRSP-Proteins in der Leber, im SCF und im MLD der 20 Array-Tiere lag das Molekulargewicht der detektierten Bande ebenfalls bei ca. 38 kDa. Im Fall von Leber und MLD wurde die Nuklearfraktion des Gesamtproteins ausgewertet, da im Totalprotein keine detektierbare Bande vorhanden war. Die Intensität der spezifischen Bande war deutlich stärker im SCF als in der Leber oder im Muskel, was den Beobachtungen aus der Immunhistochemie und der mRNA-Expression entsprach. Im Ergebnis der relativen Quantifizierung konnten keine signifikanten Unterschiede der Proteinmenge in den Geweben der F₂-Bullen mit hohem oder niedrigem IMF-Gehalt festgestellt werden (Abb. 19).

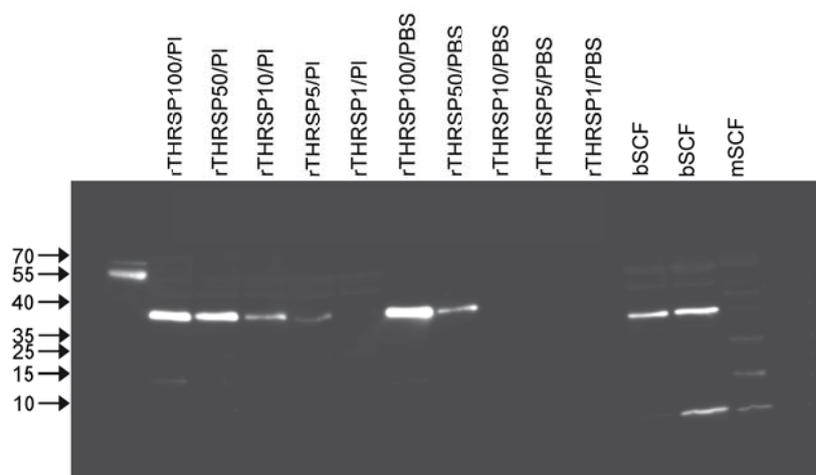
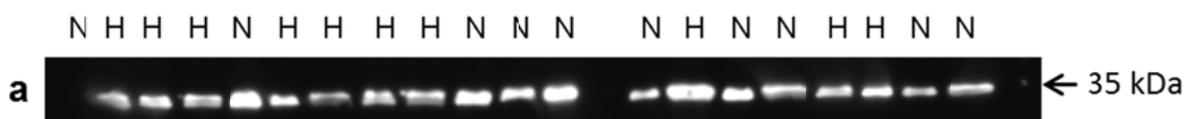


Abbildung 18. Western Blot einer Verdünnungsreihe des murinen rekombinanten THRSP in Plasma oder PBS sowie von bovinem und murinem subkutanen Fettgewebe Markierung spezifischer Banden mit dem rinderspezifischen polyklonalen Antikörper B zur Detektion von THRSP. Der Antikörper wurde 1:500 verdünnt eingesetzt. Abkürzungen: rTHRSP - rekombinantes murines THRSP, PI - Plasma, PBS - phosphatgepufferte Kochsalzlösung, bSCF - bovines subkutanes Fettgewebe, mSCF - murines subkutanes Fettgewebe



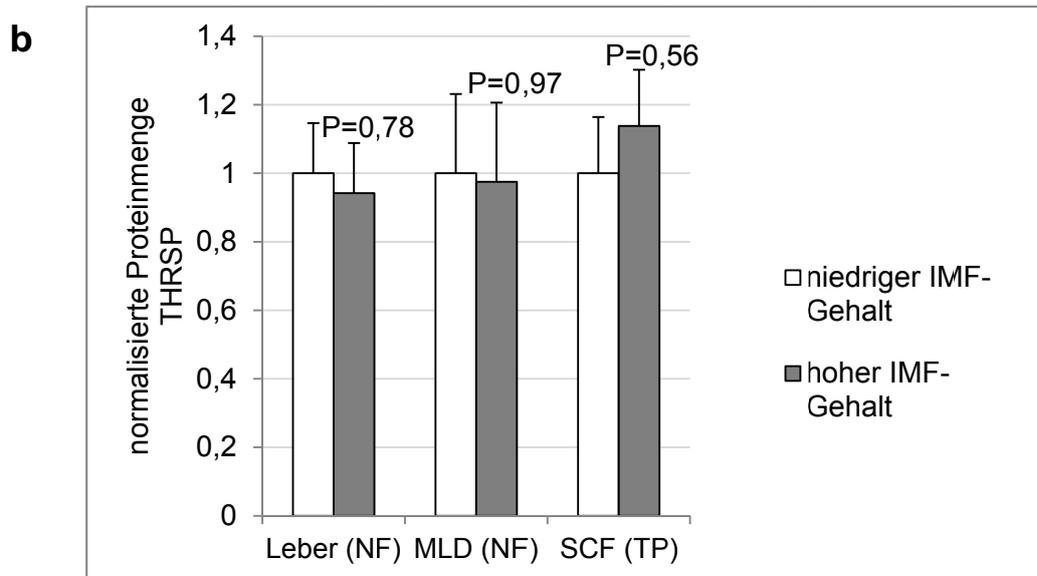


Abbildung 19. THRSP Protein-Expression in verschiedenen bovinen Geweben der F₂-Bullen

Exemplarisch sind die Proteinbanden des SCF dargestellt. Die Verdünnung des Antikörpers B betrug 1:500 (a). In den Proteinmengen der analysierten Gewebeproben wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den F₂-Bullen mit hohem (n=10) und niedrigem (n=10) IMF-Gehalt gefunden (b).

Abkürzungen: H - hoher IMF-Gehalt, MLD - M. longissimus dorsi, N - niedriger IMF-Gehalt, NF - Nuklearfraktion, SCF - subkutanes Fettgewebe, TP - Totalprotein

4.2.2.4 mRNA-Expression während der adipogenen Differenzierung

Um herauszufinden, in welchem Zellstadium *Thrsp* exprimiert wird, wurde dessen mRNA-Menge im Differenzierungsverlauf von 3T3-L1-Zellen gemessen. Dafür wurde zunächst die progressive Fettakkumulation in den 3T3-L1-Zellen mittels der Ölrot-Färbung sichtbar gemacht. Wie Abbildung 20 verdeutlicht, steigt die Anzahl und Größe der Fetttropfen in den Zellen von Tag 2 bis zu Tag 19 in Differenzierungsmedium sukzessive an. Die Ergebnisse zeigen, dass in kultivierten wachsenden Präadipozyten allmählich eine vermehrte Lipideinlagerung und damit eine Differenzierung zu reifen Adipozyten stattfindet.

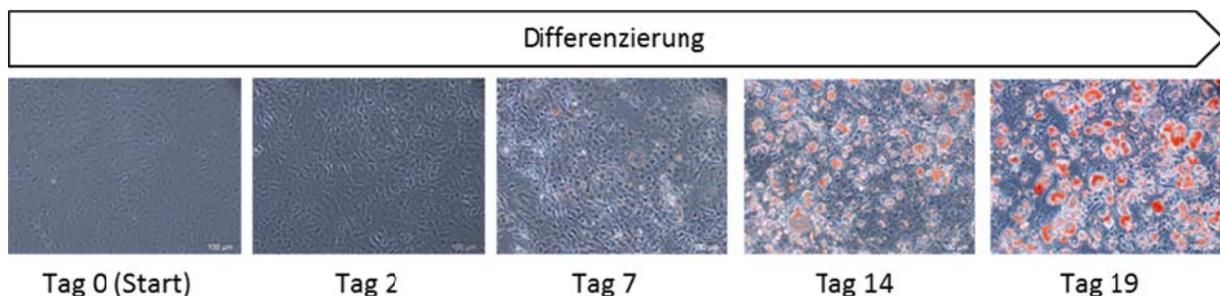


Abbildung 20. Ölrot-Färbung von 3T3-L1-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung zu reifen Adipozyten

Zusätzlich zur *Thrsp*-Expression wurde das mRNA-Vorkommen von ausgewählten Markergenen analysiert, von denen bekannt ist, dass sie in bestimmten Zellstadien vorkommen (Abb. 21). Auf diese Art war es möglich, die verschiedenen Expressionsprofile miteinander in Beziehung zu setzen. Eine *Thrsp*-Expression konnte erst mit dem Vorhandensein von ausdifferenzierten Adipozyten festgestellt werden. An der gesonderten Skalierung wird jedoch erkennbar, dass die mRNA-Konzentration von *Thrsp* viel geringer war als die der anderen Gene. *Dlk1* ist ein Präadipozytenfaktor, dessen Genexpression erwartungsgemäß während der Differenzierung gesunken ist. *Cebpb* stellt einen frühen Marker der Fettzeldifferenzierung dar und wurde im Verlauf des Differenzierungsprozesses annähernd konstant exprimiert. Die Expression von *Fabp4*, ein weit verbreitetes Protein für das Binden von Fettsäuren, steigerte sich deutlich mit der Präsenz von Lipidtropfen in den Zellen.

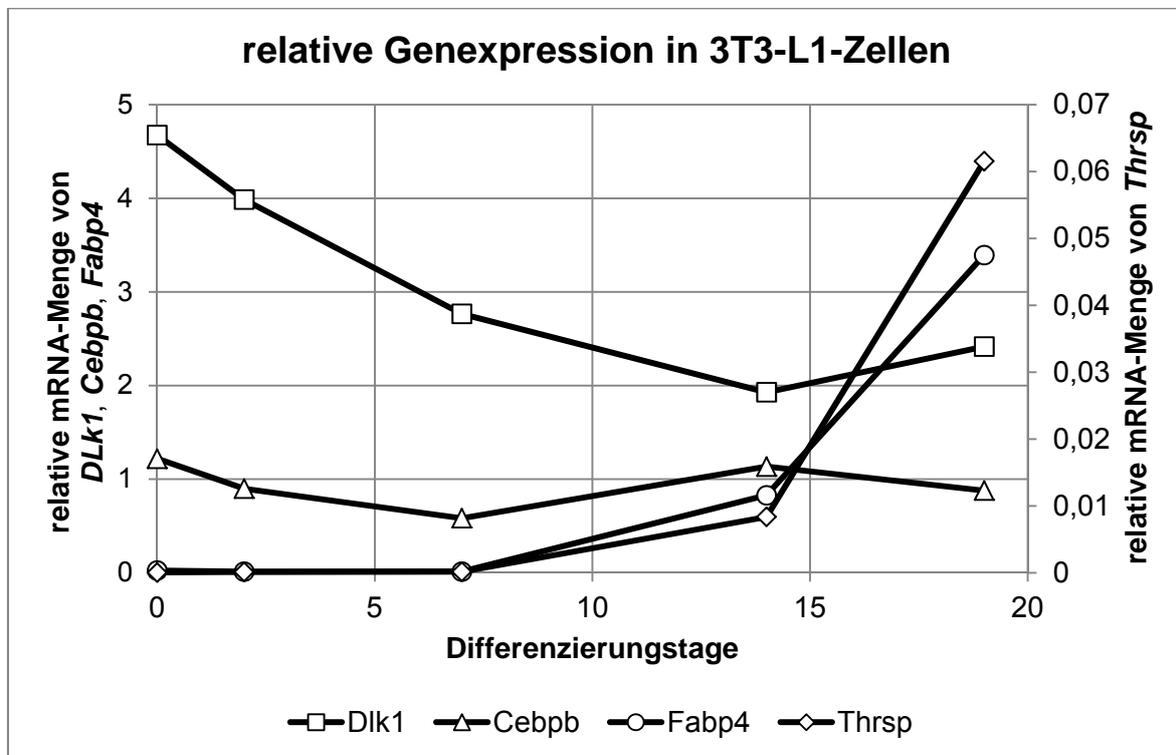


Abbildung 21. Relative mRNA-Expression von verschiedenen Genen in 3T3-L1-Zellen
Die Expressionswerte der Zielgene wurden mit *B2m* und *Hprt* normalisiert. Die Analyse und der Vergleich der relativen Genexpression wurden mit der $2^{-\Delta CT}$ Methode für normalisierte individuelle Datenpunkte nach Schmittgen & Livak (2008) durchgeführt.

Auch in den primären bovinen stromavaskulären Zellen wurde die Expression bestimmter Gene an Tag 0 (Differenzierungsstart), Tag 2 und Tag 12 gemessen (Abb. 22). Der Expressionsverlauf von *THRSP* und *FABP4* verhielt sich ähnlich wie in der murinen Zelllinie. *THRSP* wurde im Vergleich zu den 3T3-L1-Zellen allerdings noch einmal sehr viel geringer exprimiert. Das mRNA-Vorkommen des Transkriptionsfaktors *CEBPB* nahm mit zunehmendem Fortschreiten der Differenzierung deutlich ab.

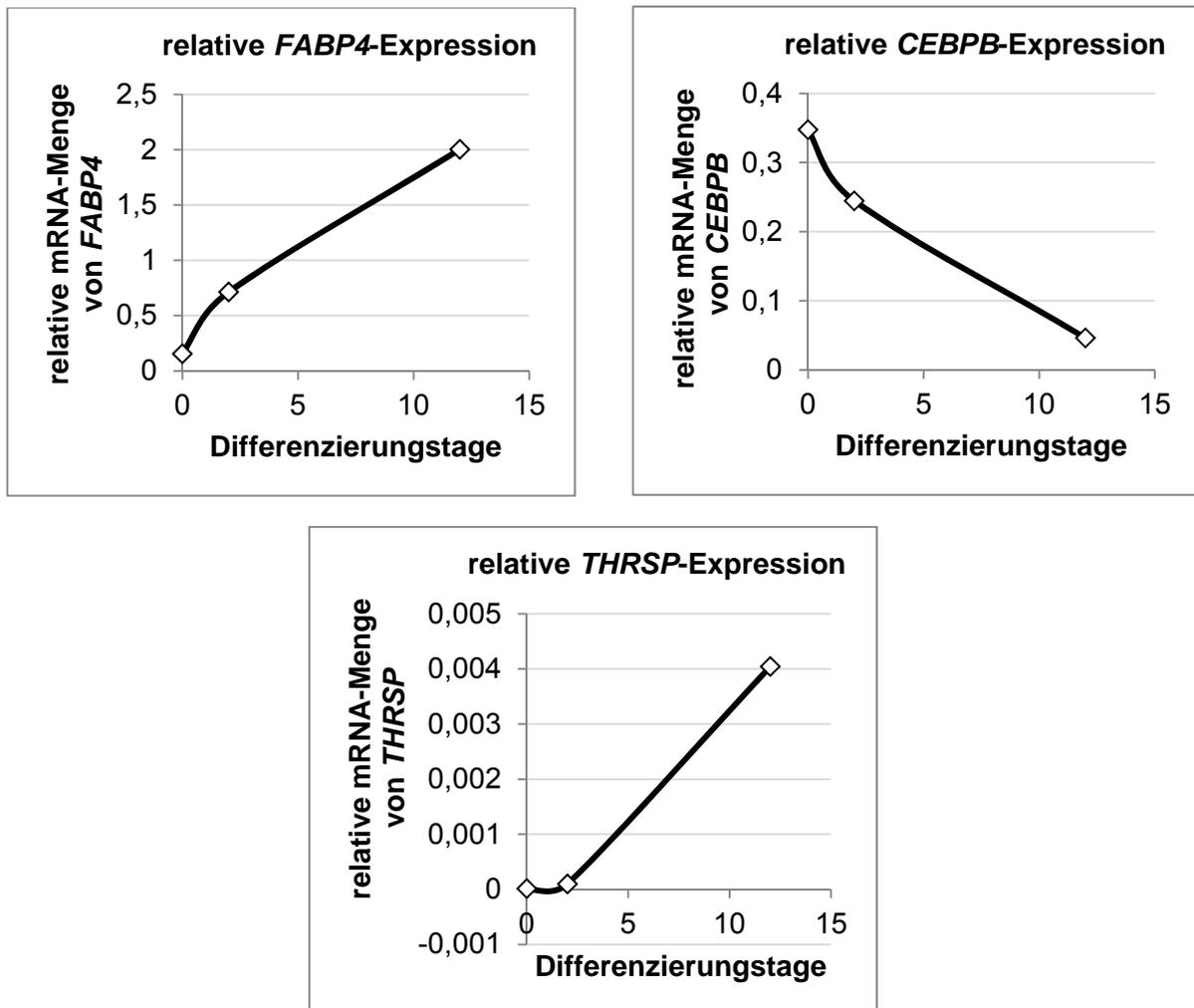


Abbildung 22. Relative mRNA-Expression von verschiedenen Genen in primären bovinen stromavaskulären Zellen

Die Expressionswerte der Zielgene wurden mit *B2M* und *UXT* normalisiert. Die Analyse und der Vergleich der relativen Genexpression erfolgten mit der $2^{-\Delta\text{CT}}$ Methode für normalisierte individuelle Datenpunkte nach Schmittgen & Livak (2008).

4.2.2.5 Proteinlokalisierung in der 3T3-L1-Zelllinie

Danach wurde untersucht, ob sich die Ergebnisse der mRNA-Expression auch auf Proteinebene widerspiegeln. Die Abbildungen 23, 24 und 25 zeigen exemplarisch Bildaufnahmen von 3T3-L1-Zellen nach zwei Tagen bzw. nach 21 Tagen Differenzierung. Zu allen Zeitpunkten konnten DLK1-positive Zellen gefunden werden. Sie hatten keine oder erst wenig Lipide im Zellinneren akkumuliert. Da es sich bei DLK1 um einen Präadipozytenfaktor handelt, waren nach zwei Tagen der Differenzierung viel mehr Farbsignale zu erkennen als nach 21 Tagen. Den Erwartungen entsprechend wurde DLK1 im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 23 c, f). Der Transkriptionsfaktor CEBPB zeigte eine nukleare Lokalisation und war in differenzierenden Zellen detektierbar, die schon Lipidtropfen eingelagert hatten (Abb. 24 c, f). Zusätzlich wurde auch eine immunhistochemische Färbung für FABP4 bzw. ALBP durchgeführt. Der verfügbare Antikörper zeigte kein zufriedenstellendes Resultat, da keine

spezifische Reaktion beobachtet werden konnte. Daher wurden die dazugehörigen Fluoreszenzaufnahmen hier nicht verwertet. Das THRSP-Protein konnte mit Hilfe der Immunhistochemie auch nach 21 Differenzierungstagen nicht eindeutig detektiert werden (Abb. 25 c, f).

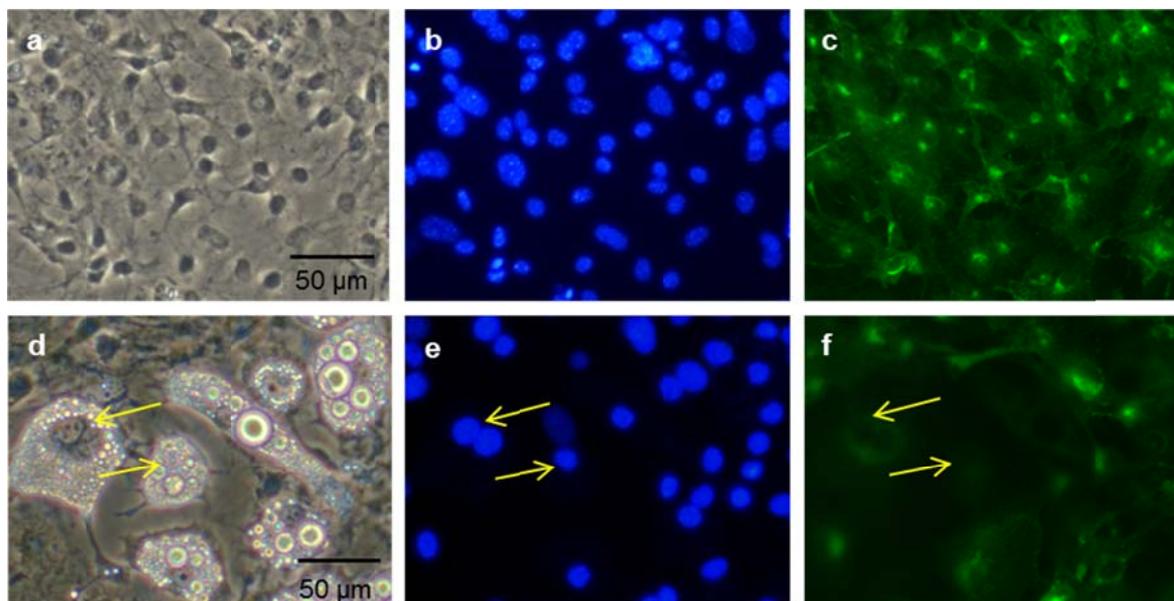


Abbildung 23. Zelluläre Lokalisation von DLK1 in 3T3-L1-Zellen nach zwei Tagen (a, b, c) und 21 Tagen (d, e, f) Differenzierung

DLK1 wurde mit einem spezifischen murinen Primärantikörper und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG immunhistochemisch detektiert und in der Nähe der Zellkerne im Zytoplasma gefunden. Die gelben Pfeile weisen auf differenzierende Zellen hin, die bereits Lipidtropfen eingelagert haben und in denen kein DLK1 mehr nachweisbar ist (c, f). Zur direkten Lokalisation sind parallel Bilder desselben Ausschnitts mit Hoechst 33258 Kernfärbung (b, e) und Phasenkontrastaufnahmen (a, d) dargestellt.

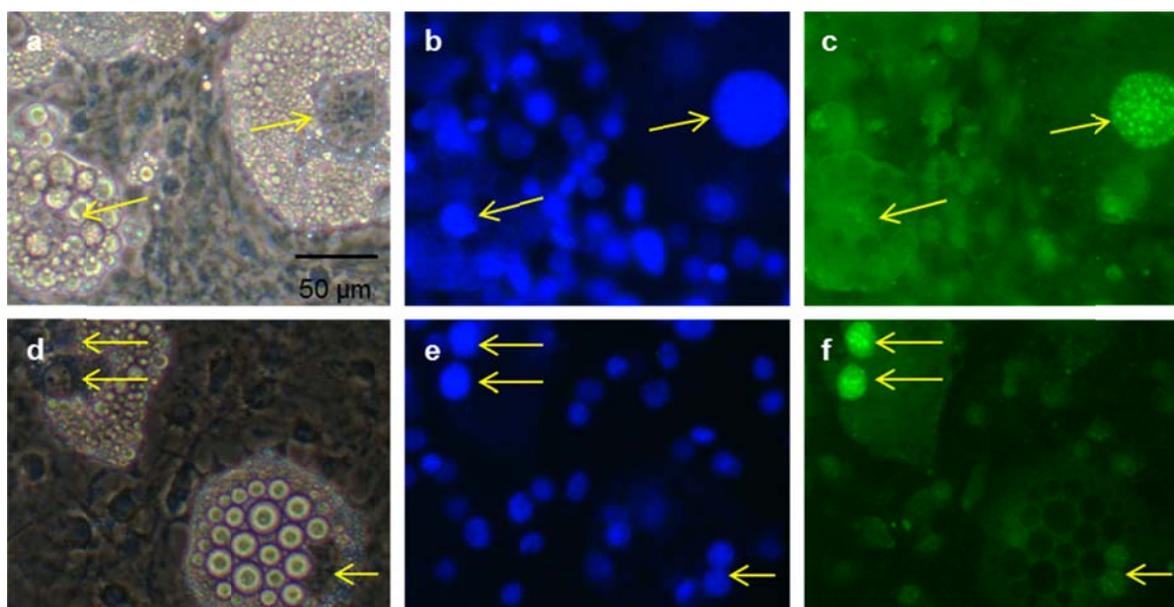


Abbildung 24. Zelluläre Lokalisation von CEBPB in 3T3-L1-Zellen nach 21 Tagen Differenzierung

In den Fluoreszenzbildern wurde CEBPB mit einem spezifischen murinen Primärantikörper und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG immunhistochemisch angefärbt und konnte direkt in den Zellkernen nachgewiesen werden. Die gelben Pfeile kennzeichnen besonders markante Zellen, die bereits Lipidtropfen eingelagert haben und in denen der Transkriptionsfaktor CEBPB unterschiedlich stark nachweisbar ist (c, f). Zur besseren Vergleichbarkeit sind parallel dieselben Ausschnitte mit Hoechst 33258 Kernfärbung (b, e) und als Phasenkontrastaufnahmen (a, d) abgebildet.

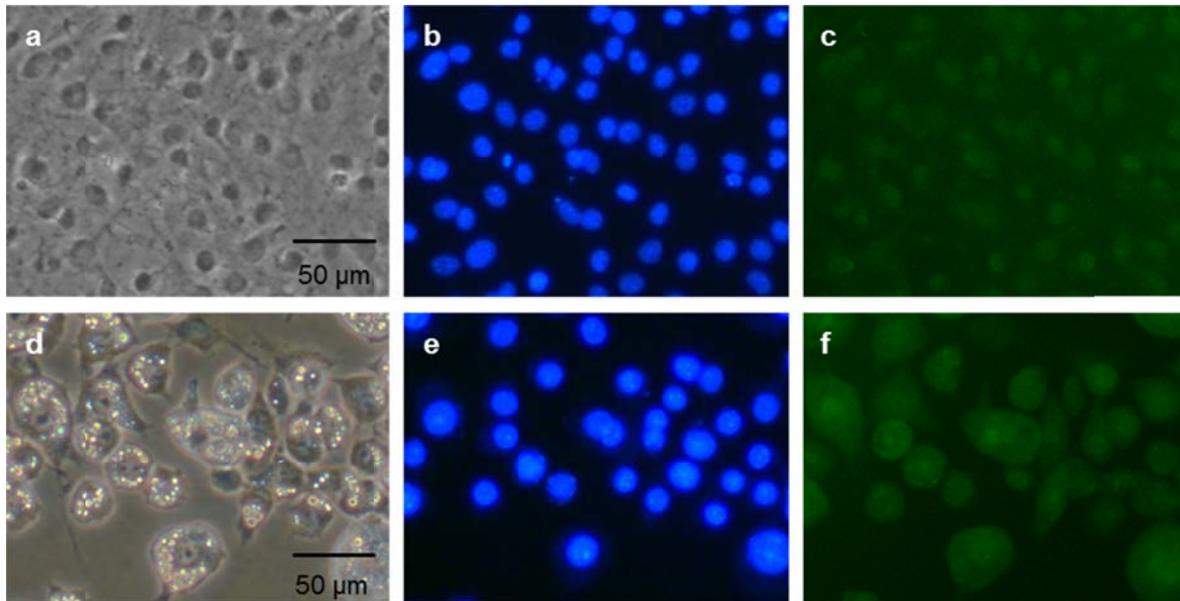


Abbildung 25. Bildaufnahmen von THRSP in 3T3-L1-Zellen nach zwei Tagen (a, b, c) und 21 Tagen (d, e, f) Differenzierung

Die zelluläre Detektion von THRSP erfolgte mit dem bovinen Antikörper B und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG. Das Protein konnte aber nicht eindeutig lokalisiert werden (c, f). Parallel werden Phasenkontrastaufnahmen (a, d) und Bilder mit Hoechst 33258 Kernfärbung (b, e) zur besseren Illustration gezeigt.

4.3 Etablierung von primären bovinen Zellkulturmodellen für funktionelle Untersuchungen

4.3.1 Kultivierung und adipogene Differenzierung von primären bovinen stromavaskulären Zellen

Bei dem hier ausgewählten Vorversuch wurden stromavaskuläre Zellen aus dem intermuskulären Fettgewebe einer Färsche und eines ausgewachsenen weiblichen Tieres und aus dem SCF der adulten Kuh verwendet. Es konnte mit allen Substanzkombinationen bei den Zellen von beiden Tieren und beiden Fettdepots die adipogene Differenzierung in einem Zeitraum von 15 Tagen erreicht werden. Auffällig war, dass sich die ausdifferenzierten Zellen hauptsächlich am Rand eines Wells befanden. Bei den Zellen der Färsche zeigte sich die Differenzierung am stärksten in Form von teilweise sehr großen einzelnen Lipidtropfen innerhalb einer Zelle. Das beste Ergebnis wurde, subjektiv betrachtet, mit der Kombination von Dexamethason, IBMX und ITS (Insulin-Transferrin-Selen-Supplement) erzielt. Die zusätzliche Gabe von Ölsäure hatte keinen Einfluss auf die adipogene Differenzierung (Abb. 26).

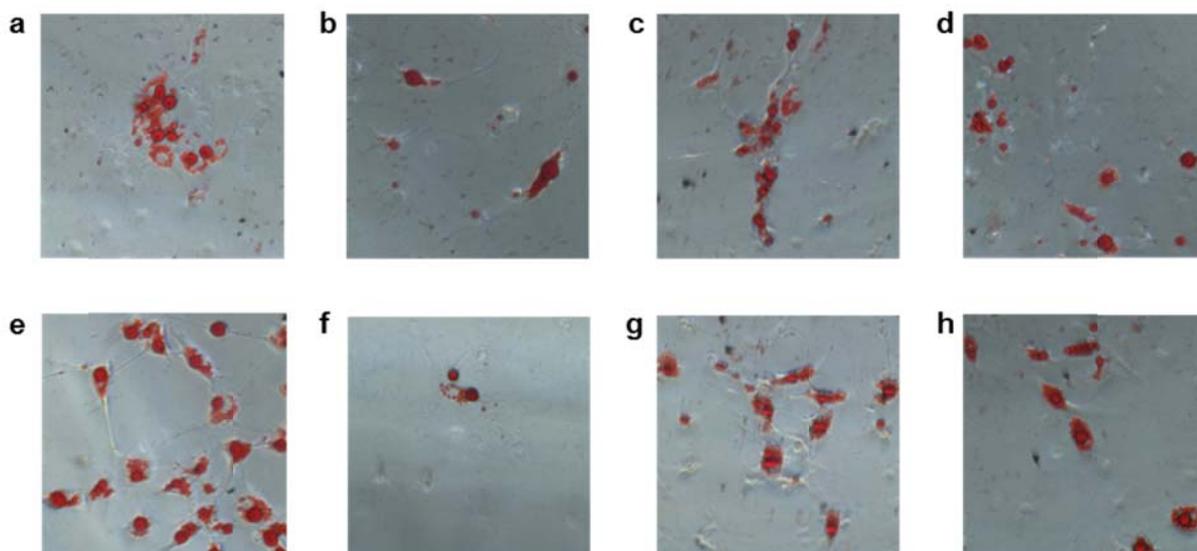


Abbildung 26. Mikroskopische Aufnahmen primärer boviner Adipozyten aus dem intermuskulären Fett einer Färs nach 15 Tagen Differenzierung

Während der Differenzierungsphase wurden die Zellen mit Dexamethason und ITS (a, b, e, f) oder Insulin (c, d, g, h) in Kombination mit Ölsäure (b, d, f, h) kultiviert. Zusätzlich wurde IBMX zu einigen Kulturen gegeben (e-h). Die Behandlung mit Dexamethason und IBMX wurde nur während der ersten 48 h der Differenzierung durchgeführt.

Auch bei den Zellen aus dem intermuskulären Fettgewebe der adulten Kuh konnte eine ausgeprägte Differenzierung in Form von großen Lipidtropfen erzielt werden. Die zusätzliche Gabe von Ölsäure schien einen positiven Einfluss auf das Ausmaß der adipogenen Differenzierung zu haben. Wie Abbildung 27 zeigt, war in dem Fall die Kombination von Dexamethason, IBMX, Insulin und Ölsäure am geeignetsten.

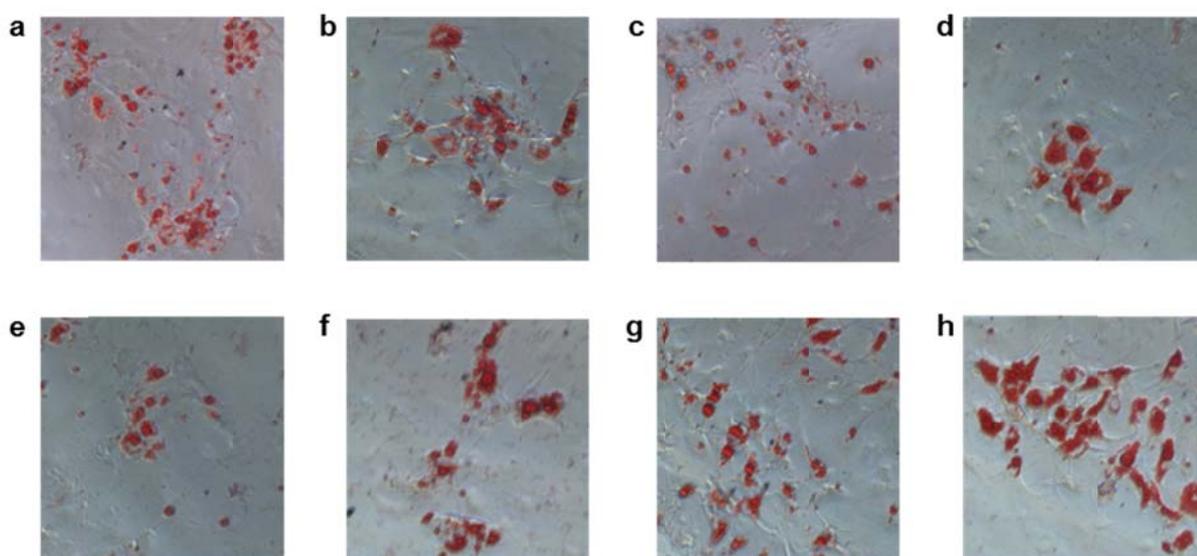


Abbildung 27. Mikroskopische Aufnahmen primärer boviner Adipozyten aus dem intermuskulären Fett einer adulten Kuh nach 15 Tagen Differenzierung

Während der Differenzierungsphase wurden die Zellen mit Dexamethason und ITS (a, b, e, f) oder Insulin (c, d, g, h) in Kombination mit Ölsäure (b, d, f, h) kultiviert. Zusätzlich wurde IBMX zu einigen Kulturen gegeben (e-h). Die Behandlung mit Dexamethason und IBMX wurde nur während der ersten 48 h der Differenzierung durchgeführt.

Bei den Zellen aus dem subkutanen Fettgewebe der ausgewachsenen Kuh war die adipogene Differenzierung nicht so stark ausgeprägt. Es zeigten sich größtenteils mehrere, aber eher kleine Fetttropfen in den Zellen. Die Differenzierung schien etwas langsamer zu verlaufen als bei den Zellen aus dem intermuskulären Fettgewebe. Die Kombination aus Dexamethason, IBMX, ITS und Ölsäure führte hier zu dem besten Ergebnis (Abb. 28). Wie schon bei den Zellen aus dem intermuskulären Fettgewebe hatte auch hier die Ölsäure einen zusätzlichen positiven Effekt auf die adipogene Differenzierung.

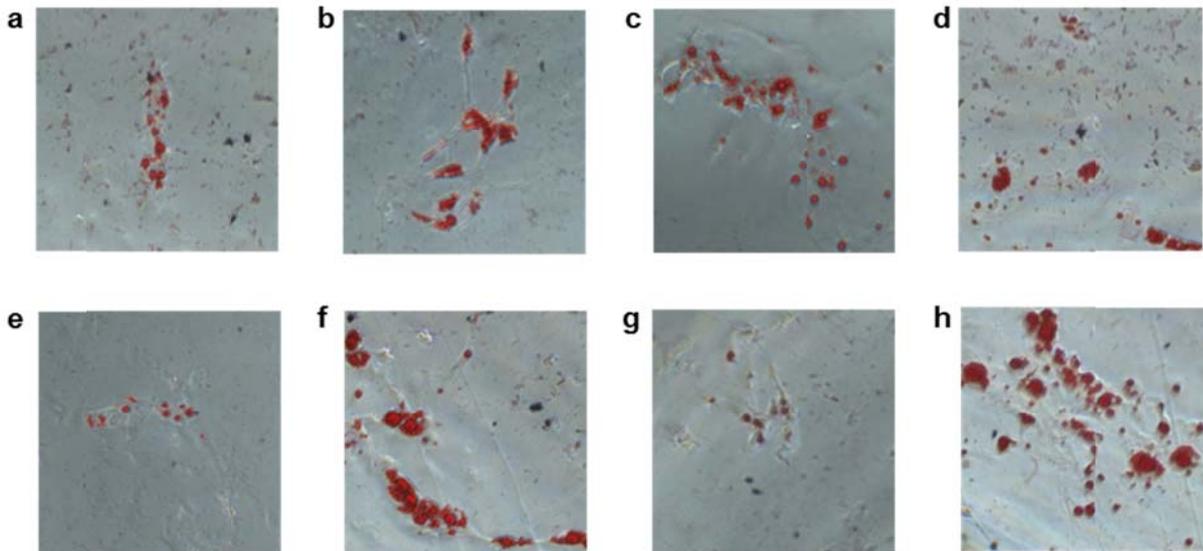


Abbildung 28. Phasenkontrastaufnahmen primärer boviner Adipozyten aus dem subkutanen Fett einer ausgewachsenen Kuh nach 15 Tagen Differenzierung

Während der Differenzierungsphase wurden die Zellen mit Dexamethason und ITS (a, b, e, f) oder Insulin (c, d, g, h) in Kombination mit Ölsäure (b, d, f, h) kultiviert. Zusätzlich wurde IBMX zu einigen Kulturen gegeben (e-h). Die Behandlung mit Dexamethason und IBMX wurde nur während der ersten 48 h der Differenzierung durchgeführt.

Unter Berücksichtigung aller durchgeführten Differenzierungsversuche kann kein optimales Differenzierungsprotokoll vorgeschlagen werden. Das Ergebnis war nicht stabil reproduzierbar und nicht mit der Differenzierung der murinen Zelllinie zu vergleichen. Insgesamt wurden mit Hilfe der verwendeten Induktions- und Differenzierungssubstanzen nur wenige Cluster reifer Adipozyten erzeugt. Zellen ohne Fetttropfchen waren in den primären bovinen Fettzellkulturen weiterhin vorherrschend.

4.3.2 Relative mRNA-Expression von Genen in bovinen Fettexplants

Da die Kultivierung der primären bovinen stromavaskulären Zellen nicht zur optimalen adipogenen Differenzierung und gewünschten Reproduzierbarkeit führte, wurde mit der Explantkultur ein alternatives Modell für funktionelle Untersuchungen an einer bovinen primären Adipozytenkultur getestet. Die extrahierte RNA aus den Fettexplantkulturen des SCF hatte nach 24 h einen RQI-Wert von 9,6 und nach 48 h einen RQI-Wert von 8,5. Die RNA-Qualität war mit RQI-Werten von >7 ausreichend, um weitere Analysen durchzuführen.

Das Genmaterial wurde verwendet, um die mRNA-Konzentration typischer Gene zu überprüfen, die während des Fettstoffwechsels exprimiert werden: *FABP4*, *HSL* und *PPARG*. Die Genexpressionswerte von *FABP4* erwiesen sich über die gesamten 48 h als sehr stabil, was für ein funktionierendes Modell spricht. Zu allen Zeitpunkten war eine mRNA-Menge von *HSL* bei Behandlung mit allen drei Kulturmedien messbar (Abb. 29). Eine *PPARG*-Expression konnte bei Behandlung mit rhTHBS4 jedoch erst nach 24 h ermittelt werden, zuvor konnten keine Signale gemessen werden (Abb. 30). Die Expressionskurven in beiden Diagrammen deuten darauf hin, dass die Zugabe von rhTHBS4 den Fettstoffwechsel stimuliert. Nach 48 h ist eine deutliche Aufregulation von *HSL* und *PPARG* zu beobachten. Der Zusatz von Serum scheint keinen ausschlaggebenden Effekt auf die mRNA-Konzentration der untersuchten Zielgene zu haben.

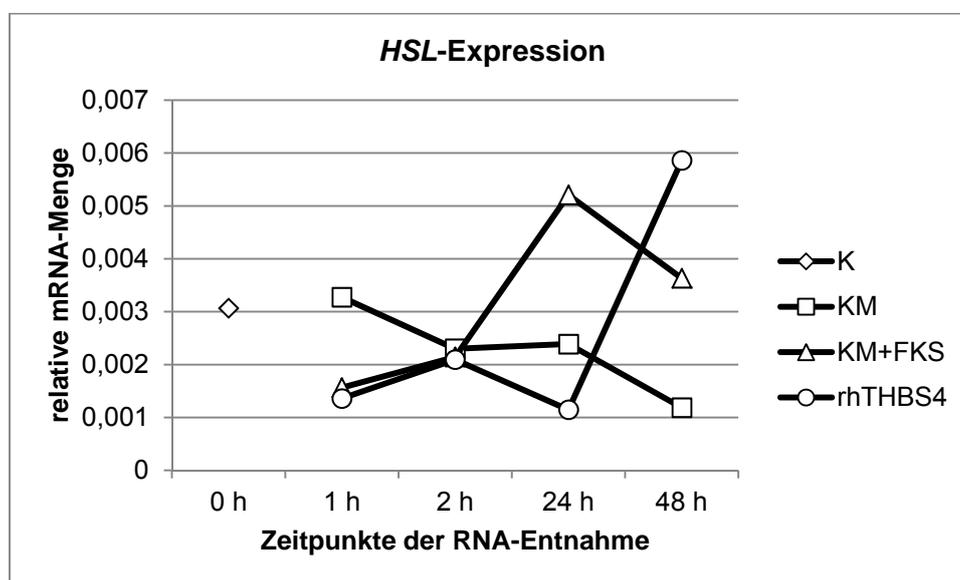


Abbildung 29. Relative mRNA-Expression von *HSL* in bovinen Fettexplants aus dem SCF zu verschiedenen Zeitpunkten

Die Expressionswerte wurden mit *FABP4* normalisiert. Die Analyse wurde mit der $2^{-\Delta CT}$ Methode für normalisierte individuelle Datenpunkte nach Schmittgen & Livak (2008) durchgeführt.

Abkürzungen: K - Kontrollprobe zum Startzeitpunkt, rhTHBS4 - Kulturmedium (a) ohne FKS und mit 50 nM rhTHBS4, KM - Kulturmedium (b) ohne FKS, KM+FKS - Kulturmedium (c) mit FKS

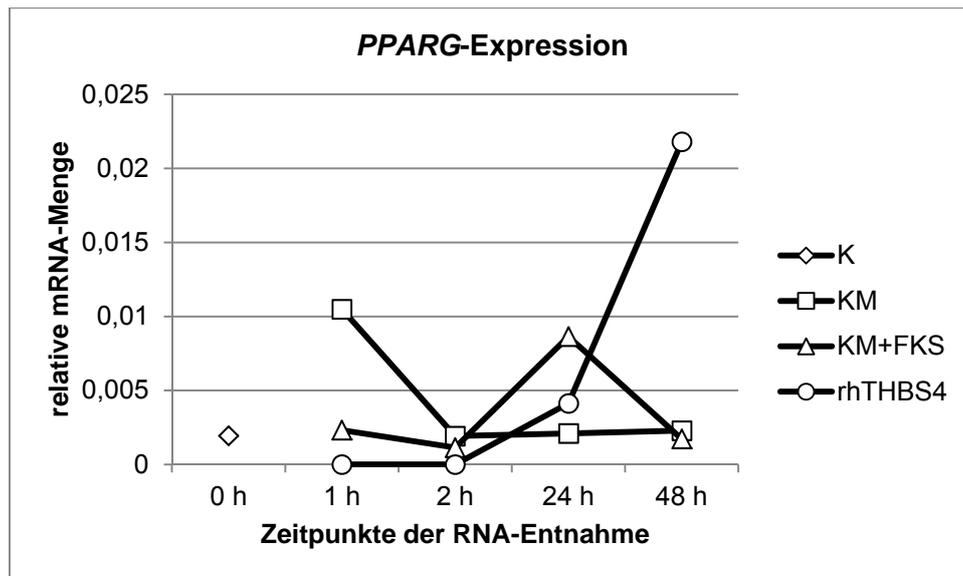


Abbildung 30. Relative mRNA-Expression von PPARG in bovinen Fettexplants aus dem SCF zu verschiedenen Zeitpunkten

Die Normalisierung der Expressionswerte wurde mit *FABP4* vorgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der $2^{-\Delta CT}$ Methode für normalisierte individuelle Datenpunkte nach Schmittgen & Livak (2008).

Abkürzungen: K - Kontrollprobe zum Startzeitpunkt, rhTHBS4 - Kulturmedium (a) ohne FKS und mit 50 nM rhTHBS4, KM - Kulturmedium (b) ohne FKS, KM+FKS - Kulturmedium (c) mit FKS

4.3.3 Kultivierung von primären bovinen Myoblasten

Um herauszufinden zu können, wie Adipokine die Entwicklung von bovinen Skelettmuskelzellen beeinflussen, sollte ein primäres Zellkulturmodell etabliert werden. Dazu wurden verschieden zusammengesetzte Medien ausgetestet (siehe Abschnitt 3.2.4.5). In Abbildung 31 ist der fortschreitende Differenzierungsprozess von bovinen Myoblasten zu mehrkernigen Myotuben dargestellt. Alle verwendeten Medien waren geeignet, um eine Myotubenformation zu induzieren. Der höchste Fusionsgrad von $30,9 \pm 3,4$ % wurde nach 72 h Inkubation mit DLI Medium ermittelt (Tab. 16, Abb. 32). Der Differenzierungsgrad von Rindermyotuben, die in SFDM kultiviert wurden, betrug $19,9 \pm 4,4$ %. Unter Verwendung von DM war eine Fusionierung der Myoblasten von $22,4 \pm 11,7$ % festzustellen.

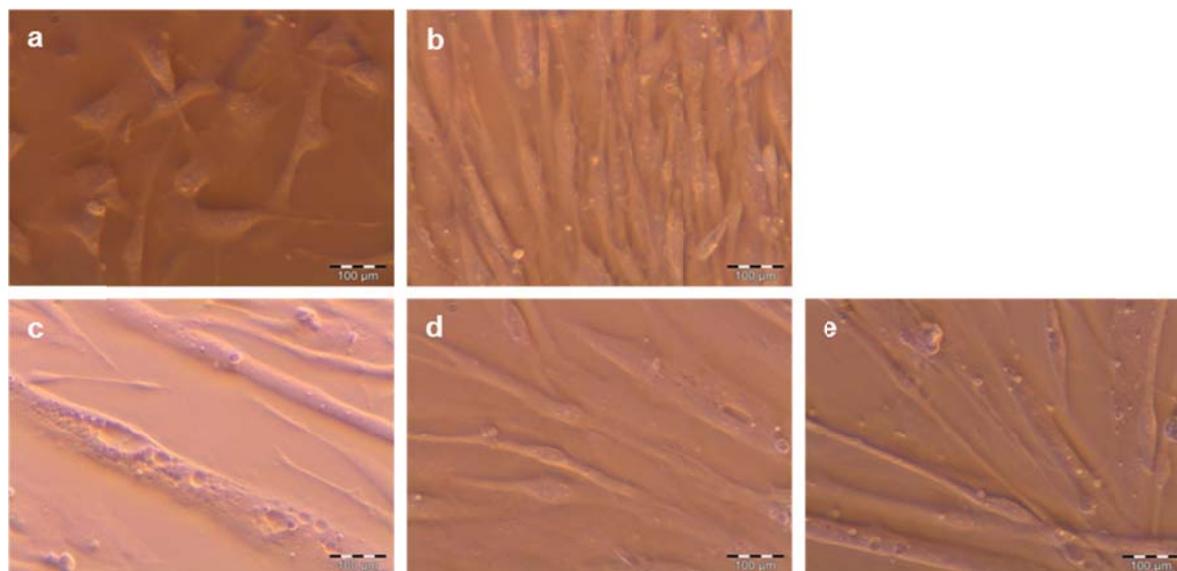


Abbildung 31. Phasenkontrastaufnahmen von bovinen Myoblasten, die zu vielkernigen Myotuben differenzieren

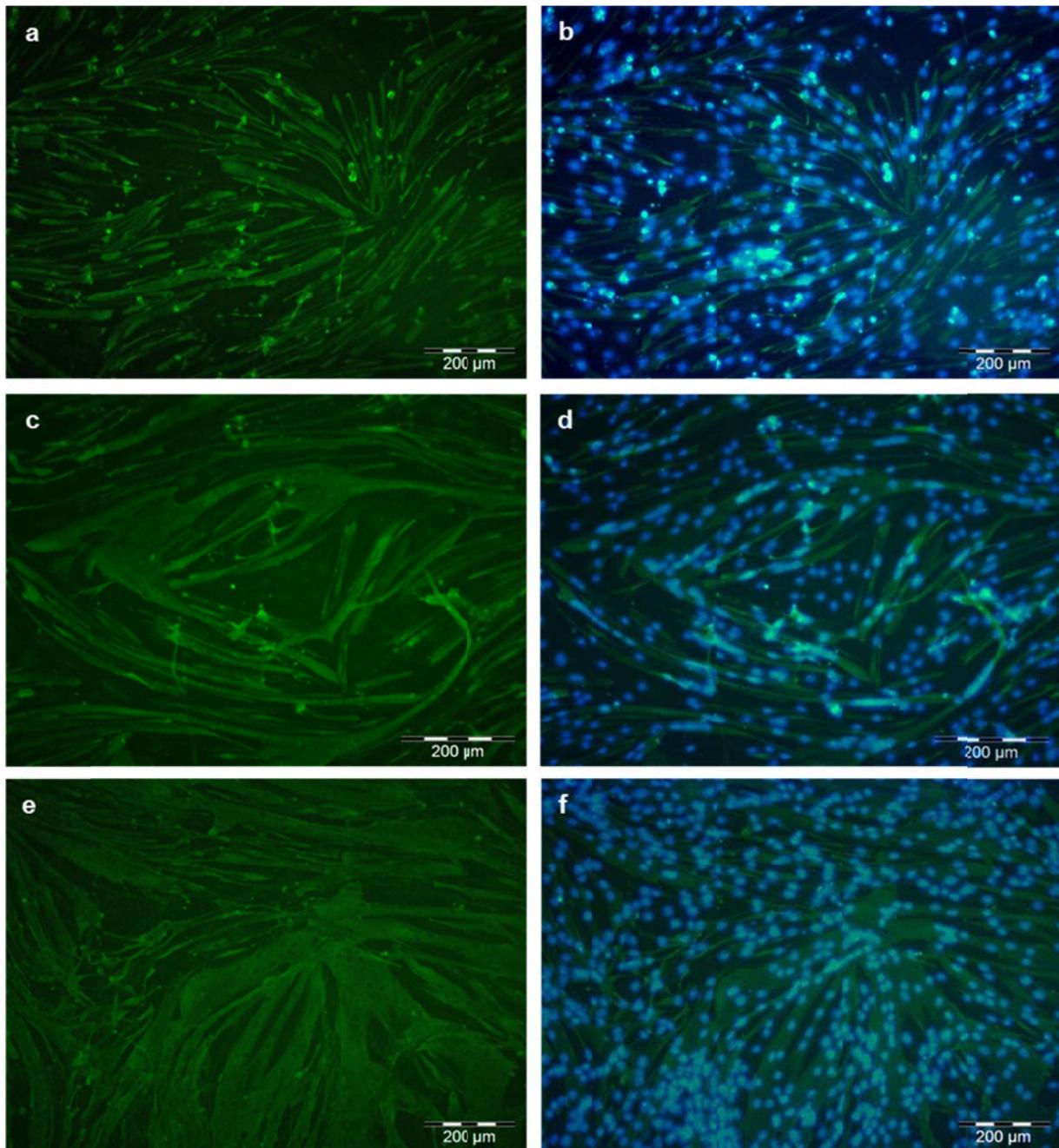
Dargestellt sind proliferierende Myoblasten, die in DMEM/F12+10 % FKS kultiviert wurden, nach zwei Tagen (a) und vier Tagen (b). Nach 24 h in serumfreiem Differenzierungsmedium sind kurze Myotuben sichtbar (c). Eine fortschreitende Myotubenformation ist am zweiten Tag der Differenzierung (d), zahlreiche und dickere Myotuben sind nach 72 h erkennbar (e). (modifiziert nach Will et al. 2015)

Tabelle 16. Anzahl der Zellkerne in den Myotuben, Gesamtanzahl der Zellkerne und Differenzierungsgrad von bovinen Skelettmuskelzellen nach 72 h Differenzierung

Die Daten sind angegeben als Mittelwert und Standardabweichung von n mikroskopischen Feldern.

Medium	Anzahl der Kerne in den Myotuben	Gesamtanzahl der Kerne	Differenzierungsindex in %	n
SFDM	39,5±17,2	211,8±106,1	19,90±4,4	5
DLI	51,2±14,5	167,4±48,8	30,92±3,4	6
DM	44,9±33,4	189,8±103,1	22,39±11,7	8

Abkürzungen: SFDM - serumfreies Differenzierungsmedium, DLI - Differenzierungsmedium mit Dexamethason, Linolsäure und Insulin, DM - Differenzierungsmedium mit 2 % FKS, 1 µM Insulin und 1 µM Cytosinarabosid (modifiziert nach Will et al. 2015)

**Abbildung 32. Fluoreszenzbilder von bovinen Myoblastenkulturen**

Die Zellen wurden 72 h in serumfreiem Differenzierungsmedium (SFDM) (a, b), in DLI- (1 μ M Dexamethason, 1 μ g/ml Linolsäure, 0,1 μ M Insulin) (c, d) oder in Differenzierungsmedium (DM) mit 2 % FKS, 1 μ M Insulin und 1 μ M Cytosinarabinosid kultiviert (e, f). Detektion von Desmin mit einem monoklonalen Primärantikörper von der Maus gegen Desmin vom Schweinemagen und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (a, c, e). Fusionsbilder von Desmin (grün) und der Kernfärbung mit Hoechst 33258 (blau). Die vielkernigen Myotuben sind desmin-positiv (b, d, f). (modifiziert nach Will et al. 2015)

5 Diskussion

5.1 Speziesübergreifende Genexpressionsdaten-Analyse

Die wachsende Verfügbarkeit von Microarray-Plattformen und RNA-Sequenzierungsergebnissen erleichtert den Zugang zu und die Bereitstellung von Daten aus globalen Expressionsanalysen unter unterschiedlichsten Versuchsbedingungen sowie für verschiedene Spezies und Gewebe. Die vergleichende Genexpressionsanalyse von verschiedenen Spezies ist dabei ein sinnvoller Ansatz, um evolutionär konservierte Transkripte zu erkennen, stellt aber eine ebenso große Herausforderung dar. Eine gemeinsame Analyse von Datensätzen vergleichbarer Proben, die mit Plattformen verschiedener Microarray-Anbieter erzeugt wurden, wird von den meisten Auswertungsprogrammen jedoch nicht unterstützt. Daher beschäftigt sich die Bioinformatik mit der Entwicklung spezieller Software für solche Problemstellungen (Wrzodek et al. 2013). Bereits 2009 berichteten Dobrin et al. über die Kombination von Expressionsprofilen unterschiedlicher Gewebe zur Erstellung krankheitsrelevanter Netzwerke. Das Zusammenführen von Daten mehrerer Spezies schafft die Möglichkeit, übertragbare Einblicke in komplexe Abläufe zu gewinnen, die nicht erlangt werden können, wenn der Fokus auf nur einer Spezies liegt (Lu et al. 2009).

Das Ziel der speziesübergreifenden Datenanalyse der vorliegenden Arbeit war es, potentielle, neue Adipokine, Myokine und Adipo-Myokine mit einer gemeinsamen Relevanz für Forschungsfelder zu identifizieren, die bisher eher selten in Zusammenhang gebracht werden. Dazu zählen u.a. Übergewicht, Pathogenese übergewichtsassoziierter metabolischer Krankheiten, Trainingsbiologie und die Körperzusammensetzung und Fleischqualität von Nutztieren. Es wurden sowohl zahlreiche interessante Adipokine und Myokine mit solch einer interdisziplinären Herangehensweise gefunden, als auch 22 relevante Adipo-Myokine identifiziert. Es ist nicht sehr überraschend, dass zwei Kandidaten, jeweils ein Kandidat aus der Liste der Adipokine und der Myokine, bekannte Gene auf den Gebieten Übergewicht und Typ-2-Diabetes sind. *SERPINF1*, auch bekannt als Pigment epithelium-derived factor (*PEDF*), wird hauptsächlich von Adipozyten sezerniert (Famulla et al. 2011), aber auch von Leber (Moreno-Navarrete et al. 2013) und Muskel (Raschke et al. 2013b). Die pro- und anti-entzündlichen Wirkungen von *PEDF* über die Aktivierung von den inflammatorischen Mediatoren c-Jun N-terminal kinase (*JNK*) und Extracellular signal-regulated kinase (*ERK*) (Crowe et al. 2009) oder über seine Fähigkeit, die *JNK*-Aktivierung zu supprimieren (Gattu et al. 2014), wurden bereits beschrieben. In adipösen Probanden mit eingeschränkter Glukosetoleranz wurden erhöhte Serumlevel von *PEDF* detektiert, die mit zunehmendem Gewichtsverlust wieder abnahmen (Sabater et al. 2010). Experimente mit Mäusen unterstützen die kausale Rolle von *Pedf* in Fettleibigkeits-induzierter

Insulinresistenz. Eine längere Behandlung mit *Pedf* (fünf Tage) veranlasst ektopische Fetteinlagerungen in Leber und Muskel, senkt die Insulinsensitivität im gesamten Körper und reduziert die insulin-stimulierte Glukoseaufnahme im Muskel (Crowe et al. 2009). Der adipöse Phänotyp von *Pedf*-Knock-out (KO)-Mäusen suggeriert laut Gattu et al. (2014) auch eine nützliche Funktion dieses Adipo-Myokins. Nach ausreichender Versorgung mit *Pedf* zeigten die *Pedf*-KO-Mäuse eine abgeschwächte Hyperglykämie und eine verbesserte hepatische Insulin-Signalwirkung. Die Aufklärung dieses detaillierten Mechanismus' bedarf jedoch noch weiterer Forschung.

Auch Fibroblast growth factor 1 (*FGF1*) wurde in den Kontext von Fettleibigkeit und Insulinsensitivität als neues Adipokin eigeordnet (Mejhert et al. 2010). Bei hochfettinduziertem Übergewicht, wurde *Fgf1* ausschließlich in Adipozyten des viszeralen Fettgewebes erhöht gefunden (Jonker et al. 2012). Ein *Fgf1*-KO unter einer Hochfettinduzierung verursachte einen aggressiven diabetischen Phänotyp verbunden mit einer abnormen Fettgewebsentwicklung und einer gesteigerten Kollagenablagerung. Demzufolge war das Fettgewebe stark entzündet. Weiterhin stellt eine *Fgf1*-Behandlung von hyperglykämischen *ob/ob* (obese) Mäusen wieder den normoglykämischen Zustand mit insulin-sensibilisierender Wirkung in Muskel und Leber her (Suh et al. 2014). Bisher wurde *FGF1* nicht im Rahmen vom bovinen Fett- und Muskelstoffwechsel untersucht, aber seine potentielle Rolle in der Ausbreitung von Fettgewebe könnte es zu einem interessanten Kandidaten machen.

Eine gemeinsame Besonderheit der Top-Netzwerke mit vermutlichen Myokinen und Adipokinen (Abb. 7 und 8) ist die Verbindung zu Bestandteilen der EZM wie Kollagenen. Es kommen neben Regulatoren des EZM-Aufbaus und deren Beschaffenheit auch Moleküle wie Integrine vor, die die EZM mit zellulären Strukturen verbinden. Beide Gewebe, Fett und Muskel, sind strukturell sehr flexible Organe. Durch Adipozytenhypertrophie und –hyperplasie reagiert das Fettgewebe auf ein Überangebot an Energie. Beide Phänomene des Gewebewachstums können in Situationen des Energiemangels schnell wieder gestoppt oder umgekehrt werden. Regelmäßige körperliche Betätigung führt zu Muskelfaserhypertrophie und weiterhin zu mechanischen Adaptationen, die sich sogar in der intramuskulären EZM bemerkbar machen können bis hin zu den Sehnen, den passiven Übersetzungsstrukturen der Muskelkraft. Der Umbau der EZM ist eine essentielle Grundvoraussetzung für diese Anpassungsvorgänge. Im Muskel steigert die EZM ihre Kollagenexpression und den -umsatz bei physischem Training (Kjaer 2004). Die EZM dient jedoch nicht nur als strukturelle Komponente, sondern stellt auch ein dynamisches Depot für Zytokine und Hormone dar und vermittelt die interzelluläre sowie EZM-Zell-Kommunikation. Sie beeinflusst direkt die Entwicklung von Satellitenzellen, den Vorläuferzellen, die während der Hypertrophie mit anderen Muskelfasern fusionieren (Lund & Cornelison 2013), und von Adipozyten, auch von denen, die im Muskelgewebe liegen (Hausman 2012). Die

physiologischen Adaptations- und Interaktionsprozesse können jedoch auch ins Gegenteil abgeleitet. Dabei können Faktoren, die im akuten Zustand förderlich sind, wie z.B. *TGFB*, chronisch schädlich werden (Kjaer 2004). Das Fettgewebe von fettleibigen Personen zeigt sowohl einen höheren Entzündungsgrad als auch fibrotische Veränderungen (Henegar et al. 2008). Eine denkbare Erklärung dafür wäre, dass die EZM im Rahmen der pathologischen Fettzellvergrößerung ihre eigene Vermehrung einfordert, die zum Zelltod, zur Inflammation und letztendlich zur Fibrose führt (Divoux & Clément 2011). Alternativ könnte die vorherrschende Gewebhypoxie, die durch eine unzureichende Vaskularisierung verursacht wird, die Fibrose und den Entzündungszustand befördern. Die umfangreiche Literatur über Fettgewebefibrose und ihre potentiell bedeutsame Rolle im Zusammenhang mit der Zunahme von Fettgewebe und damit verbundenen metabolischen Erkrankungen wurde bereits zusammengefasst (Sun et al. 2011). In diesem Kontext ist auch das Adipokin mit High-Score *SPARC* ein pro-fibrotisches Protein von Interesse, welches die Kollagenablagerung und die Wechselwirkungen zwischen Zellen und der EZM vermittelt und die Adipogenese inhibiert (Divoux & Clément 2011). *SPARC* ist nicht nur in die Modulation der Fibrose involviert, es wird auch als wichtiger Faktor für Übergewichts-assoziierte Komplikationen, wie z.B. Insulinresistenz, angesehen (Kos & Wilding 2010). Ein anderes Adipokin mit High-Score, *THBS1*, ist ein profibrotischer Modulator der *TGFB*-Aktivität, der auch als Adipokin mit hohen Expressionsspiegeln in fettleibigen Patienten vorkommt (Varma et al. 2008). *Thbs1* ist mit einem unvorteilhaften Gewebeumbau der EZM bei Übergewicht und daher auch mit Fettgewebefibrose assoziiert (Inoue et al. 2013, Li et al. 2011). Inoue et al. (2013) postulieren, dass *Thbs1* aus dem Fettgewebe Insulinresistenz und eine fibrotische Zerstörung des Gewebes induzieren könnte. Diese Vermutung wird teilweise durch Ergebnisse aus Versuchen mit *Thbs1*-KO Mäusen gestützt, die vor einer Entzündung des Fettgewebes und Insulinresistenz unter einer Hochfett-Diät geschützt waren (Li et al. 2011). Ein hohes Ausmaß der Fettgewebefibrose korreliert nicht nur mit Insulinresistenz und anderen Komorbiditäten von Adipositas, es sagt auch die Beständigkeit von operations-induziertem Gewichtsverlust und die Verbesserung des metabolischen Phänotyps vorher (Abdenmour et al. 2014, Divoux et al. 2010). Zusätzlich unterscheiden sich das subkutane und viszerale Fettdepot in ihrem fibrotischen (Abdenmour et al. 2014, Divoux et al. 2010) und sekretorischen Profil (Pellegrinelli et al. 2015). Fettgewebefibrose sollte schon früh bei Fettleibigkeit behandelt werden, jedoch fehlen direkte therapeutische Optionen bisher komplett oder es werden nur die inflammatorischen Symptome behandelt und nicht die Ursache, um Fibrose zu verhindern. Die Identifikation von kritischen Zielmolekülen für die Fettgewebefibrose könnte helfen, um diagnostische und therapeutische Hindernisse zu überwinden. Demzufolge sind Fibrose-assoziierte Gene, die mit Hilfe der hier angewendeten

analytischen Methode herausgefiltert wurden, eventuell neue wertvolle Kandidaten für eine therapeutische Intervention.

Genau wie im Fettgewebe tritt Fibrose auch im geschädigten Skelettmuskel auf. Fibrose ist ein Kennzeichen von Dystrophien wie z.B. der Duchenne-Muskeldystrophie, bei der Muskel durch Fett- und Bindegewebe ersetzt wird (Kharraz et al. 2014). In diesem speziellen Fall ist es sehr wahrscheinlich, dass Adipokine und Myokine in eine unmittelbare Wechselwirkung miteinander treten. Fibrose ist eine Begleiterscheinung beim Alterungsprozess und bei Typ-2-Diabetes und kann die Muskelmechanik einschränken (Gillies & Lieber 2011). Die pathophysiologische Entwicklung von Fibrose im Skelettmuskel ist hingegen viel weniger verstanden als in anderen Geweben wie Leber, Herz oder Niere. Auf der einen Seite ist die Ansammlung von EZM notwendig und hilfreich für den regenerativen Prozess nach Gewebeerstörung. Auf der anderen Seite wiederum beeinträchtigt die exzessive Verbreitung von EZM die Muskelfunktion. Die Gründe für eine Schädigung des Muskelgewebes sind vielseitig; z.B. Krankheiten, Verletzung, Entzündung, Alterung, schwere Atrophie oder Hypertrophie (Lieber & Ward 2013). In der vorliegenden Datenanalyse wurden einige Faktoren gefunden, die im Zusammenhang mit Fibrose genannt werden und im Muskel sowie Fettgewebe verschiedener Spezies reguliert sind. Eines dieser wichtigen Moleküle ist das profibrotische Zytokin *TGFB*, welches die Zellmigration beeinflusst und die Expression von Kollagenen und Fibronectin veranlasst (Ueha et al. 2012). Seine zentrale Bedeutung im Muskel wird durch den Fakt hervorgehoben, dass *TGFB2*, einige seiner Zielgene und zwei seiner Suppressoren, latent transforming growth factor beta binding protein 2 (*LTBP2*) und *DCN*, alle in der hier durchgeführten speziesübergreifenden Datenanalyse als Myokine identifiziert wurden (Schering et al. 2015). *DCN* ist ein gut bekanntes Myokin, aber seine Regulation im kontrahierenden Skelettmuskel und seine Reaktion auf körperliche Bewegung wurden erst kürzlich das erste Mal beschrieben (Kanzleiter et al. 2014). Es wird different exprimiert und als Antwort auf Elektrostimulation von Myotuben in der Zellkultur freigesetzt. Die Serum-*DCN*-Spiegel beim Menschen steigen nach akutem Krafttraining an. Auch in Nagern ist eine erhöhte *Dcn*-Expression im Skelettmuskel nach langanhaltender physischer Belastung zu beobachten (Kanzleiter et al. 2014). Passend zu diesen publizierten Daten wurde in den vorliegenden ausgewerteten Datensätzen ebenfalls eine Hochregulation von *DCN* nach chronischer und akuter Bewegung festgestellt (Tab. S4, Anhang A, Schering et al. 2015). Die *Dcn*-mRNA war auch im Muskel von diätinduzierten übergewichtigen Mäusen im Vergleich zu deren schlanken Wurfgeschwistern hochreguliert (Tab. S4, Anhang A). Zwei Faktoren, *P4HB* und *ITGB1*, waren in beiden abgebildeten Ingenuity-Netzwerken (Abb. 7 und 8) präsent und wurden als Adipo-Myokine identifiziert. *P4HB* ist ein Enzym, welches zur Kollagenqualität und –stabilität beiträgt, indem es posttranskriptionale Modifikationen einleitet (Kjaer 2004). Bei der

Entwicklung und der Regulation von Kollagen in beiden Geweben dominieren verschiedene Isoformen: Typ I im Muskel und die Typen IV und VI im Fett. Typ IV Kollagen formt die Basallamina des Epithels, die Kollagene I und VI sind Typen, die oft im Zusammenhang mit Fibrose genannt werden.

Leptin als ein namhaftes Adipokin kommt in der Liste der Adipokine mit High-Score vor und wird ebenso mit fibrotischen Depots assoziiert, wie Abb. 9 veranschaulicht. Leptin ist weniger als Myokin bekannt, aber seine Expression im und Ausschüttung vom Skelettmuskel wurden bereits in der Vergangenheit gezeigt (Wolsk et al. 2012). Tatsächlich soll die basale Sekretion vom Skelettmuskel nur etwas geringer als die vom Fettgewebe sein. Das deutet darauf hin, dass der Beitrag des Skelettmuskels zum Serum-Leptin-Gehalt in schlanken Probanden ausschlaggebend sein könnte. Angesichts der zentralen Stellung von Leptin in der Regulation des Fettstoffwechsels könnte dieses Adipo-Myokin zudem eine Rolle in der physiologischen Antwort auf körperliches Training in Form einer spezifischen Interaktion von Muskel und Fett einnehmen. Eine mögliche Einschränkung der hier einbezogenen Maus-Experimente könnte das Vorhandensein von intramuskulären Adipozyten sein, die zur Leptin-Expression beigetragen haben könnten. Eine Genregulation findet allerdings im Skelettmuskel auch als Reaktion auf kurzfristige körperliche Belastungen statt, sodass die Expression von Adipozyten konstant und damit vernachlässigbar ist.

Ein weiteres gut untersuchtes Adipo-Myokin, das hier identifiziert wurde, ist *VEGFC*. Dieses Gen wurde bisher hauptsächlich in Bezug auf Lymphangiogenese erforscht. Im Skelettmuskel wird *VEGFC* durch physische Belastung in gesunden Probanden induziert (Kivelä et al. 2007) und verbessert die Gefäßfunktion (Anisimov et al. 2009). Die Regulation von *VEGFC* durch Bewegung ist bei Patienten mit Typ-2-Diabetes gestört (Kivelä et al. 2007). Im Fettgewebe könnte *VEGFC* von Makrophagen und Präadipozyten stammen (Hu et al. 2013), obwohl sein Level im fettleibigen Zustand vermindert ist (Tinahones et al. 2012). Erst kürzlich wurde *VEGFC*, ähnlich wie auch *VEGFA* und Leptin, mit der Generierung von fibrotischem Material in Verbindung gebracht (Zhao et al. 2014). Das gibt Grund zur Annahme, dass Leptin und *VEGFC* eine Rolle in der Steuerung der Fibrose im Skelettmuskel und Fettgewebe als Adipo-Myokine spielen könnten.

Bei landwirtschaftlichen Nutztieren ist das Wissen über die EZM und fibrotische Zustände im Skelettmuskel limitiert. Fibrose im Fettgewebe wurde bis zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht näher untersucht. Beim Schwein sollen einige Gene, die für Komponenten der EZM kodieren, im Zusammenhang mit dem Tropfsaftverlust stehen. Als Tropfsaftverlust wird der Flüssigkeitsverlust von Frischfleisch ohne äußere Einflüsse bezeichnet. Er hat ein geringes Wasserbindungsvermögen als Ursache (Huff-Lonergan et al. 2010). Das könnte ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Skelettmuskelfibrose und Fleischqualitätsmerkmalen sein. Das Integrin *ITGB1* könnte eine spezifische Relevanz für die Fleischqualität haben, da

seine Degradierung *postmortem* positiv mit dem Tropfsaftverlust korrelieren soll (Lawson 2004). Straadt et al. (2008) stellen diese Beziehung jedoch in Frage. In einer Assoziationsstudie von Nonneman et al. (2013) wird *ITGB1* erneut als Kandidat für Kochverlust genannt. Es ist erwähnenswert, dass die Expression von *COL1A1* ebenfalls mit einem erhöhten Tropfsaftverlust assoziiert wird (Ponsuksili et al. 2008, McBryan et al. 2010). Bezüglich der Muskelbiologie und des –wachstums ist die Fibrose bisher am besten im Geflügel untersucht worden. Ein Phänomen mit dem Namen „white striping“ hängt vermeintlich mit Muskelfibrose im Brustfilet und in den Schenkeln von Broilern zusammen (Kuttappan et al. 2012). Es ist gekennzeichnet durch weiße Schlieren, die parallel zu den Muskelfasern verlaufen. Kuttappan et al. (2013a) berichten, dass diese weißen Streifen wahrscheinlich aus myopathischen Läsionen und der anschließenden Infiltration von fremden Zelltypen resultieren. Während „white striping“ allein keinen signifikanten Effekt auf Fleischqualitätsmerkmale hat (Kuttappan et al. 2013b), könnte eine Kombination mit der erst kürzlich beobachteten „wooden breast“ nachteilig sein (Sihvo et al. 2014). Ein schweres Körpergewicht und eine schnelle Wachstumsrate, und damit Hypertrophie, werden als verursachende Faktoren für diese Myopathie vermutet, deren genaue Ätiologie jedoch noch geklärt werden muss (Sihvo et al. 2014). Ob diese myodegenerativen Funktionsstörungen generell auch eine Bedeutung für den Fleischansatz und die Fleischqualität bei Rindern bzw. den Metabolismus von Wiederkäuern und Nagern haben, muss noch determiniert werden. Eigene Untersuchungen in Rindern weisen eher darauf hin, dass Muskelfasern durch Adipozyten anstatt durch Fibroblasten ersetzt werden können (Palin et al. 2002, Albrecht et al. 2011a). Diese Annahme wird durch Zellkulturstudien von Teboul et al. (1995) und Singh et al. (2007) unterstützt.

Zusammenfassend hat die speziesübergreifende Analyse von Expressionsprofilen und Sekretomdaten von Skelettmuskel und Fettgewebe zahlreiche putative Adipokine, Myokine, sowie Adipo-Myokine hervorgebracht, die interessante Kandidaten für weiterführende Studien mit Menschen, Labornagern und Nutztieren darstellen. Die Komponenten der EZM und die Mediatoren der Fibrose sind nicht nur in die Pathophysiologie von Fettleibigkeit und in die Pathogenese von adipositas-assoziierten metabolischen Erkrankungen involviert, sondern sind auch Modulatoren der Fleischqualität von Nutztieren. Des Weiteren könnte die Reduktion von Fettgewebsfibrose einen Teil der molekularen Hintergründe ausmachen, die den gesundheitsfördernden Effekten von körperlicher Bewegung zugrunde liegen (Kawanishi et al. 2013). Das würde eine dynamische Wechselbeziehung zwischen Fett- und Skelettmuskelgewebe illustrieren. Aufgrund der innovativen und globalen Herangehensweise bei der Datenauswertung wurde eine große Ressource bislang wenig oder nicht charakterisierter Faktoren geschaffen, die zur Beantwortung verschiedenster Fragestellungen genutzt werden kann. Ein bedeutender Vorteil dieser Methode ist, dass in

den Konsenslisten auch potentielle Kandidatengene erfasst werden, die wahrscheinlich bei der Datenauswertung von nur einer Spezies nicht aufgefallen wären. Auf diese Weise können innerartliche Variationen umgangen werden (Lu et al. 2009, Kristiansson et al. 2013). Zudem können Signalkaskaden und zelluläre Prozesse in den Fokus rücken, die sonst nicht das Forschungsinteresse geweckt hätten. Auf dem Gebiet der präventiven Medizin haben Chaudhuri et al. (2015) erst vor kurzem über eine speziesübergreifende Expressionsanalyse neue Gene identifiziert, die in die Entstehung der Insulinresistenz verwickelt sein könnten. Ein Nachteil der Konsenslisten sind die verschiedenen Interventionen. Bei den Mausmodellen wurden die Expressionsprofile der Gewebe nach unterschiedlicher Fütterung, körperlicher Belastung und nach Genmodifikation überprüft. Auf dem Gebiet der Nutztierforschung, speziell bei Rindern, ist die Untersuchung von belastungs- und transgenese-induzierten Myokinen wenig relevant. In dem Fall müssten alternative Interventionsmöglichkeiten zu deren Induktion hinterfragt werden, z.B. Hypoxie, Stress oder Temperaturschwankungen. Der Fokus wird aufgrund der Realisierungsmöglichkeiten allerdings weiterhin auf der Fütterungsintervention und der damit verbundenen Evaluierung von diätinduzierten Zytokinen liegen. Auch die Dominanz der mRNA-Daten und der murinen Datensätze sind limitierende Faktoren des Scorings bei der hier beschriebenen speziesübergreifenden Analyse. Gleiche Mengenanteile der Spezies und der einbezogenen Datensätze würden die Diversität noch vergrößern und die natürliche innerartliche Streuung berücksichtigen. Darüber hinaus existiert immer noch ein Restrisiko, dass falsch positive Zytokinkandidaten das Ergebnis beim Scoring verfälscht haben. Serumproteine beispielsweise können die Erkennung stören. Es ist eine der Hauptschwierigkeiten, kontaminierende Proteine zu vermeiden oder zumindest von „echten“ Proteinen zu unterscheiden. Für eine aussagekräftige Charakterisierung und Validierung der Relevanz der identifizierten Proteine, sind qualitativ hochwertige Proben eine Grundvoraussetzung (Lehr et al. 2012b, Hartwig et al. 2014). Die Sekretomprofile des Skelettmuskel- und Fettgewebes sind sehr komplex und die Konzentration der Zytokine möglicherweise extrem gering (pg bis ng/ml) (Lehr et al. 2012b, Hartwig et al. 2014). Bisher existiert noch kein biochemisches Verfahren, welches alleine in der Lage ist, die Gesamtproteinkomposition von gewebespezifischen Sekretomen zu detektieren und zu verifizieren. Eine optimierte Lösung ist es, mehrere verschiedene technische Ansätze miteinander zu verknüpfen, um die Schwächen der Einzelmethoden zu überwinden (Yoon et al. 2012, Hartwig et al. 2014, Weigert et al. 2014). Die hier durchgeführte kombinierte Analyse von Transkriptom- und Sekretomdaten mehrerer Spezies, Gewebe, Interventionen und Array-Plattformen stellt viel innovatives Ausgangsmaterial zur Verfügung, um putative Adipokine, Myokine sowie Adipo-Myokine zu identifizieren und initial zu charakterisieren.

5.2 Initiale Charakterisierung ausgewählter, putativer Adipokine und Myokine beim Rind

Anschließend an die bioinformatische Identifizierung potentieller Zytokine wurde ein breites Methodenspektrum angewandt, um Informationen zur Expression einiger Kandidaten auf mRNA- und Proteinebene der F₂-Rinderpopulation mit differentem IMF-Gehalt, zur Zelltypspezifität ihrer Expression, zur zellulären Lokalisation sowie teilweise zur Expression in Abhängigkeit vom Zellentwicklungsstadium zu erhalten. Die Auswahl der hier analysierten Gene basierte nicht nur auf der Rangfolge in den Konsenslisten, sondern wurde nach verschiedenen Kriterien vorgenommen (siehe auch Abschnitt 4.2). Sowohl Kandidaten mit vollständig fehlenden Kenntnissen zur Bedeutung beim Rind (*ANXA1*, *GDF15*, *WIF1*) wurden einbezogen als auch diätregulierte Myokine (*THBS4*), Adipokine mit bereits vorliegenden Informationen im Zusammenhang mit dem IMF (*CIDEA*) und Kandidatengene mit deutlichen Expressionsunterschieden bei Rindern mit unterschiedlichem IMF, aber unklarer Funktion (*THRSP*).

Mit *ANXA1* wurde zunächst ein Gen mit dem höchsten Adipokin-Score von 8 untersucht. *ANXA1* gehört zur Superfamilie der Annexine und bindet Ca²⁺-abhängig an saure Phospholipide in der Zellmembran. Als Signalmolekül nimmt es eine wesentliche Funktion bei vielen physiologischen und pathologischen endokrinen Prozessen ein (John et al. 2004). Es besitzt vor allem anti-inflammatorische Eigenschaften und vermittelt regulatorische Aufgaben der Glukokortikoide (Perretti & Gavins 2003). Es existieren darüber hinaus einige wenige und teils kontroverse Hinweise auf eine potentiellen Rolle von *ANXA1* bei Übergewicht und Diabetes. In einer Transkriptomanalyse von humanem Fettgewebe fanden Henegar et al. (2008) eine erhöhte *ANXA1*-Expression bei Übergewicht. Im Gegensatz dazu korrelierten *ANXA1*-Plasmaspiegel in einer aktuelleren Arbeit invers mit den typischen Markern für Adipositas und Entzündung bei übergewichtigen Probanden (Kosicka et al. 2013). In einer Untersuchung an Mäusen konnte eine gesteigerte Genexpression in übergewichtigen Mäusen im Vergleich zu schlanken Mäusen und ein Einfluss auf ihren Fettstoffwechsel beobachtet werden (Akasheh et al. 2013b). Die Erkenntnisse in landwirtschaftlichen Nutztieren sind bisher noch sehr beschränkt. Es ist lediglich bekannt, dass *ANXA1* von bovinen Adipozyten exprimiert wird (Zhao et al. 2010). Beim Menschen ist es als sezerniert beschrieben (Lehr et al. 2012a) und soll in Zellwachstum und -differenzierung involviert sein (Huo und Zhang 2005). Da in den eigenen Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede bei den F₂-Bullen gemessen wurden, scheint es eher eine Rolle bei ektopischer Fetteinlagerung zu spielen und nicht in den regulären Prozess der intramuskulären Fetteinlagerung einzugreifen. Daher wurden keine vertiefenden Untersuchungen angeschlossen.

Als weitere putative Kandidaten wurden *GDF15* und *WIF1* vor allem aufgrund ihrer Lokalisation in bovinen QTL-Regionen selektiert, die mit der Körperzusammensetzung beim Rind assoziiert sind. Zudem ist eine Funktion von *GDF15* im humanen und murinen Energiestoffwechsel beschrieben, sodass eine ähnliche Stellung im bovinen Metabolismus nahe liegt. *GDF15*, auch bekannt als Macrophage inhibitory cytokine-1 (*MIC-1*), ist ein Zytokinmitglied der *TGFB* Superfamilie und weist strukturelle Ähnlichkeiten mit verwandten Proteinen auf (Bootkov et al. 1997). Als Produkt von Makrophagen, Kardiomyozyten und Endothelzellen wird es infolge von Gewebeverletzung und Sauerstoffmangel ausgeschüttet (Bootkov et al. 1997, Kempf et al. 2006, Jurczyk et al. 2003). Dank seiner anti-inflammatorischen, stress-induzierten und pro-apoptischen Eigenschaften kann *GDF15* zudem ein Biomarker für kardiovaskuläre Dysfunktion und ein Indikator für das kachektische Fortschreiten einer Krebserkrankung sein (Vila et al. 2011, Johnen et al. 2007, Lerner et al. 2015). Physiologisch zirkulierende Mengen des Gens werden allerdings eher mit der Regulation von Appetit und Energiehaushalt assoziiert. Die Überexpression von *Gdf15* in transgenen Mäusen unterdrückt die Futteraufnahme, reduziert das Körpergewicht und verbessert die Glukosetoleranz im Vergleich zum Wildtyp (Macia et al. 2012). *Gdf15*-KO Mäuse sind entsprechend schwerer und nehmen mehr Futter zu sich (Tsai et al. 2013). Humanstudien mit adipösen Teilnehmern zeigen hingegen eine deutliche Korrelation zwischen *GDF15*-Plasmaspiegeln und Fettleibigkeit einschließlich dessen Komorbiditäten wie Typ-2-Diabetes (Vila et al. 2011, Kempf et al. 2012). Im Jahr 2009 haben Ding et al. herausgefunden, dass *GDF15* auch von Adipozyten exprimiert und freigesetzt wird und zu erhöhter Adiponectin-Produktion beiträgt. Es könnte somit als neues Adipokin mit regulatorischen Einflüssen auf die Energiehomöostase betrachtet werden. Die Sekretion aus humanen Muskelzellen wurde ebenfalls schon berichtet (Weigert et al. 2014). Obwohl seine Bedeutung im humanen Fettstoffwechsel erwiesen ist, bleibt seine Funktion im bovinen Organismus vorerst unklar. Da *MSTN* als anderes Mitglied der Genfamilie bekanntermaßen einen großen Einfluss auf das Muskelwachstum und die Fleischqualität hat, sollte die Expression von *GDF15* im Muskel überprüft werden. Das Gen war auf den verwendeten bovinen Arrays nicht annotiert, sodass dessen Expression mittels RT-qPCR untersucht wurde. Es konnte jedoch keine Expression für *GDF15* im Skelettmuskel der F₂-Bullen gemessen werden, daher wurde es als Kandidat für die Körperzusammensetzung beim Rind wieder verworfen.

WIF1 gehört zur den sezernierten WNT-Antagonisten, die eine direkte hemmende Wirkung auf WNT-Proteine haben, indem sie an deren Rezeptoren binden. Die WNT-Proteine selbst beinhalten eine große Familie von extrazellulären Signalmolekülen mit entscheidender Bedeutung für die Embryogenese und eine Vielzahl an normalen und pathologischen Entwicklungsprozessen (Wodarz & Nusse 1998). *Wif1* kommt bei erwachsenen Mäusen

vorrangig im Herz, in der Lunge und neuronalen Geweben vor, aber auch im Auge und Gehirn. Beim Menschen findet eine Expression im Gehirn, im Knorpelgewebe, in der Lunge und stark in der Retina statt (Hsieh et al. 1999, Hunter et al. 2004). Das Protein enthält eine WIF-Domäne und fünf Epidermal growth factor (*EGF*)-like Domänen und soll in die Segmentation des Mesoderms involviert sein (Hsieh et al. 1999). Es agiert außerdem als Tumorsuppressor-Gen und ist in vielen Krebsarten herunter reguliert oder sogar epigenetisch „stumm“ geschaltet (Wissmann et al. 2003, Lin et al. 2007). In einer *in silico* Analyse des humanen Muskelsekretoms wurde es bereits als sezerniert beschrieben (Bortoluzzi et al. 2006). Bisher sind keine Informationen zur Wirkung von *WIF1* in Muskel- und Fettgewebe verfügbar, es existieren lediglich Hinweise darauf, dass das Adipokin Adiponectin einen Einfluss auf die *WIF1*-Expression hat (Liu et al. 2008). Außerdem wurde *WIF1* vor kurzem im Zusammenhang mit der intramuskulären Fettablagerung bei Rindern genannt. Es soll mit peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (*PPARGC1A*), einem Transkriptionsfaktor im Fett- und Muskelstoffwechsel, assoziiert sein (Ramayo-Caldas et al. 2014). Die eigenen Untersuchungen ergaben jedoch keine messbare Expression des Gens im bovinen Skelettmuskel, was seine Bedeutung für die Körperzusammensetzung beim Rind unwahrscheinlich macht.

Auch *CIDEA* stellte ein aussichtsreiches Gen dar, da es einen Myokin-Score von 5 aufwies und in einem QTL-Abschnitt liegt, der mit der Marmorierung von Rindfleisch in Verbindung gebracht wird. *CIDEA* gehört zur *CIDE*-Familie und besitzt eine regulatorische N-terminale und eine katalytische C-terminale Domäne, wobei die letztere ausschlaggebend für dessen Funktionalität ist (Li et al. 2009). Das *CIDEA* Gen, auch bekannt als *CIDE3* beim Menschen oder fat specific protein of 27 kDa (*Fsp27*) in Nagetieren, trägt zur Steuerung der Apoptose und der Adipogenese bei (Kim et al. 2008). Es ist ein Modulator der Lipidtropfenformation, der für die optimale Einlagerung von Triglyceriden in Adipozyten notwendig ist (Puri et al. 2007). Von Danesch et al. wurde es schon im Jahr 1992 als fettzellspezifisches Markergen charakterisiert und aufgrund seines Zusammenspiels mit *CEBPs* und anderen *CEBP*-like Proteinen als Regulator der adipogenen Differenzierung diskutiert. Einige veröffentlichte Studien zeigten auch die direkte Beeinflussung der *CIDEA*-Expression durch den Transkriptionsfaktor *PPARG*, der als Masterregulator der Differenzierung von Adipozyten gilt (Kim et al. 2008, Matsusue et al. 2010). Die Größe von Lipidtropfen in humanen Zellen nimmt mit steigendem *CIDEA* mRNA-Level dank Insulin zu. Folglich lässt die insulin-induzierte Vergrößerung der Fettvakuolen mit dem Abbau des Gens deutlich nach (Ito et al. 2010). Es wird überdies vermutet, dass *Cidec* mit der mitochondrialen Funktion assoziiert ist, weil Tiere mit ausgeschaltetem Gen einen erhöhten Energieumsatz haben und vor Übergewicht und Insulinresistenz geschützt sind (Nishino et al. 2008). *CIDEA* ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in den porcinen Lipidstoffwechsel involviert (Li et al. 2009).

Außerdem lassen aktuelle Arbeiten einen Zusammenhang zwischen Genpolymorphismen und Fleischqualitätsmerkmalen vermuten (Wang et al. 2013, Mei et al. 2015). Trotz der zahlreich publizierten Bedeutung von *CIDEA* in der Lipogenese, wurde es nicht über die Konsensliste für Adipokine herausgefiltert. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass es sezerniert wird. Genexpressionsunterschiede im MLD der F₂-Bullen mit niedrigem und hohem IMF-Gehalt lassen *CIDEA* jedoch weiterhin als aussichtsreichen Kandidaten erscheinen, sodass vertiefende Untersuchungen erfolgen werden.

Für die Auswahl von *THBS4* sprachen in dem Fall sein Myokin-Score von 5 und seine differente Expression im bovinen Skelettmuskel in den Arrays. Darüber hinaus steht das Gen über seinen QTL mit der bovinen Fettverteilung im Zusammenhang. *THBS4* ist ein adhäsives Glykoprotein der extrazellulären Matrix, welches hauptsächlich in Sehnen und Muskeln vorkommt (Hauser et al. 1995), aber auch in neuronalen Geweben (Arber & Caroni 1995). Als Mitglied der Thrombospondine vermittelt es vorrangig Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen und moduliert die EZM infolge von Gewebeerstörung. Neueste Studien beschäftigen sich hauptsächlich mit der funktionellen Charakterisierung von *Thbs4* (Frolova et al. 2014). Aufgrund seiner Stressinduzierbarkeit wurde allerdings auch schon seine Bedeutung als Schutzfaktor vor einem Myokardinfarkt in Betracht gezogen (Brody et al. 2015). Die Lokalisation des Proteins im Skelettmuskel wurde bisher im interstitiellen Zellbereich, im sogenannten Perimysium, von Ratten nachgewiesen (Arber & Caroni 1995). *THBS4* wurde auch in Endothelzellen, glatten Muskelzellen von Gefäßwänden und im Endomysium gefunden (Stenina et al. 2003, Frolova et al. 2014). Es ist bekannt, dass *THBS4* sezerniert wird (Bortoluzzi et al. 2006), allerdings gibt es bisher keine Beweise für dessen Zirkulation im Blut. Die Ergebnisse von Timmons et al. (2005) sprechen für eine Belastungsinduktion des Gens. Es konnte eine erhöhte Expression im menschlichen Muskel nach sechs Wochen Training festgestellt werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit nimmt *Thbs4* einen hohen Stellenwert im Metabolismus ein, denn bei Mäusen mit einem Gen-KO traten eine veränderte Morphologie des Muskels, ein gestörter Stoffwechsel in roten Skelettmuskelfasern sowie Herzschwäche auf (Frolova et al. 2014). Obwohl *THBS4* auf dem Array zwischen den Rinderrassen JB und CH signifikant reguliert war, wurde das Gen im MLD der SEGFAM-Bullen mit differentem IMF-Gehalt nicht unterschiedlich exprimiert. Da *THBS4* laut Literatur ein Myokin sein könnte (Bortoluzzi et al. 2006), sollte dessen exprimierender Zelltyp im bovinen MLD identifiziert werden. Mit Hilfe der Ergebnisse, die aus der Analyse der mRNA aus den LCM-Proben gewonnen wurden, konnte die Genexpression nicht eindeutig einem spezifischen Zelltyp zugeordnet werden. Ein Grund dafür könnte eine zu geringe Menge an Zellmaterial sein, die während der LCM gesammelt wurde. Zudem wurde die Möglichkeit erwogen, dass es sich bei *THBS4* um ein Adipo-Myokin handeln könnte. Die Lokalisation des *THBS4*-Proteins durch immunhistochemische Färbungen in den

Serienschnitten des bovinen MLD zeigte allerdings deutlich, dass die Fettzellen per se nicht THBS4-positiv sind. Ein Fluoreszenzsignal konnte im Bereich der Bindegewebszellen und zwischen den Muskelzellen abgebildet werden. Da die Markierung sehr diffus um den Zellkern herum auftrat, war die Zuordnung zu einem bestimmten Zellorganell nicht gegeben. Das diffuse Signal auf Proteinebene könnte die unklaren Resultate der zelltypspezifischen mRNA-Expression teilweise erklären. Mit der LCM kann zwar gewährleistet werden, dass die gesammelten Muskel- und Fettzellen frei vom jeweiligen anderen Zelltyp sind, jedoch können in beiden Fraktionen die wesentlich kleineren Zellen aus der EZM enthalten sein. Diese lassen sich mit der Methode nicht trennen. Besonders Zellen der EZM, in denen das THBS4-Protein eindeutig detektierbar war, sind oft schwer von Adipozyten zu unterscheiden und können daher für eine falsch-positive Genexpression verantwortlich sein. Wenn also die EZM-Zellen die Expression verursachen, sind die Ergebnisse der Immunhistochemie mit den Expressionsresultaten der Zelltypen vereinbar. Ob das Protein in den Blutgefäßen des Interstitiums vorkommt, sollte die Kapillarfärbung des bovinen Muskelquerschnitts klären. Die Kapillaren konnten als ein Ort der Genexpression von THBS4 auf Proteinebene ausgeschlossen werden. Das THBS4-Protein konnte dafür im Plasma der 20 untersuchten Bullen gefunden werden. Im Skelettmuskel zeigte nur ein Tier eine markierte Proteinbande. Es kann gemutmaßt werden, dass die zufällig entnommene Probe des MLD außergewöhnlich viel Bindegewebe enthielt, was zu einer verstärkten THBS4-Proteinmenge führte. Daraus kann zusammenfassend geschlussfolgert werden, dass THBS4 sezerniert wird und in der interstitiellen Umgebung von Fett- und Muskelzellen, jedoch nicht in den Kapillaren, nachweisbar ist. Für die metabolische Einordnung von *THBS4* sind noch weitere Untersuchungen notwendig.

Die ausführliche Charakterisierung von *THRSP* ließ sich vorrangig durch die hohen Expressionsunterschiede im MLD der F₂-Bullen begründen, die dem Array und einer weiteren Transkriptomanalyse zu entnehmen waren. Zahlreiche Hinweise aus der Literatur zur differentiellen Expression bei Rindern rechtfertigten seine Auswahl zusätzlich (Wang et al. 2009, Graugnard et al. 2010, de Jager et al. 2013, Hudson et al. 2015). *Thrsp* wurde erstmals 1981 als kleines saures Protein von Seelig et al. entdeckt und als Spot 14 (S14) bezeichnet. Die Autoren fanden das Protein bei einer 2D-Gelanalyse nach einer *in vitro* Translation hepatischer RNA von Ratten, die mit verschiedenen Dosen von Triiodthyronin (*T3*) behandelt worden waren. *Thrsp* wird in der Leber, Brustdrüse und im weißen und braunen Fettgewebe exprimiert (Seelig et al. 1981, Jump & Oppenheimer 1985) und ist im Zellkern und Zytosol angesiedelt (Tao & Towle 1986, Kinlaw et al. 1989, Kinlaw et al. 1992). Es wird vermutet, dass es bei Nagern den zellulären Gehalt an lipogenen Enzymen, wie z.B. Fettsäuresynthase (*FAS*), in Hepatozyten (Clarke et al. 1990, Kinlaw et al. 1995) und in Adipozyten (Freake & Moon 2003) steigert. Es gibt außerdem auch Studien zur *THRSP*-

Expression beim Menschen. Kirschner und Mariash (1999) beobachteten zwar keine Korrelation zwischen dem BMI und der basalen *THRSP*-mRNA, fanden aber starke Regulationsunterschiede der mRNA-Menge zwischen normalgewichtigen und übergewichtigen Probanden nach einer Fastenperiode. Eine weitere Untersuchung lässt vermuten, dass humanes *THRSP* invers mit Übergewicht assoziiert ist (Ortega et al. 2010). Obwohl die Regulation von *THRSP* im Lipidstoffwechsel und beeinflussende Faktoren bereits etabliert sind (Kinlaw et al. 1995, Moisés et al. 2014, Vahmani et al. 2014), müssen die ablaufenden Signalwege noch aufgeklärt werden. In den letzten Jahren lag der Forschungsschwerpunkt im Humanbereich jedoch vorrangig im Zusammenhang des Gens mit Krebs (Kinlaw et al. 2006, Donnelly et al. 2009). Bezüglich der Expression bei Rindern erlangte das *THRSP*-Gen im Jahr 2005 erstmalig Aufmerksamkeit aufgrund seiner erhöhten mRNA-Menge im MLD der Rasse Japanese Black mit einer verstärktem Marmorierung im Vergleich zur Milchrindrasse Deutsche Holstein (Wang et al. 2005). Kurz darauf wurde die Beteiligung von *THRSP* an der Regulation der Milchfettsynthese im Euter festgestellt und dessen Expression in Fettgewebe, Leber und Muskel in Abhängigkeit von verschiedenen Diäten nachgewiesen (Harvatine & Baumann 2006). Einen weiteren Hinweis darauf, dass die *THRSP*-mRNA-Spiegel im Skelettmuskel von Rindern durch die Fütterungsintervention beeinflusst werden, lieferten Graugnard et al. (2010). Die Lokalisation von *THRSP* in einem großen QTL-Intervall, das mit Schlachtkörperqualität assoziiert wird, unterstützt den möglichen Zusammenhang des Gens mit der Körperzusammensetzung beim Rind (McClure et al. 2010). Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde seine gesteigerte Genexpression immer in Rinderrassen mit einem höheren IMF-Gehalt gefunden (Wang et al. 2009, de Jager et al. 2013, Hudson et al. 2015). Um neue Biomarker für die Ablagerung von IMF zu identifizieren, analysierten Wang et al. (2009) bereits das Muskeltranskriptom von Färsen zweier Rinderkreuzungen mit extrem abweichendem IMF-Gehalt. Die *THRSP*-Expression wurde in Muskelbiopsieproben zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten (3. bis 30. Lebensmonat) gemessen. Es zeigte sich eine starke Korrelation der mRNA-Menge mit dem IMF-Gehalt zu den späten Zeitpunkten der Gewebeentnahme. Daraufhin wurde *THRSP* als potentielles Kandidatengen postuliert, um die Marmorierung des Fleisches vorherzusagen (Wang et al. 2009). Um aufzuklären, ob tatsächlich eine Beziehung zwischen der *THRSP*-mRNA-Expression und dem IMF-Gehalt von Rindern besteht, wurde in der vorliegenden Arbeit eine umfassende Analyse des *THRSP*-Gens und Proteins vorgenommen. Dazu wurde zunächst eine vergleichende quantitative Analyse der *THRSP*-mRNA-Menge in bovinen Geweben durchgeführt. Bereits ermittelte Expressionsunterschiede im MLD (Komolka et al. 2014c) wurden hier bestätigt und mögliche Ursachen analysiert. Da potentiell genregulierende SNPs für die differente Expression verantwortlich sein könnten, wurde eine ausführliche Sequenzierung der genomischen DNA vorgenommen. Bei der DNA-Sequenzierung wurden

zwei annotierte SNPs, c.88G>A und c.194C>T, gefunden. Diese befanden sich bei den Bullen der untersuchten SEGFAM-Population im vollständigen Kopplungsungleichgewicht. La et al. (2013) und Oh et al. (2014) konnten im Gegensatz dazu in koreanischen Hanwoorindern keine Kopplung der SNPs feststellen. Beide SNPs waren nicht mit dem IMF assoziiert. Das entspricht den Erkenntnissen der publizierten Daten, denn bisher sind Einflüsse der SNPs lediglich auf Milch- und Proteinertag (Fontanesi et al. 2014), die Fettmenge der Milch (Mancini et al. 2013, Fontanesi et al. 2014), die Wasserbindungskapazität und Zartheit (Zhang et al. 2009) sowie Fettsäureparameter des Skelettmuskels bekannt (Saatchi et al. 2013, Oh et al. 2014). Auch zwischen dem neu identifizierten SNP (c.*695T>C) und dem IMF-Gehalt konnte kein Zusammenhang hergestellt werden. Da keine genomischen Ursachen für die differente Expression von *THRSP* gefunden werden konnten, sollte der Zelltyp identifiziert werden, der für die Genexpression im MLD verantwortlich ist. Auf diese Weise sollte geklärt werden, ob die erhöhte mRNA-Menge von *THRSP* im Skelettmuskel von den Bullen der F₂-Population mit höherem IMF auf eine größere Anzahl an Adipozyten in der Probe zurückzuführen ist. Ein mRNA-Vorkommen von *THRSP* konnte ausschließlich in Fettzellen, aber nicht in Muskelfasern detektiert werden. Die Expressionsergebnisse weisen also darauf hin, dass sich die Unterschiede in der mRNA-Konzentration von *THRSP* im bovinen Skelettmuskel mit variablem IMF-Gehalt aus der Anzahl der *THRSP*-exprimierenden Adipozyten ergeben. Die *THRSP*-Expression scheint parallel zur Anzahl der ausdifferenzierten Adipozyten im Skelettmuskelgewebe anzusteigen. Den Genexpressionsunterschieden aus der Studie von Wang et al. (2009) liegt also mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Mengeneffekt zugrunde. Anschließend wurden das Vorkommen und die zelluläre Lokalisation des *THRSP*-Proteins in bovinen Geweben überprüft. Bisher konnte das *THRSP*-Protein nur in der Leber von Labornagern, in Zelllinien und humanen Adipozyten nachgewiesen werden (Brown et al. 1997, Chou et al. 2007, Ortega et al. 2010). In den bovinen Serienschnitten des Skelettmuskels, die auch für die LCM verwendet wurden, konnte *THRSP* nur in den Zellkernen von Adipozyten und interstitiellen Zellen detektiert werden. Auch in den bovinen Gewebequerschnitten des SCF, der Leber und des MLD konnte das Protein nur in den Nuklei von Fettzellen, Bindegewebszellen und von Zellen im Periportalfeld, jedoch nicht in Zellkernen von Muskelfasern und Hepatozyten, nachgewiesen werden. Um die Kernlokalisierung des *THRSP*-Proteins zu untermauern, wurde zusätzlich eine Fraktionierung der Gewebeproteine durchgeführt. Auch dabei konnte das Protein deutlich der Nuklearfraktion von Leber und subkutanem Fett zugeordnet werden. Da das Proteinvorkommen sich generell auf die Zellkerne beschränkte, liegt die Vermutung nahe, dass *THRSP* nicht sezerniert wird. Diese Annahme stimmt mit den Angaben der Protein-Datenbank UniProt überein, wo *THRSP* als vermutlicher Transkriptionsregulator beschrieben ist.

Um zu überprüfen, ob das Gen nur in reifen Adipozyten vorhanden ist, wurde dessen Expression im Verlauf der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen ausgewertet. Das Ermitteln der mRNA-Menge der hier mitgeführten Markergene diente der Einordnung der Ergebnisse in den Ablauf der Adipogenese. Die Signale der Markerproteine (DLK1, CEBPB) und des THRSP-Proteins, die durch immunzytochemische Färbungen in der 3T3-L1-Zelllinie hervorgerufen wurden, waren weitgehend übereinstimmend mit den Ergebnissen der relativen mRNA-Expression der dazugehörigen Gene. *DLK1* wurde zu Beginn des Differenzierungsprozesses am höchsten exprimiert, sank dann in der Expression und scheint letztendlich auf einem gewissen Grundlevel zu stagnieren. Weil auch bis zum Versuchsende immer noch Präadipozyten in der Zellkultur vorkommen oder auch nicht alle Vorläuferzellen das Potential zur Reifung besitzen, tritt der Präadipozytenmarker sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene durchgängig auf. Abbildung 23 verdeutlicht allerdings, dass Zellen, die bereits Fett eingelagert haben, oft kein Farbsignal mehr zeigen. Über komplexe Signalkaskaden inhibiert *DLK1* die Adipogenese und gleichzeitig die Transkription von *CEBPB*. Ein supprimierender Transkriptionsfaktor muss erst herunter reguliert werden, damit die Adipozytendifferenzierung fortschreiten kann (Sul 2009). Obwohl *CEBPB* während der adipogenen Differenzierung nur in einem frühen Stadium aktiv ist, war sein mRNA-Vorkommen über den gesamten Differenzierungszeitraum von 19 Tagen recht konstant. In 3T3-L1-Zellen wird *CEBPB* innerhalb von zwei bis vier Stunden durch die Induktion der Differenzierung exprimiert und erreicht sein Maximum nach vier Stunden. Zwei Tage nach der Differenzierungsinitiation beginnt die mRNA-Menge wieder zu sinken (Lane et al. 1999). Nicht jede Zelle befindet sich jedoch im Verlauf der Differenzierung im gleichen Entwicklungszustand. Der transiente Anstieg gleicht sich in den verschiedenen vorhandenen Zellstadien höchstwahrscheinlich aus und der mRNA-Gehalt war daher auf einem gleichbleibenden Level messbar. In der Genexpression von *CEBPB* während der Differenzierung der primären bovinen stromavaskulären Zellen war dagegen ein markanter Abfall der mRNA-Menge zu verzeichnen. Auch in den Fluoreszenzaufnahmen der 3T3-L1-Zelllinie war der Theorie entsprechend eine deutliche Abnahme der CEBPB-positiven Zellkerne nach 21 Tagen Differenzierung wahrzunehmen. Je größer die Lipidtropfen in den Zellen, desto schwächer das Farbsignal. Die Genexpressionen von *Fabp4* und *Thrsp* stiegen in der Zelllinie sowie in der bovinen Primärkultur erst deutlich bei Vorhandensein von reifen Adipozyten an. Diese Tatsache passt gut zur Prognose, dass beide Gene erst bei begonnener Fettansammlung messbar sind. Wenngleich *Thrsp* eine niedrige, aber deutlich zunehmende mRNA-Konzentration mit dem Auftreten von Lipidtropfen zeigte, konnte das Thrsp-Protein immunhistochemisch in den 3T3-L1-Zellen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Da schon die mRNA-Konzentration am Detektionslimit gemessen wurde, könnte die Proteinmenge folglich noch unter der Nachweisgrenze gelegen haben. Insgesamt sind die

vorliegenden Ergebnisse ein klarer Beleg für die Expression von *THRSP* im bovinen Fettgewebe auf mRNA- und Proteinebene. Über eine *THRSP*-mRNA-Expression in diversen bovinen Organen (u.a. Fettgewebe, Leber, Skelettmuskel) wurde zwar bereits berichtet (Harvatine & Baumann 2006), aber Daten zum exprimierenden Zelltyp, zur subzellulären Lokalisation oder Genexpression auf Proteinebene in Rindern waren bislang nicht verfügbar. Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass *THRSP* von ausdifferenzierten Adipozyten, jedoch nicht von Myozyten, exprimiert wird. *THRSP* ist somit ein Marker für die steigende Anzahl an Fettzellen, nicht aber an der Adipozytenvermehrung selbst beteiligt. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass auch das *THRSP*-Protein im heterogenen bovinen Skelettmuskel nur in Adipozyten und Fettgewebs-assoziierten Zellen vorkommt, aber nicht in Myozyten. Dass *THRSP* immunhistochemisch hauptsächlich in Zellkernen lokalisiert und darüber hinaus nur in der nuklearen Fraktion des Proteins quantifiziert werden konnte, unterstützt die These, dass es sich bei *THRSP* um einen Transkriptionsfaktor der Adipogenese handelt, jedoch nicht um ein sezerniertes Adipokin bzw. Myokin.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die gewählte Kombination von Genexpressionsanalysen über RT-qPCR und Western Blot mit immunhistochemischen Verfahren, der Lasermikrodissektion sowie Zellkulturmodellen geeignet ist, potentielle Adipokine und Myokine als solche zu verifizieren bzw. zu verwerfen. Für eine funktionelle Untersuchung solcher Faktoren bieten Zellkultursysteme gute Voraussetzungen. Kommerziell verfügbare Systeme bestehen jedoch überwiegend aus immortalisierten Tumorzelllinien, die die Verhältnisse unter physiologischen Bedingungen nur teilweise widerspiegeln. Weiterhin sind oft gravierende Speziesunterschiede zu verzeichnen, die eine Untersuchung von Kandidatengenen in Zellen der betrachteten Zielspezies erforderlich machen. Primäre Zellkulturen sind entsprechend das Mittel der Wahl.

5.3 Etablierung von primären bovinen Zellkulturmodellen zur funktionellen Untersuchung von potentiellen Adipokinen und Myokinen

Es ist sehr wenig über die selektive Steuerung der Fettablagerung in die gewünschten Depots, wie das IMF bei Rindern, bekannt. Das Verständnis der Biologie von Präadipozyten und Adipozyten ist deshalb unerlässlich, um die Schlachtkörperzusammensetzung zu beeinflussen. Nur mit Hilfe von primären *in vitro* Zellkulturmethoden können Fettzellen unter kontrollierten Bedingungen studiert werden. Die Differenzierung von bovinen Präadipozyten zu Adipozyten unterliegt der Beteiligung und dem komplexen Zusammenspiel von zahlreichen Hormonen und Wachstumsfaktoren. Währenddessen verändern sich die Genexpression und die Morphologie der Zelle (Hausman et al. 2009, Poulos et al. 2010). Die spezifischen Mediumkomponenten, die für die Differenzierung benötigt werden, variieren zwischen den Spezies (Lengi & Corl 2010). Das Schicksal der Adipozyten-Vorläuferzellen

hängt aber von der Konvergenz multipler Faktoren ab, inklusive der Zelladhäsion an die umliegende EZM oder zu benachbarten Zellen, neuraler Signale und der Verfügbarkeit von Makro- und Mikronährstoffen (Hausman et al. 2009, Hausman 2012). Die 3T3-L1-Zelllinie ist das am besten charakterisierte und verlässlichste Modell für die Untersuchung der Präadipozytendifferenzierung. Ein Cocktail aus Serum, das mehrere Hormone und Wachstumsfaktoren liefert; Insulin, Glukokortikoiden (meist Dexamethason) und Isobutylmethylxanthin (IBMX); ist ausreichend für die Differenzierung von 3T3-L1-Zellen (Fernyhough et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte ein zufriedenstellendes Differenzierungsergebnis der murinen Zelllinie sogar nur mit Serum und Insulin erreicht werden. Damit wurden die Kultivierungsbedingungen so natürlich wie möglich gestaltet. Obwohl es einige Studien gibt, die eine erfolgreiche Differenzierung von primären bovinen Präadipozyten beschreiben (Wu et al. 2000, Hirai et al. 2007, Lengi & Corl 2010, Tokach et al. 2015), konnte hier kein ausreichend reproduzierbares Protokoll etabliert werden. Es wurden zahlreiche Differenzierungsmedien und Zusätze ausgetestet (siehe Anhang B), die entweder laut Literatur die Einlagerung von Lipidtropfen in Adipozyten fördern sollen oder die nach eigenen Beobachtungen weiter modifiziert wurden. Häufig wurden dabei kleine Vakuolen beobachtet, die anfangs irrtümlich für Fetttropfen gehalten wurden. Diese konnten jedoch nicht mit Ölrot angefärbt werden. Auch Wei et al. (2013) haben solche leeren intrazellulären Vesikel in bovinen Primärzellen gefunden. Ihre Untersuchungen weisen darauf hin, dass diese Vesikel intakt sind und von einer Phospholipidschicht umgeben werden. Sie dienen eventuell der späteren Speicherung von Lipiden. Das vorläufig beste Ergebnis wurde mit einem serumfreien Medium; supplementiert mit Dexamethason, IBMX, ITS und Ölsäure; erzielt. In primären Zellkulturen gibt es große Unterschiede bezüglich der Agenzien, die für die adipogene Induktion von stromavaskulären Zellen benötigt werden (Poulos et al. 2010). Bovine Primärzellen sind sehr anspruchsvoll und brauchen in der Regel mehr stimulierende Zusätze als porcine Zellkulturen (Wei et al. 2013). Obwohl Serum als unverzichtbar für den Differenzierungsprozess beschrieben wird (Hausman et al. 2009), wurden hier vor allem serumfreie Bedingungen getestet. Der Effekt von putativen Myokinen auf die Entwicklungsstadien der Adipozyten kann nur über die externe Zugabe dieser Faktoren überprüft werden. Serum enthält eine Menge an Komponenten und Signalpeptiden, die meist in unbekanntem Konzentrationen bzw. Wirkbeziehungen auftreten. Da das Risiko der Wechselwirkung zwischen Serum und biochemischen Botenstoffen besteht (Will et al. 2012, 2013), sollte auf Serum möglichst verzichtet werden. Dass eine Differenzierung von stromavaskulären Zellen zu lipidgefüllten Adipozyten auch ohne Serum funktioniert, haben Hauner et al. (1989) bereits vor über 25 Jahren anhand von humanen Primärzellen bewiesen. Auch Grant et al. (2008) haben zur Differenzierung von bovinen stromavaskulären Zellen serumfreies Medium eingesetzt. Um die natürliche Variation in Rinderpopulationen zu

repräsentieren, wurden für die Durchführung der Differenzierungsexperimente isolierte stromavaskuläre Zellen verschiedener Tiere genutzt. Dabei konnte festgestellt werden, dass es große tierindividuelle und depotspezifische Unterschiede gibt, was das Wachstums- und Differenzierungspotential der Zellen betrifft. Lengi & Corl (2010) machten diesbezüglich ebenfalls die Beobachtung von starken Tier-zu-Tier-Variationen. Als mögliche Begründung gaben sie an, dass viele Faktoren, wie Rasse, Geschlecht, Alter, Reproduktionsstatus und Körperzustand, dafür verantwortlich sein könnten. Dass sich das Ausmaß der stromavaskulären Differenzierung in der Zellkultur in Abhängigkeit vom Fettgewebsdepot unterscheidet, wurde auch schon an bovinen Zellkulturen gezeigt (Ortiz-Colón et al. 2009). Der Anteil der differenzierungsfähigen Zellen variiert ebenso zwischen den Spezies (Fernyhough et al. 2008, Poulos et al. 2010, Hausman et al. 2014). Auch die Einsaatdichte wird als Stellgröße der adipogenen Differenzierung diskutiert. In einigen Arbeiten wird berichtet, dass eine höhere Zellzahl bei der Einsaat den Differenzierungsprozess verbessert (Lengi & Corl 2010, Wei et al. 2013). Durch die kleinere Anzahl an Zellteilungen, die bis zur Konfluenz nötig sind, soll das Differenzierungsvermögen noch größer sein. Aus diesem Grund wurden in den hier durchgeführten Testprotokollen ebenfalls verschiedene Einsaatdichten ausprobiert. Es konnten allerdings keine auffälligen Unterschiede wahrgenommen werden. Darüber hinaus erschwert die begrenzte Ausbeute bei der Isolierung von Primärzellen die Anzahl der durchführbaren Experimente. Ein mehrfaches Passagieren, was unumgänglich ist, um Zellen zu vermehren, setzt das Differenzierungspotential allerdings noch weiter herab. Dementsprechend schwierig ist es, einen Versuchsaufbau unter identischen Bedingungen einige Male zu wiederholen und eine Aussage über die Reproduzierbarkeit zu treffen. Mit Hilfe einer Zelllinie, wie den murinen 3T3-L1-Zellen, kann ein ausreichend großer Zellbestand angelegt werden, auf den zurückgegriffen werden kann und der aus nur einem Zelltyp besteht. Während die Erforschung eines bestimmten Zelltyps den Vorteil hat, dass neue Signalwege und Moleküle entdeckt werden können (Poulos et al. 2010), birgt die Nutzung von immortalisierten bzw. klonierten Zellen allerdings auch immer die Gefahr einer unerwarteten bzw. unbekanntenen Veränderung der interessanten Signalkaskaden (Lengi & Corl 2010). Primärkulturen bestehen hingegen aus multiplen Zelltypen und haben daher langfristig einen höheren prädiktiven Wert für die Erforschung der *in vivo* Situation (Poulos et al. 2010). Ein weiterer Vorteil der stromavaskulären Zellen ist deren unmittelbare Gewinnung aus ihrem natürlichen Gewebeumfeld aus verschiedenen Spezies und Fettdepots, aber auch dass der Entnahmzeitpunkt auf Parameter wie Alter und Reproduktionsstatus abgestimmt werden kann. Zellen von etablierten Zelllinien fehlt die vorangegangene Exposition mit Botenstoffen aus dem lebenden Organismus (Poulos et al. 2010). Generell unterscheiden sich die Transkriptionsprofile der exprimierten Gene während der Adipogenese zwischen *in vitro* und

in vivo Proben (Soukas et al. 2001). Die Erkenntnisse aus einem Zellkulturmodell sind daher nur begrenzt und unter Vorbehalt auf den anderen Modelltyp übertragbar. *CEBPs* und *PPARs* spielen bekanntlich eine große Rolle in der Fettgewebsentwicklung *in vivo* und der Adipozytendifferenzierung *in vitro* (Ailhaud 1999). In einer Studie mit 3T3-L1-Zellen wird die Differenzierung als Resultat einer fortlaufenden Expression von Transkriptionsfaktoren beschrieben (Hishida et al. 2009). Sie beginnt zunächst mit dem transienten Anstieg der *CEBPA*- und *CEBPD*-Expression. Darauf folgt die Genexpression von *CEBPA* und *PPARG*. Untersuchungen an primären Zellen haben stark abweichende Expressionslevel der genannten Faktoren gezeigt. In bovinen stromavaskulären Zellen, z.B., wurde eine *PPARG*- und *CEBPA*-Expression schon vor der Initiation der Adipogenese beobachtet (Hausman et al. 2009). Auch reife Adipozyten werden zunehmend als Modellzellen verwendet. Sie sind zwar nicht mehr adhären und schwimmen im Kulturmedium, können aber trotzdem isoliert werden und wertvolle Informationen hinsichtlich der Adipogenese bereitstellen (Fernyhough et al. 2004). Ausgereifte Fettzellen geben ihre Lipide ins Medium oder an Tochterzellen ab (Chen et al. 2009, Fernyhough et al. 2004, 2005) und kehren *in vitro* in einen proliferativen Zustand zurück (Fernyhough et al. 2005; Wei et al. 2012, Wei et al. 2013). Sogenannte dedifferenzierte Fettzellen bzw. proliferative Tochterzellen haben die Fähigkeit, erneut zu lipid-assimilierenden Adipozyten zu redifferenzieren (Fernyhough et al. 2008, Wei et al. 2013), adipogene regulatorische Faktoren zu produzieren (Taniguchi et al. 2008) und in andere Zelltypen zu transdifferenzieren (Sakuma et al. 2009). Ein prinzipieller Ansatz, der aktuell angewendet wird, um reife Adipozyten zu isolieren, ist die „ceiling“ Kulturmethode (Fernyhough et al. 2004, Wei et al. 2013). Diese basiert auf den Auftriebseigenschaften, die lipid-gefüllte Adipozyten besitzen (Sugihara et al. 1986). Diese Methode bringt jedoch einige Schwierigkeiten mit sich und ist noch optimierungswürdig, denn zahlreiche Fettzellen gehen während des Prozesses verloren und es sind noch zu viele Fremdzellen vorhanden (Wei et al. 2013). Außerdem ist der Prozess der Dedifferenzierung und der anschließenden Redifferenzierung sehr zeitaufwändig und die Ausbeute im Verhältnis sehr gering.

Insgesamt bedarf die Etablierung von gut funktionierenden und reproduzierbaren primären bovinen Zellkulturmodellen noch weiterer Optimierung. Die Kenntnisse aus der Arbeit mit Rinderadipozyten könnten einen doppelten Nutzen haben, sowohl für die nachhaltige Fleischproduktion als auch für Aspekte der menschlichen Gesundheit (Dodson et al. 2010b). Auf der Suche nach einem weiteren geeigneten Alternativmodell für die bovine primäre Adipozytenkultur, das die *in vivo* Bedingungen besser widerspiegelt, wurde die Explantkultur, orientiert an einer Studie mit humanem Fettgewebe von Carswell et al. (2012), entwickelt. Dazu wurde ausdifferenziertes Gewebe aus dem SCF von adulten Tieren verwendet. Obwohl es sich auch hier um ein inhomogenes Zellgemisch handelt, sind reife Adipozyten als Zelltyp vorherrschend und Primärspeicher für überschüssige Energie in Form von

Triglyceriden (Azain 2004). Es konnte gezeigt werden, dass intakte Zellen über einen Zeitraum von mindestens 48 h erhalten blieben, da die Qualität der extrahierbaren RNA nicht wesentlich schlechter wurde. Damit ist eine wichtige Voraussetzung erfüllt, um die Wirkung von Adipokinen und Myokinen auf die Regulation relevanter Gene in Explantkulturen untersuchen zu können. Ein erster Versuch zur Wirkung von THBS4 auf adipogenese-assoziierte Gene lässt jedoch noch keine abschließenden Aussagen zu, dazu wären mehrere Durchgänge des Versuchs unter standardisierten Bedingungen notwendig. Auf das Vorhandensein von Serum kann dabei verzichtet werden, denn auch unter Verwendung von serumfreiem Kulturmedium konnten auswertbare Ergebnisse erzielt werden.

Typischerweise werden Zelllinien von Labornagern, wie Maus (C2C12) und Ratte (L6) verwendet, um grundlegende molekulare und zelluläre Prozesse des Wachstums und der Differenzierung des Skelettmuskels zu erforschen. Obwohl Primärkulturen, die vom Skelettmuskel stammen, oft ein Zellgemisch aus Muskelzellen und nicht-myogenen Populationen wie Adipozyten, Immunzellen oder Fibroblasten darstellen (Baquero-Perez et al. 2012), sind sie dennoch sehr gut geeignet, um Entwicklungsprozesse in Nutztieren zu beschreiben, da sie die *in vivo* Situation besser repräsentieren als immortalisierte Zelllinien. Einblicke in die Proliferation und Differenzierung von primären Muskelzellen wurden umfangreich aus Myoblastenkulturen von Vögeln und Mäusen gewonnen (Hembree et al. 1991). Was fleischproduzierende Tiere betrifft, existieren einige Protokolle für die Kultivierung von myogenen Zellen aus Schafen, Rindern (Dodson et al. 1987, Roe et al. 1989, Johnson et al. 1998) und Schweinen (Mau et al. 2008). Bovine Satellitenzellen wurden erstmalig 1987 von Dodson et al. isoliert und kultiviert. Bei der Kultivierung von Zellen können serumhaltige und serumfreie Kultursysteme gewählt werden. Die Entscheidung für eine der beiden Bedingungen ist von der Fragestellung abhängig. Analog zu den Adipozytenkulturen ist das Vorhandensein von Serum ungünstig, wenn die Effekte hormonell aktiver Einzelfaktoren untersucht werden sollen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde in den meisten Studien, die sich mit bovinen Zellkulturmodellen beschäftigen, mit serumhaltigem Medium gearbeitet, um die Differenzierung von Myoblasten zu mehrkernigen Myotuben zu induzieren (Cassar-Malek et al. 1999, Rønning et al. 2013, Lee et al. 2014). Unter definierten serumfreien Bedingungen wurde bisher nur eine Arbeit veröffentlicht, aus der keine detaillierten Informationen zur Mediumzusammensetzung zu entnehmen sind (Muroya et al. 2005). Die vorhandenen *in vitro* Modelle für Rinderskelettmuskelzellen sind allgemein schwer zu vergleichen, weil sie sich in Rasse, Muskeltyp und Alter der Tiere unterscheiden, die für die Isolierung der Satellitenzellen genutzt wurden. Eine Aufgabe dieser Arbeit war es, ein gut definiertes Differenzierungsmedium und optimale Kultivierungsbedingungen für eine bovine primäre Myoblastenkultur zu finden. Da bereits bekannt ist, dass eine spezielle Beschichtung mit einer Kombination aus Glykosaminoglykanen und Faserproteinen die frühe

Differenzierung von primären bovinen Skelettmuskelzellen verbessert (Rønning et al. 2013), wurden für die hier durchgeführten Versuche mit ECM-Gel beschichtete Platten verwendet. Es erwiesen sich alle getesteten Differenzierungsmedien als geeignet, um die Myotubenformation von bovinen Skelettmuskelzellen anzuregen. Das beste Ergebnis zeigte das Protokoll mit DLI ($30,92 \pm 3,43$ %), welches teilweise auf den Angaben für die Kultivierung von proliferierenden und differenzierenden Rattenmyoblasten basiert (Allen et al. 1985). Dieses beschriebene serumfreie Zellkultursystem bietet somit ein gutes *in vitro* Modell, um Differenzierungsvorgänge von bovinen Skelettmuskelzellen unter Zugabe externer Zusätze zu erforschen. Auf diese Weise können potentielle unspezifische Interaktionen zwischen zugeführten hormonellen Faktoren und Serumbestandteilen ausgeschlossen werden. In einigen Studien konnte beobachtet werden, dass die Wirkungen von Molekülen auf das Wachstum von porcinen Skelettmuskelzellen stark von den vorherrschenden Kulturbedingungen abhängt, da Serumkomponenten mit den getesteten Substanzen wechselwirken können (Will et al. 2012, 2013). Bei Untersuchungen zu den Effekten von Adipokinen und Myokinen auf Entwicklungsprozesse im Rindermuskel sollte deshalb auf ein serumfreies Differenzierungsmedium zurückgegriffen werden. Erfordert das experimentelle Design keine streng serumfreien Konditionen, können diese modifiziert werden.

5.4 Fazit

Insgesamt kann geschlussfolgert werden, dass ein globaler und bioinformatischer Ansatz bei der Auswertung von Genexpressionsdaten verschiedener Gewebe und Spezies dazu geeignet ist, um putative Zytokinkandidaten herauszustellen und grob in einen biologischen Kontext einzuordnen. Somit steht eine umfangreiche Datenquelle mit neuen Kandidatengen zur Verfügung, die durch molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden verifiziert werden müssen und danach unter verschiedensten physiologischen Gesichtspunkten und experimentellen Voraussetzungen weiter untersucht werden können. Durch das in der vorliegenden Arbeit angewandte breitgefächerte Methodenspektrum konnten potentielle Adipokine, Myokine oder Adipo-Myokine als solche beim Rind bestätigt bzw. ausgeschlossen sowie initial charakterisiert werden. Weil für die funktionelle Untersuchung von solchen hormonellen Faktoren Zellkultursysteme notwendig sind, wurden zusätzlich primäre *in vitro* Modelle etabliert, die im Vergleich zu Zelllinien die *in vivo* Situation besser reflektieren.

6 Zusammenfassung

Sowohl das Fett- als auch das Skelettmuskelgewebe werden seit einiger Zeit als wichtige endokrine Organe betrachtet. Mit Hilfe hormonähnlicher Faktoren können beide Gewebe auto-, para- und endokrin aktiv werden und mit ihrer Umgebung kommunizieren. Adipozyten produzieren und sezernieren sogenannte Adipokine. Myozyten setzen spezifische Moleküle frei, die als Myokine bezeichnet werden. Darüber hinaus existieren auch Adipo-Myokine, die von Fettgewebe und Skelettmuskulatur exprimiert und ausgeschüttet werden. Obwohl in humanen und murinen Studien bereits zahlreiche solcher Proteine identifiziert und teilweise charakterisiert werden konnten, ist über deren metabolische Wirkung nur wenig bekannt. Bezüglich ihrer physiologischen Funktionen bei Rindern sind bisher kaum Informationen vorhanden.

Die vorliegende Arbeit umfasst eine innovative bioinformatische Strategie zur Identifizierung neuer potentieller Zytokine, die den Muskel- und Fettstoffwechsel von Mensch, Modelltieren und Rindern beeinflussen können. Über umfangreiche vergleichende Auswertungsmatrices aus verschiedenen Transkriptom- und Sekretomdatensätzen von drei Spezies konnten 79 vermeintliche Adipokine, 119 putative Myokine und davon 22 Adipo-Myokine identifiziert werden. Um die herausgefilterten Faktoren in einen biologischen Kontext einordnen zu können, wurden sie einer Ingenuity Pathway Analyse unterzogen. Dabei wurde deutlich, dass viele regulierte Gene mit der Extrazellulärmatrix und Fibrose assoziiert sind. Da solche Prozesse für die Körperzusammensetzung beim Rind von Bedeutung sein könnten und bisher kaum in diesem Zusammenhang betrachtet wurden, wurden sechs Kandidatengene näher untersucht. Für drei Gene war entweder keine mRNA-Expression in Skelettmuskelproben von Bullen mit differentem IMF-Gehalt messbar oder es gab keine Expressionsunterschiede, sodass sie als Kandidaten ausgeschlossen wurden. Zwei Kandidatengene (*THBS4* und *THRSP*) wurden mit molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden näher charakterisiert, um Erkenntnisse zur Expression auf mRNA- und Proteinebene zu gewinnen. Dabei wurde festgestellt, dass *THBS4* als klassisch sezerniertes Protein zu den Adipo-Myokinen gezählt werden kann. *THRSP* hingegen wird offensichtlich nicht sezerniert, ist also weder Adipokin noch Myokin, und tritt erst in reifen Adipozyten auf. Die Lokalisation in Zellkernen unterstützt die These, dass *THRSP* als Transkriptionsfaktor wirken könnte. Aufgrund der globalen Herangehensweise bei der speziesübergreifenden Datenanalyse wurde eine Ressource mit einer Vielzahl uncharakterisierter Faktoren bereitgestellt, die zur Beantwortung verschiedenster Fragestellungen in der Nutztierforschung und im medizinischen Bereich genutzt werden kann. Durch die Etablierung von primären bovinen Fettzell- und Skelettmuskelkulturmodellen wurden zusätzlich methodische Voraussetzungen geschaffen, um funktionelle Untersuchungen mit ausgewählten Adipokinen und Myokinen durchzuführen.

7 Summary

For some time adipose tissue and skeletal muscle have been recognized to be important endocrine organs. Hormone-like factors enable both tissues to exhibit auto-, para- and endocrine activity and communicate with their local environment. Adipocytes are known to produce and secrete so-called adipokines. Myocytes release specific proteins termed as myokines. Furthermore, there are also adipo-myokines which are expressed and secreted by both adipose tissue and skeletal muscle. Although numerous molecules have been identified and partly characterized by human and murine studies, there is very less known concerning their metabolic actions. In cattle, the information existing about such factors and their physiological function is rather limited.

The present work includes an innovative bioinformatic strategy to identify novel putative proteins influencing the cross-talk between adipose tissue and skeletal muscle in humans, laboratory rodents and cattle. To achieve this aim different transcriptome and secretome data of three species were combined to generate common scoring matrices. In a wide comparative analysis of differently regulated transcripts 79 potential adipokines, 119 assumed myokines and thereof 22 adipo-myokines could be identified. To classify the filtered factors into a biological relationship, a network analysis with Ingenuity Pathway Analysis was done. It was shown that many regulated genes were associated with extracellular matrix and tissue fibrosis. Since such processes could be relevant for the body composition of cattle and have poorly been considered in this context, six candidate genes were examined. For three genes either no mRNA expression in skeletal muscle samples from bulls with different intramuscular fat content was measurable or there were no significant expression differences, so they were excluded as candidates. Two candidate genes (*THBS4* and *THRSP*) were further characterized using molecular biological and protein biochemical methods to gain some knowledge of gene expression on mRNA- and protein level. The results suggest that *THBS4* as classically secreted protein can be termed as adipo-myokine. By contrast, *THRSP* was obviously not secreted and is therefore neither an adipokine nor a myokine and occurs only in mature adipocytes. The localization in the nucleus supports the thesis that *THRSP* could act as a transcription factor. Due to the global approach of the cross-species analysis a great resource consisting of an amount of uncharacterized factors was provided. This gene pool can be useful for further investigations in different research areas and species. The establishment of working primary bovine fat cell and muscle cell culture models additionally created methodical prerequisites to conduct functional studies with selected adipokines and myokines.

8 Literaturverzeichnis

- Abdennour M, Reggio S, Le Naour G, Liu Y, Poitou C, Aron-Wisnewsky J, Charlotte F, Bouillot JL, Torcivia A, Sasso M, Miette V, Zucker JD, Bedossa P, Tordjman J, Clement K (2014). Association of adipose tissue and liver fibrosis with tissue stiffness in morbid obesity: links with diabetes and BMI loss after gastric bypass. *J Clin Endocrinol Metab*, 99: 898-907.
- Ahima RS & Flier JS (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*, 11: 327-332.
- Ailhaud G (1999). Cell surface receptors, nuclear receptors and ligands that regulate adipose tissue development. *Clin Chim Acta*, 286: 181-190.
- Akashah RT, Pang J, York JM, Fantuzzi G (2013a). New pathways to control inflammatory responses in adipose tissue. *Curr Opin Pharmacol*, 13: 613-617.
- Akashah RT, Pini M, Pang J, Fantuzzi G (2013b). Increased adiposity in annexin A1-deficient mice. *PLoS One*, 8: e82608.
- Albrecht E, Gotoh T, Ebara F, Xu JX, Viergutz T, Nürnberg G, Maak S, Wegner J (2011a). Cellular conditions for intramuscular fat deposition in Japanese Black and Holstein steers. *Meat Sci*, 89: 13-20.
- Albrecht E, Gotoh T, Ebara F, Wegner J, Maak S (2011b). Technical note: Determination of cell-specific gene expression in bovine skeletal muscle tissue using laser microdissection and reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction. *J Anim Sci*, 89: 4339-4343.
- Albrecht E, Komolka K, Kuzinski J, Maak S (2012). Agouti revisited: transcript quantification of the ASIP gene in bovine tissues related to protein expression and localization. *PLoS One*, 7: e35282.
- Albrecht E, Komolka K, Ponsuksili S, Gotoh T, Wimmers K, Maak S (2015). Transcriptome profiling of *Musculus longissimus dorsi* in two cattle breeds with different intramuscular fat deposition. *Genom Data*, 7: 109-111.
- Albrecht E, Kuzinski J, Komolka K, Gotoh T, Maak S (2015). Localization and abundance of early markers of fat cell differentiation in the skeletal muscle of cattle during growth—are DLK1-positive cells the origin of marbling flecks? *Meat Sci*, 100: 237-245.
- Albrecht E, Norheim F, Thiede B, Holen T, Ohashi T, Schering L, Lee S, Brenmoehl J, Thomas S, Drevon CA, Erickson HP, Maak S (2015). Irisin - a myth rather than an exercise-inducible myokine. *Sci Rep*, 5: 8889.
- Albrecht E, Teuscher F, Ender K, Wegner J (2006). Growth- and breed-related changes of marbling characteristics in cattle. *J Anim Sci*, 84: 1067-1075.
- Allen RE, Dodson MV, Luiten LS, Boxhorn LK (1985). A serum-free medium that supports the growth of cultured skeletal muscle satellite cells. *In Vitro Cell Dev Biol*, 21: 636-640.
- Alvarez-Llamas G, Szalowska E, de Vries MP, Weening D, Landman K, Hoek A, Wolffenbittel BH, Roelofsen H, Vonk RJ (2007). Characterization of the human visceral adipose tissue secretome. *Mol Cell Proteomics*, 6: 589-600.

- Amati F, Dubé JJ, Alvarez-Carnero E, Edreira MM, Chomentowski P, Coen PM, Switzer GE, Bickel PE, Stefanovic-Racic M, Toledo FG, Goodpaster BH (2011). Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance-trained athletes? *Diabetes*, 60: 2588-2597.
- Anisimov A, Alitalo A, Korpisalo P, Soronen J, Kaijalainen S, Leppänen VM, Jeltsch M, Ylä-Herttuala S, Alitalo K (2009). Activated forms of VEGF-C and VEGF-D provide improved vascular function in skeletal muscle. *Circ Res*, 104: 1302-1312.
- Appell HJ & Stang-Voss C (2013). Allgemeine Anatomie des Bewegungsapparates, In: Funktionelle Anatomie: Grundlagen sportlicher Leistung und Bewegung, 3. Auflage, Springer-Verlag, S. 13.
- Arber S & Caroni P (1995). Thrombospondin-4, an extracellular matrix protein expressed in the developing and adult nervous system promotes neurite outgrowth. *J Cell Biol*, 131: 1083-1094.
- Arioglu E, Rother KI, Reitman ML, Premkumar A, Taylor SI (2000). Lipodystrophy syndromes: when 'too little fat' is a clinical problem. *Pediatr Diabetes*, 1: 155-168.
- Azain MJ (2004). Role of fatty acids in adipocyte growth and development. *J Anim Sci*, 82: 916-924.
- Baik M, Vu TT, Piao MY, Kang HJ (2014). Association of DNA Methylation Levels with Tissue-specific Expression of Adipogenic and Lipogenic Genes in Longissimus dorsi Muscle of Korean Cattle. *Asian-Australas J Anim Sci*, 27: 1493-1498.
- Baquero-Perez B, Kuchipudi SV, Nelli RK, Chang KC (2012). A simplified but robust method for the isolation of avian and mammalian muscle satellite cells. *BMC Cell Biol*, 13: 16.
- Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B (2002). Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 2084-2089.
- Bellinge RH, Liberles DA, Iaschi SP, O'brien PA, Tay GK (2005). Myostatin and its implications on animal breeding: a review. *Anim Genet*, 36: 1-6.
- Bonnet M, Cassar-Malek I, Chilliard Y, Picard B (2010). Ontogenesis of muscle and adipose tissues and their interactions in ruminants and other species. *Animal*, 4: 1093-1109.
- Bonnet M, Cassar-Malek I, Delavaud A, Turrett M, Chilliard Y, Picard B (2008). Développement d'un modèle in vitro de culture d'adipocytes bovins pour étudier les interactions entre adipocytes, myoblastes et fibroblastes. In: 12ièmes Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes, Tours, France, *Viandes et Produits Carnés* (hors série), 163-164.
- Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, Moore AG, Bansal M, He XY, Zhang HP, Donnellan M, Mahler S, Pryor K, Walsh BJ, Nicholson RC, Fairlie WD, Por SB, Robbins JM, Breit SN (1997). MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 11514-11519.
- Bortoluzzi S, Scannapieco P, Cestaro A, Danieli GA, Schiaffino S (2006). Computational reconstruction of the human skeletal muscle secretome. *Proteins*, 62: 776-792.

- Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Højlund K, Gygi SP, Spiegelman BM (2012). A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481: 463-468.
- Boulé NG, Weisnagel SJ, Lakka TA, Tremblay A, Bergman RN, Rankinen T, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bouchard C (2005). Effects of exercise training on glucose homeostasis: the HERITAGE Family Study. *Diabetes Care*, 28: 108-114.
- Brenmoehl J, Albrecht E, Komolka K, Schering L, Langhammer M, Hoeflich A, Maak S (2014). Irisin is elevated in skeletal muscle and serum of mice immediately after acute exercise. *Int J Biol Sci*, 10: 338-349.
- Brody MJ, Schips TG, Vanhoutte D, Kanisicak O, Karch J, Maliken BD, Blair NS, Sargent MA, Prasad V, Molkentin JD (2015). Dissection of Thrombospondin-4 Domains Involved in Intracellular Adaptive Endoplasmic Reticulum Stress-Responsive Signaling. *Mol Cell Biol*, 36: 2-12.
- Brown SB, Maloney M, Kinlaw WB (1997). "Spot 14" protein functions at the pretranslational level in the regulation of hepatic metabolism by thyroid hormone and glucose. *J Biol Chem*, 272: 2163-2166.
- Bruns KW, Pritchard RH, Boggs DL (2004). The relationships among body weight, body composition, and intramuscular fat content in steers. *J Anim Sci*, 82: 1315-1322.
- Bureš D, Bartoň L, Zahrádková R, Teslík V, Krejčová M (2006). Chemical composition, sensory characteristics, and fatty acid profile of muscle from Aberdeen Angus, Charolais, Simmental, and Hereford bulls. *Czech J Anim Sci*, 51: 279-284.
- Cannon B & Nedergaard J (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, 84: 277-359.
- Carswell KA, Lee MJ, Fried SK (2012). Culture of isolated human adipocytes and isolated adipose tissue. *Methods Mol Biol*, 806: 203-214.
- Casas E, Shackelford SD, Keele JW, Koohmaraie M, Smith TP, Stone RT (2003). Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *J Anim Sci*, 81: 2976-2983.
- Casas E, Shackelford SD, Keele JW, Stone RT, Kappes SM, Koohmaraie M (2000). Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J Anim Sci*, 78: 560-569.
- Cassar-Malek I, Bonnet M, Chilliard Y and Picard B (2006). Cross-talk between myoblasts, adipocytes and fibroblasts during bovine myogenesis. COST Action 925 – the importance of prenatal events for postnatal muscle growth in relation to the quality of muscle based foods. In: Proceedings of the 3rd Work Group Meeting, Antalya, Turkey.
- Cassar-Malek I, Langlois N, Picard B, Geay Y (1999). Regulation of bovine satellite cell proliferation and differentiation by insulin and triiodothyronine. *Domest Anim Endocrinol*, 17: 373-388.
- Chan MH, Carey AL, Watt MJ, Febbraio MA (2004). Cytokine gene expression in human skeletal muscle during concentric contraction: evidence that IL-8, like IL-6, is influenced by glycogen availability. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287: R322-327.

- Chaudhuri R, Khoo PS, Tonks K, Junutula JR, Kolumam G, Modrusan Z, Samocha-Bonet D, Meoli CC, Hocking S, Fazakerley DJ, Stöckli J, Hoehn KL, Greenfield JR, Yang JYH, James DE (2015). Cross-species gene expression analysis identifies a novel set of genes implicated in human insulin sensitivity. *npj Systems Biology and Applications*, 1: 15010.
- Chen J, Guridi M, Fernyhough ME, Jiang Z, Guan L, Hausman GJ, Dodson MV (2009). Clonal Mature Adipocyte Production of Proliferative-competent Daughter Cells Requires Lipid Export Prior to Cell Division. *Int J Stem Cells*, 2: 76-79.
- Chilliard Y, Delavaud C, Bonnet M (2005). Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest Anim Endocrinol*, 29: 3-22.
- Choi SH, Chung KY, Johnson BJ, Go GW, Kim KH, Choi CW, Smith SB (2013). Co-culture of bovine muscle satellite cells with preadipocytes increases PPAR γ and C/EBP β gene expression in differentiated myoblasts and increases GPR43 gene expression in adipocytes. *J Nutr Biochem*, 24: 539-543.
- Chou WY, Cheng YS, Ho CL, Liu ST, Liu PY, Kuo CC, Chang HP, Chen YH, Chang GG, Huang SM (2007). Human spot 14 protein interacts physically and functionally with the thyroid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 357: 133-138.
- Clarke IJ (2008). Models of 'obesity' in large animals and birds. *Front Horm Res*, 36: 107-117.
- Clarke SD, Armstrong MK, Jump DB (1990). Dietary polyunsaturated fats uniquely suppress rat liver fatty acid synthase and S14 mRNA content. *J Nutr*, 120: 225-231.
- Colbert CL, Kim CW, Moon YA, Henry L, Palnitkar M, McKean WB, Fitzgerald K, Deisenhofer J, Horton JD, Kwon HJ (2010). Crystal structure of Spot 14, a modulator of fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 18820-18825.
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, 334: 292-295.
- Cook KS, Min HY, Johnson D, Chaplinsky RJ, Flier JS, Hunt CR, Spiegelman BM (1987). Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science*, 237: 402-405.
- Corpeleijn E, Saris WH, Blaak EE (2009). Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle. *Obes Rev*, 10: 178-193.
- Crowe S, Wu LE, Economou C, Turpin SM, Matzaris M, Hoehn KL, Hevener AL, James DE, Duh EJ, Watt MJ (2009). Pigment epithelium-derived factor contributes to insulin resistance in obesity. *Cell Metab*, 10: 40-47.
- Cunningham BA, Maloney M, Kinlaw WB (1997). Spot 14 protein-protein interactions: evidence for both homo- and heterodimer formation in vivo. *Endocrinology*, 138: 5184-5188.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*, 360: 1509-1517.

- Danesch U, Hoeck W, Ringold GM (1992). Cloning and transcriptional regulation of a novel adipocyte-specific gene, FSP27. CAAT-enhancer-binding protein (C/EBP) and C/EBP-like proteins interact with sequences required for differentiation-dependent expression. *J Biol Chem*, 267: 7185-7193.
- De Jager N, Hudson NJ, Reverter A, Barnard R, Cafe LM, Greenwood PL, Dalrymple BP (2013). Gene expression phenotypes for lipid metabolism and intramuscular fat in skeletal muscle of cattle. *J Anim Sci*, 91: 1112-1128.
- Deng Y & Scherer PE (2010). Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 1212: E1-19.
- Ding Q, Mracek T, Gonzalez-Muniesa P, Kos K, Wilding J, Trayhurn P, Bing C (2009). Identification of macrophage inhibitory cytokine-1 in adipose tissue and its secretion as an adipokine by human adipocytes. *Endocrinology*, 150: 1688-1696.
- Divoux A & Clément K (2011). Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. *Obes Rev*, 12: e494-503.
- Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, Basdevant A, Guerre-Millo M, Poitou C, Zucker JD, Bedossa P, Clément K (2010). Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes*, 59: 2817-2825.
- Dobrin R, Zhu J, Molony C, Argman C, Parrish ML, Carlson S, Allan MF, Pomp D, Schadt EE (2009). Multi-tissue coexpression networks reveal unexpected subnetworks associated with disease. *Genome Biol*, 10: R55.
- Dodson MV, Jiang Z, Chen J, Hausman GJ, Guan LL, Novakofski J, Thompson DP, Lorenzen CL, Fernyhough ME, Mir PS, Reecy JM (2010a). Allied industry approaches to alter intramuscular fat content and composition in beef animals. *J Food Sci*, 75: R1-8.
- Dodson MV, Hausman GJ, Guan L, Du M, Rasmussen TP, Poulos SP, Mir P, Bergen WG, Fernyhough ME, McFarland DC, Rhoads RP, Soret B, Reecy JM, Velleman SG, Jiang Z (2010b). Lipid metabolism, adipocyte depot physiology and utilization of meat animals as experimental models for metabolic research. *Int J Biol Sci*, 6: 691-699.
- Dodson MV, Martin EL, Brannon MA, Mathison BA, McFarland DC (1987). Optimization of bovine satellite cell-derived myotube formation in vitro. *Tissue Cell*, 19: 159-166.
- Donnelly C, Olsen AM, Lewis LD, Eisenberg BL, Eastman A, Kinlaw WB (2009). Conjugated linoleic acid (CLA) inhibits expression of the Spot 14 (THRSP) and fatty acid synthase genes and impairs the growth of human breast cancer and liposarcoma cells. *Nutr Cancer*, 61: 114-122.
- Doumit ME, Cook DR, Merkel RA (1996). Testosterone up-regulates androgen receptors and decreases differentiation of porcine myogenic satellite cells in vitro. *Endocrinology*, 137: 1385-1394.
- Du M, Huang Y, Das AK, Yang Q, Duarte MS, Dodson MV, Zhu MJ (2013). Meat Science and Muscle Biology Symposium: manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. *J Anim Sci*, 91: 1419-1427.

- Dundas J & Ling M (2012). Reference genes for measuring mRNA expression. *Theory Biosci*, 131: 215-223.
- Eckardt K, Görgens SW, Raschke S, Eckel J (2014). Myokines in insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 57: 1087-1099.
- Eckardt K, Sell H, Eckel J (2008). Novel aspects of adipocyte-induced skeletal muscle insulin resistance. *Arch Physiol Biochem*, 114: 287-298.
- Erickson HP (2013). Irisin and FNDC5 in retrospect: An exercise hormone or a transmembrane receptor? *Adipocyte*, 2: 289-293.
- Esfahani M, Movahedian A, Baranchi M, Goodarzi MT (2015). Adiponectin: an adipokine with protective features against metabolic syndrome. *Iran J Basic Med Sci*, 18: 430-442.
- Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW (2004). Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*, 145: 2273-2282.
- Famulla S, Lamers D, Hartwig S, Passlack W, Horrigs A, Cramer A, Lehr S, Sell H, Eckel J (2011). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is one of the most abundant proteins secreted by human adipocytes and induces insulin resistance and inflammatory signaling in muscle and fat cells. *Int J Obes (Lond)*, 35: 762-772.
- Febbraio MA & Pedersen BK (2002). Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J*, 16: 1335-1347.
- Fernyhough ME, Bucci LR, Hausman GJ, Antonio J, Vierck JL, Dodson MV (2005). Gaining a solid grip on adipogenesis. *Tissue Cell*, 37: 335-338.
- Fernyhough ME, Hausman GJ, Dodson MV (2008). Progeny from dedifferentiated bovine adipocytes display protracted adipogenesis. *Cells Tissues Organs*, 188: 359-372.
- Fernyhough ME, Okine E, Hausman G, Vierck JL, Dodson MV (2007). PPARgamma and GLUT-4 expression as developmental regulators/markers for preadipocyte differentiation into an adipocyte. *Domest Anim Endocrinol*, 33: 367-378.
- Fernyhough ME, Vierck JL, Hausman GJ, Mir PS, Okine EK, Dodson MV (2004). Primary adipocyte culture: adipocyte purification methods may lead to a new understanding of adipose tissue growth and development. *Cytotechnology*, 46: 163-172.
- Flier JS, Cook KS, Usher P, Spiegelman BM (1987). Severely impaired adipin expression in genetic and acquired obesity. *Science*, 237: 405-408.
- Fontanesi L, Calò DG, Galimberti G, Negrini R, Marino R, Nardone A, Ajmone-Marsan P, Russo V (2014). A candidate gene association study for nine economically important traits in Italian Holstein cattle. *Anim Genet*, 45: 576-580.
- Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW (2003). Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27: 875-888.
- Freake HC & Moon YK (2003). Hormonal and nutritional regulation of lipogenic enzyme mRNA levels in rat primary white and brown adipocytes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 49: 40-46.

- Friedman JM & Halaas JL (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395: 763-770.
- Frolova EG, Drazba J, Krukovets I, Kostenko V, Blech L, Harry C, VasANJI A, Drumm C, Sul P, Jenniskens GJ, Plow EF, Stenina-Adognravi O (2014). Control of organization and function of muscle and tendon by thrombospondin-4. *Matrix Biol*, 37: 35-48.
- Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA (2001). The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280: E827-847.
- Gallagher D, Kuznia P, Heshka S, Albu J, Heymsfield SB, Goodpaster B, Visser M, Harris TB (2005). Adipose tissue in muscle: a novel depot similar in size to visceral adipose tissue. *Am J Clin Nutr*, 81: 903-910.
- Gattu AK, Birkenfeld AL, Iwakiri Y, Jay S, Saltzman M, Doll J, Protiva P, Samuel VT, Crawford SE, Chung C (2014). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) suppresses IL-1 β -mediated c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation to improve hepatocyte insulin signaling. *Endocrinology*, 155: 1373-1385.
- Gillies AR & Lieber RL (2011). Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve*, 44: 318-331.
- Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE (2001). Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 5755-5761.
- Görgens SW, Eckardt K, Jensen J, Drevon CA, Eckel J (2015). Exercise and Regulation of Adipokine and Myokine Production. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 135: 313-336.
- Gotoh T (2003). Histochemical properties of skeletal muscles in Japanese cattle and their meat production ability. *Anim Sci J*, 74: 339-354.
- Gotoh T, Albrecht E, Teuscher F, Kawabata K, Sakashita K, Iwamoto H, Wegner J (2009). Differences in muscle and fat accretion in Japanese Black and European cattle. *Meat Sci*, 82: 300-308.
- Granneman JG (2015). Renaissance of brown adipose tissue research: integrating the old and new. *Int J Obes Suppl*, 5: S7-10.
- Grant AC, Ortiz-Colón G, Doumit ME, Buskirk DD (2008). Optimization of in vitro conditions for bovine subcutaneous and intramuscular preadipocyte differentiation. *J Anim Sci*, 86: 73-82.
- Graugnard DE, Berger LL, Faulkner DB, Loo JJ (2010). High-starch diets induce precocious adipogenic gene network up-regulation in longissimus lumborum of early-weaned Angus cattle. *Br J Nutr*, 103: 953-963.
- Greenwood PL & Cafe LM (2007). Prenatal and pre-weaning growth and nutrition of cattle: long-term consequences for beef production. *Animal*, 1: 1283-1296.
- Gutiérrez-Gil B, Wiener P, Nute GR, Burton D, Gill JL, Wood JD, Williams JL (2008). Detection of quantitative trait loci for meat quality traits in cattle. *Anim Genet*, 39: 51-61.

- Gutiérrez-Gil B, Williams JL, Homer D, Burton D, Haley CS, Wiener P (2009). Search for quantitative trait loci affecting growth and carcass traits in a cross population of beef and dairy cattle. *J Anim Sci*, 87: 24-36.
- Hansen GR, Abbey CA, Gaile DP, Raudsepp T, Chowdhary BP, Womack JE, Gill CA (2007). Assignment of six genes to bovine chromosomes 5 and 16 by fluorescence in situ hybridization, radiation hybrid mapping and genetic linkage analysis. *Cytogenet Genome Res*, 116: 194-197.
- Hartwig S, Raschke S, Knebel B, Scheler M, Irmeler M, Passlack W, Müller S, Hanisch FG, Franz T, Li X, Dicken HD, Eckardt K, Beckers J, de Angelis MH, Weigert C, Häring HU, Al-Hasani H, Ouwens DM, Eckel J, Kotzka J, Lehr S (2014). Secretome profiling of primary human skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, 1844: 1011-1017.
- Harvatine KJ & Bauman DE (2006). SREBP1 and thyroid hormone responsive spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. *J Nutr*, 136: 2468-2474.
- Hassan M, Latif N, Yacoub M (2012). Adipose tissue: friend or foe? *Nat Rev Cardiol*, 9: 689-702.
- Hauer H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF (1989). Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest*, 84: 1663-1670.
- Hauser N, Paulsson M, Kale AA, DiCesare PE (1995). Tendon extracellular matrix contains pentameric thrombospondin-4 (TSP-4). *FEBS Lett*, 368: 307-310.
- Hausman GJ (2012). Meat Science and Muscle Biology Symposium: the influence of extracellular matrix on intramuscular and extramuscular adipogenesis. *J Anim Sci*, 90: 942-949.
- Hausman GJ, Basu U, Wei S, Hausman DB, Dodson MV (2014). Preadipocyte and adipose tissue differentiation in meat animals: influence of species and anatomical location. *Annu Rev Anim Biosci*, 2: 323-351.
- Hausman GJ, Dodson MV, Ajuwon K, Azain M, Barnes KM, Guan LL, Jiang Z, Poulos SP, Sainz RD, Smith S, Spurlock M, Novakofski J, Fernyhough ME, Bergen WG (2009). Board-invited review: the biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. *J Anim Sci*, 87: 1218-1246.
- Hembree JR, Hathaway MR, Dayton WR (1991). Isolation and culture of fetal porcine myogenic cells and the effect of insulin, IGF-I, and sera on protein turnover in porcine myotube cultures. *J Anim Sci*, 69: 3241-3250.
- Henegar C, Tordjman J, Achard V, Lacasa D, Cremer I, Guerre-Millo M, Poitou C, Basdevant A, Stich V, Viguerie N, Langin D, Bedossa P, Zucker JD, Clement K (2008). Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol*, 9: R14.
- Hick A & Hartmann J (2006). Muskelphysiologie, In: Hick C & Hick A (Hrsg.) Intensivkurs Physiologie, 5. Auflage, Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH, S. 264.
- Hiller B, Angulo J, Olivera M, Nuernberg G, Nuernberg K (2013). How selected tissues of lactating holstein cows respond to dietary polyunsaturated fatty acid supplementation. *Lipids*, 48: 357-367.

- Hirai S, Matsumoto H, Hino N, Kawachi H, Matsui T, Yano H (2007). Myostatin inhibits differentiation of bovine preadipocyte. *Domest Anim Endocrinol*, 32: 1-14.
- Hishida T, Nishizuka M, Osada S, Imagawa M (2009). The role of C/EBPdelta in the early stages of adipogenesis. *Biochimie*, 91: 654-657.
- Hoehne A, Nuernberg G, Kuehn C, Nuernberg K (2012). Relationship between intramuscular fat content, selected carcass traits, and fatty acid profile in bulls using a F2-population. *Meat Sci*, 90: 629-635.
- Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, Nusse R, Dawid IB, Nathans J (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature*, 398: 431-436.
- Hu D, Fukuhara A, Miyata Y, Yokoyama C, Otsuki M, Kihara S, Shimomura I (2013). Adiponectin regulates vascular endothelial growth factor-C expression in macrophages via Syk-ERK pathway. *PLoS One*, 8: e56071.
- Hudson NJ, Reverter A, Greenwood PL, Guo B, Cafe LM, Dalrymple BP (2015). Longitudinal muscle gene expression patterns associated with differential intramuscular fat in cattle. *Animal*, 9: 650-659.
- Huff-Lonergan E, Zhang W, Lonergan SM (2010). Biochemistry of postmortem muscle - lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Sci*, 86: 184-195.
- Huh JY, Panagiotou G, Mougios V, Brinkoetter M, Vamvini MT, Schneider BE, Mantzoros CS (2012). FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. *Metabolism*, 61: 1725-1738.
- Hunter DD, Zhang M, Ferguson JW, Koch M, Brunken WJ (2004). The extracellular matrix component WIF-1 is expressed during, and can modulate, retinal development. *Mol Cell Neurosci*, 27: 477-488.
- Huo XF & Zhang JW (2005). Annexin1 regulates the erythroid differentiation through ERK signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 331: 1346-1352.
- Imumorin IG, Kim EH, Lee YM, De Koning DJ, van Arendonk JA, De Donato M, Taylor JF, Kim JJ (2011). Genome Scan for Parent-of-Origin QTL Effects on Bovine Growth and Carcass Traits. *Front Genet*, 2: 44.
- Indrakusuma I, Sell H, Eckel J (2015). Novel Mediators of Adipose Tissue and Muscle Crosstalk. *Curr Obes Rep*, 4: 411-417.
- Inoue M, Jiang Y, Barnes RH 2nd, Tokunaga M, Martinez-Santibañez G, Geletka L, Lumeng CN, Buchner DA, Chun TH (2013). Thrombospondin 1 mediates high-fat diet-induced muscle fibrosis and insulin resistance in male mice. *Endocrinology*, 154: 4548-4559.
- Ito M, Nagasawa M, Hara T, Ide T, Murakami K (2010). Differential roles of CIDEA and CIDEA in insulin-induced anti-apoptosis and lipid droplet formation in human adipocytes. *J Lipid Res*, 51: 1676-1684.
- Janssen I, Heymsfield SB, Wang ZM, Ross R (2000). Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. *J Appl Physiol*, 89: 81-88.

- John CD, Christian HC, Morris JF, Flower RJ, Solito E, Buckingham JC (2004). Annexin 1 and the regulation of endocrine function. *Trends Endocrinol Metab*, 15: 103-109.
- Johnen H, Lin S, Kuffner T, Brown DA, Tsai VW, Bauskin AR, Wu L, Pankhurst G, Jiang L, Junankar S, Hunter M, Fairlie WD, Lee NJ, Enriquez RF, Baldock PA, Corey E, Apple FS, Murakami MM, Lin EJ, Wang C, During MJ, Sainsbury A, Herzog H, Breit SN (2007). Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF-beta superfamily cytokine MIC-1. *Nat Med*, 13: 1333-1340.
- Johnson BJ, Halstead N, White ME, Hathaway MR, DiCostanzo A, Dayton WR (1998). Activation state of muscle satellite cells isolated from steers implanted with a combined trenbolone acetate and estradiol implant. *J Anim Sci*, 76: 2779-2786.
- Jonker JW, Suh JM, Atkins AR, Ahmadian M, Li P, Whyte J, He M, Juguilon H, Yin YQ, Phillips CT, Yu RT, Olefsky JM, Henry RR, Downes M, Evans RM (2012). A PPAR γ -FGF1 axis is required for adaptive adipose remodelling and metabolic homeostasis. *Nature*, 485: 391-394.
- Jump DB & Oppenheimer JH (1985). High basal expression and 3,5,3'-triiodothyronine regulation of messenger ribonucleic acid S14 in lipogenic tissues. *Endocrinology*, 117: 2259-2266.
- Jurczyluk J, Brown D, Stanley KK (2003). Polarised secretion of cytokines in primary human microvascular endothelial cells is not dependent on N-linked glycosylation. *Cell Biol Int*, 27: 997-1003.
- Kang HJ, Trang NH, Baik M (2015). Effects of Dietary Restriction on the Expression of Lipid Metabolism and Growth Hormone Signaling Genes in the Longissimus dorsi Muscle of Korean Cattle Steers. *Asian-Australas J Anim Sci*, 28: 1187-1193.
- Kanzleiter T, Rath M, Görgens SW, Jensen J, Tangen DS, Kolnes AJ, Kolnes KJ, Lee S, Eckel J, Schürmann A, Eckardt K (2014). The myokine decorin is regulated by contraction and involved in muscle hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*, 450: 1089-1094.
- Kawanishi N, Niihara H, Mizokami T, Yano H, Suzuki K (2013). Exercise training attenuates adipose tissue fibrosis in diet-induced obese mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 440: 774-779.
- Kempf T, Eden M, Strelau J, Naguib M, Willenbockel C, Tongers J, Heineke J, Kotlarz D, Xu J, Molkentin JD, Niessen HW, Drexler H, Wollert KC (2006). The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*, 98: 351-360.
- Kempf T, Guba-Quint A, Torgerson J, Magnone MC, Haefliger C, Bobadilla M, Wollert KC (2012). Growth differentiation factor 15 predicts future insulin resistance and impaired glucose control in obese nondiabetic individuals: results from the XENDOS trial. *Eur J Endocrinol*, 167: 671-678.
- Kern SA, Pritchard RH, Blair AD, Scramlin SM, Underwood KR (2014). The influence of growth stage on carcass composition and factors associated with marbling development in beef cattle. *J Anim Sci*, 92: 5275-5284.
- Kershaw EE & Flier JS (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 2548-2556.

- Kharraz Y, Guerra J, Pessina P, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P (2014). Understanding the process of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Biomed Res Int*, 2014: 965631.
- Kim JY, Liu K, Zhou S, Tillison K, Wu Y, Smas CM (2008). Assessment of fat-specific protein 27 in the adipocyte lineage suggests a dual role for FSP27 in adipocyte metabolism and cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294: E654-667.
- Kim S & Moustaid-Moussa N (2000). Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. *J Nutr*, 130: 3110S-3115S.
- Kinlaw WB, Ling NC, Oppenheimer JH (1989). Identification of rat S14 protein and comparison of its regulation with that of mRNA S14 employing synthetic peptide antisera. *J Biol Chem*, 264: 19779-19783.
- Kinlaw WB, Tron P, Friedmann AS (1992). Nuclear localization and hepatic zonation of rat "spot 14" protein: immunohistochemical investigation employing anti-fusion protein antibodies. *Endocrinology*, 131: 3120-3122.
- Kinlaw WB, Church JL, Harmon J, Mariash CN (1995). Direct evidence for a role of the "spot 14" protein in the regulation of lipid synthesis. *J Biol Chem*, 270: 16615-16618.
- Kinlaw WB, Quinn JL, Wells WA, Roser-Jones C, Moncur JT (2006). Spot 14: A marker of aggressive breast cancer and a potential therapeutic target. *Endocrinology*, 147: 4048-4055.
- Kirschner LS & Mariash CN (1999). Adipose S14 mRNA is abnormally regulated in obese subjects. *Thyroid*, 9: 143-148.
- Kivelä R, Silvennoinen M, Lehti M, Kainulainen H, Vihko V (2007). Effects of acute exercise, exercise training, and diabetes on the expression of lymphangiogenic growth factors and lymphatic vessels in skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293: H2573-2579.
- Kjaer M (2004). Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev*, 84: 649-698.
- Komolka K, Albrecht E, Wimmers K, Michal JJ, Maak S (2014a). Molecular heterogeneities of adipose depots - potential effects on adipose-muscle cross-talk in humans, mice and farm animals. *J Genomics*, 2: 31-44.
- Komolka K, Albrecht E, Schering L, Brenmoehl J, Hoeflich A, Maak S (2014b). Locus characterization and gene expression of bovine FNDC5: is the myokine irisin relevant in cattle? *PLoS One*, 9: e88060.
- Komolka K, Albrecht E, Kuehn C, Wimmers K, Maak S (2014c). Expression of thyroid hormone responsive protein (THRSP) is related to intramuscular fat in a F2-cross between Charolais and Holstein. *Archiv Latinoam Prod Animal*, 22: 618-621.
- Komolka K, Ponsuksili S, Albrecht E, Kühn C, Wimmers K, Maak S (2015). Gene expression profile of Musculus longissimus dorsi in bulls of a Charolais × Holstein F2-cross with divergent intramuscular fat content. *Genom Data*, 7: 131-133.
- Kondo H, Shimomura I, Matsukawa Y, Kumada M, Takahashi M, Matsuda M, Ouchi N, Kihara S, Kawamoto T, Sumitsuji S, Funahashi T, Matsuzawa Y (2002). Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome. *Diabetes*, 51: 2325-2328.

- Kos K & Wilding JP (2010). SPARC: a key player in the pathologies associated with obesity and diabetes. *Nat Rev Endocrinol*, 6: 225-235.
- Kosicka A, Cunliffe AD, Mackenzie R, Zariwala MG, Perretti M, Flower RJ, Renshaw D (2013). Attenuation of plasma annexin A1 in human obesity. *FASEB J*, 27: 368-378.
- Kristiansson E, Österlund T, Gunnarsson L, Arne G, Larsson DG, Nerman O (2013). A novel method for cross-species gene expression analysis. *BMC Bioinformatics*, 14: 70.
- Kühn C, Bellmann O, Voigt J, Wegner J, Guiard V, Ender K (2002). An experimental approach for studying the genetic and physiological background of nutrient transformation in cattle with respect to nutrient secretion and accretion type. *Arch Tierz*, 45: 317-330.
- Kuttappan VA, Brewer VB, Apple JK, Waldroup PW, Owens CM (2012). Influence of growth rate on the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poult Sci*, 91: 2677-2685.
- Kuttappan VA, Shivaprasad HL, Shaw DP, Valentine BA, Hargis BM, Clark FD, McKee SR, Owens CM (2013a). Pathological changes associated with white striping in broiler breast muscles. *Poult Sci*, 92: 331-338.
- Kuttappan VA, Brewer VB, Mauromoustakos A, McKee SR, Emmert JL, Meullenet JF, Owens CM (2013b). Estimation of factors associated with the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poult Sci*, 92: 811-819.
- La B, Oh D, Lee Y, Shin S, Lee C, Chung E, Yeo J (2013). Association of bovine fatty acid composition with novel missense nucleotide polymorphism in the thyroid hormone-responsive (THRSP) gene. *Anim Genet*, 44: 118.
- Lambernd S, Taube A, Schober A, Platzbecker B, Görgens SW, 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.
- Lane MD, Tang QQ, Jiang MS (1999). Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 266: 677-683.
- Lawson MA (2004). The role of integrin degradation in post-mortem drip loss in pork. *Meat Sci*, 68: 559-566.
- Lee EJ, Lee HJ, Kamli MR, Pokharel S, Bhat AR, Lee YH, Choi BH, Chun T, Kang SW, Lee YS, Kim JW, Schnabel RD, Taylor JF, Choi I (2014). Depot-specific gene expression profiles during differentiation and transdifferentiation of bovine muscle satellite cells, and differentiation of preadipocytes. *Genomics*, 100: 195-202.
- Lehr S, Hartwig S, Lamers D, Famulla S, Müller S, Hanisch FG, Cuvelier C, Ruige J, Eckardt K, Ouwens DM, Sell H, Eckel J (2012a). Identification and validation of novel adipokines released from primary human adipocytes. *Mol Cell Proteomics*, 11: M111.010504.
- Lehr S, Hartwig S, Sell H (2012b). Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin Appl*, 6: 91-101.
- Lengi AJ & Corl BA (2010). Factors influencing the differentiation of bovine preadipocytes in vitro. *J Anim Sci*, 88: 1999-2008.

- Lerner L, Hayes TG, Tao N, Krieger B, Feng B, Wu Z, Nicoletti R, Chiu MI, Gyuris J, Garcia JM (2015). Plasma growth differentiation factor 15 is associated with weight loss and mortality in cancer patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 6: 317-324.
- Li YH, Lei T, Chen XD, Xia T, Peng Y, Long QQ, Zhang J, Feng SQ, Zhou L, Yang ZQ (2009). Molecular cloning, chromosomal location and expression pattern of porcine CIDEa and CIDEc. *Mol Biol Rep*, 36: 575-582.
- Li Y, Tong X, Rumala C, Clemons K, Wang S (2011). Thrombospondin1 deficiency reduces obesity-associated inflammation and improves insulin sensitivity in a diet-induced obese mouse model. *PLoS One*, 6: e26656.
- Lidell ME & Enerbäck S (2010). Brown adipose tissue--a new role in humans? *Nat Rev Endocrinol*, 6: 319-325.
- Lieber RL & Ward SR (2013). Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 4. Structural and functional consequences of skeletal muscle fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 305: C241-252.
- Lin YC, You L, Xu Z, He B, Yang CT, Chen JK, Mikami I, Clément G, Shi Y, Kuchenbecker K, Okamoto J, Kashani-Sabet M, Jablons DM (2007). Wnt inhibitory factor-1 gene transfer inhibits melanoma cell growth. *Hum Gene Ther*, 18: 379-386.
- Liu J, Lam JB, Chow KH, Xu A, Lam KS, Moon RT, Wang Y (2008). Adiponectin stimulates Wnt inhibitory factor-1 expression through epigenetic regulations involving the transcription factor specificity protein 1. *Carcinogenesis*, 29: 2195-2202.
- Lu Y, Huggins P, Bar-Joseph Z (2009). Cross species analysis of microarray expression data. *Bioinformatics*, 25: 1476-1483.
- Lund DK & Cornelison DD (2013). Enter the matrix: shape, signal and superhighway. *FEBS J*, 280: 4089-4099.
- Macia L, Tsai VW, Nguyen AD, Johnen H, Kuffner T, Shi YC, Lin S, Herzog H, Brown DA, Breit SN, Sainsbury A (2012). Macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1/GDF15) decreases food intake, body weight and improves glucose tolerance in mice on normal & obesogenic diets. *PLoS One*, 7: e34868.
- Macken CN, Milton CT, Klopfenstein TJ, Dicke BD, McClellan DE (2003). Effects of final implant type and supplementation of melenogestrol acetate[®] on finishing feedlot heifer performance, carcass characteristics, and feeding economics. *Prof Anim Sci*, 19: 159-170.
- Mancini G, Nicolazzi EL, Valentini A, Chillemi G, Marsan PA, Santus E, Pariset L (2013). Association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and milk production traits in Italian Brown cattle. *Livestock Science*, 157: 93-99.
- Matusue K (2010). A physiological role for fat specific protein 27/cell death-inducing DFF45-like effector C in adipose and liver. *Biol Pharm Bull*, 33: 346-350.
- Mau M, Oksbjerg N, Rehfeldt C (2008). Establishment and conditions for growth and differentiation of a myoblast cell line derived from the semimembranosus muscle of newborn piglets. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 44: 1-5.
- McBryan J, Hamill RM, Davey G, Lawlor P, Mullen AM (2010). Identification of suitable reference genes for gene expression analysis of pork meat quality and analysis of candidate genes associated with the trait drip loss. *Meat Sci*, 86: 436-439.

- McClure MC, Morsci NS, Schnabel RD, Kim JW, Yao P, Rolf MM, McKay SD, Gregg SJ, Chapple RH, Northcutt SL, Taylor JF (2010). A genome scan for quantitative trait loci influencing carcass, post-natal growth and reproductive traits in commercial Angus cattle. *Anim Genet*, 41: 597-607.
- McPhee MJ, Oltjen JW, Famula TR, Sainz RD (2006). Meta-analysis of factors affecting carcass characteristics of feedlot steers. *J Anim Sci*, 84: 3143-3154.
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 387: 83-90.
- McPherron AC & Lee SJ (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 12457-12461.
- McPherron AC & Lee SJ (2002). Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J Clin Invest*, 109: 595-601.
- Mei CG, Gui LS, Fu CZ, Wang HC, Wang JL, Cheng G, Zan LS (2015). Polymorphisms in the bovine CIDEC gene are associated with body measurement traits and meat quality traits in Qinchuan cattle. *Genet Mol Res*, 14: 9013-9023.
- Mejhert N, Galitzky J, Pettersson AT, Bambace C, Blomqvist L, Bouloumié A, Frayn KN, Dahlman I, Arner P, Rydén M (2010). Mapping of the fibroblast growth factors in human white adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab*, 95: 2451-2457.
- Moisá SJ, Shike DW, Faulkner DB, Meteer WT, Keisler D, Looor JJ (2014). Central Role of the PPAR γ Gene Network in Coordinating Beef Cattle Intramuscular Adipogenesis in Response to Weaning Age and Nutrition. *Gene Regul Syst Bio*, 8: 17-32.
- Molina H, Yang Y, Ruch T, Kim JW, Mortensen P, Otto T, Nalli A, Tang QQ, Lane MD, Chaerkady R, Pandey A (2009). Temporal profiling of the adipocyte proteome during differentiation using a five-plex SILAC based strategy. *J Proteome Res*, 8: 48-58.
- Moloney AP, Mooney MT, Kerry JP, Troy DJ (2001). Producing tender and flavoursome beef with enhanced nutritional characteristics. *Proc Nutr Soc*, 60: 221-229.
- Moreno-Navarrete JM, Touskova V, Sabater M, Mraz M, Drapalova J, Ortega F, Serrano M, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Ortiz MR, Pardo G, Pueyo N, Ricart W, Lacinova Z, Haluzik M, Frühbeck G, Fernández-Real JM (2013). Liver, but not adipose tissue PEDF gene expression is associated with insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*, 37: 1230-1237.
- Mörlein D, Link G, Werner C, Wicke M (2007). Suitability of three commercially produced pig breeds in Germany for a meat quality program with emphasis on drip loss and eating quality. *Meat Sci*, 77: 504-511.
- Muroya S, Nakajima I, Oe M, Chikuni K (2005). Effect of phase limited inhibition of MyoD expression on the terminal differentiation of bovine myoblasts: no alteration of Myf5 or myogenin expression. *Dev Growth Differ*, 47: 483-492.
- Nalaila SM, Stothard P, Moore SS, Li C, Wang Z (2012). Whole-genome QTL scan for ultrasound and carcass merit traits in beef cattle using Bayesian shrinkage method. *J Anim Breed Genet*, 129: 107-119.
- Nielsen AR, Mounier R, Plomgaard P, Mortensen OH, Penkowa M, Speerschneider T, Pilegaard H, Pedersen BK (2007). Expression of interleukin-15 in human skeletal muscle effect of exercise and muscle fibre type composition. *J Physiol*, 584: 305-312.

- Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SL, Fagoaga OR, Henson DA, Utter A, Davis JM, Williams F, Butterworth DE (1998). Influence of mode and carbohydrate on the cytokine response to heavy exertion. *Med Sci Sports Exerc*, 30: 671-678.
- Nikolić N, Bakke SS, Kase ET, Rudberg I, Flo Halle I, Rustan AC, Thoresen GH, Aas V (2012). Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an in vitro model of exercise. *PLoS One*, 7: e33203.
- Nishino N, Tamori Y, Tateya S, Kawaguchi T, Shibakusa T, Mizunoya W, Inoue K, Kitazawa R, Kitazawa S, Matsuki Y, Hiramatsu R, Masubuchi S, Omachi A, Kimura K, Saito M, Amo T, Ohta S, Yamaguchi T, Osumi T, Cheng J, Fujimoto T, Nakao H, Nakao K, Aiba A, Okamura H, Fushiki T, Kasuga M (2008). FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. *J Clin Invest*, 118: 2808-2821.
- Nonneman DJ, Shackelford SD, King DA, Wheeler TL, Wiedmann RT, Snelling WM, Rohrer GA (2013). Genome-wide association of meat quality traits and tenderness in swine. *J Anim Sci*, 91: 4043-4050.
- Oh DY, Lee YS, La BM, Lee JY, Park YS, Lee JH, Ha JJ, Yi JK, Kim BK, Yeo JS (2014). Identification of exonic nucleotide variants of the thyroid hormone responsive protein gene associated with carcass traits and Fatty Acid composition in korean cattle. *Asian-Australas J Anim Sci*, 27: 1373-1380.
- O'Neill S & O'Driscoll L (2015). Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes Rev*, 16: 1-12.
- Ortega FJ, Vazquez-Martin A, Moreno-Navarrete JM, Bassols J, Rodriguez-Hermosa J, Gironés J, Ricart W, Peral B, Tinahones FJ, Fruhbeck G, Menendez JA, Fernández-Real JM (2010). Thyroid hormone responsive Spot 14 increases during differentiation of human adipocytes and its expression is down-regulated in obese subjects. *Int J Obes (Lond)*, 34: 487-499.
- Ortiz-Colón G, Grant AC, Doumit ME, Buskirk DD (2009). Bovine intramuscular, subcutaneous, and perirenal stromal-vascular cells express similar glucocorticoid receptor isoforms, but exhibit different adipogenic capacity. *J Anim Sci*, 87: 1913-1920.
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, 11: 85-97.
- Palin MF, Beaudry D, Roberge C, Pomar C (2002). Use of subtractive hybridization to identify genetic factors involved in the development of swine muscle steatosis. In: Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France, Session 3.
- Paulsen G, Mikkelsen UR, Raastad T, Peake JM (2012). Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exerc Immunol Rev*, 18: 42-97.
- Pedersen BK (2013). Muscle as a secretory organ. *Compr Physiol*, 3: 1337-1362.
- Pedersen BK, Akerström TC, Nielsen AR, Fischer CP (2007). Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol*, 103: 1093-1098.
- Pedersen BK & Febbraio MA (2008). Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev*, 88: 1379-1406.

- Pedersen BK & Febbraio MA (2012). Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*, 8: 457-465.
- Pedersen BK & Hoffman-Goetz L (2000). Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev*, 80: 1055-1081.
- Pedersen BK, Steensberg A, Schjerling P (2001). Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J Physiol*, 536: 329-337.
- Pellegrinelli V, Rouault C, Rodriguez-Cuenca S, Albert V, Edom-Vovard F, Vidal-Puig A, Clément K, Butler-Browne GS, Lacasa D (2015). Human Adipocytes Induce Inflammation and Atrophy in Muscle Cells During Obesity. *Diabetes*, 64: 3121-3134.
- Perretti M & Gavins FN (2003). Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. *News Physiol Sci*, 18: 60-64.
- Petersen AM & Pedersen BK (2005). The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol*, 98: 1154-1162.
- Pethick DW, D'Souza DN, Dunshea FR, Harper GS (2005). Fat metabolism and regional distribution in ruminants and pigs – influences of genetics and nutrition. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*, 15: 39-45.
- Pethick DW, Harper GS, Oddy, VH (2004). Growth, development and nutritional manipulation of marbling in cattle: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44: 705-715.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 30: e36.
- Pfuhl R, Bellmann O, Kühn C, Teuscher F, Ender K (2007). Beef versus dairy cattle: a comparison of feed conversion, carcass composition, and meat quality. *Arch Tierz*, 50: 59-70.
- Picard B, Lefaucheur L, Berri C, Duclos MJ (2002). Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reprod Nutr Dev*, 42: 415-431.
- Platter WJ, Tatum JD, Belk KE, Koontz SR, Chapman PL, Smith GC (2005). Effects of marbling and shear force on consumers' willingness to pay for beef strip loin steaks. *J Anim Sci*, 83: 890-899.
- Ponsuksili S, Jonas E, Murani E, Phatsara C, Srikanchai T, Walz C, Schwerin M, Schellander K, Wimmers K (2008). Trait correlated expression combined with expression QTL analysis reveals biological pathways and candidate genes affecting water holding capacity of muscle. *BMC Genomics*, 9: 367.
- Poulos SP, Dodson MV, Hausman GJ (2010). Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. *Exp Biol Med (Maywood)*, 235: 1185-1193.
- Puri V, Konda S, Ranjit S, Aouadi M, Chawla A, Chouinard M, Chakladar A, Czech MP (2007). Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage. *J Biol Chem*, 282: 34213-34218.
- Quarta C, Sánchez-Garrido MA, Tschöp MH, Clemmensen C (2016). Renaissance of leptin for obesity therapy. *Diabetologia*, 59: 920-927.

- Ramayo-Caldas Y, Fortes MR, Hudson NJ, Porto-Neto LR, Bolormaa S, Barendse W, Kelly M, Moore SS, Goddard ME, Lehnert SA, Reverter A (2014). A marker-derived gene network reveals the regulatory role of PPARGC1A, HNF4G, and FOXP3 in intramuscular fat deposition of beef cattle. *J Anim Sci*, 92: 2832-2845.
- Raschke S & Eckel J (2013). Adipo-myokines: two sides of the same coin--mediators of inflammation and mediators of exercise. *Mediators Inflamm*, 2013: 320724.
- Raschke S, Elsen M, Gassenhuber H, Sommerfeld M, Schwahn U, Brockmann B, Jung R, Wisløff U, Tjønnå AE, Raastad T, Hallén J, Norheim F, Drevon CA, Romacho T, Eckardt K, Eckel J (2013a). Evidence against a beneficial effect of irisin in humans. *PLoS One*, 8: e73680.
- Raschke S, Eckardt K, Bjørklund Holven K, Jensen J, Eckel J (2013b). Identification and validation of novel contraction-regulated myokines released from primary human skeletal muscle cells. *PLoS One*, 8: e62008.
- Rehman I, Azzouzi AR, Cross SS, Deloulme JC, Catto JW, Wylde N, Larre S, Champigneulle J, Hamdy FC (2004). Dysregulated expression of S100A11 (calgizzarin) in prostate cancer and precursor lesions. *Hum Pathol*, 35: 1385-1391.
- Robelin, J (1986). Growth of adipose tissues in cattle; partitioning between depots, chemical composition and cellularity. A review. *Livest Prod Sci*, 14: 349-364.
- Roe JA, Harper JM, Buttery PJ (1989). Protein metabolism in ovine primary muscle cultures derived from satellite cells--effects of selected peptide hormones and growth factors. *J Endocrinol*, 122: 565-571.
- Roh SG, Suzuki Y, Gotoh T, Tatsumi R, Katoh K (2016). Physiological Roles of Adipokines, Hepatokines, and Myokines in Ruminants. *Asian-Australas J Anim Sci*, 29: 1-15.
- Rønning SB, Pedersen ME, Andersen PV, Hollung K (2013). The combination of glycosaminoglycans and fibrous proteins improves cell proliferation and early differentiation of bovine primary skeletal muscle cells. *Differentiation*, 86: 13-22.
- Rotter V, Nagaev I, Smith U (2003). Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem*, 278: 45777-45784.
- Saatchi M, Garrick DJ, Tait RG Jr, Mayes MS, Drewnoski M, Schoonmaker J, Diaz C, Beitz DC, Reecy JM (2013). Genome-wide association and prediction of direct genomic breeding values for composition of fatty acids in Angus beef cattle. *BMC Genomics*, 14: 730.
- Sabater M, Moreno-Navarrete JM, Ortega FJ, Pardo G, Salvador J, Ricart W, Frühbeck G, Fernández-Real JM (2010). Circulating pigment epithelium-derived factor levels are associated with insulin resistance and decrease after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*, 95: 4720-4728.
- Sakuma T, Matsumoto T, Kano K, Fukuda N, Obinata D, Yamaguchi K, Yoshida T, Takahashi S, Mugishima H (2009). Mature, adipocyte derived, dedifferentiated fat cells can differentiate into smooth muscle-like cells and contribute to bladder tissue regeneration. *J Urol*, 182: 355-365.
- Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI (2010). Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*, 375: 2267-2277.

- Schering L, Hoene M, Kanzleiter T, Jähnert M, Wimmers K, Klaus S, Eckel J, Weigert C, Schürmann A, Maak S, Jonas W, Sell H (2015). Identification of novel putative adipomyokines by a cross-species annotation of secretomes and expression profiles. *Arch Physiol Biochem*, 121: 194-205.
- Schmittgen TD & Livak KJ (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3: 1101-1108.
- Schrauwen-Hinderling VB, Hesselink MK, Schrauwen P, Kooi ME (2006). Intramyocellular lipid content in human skeletal muscle. *Obesity (Silver Spring)*, 14: 357-367.
- Seelig S, Liaw C, Towle HC, Oppenheimer JH (1981). Thyroid hormone attenuates and augments hepatic gene expression at a pretranslational level. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 4733-4737.
- Shirouchi B, Albrecht E, Nuernberg G, Maak S, Olavanh S, Nakamura Y, Sato M, Gotoh T, Nuernberg K (2014). Fatty acid profiles and adipogenic gene expression of various fat depots in Japanese Black and Holstein steers. *Meat Sci*, 96: 157-164.
- Shukla A, Malik M, Cataisson C, Ho Y, Friesen T, Suh KS, Yuspa SH (2009). TGF-beta signalling is regulated by Schnurri-2-dependent nuclear translocation of CLIC4 and consequent stabilization of phospho-Smad2 and 3. *Nat Cell Biol*, 11: 777-784.
- Sihvo HK, Immonen K, Puolanne E (2014). Myodegeneration with fibrosis and regeneration in the pectoralis major muscle of broilers. *Vet Pathol*, 51: 619-623.
- Sillence MN (2004). Technologies for the control of fat and lean deposition in livestock. *Vet J*, 167: 242-257.
- Singh NK, Chae HS, Hwang IH, Yoo YM, Ahn CN, Lee SH, Lee HJ, Park HJ, Chung HY (2007). Transdifferentiation of porcine satellite cells to adipoblasts with ciglitizone. *J Anim Sci*, 85: 1126-1135.
- Smith SB, Kawachi H, Choi CB, Choi CW, Wu G, Sawyer JE (2009). Cellular regulation of bovine intramuscular adipose tissue development and composition. *J Anim Sci*, 87: E72-82.
- Soukas A, Socci ND, Saatkamp BD, Novelli S, Friedman JM (2001). Distinct transcriptional profiles of adipogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem*, 276: 34167-34174.
- Starkie RL, Arkinstall MJ, Koukoulas I, Hawley JA, Febbraio MA (2001). Carbohydrate ingestion attenuates the increase in plasma interleukin-6, but not skeletal muscle interleukin-6 mRNA, during exercise in humans. *J Physiol*, 533: 585-591.
- Steensberg A, Febbraio MA, Osada T, Schjerling P, van Hall G, Saltin B, Pedersen BK (2001). Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. *J Physiol*, 537: 633-639.
- Steensberg A, van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Klarlund Pedersen B (2000). Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol*, 529: 237-242.
- Stefan N, Thamer C, Staiger H, Machicao F, Machann J, Schick F, Venter C, Niess A, Laakso M, Fritsche A, Häring HU (2007). Genetic variations in PPARG and PPARGC1A determine mitochondrial function and change in aerobic physical fitness and insulin sensitivity during lifestyle intervention. *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 1827-1833.

- Stengel A, Hofmann T, Goebel-Stengel M, Elbelt U, Kobelt P, Klapp BF (2013). Circulating levels of irisin in patients with anorexia nervosa and different stages of obesity--correlation with body mass index. *Peptides*, 39: 125-130.
- Stenina OI, Desai SY, Krukovets I, Kight K, Janigro D, Topol EJ, Plow EF (2003). Thrombospondin-4 and its variants: expression and differential effects on endothelial cells. *Circulation*, 108: 1514-1519.
- Straadt IK, Rasmussen M, Young JF, Bertram HC (2008). Any link between integrin degradation and water-holding capacity in pork? *Meat Sci*, 80: 722-727.
- Sugihara H, Yonemitsu N, Miyabara S, Yun K (1986). Primary cultures of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. *Differentiation*, 31: 42-49.
- Suh JM, Jonker JW, Ahmadian M, Goetz R, Lackey D, Osborn O, Huang Z, Liu W, Yoshihara E, van Dijk TH, Havinga R, Fan W, Yin YQ, Yu RT, Liddle C, Atkins AR, Olefsky JM, Mohammadi M, Downes M, Evans RM (2014). Endocrinization of FGF1 produces a neomorphic and potent insulin sensitizer. *Nature*, 513: 436-439.
- Sul HS (2009). Minireview: Pref-1: role in adipogenesis and mesenchymal cell fate. *Mol Endocrinol*, 23: 1717-1725.
- Sun K, Kusminski CM, Scherer PE (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*, 121: 2094-2101.
- Taniguchi M, Guan LL, Zhang B, Dodson MV, Okine E, Moore SS (2008). Adipogenesis of bovine perimuscular preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 366: 54-59.
- Tao TY & Towle HC (1986). Coordinate regulation of rat liver genes by thyroid hormone and dietary carbohydrate. *Ann N Y Acad Sci*, 478: 20-30.
- Taube A, Lambernd S, van Echten-Deckert G, Eckardt K, Eckel J (2012). Adipokines promote lipotoxicity in human skeletal muscle cells. *Arch Physiol Biochem*, 118: 92-101.
- Teboul L, Gaillard D, Staccini L, Inadera H, Amri EZ, Grimaldi PA (1995). Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells. *J Biol Chem*, 270: 28183-28187.
- Timmons JA, Baar K, Davidsen PK, Atherton PJ (2012). Is irisin a human exercise gene? *Nature*, 488: E9-10.
- Timmons JA, Jansson E, Fischer H, Gustafsson T, Greenhaff PL, Ridden J, Rachman J, Sundberg CJ (2005). Modulation of extracellular matrix genes reflects the magnitude of physiological adaptation to aerobic exercise training in humans. *BMC Biol*, 3: 19.
- Tinahones FJ, Coín-Aragüez L, Mayas MD, Garcia-Fuentes E, Hurtado-Del-Pozo C, Vendrell J, Cardona F, Calvo RM, Obregon MJ, El Bekay R (2012). Obesity-associated insulin resistance is correlated to adipose tissue vascular endothelial growth factors and metalloproteinase levels. *BMC Physiol*, 12: 4.
- Tokach RJ, Ribeiro FR, Chung KY, Rounds W, Johnson BJ (2015). Chromium Propionate Enhances Adipogenic Differentiation of Bovine Intramuscular Adipocytes. *Front Vet Sci*, 2: 26.

- Trayhurn P & Beattie JH (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc*, 60: 329-339.
- Trayhurn P, Drevon CA, Eckel J (2011). Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Arch Physiol Biochem*, 117: 47-56.
- Tsai VW, Macia L, Johnen H, Kuffner T, Manadhar R, Jørgensen SB, Lee-Ng KK, Zhang HP, Wu L, Marquis CP, Jiang L, Husaini Y, Lin S, Herzog H, Brown DA, Sainsbury A, Breit SN (2013). TGF- β superfamily cytokine MIC-1/GDF15 is a physiological appetite and body weight regulator. *PLoS One*, 8: e55174.
- Ueha S, Shand FH, Matsushima K (2012). Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis. *Front Immunol*, 3: 71.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012). Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40: e115.
- Vahmani P, Glover KE, Fredeen AH (2014). Effects of pasture versus confinement and marine oil supplementation on the expression of genes involved in lipid metabolism in mammary, liver, and adipose tissues of lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 97: 4174-4183.
- Varma V, Yao-Borengasser A, Bodles AM, Rasouli N, Phanavanh B, Nolen GT, Kern EM, Nagarajan R, Spencer HJ 3rd, Lee MJ, Fried SK, McGehee RE Jr, Peterson CA, Kern PA (2008). Thrombospondin-1 is an adipokine associated with obesity, adipose inflammation, and insulin resistance. *Diabetes*, 57: 432-439.
- Vernon RG (1986). The growth and metabolism of adipocytes. In: Buttery PJ, Haynes NB, Lindsay DB (ed.) *Control and Manipulation of Animal Growth*. Butterworths, London, United Kingdom, 67-83.
- Vila G, Riedl M, Anderwald C, Resl M, Handisurya A, Clodi M, Prager G, Ludvik B, Krebs M, Luger A (2011). The relationship between insulin resistance and the cardiovascular biomarker growth differentiation factor-15 in obese patients. *Clin Chem*, 57: 309-316.
- Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE (2001). Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res*, 9: 414-417.
- Wang YH, Bower NI, Reverter A, Tan SH, De Jager N, Wang R, McWilliam SM, Cafe LM, Greenwood PL, Lehnert SA (2009). Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. *J Anim Sci*, 87: 119-130.
- Wang YH, Byrne KA, Reverter A, Harper GS, Taniguchi M, McWilliam SM, Mannen H, Oyama K, Lehnert SA (2005). Transcriptional profiling of skeletal muscle tissue from two breeds of cattle. *Mamm Genome*, 16: 201-210.
- Wang J, Cao X, Pan H, Hua L, Yang M, Lei C, Lan X, Chen H (2013). Cell death-inducing DFFA-like effector c (CIDEA/Fsp27) gene: molecular cloning, sequence characterization, tissue distribution and polymorphisms in Chinese cattles. *Mol Biol Rep*, 40: 6765-6774.
- Wei S, Du M, Jiang Z, Duarte MS, Fernyhough-Culver M, Albrecht E, Will K, Zan L, Hausman GJ, Elabd EM, Bergen WG, Basu U, Dodson MV (2013). Bovine dedifferentiated adipose tissue (DFAT) cells: DFAT cell isolation. *Adipocyte*, 2: 148-159.

- Wei S, Duarte MS, Du M, Jiang Z, Paulino PV, Chen J, Fernyhough-Culver M, Hausman GJ, Zan L, Dodson MV (2012). Like pigs, and unlike other breeds of cattle examined, mature Angus-derived adipocytes may extrude lipid prior to proliferation in vitro. *Adipocyte*, 1: 237-241.
- Weigert C, Hennige AM, Brodbeck K, Häring HU, Schleicher ED (2005). Interleukin-6 acts as insulin sensitizer on glycogen synthesis in human skeletal muscle cells by phosphorylation of Ser473 of Akt. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289: E251-257.
- 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.
- Whitham M, Chan MH, Pal M, Matthews VB, Prelovsek O, Lunke S, El-Osta A, Broenneke H, Alber J, Brüning JC, Wunderlich FT, Lancaster GI, Febbraio MA (2012). Contraction-induced interleukin-6 gene transcription in skeletal muscle is regulated by c-Jun terminal kinase/activator protein-1. *J Biol Chem*, 287: 10771-10779.
- Will K, Kalbe C, Kuzinski J, Lösel D, Viergutz T, Palin MF, Rehfeldt C (2012). Effects of leptin and adiponectin on proliferation and protein metabolism of porcine myoblasts. *Histochem Cell Biol*, 138: 271-287.
- Will K, Kuzinski J, Kalbe C, Palin MF, Rehfeldt C (2013). Effects of leptin and adiponectin on the growth of porcine myoblasts are associated with changes in p44/42 MAPK signaling. *Domest Anim Endocrinol*, 45: 196-205.
- Will K, Schering L, Albrecht E, Kalbe C, Maak S (2015). Differentiation of bovine satellite cell-derived myoblasts under different culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 51: 885-889.
- Wissmann C, Wild PJ, Kaiser S, Roepcke S, Stoehr R, Woenckhaus M, Kristiansen G, Hsieh JC, Hofstaedter F, Hartmann A, Knuechel R, Rosenthal A, Pilarsky C (2003). WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J Pathol*, 201: 204-212.
- Wodarz A & Nusse R (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14: 59-88.
- Wolsk E, Mygind H, Grøndahl TS, Pedersen BK, van Hall G (2012). Human skeletal muscle releases leptin in vivo. *Cytokine*, 60: 667-673.
- Wrzodek C, Eichner J, Büchel F, Zell A (2013). InCroMAP: integrated analysis of cross-platform microarray and pathway data. *Bioinformatics*, 29: 506-508.
- Wu P, Sato K, Suzuta F, Hikasa Y, Kagota K (2000). Effects of lipid-related factors on adipocyte differentiation of bovine stromal-vascular cells in primary culture. *J Vet Med Sci*, 62: 933-939.
- Yablonka-Reuveni Z, Seger R, Rivera AJ (1999). Fibroblast growth factor promotes recruitment of skeletal muscle satellite cells in young and old rats. *J Histochem Cytochem*, 47: 23-42.
- Yamamoto Y, Gesta S, Lee KY, Tran TT, Saadatirad P, Kahn CR (2010). Adipose depots possess unique developmental gene signatures. *Obesity (Silver Spring)*, 18: 872-878.

- Yim JE, Heshka S, Albu J, Heymsfield S, Kuznia P, Harris T, Gallagher D (2007). Intermuscular adipose tissue rivals visceral adipose tissue in independent associations with cardiovascular risk. *Int J Obes (Lond)*, 31: 1400-1405.
- Yoon JH, Kim J, Song P, Lee TG, Suh PG, Ryu SH (2012). Secretomics for skeletal muscle cells: a discovery of novel regulators? *Adv Biol Regul*, 52: 340-350.
- Zembayashi M (1994). Effects of nutritional planes and breeds on intramuscular-lipid deposition in *M. longissimus dorsi* of steers. *Meat Sci*, 38: 367-374.
- Zhang H, Dong X, Wang Z, Zhou A, Peng Q, Zou H, Xue B, Wang L (2016). Dietary conjugated linoleic acids increase intramuscular fat deposition and decrease subcutaneous fat deposition in Yellow Breed × Simmental cattle. *Anim Sci J*, 87: 517-524.
- Zhang XB, Zan LS, Wang HB, Hao RJ, Yang YJ (2009). Correlation of C184T Mutation in *THRSP* Gene with Meat Traits in the Qinchuan Cattle. *Scientia Agricultura Sinica*, 42: 4058-4065.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372: 425-432.
- Zhao T, Zhao W, Meng W, Liu C, Chen Y, Sun Y (2014). Vascular endothelial growth factor-C: its unrevealed role in fibrogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 306: H789-796.
- Zhao YM, Basu U, Dodson MV, Basarb JA, Guan LL (2010). Proteome differences associated with fat accumulation in bovine subcutaneous adipose tissues. *Proteome Sci*, 8: 14.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13: 4279-4295.

Anhang A - Tabellen und Abbildungen

Anhangsverzeichnis

Tabelle S1. Geräte Und Software	119
Tabelle S2. Alphabetische Liste der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	121
Tabelle S3. Protokolle für die Kultivierung von primären bovinen Adipozyten	125
Tabelle S4. Liste der 119 Myokine und ihre Regulation in den individuellen Datensätzen vom Skelettmuskel	136
Tabelle S5. Liste der 79 Adipokine und ihre Regulation in den individuellen Datensätzen vom Fettgewebe.....	140
Abbildung A1. Vorgehensweise bei der speziesübergreifenden Datenanalyse und Generierung der Matrix für die Identifizierung von Kandidatengen, die potentiell vom Muskel sezerniert werden	143
Abbildung A2. Vorgehensweise bei der speziesübergreifenden Datenanalyse und Generierung der Matrix für die Identifizierung von Kandidatengen, die potentiell vom Fettgewebe sezerniert werden	144

Tabelle S1. Geräte und Software

Gerät/Software	Firma
Bildanalysesoftware Cell [^] F	Olympus, Hamburg, Deutschland
Biochem-VacuuCenter BVC 21 NT	Vacuubrand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
CC12 Kamera	OSIS, Münster, Deutschland
Chemocam HR-16 Imager	INTAS, Göttingen, Deutschland
CLC Main Workbench 7.0.3	CLC bio, Qiagen, Aarhus, Dänemark
CO ₂ -Brutschrank Serie CB	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Dispomix	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
DNA/DNA UV-cleaner Box	Armin Baack Bedarf und Technik für Labor und Medizin, Schwerin, Deutschland
DNA-Sequenziergerät ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Doppel-Gelsystem PerfectBlue [™] Twin S	Peqlab, VWR, Erlangen, Deutschland
Elektrophoresekammer Criterion [™] Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Experion [™] Automated Electrophoresis Station	Bio-Rad, München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop DM 24000	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Nikon Microphot SA	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Geldokumentationssystem Quantum Modell 1199 ‚Super-Bright‘	Peqlab, VWR, Erlangen, Deutschland
Gelelektrophoresekammer H2	Biodeal, Handelsvertretung Edelmann e.K., Markkleeberg, Deutschland
Ingenuity Pathway Analyses (IPA)	Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA
Invitrogen [™] Countess [™] automated cell counter	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
iQ [™] 5 Optical System Software	Bio-Rad, München, Deutschland
Kryostatmikrotom CM 3050 S	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Kühlzentrifuge Biofuge stratos (Heraeus)	Kendro Laboratory Products GmbH, Langensebold, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
LabImage 1D Software	Kapelan Bio-Imaging, Leipzig, Deutschland
Laminarbox Hera safe (Heraeus)	Kendro Laboratory Products GmbH, Langensebold, Deutschland
Lasermikrodissektion MicroBeam	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
Magnetrührwerk mit Heizung RCT S26	IKA [®] -Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
MyiQ [™] 2 Two Color Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, München, Deutschland
Minischüttler MR-1	Peqlab, VWR, Erlangen, Deutschland
NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer	Peqlab, VWR, Erlangen, Deutschland
Netzgerät E443	Consort, Turnhout, Belgien
Netzgerät Consort EV202	Biodeal, Handelsvertretung Edelmann e.K., Markkleeberg, Deutschland
pH-Meter HI2212	HANNA Instruments, Vöhringen, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop Nikon Diaphot 300	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Pipetten	Gilson International, Limburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus [®]	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Polytron PT 1200 E	Kinematica AG, Littau-Luzern, Schweiz

Präzisionswaage M-Pact AX423	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Quantum™ Modell 1100 'Super-Bright'	Peqlab, VWR, Erlangen, Deutschland
QWin Bildanalysesoftware	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Reinstwasseranlage Astacus	MembraPure GmbH, Bodenheim, Deutschland
REST 2009 Software	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rotilabo®-Mini-Zentrifuge "Uni-Fuge"	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Semi-Dry-Blotter Trans-Blot®	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermocycler peqSTAR	Peqlab, VWR, Erlangen, Deutschland
Thermalmixer Tmix	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Vortex Genius 3	IKA®-Werke GmbH, Staufen, Deutschland
Wasserbad WBT6	medingLab Temperiertechnik, Freital, Deutschland

Tabelle S2. Alphabetische Liste der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Artikel/Chemikalie	Firma/Vertrieb	Artikelnummer
Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	CP40.2
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung 30 % (29:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	A124.2
Ammoniumperoxydisulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	9592.2
Ammoniumsulfid	Merck KGaA, Darmstadt	5442
Amphotericin B	Biochrom, Berlin	A2612
Agarose	Biodeal, Handelsvertretung Edelman e.K., Markkleeberg	CH1001,0500
APS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	9592.2
Biotin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	B4639-500MG
Bromphenolblau (Na-Salz)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	A512.1
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	A1470-25G
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	CN93.1
CellLytic MT Cell Lysis Reagent	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	C3228-50ML
Chemilumineszenz-Substrat, SuperSignal™ West Femto	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	34095
Collagenase I	Biochrom, Berlin	C 1-22
Coomassie Brilliant Blau R250	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	3862.1
Countess™ cell counting chamber slides	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen™), Karlsruhe	C10312
Cytosinarabinosid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	C1768-100MG
Deckgläser (24×40 mm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	1870
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	D8893-1MG
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	K028.1
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	A994.1
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	T877.2
Dispomix Tube M	Biolabproducts GmbH, Bebensee	22-970-083-M
DMEM (Flüssigmedium)	Biochrom, Berlin	F0435
DMEM/F12 (Flüssigmedium)	PAN-Biotech, Aidenbach	P04-41550
DMEM/F12 (Pulver)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	D8900
ECM Gel	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	E6909
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	8043.1
Einmalspritzen Injekt® 20 ml	B.Braun, Melsungen	4606205V
Eosin-Kalium	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster	1A-486
Essigsäure (100 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	3738.4
Ethanol (96 %), vergällt	Walter-CMP, Kiel	WAL10504 9025
Ethanol (99,8 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	9065.3
Faltenfilter Rotilabo®, Typ 600P	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	CA21.1
Fertig-Gele, 12 % Criterion™ TGX Stain-Free™	Bio-Rad, München	5678043
Filter-Pipettenspitzen (10 µl)	Sarstedt, Nümbrecht	70.1130.215
Filter-Pipettenspitzen (20 µl)	Sarstedt, Nümbrecht	70.760.219
Filter-Pipettenspitzen (100 µl)	Sarstedt, Nümbrecht	70.760.217
Filter-Pipettenspitzen (200 µl)	Sarstedt, Nümbrecht	70.760.211
Filter-Pipettenspitzen (1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht	70.762.211
Fötales Kälberserum (FKS)	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe	10270-106
Glucose, D-	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	6780.1
Glutamin, L-	Serva, Heidelberg	22942

Glutamin, L-, Lsg.	Biochrom, Berlin	K0283
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	3783.1
Glyceringelatine	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster	3G-031
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	0079.3
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	9105.3
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	B-2883-100MG
Hydrocortison (Cortisol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	H0888-1G
Isobutylmethylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	I7018-100MG
Insulin (bovin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	I1882-100MG
Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	T870.1
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	6752.4
ITS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	I3146-5ML
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	6781.3
KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	3904.2
Kobaldchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	C8661-100G
Kryoröhrchen (1,8 ml)	Sarstedt, Nümbrecht	72.379
Linolsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	L1012-100MG
Linolensäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	L9530-5ML
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	T145.3
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	M7506-500G
Membranfilter Sartolab-P20 Plus	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen	18058
Membranobjektträger	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen	415190-9041-000
Mercaptoethanol, β-	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	M6250-100ML
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	4627.5
Molekulargewichtsmarker FastRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	SM1103
Molekulargewichtsmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	26616
Natrium-Acetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	X891.1
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	3957.1
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	CN30.2
Natrium-β-Glyzerophosphat	Chroma-Gesellschaft, Köngen	3G-057 (1996)
Na ₂ HPO ₄	neoLab, Heidelberg	48.101.000
Neugeborenen Kälberserum (NKS)	Biochrom, Berlin	S 0125
Nylon-Netzfilter (20 μm)	Merck (Millipore), Darmstadt	NY2004700
Nylon-Netzfilter (30 μm)	Merck (Millipore), Darmstadt	NY3004700
Nylon-Netzfilter (60 μm)	Merck (Millipore), Darmstadt	NY6004700
Nylon-Netzfilter (180 μm)	Merck (Millipore), Darmstadt	NY8H04700
Objektträger	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	H868
Ölrot	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster	1E-242
Ölsäure-BSA-Komplex	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	O3008-5ML
Pantothensäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	P5155-100G
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	0335.2
PCR-Platten (iQ™ 96-Well)	Bio-Rad, München	223-9441
PCR-Verschlussfolien	Bio-Rad, München	MSB-1001
Penicillin/Streptomycin Lsg.	Biochrom, Berlin	A2213

Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	0038.2
Pipettenspitzen (10 µl)	Sarstedt, Nümbrecht	70.1130
Pipettenspitzen (200 µl)	Sarstedt, Nümbrecht	70.760.012
Pipettenspitzen (1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht	70.762.010
Polyvinylidenfluorid (PVDF)- Membran	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	T830.1
Polysine [®] -Objektträger	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	ET10.1
ProLong [®] Diamond Antifade Mountant	Thermo Fisher Scientific (Life Technologies), Darmstadt	P36961
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	P8340-1ML
Proteinase K	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	7528.3
QIAzol [®] -Lysereagens	Qiagen, Hilden	79306
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht	72.737
Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht	72.704.400
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht	72.706.400
Reaktionsgefäße (2,0 ml)	Sarstedt, Nümbrecht	72.695.400
Reaktionsgefäße (0,65 ml)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	7060.1
Reaktionsgefäße (0,65 ml, farbig)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	7096.1
Roti [®] -Block (10×)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	A151.4
Roti [®] -GelStain	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	3865.1
Roti [®] -Liquid Barrier Marker	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	AN92.1
Roti [®] -Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	0038.1
Roti [®] -Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	A156.1
Salzsäure (HCl) 37 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	4625.1
Serologische Pipette (2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht	86.1252.001
Serologische Pipette (5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht	86.1253.001
Serologische Pipette (10 ml)	Sarstedt, Nümbrecht	86.1254.001
Serologische Pipette (25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht	86.1685.001
Serologische Pipette (50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht	86.1689.001
Spritzenfilter S 0,2	Sarstedt, Nümbrecht	83.1826.001
Sudanschwarz	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster	1A-430
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	2367.3
Trans-Blot [®] Turbo [™] Midi PVDF Transfer Packs	Bio-Rad, München	1704157
Transferrin, Apo- (bovin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	T1428-100MG
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	3313.1
Triiodthyronin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	T6397-100MG
TRIS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	4855.2
Triton	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	93442-100ML
Troglitazon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	T2573-5MG
Trypanblau (0,4 %)	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen [™]), Karlsruhe	T10282
Trypsin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	2193.1
Trypsin/EDTA Lsg.	Biochrom, Berlin	L2143
Tween-20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	9127.2
Veronal-Natrium	VEB Arzneimittelwerk Dresden	0020182 (1975)
Western Blot Filterpapier	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	88620
Xylol	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe	4436.2

Zellkulturplatte, 6-well	Greiner Bio-One, Frickenhausen	657160
Zellkulturplatte, 12-well	Sarstedt, Nümbrecht	83.3921
Zellkulturplatte, 24-well	neoLab, Heidelberg	353847
Zellkulturschalen (35 mm)	OMNILAB-Laborzentrum GmbH, Bremen	6339976
Zellkulturschalen (100 mm)	Sarstedt, Nümbrecht	83.1802.003
Zellkulturschalen (100 mm), BD Falcon™ Primaria™	neoLab, Heidelberg	353803
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht	62.554.502
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht	62.547.254

Tabelle S3. Protokolle für die Kultivierung von primären bovinen Adipozyten

Protokoll	1	2	3	4	5
Tier	Färsen bzw. Kuh	Färsen bzw. Kuh	Färsen bzw. Kuh	Färsen bzw. Kuh	Färsen bzw. Kuh
Fettdepot	IMF	IMF	IMF	IMF	IMF
Einsaatdichte	5×10^3 Z./well	5×10^3 Z./well	5×10^3 Z./well	5×10^3 Z./well	5×10^3 Z./well
Kulturgefäß	24-well Platte	24-well Platte	24-well Platte	24-well Platte	24-well Platte
Proliferation (d)	6	6	6	6	6
Wachstumsmedium	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin
Induktion (d)	2	2	2	2	2
Induktionsmedium	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 0,25 µM Dexamethason ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 5 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 0,25 µM Dexamethason ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 0,25 µM Dexamethason ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1 µM Dexamethason ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 5 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1 µM Dexamethason ITS (850 nM Insulin)
Differenzierung (d)	13	13	13	13	13
Differenzierungsmedium	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 5 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 5 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin ITS (850 nM Insulin)

Protokoll	6	7	8	9	10
Tier	Färsen bzw. Kühe	Färsen bzw. Kühe	Färsen bzw. Kühe	Färsen bzw. Kühe	Färsen bzw. Kühe
Fettdepot	IMF	IMF	IMF	IMF	IMF
Einsaatdichte	5×10^3 Z./well	5×10^3 Z./well	5×10^3 Z./well	5×10^3 Z./well	5×10^3 Z./well
Kulturgefäß	24-well Platte	24-well Platte	24-well Platte	24-well Platte	24-well Platte
Proliferation (d)	6	6	6	6	6
Wachstumsmedium	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin
Induktion (d)	2	2	2	2	2
Induktionsmedium	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1 µM Dexamethason ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 0,25 µM Dexamethason 500 µM IBMX ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 5 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 0,25 µM Dexamethason 500 µM IBMX ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 0,25 µM Dexamethason 500 µM IBMX ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1 µM Dexamethason 500 µM IBMX ITS (850 nM Insulin)
Differenzierung (d)	13	13	13	13	13
Differenzierungsmedium	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 500 µM IBMX ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 5 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 500 µM IBMX ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 500 µM IBMX ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 500 µM IBMX ITS (850 nM Insulin)

Protokoll	11	12	13	14	15
Tier	Färsen bzw. Kuh	Färsen bzw. Kuh	Färsen bzw. Kuh	Färsen bzw. Kuh	Färsen bzw. Kuh
Fettdepot	IMF	IMF	IMF, SCF	IMF, SCF	IMF, SCF
Einsaatdichte	5×10^3 Z./well	5×10^3 Z./well	5×10^3 Z./well	5×10^3 Z./well	5×10^3 Z./well
Kulturgefäß	24-well Platte	24-well Platte	24-well Platte	24-well Platte	24-well Platte
Proliferation (d)	6	6	8	8	8
Wachstumsmedium	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin
Induktion (d)	2	2	2	2	2
Induktionsmedium	DMEM/F12 5 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1 µM Dexamethason 500 µM IBMX ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1 µM Dexamethason 500 µM IBMX ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 0,25 µM Dexamethason ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 0,25 µM Dexamethason 500 µM IBMX ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 0,25 µM Dexamethason 850 nM Insulin
Differenzierung (d)	13	13	14	14	14
Differenzierungsmedium	DMEM/F12 5 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 500 µM IBMX ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 500 µM IBMX ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 850 nM Insulin

Protokoll	16	17	18	19	20
Tier	Färsen bzw. Kuh	Färsen bzw. Kuh	Färsen bzw. Kuh	Färsen bzw. Kuh	Färsen bzw. Kuh
Fettdepot	IMF, SCF	IMF, SCF	IMF, SCF	IMF, SCF	IMF, SCF
Einsaatdichte	5×10^3 Z./well	5×10^3 Z./well	5×10^3 Z./well	a) 5×10^3 Z./well b) $2,4 \times 10^4$ Z./Schale	5×10^3 Z./well
Kulturgefäß	24-well Platte	24-well Platte	24-well Platte	a) 24-well Platte b) 3,5 cm Kulturschale	24-well Platte
Proliferation (d)	8	8	8	8	8
Wachstumsmedium	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin
Induktion (d)	2	2	2	2	2
Induktionsmedium	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 0,25 µM Dexamethason 500 µM IBMX 850 nM Insulin	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 0,25 µM Dexamethason 400 µM Ölsäure ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 0,25 µM Dexamethason 400 µM Ölsäure 850 nM Insulin	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 0,25 µM Dexamethason 500 µM IBMX 400 µM Ölsäure ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 0,25 µM Dexamethason 500 µM IBMX 400 µM Ölsäure 850 nM Insulin
Differenzierung (d)	14	14	14	14	14
Differenzierungsmedium	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 850 nM Insulin	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 400 µM Ölsäure ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 400 µM Ölsäure 850 nM Insulin	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 400 µM Ölsäure ITS (850 nM Insulin)	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 400 µM Ölsäure 850 nM Insulin

Protokoll	21	22	23	24	25
Tier	Kuh	Kuh	Kuh	Kuh	Kuh
Fettdepot	SCF	SCF	SCF	SCF	SCF
Einsaatdichte	2×10^4 Z./well	2×10^4 Z./well	2×10^4 Z./well	2×10^4 Z./well	2×10^4 Z./well
Kulturgefäß	24-well Platte	24-well Platte	24-well Platte	24-well Platte	24-well Platte
Proliferation (d)	3	3	3	3	3
Wachstumsmedium	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin
Induktion (d)	2	2	2	2	2
Induktionsmedium	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 10 µg/ml Insulin 0,25 µM Dexamethason	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 10 µg/ml Insulin 600 µM Ölsäure 0,25 µM Dexamethason	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 10 µg/ml Insulin 300 µM Ölsäure 0,25 µM Dexamethason	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 10 µg/ml Insulin 150 µM Ölsäure 0,25 µM Dexamethason	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 10 µg/ml Insulin 500 µM Linolensäure 0,25 µM Dexamethason
Differenzierung (d)	14	14	14	14	14
Differenzierungsmedium	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 10 µg/ml Insulin	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 10 µg/ml Insulin 600 µM Ölsäure	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 10 µg/ml Insulin 300 µM Ölsäure	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 10 µg/ml Insulin 150 µM Ölsäure	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 10 µg/ml Insulin 500 µM Linolensäure

Protokoll	26	27	28	29	30
Tier	Kuh	Kuh	Kuh	Kuh	Kuh
Fettdepot	SCF	SCF	SCF	SCF	SCF
Einsaatdichte	2×10^4 Z./well	a) 2×10^4 Z./well b) 5×10^4 Z./well	a) 5×10^4 Z./well b) $12,5 \times 10^4$ Z./well c) 20×10^4 Z./well	2×10^4 Z./well	2×10^4 Z./well
Kulturgefäß	24-well Platte	a) 24-well Platte b) 6-well Platte	a) 6-well Platte b) 6-well Platte c) 6-well Platte	24-well Platte	24-well Platte
Proliferation (d)	3	3	3	3	3
Wachstumsmedium	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin
Induktion (d)	2	2	-	2	2
Induktionsmedium	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 10 µg/ml Insulin 250 µM Linolensäure 0,25 µM Dexamethason	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 5 µg/ml Insulin 0,25 µM Dexamethason	-	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 5 µg/ml Insulin 600 µM Ölsäure 0,25 µM Dexamethason	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 5 µg/ml Insulin 300 µM Ölsäure 0,25 µM Dexamethason
Differenzierung (d)	14	14	14	14	14
Differenzierungs- medium	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 10 µg/ml Insulin 250 µM Linolensäure	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 5 µg/ml Insulin	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 5 µg/ml Insulin	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 5 µg/ml Insulin 600 µM Ölsäure	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 5 µg/ml Insulin 300 µM Ölsäure

Protokoll	31	32	33	34	35
Tier	Kuh	Kuh	Kuh	Kuh	Kuh
Fettdepot	SCF	SCF	SCF	SCF	SCF
Einsaatdichte	a) 2×10^4 Z./well b) 5×10^4 Z./well	2×10^4 Z./well	2×10^4 Z./well	a) 2×10^4 Z./well b) 5×10^4 Z./well	a) 5×10^4 Z./well b) $12,5 \times 10^4$ Z./well c) 20×10^4 Z./well
Kulturgefäß	a) 24-well Platte b) 6-well Platte	24-well Platte	24-well Platte	a) 24-well Platte b) 6-well Platte	a) 6-well Platte b) 6-well Platte c) 6-well Platte
Proliferation (d)	3	3	3	3	3
Wachstumsmedium	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin
Induktion (d)	2	2	2	2	-
Induktionsmedium	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 5 µg/ml Insulin 150 µM Ölsäure 0,25 µM Dexamethason	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 5 µg/ml Insulin 500 µM Linolensäure 0,25 µM Dexamethason	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 5 µg/ml Insulin 250 µM Linolensäure 0,25 µM Dexamethason	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 2,5 µg/ml Insulin 0,25 µM Dexamethason	-
Differenzierung (d)	14	14	14	14	14
Differenzierungs- medium	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 5 µg/ml Insulin 150 µM Ölsäure	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 5 µg/ml Insulin 500 µM Linolensäure	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 5 µg/ml Insulin 250 µM Linolensäure	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 2,5 µg/ml Insulin	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 2,5 µg/ml Insulin

Protokoll	36	37	38	39	40
Tier	Kuh	Kuh	Kuh	Kuh	Kuh
Fettdepot	SCF	SCF	SCF	SCF	SCF
Einsaatdichte	2×10 ⁴ Z./well	2×10 ⁴ Z./well	2×10 ⁴ Z./well	2×10 ⁴ Z./well	2×10 ⁴ Z./well
Kulturgefäß	24-well Platte	24-well Platte	24-well Platte	24-well Platte	24-well Platte
Proliferation (d)	3	3	3	3	3
Wachstumsmedium	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin
Induktion (d)	2	2	2	2	2
Induktionsmedium	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 2,5 µg/ml Insulin 600 µM Ölsäure 0,25 µM Dexamethason	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 2,5 µg/ml Insulin 300 µM Ölsäure 0,25 µM Dexamethason	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 2,5 µg/ml Insulin 150 µM Ölsäure 0,25 µM Dexamethason	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 2,5 µg/ml Insulin 500 µM Linolensäure 0,25 µM Dexamethason	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 2,5 µg/ml Insulin 250 µM Linolensäure 0,25 µM Dexamethason
Differenzierung (d)	14	14	14	14	14
Differenzierungs- medium	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 2,5 µg/ml Insulin 600 µM Ölsäure	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 2,5 µg/ml Insulin 300 µM Ölsäure	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 2,5 µg/ml Insulin 150 µM Ölsäure	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 2,5 µg/ml Insulin 500 µM Linolensäure	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 2,5 µg/ml Insulin 250 µM Linolensäure

Protokoll	41	42	43	44	45
Tier	Kuh	Kuh	Kuh	Kuh	Kuh
Fettdepot	SCF	SCF	SCF	SCF	SCF
Einsaatdichte	a) 2×10^4 Z./well b) 5×10^4 Z./well	a) 5×10^4 Z./well b) $12,5 \times 10^4$ Z./well c) 20×10^4 Z./well	2×10^4 Z./well	2×10^4 Z./well	2×10^4 Z./well
Kulturgefäß	a) 24-well Platte b) 6-well Platte	a) 6-well Platte b) 6-well Platte c) 6-well Platte	24-well Platte	24-well Platte	24-well Platte
Proliferation (d)	3	3	3	3	3
Wachstumsmedium	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin
Induktion (d)	2	-	2	2	2
Induktionsmedium	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1,25 µg/ml Insulin 0,25 µM Dexamethason	-	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1,25 µg/ml Insulin 600 µM Ölsäure 0,25 µM Dexamethason	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1,25 µg/ml Insulin 300 µM Ölsäure 0,25 µM Dexamethason	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1,25 µg/ml Insulin 150 µM Ölsäure 0,25 µM Dexamethason
Differenzierung (d)	14	14	14	14	14
Differenzierungs- medium	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1,25 µg/ml Insulin	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1,25 µg/ml Insulin	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1,25 µg/ml Insulin 600 µM Ölsäure	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1,25 µg/ml Insulin 300 µM Ölsäure	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1,25 µg/ml Insulin 150 µM Ölsäure

Protokoll	46	47	48	49	50
Tier	Kuh	Kuh	Kuh	Kuh	Kuh
Fettdepot	SCF	SCF	SCF	SCF	SCF
Einsaatdichte	2×10^4 Z./well	2×10^4 Z./well	$1,7 \times 10^5$ Z./well	$1,7 \times 10^5$ Z./well	$1,7 \times 10^5$ Z./well
Kulturgefäß	24-well Platte	24-well Platte	6-well Platte	6-well Platte	6-well Platte
Proliferation (d)	3	3	4	4	4
Wachstumsmedium	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 Pulver 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 0,9 g Glucose 8 mg Biotin 4 mg Pantothersäure	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin
Induktion (d)	2	2	3	3	7
Induktionsmedium	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1,25 µg/ml Insulin 500 µM Linolensäure 0,25 µM Dexamethason	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1,25 µg/ml Insulin 250 µM Linolensäure 0,25 µM Dexamethason	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 200 nM Insulin 1 nM T3 100 nM Cortisol 10 µg/ml Transferrin 5 µM Troglitazon	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 200 nM Insulin 1 nM T3 100 nM Cortisol 10 µg/ml Transferrin 5 µM Troglitazon	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 100 nM Insulin 3 % FKS 1 µM Dexamethason 200 µM IBMX 0,25 µM Troglitazon
Differenzierung (d)	14	14	12	12	8
Differenzierungsmedium	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1,25 µg/ml Insulin 500 µM Linolensäure	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1,25 µg/ml Insulin 250 µM Linolensäure	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 200 nM Insulin 1 nM T3 100 nM Cortisol 10 µg/ml Transferrin	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 200 nM Insulin 1 nM T3 100 nM Cortisol 10 µg/ml Transferrin	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 100 nM Insulin 3 % FKS 1 µM Dexamethason

Protokoll	51	52	53	54	55
Tier	Kuh	Kuh	Kuh	Kuh	Kuh
Fettdepot	SCF	SCF	SCF	SCF	SCF
Einsaatdichte	$1,7 \times 10^5$ Z./well	$1,7 \times 10^5$ Z./well	$6,25 \times 10^4$ Z./well	$6,25 \times 10^4$ Z./well	$6,25 \times 10^4$ Z./well
Kulturgefäß	6-well Platte	6-well Platte	12-well Platte	12-well Platte	12-well Platte
Proliferation (d)	4	4	4	4	4
Wachstumsmedium	DMEM/F12 Pulver 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 0,9 g Glucose 8 mg Biotin 4 mg Pantothersäure	DMEM/F12 Pulver 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin	DMEM/F12 10 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin
Induktion (d)	7	3	2	2	-
Induktionsmedium	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 100 nM Insulin 3 % FKS 1 µM Dexamethason 200 µM IBMX 0,25 µM Troglitazon	DMEM/F12 1 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 200 nM Insulin 1 nM T3 100 nM Cortisol 10 µg/ml Transferrin 5 µM Troglitazon	DMEM/F12 5 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 0,25 µM Dexamethason 500 µM IBMX 1 µg/ml Insulin	DMEM/F12 5 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 0,25 µM Dexamethason 500 µM IBMX 1 µg/ml Insulin 5 µM Troglitazon	-
Differenzierung (d)	8	12	22	22	24
Differenzierungsmedium	DMEM/F12 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 100 nM Insulin 3 % FKS 1 µM Dexamethason	DMEM/F12 1 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 200 nM Insulin 1 nM T3 100 nM Cortisol 10 µg/ml Transferrin	DMEM/F12 5 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1 µg/ml Insulin	DMEM/F12 5 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1 µg/ml Insulin 5 µM Troglitazon	DMEM/F12 5 % FKS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B 4 mmol/l Glutamin 1 µg/ml Insulin

Tabelle S4. Liste der 119 Myokine und ihre Regulation in den individuellen Datensätzen vom Skelettmuskel

Entrez Maus	Refseq	Symbol Maus	aEX+0 vs. SED MS	aEX+3 vs. SED MS	cEX vs. SED MQF	B6 vs. DIO MQF	NZO vs. B6 MQF	NZO vs. DIO MQF	B6 vs. UCP1Tg MQF+MG	JB vs. CH MLD	SEGFAM H vs. N MLD	Score	Sekretionstyp
29876	NM_013885	Clic4	1,466	1,587	1,593		-5,975	-5,416	2,117	7,090	1,204	8	SP-
16195	NM_010560	Il6st		1,472	-1,065	-1,225	-1,723	-2,111	1,217	5,750		7	SP+
16784	NM_001017959	Lamp2	1,150	1,051		1,132	1,157	1,308	1,472	2,000		7	SP-
18295	NM_008760	Ogn		1,147	1,276	-1,578	2,407	1,532	1,321	5,000		7	SP+
27999	NM_138587	Fam3c	1,388	-1,192	1,167		1,398	1,292	-1,166	5,720		7	SP-
57342	NM_020606	Parva	1,167	-1,073	1,159	-1,329	1,449		1,172	2,510		7	SP-
67971	NM_026481	Tppp3	-1,340	-1,408	-1,409	-1,396		-1,420	-1,458	0,420		7	SP-
21859	NM_011595	Timp3	1,265	1,048	1,510		1,806	1,732	-1,415	2,000		7	SP+
13649	NM_207655	Egfr	1,142	1,118	1,346	1,412		1,536	-1,318	6,640		7	SP+
75705	NM_145625	Eif4b		-1,120		-1,178	-1,138	-1,333	1,390	1,370	0,931	7	SP-
14085	NM_010176	Fah	-1,309	1,144		-1,579	2,774	1,772	1,272			6	SP-
67041	NM_024188	Oxct1	1,160	1,262	1,135	1,402	-1,415			2,490		6	SP+
14164	NM_010197	Fgf1		1,423	1,424	-1,484		-2,052	1,486	1,370		6	manuell identifiziert
104112	NM_134037	Acly	1,168	-1,076	2,265		4,183	4,551			1,584	6	SP-
235606	NM_146226	Apeh	1,401	-1,302			1,088	1,127	1,188	0,370		6	SP-
56429	NM_019759	Dpt	1,165	-1,105		-1,409	1,932	1,387	-1,174			6	manuell identifiziert
22042	NM_011638	Tfrc	-1,371	1,645		1,426	-1,523		-1,540	2,310		6	SP-
21808	NM_009367	Tgfb2	-1,234	1,242			1,238	1,393	-1,295	5,350		6	SP+
66905	NM_025836	Plin3		1,086	1,370		1,602	2,160	1,368	0,600		6	SP-
19122	NM_011170	Prnp	1,230	1,322			-1,545	-1,782	-1,184	5,290		6	SP+
20292	NM_011330	Ccl11	1,705	1,260	-1,241		-1,309	-1,500	-1,306			6	SP+
50773	NM_015807	Nt5c	-1,218	-1,878		1,200	1,141	1,368	2,087			6	SP-
99543	NM_133859	Olfml3		-1,459	1,470	-1,360	2,225	1,667		2,640		6	SP+
109959	NM_001042711	Amy2a5		1,037		-1,425	-1,372	-1,911	1,544	4,910		6	SP+
15528	NM_008303	Hspe1		-1,859	1,164		1,426	1,454	1,368	1,880		6	SP-
17181	NM_016762	Matn2		1,368	1,206	-1,386	2,027	1,492		2,750		6	SP+
13179	NM_007833	Dcn	1,196	-1,301	1,321		1,336	1,236		5,650		6	SP+
18451	NM_011030	P4ha1	1,156	-1,083	1,366		-1,381	-1,691		4,090		6	SP+
74325	NM_028870	Cltb		1,425		-1,161	-1,447	-1,681	-1,418	0,380		6	SP-

16835	NM_010700	Ldlr	1,297	1,246		1,644	1,252	2,025	-1,661		6	SP+	
18453	NM_011032	P4hb		1,200		-1,096	1,364	1,247	1,623	0,790	6	SP+	
13885	NM_016903	Esd		-1,081	-1,051		1,294	1,318	1,277	2,120	6	SP-	
11852	NM_007483	Rhob	1,647		1,334		-1,838	-2,166	-1,249	0,640	6	SP-	
12842	NM_007742	Col1a1	1,276	-1,081			4,722	5,243	1,701	0,360	6	SP+	
12632	NM_007688	Cfl2	1,261	1,361		1,206		1,214	1,786	3,060	6	SP-	
13382	NM_007861	Dld	1,366	1,249			1,257	1,365		4,020	5	SP-	
16846	NM_008493	Lep	-1,755			-14,294	11,053		-1,235		2,156	5	SP+
17295	NM_008591	Met	1,810	1,654			1,310	1,438	-1,303		5	SP+	
16997	NM_013589	Ltbp2		1,097	1,634	1,195	2,502	2,955			5	SP+	
20315	NM_001012477	Cxcl12		-1,075	-1,301		1,441	1,310	1,312		5	SP+	
14450	NM_010256	Gart	1,247	1,621			-1,323	-1,321			1,100	5	SP-
18104	NM_008706	Nqo1	1,378	1,553		-1,322	-1,534	-2,010			5	SP-	
12321	NM_007594	Calu	1,135	1,297		-1,277		-1,389		2,440	5	SP+	
53883	NM_017392	Celsr2		1,770	-1,257		-2,045	-1,867	-1,327		5	manuell identifiziert	
58193	NM_021388	Extl2		1,042	-1,176		-1,395	-1,270	-1,309		5	SP-	
15507	NM_013560	Hspb1	1,196	1,727	1,341		-1,926	-2,725			5	SP-	
11637	NM_016895	Ak2	1,295	-1,345		1,141			1,215	0,720	5	SP-	
75612	NM_029364	Gns		1,044			1,139	1,131	1,185	1,800	5	SP-	
16779	NM_008483	Lamb2		-1,200			1,639	1,323	1,327	0,620	5	SP+	
18073	NM_010917	Nid1	1,160	-1,063			2,090	1,846		2,350	5	SP+	
93695	NM_053110	GpnmB		-1,671	1,794	-1,755		-2,783	-1,354		5	manuell identifiziert	
18645	NM_019410	Pfn2		-1,178	-1,102	-1,122	1,109		-1,406		5	SP-	
116847	NM_054077	Prelp		-1,223	1,412	-1,805	1,763			0,450	5	SP+	
56726	NM_019989	Sh3bgrl	1,390	1,535	1,229		1,493	1,445			5	SP-	
107652	NM_133806	Uap1		1,559			-1,447	-1,398	-1,523	2,770	5	SP-	
21826	NM_011581	Thbs2	1,125	-1,388	1,467	-1,970	2,088				5	SP+	
22218	NM_009460	Sumo1	1,155	-1,094			1,113	1,168		2,890	5	SP-	
21393	NM_011540	Tcap	1,564	-1,258			-1,322	-1,277			0,936	5	SP-
66085	NM_025344	Eif3f		-1,108			-1,092	-1,130	1,241	0,560	5	SP-	
108124	NM_025898	Napa		-1,648	1,146		-1,452	-1,436		0,650	5	SP-	
18187	NM_001077403	Nrp2		-1,098	-1,188		1,222	1,338		3,100	5	SP+	
18186	NM_008737	Nrp1	-1,113	-1,156	-1,172		1,363	1,328		3,530	5	SP+	
12010	NM_009735	B2m	1,511	-1,157			1,617	1,494		1,470	5	SP+	
229905	NM_173763	Ccbl2	1,549		1,199			1,294	1,206	2,820	5	SP-	

223272	NM_145467	Itgbl1	1,185		1,651	-1,842	2,285		2,040	5	SP+		
15254	NM_008248	Hint1	1,098	-1,528			1,112	1,122	1,638	5	SP-		
22341	NM_009506	Vegfc		-1,759	-1,558		2,629	2,407	4,310	5	SP+		
68797	NM_026840	Pdgfrl		-1,135		-1,719	3,356	2,015	1,430	5	SP+		
53381	NM_016764	Prdx4		-1,507			1,328	1,481	1,483	0,760	5	SP+	
12464	NM_009837	Cct4	1,219	-1,019	1,125				1,327	2,670	5	SP-	
67054	NM_025939	Paics		1,116			-1,302	-1,181	-1,226	3,830	5	SP-	
94092	NM_053169	Trim16			-1,226	1,167	-6,798	-5,811	1,199		5	SP-	
67955	NM_026474	Sugt1		-1,326		1,106		1,118		2,740	1,170	5	SP-
216197	NM_175451	Ckap4	-1,703				-6,660	-7,673	1,288	1,780		5	SP-
14314	NM_008047	Fstl1		1,061	-1,222		1,595	1,549		2,590		5	SP+
104444	NM_024233	Rexo2		-1,036			1,255	1,199	1,224	1,540		5	SP-
27366	NM_178604	Txn14a		1,109	-1,047		-1,441	-1,358		0,620		5	SP-
16432	NM_008410	Itm2b	1,125	-1,158			1,263	1,128		1,780		5	SP-
20360	NM_011351	Sema6c			-1,239		1,404	1,212	-1,272	0,380		5	SP+
66398	NM_025536	Commd5	-1,211	-2,355			1,643	2,099		0,710		5	SP-
50875	NM_016963	Tmod3	1,318	1,822			-1,639	-1,724		6,140		5	SP-
67393	NM_133687	Cxxc5			-1,338		1,254	1,332	-1,325	0,650		5	SP-
54397	NM_019441	Ppt2		-1,101			-1,846	-2,089		0,580	1,182	5	SP+
68682	NM_152808	Slc44a2	1,104	1,030		-1,385	1,280			0,280		5	SP-
74761	NM_024263	Mxra8		-1,564		-1,460	3,011	2,113	1,439			5	SP+
105348	NM_027307	Golm1		-1,192			1,566	1,496	-4,567	3,970		5	SP-
12628	NM_009888	Cfh			1,363		1,723	1,648		6,060	0,842	5	SP+
14778	NM_008161	Gpx3		-1,106		-1,394	-1,330	-1,858	2,396			5	SP+
11502	NM_007404	Adam9	1,202	1,149			-1,217		-1,259	5,020		5	SP+
20720	NM_009255	Serpine2	-1,208	1,082			-1,247	-1,332		2,400		5	SP+
14114	NM_010180	Fbln1	-1,683	-1,205	1,450		3,989	3,171				5	SP+
16412	NM_010578	Itgb1	-1,078	1,231				-1,287	-1,300	5,240		5	SP+
11603	NM_021604	Agm		-1,205	-1,176		1,795	2,126			1,371	5	SP+
14118	NM_007993	Fbn1		-1,384	-1,331		1,824	1,701		3,630		5	SP+
20971	NM_011521	Sdc4	1,478	1,499	1,358			-1,606	-1,351			5	SP+
216440	NM_177614	Os9		-1,089		-1,139	1,345	1,183	1,504			5	SP+
21810	NM_009369	Tgfb1	-1,339	-1,093			1,522	1,396		0,480		5	SP+
56375	NM_019804	B4galt4	-1,850		1,292		-1,424	-1,369		2,200		5	SP+

14201	NM_010213	Fhl3	1,239	1,235	-1,280				-1,336	0,700	5	SP-	
232087	NM_145569	Mat2a	1,382	1,242		1,681	-1,534			1,570	5	SP-	
21402	NM_011543	Skp1a	1,276	-1,167			-1,291	-1,250		1,250	5	SP-	
13167	NM_001037999	Dbi	1,132	-1,855		-1,405	1,332			1,750	5	SP-	
20810	NM_009272	Srm		1,916			-1,290	-1,399	1,588	0,290	5	SP-	
67956	NM_030241	Setd8	-1,339	-1,111				-1,451	-2,060	2,250	5	SP+	
12876	NM_013494	Cpe	1,226	1,156		-1,281		-1,183	1,577		5	SP+	
234852	NM_145606	Chmp1a		-1,087	-1,107	-1,114		-1,182	1,188		5	SP-	
16011	NM_010518	Igfbp5		-1,641		-1,510	2,075	1,384		0,710	5	SP+	
80752	NM_030565	Fam20c	2,250				1,266		-1,541	0,730	1,122	5	SP-
13476	NM_007874	Reep5	1,144	1,034			1,172	1,171		5,490	5	SP-	
67951	NM_026473	Tubb6	1,315	3,098				-1,420	1,628	0,610	5	SP-	
11727	NM_007447	Ang		-1,923		-1,584	-2,460	-3,846		2,600	5	SP+	
98170	NM_133804	Tmem132a	-1,135	1,102				1,466	1,373	0,710	5	SP+	
66540	NM_025626	Fam107b	1,362	1,272	1,820		1,820	1,720			5	SP-	
59069	NM_022314	Tpm3		1,528			1,538	1,783	2,079	2,400	5	SP-	
625249	NM_001037741	Gpx4		-1,568			-1,216	-1,333	1,378	0,560	5	SP+	
11668	NM_013467	Aldh1a1		1,141		-1,430		-1,756	-1,405	3,010	5	SP-	
68051	NM_026532	Nutf2		-1,414			-1,156	-1,288	1,145	0,730	5	SP-	
12313	NM_009790	Calm1		-1,153	-1,129	1,163			-2,061	1,530	5	SP-	
11459	NM_009606	Acta1	1,203	-1,135			1,145		-1,669	1,130	5	SP-	

Tabelle S5. Liste der 79 Adipokine und ihre Regulation in den individuellen Datensätzen vom Fettgewebe

Entrez Maus	Refseq Maus	Gensymbol Maus	B6	B6	NZO	NZO	NZO	NZO	JB	JB	Score	Sekretionstyp
			vs. DIO SCF	vs. DIO GFG	vs. B6 SCF	vs. B6 GFG	vs. DIO SCF	vs. DIO GFG	vs. HS SCF	vs. HS IMF		
56429	NM_019759	Dpt	-4,338	-2,209	1,607	1,662	-2,715	-1,548			6	SP+
12321	NM_007594	Calu	-2,692	-1,953	1,525	1,431	-1,768	-1,232			6	SP+
16324	NM_008381	Inhbb	-3,487	-3,332	1,884	2,048	-1,880	-1,471			6	SP+
14314	NM_008047	Fstl1	-2,767	-2,828	1,423	1,617	-1,968	-1,476			6	SP+
12111	NM_007542	Bgn	-2,878	-3,642	1,512	2,282	-1,915	-1,651			6	SP+
54612	NM_018780	Sfrp5	-45,301	-23,445	5,083	14,471	-9,509	-1,606			6	SP+
76477	NM_029620	Pcolce2	-12,843	-11,024	2,839	4,224	-4,620	-2,153			6	SP+
20317	NM_011340	Serpinf1	-4,341	-4,895	1,824	3,388	-2,368	-1,482			6	SP+
232680	NM_001024698	Cpa2	-18,439	-14,598	3,694	3,250	-5,163	-4,257			6	SP+
53883	NM_017392	Celsr2	1,715	2,676	-4,184	-2,481	-2,474		-1,597		6	SP+
16412	NM_010578	Itgb1	-1,740	-1,941	1,261	1,480	-1,387	-1,180			6	SP+
235505	NM_153098	Cd109	-6,266	-1,830		-1,520	-5,386	-2,287			5	SP+
18453	NM_011032	P4hb	-1,667	-1,488	1,286		-1,306	-1,203			5	SP+
320712	NM_001014423	Abi3bp		2,061	2,106	1,749	1,789	4,286			5	SP+
22341	NM_009506	Vegfc	-1,605	-1,846	2,335	2,337	1,467				5	SP+
93695	NM_053110	Gpnmb	-2,920	-28,437	-2,026		-6,022	-18,282			5	SP+
26433	NM_011962	Plod3	-2,373	-2,153	1,786	1,890	-1,338				5	SP+
217303	NM_170758	Cd300a		-8,978	-1,803	2,332	-2,499	-5,597			5	SP+
13805	NM_007932	Eng	-2,061	-1,907	1,449		-1,431	-1,343			5	SP+
52685	NM_027987	Cd300lg	-2,505	-2,091	1,491		-1,689	-1,545			5	SP+
83554	NM_031380	Fstl3	-2,117	-2,031	1,623	2,332	-1,317				5	SP+
20692	NM_009242	Sparc	-3,545	-2,302	3,023	2,612		1,360			5	SP+
78558	NM_030127	Htra3	-2,807	-1,921	2,014	2,786		1,610			5	SP+
30878	NM_013912	Apln	-5,683	-2,986	2,170	2,244	-2,656				5	SP+
12827	NM_009932	Col4a2	-3,408	-2,391	2,263	2,000	-1,507				5	SP+

19038	NM_008908	Ppic	-2,842	-2,083	1,425	2,025	-2,011			5	SP+
54196	ENSMUST00000116476	Pabpn1	1,237	2,725	-1,388	-2,126		1,315		5	SP+
20306	NM_013654	Ccl7		-9,724	-2,814	4,063	-2,745	-3,023		5	SP+
56401	NM_019782	Lepre1	-2,696	-2,491		1,801	-1,759	-1,314		5	SP+
20657	NM_011435	Sod3	-5,238	-4,326	2,578		-2,053	-2,220		5	SP+
12834	ENSMUST00000137365	Col6a2	-2,771	-2,989	1,878	4,401		1,504		5	SP+
18822	NM_011122	Plod1	-2,335	-2,971		1,758	-1,557	-1,578		5	SP+
12064	NM_007540	Bdnf	-11,227	-6,814	2,028		-5,630	-4,674		5	SP+
18830	NM_011125	Pltp	-5,121	-7,417	2,172		-2,391	-4,178		5	SP+
78558	NM_001042615	Htra3	-6,258	-4,365	3,654	4,224	-1,726			5	SP+
14601	NM_010285	Ghrh	-6,031	-12,740		6,220	-4,331	-2,202		5	SP+
21825	NM_011580	Thbs1	-2,720	-7,236	-2,151		-6,198	-3,549		5	SP+
16803	NM_008489	Lbp	-24,187	-6,045	2,410		-10,389	-2,939		5	SP+
12834	NM_146007	Col6a2	-2,060	-5,051	1,478	4,286	-1,402			5	SP+
16846	NM_008493	Lep	-15,914	-6,095	5,739	4,026	-2,816			5	SP+
12833	NM_009933	Col6a1	-2,117	-3,673	1,411	4,048	-1,517			5	SP+
13033	NM_009983	Ctsd	-1,624	-3,381	1,569	1,583		-2,045		5	SP+
11658	NM_009655	Alcam	-2,306	-3,118		1,773	-1,663	-1,596		5	SP+
14102	NM_001146708	Fas	-1,738	-2,288	-1,401		-2,498	-2,488		5	SP+
110075	NM_173404	Bmp3	-8,279	-9,739	2,499	9,602	-3,393			5	SP+
14563	U08337	Gdf5	-2,270		11,642	10,729	5,197	11,039		5	SP+
74761	NM_024263	Mxra8	-4,120	-2,360	2,975	2,474	-1,383			5	SP+
58809	NM_021472	Rnase4	-3,266	-2,116	4,892	2,690		1,585		5	SP+
12258	NM_009776	Serping1	-1,655	-1,665			-1,580	-1,462	1,911	5	SP+
71738	NM_174857	Mamdc2	-4,736	-5,377	2,949	2,743			-2,300	5	SP+
20292	NM_011330	Ccl11	-2,476	-3,352			-2,463	-1,796	3,196	5	SP+
53381	NM_016764	Prdx4	-1,747	-1,948	1,410	1,703			1,681	5	SP+
15439	NM_017370	Hp	-2,062			-1,827	-2,214	-1,949	2,443	5	SP+
50766	NM_015800	Crim1	-2,036	-2,105			-1,745	-1,620	3,253	5	SP+
98170	NM_133804	Tmem132a	-2,371	-2,392	1,489		-1,602	-1,489		5	SP+

116847	NM_054077	Prelp	-9,641	-3,332	3,264	2,463	-2,858				5	SP+
80752	NM_030565	Fam20c	-4,581	-3,377	5,116	4,230		1,612			5	SP+
16413	NM_008403	Itgb1bp1	-1,339		-1,488		-2,026	-1,692	1,274		5	SP+
20195	NM_016740	S100a11	-2,722	-2,318	1,615	1,585	-1,685	-1,347	1,496	2,111	8	SP-
16952	NM_010730	Anxa1	-5,445	-4,023	2,535	2,117	-2,151	-1,551		1,781	8	SP-
11747	NM_009673	Anxa5	-2,676	-2,361	1,543	1,309	-1,712	-1,591			6	SP-
22223	NM_011670	Uchl1	-7,865	-5,795	2,401	2,983	-3,493	-1,628			6	SP-
29876	NM_013885	Clic4		-1,552	-4,320	-4,321	-5,285	-6,323		1,637	6	SP-
50875	NM_016963	Tmod3		-1,231	-1,819	-1,633	-1,980	-2,076		1,971	6	SP-
16854	NM_010705	Lgals3	-2,213	-7,238		1,563	-2,210	-4,493			5	SP-
28064	NM_145353	Yipf3	-1,446	-1,483	1,216		-1,194	-1,288			5	SP-
12417	NM_007624	Cbx3	1,217	1,226	-1,365	-1,463		-1,211			5	SP-
67399	NM_001114088	Pdlim7	-1,784	-2,080		1,446	-1,543	-1,219			5	SP-
20200	NM_011313	S100a6	-1,615	-2,097	-1,751		-2,692	-1,478			5	SP-
18611	NM_011063	Pea15a	-2,340	-2,767	1,626	2,620	-1,449				5	SP-
12306	NM_007585	Anxa2	-5,285	-3,688	3,240	2,955	-1,641				5	SP-
11692	NM_023040	Gfer	-1,315	-1,577		-1,368	-1,723	-2,068			5	SP-
109778	NM_026678	Blvra	-1,974	-3,008	1,627	2,020		-1,389			5	SP-
63985	AB001732	Gmfb	-1,553	-1,986	1,391	1,756		-1,182			5	SP-
20088	AK135247	Rps24	1,335	1,903	-1,182	-1,241		1,529			5	SP-
11475	NM_007392	Acta2	-2,220	-2,342	-1,723		-3,905	-2,595			5	SP-
216197	NM_175451	Ckap4		-1,635	-17,976	-13,094	-19,169	-22,672			5	SP-
13476	NM_007874	Reep5	-3,257	-2,699	2,007	2,211	-1,639				5	SP-
19122	NM_011170	Prnp	-2,099	-1,841	1,430	1,567				2,502	5	SP-
15528	NM_008303	Hspe1	1,411			1,711	1,796	1,466		1,592	5	SP-
75705	NM_145625	Eif4b		1,280	-1,352	-1,322			1,184	1,468	5	SP-

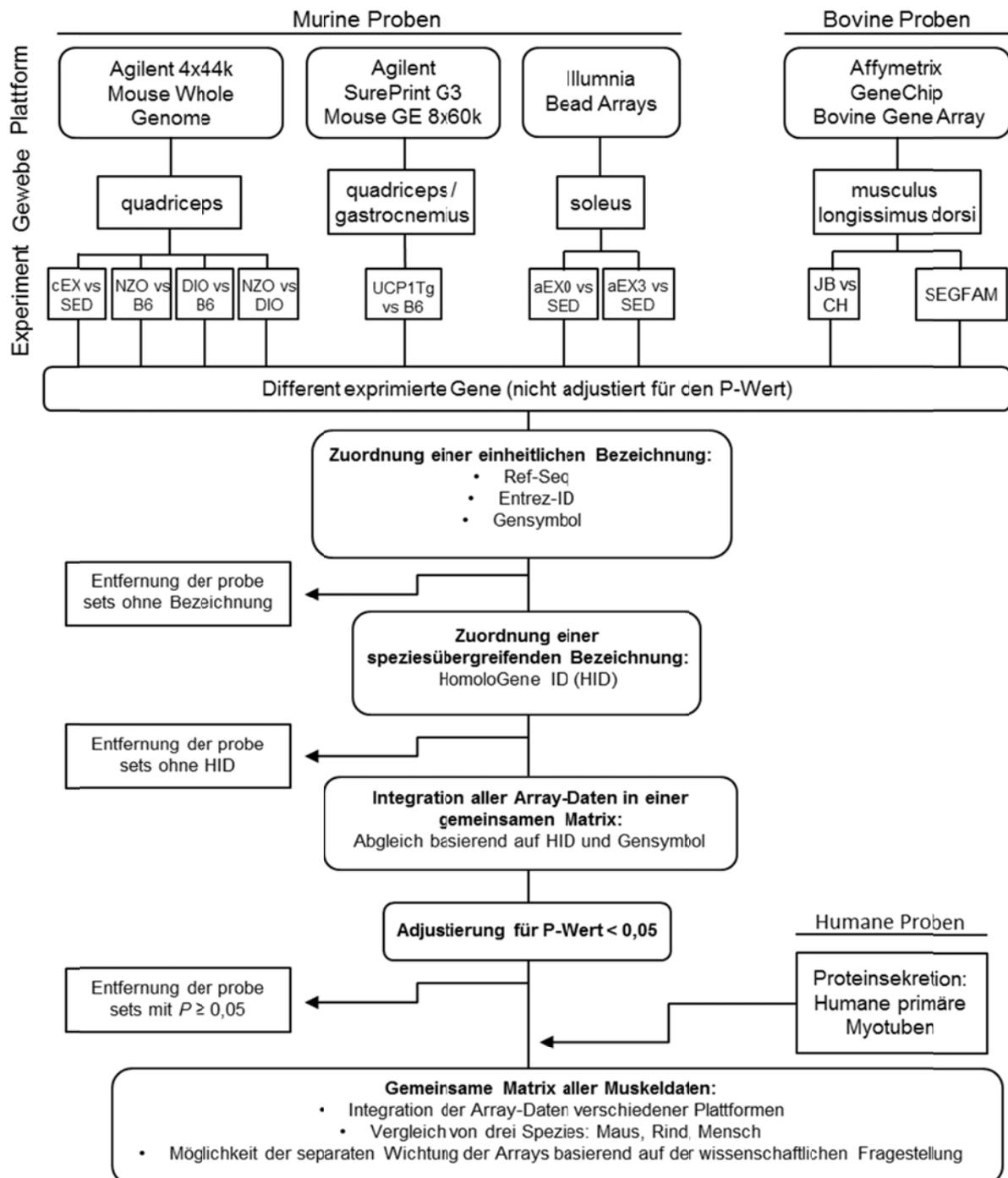


Abbildung A1. Vorgehensweise bei der spezieübergreifenden Datenanalyse und Generierung der Matrix für die Identifizierung von Kandidatengen, die potentiell vom Muskel sezerniert werden

Abkürzungen: aEX0 - nach akuter Belastung, aEX3 - 3 Stunden nach akuter Belastung, cEX - nach chronischer Belastung, B6 - C57BL/6J-Mäuse, CH - Charolais, DIO - diet-induced obesity (diät-induziertes Übergewicht), JB - Japanese Black, NZO - New Zealand obese, SED - sedentary (inaktiv), SEGFAM - Bullen einer F₂-Kreuzung, UCP1Tg - UCP1-überexprimierende Mäuse

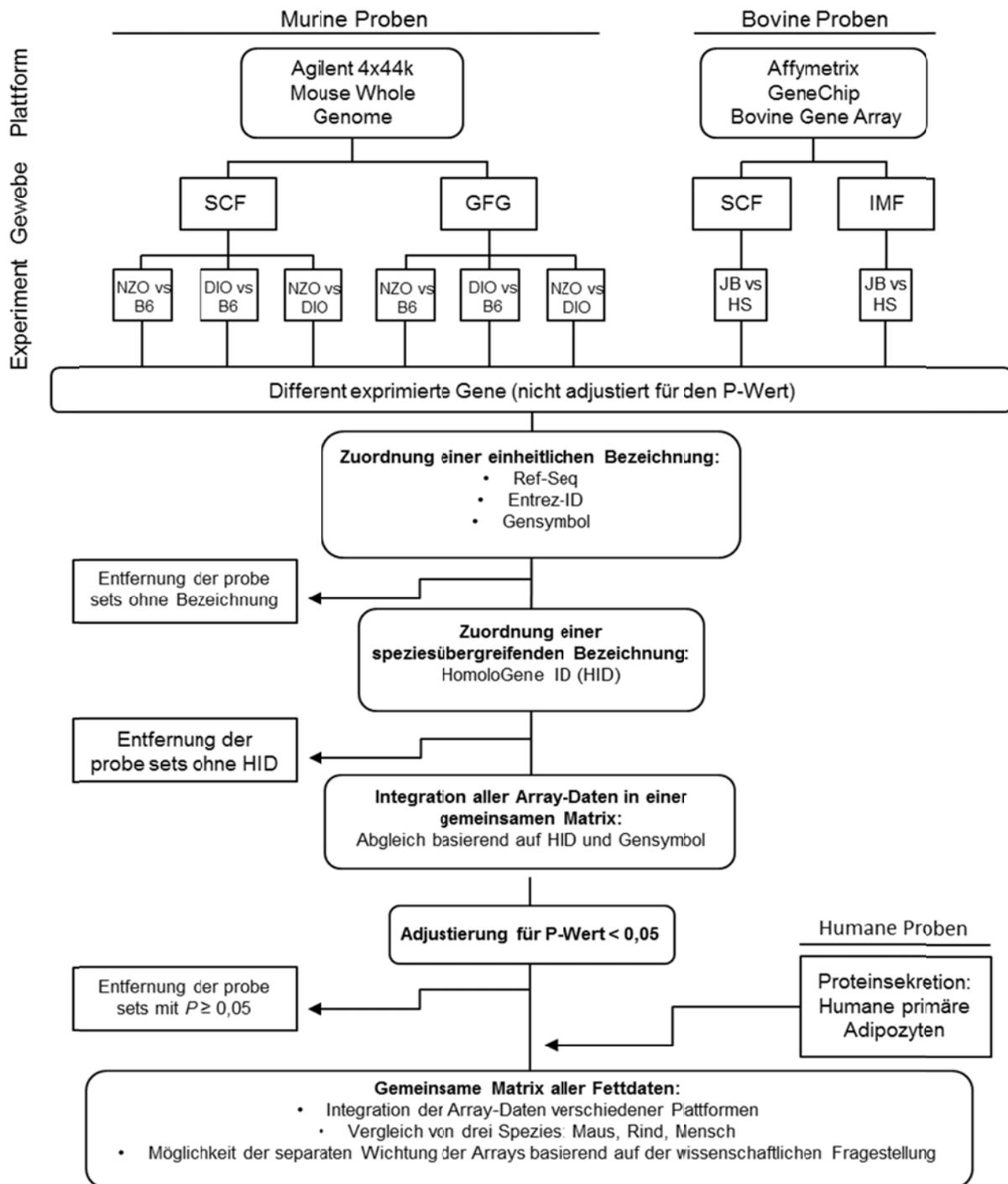


Abbildung A2. Vorgehensweise bei der speziesübergreifenden Datenanalyse und Generierung der Matrix für die Identifizierung von Kandidatengen, die potentiell vom Fettgewebe sezerniert werden

Abkürzungen: B6 - C57BL/6J-Mäuse, DIO - diet-induced obesity (diät-induziertes Übergewicht), GFG - gonadales Fettgewebe, HS - Deutsche Holstein, IMF - intramuskuläres Fett, JB - Japanese Black, NZO - New Zealand obese, SCF - subcutanes Fettgewebe

Anhang B - Medien und Puffer

Medien, Lösungen und Zusätze für die Zellkultur

Alle verwendeten Medien, Puffer oder Zusätze wurden bereits steril gekauft oder vor Gebrauch durch Membranfiltration (0,2 µm) sterilisiert. Alle Gebrauchslösungen und –medien wurden im Kühlschrank aufbewahrt.

Medien

Entnahmemedium:

Substanz	Endkonzentration
DMEM/F12 (Pulver)	15,6 g/l
NaHCO ₃	15 mM
Amphotericin B Lsg.	10 % (≅ 25 µg/ml)
Penicillin/Streptomycin Lsg.	10 % (≅ 1000 IU/ml Penicillin, 1 mg/ml Streptomycin)

pH=7,08

Verdauungsmedium:

Substanz	Endkonzentration
DMEM/F12 (Pulver)	15,6 g/l
NaHCO ₃	15 mM
HEPES	100 mM
BSA	1,5 %
Collagenase Typ I	2 mg/ml

pH=7,08

Post-Verdauungsmedium:

Substanz	Endkonzentration
DMEM/F12 (Pulver)	15,6 g/l
NaHCO ₃	15 mM
HEPES	100 mM

pH=7,08

Kulturmedium für primäre bovine stromavaskuläre Zellen:

Substanz	Anteil
DMEM/F12 (flüssig)	86 %
FKS	10 %
L-Glutamin Lsg.	2 % (≅ 4 mmol/l)
Amphotericin B Lsg.	1 % (≅ 2,5 µg/ml)
Penicillin/Streptomycin Lsg.	1 % (≅ 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)

Proliferationsmedium für 3T3-L1-Zellen:

Substanz	Anteil
DMEM	89 %
NKS	10 %
Penicillin/Streptomycin Lsg.	1 % (\cong 1000 IU/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin)

Differenzierungsmedium für 3T3-L1-Zellen:

Substanz	Anteil
DMEM	89 %
FKS	10 %
Penicillin/Streptomycin Lsg.	1 % (\cong 100 IU/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin)
Insulin	1 μ g/ml

PufferPBS-D Lösung:

Substanz	Endkonzentration
NaCl	144 mmol/l
KCl	5,4 mmol/l
Glukose	25 mmol/l
Sukrose	14 mmol/l
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	5 mmol/l
Penicillin	50 IU/ml
Streptomycin	50 μ g/ml
Phenolrot	1 μ g/ml

pH=7,5

Zusätze und TestsubstanzenApo-Transferrin (bovin):Stammlsg. 10 mg/ml \rightarrow 100 mg in 10 ml autoklav. H₂O lösen

Aliquots: 20 à 0,5 ml (-20 °C)

50 μ l / 50 ml Medium = Endkonz.: 10 μ g/mlBovines Serumalbumin (BSA):Stammlsg. 50 mg/ml \rightarrow 5 g in 100 ml autokl. Reinstwasser

Aliquots: 20 à 1,5 ml; 140 à 0,5 ml (-20 °C)



1 ml / 100 ml Medium = Endkonz.: 0,5 mg/ml

Cytosinarabinosid: DNA-Synthesehemmer

Stammlsg.: 1 mmol/l → 24,32 mg in 100 ml



Aliquots: 66 à 1,5 ml (-20 °C)



1 ml / 1 l Medium = Endkonz.: 1 µM

Dexamethason:

Stammlsg. 20 µg/ml → 1 ml abs. Alkohol in Ampulle geben, leicht schwenken
+ 49 ml autoklav. Reinstwasser (alles in Originalampulle)



Aliquots: 50 Röhrchen à 1 ml (-20 °C)



100 µl / 50 ml Medium = Endkonz.: 100 nM (40 ng/ml)

IBMX:

Stammlsg. 250 mM → 100 mg in 1800 µl DMSO lösen



Aliquots: 90 à 20 µl (-20 °C)



5 µl / 50 ml Medium = Endkonz.: 25 µM

Insulin (bovin):

Stammlsg. 10 mg/ml → 100 mg in 10 ml

autokl. Reinstwasser mit 1 % Eisessig

(0,1 ml Eisessig + 9,9 ml autokl. Reinstwasser)



Aliquots: 200 à 50 µl (-20°C)



60 µl / 100 ml Medium = Endkonz.: 1 µM (5,7 µg/ml)

ITS:

Stammlsg. 1 mg/ml Insulin (≅174000 nM)



500 µl / 100 ml Medium = Endkonz.: 850 nM (5 µg/ml)

Hydrocortison:

Stammlsg. 10 mM → 100 mg in 27,6 ml abs. Alkohol



Aliquots: 27 à 1 ml (-20 °C)



0,5 µl / 50 ml Medium = Endkonz.: 100 nM

Linolsäure:

Stammlsg. 1 mg/ml → 100 mg in 100 ml 1 N NaOH lösen



Aliquots: 66 à 1,5 ml (-20 °C)



50 µl / 100 ml Medium = Endkonz.: 0,5 µg/ml

Luft- und lichtempfindlich!

Linolensäure:

Stammlsg. 100 mg/ml (\cong 356500 µM)



70,1 µl / 50 ml Medium = Endkonz. 500 µM (140 mg/ml)

Ölsäure:

Stammlsg. 100 mg/ml (\cong 354000 µM)



56,6 µl / 50 ml Medium = Endkonz. 400 µM (113 mg/ml)

Triiodthyronin (T₃):

Stammlsg. 30 µM → 1 mg in 1 ml 1 N NaOH lösen

Zugabe von 49 ml Medium (DMEM)



Aliquots: 50 à 1 ml (-20 °C)



100 µl / 100 ml Medium = Endkonz.: 30 nM

Troglitazon:

Stammlsg.: 100 mM → 5 mg in 100 µl DMSO lösen



Aliquots: 20 à 5 µl (-20 °C)



5 µl / 50 ml Medium = Endkonz.: 10 µM

Lösungen für molekularbiologische MethodenDNA-IsolierungTris-Puffer:

Substanz	pro 100 ml
0,5 M EDTA-Lsg. (pH=8,0)	20 ml
1 M Tris-Lsg. (pH=8,0)	5 ml
SDS-Lsg. (10 %)	5 ml
Reinstwasser	70 ml

Tris-EDTA-Puffer:

Substanz	pro 100 ml
0,5 M EDTA-Lsg. (pH=8,0)	0,2 ml
1 M Tris-Lsg. (pH=8,0)	1 ml
Reinstwasser	98,8 ml

Agarose-Gelelektrophorese50×TAE-Puffer:

Substanz	pro 1000 ml
Tris	242,3 g
EDTA	18,6 g
Essigsäure	ca. 57 ml (zur Einstellung des pH-Wertes)
Reinstwasser	943 ml
pH=8,0	

1×TAE-Puffer:

Substanz	pro 1000 ml
50× TAE-Puffer	20 ml
Reinstwasser	980 ml

Bromphenolblau-Ladepuffer:

Substanz	pro 100 ml
Glycerin	50 ml
Bromphenolblau	0,1 g
0,5 M EDTA-Lsg. (pH=8,0)	24 ml
1 M Tris-Lsg. (pH=8,0)	1 ml

Lösungen für die Proteinfraktionierung und für proteinbiochemische Methoden

PBS:

Substanz	pro 1 l Reinstwasser
NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
pH=7,4	

Immunhistochemische und -cytochemische Färbung

PBS-T:

Substanz	pro 1 l Reinstwasser
NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Triton	1000 µl

TBS:

Substanz	pro 1 l Reinstwasser
Tris	2,42 g
NaCl	8 g
pH=7,4	

TBS-Tw20 (Waschpuffer):

Substanz	pro 200 ml Reinstwasser
Tris	1,2112 g
NaCl	1,7532 g
Tween-20	100 µl
pH=7,4	

TBS-Ziegen Serum 1 % (Blockierungslösung):

Substanz	pro 25 ml Reinstwasser
Tris	0,1515 g
NaCl	0,2193 g
Ziegen Serum	250 µl
pH=7,4	

Sudanschwarz-Lsg.:

Substanz	pro 100 ml
Sudanschwarz	0,1 g
Ethanol (70 %)	100 ml

→ vor Gebrauch filtrieren

Eosin-Lsg.:

Substanz	pro 200 ml Reinstwasser
Eosin	0,2 g
Eisessig	2-3 Tropfen

Kobaldchlorid-Lsg.:

Substanz	pro 100 ml
Kobaldchlorid	2 g
Reinstwasser	100 ml

Formol-Calcium-Lsg.:

Substanz	pro 100 ml Reinstwasser
Paraformaldehyd	4 g
CaCl ₂	1 g
CaCO ₃	im Überschuss

→ vor Gebrauch filtrieren

Paraformaldehyd-Lsg.:

Substanz	pro 100 ml Reinstwasser
Eosin	4 g
1 M NaOH	2-3 Tropfen

Ammoniumsulfid-Lsg.:

Substanz	pro 100 ml
Ammoniumsulfid	1 g
Reinstwasser	100 ml

Western BlotTrenngel 12 %:

Substanz	1 Gel
Reinstwasser	1,65 ml
Tris-Lsg. (1,5 M, pH=8,8)	1,25 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	2 ml
SDS-Lsg. (10 %)	50 µl
APS-Lsg. (10 %)	50 µl
TEMED	2,5 µl

Sammelgel (5 %):

Substanz	1 Gel
Reinstwasser	1,75 ml
Tris-Lsg. (0,5 M, pH=6,8)	315 µl
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	375 µl
SDS-Lsg. (10 %)	25 µl
APS-Lsg. (10 %)	25 µl
TEMED	2,5 µl

Trenngelpuffer:

Substanz	pro 250 ml Reinstwasser
Tris	45,41 g
pH=8,8	

Sammelgelpuffer:

Substanz	pro 100 ml Reinstwasser
Tris	6,06 g
pH=6,8	

10×Towbin-Puffer:

Substanz	pro 1 l Reinstwasser
Tris	30,3 g
Glycin	144,1 g

Laufpuffer:

Substanz	pro 1 l
10×Towbin-Puffer	100 ml
SDS-Lsg. (10 %)	10 ml
Reinstwasser	890 ml

Blottingpuffer:

Substanz	pro 1 l
10×Towbin-Puffer	100 ml
Methanol	200 ml
Reinstwasser	700 ml

SDS-Probenpuffer (2-fach) nach Laemmli:

Substanz	pro 10 ml
Reinstwasser	1,75 ml
Tris-Lsg. (1 M, pH=6,8)	1,25 ml
Glycerin	2 ml
SDS-Lsg. (10 %)	4 ml
β-Mercaptoethanol	1 ml (Zugabe kurz vor Benutzung)
0,5 % Bromphenolblau-Lsg.	1 ml
pH=6,8	

Coomassie-Färbelsg. für die Gele:

Substanz	pro 1 l
Isopropanol	47,5 ml
Essigsäure (100 %)	9 ml
Coomassie Brilliant Blau R250	0,5 g
Reinstwasser	943,5 ml

Coomassie-Färbelsg. für die PVDF-Membran:

Substanz	pro 60 ml
Methanol	30 ml
Essigsäure (100 %)	4,2 ml
Coomassie Brilliant Blau R250	0,1 g
Reinstwasser	25,8 ml

Coomassie-Entfärbelsg. 1 für PVDF-Membran:

Substanz	pro 30 ml
Methanol	15 ml
Essigsäure (100 %)	2,1 ml
Reinstwasser	12,9 ml

Coomassie-Entfärbelsg. 2 für PVDF-Membran:

Substanz	pro 30 ml
Methanol	27 ml
Essigsäure (100 %)	3 ml

Stripping-Puffer:

Substanz	pro 1 l
Glycin	15 g
SDS-Lsg. (10 %)	10 ml → pH=2,2
Tween-20	10 ml
Reinstwasser	980 ml

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Sämtliche Zitate, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, habe ich in jedem Fall durch Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Ferner versichere ich, dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Fassung weder an der naturwissenschaftlichen Fakultät III der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Dummerstorf, den

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich für die Betreuung während der Promotion bei Prof. Dr. Gabriele Stangl und Prof. Dr. Steffen Maak bedanken. Herrn Prof. Steffen Maak danke ich darüber hinaus für die Überlassung des aktuellen und kontrovers diskutierten Themas, seine Hilfe, die zahlreichen fachlichen Diskussionen, die Unterstützung bei den Publikationen sowie für seine Geduld und sein Verständnis.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Elke Albrecht, die intensiv an der Betreuung und thematischen Bearbeitung beteiligt war und zudem stets ein offenes Ohr für Wünsche, Fragen und Zeit für hilfreiche Gespräche hatte. Weiterhin danke ich Frau Dr. Katja Will für ihre ruhige Art und ihre fachlichen Ratschläge in der Zellkultur sowie Frau Dr. Katrin Komolka, die mir sehr dabei half, die Array-Auswertung und das Primerdesign zu bewältigen.

Besonders hervorheben möchte ich Frau Elke Schwitulla und Stefanie Foß, die technischen Mitarbeiterinnen von Prof. Dr. Maak, die mir immer geduldig und bei vielen Laborarbeiten, Anliegen und Rückfragen fürsorglich zu Seite standen. Gleichmaßen gilt der Dank Frau Angela Steinborn und Anne Berndt für Ihre Unterstützung im Zellkulturlabor. Ich bedanke mich auch bei Frau Marlies Fuchs für ihre technische Assistenz bei der DNA-Sequenzierung.

Insgesamt danke ich allen Wissenschaftlern und Mitarbeitern des Instituts für Muskelbiologie und Wachstum für ihre Hilfsbereitschaft, viele neue Denkanstöße bei der Lösung von Problemen und vor allem für ihren Ansporn, auch die schwierigen Zeiten zu überstehen.

Der Leibniz-Gemeinschaft möchte ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Verbundvorhabens im wettbewerblichen Verfahren (SAW-2013-FBN-3) danken. Ich bedanke mich ebenso bei dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke, dem Deutschen Diabetes-Zentrum Düsseldorf und dem Universitätsklinikum Tübingen für die sehr gute Kooperation. In diesem Zusammenhang seien auch die mitwirkenden Abteilungen von Prof. Dr. Annette Schürmann, Prof. Dr. Susanne Klaus, Prof. Dr. Cora Weigert und Prof. Dr. Jürgen Eckel dankend erwähnt.

Zuletzt möchte ich einen Dank an meinen Freund und meine Familie richten, deren Geduld und Beistand besonders zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Familienname: Schering

Vorname: Lisa

Akademischer Werdegang:

2000-2007	Lucas-Cranach-Gymnasium in Piesteritz Abschluss: Abitur
10/2007-09/2010	Studium der Ernährungswissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Abschluss: Bachelor of Science
10/2010-12/2012	Studium der Ernährungswissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Abschluss: Master of Science
01/2013-06/2016	Promotion am Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN), im Institut für Muskelbiologie und Wachstum zum Thema „Identifizierung und Charakterisierung von Adipokinen und Myokinen mit Bedeutung für die Körperzusammensetzung beim Rind“
seit 06/2016	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN)

Dummerstorf, den

Unterschrift

Projektbezogene Publikationen

Publikationen in peer-reviewed Journalen:

Albrecht E, Norheim F, Thiede B, Holen T, Ohashi T, Schering L, Lee S, Brenmoehl J, Thomas S, Drevon CA, Erickson HP, Maak S (2015). Irisin - a myth rather than an exercise-inducible myokine. *Sci Rep*, 5: 8889, 1-10.

Brenmoehl J, Albrecht E, Komolka K, Schering L, Langhammer M, Hoeflich A, Maak S (2014). Irisin is elevated in skeletal muscle and serum of mice immediately after acute exercise. *Int J Biol Sci*, 10 (3): 338-349.

Komolka K, Albrecht E, Schering L, Brenmoehl J, Hoeflich A, Maak S (2014). Locus characterization and gene expression of bovine FNDC5: is the myokine irisin relevant in cattle? *PLoS One*, 9: e88060, 1-11.

Schering L, Hoene M, Kanzleiter T, Jähnert M, Wimmers K, Klaus S, Eckel J, Weigert C, Schürmann A, Maak S, Jonas W, Sell H (2015). Identification of novel putative adipomyokines by a cross-species annotation of secretomes and expression profiles. *Arch Physiol Biochem*, 121: 194-205.

Will K, Schering L, Albrecht E, Kalbe C, Maak S (2015). Differentiation of bovine satellite cell-derived myoblasts under different culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 51: 885-889.

Poster, Vorträge und Kurzbeiträge:

Albrecht E, Schering L, Dannenberger D, Nürnberg G, Kühn CH, Maak S (2015). Associations of SNPs in the THRSP gene with morphological and biochemical traits of longissimus muscle in F2 offspring of a Charolais × Holstein cross. *J Anim Sci*, 93: 65.

Schering L, Albrecht E, Liu Y, Kühn CH, Wimmers K, Maak S (2015). Molekulare Ursachen einer differentiellen Expression von THRSP im bovinen Skelettmuskel. *Schriftenreihe / Leibniz-Institut für Nutztierbiologie*, 24: 17-20.

Schering L, Albrecht E, Liu Y, Kühn CH, Wimmers K, Maak S (2015). Molekulare Ursachen einer differentiellen Expression von THRSP im bovinen Skelettmuskel. In: Aus der Arbeit der Forschungsstätten für Tierproduktion, Kurzfassungen: Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e.V. und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaften e.V., 16. und 17. September 2015 in Berlin (DGfZ/GfT; Hrsg.): A21.

Schering L, Albrecht E, Liu Y, Kühn CH, Wimmers K, Maak S (2015). Molecular background of differential expression of THRSP in bovine longissimus muscle. *J Anim Sci*, 93: 63.