

Aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. M. Tiedge

**Untersuchung der Auswirkungen der mitochondrialen *Atp-8*-Mutation im  
conplastischen FVB-Mausmodell auf Pathogenesemechanismen des  
Diabetes mellitus**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Christiane Koch

geboren am 19. August 1983 in Cottbus,

aus Rostock

Rostock, Dezember 2010

Dekan: Prof. Dr. E. Reisinger

Dekan: Prof. Dr. med. E. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Tiedge, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. R. Jaster, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. R. Walther, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität Greifswald

Tag der Verteidigung: 28.06.2011

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Diabetes mellitus .....	1
1.1.1	Definition und Klassifikation .....	1
1.1.2	Diabetes mellitus Typ 1 .....	2
1.1.3	Diabetes mellitus Typ 2 .....	4
1.2	Mitochondrien .....	6
1.2.1	Aufbau .....	6
1.2.2	Oxidative Phosphorylierung .....	6
1.2.3	Reaktive Sauerstoffspezies .....	9
1.2.4	Das mitochondriale Genom .....	10
1.2.5	Mitochondriale Krankheiten .....	11
1.3	Insulinsekretion und Insulinwirkung .....	13
1.3.1	Insulinsekretion .....	13
1.3.2	Insulinwirkung .....	14
1.4	Fragestellung .....	15
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1	Materialien .....	16
2.2	Tiere und Tierhaltung .....	19
2.3	Lipidbelastungsstudie .....	20
2.3.1	Blutentnahmen und Gewichtsbestimmung .....	20
2.3.1.1	Blutentnahme aus der Schwanzvene .....	20
2.3.1.2	Retrobulbäre Blutentnahme .....	20
2.3.1.3	Bestimmung des Körpergewichtes .....	20
2.3.2	Bestimmung des Insulingehaltes im Serum .....	21
2.3.3	Glucosetoleranz und Insulinsensitivität .....	21
2.3.3.1	Bestimmung der Blutglucose .....	21
2.3.3.2	Intraperitonealer Glucosetoleranztest .....	21
2.3.3.3	Intraperitonealer Insulinsensitivitätstest .....	22
2.3.4	Isolation der pankreatischen Inseln .....	22
2.3.4.1	Lösungen und Medien .....	22
2.3.4.2	Inselisolation .....	22
2.3.5	Ex vivo Stimulation der isolierten Pankreasinseln .....	23
2.3.5.1	Lösungen .....	23
2.3.5.2	Ex vivo Stimulation .....	24

2.3.5.3	Bestimmung des Insulingehaltes .....	24
2.3.5.4	Bestimmung des ds-DNA-Gehaltes .....	25
2.3.6	Histologische Untersuchungen .....	25
2.3.6.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	25
2.3.6.2	Immunhistochemie .....	26
2.3.6.3	Elektronenmikroskopie .....	27
2.4	Auswirkungen des mt <sup>FVB</sup> -Hintergrundes auf das Autoimmungeschehen der NOD Maus .....	28
2.4.1	Bestimmung der Insulin-Autoantikörper .....	28
2.4.1.1	Substratpuffer .....	28
2.4.1.2	Ermittlung des Insulin-Autoantikörper-Gehaltes .....	28
2.5	Untersuchungen der Auswirkungen des mt <sup>FVB</sup> -Genotyps auf mitochondriale Funktionen .....	30
2.5.1	Mitochondrien-Isolation aus Leber und Milz .....	30
2.5.1.1	Mitochondrien-Isolation aus der Milz .....	30
2.5.1.2	Mitochondrien-Isolation aus der Leber .....	31
2.5.2	Messung der ATPase-Aktivität in den Mitochondrien .....	32
2.5.2.1	Reaktionsmix .....	32
2.5.2.2	Messung der ATPase-Aktivität .....	32
2.5.3	Messung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion .....	33
2.5.3.1	Analysenpuffer .....	33
2.5.3.2	Messung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion .....	33
2.5.4	Messung des Sauerstoffverbrauches in den Mitochondrien .....	33
2.5.4.1	Puffer .....	33
2.5.4.2	Messung des Sauerstoffverbrauches .....	34
2.6	Statistische Auswertung .....	35
<b>3</b>	<b>Resultate .....</b>	<b>36</b>
3.1	Auswirkungen der mitochondrialen Variante des <i>Atp-8</i> -Gens (mt <sup>FVB/N</sup> ) auf das Autoimmungeschehen der NOD Maus .....	36
3.1.1	Blutglucosekonzentrationen der NODmt <sup>FVB</sup> und NOD Tiere .....	37
3.1.2	Gewichtsverlauf der NODmt <sup>FVB</sup> und NOD Tiere .....	39
3.1.3	Diabetesinzidenz der NODmt <sup>FVB</sup> und NOD Tiere .....	40
3.1.4	Insulin-Autoantikörpergehalt bei NODmt <sup>FVB</sup> und NOD Tieren .....	41
3.2	Lipidbelastungsstudie der NODmt <sup>FVB</sup> und NOD Maus .....	43

3.2.1	Blutglucosespiegel der NODmt <sup>FVB</sup> und NOD Tiere unter fettreicher und fettarmer Diät.....	43
3.2.2	Gewichtsverlauf der NODmt <sup>FVB</sup> und NOD Tiere unter fettreicher und fettarmer Diät .....	44
3.2.3	Seruminsulinspiegel der NODmt <sup>FVB</sup> und NOD Tiere unter fettreicher und fettarmer Diät .....	45
3.2.4	Glucosestimulierte Insulinsekretion (GSIS) ex vivo aus pankreatischen $\beta$ -Zellen von NODmt <sup>FVB</sup> und NOD Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät.....	46
3.2.5	Insulitis-Raten bei NODmt <sup>FVB</sup> und NOD Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät .....	47
3.2.6	Größe und Anzahl der Langerhansschen Inseln in Pankreaspräparaten von NODmt <sup>FVB</sup> und NOD Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät.....	48
3.3	Lipidbelastungsstudie der B6mt <sup>FVB</sup> und B6mt <sup>AKR</sup> Maus .....	50
3.3.1	Blutglucosespiegel der B6mt <sup>FVB</sup> und B6mt <sup>AKR</sup> Tiere unter fettreicher und fettarmer Diät .....	50
3.3.2	Gewichtsverlauf der B6mt <sup>FVB</sup> und B6mt <sup>AKR</sup> Tiere unter fettreicher Diät und fettarmer Diät .....	51
3.3.3	Seruminsulinspiegel von B6mt <sup>FVB</sup> und B6mt <sup>AKR</sup> Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät .....	52
3.3.4	Glucosetoleranz von B6mt <sup>FVB</sup> und B6mt <sup>AKR</sup> Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät .....	53
3.3.5	Insulinsensitivität bei B6mt <sup>FVB</sup> und B6mt <sup>AKR</sup> Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät .....	54
3.3.6	Glucosestimulierte Insulinsekretion (GSIS) ex vivo aus pankreatischen $\beta$ -Zellen von B6mt <sup>FVB</sup> und B6mt <sup>AKR</sup> Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät.....	55
3.3.7	Größe und Anzahl der Langerhansschen Inseln in Pankreaspräparaten von B6mt <sup>FVB</sup> und B6mt <sup>AKR</sup> Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät.....	56
3.3.8	Größe und Anzahl der Mitochondrien in pankreatischen $\beta$ -Zellen von B6mt <sup>FVB</sup> und B6mt <sup>AKR</sup> Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät.....	58
3.4	Untersuchungen der Auswirkungen des mt <sup>FVB/N</sup> -Genotyps auf mitochondriale Funktionen.....	60
3.4.1	Aktivität des ATPase-Komplexes in isolierten Mitochondrien von NODmt <sup>FVB</sup> und NOD Tieren sowie von B6mt <sup>FVB</sup> und B6mt <sup>AKR</sup> Tieren.....	60

3.4.2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion in isolierten Mitochondrien von NODmt <sup>FVB</sup> und NOD Tieren sowie von B6mt <sup>FVB</sup> und B6mt <sup>AKR</sup> Tieren.....	62
3.4.3	Sauerstoffverbrauch von isolierten Mitochondrien von NODmt <sup>FVB</sup> und NOD Tieren sowie von B6mt <sup>FVB</sup> und B6mt <sup>AKR</sup> Tieren .....	63
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>66</b>
4.1	Auswirkungen der mitochondrialen Variante des <i>Atp-8</i> -Gens (mt <sup>FVB/N</sup> ) auf das Autoimmungeschehen der NOD Maus .....	68
4.2	Lipidbelastungsstudie der NODmt <sup>FVB</sup> und NOD Maus .....	70
4.3	Lipidbelastungsstudie der B6mt <sup>FVB</sup> und B6mt <sup>AKR</sup> Maus .....	72
4.3.1	Glucosetoleranz .....	72
4.3.2	Insulinsensitivität.....	73
4.3.3	Seruminsulinspiegel .....	75
4.3.4	Anzahl und Größe der Langerhansschen Inseln sowie Größe der Mitochondrien in pankreatischen $\beta$ -Zellen .....	76
4.4	Untersuchungen der Auswirkungen des mt <sup>FVB/N</sup> -Genotyps auf mitochondriale Funktionen.....	78
4.4.1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion in isolierten Milz-Mitochondrien.....	78
4.4.2	Aktivität des ATPase-Komplexes in isolierten Milz-Mitochondrien.....	79
4.4.3	Sauerstoffverbrauch von isolierten Leber-Mitochondrien .....	80
4.5	Ausblick.....	83
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>Thesen.....</b>	<b>95</b>

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µg/l	Mikrogramm pro Liter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
α	Alpha
Abb.	Abbildung
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ANT	Adeninnukleotidtranslokase
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP-Synthase
β	Beta
B6mt <sup>AKR</sup>	Mausstamm C57BL/6J-mt <sup>AKR/J</sup>
B6mt <sup>FVB</sup>	Mausstamm C57BL/6J-mt <sup>FVB/N</sup>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
cal	Kalorien
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Cox	Cytochrom-c-Oxidase
CTS	Mausstamm <i>Cataract Shionogi</i>
Cu	Kupfer
δ	Delta
DAG	Diacylglycerin
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
dest.	destillata

## Abkürzungsverzeichnis

---

d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds-DNA	Doppelstrang-DNA
$\varepsilon$	Epsilon
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAD	Flavinadenindinukleotid
FCS	fetales Kälberserum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FMN	Flavinmononukleotid
$\gamma$	Gamma
g	Gramm
g	Erdschwerebeschleunigung
GAD	Glutamatdecarboxylase
GLUT	Glukosetransporter
Gr.	Größe
GSIS	glucosestimulierte Insulinsekretion
h	Stunden
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxymethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozytenantigen
IAA	Insulin-Autoantikörper
IgG	Immunglobulin G
<i>INS</i>	Insulin-Gen
i. p.	intraperitoneal
IRS	Insulinrezeptorsubstrate
K <sub>ATP</sub>	ATP-sensitiver Kaliumkanal
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasen

## Abkürzungsverzeichnis

---

KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
KR	Krebs-Ringer
l	Liter
LADA	<i>latent autoimmune diabetes of adults</i>
Leu	Leucin
LHON	Lebersche hereditäre Optikusatrophie
M	Molar
MELAS	mitochondriale Enzephalopathie, Laktatazidose, schlaganfall-ähnliche Episoden
MERRF	myoklone Epilepsie mit <i>ragged red fibres</i>
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol/l	Millimol pro Liter
Mn	Mangan
MODY	<i>maturity onset diabetes of the young</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MSH	Mannitol, Sucrose, HEPES
mt	mitochondrial
mtDNA	mitochondriale DNA
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaCO <sub>2</sub>	Natriumkarbonat
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogenkarbonat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat

## Abkürzungsverzeichnis

---

NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
nDNA	nukläre DNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NOD	Mausstamm NOD/Ltj
NODmt <sup>FVB</sup>	Mausstamm NOD/Ltj-mt <sup>FVB/N</sup>
NON	Mausstamm <i>non obese normal</i>
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid
OH·	Hydroxylradikal
OsO <sub>4</sub>	Osmiumtetroxid
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
P <sub>i</sub>	Orthophosphat
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonfluorid
PP	pankreatisches Polypeptid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i>
rRNA	ribosomale DNA
s.	siehe
S.	Seite
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SOD	Superoxid-Dismutase
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
Tab.	Tabelle
tRNA	transfer-RNA
u.	und
U	<i>Units</i>
U/ml	<i>Units</i> pro Milliliter
u. a.	unter anderem
UCP	<i>Uncoupling protein</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

usw.	und so weiter
u. U.	unter Umständen
VNTR	<i>variable numbers of tandem</i>
vs.	versus
WHO	<i>World Health Organisation</i>
z. B.	zum Beispiel
Zn	Zink
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Diabetes mellitus

### 1.1.1 Definition und Klassifikation

Der Diabetes mellitus ist definiert als eine durch chronische Hyperglykämie charakterisierte Regulationsstörung des Stoffwechsels. Dieser Regulationsstörung liegt entweder eine gestörte Insulinsekretion, eine verminderte Insulinwirkung oder beides zugrunde (Kerner *et al.* 2004). Beim Diabetes mellitus kann man einen Typ 1 und einen Typ 2 unterscheiden. Der Typ 1 Diabetes ist eine Autoimmunerkrankung, die zu einer vollständigen Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen mit absoluter Insulinbedürftigkeit führt. Der Typ 2 Diabetes ist eine Erkrankung mit Insulinresistenz, verbunden mit einem Sekretionsdefizit der  $\beta$ -Zellen, wobei einzelne Patienten diese beiden Veränderungen in unterschiedlichem Maße aufweisen (Hien & Böhm 2007).

Der Diabetes mellitus ist die häufigste Stoffwechselerkrankung in den westlichen Industrieländern (Mussig *et al.* 2010). Im Jahr 2000 waren weltweit über 170 Mio. Menschen betroffen und im Jahr 2030 werden es schätzungsweise 365 Mio. Menschen sein (Wild *et al.* 2004). In Deutschland, dem Land mit der höchsten Diabetes-Prävalenz Europas, sind ca. 12 % der 20- bis 79-Jährigen, d. h. 7,5 Mio. Menschen an Diabetes erkrankt, bei einer erheblichen Dunkelziffer von ca. 3 Mio. (IDF 2009). Etwa 90 % aller Diabetes-Erkrankungen fallen auf den Typ 2 Diabetes und 10 % auf den Typ 1 Diabetes. Andere Diabetes-Formen, wie z. B. MODY („*maturity-onset diabetes of the young*“) oder Gestationsdiabetes, weisen eine sehr geringe Prävalenz auf (Ratzmann 1991).

Bereits 1965 wurden von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) Empfehlungen zur Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus gegeben (WHO 1965). Die Amerikanische Diabetes Gesellschaft (ADA) revidierte 1997 die Kriterien zur Diagnose des Diabetes und gab neue Empfehlungen zur Klassifikation heraus, die von der WHO und der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) 2000 bestätigt und als Leitlinien übernommen wurden (Kerner *et al.* 2004). In Tab. 1.1 ist diese Klassifikation dargestellt.

1. **Typ 1 Diabetes** vorwiegend immunologisch bedingte  $\beta$ -Zellzerstörung, die meist zum absoluten Insulinmangel führt
2. **Typ 2 Diabetes** kann sich von einer vorwiegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz erstrecken
3. **andere spezifische Diabetes-Typen** z. B. genetische Defekte der  $\beta$ -Zellfunktion oder der Insulinwirkung, Erkrankungen des exokrinen Pankreas, Endokrinopathien, medikamenten- oder chemikalieninduziert, Infektionen, usw.
4. **Gestationsdiabetes**

**Tab. 1.1 Klassifikation des Diabetes mellitus (Kellerer & Danne 2009)**

### **1.1.2 Diabetes mellitus Typ 1**

Der Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM) kommt charakteristischerweise im Kindesalter vor. Einen ersten, kleineren Häufigkeitsgipfel gibt es im 4. Lebensjahr und einen zweiten größeren Häufigkeitsgipfel weist der T1DM im Alter von 10 bis 12 Jahren auf, wobei Mädchen und Jungen gleich häufig betroffen sind. Es gibt eine Variante des T1DM, die sich erst im Erwachsenenalter manifestiert. Diese Variante wird als „*latent autoimmune diabetes in adults*“ (LADA) bezeichnet und ist eine langsam fortschreitende, weniger schwere Form (Hürter & Lange 2005).

Der T1DM ist eine Autoimmunerkrankung bei der es zur progredienten Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen kommt. Dadurch entwickelt sich ein Insulinmangel mit den klassischen Symptomen Polyurie, Polydipsie, Ketoazidose und Gewichtsverlust. Das Spektrum der Manifestation des Insulinmangels ist groß und reicht von gestörter Glucosetoleranz über mäßig erhöhte Nüchternblutglucose bis zur abrupt einsetzenden Insulinbedürftigkeit mit ketoazidotischer Stoffwechsellage und möglichem Bewusstseinsverlust (Kerner *et al.* 2004).

Risikofaktoren für den T1DM sind vor allem genetische Prädispositionen, jedoch ist die Erkrankung nicht einem bestimmten Gen zu zuschreiben. Es gelten bestimmte humane Leukozytenantigen (HLA)-Genkombinationen als besonders suszeptibel. Die Kombination der HLA-Gene DR4-DQ8 und DR3-DQ2 werden bei 90 % aller T1DM Patienten gefunden. Daneben gibt es noch andere Genvariationen, die das Erkrankungsrisiko erhöhen, z. B. *INS-VNTR* („*variable number of tandem repeats*“) Polymorphismen in der Promotor-Region des *Insulin*-Gens (*INS*) (Bennett & Todd 1996). Neben der genetischen Komponente gibt es weitere Faktoren, die zur Ätiopathogenese beitragen, z. B. Virusinfektionen, Stilldauer und Ernährungsfaktoren (Hürter & Lange 2005).

Der Typ 1 Diabetes unterscheidet sich von anderen Diabetes-Formen durch das Vorhandensein von Autoantikörpern, die gegen  $\beta$ -Zellkomponenten gerichtet sind. Die drei häufigsten Autoantikörper, die bei Typ 1 Diabetikern gefunden werden, sind gegen Glutamat-decarboxylase (GAD) (Baekkeskov *et al.* 1989), Tyrosinphosphatase (Lan *et al.* 1996) und Insulin (Palmer 1987) gerichtet. Bei 90 % aller neu entdeckten T1DM Patienten lässt sich mindestens einer der genannten Autoantikörper nachweisen (Gillespie 2006). Die Antikörper sind bereits vor der Krankheitsmanifestation im Blut der Patienten vorhanden und es wird versucht, sie zur Prädiktion zu nutzen (Ziegler *et al.* 1999).

Charakteristisch für den T1DM sind lymphozytäre Infiltrate in den Langerhansschen Inseln oder deren Umgebung, was als Insulitis bzw. Periinsulitis bezeichnet wird. (Richardson *et al.* 2010). Das Infiltrationsausmaß lässt sich in drei Stadien unterteilen, wobei in der Frühphase nur der Randbereich der Langerhansschen Inseln entzündliches Infiltrat aufweist (Periinsulitis). Im Verlauf breiten sich die Infiltrate immer weiter innerhalb der Inseln aus (Insulitis) und die Zerstörung der  $\beta$ -Zellen schreitet voran, bis schließlich alle  $\beta$ -Zellen untergegangen sind (Endstadium). Im Verlauf der Erkrankung lassen sich immer mehr Inseln in die letzte Kategorie einordnen (Foulis *et al.* 1986). Interessanterweise ist die Destruktion auf die  $\beta$ -Zellen beschränkt, während glucagon-sezernierende  $\alpha$ -Zellen, somatostatin-sezernierende  $\delta$ -Zellen und pankreatisches polypeptid-sezernierende PP-Zellen nahezu vollständig erhalten bleiben (Gepts & De Mey 1978).

Zur klinischen Manifestation der Erkrankung kommt es nicht sofort mit dem Beginn der  $\beta$ -Zelldestruktion, sondern erst wenn 80 % der insulinproduzierenden Zellen untergegangen sind (Gillespie 2006).

### ***Die NOD Maus***

Die „*non obese diabetic*“ (NOD) Maus gilt als klassisches Tiermodell für den T1DM. Die Arbeitsgruppe von Makino entwickelte den NOD Stamm in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts. Die Entwicklung des NOD Stammes erfolgte während der Etablierung des für die Entwicklung einer Katarakt suszeptiblen CTS („*Cataract Shionogi*“) Stammes, der aus dem Auszuchtstamm Jcl : ICR ingezüchtet wurde (Makino *et al.* 1980).

Aus der 6. Generation wurden Tiere selektioniert, die eine hohe Nüchternblutglucose aufwiesen und keine Katarakt entwickelten. Diese Tiere wurden gezielt auf den diabetischen Phänotyp gezüchtet und der Stamm wurde NON/Shi („*non obese normal*“) bezeichnet. Aus der 13. Generation des NON/Shi Stammes wurden Tiere mit normalen Blutglucosewerten selektio-

niert und weiter ingezüchtet. In der 20. Generation wurde bei einem Tier ein spontan auftretender T1DM festgestellt. Dessen Nachkommen wurden als NOD Stamm weiter ingezüchtet (Ikegami & Makino 2001).

Die Inzidenz des T1DM beträgt bei den weiblichen Tieren 60 – 80 % und bei den männlichen Tieren 20 – 30 % (Kikutani & Makino 1992). Der Diabetes manifestiert sich bei den weiblichen Tieren zwischen der 12. und 14. Woche und bei den männlichen Tieren etwas später. Die Symptome entsprechen denen des Menschen: Hyperglykämie, Polyurie, Polydipsie, Ketonurie, Glucosurie usw. (Makino *et al.* 1980). Bereits nach 3 bis 4 Wochen zeigen sich bei beiden Geschlechtern entzündliche Infiltrate, die die Langerhansschen Inseln umgeben (Periinsulitis).

Die Insulitis kann zum T1DM führen, muss aber nicht. Das zeigt sich vor allem darin, dass die männlichen Tiere im Alter von etwa 30 Wochen zu 100 % eine Insulitis aufweisen aber nur 20 – 30 % der Tiere erkranken (Makino *et al.* 1981).

Darüber hinaus neigen die NOD Tiere zu lymphozytären Infiltrationen in anderen Organen wie Nervenzellen, Schilddrüse und Speicheldrüsen (Hu *et al.* 1992; Many *et al.* 1996; Solomon *et al.* 2001). Diese extrapankreatischen Infiltrationen werden beim humanen T1DM nicht gefunden.

### **1.1.3 Diabetes mellitus Typ 2**

Der Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) stellt die häufigste Diabetes-Form dar. Er führt selten zu schweren Stoffwechselentgleisungen aber häufig zu schwerwiegenden Komplikationen wie Angio- und Neuropathien und deren Folgeerkrankungen (z. B. Nierenversagen, Erblindung oder Wundheilungsstörungen) (Kerner *et al.* 2004). Der T2DM tritt vor allem im höheren Lebensalter auf und weist einen Häufigkeitsgipfel zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr auf (Hauner *et al.* 2003).

Der Pathomechanismus für die Entstehung des T2DM beruht auf einer gestörten Insulinsekretion (Cederholm & Wibell 1985) und/oder einer Insulinresistenz (Banerji & Lebovitz 1989; Lillioja *et al.* 1993) die durch Störungen der unter 1.3 beschriebenen Signalkaskaden hervorgerufen werden. Im Gegensatz zum T1DM kommt es beim T2DM nicht zu einer autoimmunen Zerstörung der  $\beta$ -Zellen. Die Symptome des T2DM sind dem T1DM jedoch ähnlich: Polyurie, Polydipsie und gesteigerte Müdigkeit.

Beim T2DM gibt es eine starke genetische Komponente, wobei es sich hierbei um eine polygene Erkrankung handelt. Das Lebenszeitrisiko für T2DM beträgt 7 %. Ist ein Elternteil an T2DM erkrankt, erhöht sich das Lebenszeitrisiko auf 40 %. Sind beide Eltern erkrankt, steigt das Lebenszeitrisiko auf 70 % (Majithia & Florez 2009). Zurzeit sind 20 Genvariationen bekannt, die mit dem T2DM assoziiert sind. Viele der bisher bekannten Genloci scheinen die Kapazität der  $\beta$ -Zellen zu regulieren, die für eine Steigerung der Insulinsekretion bei sich einstellender Insulinresistenz wichtig sind (Ridderstrale & Groop 2009). Es sind jedoch auch monogene Diabetes-Formen bekannt, wie der „*maturity onset diabetes of the young*“ (MODY). Der MODY ist eine Variante des T2DM der bereits bei Kindern und jungen Erwachsenen < 25 Jahren auftritt (Majithia & Florez 2009).

## 1.2 Mitochondrien

### 1.2.1 Aufbau

Mitochondrien sind Zellorganellen, die für zahlreiche Funktionen in eukaryotischen Zellen essentiell sind (Reichert 2007). Mitochondrien sind ca. 1  $\mu\text{m}$  dick und haben eine variable Länge. Sie sind von zwei hochspezialisierten Membranen umgeben, einer inneren und einer äußeren Membran. Dadurch werden sie in zwei Kompartimente eingeteilt. Zwischen der inneren und der äußeren Membran befindet sich der Intermembranraum und im Inneren befindet sich die mitochondriale Matrix (Logan 2006).

Die äußere Membran besitzt Porine, die eine Art Transportkanal darstellen, so dass die äußere Membran für eine Reihe von Molekülen und Ionen permeabel ist, z. B. NAD, ATP und Coenzym A. Die innere Mitochondrienmembran ist nahezu undurchlässig, so dass für fast alle Moleküle und Ionen spezielle Transportsysteme benötigt werden. Desweiteren ist die innere Membran in zahlreiche Cristae gefaltet, die zu einer Vergrößerung der Oberfläche führen. Darüber hinaus verfügt sie über die Komplexe der Atmungskette und das Ubichinon. Außerdem enthält sie die Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus sowie Adeninnukleotidtranslokasen (ANTs) und weitere Transportsysteme. Im Intermembranraum befindet sich das Hämprotein Cytochrom c, das bei Beschädigung der äußeren Membran ins Zytosol freigesetzt wird und dort eine Caspasen-Kaskade aktiviert, die zur Apoptose führt. Das Cytochrom c ist jedoch auch ein wichtiger Bestandteil der Atmungskette. In der Matrix sind viele Proteine lokalisiert, wie die Enzyme des Citratzyklus, der Fettsäure-Oxidation, des Abbaus von Keto- und Aminosäuren sowie einige Enzyme der Hämsynthese. Desweiteren befinden sich auch die mitochondriale DNA, rRNAs, tRNAs und einige Ribosomen in der Matrix, so dass Mitochondrien in der Lage sind, einen Teil ihrer Proteine eigenständig zu synthetisieren (Löffler *et al.* 2006).

### 1.2.2 Oxidative Phosphorylierung

Die Atmungskette besteht strenggenommen aus vier Komplexen, die sich in der inneren Mitochondrienmembran befinden. Zur oxidativen Phosphorylierung ist ein weiterer Proteinkomplex der inneren Membran, die ATP-Synthase (ATPase), notwendig. Die ATPase wird in der Literatur häufig, wie auch in der vorliegenden Arbeit, mit zur Atmungskette gezählt und dann

als Komplex V bezeichnet. Darüber hinaus gehören das Cytochrom c und das Ubichinon zu den Bestandteilen der Atmungskette (Karp 2006).

Der Komplex I (NADH-Dehydrogenase) ist der erste und größte Proteinkomplex der Atmungskette. Dieser Komplex besteht aus 45 Untereinheiten und mindestens sieben Eisen-Schwefel-Zentren (Karp 2006). Die NADH-Dehydrogenase oxidiert das aus verschiedenen Abbauvorgängen hervorgegangene  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und überträgt das Elektronenpaar auf Ubichinon, das dadurch zu Ubihydrochinon reduziert wird. Dieser Prozess ist mit einer Translokation von vier Protonen von der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum assoziiert, so dass ein elektrochemischer Gradient entsteht (da Fonseca *et al.* 2008).

Der Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) ist der kleinste Komplex der Atmungskette und besteht aus vier Untereinheiten sowie drei Eisen-Schwefelzentren. Die Succinat-Dehydrogenase der Atmungskette ist gleichzeitig die Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus und überträgt die Elektronen, die bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat auf  $\text{FADH}_2$  übertragen werden, auf Ubichinon. Auf diese Weise besteht eine direkte Verbindung zwischen Citratzyklus und Atmungskette (Karp 2006). Mit der Elektronenübertragung des Komplexes II ist keine Protonentranslokation assoziiert (Dudkina *et al.* 2009).

Der Komplex III (Cytochrom b) katalysiert durch den Q-Zyklus die Elektronenübertragung von Ubihydrochinon auf Cytochrom c. Ubihydrochinon gibt an der matrixfernen Seite des Komplexes III ein Elektron über Eisen-Schwefel-Zentren und Cytochrom  $c_1$  an Cytochrom c weiter. Ein weiteres Elektron wird über die Hämproteine  $b_H$  und  $b_L$  auf ein Ubichinon oder Ubisemichinon an der matrixnahen Seite des Komplexes III übertragen. Das jeweilige Cytochrom c Molekül kann jeweils nur ein Elektron aufnehmen. Für die Reduktion des Ubichinons an der matrixnahen Seite werden jedoch zwei Elektronen benötigt, so dass der Q-Zyklus zweimal nacheinander ablaufen muss, bis ein Molekül Ubihydrochinon regeneriert ist. Die Elektronenübertragung auf Cytochrom c ist mit der Translokation von vier Protonen in den Intermembranraum gekoppelt (Crofts *et al.* 2008; da Fonseca *et al.* 2008).

Der Komplex IV (Cytochrom c Oxidase) ist die letzte Station der Elektronentransportkette. Hier werden vier reduzierte Cytochrom c Moleküle nacheinander oxidiert und die Elektronen auf  $\frac{1}{2} \text{O}_2$  übertragen, so dass  $\text{H}_2\text{O}$  entsteht (Belevich *et al.* 2006). Die Reaktionen des Komplexes IV sind ebenfalls mit dem Transport von Protonen in den Intermembranraum verbunden (Dudkina *et al.* 2009).

Der Protonengradient, der durch die Protonentranslokationen entstanden ist, wird von dem Komplex V (ATPase) genutzt, um ATP zu synthetisieren. Die ATPase besteht aus zwei Komponenten, dem  $F_1$ - und dem  $F_0$ -Teil. Der  $F_1$ -Teil besteht aus fünf Polypeptiden mit dem Ver-

hältnis  $3\alpha:3\beta:1\delta:1\gamma:1\varepsilon$  wobei jede  $\beta$ -Untereinheit ein katalytisches Zentrum besitzt. Während die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten kreisförmig angeordnet sind und den kugelförmigen Kopf der ATPase bilden, stellt die  $\gamma$ -Untereinheit die zentrale Achse dar, die sich von  $F_1$  bis  $F_0$  durch das Zentrum des Proteins erstreckt. Die  $\varepsilon$ -Untereinheit sorgt ebenfalls dafür, dass die  $\gamma$ -Untereinheit mit der  $F_0$ -Basis verbunden ist. Die an die innere Membran assoziierte  $F_0$ -Komponente besteht aus drei Polypeptiden mit dem Verhältnis  $1a:2b:10-14c$ . Die  $c$ -Untereinheiten bilden in der Membran einen rotierenden Ring. Die beiden  $b$ -Untereinheiten bilden zusammen mit der  $\gamma$ -Untereinheit eine periphere Achse, die die  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten in einer bestimmten Position fixiert. Die  $a$ -Untereinheit der  $F_0$ -Komponente enthält einen Protonenkanal durch den die Protonen zurück in die Matrix strömen können (Karp 2006). Um die Protonenpassage mit der ATP-Synthese zu koppeln, sind Konformationsänderungen der ATPase notwendig. Für den Rücktransport in die Matrix gelangt ein Proton aus dem Intermembranraum in die  $a$ -Untereinheit und bindet zwischen zwei  $c$ -Untereinheiten. Damit das Proton den Kanal wieder verlassen kann, müssen die  $c$ -Untereinheiten rotieren. Da die  $\gamma$ -Untereinheit sowohl mit der  $c$ -Untereinheit als auch mit den  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten verbunden ist, löst die Rotation ebenfalls eine Drehung der  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten aus (da Fonseca *et al.* 2008). Auf Grund dieser Konformationsänderung rotieren die drei katalytischen Zentren, die ATP aus ADP und  $P_i$  synthetisieren (Karp 2006). Das sich in der Matrix befindende ATP kann dann durch Adennukleotidtranslokasen (ANT) im Austausch mit ADP ins Zytosol transportiert werden (Wallace 2001).

Mitochondrien oxidieren nur dann schnell Substrat, wenn genügend ADP und anorganisches Phosphat zur Verfügung stehen (Atmungskontrolle). Der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien erhöht sich bei ausreichend zur Verfügung stehendem Substrat erst bei der Zugabe von ADP. 1955 hat Britton Chance fünf Fließgleichgewichte der Atmungskette definiert, von denen die Zustände 3 und 4 die wichtigsten sind. Im Zustand 3, dem aktiven Zustand, sind genug Substrat, Sauerstoff, ADP und anorganisches Phosphat vorhanden, so dass die oxidative Phosphorylierung, und damit auch der Sauerstoffverbrauch, bei maximaler Geschwindigkeit ablaufen. Im Zustand 4, dem kontrollierten Zustand, fehlt ADP und limitiert den Sauerstoffverbrauch. In intakten Zellen befinden sich die Mitochondrien entweder im Zustand 3 oder im Zustand 4. Die anderen Zustände spielen daher eine untergeordnete Rolle. Im Zustand 1 limitiert das Fehlen von ADP und Substrat die Atmungsgeschwindigkeit und im Zustand 2 stellt Substratmangel den limitierenden Faktor dar. Im Zustand 5 wird die Atmungsgeschwindigkeit durch das Fehlen von Sauerstoff begrenzt (Chance *et al.* 1955).

Die Rolle der ATP-8 Untereinheit, deren Auswirkungen auf die metabolische Funktion der  $\beta$ -Zellen in dieser Arbeit näher untersucht werden soll, ist noch nicht vollständig geklärt. Bei Hefebakterien scheint sie für die Zusammensetzung der  $F_0$ -Einheit wichtig zu sein (Devenish *et al.* 2000).

### 1.2.3 *Reaktive Sauerstoffspezies*

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind eine Gruppe von hoch energetischen Sauerstoffverbindungen, die aus einer unvollständigen Reduktion von molekularem Sauerstoff hervorgehen. In biologischen Systemen kommen vor allem Superoxide ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxide ( $H_2O_2$ ) und Hydroxylradikale ( $OH\cdot$ ) vor (Kowaltowski *et al.* 2009).

Die mitochondriale Elektronentransportkette reduziert einen Großteil des aufgenommenen Sauerstoffes zu Wasser. Von dem aufgenommenen Sauerstoff führen jedoch 1 – 2 % zur ROS-Entstehung (Chance *et al.* 1979).  $O_2^-$  ist der primäre reaktive Sauerstoffmetabolit, der in den Mitochondrien entsteht, wobei vor allem die Atmungsketten-Komplexe I und III für die ROS-Synthese verantwortlich sind. Im Komplex III werden Elektronen nacheinander von Ubihydrochinon matrixfern auf Cytochrom c übertragen oder über Hämproteine matrixnah auf Ubichinon übertragen. Dabei entsteht auf beiden Seiten der inneren Mitochondrienmembran als Zwischenschritt Ubisemichinon, das stark reduzierend wirkt. Auf diese Weise kann es zur Übertragung eines einzelnen Elektrons auf Sauerstoff kommen und damit zur Bildung von  $O_2^-$ . Neben dem Komplex III stellt auch der Komplex I eine ROS-Quelle dar, wobei die ROS-Synthese an zwei verschiedenen Stellen erfolgen kann. Zum einen wird im Komplex I, wie auch im Komplex III, eine sukzessive Elektronenübertragung auf Ubichinon mit der vorübergehenden Bildung eines Ubisemichinons für die ROS-Entstehung verantwortlich gemacht. Zum anderen kann auch die sukzessive Elektronenübertragung vom Coenzym FMN auf die Eisen-Schwefel-Zentren des Komplexes I zur ROS-Entstehung führen (Kowaltowski *et al.* 2009).

Superoxid ist ein reaktives Molekül, kann aber durch die Superoxid-Dismutase (SOD), die sich sowohl in der mitochondrialen Matrix (Mn-SOD) als auch im Intermembranraum (Cu/Zn-SOD) befindet, in das stabilere  $H_2O_2$  überführt werden (Weisiger & Fridovich 1973).  $H_2O_2$  hat mehrere mögliche Schicksale. Es kann durch die Glutathion-Peroxidase, Thioredoxin-Peroxidase oder durch die Katalase entfernt werden. Es kann aber auch Proteine, Lipide und Nukleinsäuren direkt schädigen, wenn die antioxidativen Systeme nicht suffizient sind.

Darüber hinaus kann es in der Anwesenheit von Eisen-Ionen durch die Fenton-Reaktion in das sehr reaktive Hydroxylradikal ( $\text{OH}\cdot$ ) überführt werden. Das  $\text{OH}\cdot$  kann Lipid-Peroxidationskaskaden aktivieren, die z. B. Lipide der Zellmembranen schädigen und damit schwere Störungen der gesamten Zelle hervorrufen (Brand *et al.* 2004).

Wie bereits erwähnt, verfügen Zellen und Mitochondrien über antioxidative Schutzsysteme, die ROS abbauen und vor oxidativem Stress schützen. Allerdings sind Zellen und Mitochondrien der einzelnen Gewebe mit unterschiedlich ausgeprägten Schutzsystemen ausgestattet, so dass einige Gewebe empfindlicher auf oxidativen Stress reagieren als andere (Johnson *et al.* 2007; Santiago *et al.* 2008).

Eine weitere Schutzmöglichkeit vor oxidativem Stress bietet das Entkoppeln der Atmung von der ATP-Synthese durch sogenannte „*uncoupling proteins*“ (UCPs). Neben dem Protonenkanal der ATPase können die Protonen durch ein „Loch“ in der inneren Mitochondrienmembran wieder zurück in die Matrix gelangen. Diese „Löcher“ stellen die UCPs dar (Rousset *et al.* 2004). Das am besten untersuchte UCP, das UCP 1, befindet sich ausschließlich in Adipozyten des braunen Fettgewebes. Dort sorgt der Protonen-Rückstrom für Thermogenese (Nicholls & Locke 1984). Inzwischen sind weitere UCPs bekannt, wie das UCP 2, das in vielen Geweben vorkommt, und das UCP 3, das vor allem im Skelettmuskel exprimiert wird. Die Aktivierung von UCP 2 und UCP 3 führt zur Entkopplung von Respiration und ATP-Synthese, jedoch nicht zur Thermogenese. Es ist bekannt, dass eine solche Entkopplung die ROS-Bildung in den Komplexen I und III reduziert. Die ROS-Synthese ist vom Potential der inneren Mitochondrienmembran abhängig, das durch den Protonengradienten entsteht bzw. aufrechterhalten wird. Durch die Entkopplung wird über den Abbau des Protonengradienten das Membranpotential gesenkt und damit auch die ROS-Entstehung (Rousset *et al.* 2004).

#### **1.2.4 Das mitochondriale Genom**

Mitochondrien verfügen über ein eigenständiges Genom. Die mitochondriale DNA (mtDNA) ist ein doppelsträngiges und zirkuläres Molekül. Die mtDNA hat beim Menschen eine Größe von 16,6 kb und codiert für 37 Gene. Diese Gene codieren für 22 tRNAs, 2 rRNAs und 13 Untereinheiten der Atmungsketten-Komplexe (Curran *et al.* 2007). Zu den 13 mitochondrial codierten Untereinheiten gehören sieben Untereinheiten des Komplexes I (Nd 1 – 4, 4L, 5 und 6), die Cytochrom b Untereinheiten des Komplexes III, drei Untereinheiten des Komplexes IV sowie zwei Untereinheiten der ATPase (ATP 6 und 8) (da Fonseca *et al.* 2008).

Die Mehrzahl der mitochondrialen Proteine wird von der nukleären DNA (nDNA) codiert, im Zytosol synthetisiert und ins Mitochondrium transportiert (Schapira 2006).

Das mitochondriale Genom besteht nur aus codierenden Abschnitten (Exons) und besitzt keine Histone. Es befindet sich in der mitochondrialen Matrix und besitzt nur unzureichende Fehlererkennungs- und Reparaturmechanismen. Daher ist der schädigende Einfluss der entlang der benachbarten Atmungskette entstehenden ROS sehr groß, was sich in einer 10 bis 20fach erhöhten Mutationsrate gegenüber der nDNA bemerkbar macht (Jacksch-Angerer *et al.* 1999).

Variationen innerhalb des mitochondrialen Genoms spielen eine wichtige Rolle bei der Suszeptibilität einiger Erkrankungen, z. B. neurodegenerative Erkrankungen, Diabetes mellitus oder Krebs (Curran *et al.* 2007). Eine weitere Besonderheit der mtDNA besteht darin, dass sie sich kontinuierlich repliziert. Die Replikation findet unabhängig von der Replikation der nDNA oder der Zellteilung statt (Schapira 2006).

### **1.2.5 Mitochondriale Krankheiten**

Mitochondrien sind für das Überleben eukaryotischer Zellen essentiell. Sie unterstützen den aeroben Stoffwechsel, generieren Energie und haben wichtige Signalfunktionen. Folglich sind Veränderungen der mitochondrialen Proteine, hervorgerufen durch Mutationen der mitochondrialen oder auch nukleären DNA, mit einer veränderten Funktionsweise der Mitochondrien assoziiert. Mitochondriale Mutationen sind 10 bis 20mal häufiger als nukleäre Mutationen. Am häufigsten werden Mutationen der mtDNA durch ROS verursacht, die in der Atmungskette entstehen. Ob die Mutation zur Erkrankung führt, ist abhängig vom prozentualen Anteil der mutation-tragenden Mitochondrien der Zelle (Schon *et al.* 1997). Da die Mutationen mit Abweichungen der oxidativen Phosphorylierung einhergehen, machen sich diese Veränderungen vor allem in Geweben mit hohem Energiebedarf bemerkbar, z. B. ZNS, Skelettmuskel, Herz, Auge, Ohr und Endokrinum (Johns 1995).

Beim Menschen sind vor allem Deletionen und Punktmutationen bei mitochondrialen Genomvariationen beschrieben. Deletionen waren die ersten beschriebenen mtDNA-Veränderungen (Holt *et al.* 1988). Die beim Menschen häufigste Deletion ist 5 kb lang und befindet sich in der Region zwischen den Genen für Cytochrom b und der Untereinheit 2 des Komplexes IV. Sie ist mit bestimmten Erkrankungen assoziiert, wie der chronisch progredienten Ophthalmoplegie, dem Kearns-Sayre-Syndrom und dem Pearson-Syndrom (Schapira 2006).

Es sind mehr als 100 Punktmutationen in protein-codierenden Genen sowie in den Genen für tRNAs und rRNAs bekannt. Ihr klinisches Bild ist mannigfaltig und beinhaltet Syndrome wie z. B. das MERRF-Syndrom (myoklone Epilepsie mit „*ragged red fibres*“), das MELAS-Syndrom (mitochondriale Enzephalopathie, Laktatazidose und schlaganfall-ähnlichen Episoden) und die Lebersche hereditäre Optikusneuropathie (LHON). Durch Punktmutationen können auch oligosymptomatische Krankheitsbilder ausgelöst werden, wie Diabetes mellitus, Kardiomyopathie oder Myopathie (Chinnery 2006).

Eine weitere häufige mtDNA-Mutation betrifft das mt-*tRNA<sup>Leu</sup>*-Gen (Goto *et al.* 1990). Diese Mutation weist eine Vielzahl von klinischen Manifestationen auf. Oftmals ist sie mit dem T2DM assoziiert. Diese Mutation gilt als häufigste bekannte molekulare Ursache für den T2DM und ist für 0,5 – 1 % aller Erkrankungen verantwortlich (Wallace & Lott 2002). Auch mitochondriale Transkriptionsfaktoren können mit Erkrankungen assoziiert sein. Eine Inaktivierung des mitochondrialen Transkriptionsfaktors *Tfam* führte in einem Tiermodell zu erhöhten Blutglucosewerten und gesteigerter Apoptose von  $\beta$ -Zellen (Silva *et al.* 2000).

Es muss beachtet werden, dass ein und dieselbe Mutation zu verschiedenen Erkrankungen führen kann. Das gilt auch umgekehrt: eine bestimmte Erkrankung kann durch verschiedene Mutationen ausgelöst werden (Schapira 2006).

## 1.3 Insulinsekretion und Insulinwirkung

### 1.3.1 Insulinsekretion

Das Pankreas besteht aus einem endokrinen und einem exokrinen Anteil, wobei der endokrine Anteil, die Langerhansschen Inseln, lediglich 1 % der Gesamtmasse ausmacht (Hedeskov 1980). Der exokrine Teil produziert und sezerniert Verdauungsenzyme, während der endokrine Teil Hormone synthetisiert und sezerniert. Die Langerhansschen Inseln bestehen zum Großteil (80 %) aus insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen. Darüber hinaus befinden sich in den Inseln  $\alpha$ -Zellen, die Glucagon synthetisieren,  $\delta$ -Zellen, die Somatostatin synthetisieren und PP-Zellen, die pankreatisches Polypeptid produzieren (Larsson *et al.* 1976). Die Inseln sind gut vaskularisiert, so dass die Hormone schnell ins Blut abgegeben werden können (Hedeskov 1980).

Betazellen haben die Aufgabe die Konzentration insbesondere von Blutglucose aber auch von anderen Sekretagoga zu messen und die Insulinsekretion entsprechend den Bedürfnissen anzupassen. Glucose gelangt über den Glucosetransporter GLUT 1 (Mensch) bzw. GLUT 2 (Nagetier) in die  $\beta$ -Zelle und wird dort durch die Glucokinase phosphoryliert (Wiederkehr & Wollheim 2006). Die Glucokinase gilt als Schlüsselenzym und bestimmt das Ausmaß der sich anschließenden Glykolyse und der Erzeugung von Pyruvat (Matschinsky 1996). Das bei der Glykolyse frei werdende  $\text{NADH} + \text{H}^+$  wird durch mitochondriale Transportsysteme, wie Glycerophosphat- und Malat/Aspartat-Shuttle in die Mitochondrien transportiert, so dass es reoxidiert werden kann. Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse wird nach der Umwandlung in Oxalacetat im Citrat-Zyklus weiter abgebaut. Die im Citrat-Zyklus frei werdenden Reduktionsäquivalente werden in der Atmungskette unter Gewinnung von ATP reoxidiert, so dass das ATP/ADP-Verhältnis ansteigt (Wollheim & Maechler 2002). Dieser Anstieg führt zu einer Inhibition ATP-sensitiver Kaliumkanäle ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ), wodurch die Plasmamembran der  $\beta$ -Zelle depolarisiert wird (Maechler *et al.* 1998). Durch die Depolarisation öffnen sich spannungsabhängige Kalziumkanäle und Kalzium strömt in die  $\beta$ -Zellen. Der erhöhte Kalziumspiegel führt zur Exozytose, ein Prozess, bei dem die Granula, in denen das Insulin gespeichert ist, mit der Plasmamembran fusionieren und Insulin nach extrazellulär abgeben (Rorsman 1997).

### 1.3.2 Insulinwirkung

Trotz diskontinuierlicher Nahrungsaufnahme liegt die Blutglucose beim stoffwechselgesunden Menschen fast immer in einem engen Bereich zwischen 4 und 7 mmol/l. Diese strenge Kontrolle wird durch ein Gleichgewicht zwischen Glucoseaufnahme aus dem Gastrointestinaltrakt in das Blut, Gluconeogenese in der Leber sowie Glucoseaufnahme in die glucosemetabolisierenden Gewebe erhalten (Saltiel & Kahn 2001). In vielen Geweben wird Insulin für die Glucoseaufnahme oder Regulierung von Signalkaskaden benötigt. Man bezeichnet diese Gewebe daher auch als insulinabhängige oder insulinempfindliche Gewebe. Aufgrund der Masse und der Stoffwechselbedeutung machen Skelettmuskulatur, Fettgewebe und Leber den größten Anteil der insulinempfindlichen Gewebe aus (Löffler *et al.* 2006).

Insulin steigert die Glucoseaufnahme in der Muskulatur sowie im Fettgewebe und inhibiert die hepatische Gluconeogenese. Auf diese Weise dient Insulin primär als Regulator der Blutglucosekonzentration. Darüber hinaus stimuliert Insulin das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung. Desweiteren unterstützt Insulin die Speicherung von energiereichen Substraten in Fettgewebe, Leber und Muskulatur (Saltiel & Kahn 2001).

Zellen insulinabhängiger Gewebe verfügen über einen in der Zellmembran lokalisierten Insulinrezeptor. Der Insulinrezeptor besteht aus zwei extrazellulären  $\alpha$ -Untereinheiten und zwei transmembranösen  $\beta$ -Untereinheiten, die über eine Tyrosinkinase-Aktivität verfügen. Durch die Bindung von Insulin an die  $\alpha$ -Untereinheit wird eine Autophosphorylierung der beiden  $\beta$ -Untereinheiten induziert (Chang *et al.* 2004). Diese Autophosphorylierung löst eine Kaskade von intrazellulären Phosphorylierungen aus, die Proteininteraktionen und Enzymaktivitäten regulieren. Substrate des Insulinrezeptors sind vor allem die Insulinrezeptorsubstrate (IRS) 1 und 2 aber auch andere Proteine (Taniguchi *et al.* 2005). Diese aktivierten Substrate aktivieren wiederum weitere Kinasen und initiieren verschiedene Signalwege, die die intrazellulären Wirkungen des Insulins vermitteln. Eine von IRS 1 ausgehende Signalkaskade führt zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Eine durch PI3K vermittelte Signalkaskade aktiviert wiederum die Translokation von GLUT 4 aus intrazellulären Speichern in die Zellmembran. Durch GLUT 4 können Myozyten und Adipozyten Glucose aus dem Blut aufnehmen, so dass die Translokation von GLUT 4 die intrazelluläre Glucoseaufnahme steigert (Youngren 2007).

## 1.4 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit ist es,

1. den Einfluss der Mutation des *mt-Atp-8*-Gens in einem Tiermodell für den Diabetes mellitus Typ 1 zu untersuchen. Hierbei sollte neben der Langzeituntersuchung des autoimmunen Diabetes unter Standardbedingungen auch auf Veränderungen unter metabolischer Belastung (fetteiche Diät) eingegangen werden.
2. die Rolle der Genvariation des *mt-Atp-8*-Gens bezüglich der Suszeptibilität gegenüber metabolischem Stress zu untersuchen. Hierbei sollte insbesondere auf Veränderungen des Glucosemetabolismus unter metabolischem Stress (fetteiche Diät) eingegangen werden.
3. mögliche, durch die Mutation des *mt-Atp-8*-Gens hervorgerufene Veränderungen der mitochondrialen Basisfunktionen zu identifizieren. Dabei sollten sowohl Mitochondrien des für den T1DM suszeptiblen NOD Stammes als auch Mitochondrien des B6 Stammes untersucht werden.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

<b>Material</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma, München
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma, München
Albumin bovine Fraction V pH 7	Serva, Heidelberg
Amplex Red Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Meerschweinchen IgG	Dianova, Hamburg
Antimycin	Sigma, München
Aprotinin	Sigma, München
Araldite (Epoxidharz)	Sigma, München
Beta-Mercaptoethanol	Ferak, Berlin
Biotin	Serva, Heidelberg
Bleicitrat	Sigma, München
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Serva, Heidelberg
Collagenase P	Roche, Mannheim
D-Glucose	Merck, Darmstadt
Diaminobenzidin	Sigma, München
Diethanolamin	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München
Ethylendiaminetetraacetat (EDTA)	Sigma, München
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Sigma, München
Eisessig	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma, München
Hämatoxylin	Roth, Karlsruhe
HCl	Sigma, München
HEPES	Ferak, Berlin
Iod-Lösung	Mundipharma, Limburg
KCl	Sigma, München

Ketamin	Essex, München
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck, Darmstadt
Laktatdehydrogenase	Sigma, München
Leupeptin	Sigma, München
Mannitol	Sigma, München
Meerschweinchen-anti-Insulin-Antikörper	Dako, Hamburg
Methanol	Sigma, München
$\text{MgCl}_2$	Sigma, München
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma, München
Mouse Insulin-ELISA Kit	Mercodia, Uppsala, Schweden
$\text{NaCl}$	Roth, Karlsruhe
$\text{NaCO}_2$	Merck, Darmstadt
NADH	Sigma, München
$\text{NaHCO}_3$	Merck, Darmstadt
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
$\text{NaN}_3$	Sigma, München
Oligomycin	Sigma, München
$\text{OsO}_4$	Merck, Darmstadt
p-Nitrophenylphosphat-Dinatrium	Sigma, München
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Pepstatin	Sigma, München
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, München
phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphoenolpyruvat	Roche, Mannheim
Pierce BCA Kit	Pierce, Rockford, USA
Pyruvatkinase	Sigma, München
Quant-it Pico Green ds-DNA-Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Roti-Histokitt	Roth, Karlsruhe
Roti-Histol	Roth, Karlsruhe
Schweineinsulin	Sigma, München
Schweineserum	Dako, Hamburg
Streptavidin (mit Peroxidase markiert)	Sigma, München
Succinat	Sigma, München

Sucrose	Serva, Heidelberg
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Tween	Roth, Karlsruhe
Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA Kit	Merckodia, Uppsala, Schweden
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
VLE RPMI-1640 Medium	Biochrom, Berlin
Xylazin	Bayer, Leverkusen
Ziege-anti-Maus IgG	Sigma, München

### Geräte

### Bezugsquelle

Bulldog-Klemme gerade 16 mm	Aesculap, Tuttlingen
Bulldog-Klemme gebogen 14 mm	Aesculap, Tuttlingen
Elektronenmikroskop EM 902A	Zeiss, Göttingen
Glucometer Free Style Mini	Abbott, Wiesbaden
Kurzkapillaren (EDTA-beschichtet)	Sarstedt, Nümbrecht
Laborwaage Laboratory LC 620 S	Sartorius, Göttingen
Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Omnican 100 Spritzen	Braun, Melsungen
Omnifix F Spritzen	Braun, Melsungen
Operationsmikroskop	Zeiss, Göttingen
Oxygraph DW 1 Clark-Elektrode	Hansatech, Reutlingen
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pinzette anatomisch	Aesculap, Tuttlingen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Potter Elvehjem	Sigma, München
Präparierschere	Aesculap, Tuttlingen
Stereomikroskop	Zeiss, Göttingen
Sterican Kanülen Gr. 18	Braun, Melsungen
Ultramikrotom Ultracut SWS	Leica, Wetzlar
Wasserbad	GLF, Burgwedel
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg

## 2.2 Tiere und Tierhaltung

Es wurden die Maustämme NOD/LtJ (NOD) sowie die conplastischen Stämme NOD/LtJ-mt<sup>FVB/N</sup> (NODmt<sup>FVB</sup>), C57BL/6J-mt<sup>FVB/N</sup> (B6mt<sup>FVB</sup>) und C57BL/6J-mt<sup>AKR/J</sup> (B6mt<sup>AKR</sup>) untersucht, die sich lediglich an wenigen Stellen im mitochondrialen Genom unterscheiden.

Conplastische Mausstämmen wurden erzeugt, indem die Weibchen des mitochondrialen Donorstammes mit Männchen des gewählten Hintergrundstammes verpaart wurden. Anschließend wurden die weiblichen Nachkommen über zehn Generationen mit Männchen des Empfängerstammes zurückgekreuzt. Die Nachkommen wurden nun als rein conplastisch angesehen und konnten für Untersuchungen genutzt werden.

Das mitochondriale Genom des Stammes B6mt<sup>FVB</sup> und des Stammes B6mt<sup>AKR</sup> sind im mitochondrialen (mt)-*Atp-8*-Gen polymorph.

Die NOD Maus ist ein klassisches Modell für den Diabetes mellitus Typ 1. Die Übertragung des mitochondrialen FVB/N-Genoms auf den NOD/LtJ-Hintergrund diente der Untersuchung des Einflusses dieser mitochondrialen Mutation auf die immunologische Situation des NOD Hintergrundes. Das mitochondriale Genom des Stammes NOD ist gegenüber NODmt<sup>FVB</sup> an drei Stellen polymorph, neben dem mt-*Atp-8*-Gen auch im mt-*Cox-III*-Gen sowie in einem Bereich der mt-*t-rna*<sup>Arg</sup>.

Bei der Mutation des mt-*Atp-8*-Gens handelt es sich um eine Substitution von Guanin gegen Thymin an Position 7778. Daraus resultiert ein Austausch von Aspartat gegen Tyrosin an der Stelle der 5. Aminosäure des N-terminalen Endes der ATP-8 Untereinheit.

Alle Tiere stammten aus der Zentralen Tierhaltung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock. Die Tiere erhielten, wenn nicht anders vermerkt, ein kommerzielles, pelletiertes Alleinfuttermittel und Wasser ad libitum. Die Raumtemperatur betrug  $20 \pm 2$  °C bei einer Luftfeuchtigkeit von  $50 \pm 5$  %. Der Hell- Dunkelzyklus betrug jeweils zwölf Stunden und die Tiere waren frei von Viren und anderen Krankheitserregern (nach FELASA-Richtlinien).

Alle Tierversuche wurden von der Bezirksregierung Rostock genehmigt (Antragsnummer LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-008/09).

## 2.3 Lipidbelastungsstudie

Um zu untersuchen, ob Lipotoxizität die Funktion der pankreatischen  $\beta$ -Zellen von normoglykämischen B6mt<sup>FVB</sup>, B6mt<sup>AKR</sup>, NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren beeinflusst, erhielten die Tiere über zwölf Wochen eine fettreiche Diät (60 % cal aus Fett) oder eine fettarme Kontrolldiät (10 % cal aus Fett). Die Lipidbelastungsstudie begann in der 4. Lebenswoche der Tiere und endete in der 16. Lebenswoche. Die Tiere wurden jeweils zu viert in einem Käfig gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

Am Ende der Lipidbelastungsstudie wurden Serumproben zur Bestimmung der Seruminsulinspiegel von einer Kohorte (n = 5 – 10) entnommen, der zuvor 4 bis 6 Stunden das Futter entzogen wurde. Eine andere Kohorte (n = 4) wurde für Untersuchungen zur Glucosetoleranz und zur Insulinsensitivität genutzt (s. Kap. 2.3.3). Eine weitere Kohorte (n = 4) wurde für die ex vivo stimulierte Insulinsekretion (s. Kap. 2.3.5) verwendet. Bei einer letzten Kohorte (n = 6) wurden die Pankreata zur histologischen Untersuchung entnommen (s. Kap. 2.3.6).

### 2.3.1 Blutentnahmen und Gewichtsbestimmung

#### 2.3.1.1 Blutentnahme aus der Schwanzvene

Die Schwanzspitze der Tiere wurde eingeritzt und eine kleine Menge Blut entnommen.

#### 2.3.1.2 Retrobulbäre Blutentnahme

Die Tiere wurden mit einem Narkosemix (Ketamin 60 % + Xylazin 40 %) narkotisiert. Mit einer EDTA-beschichteten Kurzkapillare wurden die Tiere retrobulbär entblutet. Diese Form der Blutentnahme wurde nur vor der Isolation der pankreatischen Inseln durchgeführt.

#### 2.3.1.3 Bestimmung des Körpergewichtes

Das Körpergewicht der Tiere für die Lipidbelastungsstudie wurde wöchentlich mit einer Laborwaage bestimmt.

Für die Untersuchungen zur Auswirkung des mt<sup>FVB</sup>-Hintergrundes auf das Autoimmungeschehen der NOD Maus wurde das Körpergewicht alle zwei Wochen bzw. monatlich bestimmt (s. Kap. 3.1.2).

### **2.3.2 Bestimmung des Insulingehaltes im Serum**

Für die Bestimmung des Seruminsulingehaltes wurden B6mt<sup>FVB</sup>, B6mt<sup>AKR</sup>, NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren unter fettreicher Diät als auch unter fettarmer Diät im Alter von 8 Wochen bzw. 8 und 16 Wochen 50 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen. Die Gruppen bestanden aus 5 bis 10 Tieren.

Die Ermittlung des Insulingehaltes erfolgte mit dem Ultrasensitive Mouse Insulin-ELISA Kit (Mercodia, Schweden). In die jeweiligen Vertiefungen wurden 5 µl der Serumprobe pipettiert und mit 45 µl des mitgelieferten Null-Standards aufgefüllt. Der weitere Versuchsablauf des Insulin-ELISAs entsprach der Anleitung des Herstellers.

### **2.3.3 Glucosetoleranz und Insulinsensitivität**

#### *2.3.3.1 Bestimmung der Blutglucose*

Die Schwanzspitze der Tiere wurde eingeritzt und eine kleine Menge Blut (ca. 0,3 µl) entnommen. Die Messung erfolgte mit dem Glucosemessgerät Free Style Mini nach der Glucoseoxidase-Methode.

Die Blutglucose der Tiere für die Lipidbelastungsstudie wurde wöchentlich gemessen.

Für die Untersuchungen der Auswirkung des mt<sup>FVB</sup>-Hintergrundes auf das Autoimmungeschehen der NOD Maus wurde die Blutglucose wöchentlich bzw. zweimal pro Woche bestimmt (s. Kap. 3.1.1).

Die Tiere wurden als diabetisch angesehen, wenn die Blutglucosekonzentrationen an zwei aufeinanderfolgenden Messungen mehr als 9 mmol/l betragen.

#### *2.3.3.2 Intraperitonealer Glucosetoleranztest*

Die Glucosetoleranz wurde an Tieren im Alter von zwölf Wochen unter fettreicher (60 % cal aus Fett) und fettarmer Diät (10 % cal aus Fett) untersucht. Dazu wurde den Tieren 4 bis 6 Stunden das Futter entzogen und anschließend 1,5 mg Glucose pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die Blutglucose wurde direkt vor der Injektion bestimmt (Zeitpunkt 0) sowie nach 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten. Jede Gruppe bestand aus vier Tieren.

### 2.3.3.3 Intraperitonealer Insulinsensitivitätstest

Die Insulinsensitivität wurde an Tieren im Alter von zwölf Wochen unter fettreicher (60 % cal aus Fett) und fettarmer Diät (10 % cal aus Fett) untersucht. Dazu wurde den Tieren 4 bis 6 Stunden das Futter entzogen. Pro Gramm Körpergewicht wurden den Tieren 0,8 U Insulin intraperitoneal injiziert. Die Blutglucose wurde direkt vor der Injektion gemessen (Zeitpunkt 0) sowie nach 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten. Jede Gruppe enthielt vier Tiere.

## 2.3.4 Isolation der pankreatischen Inseln

### 2.3.4.1 Lösungen und Medien

#### A) Collagenase-Lösung

1 mg	Collagenase P
1 ml	PBS

#### B) RPMI-Medium

Standard RPMI-Medium (5 mmol/l Glucose)
10 % FCS
0,1 % Pen-Strep (Penicillin 10.000 U/ml + Streptomycin 10 mg/ml)

### 2.3.4.2 Inselisolation

Nach Betäubung mit einer Narkoselösung (Ketamin 60 % + Xylazin 40 %) wurden dem Tier ein Großteil seines Blutvolumens durch retrobulbäre Blutentnahme entnommen (0,5 – 1 ml). Danach erfolgte die Tötung des Tieres durch zervikale Dislokation. Anschließend wurde das Abdomen kaudomedial durch einen Scherenschnitt durch Haut und Muskulatur eröffnet. Beidseits der Medianen wurde der Schnitt nach lateral erweitert und die entstandenen Lappen nach laterokranial verlagert. Der Darm wurde nach links verlagert, so dass die Aorta sichtbar wurde. Anschließend wurde das Tier durch Aortenpunktion entblutet, die Darmschlingen wieder zurück verlagert und die Papilla duodeni major aufgesucht. Rechts der Papille wurde das Duodenum mit einer geraden Bulldogklemme ligiert, um die Einmündung des Ductus choledochus in das Duodenum zu markieren. Danach wurde der Ductus choledochus distal

der Einmündung der großen Gallengänge mit einer kleineren, gebogenen Bulldog-Klemme unterbunden, um eine spätere Perfusion der Leberlappen zu vermeiden.

Unter einem Operationsmikroskop wurde nun die Papilla duodeni major mit einer Kanüle (0,3 x 12 mm) punktiert und über diese 1 ml Collagenase-Lösung in das Pankreas injiziert. Dabei wurde der Ductus choledochus zusätzlich mit einer anatomischen Pinzette proximal der Kanülenöffnung komprimiert. Anschließend wurde das infundierte Organ entnommen und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Der Verdau erfolgte bei 37 °C über 7 bis 11 Minuten. Dabei wurde das Pankreas erstmals nach fünf Minuten für wenige Sekunden leicht geschwenkt und das Schwenken alle zwei Minuten wiederholt. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurde der Verdau durch kurzes, kräftiges Schütteln per Hand (etwa 30 Sekunden) und Auffüllen des Gefäßes mit 14 ml des vorbereiteten, eiskalten RPMI-Mediums abgestoppt. Da die verwendete Collagenase P unterschiedliche Aktivität aufwies, ergab sich die genaue Dauer der Inkubation aus den Erfahrungen vorangegangener Versuche.

Das Pankreas wurde anschließend zweimal gewaschen, in dem es jeweils zwei Minuten bei 1000 rpm (Raumtemperatur) zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in eiskaltem, vorbereitetem RPMI-Medium resuspendiert.

Nach dem Waschen wurde das angedaute Gewebe in eine Petrischale überführt. Unter einem Stereomikroskop wurden nun die Inseln zügig herauspipettiert und von noch anhaftendem Gewebe befreit. Dabei wurden sie dreimal mit eiskaltem, vorbereitetem RPMI-Medium gewaschen. Zum Schluss wurde den isolierten Inseln vorbereitetes RPMI-Medium zugefügt und die Inseln 24 Stunden zur Regeneration bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.3.5 *Ex vivo Stimulation der isolierten Pankreasinseln*

#### 2.3.5.1 *Lösungen*

##### *A) Krebs-Ringer-Stammlösung (KR-Stammlösung)*

120 mM	NaCl
4,7 mM	KCl
1,2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,2 mM	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O
2,9 mM	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O

*B) Krebs-Ringer-Komplettlösung (KR-Komplettlösung)*

250 ml	KR-Stammlösung
0,596 g	HEPES
0,105 g	NaHCO <sub>3</sub>
1,25 g	BSA
pH 7,4	

*C) Krebs-Ringer-Lösungen (KR-Lösungen)*

KR-Komplettlösung + KCl 40 mM
KR-Komplettlösung + Glucose 16,7 mM
KR-Komplettlösung + Glucose 2,8 mM

*2.3.5.2 Ex vivo Stimulation*

Die ex vivo Stimulation wurde an 16 Wochen alten, normoglykämischen B6mt<sup>FVB</sup>, B6mt<sup>AKR</sup>, NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren unter fettreicher als auch unter fettarmer Diät durchgeführt.

Die am Vortag isolierten Inseln wurden zunächst zweimal durch 30-minütige Inkubation in KR-Komplettlösung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gewaschen. Anschließend wurden unter einem Stereomikroskop jeweils 20 Inseln pro Vertiefung in eine 24-Well-Platte pipettiert und die Inseln wiederum eine Stunde mit KR-Komplettlösung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Inseln mit den KR-Lösungen zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation mit 2,8 mM Glucose diente als substimulatorische Kontrolle. Nach zwei Stunden wurden die Inseln von der KR-Lösung durch Zentrifugieren getrennt und der Überstand bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Die Inseln wurden einmal mit KR-Stammlösung gewaschen. Mit Hilfe von Ultraschall wurden die Zellen zerstört, um in einem weiteren Versuch den Insulingehalt der Zellen zu ermitteln. Anschließend wurden die Zellen bei -20 °C gelagert.

*2.3.5.3 Bestimmung des Insulingehaltes*

Die Menge des sezernierten Insulins im Überstand sowie der Insulingehalt der Zellen wurde mittels Mouse Insulin-ELISA Kit (Merckodia, Schweden) bestimmt und dabei nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Bestimmung des Insulingehaltes erfolgte mittels der Cubic-spline Regression des Programms Graph Pad Prism.

#### 2.3.5.4 Bestimmung des ds-DNA-Gehaltes

Die Bestimmung des ds-DNA-Gehaltes der Inseln erfolgte, um den Insulingehalt des Überstandes und der Pankreasinseln direkt vergleichen zu können, da die Inselgröße differierte.

Die Bestimmung des ds-DNA-Gehaltes erfolgte mit dem Quant-it Pico Green ds-DNA-Kit (Invitrogen, Karlsruhe). Die zu untersuchenden Substanzen und Standardlösungen wurden mit definierter Konzentration auf eine unbeschichtete Mikrotiterplatte aufgetragen. Anschließend wurde ein Fluoreszenzfarbstoff (Picogreen) hinzugefügt, der spezifisch an ds-DNA bindet. Nach vier Minuten Inkubationszeit wurde die Intensität der Fluoreszenz photometrisch ermittelt (Anregung bei 485 nm, Emission bei 535 nm).

### 2.3.6 Histologische Untersuchungen

#### 2.3.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

##### **Lösungen**

##### *A) Hämatoxylin-Lösung*

Hämatoxylin wurde 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

##### *B) Eosin-Lösung*

200 ml 0,5 % Eosin-Lösung wurden mit 2 bis 3 Tropfen Eisessig versetzt.

##### *C) Salzsaurer Ethanol*

200 ml 60 % Ethanol wurden mit 20 Tropfen konzentrierter Salzsäure versetzt.

##### **Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Zur histomorphologischen Beurteilung wurden die formalinfixierten Pankreata in Paraffin eingebettet, 5 µm dicke Schnitte angefertigt und nach Fixation mittels Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

Dafür wurden die Schnitte zunächst mit Roti-Histol (Xylol-Ersatz) entparaffinisiert und in absteigender Ethanolreihe rehydriert (jeweils fünf Minuten zweimal 96 % Ethanol, 80 % Ethanol und 60 % Ethanol). Anschließend wurden die Präparate fünf Minuten in Aqua dest.

gewaschen und danach für 25 Minuten in Hämatoxylin-Lösung inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Schnitte in lauwarmem Leitungswasser gespült und für 30 Minuten in salzsaurem Ethanol inkubiert. Danach wurden die Schnitte 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Es folgte die Dehydrierung in aufsteigender Ethanolreihe bis zum Roti-Histol. Dafür wurden die Präparate nur kurz in die unterschiedlich konzentrierten Ethanol-Lösungen eingetaucht (60 % Ethanol, 80 % Ethanol, zweimal 96 % Ethanol), anschließend in Roti-Histol überführt und fünf Minuten inkubiert. Die Roti-Histol-Inkubation wurde einmal für zehn Minuten wiederholt. Danach wurden die Schnitte mit Roti-Histokitt eingedeckt.

### 2.3.6.2 Immunhistochemie

Um zu untersuchen, ob sich unter Lipidbelastung die Morphologie der pankreatischen Inseln verändert und, ob sich die fettreiche Diät auf die Ausprägung der Insulitis auswirkt, wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt.

Dafür wurden den nach Betäubung durch zervikale Dislokation getöteten Tieren die Pankreata entnommen und in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Gewebeproben in Paraffin eingebettet und in 4 – 5  $\mu\text{m}$  dünne Scheiben geschnitten und auf Objektträger fixiert. In der Folge wurde die endogene Peroxidase mit 0,3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Methanol blockiert. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen mit den Antiseren, wurden die Gewebsschnitte mit Schweineserum behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Meerschweinchen-anti-Insulin-Antikörper (1:500) als ersten Antikörper und danach mit Anti-Meerschweinchen-IgG (1:100) als zweiten Antikörper. Der Komplex aus Biotin und Peroxidase-markierten Streptavidin diente dem Nachweis der spezifischen Antikörperbindung. Anschließend wurden die Peroxidasmoleküle mit Diaminobenzidin und 0,002 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 0,15 M PBS (pH 7,4) gefärbt. Die Zahl der Inseln wurde in randomisiert und blind ausgewählten Blickfeldern ermittelt. Die Größe der Inseln wurde mit Hilfe *Image J Software* gemessen. Es wurden die Pankreata von normoglykämischen  $\text{B6mt}^{\text{FVB}}$ ,  $\text{B6mt}^{\text{AKR}}$ ,  $\text{NODmt}^{\text{FVB}}$  und NOD jeweils unter fettreicher als auch unter fettarmer Diät untersucht. Pro Genotyp und Diät wurden zweimal vier Blickfelder ausgewertet.

### 2.3.6.3 Elektronenmikroskopie

#### *Natrium-Phosphat-Puffer*

0,2 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,2 M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
pH 7,2	

#### *Elektronenmikroskopie*

Um zu untersuchen, ob sich die Lipidbelastung auf die Morphologie der Mitochondrien im Pankreas auswirkt, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Dafür wurden den nach Betäubung durch zervikale Dislokation getöteten Tieren die Pankreata entnommen und mit 4 % Glutaraldehyd in 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer für eine Stunde fixiert. Anschließend wurden Gewebeblöcke präpariert, in PBS gewaschen und in 1 % OsO<sub>4</sub> für eine Stunde fixiert. Danach wurden die Präparate mit Alkohol entwässert und in *Araldite* (Epoxidharz) eingebettet. Mit dem Ultramikrotom *Ultracut SWS* wurden ultradünne Schnitte angefertigt. Diese wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat angefärbt und mit dem Elektronenmikroskop *EM 902 A* untersucht.

In den randomisiert und blind ausgewählten Blickfeldern mit einer Größe von 13 μm<sup>2</sup> wurde die Anzahl der Mitochondrien gezählt und die Größe mit *Image J Software* ausgemessen.

Es wurden acht Blickfelder pro Genotyp und Diät (ca. 80 Mitochondrien) analysiert.

## 2.4 Auswirkungen des $mt^{FVB}$ -Hintergrundes auf das Autoimmungeschehen der NOD Maus

Für diese Studie wurden NOD und  $NODmt^{FVB}$  Tiere über einen Zeitraum von 36 Wochen beobachtet (4. bis 40. Lebenswoche).

### 2.4.1 Bestimmung der Insulin-Autoantikörper

Alle zwei Wochen wurde Serum von NOD und  $NODmt^{FVB}$  auf Insulin-Autoantikörper untersucht. Dafür wurden 50  $\mu$ l Blut aus der Schwanzvene entnommen (s. Kap. 2.3.1.1).

Die Blutentnahme erfolgte zwischen der 12. und 32. Lebenswoche alle zwei Wochen. Das Serum wurde abzentrifugiert und bis zur späteren Analyse bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.4.1.1 Substratpuffer

1 mmol/l	Diethanolamin
3 mmol/l	$\text{NaN}_3$
0,5 mmol/l	$\text{MgCl}_2$

#### 2.4.1.2 Ermittlung des Insulin-Autoantikörper-Gehaltes

Die Bestimmung des Insulin-Autoantikörper-Gehaltes aus dem Serum erfolgte nach der Methode von Bonifacio (Bonifacio *et al.* 2001).

Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit Schweine-Insulin (1  $\mu\text{g/ml}$ ) sowie Beschichtungspuffer (0,05 mM  $\text{NaHCO}_3/\text{NaCO}_2$ ) inkubiert (coating). Nicht gebundene Insulinmoleküle wurden nach der Inkubation mit PBS-0,05 % Tween ausgewaschen. Anschließend wurden die Vertiefungen mit 200  $\mu$ l PBS-0,05 % Tween gefüllt, um freie Bindungsstellen am Plattenmaterial zu besetzen (blocking). Wiederum erfolgte nach der Inkubation das Auswaschen der nicht gebundenen Substanzen mit PBS-0,05 % Tween. Nun wurden 100  $\mu$ l der zehnfach verdünnten Serumproben in die Vertiefungen pipettiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. So konnten die Insulin-Autoantikörper an den auf der Platte fest verankerten Insulinmolekülen binden. Danach wurden die Platten fünfmal mit PBS-0,05 % Tween gewaschen. Um die Antikörperkonzentration zu messen, wurde ein mit alkalischer Phosphatase-konjugierter Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper auf die Mikrotiterplatten aufgetra-

gen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten fünfmal mit PBS-0,05 % Tween gewaschen. Danach wurde das in Substratpuffer gelöste p-Nitrophenylphosphat-Dinatrium hinzugegeben. Dieses Substrat wurde durch die am zugefügten Antikörper gebundene alkalische Phosphatase in einer Farbreaktion umgesetzt. Die Platten wurden photometrisch bei 405 nm analysiert.

## 2.5 Untersuchungen der Auswirkungen des $mt^{FVB}$ -Genotyps auf mitochondriale Funktionen

### 2.5.1 Mitochondrien-Isolation aus Leber und Milz

#### 2.5.1.1 Mitochondrien-Isolation aus der Milz

##### *Puffer*

##### *A) Isolationspuffer*

0,2 mM	EDTA
0,25 M	Sucrose
10 mM	Tris-HCl pH 7,8
1 $\mu$ g/ml	Leupeptin
1 $\mu$ g/ml	Pepstatin A
0,3 mM	PMSF

##### *B) EDTA/MSH-Puffer*

210 mM	Mannitol
70 mM	Sucrose
5 mM	HEPES
1 mM	EDTA

##### *Mitochondrien-Isolation aus der Milz*

Für die Mitochondrien-Isolation wurden normoglykämische  $B6mt^{FVB}$ ,  $B6mt^{AKR}$ ,  $NODmt^{FVB}$  und NOD Tiere unter Standarddiät verwendet. Jede Gruppe bestand aus 3 bis 6 Tieren.

Nach Betäubung mit einer Narkoselösung (Ketamin 60 % + Xylazin 40 %) erfolgte die Tötung des Tieres durch zervikale Dislokation. Anschließend wurde die Milz aufgesucht und herauspräpariert.

Die Gewebeproben wurden bis zur weiteren Verwendung in PBS auf Eis gelagert. Ein 10 ml Potter-Elvehjem wurde auf Eis vorgekühlt und mit 8 ml Isolationspuffer (ATPase-Aktivität) bzw. EDTA/MSH-Puffer ( $H_2O_2$ -Produktion) gefüllt. Jeweils maximal 0,5 g der Gewebeproben wurden in kleine Stücke geschnitten (2 x 2 mm) und mit Hilfe des Potters homogenisiert.

Das Homogenisat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (10 Minuten, 1000 g, 4 °C). Der Überstand enthielt die Mitochondrien. Diese wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Mitochondrien wurden ein weiteres Mal zentrifugiert (15 Minuten, 12000 g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet, das nun die Mitochondrien enthielt, in dem Isolationspuffer (ATPase-Aktivität) bzw. EDTA/MSH-Puffer (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion) resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Das Pellet wurde nun in 100 µl Isolationspuffer (ATPase-Aktivität) bzw. EDTA/MSH-Puffer (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion) resuspendiert. Alle Mitochondrien einer Gewebeprobe wurden gepoolt und der Gesamtproteingehalt des Pools ermittelt. Für die Bestimmung des Proteingehaltes wurde das Pierce-BCA-Kit (Pierce, USA) verwendet und nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers vorgegangen. Anschließend wurden die Proben mit Isolationspuffer (ATPase-Aktivität) bzw. EDTA/MSH-Puffer (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion) so verdünnt, dass in allen analysierten Proben die gleiche Proteinkonzentration enthalten war.

#### 2.5.1.2 Mitochondrien-Isolation aus der Leber

##### ***Puffer***

##### *Isolationspuffer*

0,2 mM	EDTA
0,25 M	Sucrose
10 mM	Tris-HCl pH7,8
1 µg/ml	Leupeptin
1 µg/ml	Pepstatin A
0,3 mM	PMSF

##### ***Mitochondrien-Isolation aus der Leber***

Für die Mitochondrien-Isolation wurden normoglykämische B6mt<sup>FVB</sup>, B6mt<sup>AKR</sup>, NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere unter der Standarddiät verwendet. Jede Gruppe bestand aus 3 bis 6 Tieren. Nach Betäubung mit einer Narkoselösung (Ketamin 60 % + Xylazin 40 %) erfolgte die Tötung des Tieres durch zervikale Dislokation. Die Leber wurde aufgesucht und herauspräpariert.

Der weitere Vorgang entsprach dem der Mitochondrienisolation aus der Milz (ATPase-Aktivität) mit dem Unterschied, dass das Pellet am Ende des letzten Waschschrilles in 300  $\mu\text{l}$  Isolationspuffer statt 100  $\mu\text{l}$  resuspendiert wurde. Wie bei den Milz-Mitochondrien beschrieben, wurde der Proteingehalt mit dem Pierce-BCA-Kit ermittelt und der Gesamtproteingehalt der Proben mit Isolationspuffer verdünnt, so dass in allen analysierten Proben die gleiche Proteinkonzentration enthalten war.

## 2.5.2 Messung der ATPase-Aktivität in den Mitochondrien

### 2.5.2.1 Reaktionsmix

50 mM	Tris-HCl pH 8,0
1 mM	ATP
0,3 mM	NADH
3,3 mM	MgCl <sub>2</sub>
2 $\mu\text{g/ml}$	Antimycin A
1 mM	Phosphoenolpyruvat
5 U/ml	Laktatdehydrogenase
2,5 U/ml	Pyruvatkinase

### 2.5.2.2 Messung der ATPase-Aktivität

In eine 1 ml Küvette wurden 20 bis 40  $\mu\text{g}$  (10  $\mu\text{l}$ ) der frisch isolierten Milz-Mitochondrien gegeben und in 1 ml Reaktionsmix suspendiert. Zur Hälfte der Proben wurden 30  $\mu\text{l}$  Oligomycin (30  $\mu\text{g/ml}$ ) hinzugefügt. Oligomycin hemmt die ATPase, daher dienten die oligomycinhaltigen Proben als Kontrollen. Die Lösungen wurden bei 340 nm photometrisch untersucht und die Extinktionswerte über einen Zeitraum von fünf Minuten alle 30 Sekunden notiert.

### 2.5.3 Messung der $H_2O_2$ -Produktion

#### 2.5.3.1 Analysenpuffer

210 mM	Mannitol
70 mM	Sucrose
5 mM	HEPES
0,5 mM	$KH_2PO_4$
0,1 mg/ml	BSA
10 $\mu$ M	Antimycin

#### 2.5.3.2 Messung der $H_2O_2$ -Produktion

Die frisch isolierten Milz-Mitochondrien wurden ein weiteres Mal zentrifugiert (15 Minuten, 12000 g, 4 °C) und das Pellet in dem Analysenpuffer resuspendiert und auf eine Proteinkonzentration von 7 mg/ml verdünnt. Für die Messung der mitochondrialen  $H_2O_2$ -Produktion wurde das Amplex Red-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Es wurde eine Standardkurve erstellt, indem das  $H_2O_2$  auf bestimmte Konzentrationen verdünnt wurde (10  $\mu$ M; 5  $\mu$ M; 2,5  $\mu$ M; 1,25  $\mu$ M; 0,625  $\mu$ M; 0,3125  $\mu$ M; 0,15625  $\mu$ M und 0  $\mu$ M). Die weiteren Schritte entsprachen den Angaben des Herstellers. Mit Hilfe eines Photometers wurde die Extinktion zum Zeitpunkt 0, 10, 20 und 30 Minuten bei 560 nm gemessen. Anhand der Extinktionswerte der Standardkurve konnte die  $H_2O_2$ -Konzentration in den einzelnen Proben berechnet werden.

### 2.5.4 Messung des Sauerstoffverbrauches in den Mitochondrien

#### 2.5.4.1 Puffer

##### A) Waschpuffer

10 mM	Tris pH 7,5
1 mM	EDTA
250 mM	Sucrose
4 $\mu$ g/ml	Aprotinin
1 $\mu$ g/ml	Pepstatin
2 $\mu$ g/ml	Leupeptin

*B) Analysenpuffer*

10 mM	Tris pH 7,5
10 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
100 mM	KCl
40 mM	Glucose
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	EGTA
0,04 %	BSA

*2.5.4.2 Messung des Sauerstoffverbrauches*

Der Sauerstoffverbrauch wurde mit der *Oxygraph DW 1 Clark-Elektrode* gemessen.

Die frisch isolierten Leber-Mitochondrien wurden auf 20 mg/ml Protein verdünnt. Die *Oxygraph DW 1 Clark-Elektrode* wurde nach der Bedienungsanleitung des Herstellers vorbereitet und fünfmal mit Waschpuffer gewaschen.

Danach wurden 1250 µl des Analysenpuffers in die Elektrodenkammer gegeben und mit Hilfe der *Oxygraph plus v 1.01 Software* der Sauerstoffverbrauch zwei Minuten lang gemessen. Anschließend wurden 50 µl der suspendierten Mitochondrien hinzugefügt und der Sauerstoffverbrauch zwei Minuten gemessen. Nach den zwei Minuten wurden 60 µl Succinat (0,15 M) in die Elektrodenkammer gegeben und der Sauerstoffverbrauch wiederum zwei Minuten gemessen (Zustand 4; Fließgleichgewicht der Atmungskette). Dann wurden 10 µl ADP (12,6 mM) hinzugefügt und der Sauerstoffverbrauch fünf Minuten lang ermittelt (Zustand 3; Fließgleichgewicht der Atmungskette). Nach den fünf Minuten wurden erneut 10 µl ADP (12,6 mM) in die Elektrodenkammer pipettiert und die Änderung der Sauerstoffkonzentration fünf Minuten lang gemessen.

Die Puffer hatten Raumtemperatur, Succinat und ADP waren eiskalt.

Für die Auswertung wurde das Verhältnis des Sauerstoffverbrauches zwischen Zustand 4 und Zustand 3 gemessen, da diese die wichtigsten Zustände der fünf Fließgleichgewichte der Atmungskette sind.

## 2.6 Statistische Auswertung

Soweit nicht anders erwähnt, erfolgte die Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM. Die Signifikanz-Prüfung erfolgte durch einen *Student's T-Test*, bei multiplen Vergleichen durch einen *ANOVA-Test* mit anschließendem *Bonferroni-post-Test*.

Berechnungen zur Diabetesinzidenz erfolgten durch einen *Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test*.

Zum Manifestationsalter erfolgten die Berechnungen mit einem *Mann-Whitney-Test*.

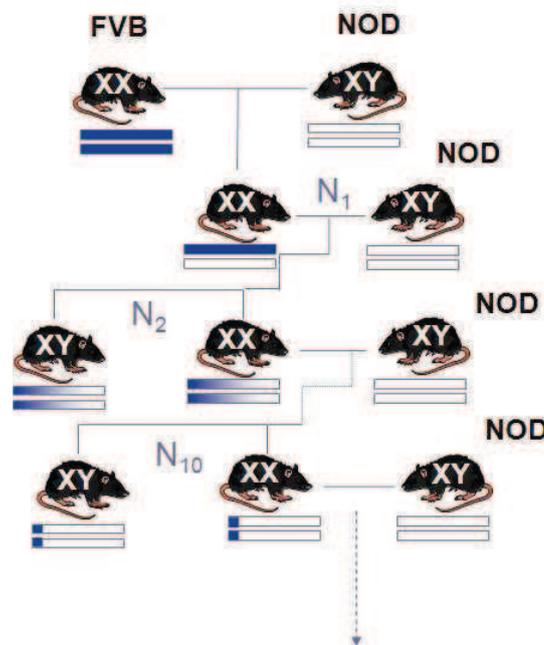
Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem *Graph Pad Prism* Programm (Graph Pad Inc., USA) durchgeführt

### 3 Resultate

#### 3.1 Auswirkungen der mitochondrialen Variante des *Atp-8*-Gens ( $mt^{FVB/N}$ ) auf das Autoimmungeschehen der NOD Maus

Um die Auswirkungen der Mutation des mitochondrialen (mt) *Atp-8*-Gens auf das Autoimmungeschehen der NOD Maus zu untersuchen, wurden  $NODmt^{FVB}$  und NOD Tiere über einen Zeitraum von 36 Wochen beobachtet (4. bis 40. Lebenswoche).

Es ist bekannt, dass die NOD Maus bezüglich des Diabetes mellitus Typ 1 eine starke Geschlechtspräferenz zeigt. So erkrankten in allen bekannten NOD Stämmen mehr weibliche als männliche Tiere. In Vorversuchen stellten wir fest, dass bei den weiblichen  $NODmt^{FVB}$  Tieren 80 % erkrankten, bei den NOD Tieren waren es nur 55 % ( $p < 0,05$ ). Bei den männlichen Tieren wurde eine Veränderung des Manifestationsalters beobachtet, jedoch kein Unterschied bezüglich der kumulativen Diabetesinzidenz. So erkrankten die  $NODmt^{FVB}$  Tiere bereits mit 24 Wochen, NOD Tiere erkrankten erst mit 31 Wochen ( $p < 0,05$ ). Auf Grund dieser Ergebnisse wurden männliche und weibliche Tiere getrennt beobachtet.



**Abb. 3.1** Erzeugung conplastischer Mausstämmen.

Conplastische Mausstämmen wurden erzeugt, indem weibliche Mäuse des mitochondrialen Donorstammes (FVB/N) mit Männchen des gewählten Hintergrundstammes (NOD/Ltj) verpaart wurden.

### 3.1.1 Blutglucosekonzentrationen der NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere

Der Blutglucosespiegel der NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere wurde im Alter von 6 bis 10 Wochen alle zwei Wochen bestimmt. Ab der 10. bis einschließlich der 20. Woche wurden die Blutglucosekonzentrationen wöchentlich bestimmt. Nach der 20. Woche erfolgte die Bestimmung der Blutglucose wieder zweiwöchentlich.

Die weiblichen NOD Tiere zeigten zu Beginn des Experimentes signifikant höhere Blutglucosespiegel als die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere (NODmt<sup>FVB</sup>:  $4,36 \pm 0,15$  mmol/l vs. NOD:  $5,85 \pm 0,28$  mmol/l,  $p < 0,001$ ; jeweils 6. Woche). Bei beiden Genotypen stieg die Blutglucose im Verlauf an. Ab der 20. Woche wiesen die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere höhere Blutglucosewerte auf als die NOD Tiere. In der 26. und in der 40. Woche wurden bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren signifikant höhere Blutglucosespiegel gemessen als bei den NOD Tieren (NODmt<sup>FVB</sup>:  $23,44 \pm 1,5$  mmol/l vs. NOD:  $17,88 \pm 2,3$  mmol/l,  $p < 0,05$ ; jeweils 40. Woche; Abb. 3.1.1 A).

Auch die männlichen NOD Tiere wiesen zu Beginn des Experimentes signifikant höhere Blutglucosespiegel auf als die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere (NODmt<sup>FVB</sup>:  $5,22 \pm 0,12$  mmol/l vs. NOD:  $6,2 \pm 0,34$  mmol/l,  $p < 0,01$ ; jeweils 6. Woche). Bei beiden Genotypen stieg die Blutglucose im Verlauf der Studie an. In der 30. Woche wiesen die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere signifikant höhere Blutglucosekonzentrationen auf als die NOD Tiere (NODmt<sup>FVB</sup>:  $16,43 \pm 2,67$  mmol/l vs. NOD:  $8,15 \pm 1,54$  mmol/l;  $p < 0,01$ ; s. Abb. 3.1.1 B).

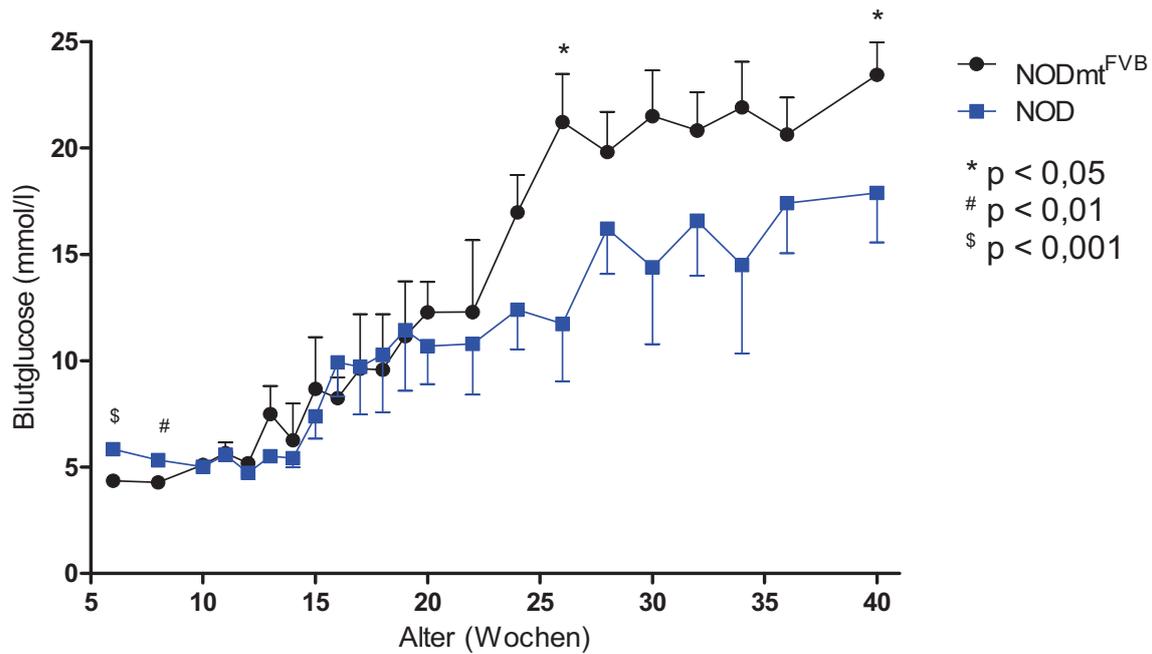


Abb. 3.1.1 A Blutglucosespiegel der weiblichen NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren.

Die Abbildung zeigt die Blutglucosespiegel der weiblichen NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere (n = 9 – 43). Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 36 Wochen beobachtet (4. – 40. Woche). Ab der 20. Woche wiesen die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere höhere Blutglucosespiegel auf. In der 26. Woche und in der 40. Woche war dieser Unterschied signifikant ( $p < 0,05$ ).

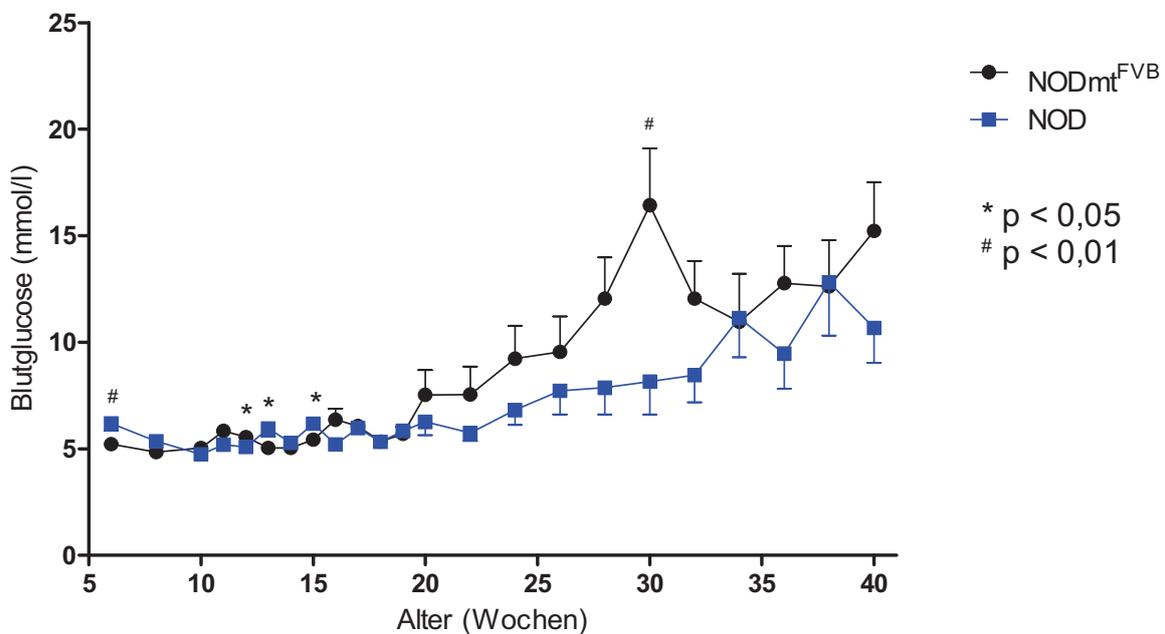


Abb. 3.1.1 B Blutglucosespiegel der männlichen NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere.

Dargestellt ist der Blutglucosespiegel der männlichen NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere (n = 10 – 38). Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 36 Wochen beobachtet (4. – 40. Woche). Die Blutglucosewerte der NODmt<sup>FVB</sup> Tiere waren ab der 20. Woche höher als bei den NOD Tieren und in der 30. Woche signifikant höher ( $p < 0,01$ ).

### 3.1.2 Gewichtsverlauf der NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere

Bei den NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren wurde von der 4. Woche bis einschließlich der 10. Woche das Körpergewicht zweiwöchentlich bestimmt. Nach der 10. Woche wurde das Körpergewicht der Tiere monatlich bestimmt.

Bei den weiblichen Tieren unterschied sich die Gewichtszunahme der beiden Genotypen nicht voneinander (NODmt<sup>FVB</sup>:  $7,63 \pm 0,96$  g vs. NOD:  $7,89 \pm 0,86$  g; s. Abb. 3.1.2 A).

In der ersten Hälfte des Beobachtungszeitraumes waren die männlichen NODmt<sup>FVB</sup> Tiere signifikant schwerer als die NOD Tiere ( $p < 0,05$ ). Nach der 16. Woche war das Körpergewicht der beiden Genotypen vergleichbar. Im Verlauf der Untersuchung war bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren eine Gewichtszunahme um  $9,95 \pm 0,82$  g zu beobachten und bei den NOD Tieren eine Gewichtszunahme um  $12,54 \pm 1,23$  g (s. Abb. 3.1.2 B).

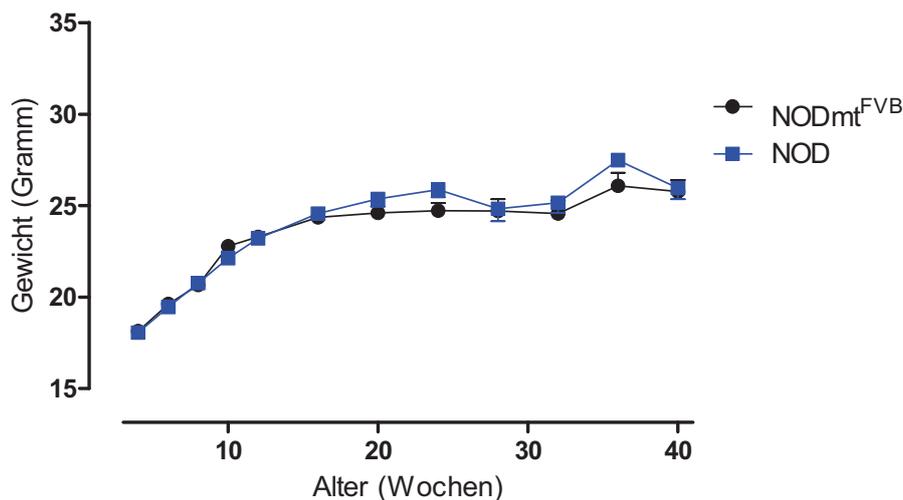
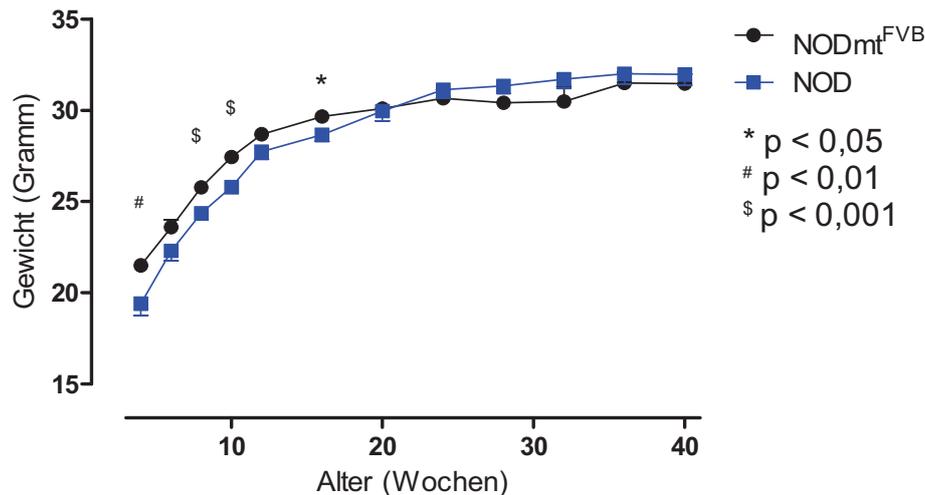


Abb. 3.1.2 A Gewichtsverlauf der weiblichen NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere.

Dargestellt ist das Körpergewicht der weiblichen NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere ( $n = 10 - 38$ ). Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 36 Wochen beobachtet (4. - 40. Woche).



**Abb. 3.1.2 B Gewichtsverlauf der männlichen NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere.**

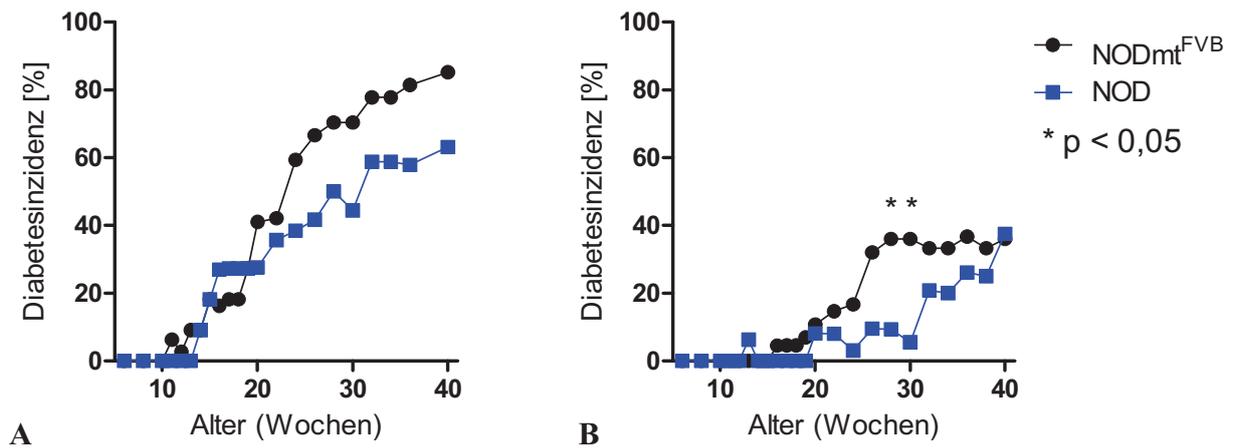
Die Darstellung zeigt das Körpergewicht der männlichen NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere (n = 17 – 40). Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 36 Wochen beobachtet (4. – 40. Woche). Die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere wiesen in der ersten Hälfte ein signifikant höheres Körpergewicht auf (p < 0,05).

### 3.1.3 Diabetesinzidenz der NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere

Die Bestimmung der Blutglucose erfolgte wie unter 3.1.1 beschrieben.

Bei den weiblichen NODmt<sup>FVB</sup> Tieren war die kumulative Diabetesinzidenz nach der 20. Woche höher als bei den NOD Tieren (NODmt<sup>FVB</sup>: 41,03 % vs. NOD: 27,59 %). Diese Beobachtung setzte sich bis zur 40. Woche fort (NODmt<sup>FVB</sup>: 85 % vs. NOD: 65 %; p > 0,05; s. Abb. 3.1.3 A).

Bei den männlichen Tieren stieg die kumulative Diabetesinzidenz bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren nach der 20. Woche an. In der 28. und 30. Woche war die Diabetesinzidenz bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren signifikant höher als die Inzidenz der NOD Tiere (p < 0,05). In der 40. Woche unterschieden sich die Diabetesinzidenzen der beiden Genotypen nicht voneinander (NODmt<sup>FVB</sup>: 36 % vs. NOD: 37,5 %). Die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere erkrankten signifikant früher als die NOD Tiere (NODmt<sup>FVB</sup>: 20. Woche vs. NOD: 30. Woche; p < 0,05; s. Abb. 3.1.3. B).



**Abb. 3.1.3 Diabetesinzidenz der weiblichen (A) und männlichen (B) NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere.**

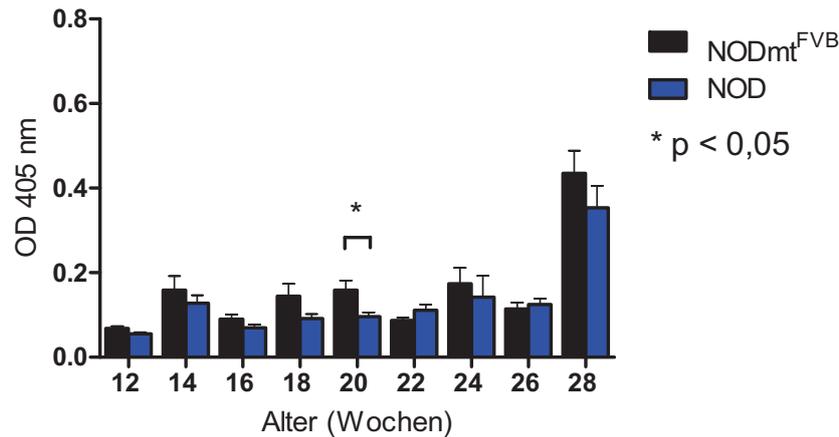
Die Abbildung zeigt die kumulative Diabetesinzidenz der weiblichen (3.1.3 A; n = 9 – 43) und männlichen (3.1.3 B; n = 7 – 15) NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 36 Wochen beobachtet und als diabetisch definiert, wenn die Blutglucose an zwei aufeinanderfolgenden Messungen mehr als 9 mmol/l betrug. Die weiblichen NODmt<sup>FVB</sup> Tiere erkrankten häufiger und früher als NOD Tiere ( $p > 0,05$ ). Die männlichen NODmt<sup>FVB</sup> Tiere erkrankten signifikant früher als die NOD Tiere ( $p < 0,05$ ). Am Ende der Untersuchung erkrankten von beiden Genotypen gleich viele männliche Tiere.

### 3.1.4 Insulin-Autoantikörpergehalt bei NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren

Die Insulin-Autoantikörperkonzentrationen wurden im Serum der Tiere bestimmt. Dafür wurde den weiblichen Tieren von der 12. bis zur 28. Woche, den männlichen Tieren von der 12. bis zur 32. Woche, alle zwei Wochen Blut entnommen und auf Insulin-Autoantikörper (IAA) untersucht. Die IAA wurden mittels ELISA aus dem Serum der Tiere detektiert und die Extinktion gemessen. Die Extinktion bei 405 nm ist proportional zum IAA-Spiegel der Serumproben und so kann von der Extinktion indirekt auf die IAA-Konzentration geschlossen werden.

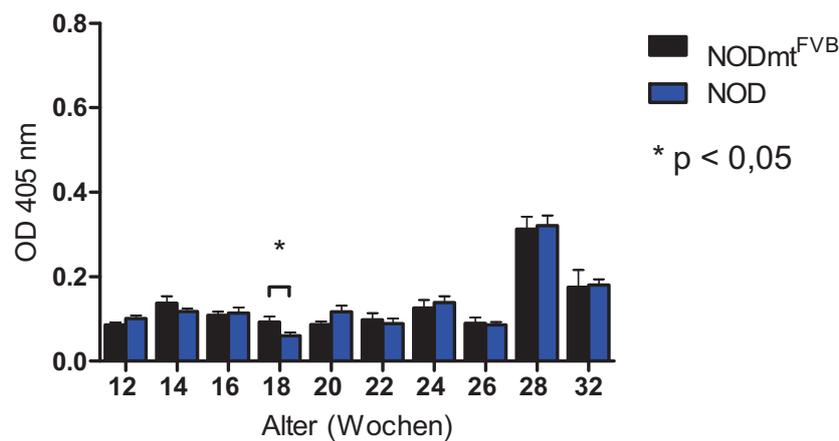
Die IAA-Konzentrationen waren bereits in der 12. Woche bei den weiblichen NODmt<sup>FVB</sup> Tieren höher als die der NOD Tiere. In der 20. Woche zeigten sich bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren signifikant höhere IAA-Spiegel (NODmt<sup>FVB</sup>:  $0,16 \pm 0,02$  OD 405 nm vs. NOD:  $0,1 \pm 0,01$  OD 405 nm;  $p < 0,05$ ; s. Abb. 3.1.4 A).

Die IAA-Konzentrationen der männlichen NODmt<sup>FVB</sup> und der NOD Tiere unterschieden sich nicht so deutlich wie die der weiblichen Tiere. In der 18. Woche wiesen die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere signifikant höhere IAA-Spiegel auf (NODmt<sup>FVB</sup>:  $0,09 \pm 0,01$  OD 405 nm vs. NOD:  $0,06 \pm 0,01$  OD 405 nm;  $p < 0,05$ ; s. Abb. 3.1.4 B).



**Abb. 3.1.4 A Insulin-Autoantikörpergehalt bei weiblichen NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren.**

Die Darstellung zeigt die Extinktion der Serumproben von weiblichen NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren (n = 6 – 34) zwischen der 12. und der 28. Lebenswoche. Der Gehalt an IAA wurde mittels ELISA aus dem Serum der Tiere bestimmt. Die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere wiesen in der 20. Woche einen signifikant höheren IAA-Spiegel als die NOD Tiere auf (p < 0,05).



**Abb. 3.1.4 B Insulin-Autoantikörpergehalt bei männlichen NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren.**

Die Abbildung zeigt die Extinktion der Serumproben der männlichen NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere (n = 7 – 37). Die IAA-Konzentrationen wurden zwischen der 12. und der 32. Woche bestimmt. In der 18. Woche war die Konzentration der IAA bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren signifikant höher als die der NOD Tiere (p < 0,05).

## 3.2 Lipidbelastungsstudie der NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Maus

Um zu untersuchen wie NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere auf metabolische Belastung reagieren, wurde eine Lipidbelastungsstudie durchgeführt. Im Rahmen dieser Studie erhielten die Tiere entweder eine fettreiche Diät (60 % cal aus Fett) oder eine Kontrolldiät (10 % cal aus Fett). Die Belastungsdauer betrug zwölf Wochen (4. bis 16. Lebenswoche). Es wurden nur männliche Tiere untersucht.

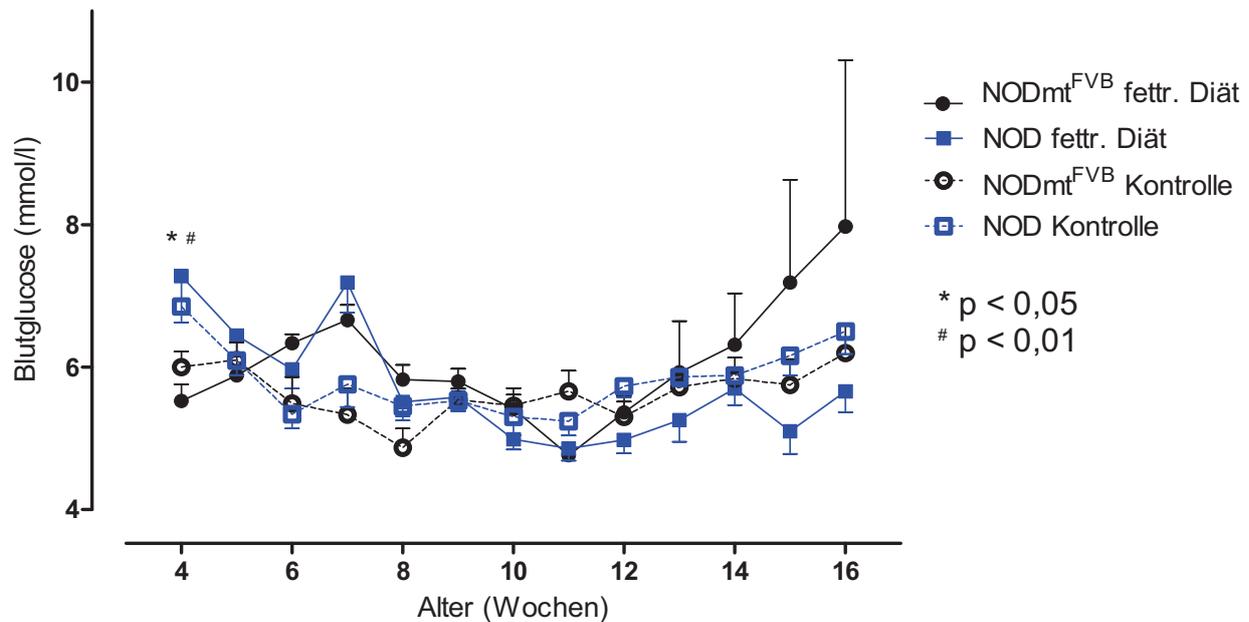
### 3.2.1 Blutglucosespiegel der NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere unter fettreicher und fettarmer Diät

Bei den NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren wurde die Blutglucosekonzentration wöchentlich bestimmt. Die Tiere wurden als diabetisch angesehen, wenn die Blutglucosekonzentration an zwei aufeinanderfolgenden Messungen mehr als 9 mmol/l betrug.

In der 4. Woche war die Blutglucosekonzentration der NOD Tiere unter der fettreichen Diät signifikant höher als die Blutglucosekonzentration der NODmt<sup>FVB</sup> Tiere (NODmt<sup>FVB</sup>:  $5,53 \pm 0,23$  mmol/l vs. NOD:  $7,28 \pm 0,54$  mmol/l;  $p < 0,01$ ; jeweils 4. Woche). Dieser Sachverhalt kehrte sich nach der 11. Woche um ( $p > 0,05$ ).

Bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren stieg die Blutglucose im Beobachtungszeitraum leicht an, während sie bei den NOD Tieren leicht abfiel (NODmt<sup>FVB</sup>:  $7,98 \pm 2,33$  mmol/l vs. NOD:  $5,66 \pm 0,29$  mmol/l; jeweils 16. Woche)

Zu Beginn der Untersuchung hatten die NOD Tiere unter Kontrolldiät signifikant höhere Blutglucosewerte als die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere (NODmt<sup>FVB</sup>:  $6 \pm 0,22$  mmol/l vs. NOD:  $6,85 \pm 0,22$  mmol/l;  $p < 0,05$ ; jeweils 4. Woche). Unter fettarmer Diät blieb die Blutglucose im Verlauf des Beobachtungszeitraumes unverändert (NODmt<sup>FVB</sup>:  $6,2 \pm 0,39$  mmol/l vs. NOD:  $6,5 \pm 0,32$  mmol/l; jeweils 16. Woche; s. Abb. 3.2.1).



**Abb. 3.2.1 Blutglucosespiegel der NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere unter fettreicher und fettarmer Diät.**

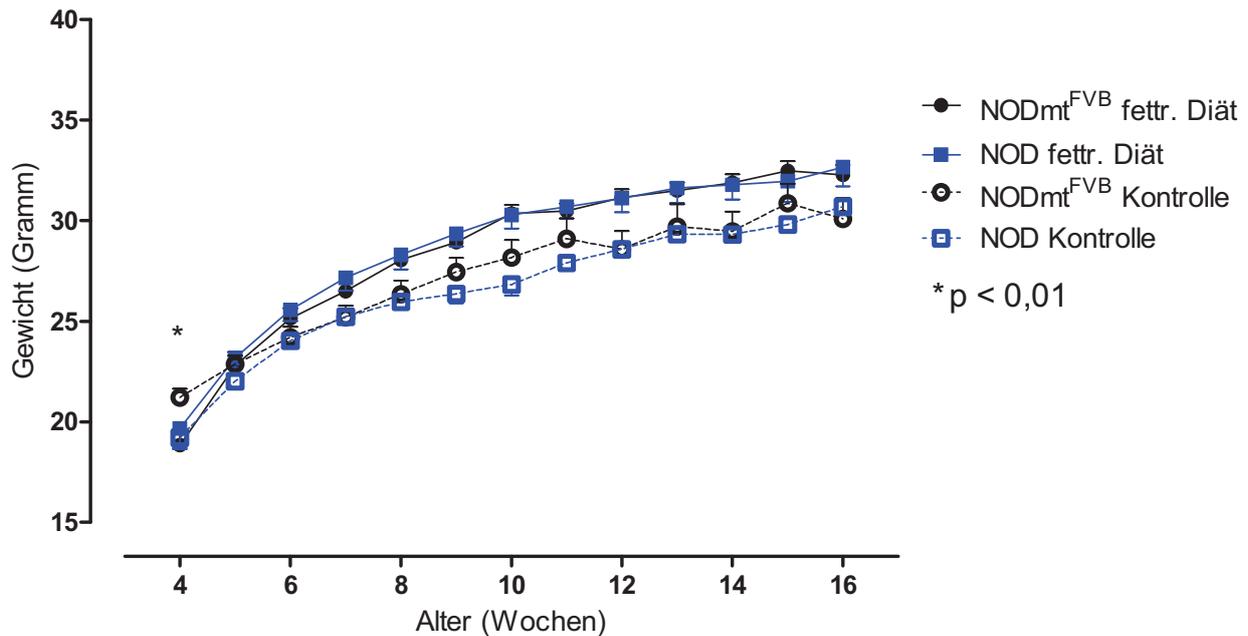
Die Darstellung zeigt den Blutglucosespiegel von NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät. Die Tiere ( $n = 8 - 9$ ) erhielten die jeweilige Diät über zwölf Wochen (4. – 16. Woche). Zu Beginn der Untersuchung zeigten sich bei den NOD Tieren unter beiden Diäten signifikant höhere Blutglucosewerte ( $p < 0,05$ ). Nach der 12. Woche zeigten sich bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren unter fettreicher Diät höhere Blutglucosewerte als bei den NOD Tieren ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.2 Gewichtsverlauf der NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere unter fettreicher und fettarmer Diät

Das Körpergewicht der NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere wurde wöchentlich bestimmt.

Zu Beginn der Lipidbelastung wiesen die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere ein geringeres Körpergewicht auf als die NOD Tiere (NODmt<sup>FVB</sup>:  $18,84 \pm 0,79$  g vs. NOD:  $19,68 \pm 1,04$  g;  $p > 0,05$ ; jeweils 4. Woche). Im weiteren Verlauf nahmen beide Genotypen unter der fettreichen Diät in gleichem Maße an Gewicht zu (NODmt<sup>FVB</sup>:  $32,23 \pm 0,5$  g vs. NOD:  $32,66 \pm 0,95$  g; jeweils 16. Woche).

Die Kontroll-NODmt<sup>FVB</sup> Tiere wiesen zu Beginn des Experimentes ein signifikant höheres Körpergewicht auf als die NOD Tiere (NODmt<sup>FVB</sup>:  $21,21 \pm 0,44$  g vs. NOD:  $19,2 \pm 0,47$  g;  $p < 0,01$ ; jeweils 4. Woche). Im Verlauf der Untersuchung stieg bei beiden Genotypen das Gewicht gleich stark an (NODmt<sup>FVB</sup>:  $30,09 \pm 1,02$  g vs. NOD:  $30,7 \pm 0,44$  g; jeweils 16. Woche; s. Abb. 3.2.2).



**Abb. 3.2.2 Gewichtsverlauf der NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere unter fettreicher und fettarmer Diät.**

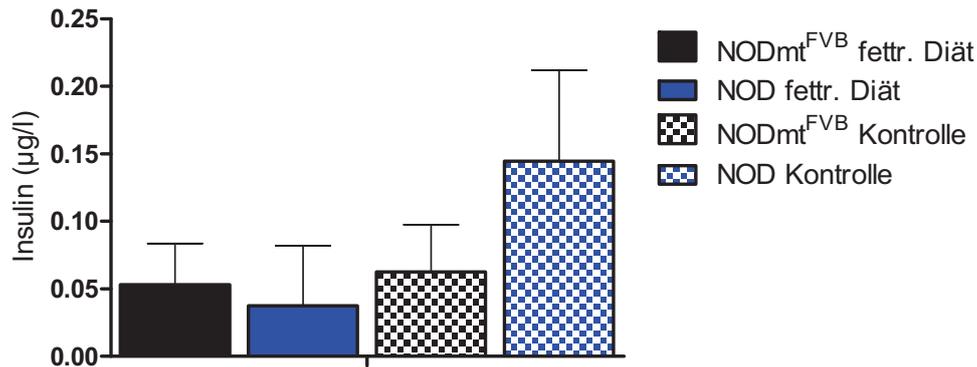
Die Abbildung zeigt das Körpergewicht der NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere unter fettreicher Diät und Kontrolldiät. Die Tiere (n = 8 – 10) erhielten die jeweilige Diät über zwölf Wochen (4. – 16. Woche). Die Tiere unter Kontrolldiät zeigten zu Beginn der Studie ein signifikant unterschiedliches Ausgangsgewicht ( $p < 0,01$ ), wobei die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere deutlich schwerer waren.

### 3.2.3 Seruminsulinspiegel der NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere unter fettreicher und fettarmer Diät

Die Seruminsulinspiegel der NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere unter Lipidbelastung wurden im Alter von acht Wochen bestimmt.

Unter der fettreichen Diät konnte bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren ein höherer Seruminsulinspiegel als bei den NOD Tieren festgestellt werden (NODmt<sup>FVB</sup>:  $0,05 \pm 0,03 \mu\text{g/l}$  vs. NOD:  $0,04 \pm 0,04 \mu\text{g/l}$ ;  $p > 0,05$ ).

Unter der Kontrolldiät wurden bei den NOD Tieren höhere Seruminsulinspiegel gemessen als bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren (NODmt<sup>FVB</sup>:  $0,06 \pm 0,03 \mu\text{g/l}$  vs. NOD:  $0,14 \pm 0,07 \mu\text{g/l}$ ;  $p > 0,05$ ; s. Abb. 3.2.3).



**Abb. 3.2.3** Seruminsulinspiegel der NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere unter fettreicher und fettarmer Diät im Alter von acht Wochen.

Die Abbildung zeigt den Seruminsulinspiegel von NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren (n = 8 – 10) im Alter von acht Wochen. Die Tiere erhielten die jeweilige Diät über einen Zeitraum von zwölf Wochen (4. – 16. Woche). Die Insulinkonzentration im Serum wurde mittels ELISA bestimmt. Unter fettreicher Diät zeigten sich bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren höhere Seruminsulinkonzentrationen als bei den NOD Tieren ( $p > 0,05$ ). Unter der Kontrolldiät wurden bei den NOD Tieren höhere Insulinspiegel im Serum als bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren gemessen ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.4 *Glucosestimulierte Insulinsekretion (GSIS) ex vivo aus pankreatischen $\beta$ -Zellen von NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät*

Die isolierten pankreatischen Inseln von 16 Wochen alten Tieren wurden mit verschiedenen Krebs-Ringer-Puffern (KR-Puffer) inkubiert. Dabei dienten die KR-Puffer mit 40 mM KCl und 16,7 mM Glucose als Stimulationsreiz für die Insulinsekretion, während der KR-Puffer mit 2,8 mM Glucose als substimulatorische Kontrolle diente.

Die Inseln der Tiere unter der fettreichen Diät sezernierten bei allen KR-Puffern weniger Insulin als die pankreatischen Inseln der Tiere, die die Kontrolldiät erhielten ( $p > 0,05$ ).

Unter fettreicher Diät sezernierten die Inseln der NODmt<sup>FVB</sup> Tiere nach der Stimulation mit 40 mM KCl weniger Insulin als die NOD Tiere (NODmt<sup>FVB</sup>:  $0,27 \pm 0,06$  ng Insulin pro  $\mu\text{g}$  DNA vs. NOD:  $0,31 \pm 0,02$  ng Insulin pro  $\mu\text{g}$  DNA;  $p > 0,05$ ). Nach der Stimulation mit 16,7 mM Glucose sezernierten die Inseln der NODmt<sup>FVB</sup> Tiere mehr Insulin als die NOD Tiere (NODmt<sup>FVB</sup>:  $0,41 \pm 0,09$  ng Insulin pro  $\mu\text{g}$  DNA vs. NOD:  $0,19 \pm 0,06$  ng Insulin pro  $\mu\text{g}$  DNA;  $p > 0,05$ ). Nach der Inkubation mit 2,8 mM Glucose sezernierten die Inseln der NODmt<sup>FVB</sup> Tiere weniger Insulin als die NOD Tiere (NODmt<sup>FVB</sup>:  $0,02 \pm 0,02$  ng Insulin pro  $\mu\text{g}$  DNA vs. NOD:  $0,05 \pm 0,01$  ng Insulin pro  $\mu\text{g}$  DNA;  $p > 0,05$ ).

Unter Kontrolldiät sezernierten die Inseln der  $\text{NODmt}^{\text{FVB}}$  Tiere nach der Stimulation mit 40 mM KCl mehr Insulin als die NOD Tiere ( $\text{NODmt}^{\text{FVB}}$ :  $0,92 \pm 0,45$  ng vs. NOD:  $0,57 \pm 0,35$  ng Insulin pro  $\mu\text{g}$  DNA;  $p > 0,05$ ). Nach der Stimulation mit 16,7 mM Glucose sezernierten die Inseln der  $\text{NODmt}^{\text{FVB}}$  Tiere mehr Insulin als die NOD Tiere ( $\text{NODmt}^{\text{FVB}}$ :  $0,74 \pm 0,26$  ng Insulin pro  $\mu\text{g}$  DNA vs. NOD:  $0,48 \pm 0,22$  ng Insulin pro  $\mu\text{g}$  DNA;  $p > 0,05$ ). Nach der Inkubation mit 2,8 mM Glucose sezernierten die Inseln der  $\text{NODmt}^{\text{FVB}}$  Tiere weniger Insulin als die Inseln Tiere ( $\text{NODmt}^{\text{FVB}}$ :  $0,05 \pm 0,20$  ng Insulin pro  $\mu\text{g}$  DNA vs. NOD:  $0,14 \pm 0,09$  ng Insulin pro  $\mu\text{g}$  DNA;  $p > 0,05$ ; s. Abb. 3.2.4.)

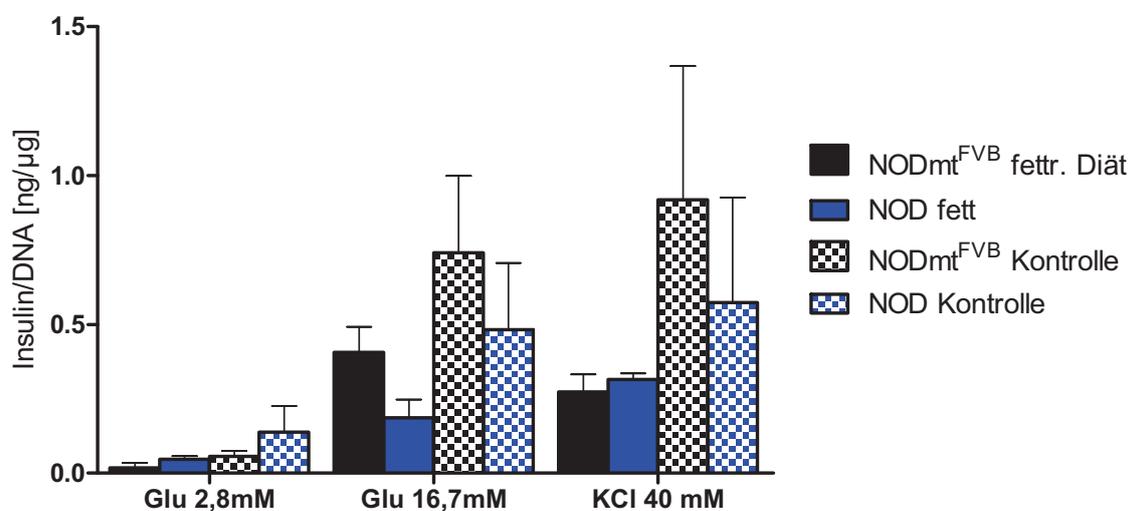


Abb. 3.2.4 Glucosestimulierte Insulinsekretion (GSIS) ex vivo.

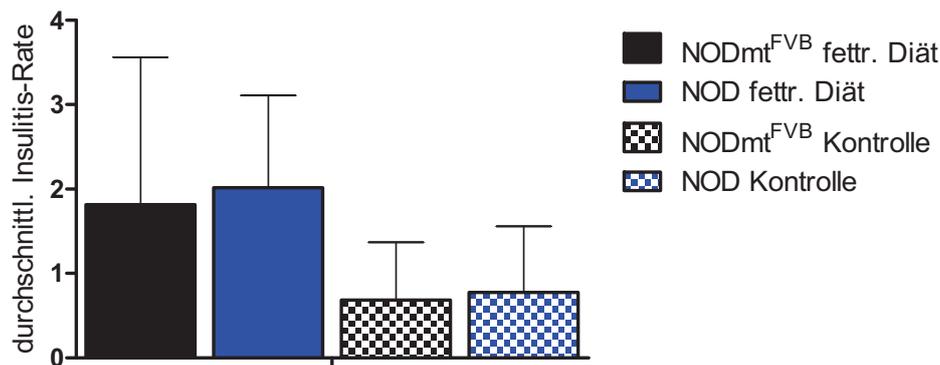
Dargestellt ist die GSIS ex vivo aus pankreatischen Inseln von  $\text{NODmt}^{\text{FVB}}$  und NOD Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät im Alter von 16 Wochen. Die Tiere erhielten die jeweilige Diät über einen Zeitraum von zwölf Wochen (4. – 16. Woche). Die Inseln wurden mit KR-Puffern inkubiert, die 40 mM KCl, 16,7 mM Glucose oder 2,8 mM Glucose enthielten. Es wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt. Bei dem Stimulationsreiz mit 16,7 mM Glucose sezernierten die Inseln der  $\text{NODmt}^{\text{FVB}}$  Tiere mehr Insulin als die Inseln der NOD Tiere ( $p > 0,05$ ). Die Inseln der Kontrolltiere sezernierten sowohl unter 40 mM KCl als auch unter 16,7 mM Glucose als Stimulationsreiz mehr Insulin als die Inseln der Tiere unter fettreicher Diät ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.5 Insulitis-Raten bei $\text{NODmt}^{\text{FVB}}$ und NOD Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät

Histologische Pankreaspräparate wurden auf lymphozytäre Infiltrationen untersucht. Die Insulitis-Rate ergab sich, indem die Anzahl der lymphozytär infiltrierten Inseln durch die Gesamtanzahl der Inseln des Präparates dividiert wurde.

Es wurde festgestellt, dass die durchschnittliche Insulitis-Rate durch die fettreiche Diät anstieg ( $p > 0,05$ ). Die Insulitis-Raten beider Genotypen waren ähnlich (NODmt<sup>FVB</sup>:  $1,82 \pm 1,74$  vs. NOD:  $2,02 \pm 1,09$ ).

In den Kontrollgruppen unterschieden sich die Insulitis-Raten nicht voneinander (NODmt<sup>FVB</sup>:  $0,68 \pm 0,68$  vs. NOD:  $0,78 \pm 0,78$ ; s. Abb. 3.2.5).



**Abb. 3.2.5** Insulitis-Raten von NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät.

Dargestellt sind die durchschnittlichen Insulitis-Raten von NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren ( $n = 2 - 3$ ). Es wurden histologische Pankreaspräparate angefertigt, die immunhistochemisch mit Insulin-Antikörpern angefärbt wurden und auf lymphozytäre Infiltrationen untersucht wurden. Pro Tier wurden 15 – 34 Langerhanssche Inseln untersucht. Die Insulitis-Raten zwischen den NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren waren ähnlich. Es war zu beobachten, dass die Insulitis-Raten unter der fettreichen Diät bei beiden Genotypen anstiegen.

### 3.2.6 Größe und Anzahl der Langerhansschen Inseln in Pankreaspräparaten von NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät

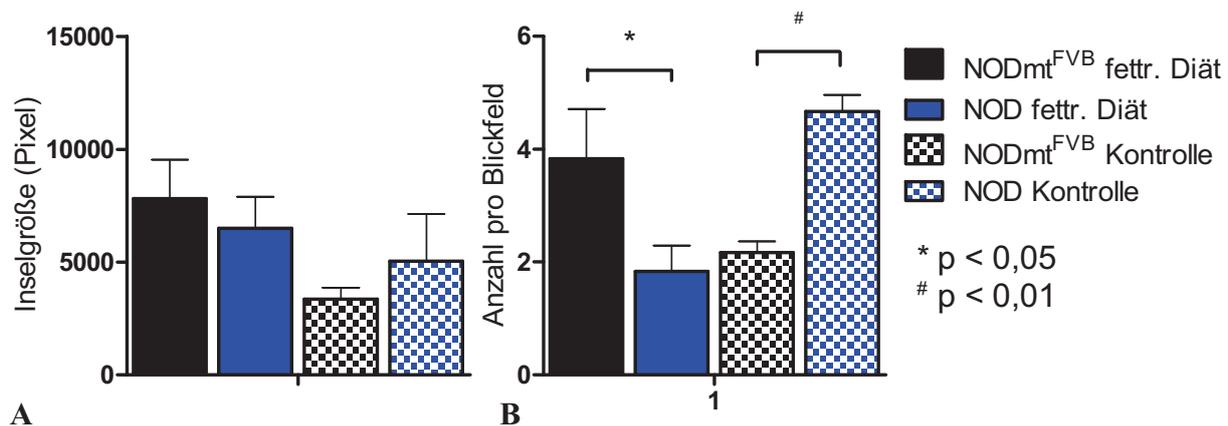
Die Größe und die Anzahl der Langerhansschen Inseln wurden in histologischen Präparaten von NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren unter fettarmer und fettreicher Diät gemessen.

Bei beiden Genotypen wurden unter der fettreichen Diät größere Langerhanssche Inseln beobachtet als unter der fettarmen Diät (NODmt<sup>FVB</sup>:  $7.801 \pm 1.742$  Pixel vs. NOD:  $6.497 \pm 1.400$  Pixel;  $p > 0,05$ ).

Unter der fettarmen Diät wiesen die NOD Tiere größere Inseln auf als die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere (NODmt<sup>FVB</sup>:  $3.361 \pm 501$  Pixel vs. NOD:  $5.049 \pm 2.082$  Pixel;  $p > 0,05$ ; s. Abb. 3.2.6).

Die Pankreaspräparate der NODmt<sup>FVB</sup> Tiere wiesen unter fettreicher Diät signifikant mehr Inseln auf als die Pankreaspräparate von NOD Tieren (NODmt<sup>FVB</sup>:  $3,83 \pm 0,88$  Inseln pro Blickfeld vs. NOD:  $1,83 \pm 0,46$  Inseln pro Blickfeld;  $p < 0,05$ ).

Unter Kontrolldiät wiesen die NOD Tiere signifikant mehr Inseln auf als die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere (NODmt<sup>FVB</sup>:  $2,17 \pm 0,20$  Inseln pro Blickfeld vs. NOD:  $4,67 \pm 0,30$  Inseln pro Blickfeld;  $p < 0,01$ ; s. Abb. 3.2.6 B).



**Abb. 3.2.6 Größe (A) und Anzahl (B) der Langerhansschen Inseln in histologischen Pankreaspräparaten.**

Dargestellt ist die Größe (3.2.6 A) und Anzahl (3.2.6 B) der Langerhansschen Inseln bei NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät (4. – 16. Lebenswoche). Es wurden Pankreaspräparate angefertigt und immunhistologisch gegen Insulin gefärbt. Es wurden zwölf unabhängige Versuche durchgeführt. Unter der fettreichen Diät waren die Inseln der NODmt<sup>FVB</sup> Tiere größer als die Inseln der NOD Tiere ( $p > 0,05$ ). Außerdem wiesen die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere signifikant mehr Inseln auf ( $p < 0,05$ ). Unter der fettarmen Diät konnten bei den NOD Tieren im Vergleich zu den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren größere Inseln beobachtet werden ( $p > 0,05$ ). Desweiteren wurde bei den NOD Tieren eine signifikant höhere Anzahl an Inseln gezählt ( $p < 0,01$ ).

### 3.3 Lipidbelastungsstudie der B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Maus

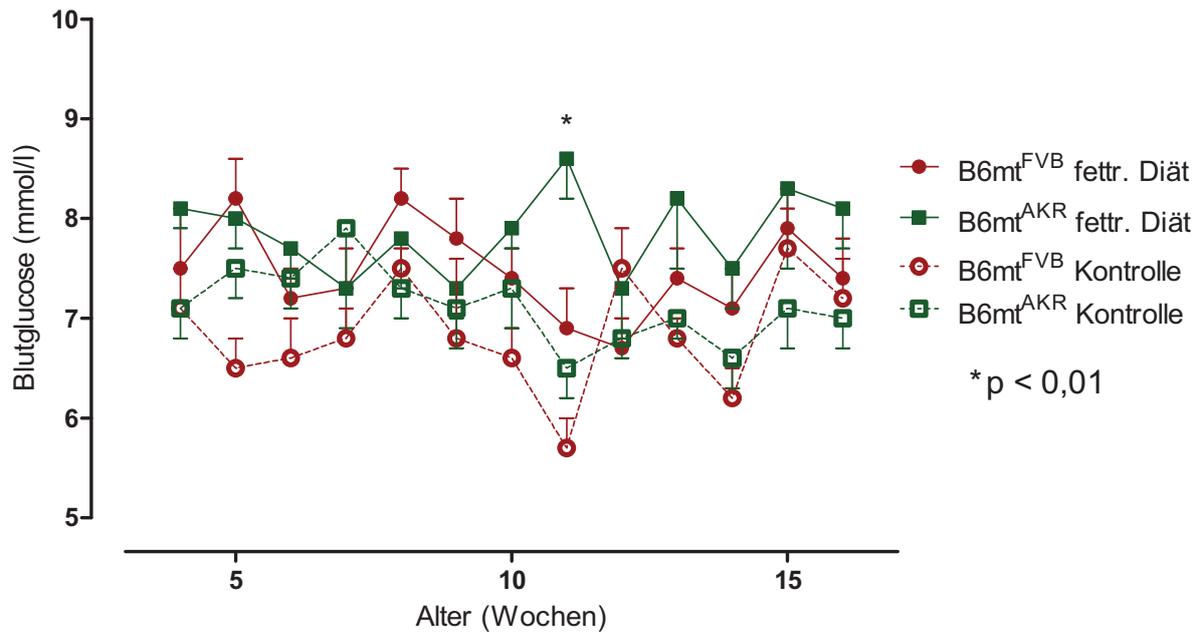
Um zu untersuchen wie B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tiere ohne autoreaktiven Hintergrund auf metabolische Belastung reagieren, wurde eine Lipidbelastungsstudie durchgeführt. Dabei erhielten die Tiere über einen Zeitraum von zwölf Wochen (4. bis 16. Woche) entweder eine fettreiche Diät (60 % cal aus Fett) oder eine Kontrolldiät (10 % cal aus Fett). Für diese Studie wurden nur männliche Tiere untersucht.

#### 3.3.1 *Blutglucosespiegel der B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tiere unter fettreicher und fettarmer Diät*

Die Bestimmung der Blutglucose erfolgte wie bereits unter 3.2.1 beschrieben.

Unter fettreicher Diät war die Blutglucose beider Genotypen während des Beobachtungszeitraumes konstant. In der 11. Woche war die Blutglucosekonzentration der B6mt<sup>AKR</sup> Tiere signifikant höher als bei den B6mt<sup>FVB</sup> Tieren (B6mt<sup>FVB</sup>:  $6,9 \pm 0,4$  mmol/l vs. B6mt<sup>AKR</sup>:  $8,6 \pm 0,4$  mmol/l;  $p < 0,01$ ).

Auch unter fettarmer Diät änderte sich die Blutglucose der beiden Genotypen im Verlauf der Messungen nicht (s. Abb. 3.3.1).



**Abb. 3.3.1 Blutglucosespiegel der B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tiere unter fettreicher und fettarmer Diät.**

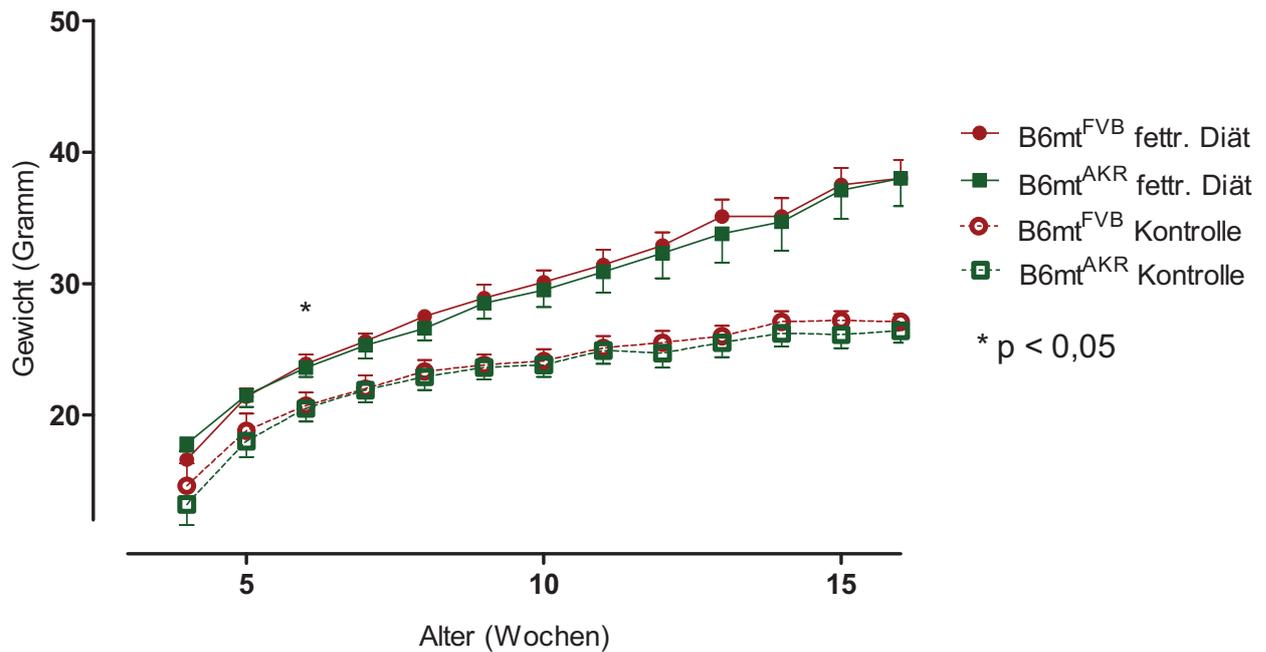
Die Abbildung zeigt die Blutglucosespiegel von B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät. Die Tiere (n = 8) erhielten die jeweilige Diät über einen Zeitraum von zwölf Wochen (4. – 16. Woche). In der 11. Woche war die Blutglucosekonzentration der B6mt<sup>AKR</sup> Tiere unter fettreicher Diät signifikant höher als die Blutglucosekonzentration der B6mt<sup>FVB</sup> Tiere (p < 0,01).

### 3.3.2 Gewichtsverlauf der B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tiere unter fettreicher Diät und fettarmer Diät

Das Gewicht wurde wöchentlich gemessen. Die Tiere, die die fettreiche Diät erhielten, nahmen signifikant stärker an Gewicht zu als die Tiere, die die fettarme Diät erhielten (p < 0,05).

Unter fettreicher Diät zeigte sich bei beiden Genotypen eine vergleichbare Gewichtszunahme (B6mt<sup>FVB</sup>: 21,4 ± 2,1 g vs. B6mt<sup>AKR</sup>: 20,2 ± 2,3 g).

Auch bei den Tieren, die die Kontrolldiät erhielten, war die Gewichtszunahme vergleichbar (B6mt<sup>FVB</sup>: 12,5 ± 2,3 g vs. B6mt<sup>AKR</sup>: 13,2 ± 2,5 g; s. Abb. 3.3.2).



**Abb. 3.3.2 Gewichtsverlauf der B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tiere unter fettreicher und fettarmer Diät.**

Die Darstellung zeigt den wöchentlichen Gewichtsverlauf von B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät. Die Tiere (n = 8) erhielten die jeweilige Diät über zwölf Wochen (4. – 16. Woche). Die Tiere unter der fettreichen Diät waren signifikant schwerer (p < 0,05).

### 3.3.3 Seruminsulinspiegel von B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät

Die Bestimmung der Seruminsulinspiegel bei B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät erfolgte in der 8. und 16. Woche.

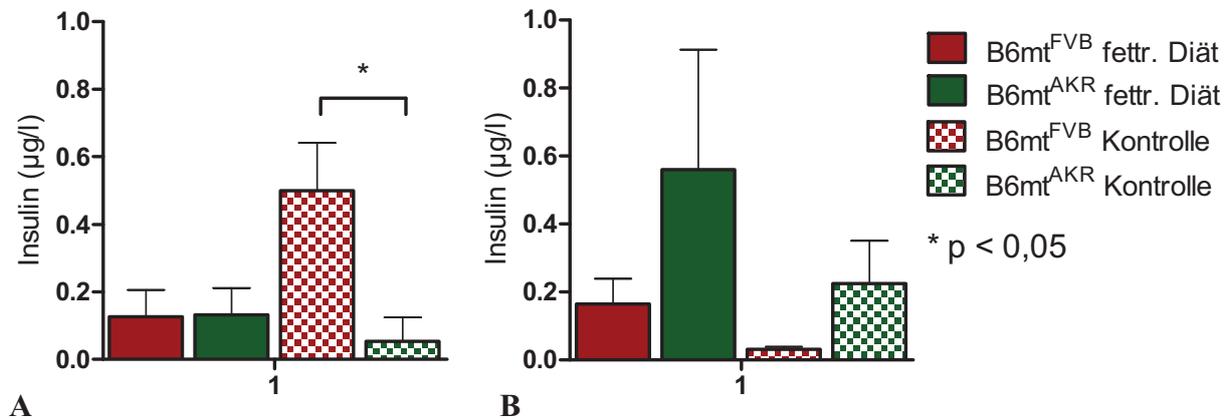
In der 8. Woche unterschieden sich die Seruminsulinspiegel der beiden Genotypen unter fettreicher Diät nicht (B6mt<sup>FVB</sup>: 0,13 ± 0,08 µg/l vs. B6mt<sup>AKR</sup>: 0,13 ± 0,08 µg/l).

Unter fettarmer Diät wiesen die B6mt<sup>FVB</sup> Tiere in der 8. Woche signifikant höhere Seruminsulinspiegel auf als die B6mt<sup>AKR</sup> Tiere (B6mt<sup>FVB</sup>: 0,5 ± 0,14 µg/l vs. B6mt<sup>AKR</sup>: 0,05 ± 0,07 µg/l; p < 0,05; s. Abb. 3.3.3 A).

Unter fettreicher Diät zeigte sich im Vergleich der 8. und 16. Woche vor allem bei den B6mt<sup>AKR</sup> Tieren ein Anstieg der Seruminsulinkonzentration (p > 0,05).

In der 16. Woche wiesen die B6mt<sup>FVB</sup> Tiere niedrigere Seruminsulinspiegel auf als die B6mt<sup>AKR</sup> Tiere (B6mt<sup>FVB</sup>: 0,16 ± 0,07 µg/l vs. B6mt<sup>AKR</sup>: 0,56 ± 0,35 µg/l; p > 0,05). Bei den Kontroll-B6mt<sup>FVB</sup> Tieren zeigten sich niedrigere Seruminsulinkonzentrationen als bei den

B6mt<sup>AKR</sup> Tieren (B6mt<sup>FVB</sup>:  $0,03 \pm 0,01 \mu\text{g/l}$  vs. B6mt<sup>AKR</sup>:  $0,22 \pm 0,13 \mu\text{g/l}$ ;  $p > 0,05$ ; s. Abb. 3.3.3 B).



**Abb. 3.3.3 Seruminsulinspiegel im Alter von 8 (A) und 16 (B) Wochen.**

Dargestellt ist der Seruminsulingehalt (ELISA) von B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tieren im Alter von 8 (3.3.3 A) und 16 Wochen (3.3.3 B) unter fettreicher und fettarmer Diät ( $n = 5 - 10$ ). Unter der fettarmen Diät wiesen die B6mt<sup>FVB</sup> Tiere im Alter von 8 Wochen signifikant höhere Seruminsulinwerte auf ( $p < 0,05$ ). Die B6mt<sup>FVB</sup> Tiere im Alter von 16 Wochen zeigten sowohl unter fettreicher als auch unter fettarmer Diät niedrigere Seruminsulinspiegel als die B6mt<sup>AKR</sup> Tiere ( $p > 0,05$ ).

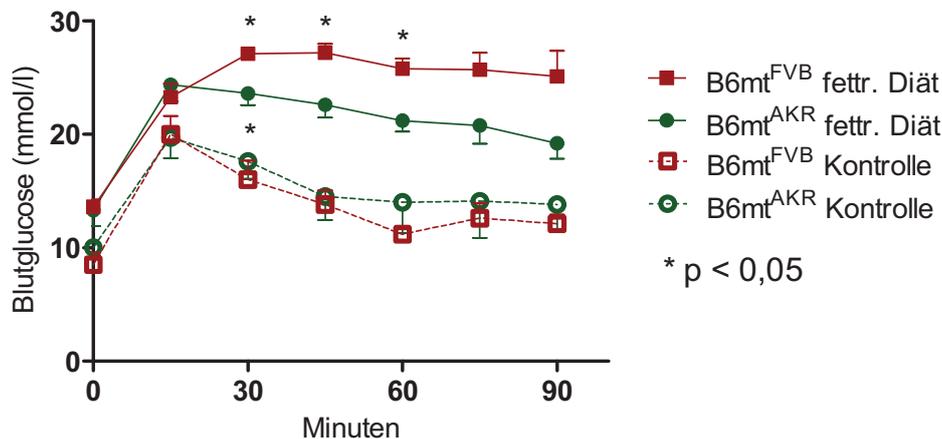
### 3.3.4 Glucosetoleranz von B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät

Der intraperitoneale Glucosetoleranztest wurde bei B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät in der 16. Woche durchgeführt. Den Tieren wurde für 4 bis 6 Stunden das Futter entzogen und anschließend 1,5 mg Glucose pro Gramm Körpergewicht i. p. injiziert.

Die Blutglucose beider Genotypen unter fettreicher Diät fiel nach der Glucose-Injektion langsamer ab als die Blutglucose der Tiere unter fettarmer Diät ( $p < 0,05$ ).

Die Blutglucosewerte der B6mt<sup>FVB</sup> Tiere unter fettreicher Diät waren nach der Glucose-Injektion signifikant höher als der Blutglucosespiegel der B6mt<sup>AKR</sup> Tiere ( $p < 0,05$ ). Die Blutglucose der B6mt<sup>FVB</sup> Tiere erreichte 45 Minuten nach der Glucose-Injektion den Maximalwert ( $27,2 \pm 0,78 \text{ mmol/l}$ ) und fiel danach auf  $25,1 \pm 2,27 \text{ mmol/l}$  (90 Minuten nach der Glucose-Injektion). Bei den B6mt<sup>AKR</sup> Tieren stieg die Blutglucose nach 15 Minuten auf den Maximalwert ( $20 \pm 1,49 \text{ mmol/l}$ ) und blieb konstant ( $19,2 \pm 1,35 \text{ mmol/l}$ , 90 Minuten nach der Injektion).

Unter fettarmer Diät zeigten die Blutglucoseverläufe der beiden Genotypen einen vergleichbaren Verlauf. Die Blutglucose stieg 15 Minuten nach der Glucose-Injektion auf den Maximalwert ( $B6mt^{FVB}$ :  $20 \pm 1,6$  mmol/l vs.  $B6mt^{AKR}$ :  $19,7 \pm 1,78$  mmol/l) und sank bis zum Ende der Messungen wieder ab ( $B6mt^{FVB}$ :  $12,1 \pm 0,83$  mmol/l vs.  $B6mt^{AKR}$ :  $13,8 \pm 2,41$  mmol/l ab; s. Abb. 3.3.4).



**Abb. 3.3.4** Glucosetoleranztest der  $B6mt^{FVB}$  und  $B6mt^{AKR}$  Tiere unter fettreicher und fettarmer Diät.

Dargestellt ist der intraperitoneale Glucosetoleranztest bei  $B6mt^{FVB}$  und  $B6mt^{AKR}$  Tieren ( $n = 4$ ) unter fettreicher und fettarmer Diät. Die Glucosetoleranz der  $B6mt^{FVB}$  Tiere unter fettreicher Diät war 30 – 60 Minuten nach der Glucose-Injektion signifikant schlechter als bei den  $B6mt^{AKR}$  Tieren ( $p < 0,05$ ). Insgesamt verschlechterte sich die Glucosetoleranz durch eine fettreiche Diät bei beiden Genotypen signifikant ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.5 Insulinsensitivität bei $B6mt^{FVB}$ und $B6mt^{AKR}$ Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät

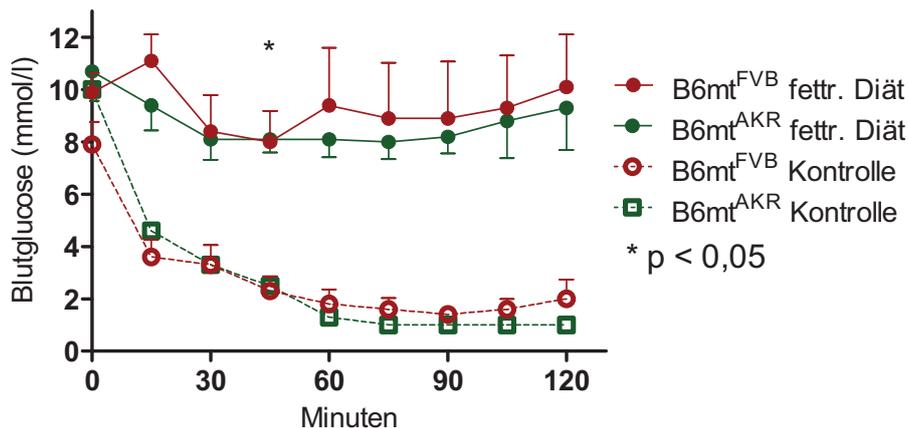
Die Insulinsensitivität wurde bei  $B6mt^{FVB}$  und  $B6mt^{AKR}$  Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät im Alter von 16 Wochen untersucht. Den Tieren wurden 0,8 U Insulin pro Gramm Körpergewicht i. p. injiziert.

Unter fettreicher Diät fiel die Blutglucose nach der Insulin-Injektion signifikant weniger ab, als unter fettarmer Diät ( $p < 0,05$ ).

Unter fettreicher Diät sank die Blutglucose bei den  $B6mt^{FVB}$  auf  $8 \pm 1,18$  mmol/l (45 Minuten nach Insulin-Injektion) und stieg anschließend wieder an ( $10,1 \pm 2,02$  mmol/l, 120 Minuten nach der Injektion). Bei den  $B6mt^{AKR}$  Tieren sank die Blutglucose auf  $8 \pm 0,66$  mmol/l (75

Minuten nach der Injektion) und stieg anschließend auf  $9,3 \pm 1,6$  mmol/l (120 Minuten nach der Injektion).

Die Blutglucosewerte beider Genotypen unter der fettarmen Diät zeigten nach der Insulin-Injektion einen vergleichbaren Verlauf und fielen deutlich ab. Bei den  $B6mt^{FVB}$  Tieren sank die Blutglucosekonzentration auf  $1,4 \pm 0,23$  mmol/l (90 Minuten nach der Injektion) und stieg danach auf  $2 \pm 0,74$  mmol/l (120 Minuten nach der Injektion). Bei den  $B6mt^{AKR}$  Tieren fiel die Blutglucosekonzentration auf 1 mmol/l (120 Minuten nach der Injektion; s. Abb. 3.3.5).



**Abb. 3.3.5** Insulinsensitivität der  $B6mt^{FVB}$  und  $B6mt^{AKR}$  Tiere unter fettreicher und fettarmer Diät.

Dargestellt ist die Insulinsensitivität von  $B6mt^{FVB}$  und  $B6mt^{AKR}$  Tieren ( $n = 4$ ) unter fettreicher und fettarmer Diät. Die Tiere, die eine fettreiche Diät erhielten, zeigten eine deutlich schlechtere Insulinsensitivität als die Tiere unter Kontrolldiät. Die Insulinsensitivität verschlechterte sich unter fettreicher Diät bei beiden Genotypen signifikant ( $p < 0,05$ ).

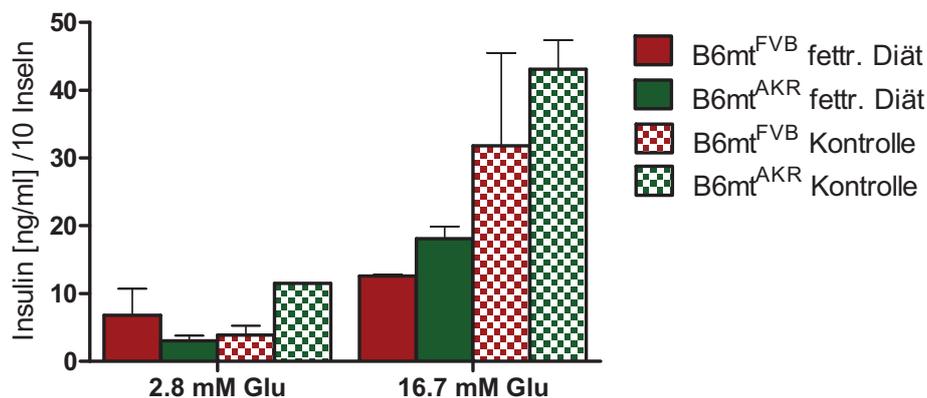
### 3.3.6 Glucosestimulierte Insulinsekretion (GSIS) ex vivo aus pankreatischen $\beta$ -Zellen von $B6mt^{FVB}$ und $B6mt^{AKR}$ Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät

Die isolierten pankreatischen Inseln von 16 Wochen alten Tieren wurden mit zwei verschiedenen Krebs-Ringer-Puffern (KR-Puffer) inkubiert. Dabei diente der KR-Puffer mit 16,7 mM Glucose als Stimulationsreiz und der KR-Puffer mit 2,8 mM Glucose als substimulatorische Kontrolle.

Unter fettreicher Diät sezernierten die Inseln der  $B6mt^{FVB}$  Tiere nach der Stimulation mit 16,7 mM Glucose weniger Insulin als die  $B6mt^{AKR}$  Tiere ( $B6mt^{FVB}$ :  $12,6 \pm 0,17$  ng/ml Insulin pro 10 Inseln vs.  $B6mt^{AKR}$   $18,1 \pm 1,8$  ng/ml Insulin pro 10 Inseln;  $p > 0,05$ ). Bei der Inkubation mit 2,8 mM Glucose sezernierten die Inseln der  $B6mt^{FVB}$  Tiere mehr Insulin als die  $B6mt^{AKR}$

Tiere ( $B6mt^{FVB}$ :  $6,8 \pm 3,9$  ng/ml Insulin pro 10 Inseln vs.  $B6mt^{AKR}$ :  $3 \pm 0,78$  ng/ml Insulin pro 10 Inseln;  $p > 0,05$ ).

Unter Kontrolldiät sezernierten die Inseln der  $B6mt^{FVB}$  Tiere nach der Stimulation mit 16,7 mM Glucose weniger Insulin als die  $B6mt^{AKR}$  Tiere ( $B6mt^{FVB}$ :  $31,8 \pm 13,7$  ng/ml Insulin pro 10 Inseln vs.  $B6mt^{AKR}$ :  $43,1 \pm 4,3$  ng/ml Insulin pro 10 Inseln). Bei der Inkubation der Inseln beider Genotypen mit 2,8 mM Glucose sezernierten die Inseln der  $B6mt^{AKR}$  Tiere mehr Insulin als die  $B6mt^{FVB}$  Tiere ( $B6mt^{FVB}$ :  $3,9 \pm 1,32$  ng/ml Insulin pro 10 Inseln vs.  $B6mt^{AKR}$ :  $11,5$  ng/ml Insulin pro 10 Inseln;  $p > 0,05$ ; s. Abb. 3.3.6).



**Abb. 3.3.6** Glucosestimulierte Insulinsekretion ex vivo.

Die Darstellung zeigt die GSIS ex vivo der isolierten Pankreasinseln von  $B6mt^{FVB}$  und  $B6mt^{AKR}$  Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät im Alter von 16 Wochen. Es wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt. Die Inseln von  $B6mt^{FVB}$  Tieren sezernierten bei einem Stimulationsreiz von 16,7 mM jeweils weniger Insulin pro 10 Inseln als die Inseln von  $B6mt^{AKR}$  Tieren ( $p > 0,05$ ).

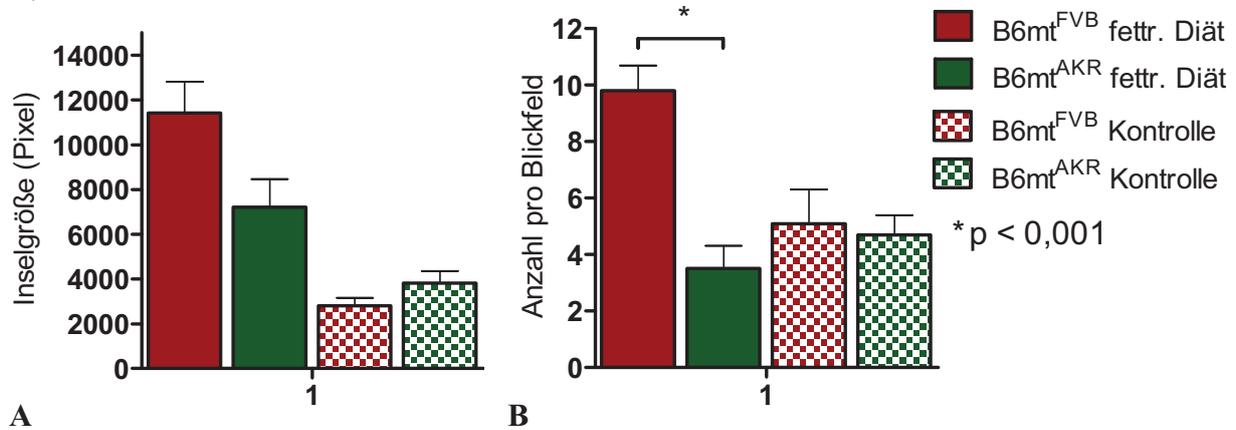
### 3.3.7 Größe und Anzahl der Langerhansschen Inseln in Pankreaspräparaten von $B6mt^{FVB}$ und $B6mt^{AKR}$ Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät

Die Anzahl und die Größe der Langerhansschen Inseln wurden in histologischen Pankreaspräparaten gezählt bzw. gemessen.

In den Pankreaspräparaten waren die Inseln der  $B6mt^{FVB}$  Tiere unter fettreicher Diät größer als die Inseln der  $B6mt^{AKR}$  Tiere ( $B6mt^{FVB}$ :  $11.400 \pm 1.400$  Pixel vs.  $B6mt^{AKR}$ :  $7.200 \pm 1.250$  Pixel;  $p > 0,05$ ). Die Inseln der  $B6mt^{FVB}$  und  $B6mt^{AKR}$  Tiere unter fettarmer Diät zeigten keine Größenunterschiede ( $B6mt^{FVB}$ :  $2.800 \pm 350$  Pixel vs.  $B6mt^{AKR}$ :  $3.800 \pm 550$  Pixel; s. Abb. 3.3.7 A, C, D).

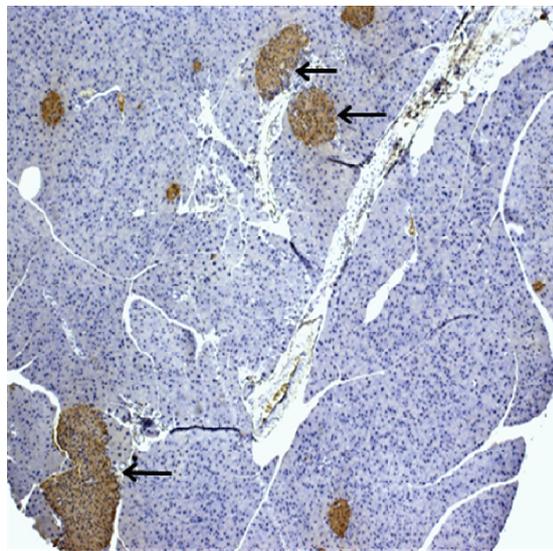
In den Pankreaspräparaten der  $B6mt^{FVB}$  Tiere unter fettreicher Diät wurden signifikant mehr Inseln pro Blickfeld gezählt als bei den  $B6mt^{AKR}$  Tieren ( $B6mt^{FVB}$ :  $9,8 \pm 0,9$  Inseln pro Blick-

feld vs.  $B6mt^{AKR}$ :  $3,5 \pm 0,8$  Inseln pro Blickfeld;  $p < 0,001$ ). Unter der fettarmen Diät zeigten sich in der Anzahl der Inseln keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen ( $B6mt^{FVB}$ :  $5,1 \pm 1,2$  Inseln pro Blickfeld vs.  $B6mt^{AKR}$ :  $4,7 \pm 0,7$  Inseln pro Blickfeld; s. Abb. 3.3.7 B - D).

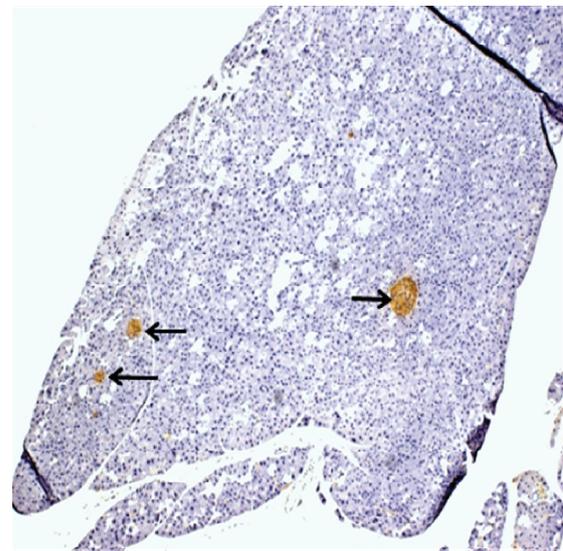


**Abb. 3.3.7 Größe (A) und Anzahl (B) der Langerhansschen Inseln in histologischen Pankreaspräparaten.**

Diese Darstellung zeigt die Größe (3.3.7 A) und Anzahl (3.3.7 B) der Langerhansschen Inseln in histologischen Pankreaspräparaten von  $B6mt^{FVB}$  und  $B6mt^{AKR}$  Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät ( $n = 8$ ). Unter fettreicher Diät wiesen die  $B6mt^{FVB}$  Tiere im Gegensatz zu den  $B6mt^{AKR}$  Tieren signifikant mehr Inseln auf ( $p < 0,001$ ). Desweiteren waren die pankreatischen Inseln der  $B6mt^{FVB}$  Tieren größer als die der  $B6mt^{AKR}$  Tiere ( $p > 0,05$ ).



C



D

**Abb. 3.3.7 C+D Histologische Pankreaspräparate mit einer immunhistologischen Insulinfärbung.**

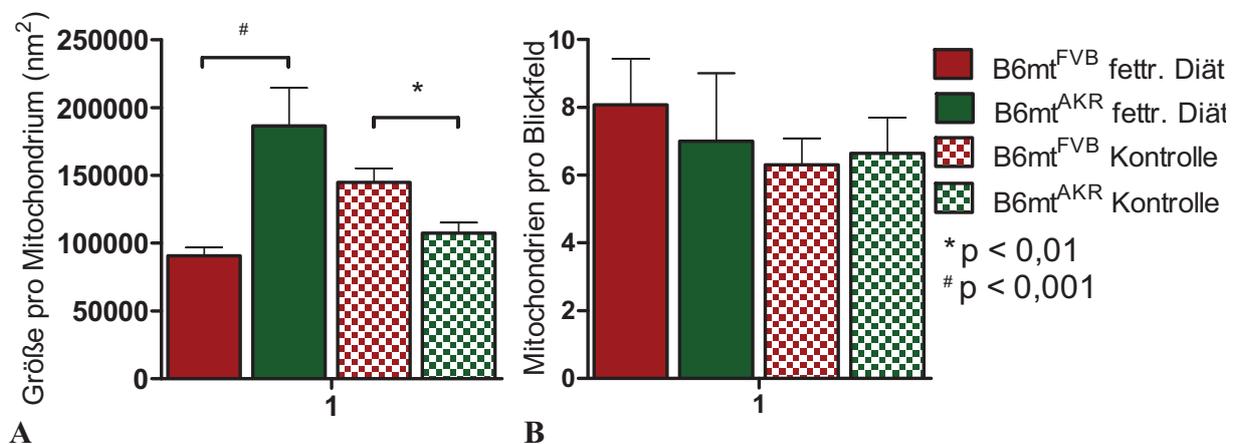
Die Darstellung zeigt exemplarisch eine immunhistologische Insulinfärbung von  $B6mt^{FVB}$  Tieren unter fettreicher Diät (3.3.7 C) und fettarmer Diät (3.3.7 D). Im Gegensatz zu den  $B6mt^{AKR}$  Tieren zeigten sich bei den  $B6mt^{FVB}$  Tieren deutlich größere und signifikant mehr Inseln (Pfeile) in den Pankreasschnitten ( $p < 0,001$ ).

### 3.3.8 Größe und Anzahl der Mitochondrien in pankreatischen $\beta$ -Zellen von $B6mt^{FVB}$ und $B6mt^{AKR}$ Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät

Um die Größe und die Anzahl der Mitochondrien in pankreatischen  $\beta$ -Zellen zu ermitteln, wurden Pankreaspräparate angefertigt und mit Hilfe eines Elektronenmikroskops untersucht.

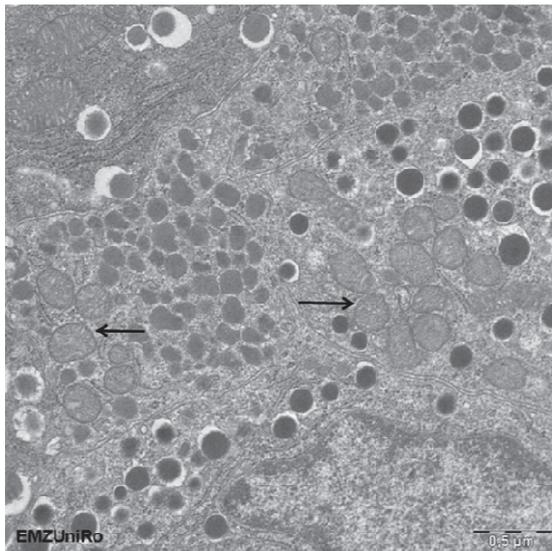
Unter der fettreichen Diät wiesen die  $\beta$ -Zellen der  $B6mt^{AKR}$  Tiere signifikant größere Mitochondrien auf als die  $\beta$ -Zellen der  $B6mt^{FVB}$  Tiere ( $B6mt^{FVB}$ :  $90.664 \pm 6.241 \text{ nm}^2$  vs.  $B6mt^{AKR}$ :  $186.477 \pm 27.898 \text{ nm}^2$ ;  $p < 0,001$ ). Unter der fettarmen Diät waren die Mitochondrien der  $B6mt^{FVB}$  Tiere signifikant größer als die Mitochondrien der  $B6mt^{AKR}$  Tiere ( $B6mt^{FVB}$ :  $144.809 \pm 10.562 \text{ nm}^2$  vs.  $B6mt^{AKR}$ :  $107.406 \pm 8.006 \text{ nm}^2$ ;  $p < 0,01$ ; s. Abb. 3.3.8 A, Abb. 3.3.9).

Unter der fettreichen Diät wiesen die  $\beta$ -Zellen der  $B6mt^{FVB}$  Tiere eine höhere Anzahl an Mitochondrien auf als die  $\beta$ -Zellen der  $B6mt^{AKR}$  Tiere ( $B6mt^{FVB}$ :  $8,07 \pm 1,36$  Mitochondrien pro Blickfeld vs.  $B6mt^{AKR}$ :  $7 \pm 2$  Mitochondrien pro Blickfeld;  $p > 0,05$ ). Die Anzahl der Mitochondrien in den  $\beta$ -Zellen von  $B6mt^{FVB}$  und  $B6mt^{AKR}$  Tieren unter fettarmer Diät unterschied sich zwischen den beiden Genotypen nicht ( $B6mt^{FVB}$ :  $6,31 \pm 0,78$  Mitochondrien pro Blickfeld vs.  $B6mt^{AKR}$ :  $6,64 \pm 1,05$  Mitochondrien pro Blickfeld; s. Abb. 3.3.8 B, Abb. 3.3.9).

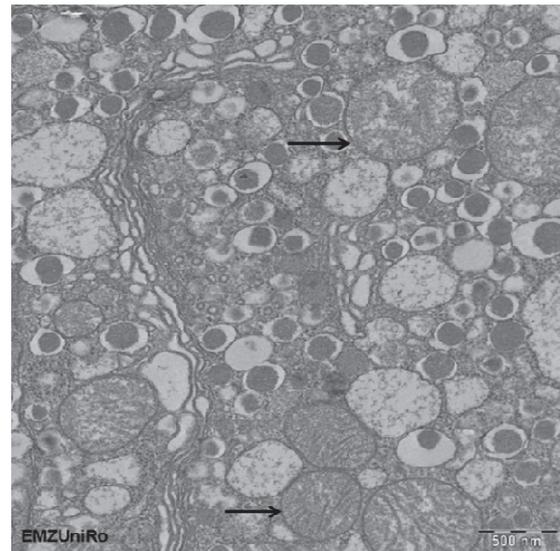


**Abb. 3.3.8 Größe (A) und Anzahl (B) der Mitochondrien in pankreatischen  $\beta$ -Zellen.**

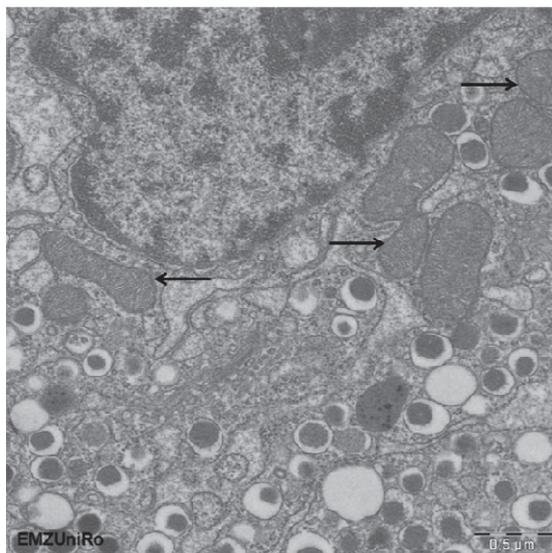
Die Abbildung zeigt die Größe (3.3.8 A) und Anzahl (3.3.8 B) der Mitochondrien in pankreatischen  $\beta$ -Zellen von  $B6mt^{FVB}$  und  $B6mt^{AKR}$  Tieren unter fettreicher und fettarmer Diät. Es wurden acht unabhängige Experimente durchgeführt. Unter der fettreichen Diät waren die Mitochondrien der  $B6mt^{FVB}$  Tiere signifikant kleiner als die der  $B6mt^{AKR}$  Tiere ( $p < 0,001$ ). Die  $B6mt^{FVB}$  Tiere wiesen im Gegensatz zu den  $B6mt^{AKR}$  Tieren eine höhere Anzahl an Mitochondrien auf ( $p > 0,05$ ). Unter der fettarmen Diät waren die Mitochondrien der  $B6mt^{FVB}$  Tiere signifikant größer als die der  $B6mt^{AKR}$  Tiere ( $p < 0,01$ ).



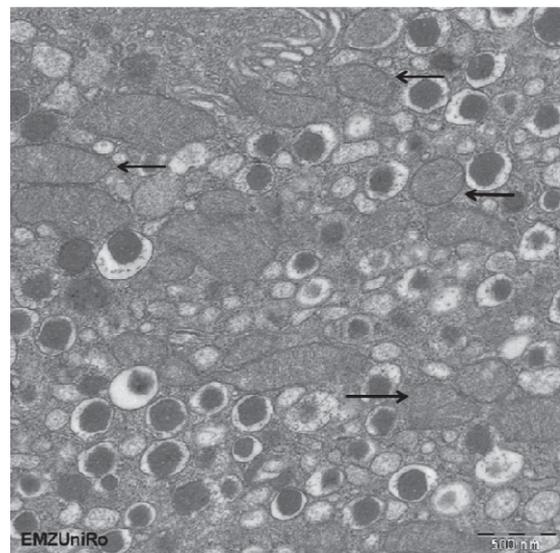
A



B



C



D

**Abb. 3.3.9 A-D Elektronenmikroskopische Aufnahmen von pankreatischen  $\beta$ -Zellen.**

Die Abbildungen zeigen exemplarisch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrien (Pfeile) aus pankreatischen  $\beta$ -Zellen von  $B6mt^{FVB}$  Tieren unter fettreicher Diät (3.3.9 A) und Kontrolldiät (3.3.9 C) sowie von  $B6mt^{AKR}$  Tieren unter fettreicher Diät (3.3.9 B) und Kontrolldiät (3.3.9 D). Die  $B6mt^{FVB}$  Tiere unter fettreicher Diät wiesen im Gegensatz zu den  $B6mt^{AKR}$  Tieren kleinere Mitochondrien auf.

### 3.4 Untersuchungen der Auswirkungen des $mt^{FVB/N}$ -Genotyps auf mitochondriale Funktionen

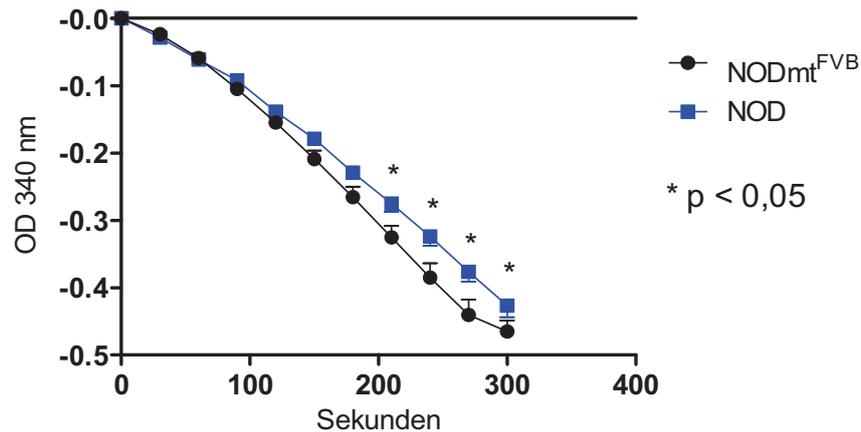
Die FVB-Mutation weist eine Variation im  $mt\text{-}Atp\text{-}8$ -Gen auf, das für eine Untereinheit der ATPase im Komplex V der Atmungskette kodiert. Um den Einfluss dieser Mutation genauer zu untersuchen, wurden Versuche an isolierten Mitochondrien durchgeführt. Es wurden für die Versuche Mitochondrien aus Milz und Leber verwendet, da die Mitochondrien-Isolation aus  $\beta$ -Zellen keine ausreichende Menge für Untersuchungen ergab.

#### 3.4.1 *Aktivität des ATPase-Komplexes in isolierten Mitochondrien von $NODmt^{FVB}$ und $NOD$ Tieren sowie von $B6mt^{FVB}$ und $B6mt^{AKR}$ Tieren*

In der Atmungskette wird NADH zu NAD oxidiert. NADH hat im Gegensatz zu NAD bei 340 nm ein Extinktionsmaximum. Wird NADH zu NAD oxidiert, nimmt folglich die Extinktion ab. So lässt das Ausmaß der Extinktionsänderung einen Rückschluss auf die Enzymaktivität der ATP-Synthase (ATPase) zu. Zur Beurteilung der ATPase-Aktivität wurde die Extinktionsänderung von isolierten Mitochondrien unter Zugabe von NADH gemessen.

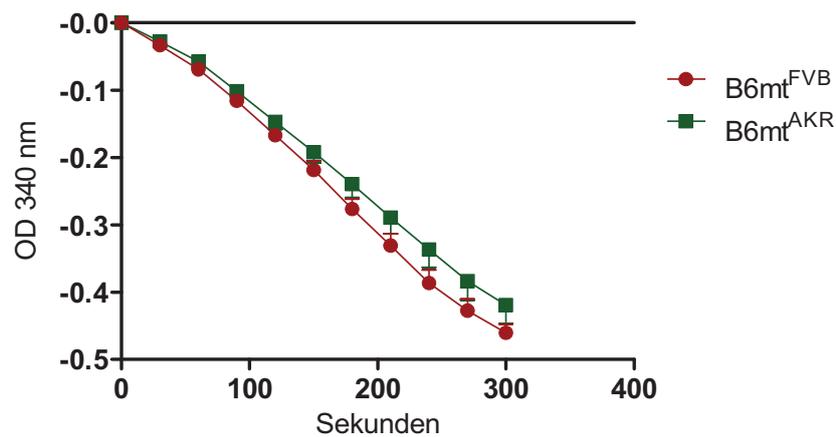
Bei den Mitochondrien der  $NODmt^{FVB}$  Tiere nahm die Extinktion signifikant stärker ab, als bei den Mitochondrien der  $NOD$  Tiere ( $NODmt^{FVB}$ : 46,5-fach vs.  $NOD$ : 42,7-fach;  $p < 0,05$ ; s. Abb. 3.4.1 A).

Bei den Mitochondrien der  $B6mt^{FVB}$  Tiere nahm die Extinktion stärker ab, als bei den Mitochondrien der  $B6mt^{AKR}$  Tieren ( $B6mt^{FVB}$ : 46-fach vs.  $B6mt^{AKR}$ : 41,9-fach;  $p > 0,05$ ; s. Abb. 3.4.1 B).



**Abb. 3.4.1 A** Aktivität des ATPase-Komplexes in isolierten Mitochondrien von NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren.

Dargestellt ist die Aktivität des ATPase-Komplexes in isolierten Milz-Mitochondrien von NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren (n = 9). Bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren nahm die Extinktion stärker ab als bei den NOD Tieren (p < 0,05). Im Vergleich mit den NOD Tieren war die Aktivität der ATPase bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren gesteigert.



**Abb. 3.4.1 B** Aktivität des ATPase-Komplexes in isolierten Mitochondrien von B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tieren.

Die Darstellung zeigt die Aktivität des ATPase-Komplexes in isolierten Milz-Mitochondrien von B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tieren (n = 10 – 11). Die Extinktion nahm bei den Mitochondrien der B6mt<sup>FVB</sup> Tiere stärker ab als bei den B6mt<sup>AKR</sup> Tieren (p > 0,05). Im Vergleich mit den B6mt<sup>AKR</sup> Tieren war die Aktivität der ATPase bei den B6mt<sup>FVB</sup> Tieren gesteigert.

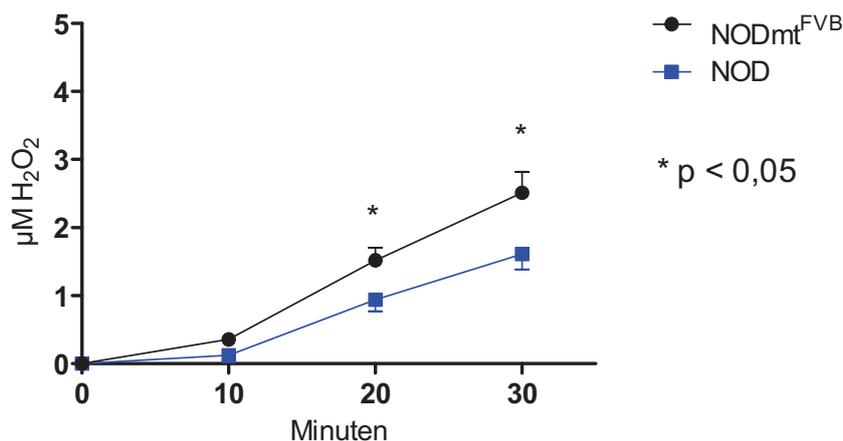
### 3.4.2 $H_2O_2$ -Produktion in isolierten Mitochondrien von $NODmt^{FVB}$ und NOD Tieren sowie von $B6mt^{FVB}$ und $B6mt^{AKR}$ Tieren

Mitochondrien sind Produzenten reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), werden aber auch durch ROS geschädigt. Die FVB-Mutation führt dazu, dass in isolierten Mitochondrien die Konzentration von ROS, z. B.  $H_2O_2$  ansteigt.

Für die Messung der  $H_2O_2$ -Produktion wurde das Amplex-Red-Kit verwendet.

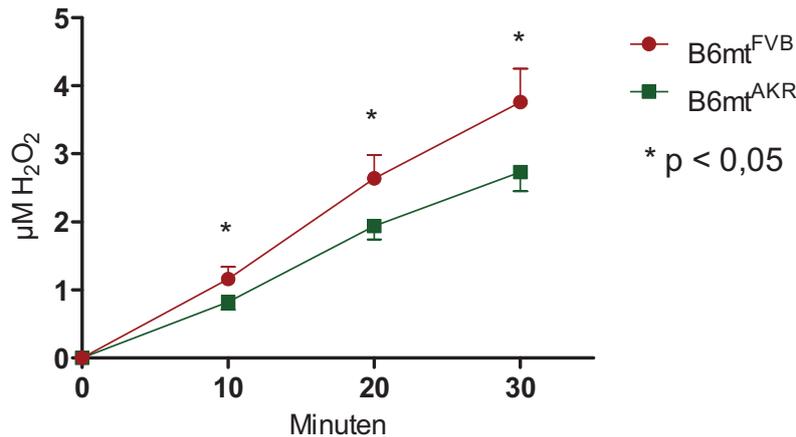
Die Mitochondrien der  $NODmt^{FVB}$  Tiere produzierten signifikant mehr  $H_2O_2$  als die Mitochondrien der NOD Tiere ( $NODmt^{FVB}$ :  $2,51 \pm 0,31 \mu M H_2O_2$  vs. NOD:  $1,61 \pm 0,22 \mu M H_2O_2$ , jeweils nach 30 Minuten Inkubation;  $p < 0,05$ ; s. Abb. 3.4.2 A).

Die Mitochondrien der  $B6mt^{FVB}$  produzierten signifikant mehr ROS als die Mitochondrien der  $B6mt^{AKR}$  Tiere ( $B6mt^{FVB}$ :  $3,76 \pm 0,49 \mu M H_2O_2$  vs.  $B6mt^{AKR}$ :  $2,73 \pm 0,28 \mu M H_2O_2$ , jeweils nach 30 Minuten;  $p < 0,05$ ; s. Abb. 3.4.2 B).



**Abb. 3.4.2 A**  $H_2O_2$ -Produktion in isolierten Mitochondrien von  $NODmt^{FVB}$  und NOD Tieren.

Dargestellt ist die  $H_2O_2$ -Produktion in isolierten Milz-Mitochondrien von  $NODmt^{FVB}$  und NOD Tieren ( $n = 6$ ). Die  $H_2O_2$ -Produktion war in den Mitochondrien der  $NODmt^{FVB}$  Tiere signifikant höher als in den Mitochondrien der NOD Tiere ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 3.4.2 B** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion in isolierten Mitochondrien von B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tieren.

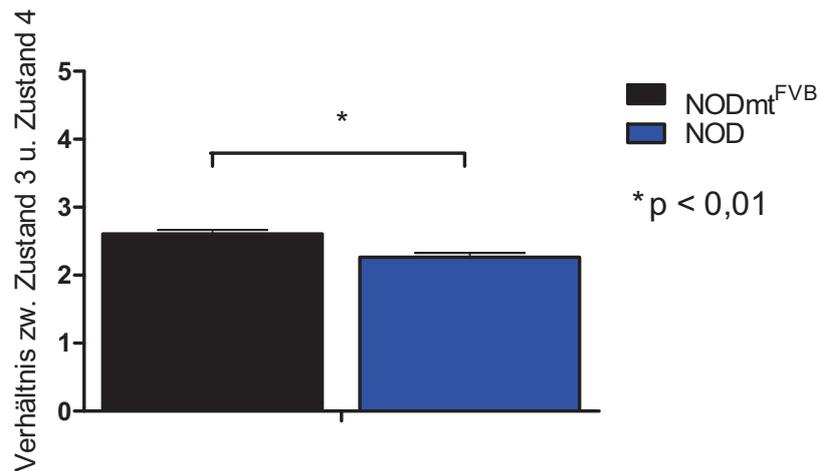
Die Abbildung zeigt die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion in isolierten Milz-Mitochondrien von B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tieren (n = 5 – 6). Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion war in den Mitochondrien der B6mt<sup>FVB</sup> Tiere signifikant höher als in den Mitochondrien der B6mt<sup>AKR</sup> Tiere (p < 0,05).

### 3.4.3 Sauerstoffverbrauch von isolierten Mitochondrien von NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren sowie von B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tieren

Die Zustände 3 und 4 der Atmungskette stellen die wichtigsten Zustände der Atmungskette dar (s. Kap. 1.2.2). Daher wurden bei den Versuchen zum Sauerstoffverbrauch von isolierten Mitochondrien die Zustände 3 und 4 untersucht.

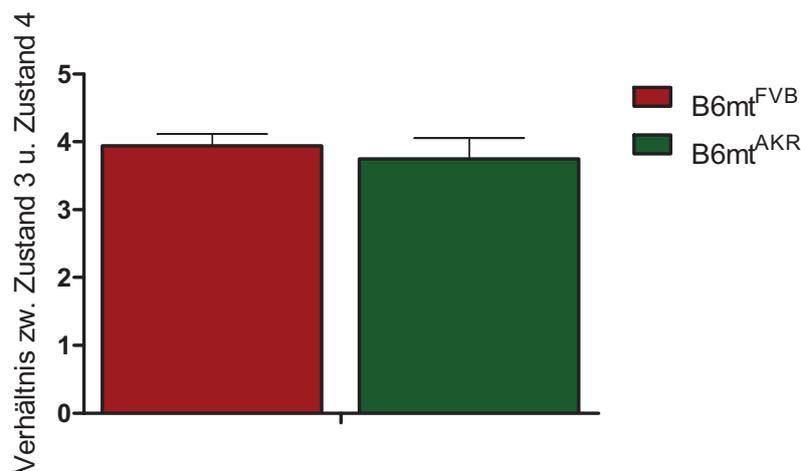
Bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren war das Verhältnis zwischen Zustand 3 und Zustand 4 signifikant größer als bei den NOD Tieren (NODmt<sup>FVB</sup>: 2,61 ± 0,06 vs. NOD: 2,27 ± 0,6; p < 0,01). Das Ergebnis zeigte, dass die oxidative Phosphorylierung gesteigert ablief (s. Abb. 3.2.3 A). Die Tabelle 3.1 zeigt zusätzlich, dass die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere im Zustand 3 signifikant mehr Sauerstoff verbraucht haben, als die Mitochondrien der NOD Tiere (p < 0,05).

Bei den Mitochondrien der B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tiere wurden keine Unterschiede der Verhältnisse zwischen Zustand 3 und Zustand 4 festgestellt (B6mt<sup>FVB</sup>: 3,94 ± 0,17 vs. B6mt<sup>AKR</sup>: 3,75 ± 0,31; s. Abb. 3.4.3 B).



**Abb. 3.4.3 A Sauerstoffverbrauch von isolierten Mitochondrien von NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren.**

Die Abbildung zeigt den Sauerstoffverbrauch von isolierten Leber-Mitochondrien aus NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren (n = 3). Der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien wurde mit Hilfe der Oxygraph DW 1 Clark Elektrode gemessen. Das Verhältnis zwischen Zustand 3 und 4 war bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren signifikant größer als bei den NOD Tieren (p < 0,01).



**Abb. 3.4.3 B Sauerstoffverbrauch von isolierten Mitochondrien von B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tieren.**

Dargestellt ist der Sauerstoffverbrauch von isolierten Leber-Mitochondrien von B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tieren (n = 5). Der Sauerstoffverbrauch wurde mit Hilfe der Oxygraph DW 1 Clark Elektrode ermittelt. Es wurden keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen bezüglich des Sauerstoffverbrauches festgestellt.

**Tab. 3.1 Sauerstoffverbrauch von NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren.**

Die Tabelle zeigt den Sauerstoffverbrauch von isolierten Leber-Mitochondrien aus NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren unter Zustand 3 und Zustand 4 Bedingungen. Der Sauerstoffverbrauch der NODmt<sup>FVB</sup> Tiere war unter Zustand 3 Bedingungen signifikant größer ( $p < 0,05$ ).

Genotyp	O <sub>2</sub> -Verbrauch Zustand 4	O <sub>2</sub> -Verbrauch Zustand 3	Verhältnis 3:4
NODmt <sup>FVB</sup>	5,75 ± 0,01	15,04 ± 0,46	2,61 ± 0,08
NOD	5,65 ± 0,13	12,83 ± 0,63 p < 0,05	2,27 ± 0,08 p < 0,05

## 4 Diskussion

Die in den Mitochondrien lokalisierte oxidative Phosphorylierung ist die Hauptenergiequelle in aeroben Organismen. Daraus folgt, dass veränderte mitochondriale Eigenschaften, z. B. verursacht durch Mutationen der mitochondrialen DNA (mtDNA), zu Erkrankungen führen können. Das mitochondriale Genom codiert für 37 Gene, darunter auch für 13 Untereinheiten der Komplexe der Atmungskette (u. a. die ATP-8 Untereinheit des Komplexes V), rRNAs und tRNAs. Defekte der mtDNA führen daher oftmals zu einer Veränderung der oxidativen Phosphorylierung (Wiederkehr & Wollheim 2006). Der Einfluss mitochondrialer DNA-Mutationen macht sich vor allem in Geweben mit hohem Energiebedarf bemerkbar, z. B. Nervenzellen, Muskelzellen und pankreatischen  $\beta$ -Zellen. Aufgrund der gestörten Energiebereitstellung resultieren bestimmte Erkrankungen, z. B. Myopathie, Demenz oder kardiale Reizleitungsstörungen (Jacksch-Angerer *et al.* 1999). In den  $\beta$ -Zellen des Pankreas besitzen die Mitochondrien eine Schlüsselrolle bei der glucosestimulierten Insulinsekretion (GSIS), indem sie das für die GSIS essentielle ATP synthetisieren (Wiederkehr & Wollheim 2006).

Der ATP-Synthase Komplex besteht aus zwei Komponenten: dem  $F_0$ -Teil, der als Protonenkanal dient und in der inneren Mitochondrienmembran verankert ist, sowie dem  $F_1$ -Teil, der in den Matrixraum hineinragt und das katalytische Zentrum darstellt. Nur beide Anteile zusammen sind in der Lage ATP zu synthetisieren (Löffler *et al.* 2006). Das mt-*Atp-8*-Gen codiert für eine Untereinheit im  $F_0$ -Anteil (da Fonseca *et al.* 2008). Untersuchungen an Hefen haben gezeigt, dass die ATP-8 Untereinheit für den Aufbau und die Funktion des  $F_0$ -Anteils essentiell ist (Devenish *et al.* 2000). Die korrekte Assemblierung ist somit für die ATP-Synthese unabdingbar. ATP dient als universeller Energielieferant für alle Zellen des Organismus und wird für viele physiologische Prozesse benötigt, unter anderem für die Insulinsekretion. Bei der Insulinsekretion führt ATP zur Inhibition von ATP-abhängigen Kaliumkanälen der  $\beta$ -Zelle, wodurch die Insulinsekretion stimuliert wird (Langin 2001).

Beim Menschen sind Krankheiten bekannt, die auf mitochondriale Mutationen zurückzuführen sind. Die bekannteste humane Mutation ist die „*Common Deletion*“, die mit einer Länge von 5000 Basenpaaren ein Drittel des gesamten mitochondrialen Genoms betrifft. Sie führt zu einem Verlust von Genen, die für Untereinheiten der Komplexe I, IV und V sowie fünf tRNAs kodieren. Phänotypisch führt sie je nach Organmanifestation zur chronisch progredienten externen Ophthalmoplegie, zum Kearns-Sayre-Syndrom oder zum Pearson-Syndrom (Jacksch-Angerer *et al.* 1999). Darüber hinaus sind beim Menschen eine Vielzahl weiterer

Mutationen bekannt, darunter auch Mutationen im mt-*ATP-8*-Gen, die z. B. zu schwerer Leukodystrophie und hypertropher Kardiomyopathie führen (Mkaouar-Rebai *et al.* 2010).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss einer Variante des mitochondrialen *Atp-8*-Gens (mt-*Atp-8*) auf mitochondriale Grundfunktionen pankreatischer  $\beta$ -Zellen sowie deren Veränderungen unter metabolischer Belastung zu untersuchen. Um diese Mutation isoliert betrachten zu können, wurde die Mutation des mt-*Atp-8*-Gens auf den genetischen Hintergrund der NOD und B6 Mäuse übertragen.

#### 4.1 Auswirkungen der mitochondrialen Variante des *Atp-8*-Gens ( $mt^{FVB/N}$ ) auf das Autoimmungeschehen der NOD Maus

Das mitochondriale Genom des NOD Stammes ist gegenüber  $NODmt^{FVB}$  an drei Stellen polymorph: neben dem *mt-Atp-8*-Gen auch im *mt-Cox-III*-Gen sowie in einem Bereich der *mt-t-rna<sup>Arg</sup>* (Yu *et al.* 2009a).

Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation des *mt-Atp-8*-Gens zu vermehrtem Auftreten von Autoimmunkrankheiten führt, z. B. Collagen-induzierte Arthritis, Nephritis und Autoimmunpankreatitis (Yu *et al.* 2009b). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit für den Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM) der NOD Maus bestätigt werden. Für die Erhöhung der Suszeptibilität gegenüber dem T1DM spielt im NOD Modell offensichtlich nur die Mutation im *mt-Atp-8*-Gen eine Rolle, während Variationen im *mt-Cox-III*-Gen und in einem Bereich der *mt-t-rna<sup>Arg</sup>* die Suszeptibilität für T1DM nicht erhöhen (Mathews *et al.* 2005).

Im Serum der  $NODmt^{FVB}$  Tiere wurden zu einem früheren Zeitpunkt höhere Insulin-Autoantikörper (IAA)-Konzentrationen gemessen als bei den NOD Tieren. Ebenso zeigte sich bei den  $NODmt^{FVB}$  Tieren nach der 20. Woche eine erhöhte kumulative Diabetesinzidenz. Von den  $NODmt^{FVB}$  Tieren erkrankten mehr Tiere und vor allem bei den männlichen Tieren war das Manifestationsalter signifikant niedriger als bei den NOD Tieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Mutation des *mt-Atp-8*-Gens zu einer vermehrten Synthese reaktiver Sauerstoffmetabolite (ROS) in isolierten Mitochondrien von Leber- und Milzzellen führt (Yu *et al.* 2009b). ROS entstehen in den Mitochondrien als Nebenprodukte der Atmungskette. Anstelle der Reduktion des molekularen Sauerstoffes zu  $H_2O$ , können einige Elektronen die innere Mitochondrienmembran passieren und reagieren im mitochondrialen Matrixraum als Superoxid ( $O_2^-$ ) zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oder Hydroxylradikalen ( $OH\cdot$ ) (Wiederkehr & Wollheim 2006). Vor allem im Matrixraum sind die Mitochondrien sehr vulnerabel gegenüber ROS, da sich dort unter anderem mtDNA, mtRNA und Enzyme der  $\beta$ -Oxidation sowie des Citrat-Zyklus befinden. Zusätzlich spielen ROS aufgrund ihrer Fähigkeit Lipide, Proteine und Nukleinsäuren zu schädigen (Robertson 2006) eine wichtige Rolle bei der autoimmunen Schädigung der  $\beta$ -Zellen. Die durch ROS geschädigten Zellen setzen Proteine als Antigene frei, die zur Entstehung neuer immunogener Epitope an der Zelloberfläche führen, die als Autoantigen T-Lymphozyten und Makrophagen aktivieren. Schließlich kommt es zur autoreaktiven Schädigung der  $\beta$ -Zelle (Trigwell *et al.* 2001).

In der Pathogenese des T1DM spielen Autoantikörper eine wichtige Rolle. Die häufigsten Autoantikörper, die beim T1DM nachgewiesen werden, sind gegen Glutamatdecarboxylase

(GAD), Tyrosinphosphatase und Insulin gerichtet (Piro *et al.* 2008). Die Arbeitsgruppe von S. Trigwell konnte nachweisen, dass ROS zu einer Modifikation der GAD führen. Dabei wurde gezeigt, dass in vitro durch die Fenton-Reaktion generierte ROS zu einem höheren Molekulargewicht der GAD führten. Interessanterweise wurden in Serum von T1DM Patienten vor allem Antikörper gegen GAD mit dieser spezifischen Veränderung des Molekulargewichts gefunden (Trigwell *et al.* 2001).

Erhöhter oxidativer Stress, ausgelöst durch ein Ungleichgewicht zwischen ROS-Produktion und Verfügbarkeit antioxidativer Systeme, ist mit vermehrter Lipid-Peroxidation assoziiert (Kurien & Scofield 2008). Durch Lipid-Peroxidation kommt es zur Freisetzung von 4-Hydroxy-2-Alkenen, die wiederum zur Bildung von Addukten mit Aminogruppen von Lysin und anderen Aminosäuren führen. Diese durch Adduktbildung veränderten Proteine sind sehr immunogen und können zur Formierung von Autoantikörpern führen (Kurien & Scofield 2008). Auch beim systemischen Lupus erythematoses (SLE), dessen Pathomechanismus unter anderem auf Autoantikörper gegen nukleäre Bestandteile beruht, wurde der Einfluss von ROS auf die Synthese von Autoantikörper beschrieben. Das 60-kDa-Ro ist ein Ziel der Autoantikörper beim SLE und wird durch HNE, einem 4-Hydroxy-2-Alken, so modifiziert, dass es zur Bildung von chemischen Addukten kommt, die als Neoantigene dienen können. Das durch ROS modifizierte 60-kDa-Ro wird von den antigen-präsentierenden Zellen leichter endozytiert, als das native 60-kDa-Ro, so dass es zu einer schnelleren und massiveren Generierung von Autoantikörpern gegen 60-kDa-Ro kommt (Newsholme *et al.* 2006).

Die  $\beta$ -Zell-Destruktion beim T1DM wird durch T-Lymphozyten und Makrophagen verursacht sowie durch zirkulierende Autoantikörper, die für die Aktivierung der T-Lymphozyten verantwortlich sind. Es gibt Hinweise, dass diese Autoantikörper bereits zu einem frühen Zeitpunkt auftreten, ohne dass es sofort zu Insulinitis und T1DM kommt. Das spricht dafür, dass der Pool autoreaktiver T-Zellen zunächst ausreichend vom Immunsystem kontrolliert wird. Erst durch bestimmte Auslöser kommt es zur Aktivierung und zur Ausdehnung der autoreaktiven T-Zellpopulation mit Insulinitis,  $\beta$ -Zell-Untergang und T1DM (In't Veld *et al.* 2007). Es werden viele verschiedene Faktoren diskutiert, die zur Aktivierung autoreaktiver Immunzellen führen, wie Virusinfektionen, Impfungen, Ernährungsgewohnheiten im Kleinkindalter und viele andere mehr (Piro *et al.* 2008). Zu diesen Faktoren könnte auch eine gesteigerte mitochondriale ROS-Produktion gehören, die bei den NOD<sup>mt<sup>FVB</sup></sup> Tieren zu einer gesteigerten Inzidenz und früheren Manifestation des T1DM führt.

## 4.2 Lipidbelastungsstudie der NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Maus

Um den Einfluss der Mutation im *mt-Atp-8*-Gen auf metabolische Belastungen zu untersuchen, erhielten NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere über einen Zeitraum von zwölf Wochen entweder eine fettreiche (60 % cal aus Fett) oder eine fettarme Diät (10 % cal aus Fett).

Es wurde festgestellt, dass unter fettreicher Diät die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere signifikant größere und mehr Langerhanssche Inseln aufwiesen als die NOD Tiere. Unter Kontrolldiät wurden bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren signifikant kleinere Inseln beobachtet. Demnach nahm die Inselgröße bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren durch die Lipidbelastung zu.

Der T1DM resultiert durch eine autoimmune Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen. Das klinische Vollbild des T1DM manifestiert sich nicht mit dem Beginn der autoimmunen Destruktion, sondern erst wenn 80 % der  $\beta$ -Zellen zerstört sind (Gillespie 2006). Solange nicht mehr als 80 % der  $\beta$ -Zellen untergegangen sind, können die verbleibenden  $\beta$ -Zellen den Insulinmangel ausgleichen. Gleiches gilt für durch fettreiche Diät induzierte Insulinresistenz, die ebenfalls zu einem Insulinmangel führt (siehe unten). Die Kompensation geschieht zum einen durch vermehrte Insulinsekretion, zum anderen durch Vergrößerung der  $\beta$ -Zellmasse (Kubota *et al.* 2000). Die  $\beta$ -Zellmasse kann durch Replikation, Hypertrophie oder Formation neuer Langerhansscher Inseln erfolgen, wobei bei Nagetieren scheinbar die Replikation dominiert (Bonner-Weir 2000). Der genaue Mechanismus, der zur Vergrößerung der  $\beta$ -Zellmasse führt, ist bisher unklar. Eine wichtige Komponente könnte die Glucokinase darstellen (Weir & Bonner-Weir 2007). Die Glucokinase ist eine Hexokinase, die in den  $\beta$ -Zellen vorkommt und als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym die erste Reaktion der Glucoseoxidation katalysiert (Löffler *et al.* 2006). Welche Rolle die Glucokinase bei der Zunahme der Menge an insulinproduzierenden Geweben einnimmt, ist unklar. Es konnten jedoch an einem glucokinase-defizienten Tiermodell unter metabolischer Belastung, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, kein Zuwachs der  $\beta$ -Zellmasse beobachtet werden (Terauchi *et al.* 2007).

Durch die fettreiche Diät wurde zusätzlich zur autoimmunen Belastung des NOD Hintergrundes eine metabolische Belastung provoziert, die einen erhöhten Körperfettgehalt und damit auch erhöhte Fettsäurespiegel im Blut bedingt. Eine erhöhte Serumkonzentration an Fettsäuren ist mit einer peripheren Insulinresistenz assoziiert, so dass durch die lipidreiche Diät der Insulinmangel verstärkt wurde (Belfort *et al.* 2005).

Die bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren durch fettreiche Diät hervorgerufene Vergrößerung der pankreatischen Inseln könnte als Kompensationsmechanismus aufgefasst werden, der dazu dient, die Insulinsekretion zu steigern. Unter der Lipidbelastung ist lediglich ein Tier während des

Beobachtungszeitraumes diabetisch geworden. Das könnte einerseits an dem Kompensationsmechanismus liegen, der dafür sorgt, dass ausreichend Insulin sezerniert wird, andererseits wurden die Tiere nur bis zur 16. Lebenswoche untersucht. Bei der Beobachtung der NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere unter Standarddiät über einen längeren Zeitraum wurde festgestellt, dass die Manifestation des T1DM bei den männlichen NODmt<sup>FVB</sup> Tieren erst nach der 16. Woche beginnt (s. Kap. 3.1.1). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die fettreiche Diät nicht zu einer Beschleunigung der autoimmunen Zerstörung der  $\beta$ -Zellen führt. Da die Lipidbelastung bei beiden Genotypen zu keiner Erhöhung des Seruminsulins geführt hat, ist die Insulinsekretionsleistung vermutlich bei beiden Genotypen bereits eingeschränkt. Bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren scheint der Insulinmangel bereits so weit fortgeschritten zu sein, dass es kompensatorisch zur Vergrößerung der Langerhansschen Inseln kommt, während die NOD Tiere den Insulinbedarf ohne kompensatorische Vergrößerung der Inseln decken können.

### 4.3 Lipidbelastungsstudie der B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Maus

#### 4.3.1 Glucosetoleranz

Den Einfluss der metabolischen Belastung durch eine fettreiche Diät wurde auch bei den conplastischen Mausstämmen B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> untersucht. Das FVB-Genom und das AKR-Genom sind lediglich im mt-*Atp-8*-Gen polymorph (Yu *et al.* 2009a). Wie bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren wurde bei den B6mt<sup>FVB</sup> Tieren eine erhöhte ROS-Produktion nachgewiesen (s. Kap. 4.4.1).

Unter fettreicher Diät verschlechterte sich die Glucosetoleranz beider Genotypen signifikant. Zusätzlich zeigten die B6mt<sup>FVB</sup> Tiere unter Lipidbelastung eine signifikant verminderte Glucosetoleranz gegenüber den B6mt<sup>AKR</sup> Tieren.

Durch die fettreiche Diät kommt es auch außerhalb des Fettgewebes, z. B. in der Muskulatur oder in  $\beta$ -Zellen zu einer intrazellulären Anreicherung von Fettsäuren (Fex *et al.* 2007). Diese Fettsäuren werden vermehrt in die Mitochondrien transportiert, um dort durch enzymatische Reaktionen der  $\beta$ -Oxidation metabolisiert zu werden. Dabei werden Reduktionsäquivalente (FADH<sub>2</sub> und NADH + H<sup>+</sup>) frei, die in der Atmungskette reoxidiert werden. Somit gehen Elektronen in die Elektronentransportkette ein und es werden Protonen in den mitochondrialen Intermembranraum transportiert, so dass ein Protonengradient entsteht. Durch den Protonengradienten, der für die ATP-Synthese essentiell ist, entsteht ein Membranpotential an der inneren Mitochondrienmembran. Wenn durch die  $\beta$ -Oxidation große Mengen an Reduktionsäquivalenten zur Verfügung stehen und die Reaktionen der Atmungskette mit hoher Geschwindigkeit ablaufen, werden dementsprechend viele Protonen in den Intermembranraum gepumpt und es entsteht ein hohes Membranpotential. Je höher das Membranpotential ist, desto höher ist die mitochondriale ROS-Produktion, die sich wiederum schädigend auf mitochondriale Funktionen auswirkt (Krauss *et al.* 2003).

Da die B6mt<sup>FVB</sup> Tiere bereits ohne Lipidbelastung eine erhöhte ROS-Synthese in isolierten Mitochondrien aufwiesen, könnte es durch die fettreiche Diät zu einer massiven Steigerung der mitochondrialen ROS-Produktion zu kommen, so dass sich deren schädigende Wirkung potenziert.

Desweiteren kommt es durch den erhöhten Fettsäuregehalt in den Mitochondrien zur vermehrten Bildung von Lipid-Anionen, für die die innere Membran der Mitochondrien nicht permeabel ist (Ho *et al.* 2002). Die sich im Matrixraum befindenden Lipid-Anionen sind durch die dort entstehenden ROS sehr vulnerabel für Lipid-Peroxidation und auf diese Weise

entstehen in der Matrix zusätzliche ROS in Form von Lipid-Radikalen (Schrauwen & Hesselink 2004).

Dieses Ergebnis konnte allerdings von der Arbeitsgruppe um P. Moore nicht bestätigt werden, da die Arbeitsgruppe bei Lipidtoxizitätsuntersuchungen keine erhöhten ROS-Konzentrationen gemessen hatte (Moore *et al.* 2004). Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit wurden dort isolierte Inseln von Wistar-Ratten 24 bis 72 Stunden mit Palmitat oder Oleat inkubiert und eine Lipidbelastung *in vitro* geschaffen. In der vorliegenden Arbeit wurde durch die fettreiche Diät eine Lipidbelastung *in vivo* erzeugt. Außerdem wurde bei den Untersuchungen von P. Moore der zelluläre Gesamtgehalt von ROS mit dem Farbstoff Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA quantifiziert. Lediglich der Farbstoff MitoSOX<sup>®</sup> ist in der Lage mitochondrial erzeugtes ROS zu detektieren. Auch wurde in der vorliegenden Arbeit die ROS-Synthese in isolierten Mitochondrien quantifiziert, während bei P. Moore isolierte  $\beta$ -Zellen untersucht wurden. Auf Grund des unterschiedlichen Versuchsaufbaus lassen sich die unterschiedlichen Ergebnisse erklären.

Darüber hinaus konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass eine erhöhte ROS-Produktion Entkoppler der Atmungskette, „*uncoupling proteins*“ (UCPs), induziert (Skulachev 1998; Wiederkehr & Wollheim 2006). UCPs führen zu einem Rücktransport der Protonen vom Intermembranraum des Mitochondriums in die Matrix, ohne dass ATP synthetisiert wird. Durch UCPs wird die Respiration von der ATP-Synthese getrennt und die ATP-Synthese verringert sich. Die mitochondriale Bereitstellung von ATP ist für die Insulinsekretion essentiell. Das UCP 2 der  $\beta$ -Zelle ist homolog mit dem UCP 1 des braunen Fettgewebes. Die Arbeitsgruppe von B. Lowell hat gezeigt, dass eine vermehrte UCP 2-Expression einen negativen Einfluss auf die GSIS sowohl *in vivo* als auch *in vitro* hat (Lowell & Shulman 2005). Daher könnte eine vermehrte UCP 2-Expression ebenfalls einen Einfluss auf die Glucosetoleranz haben. Die Rolle des UCP 2 wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht.

#### 4.3.2 *Insulinsensitivität*

Die fettreiche Diät führte insgesamt zu einer signifikanten Verschlechterung der Insulinsensitivität. Zwischen den beiden Genotypen wurden jedoch keine Unterschiede festgestellt.

Der Mechanismus der Insulinresistenz erklärt sich durch folgende Eigenschaften des Insulinrezeptors: Der Insulinrezeptor besteht aus vier Untereinheiten ( $\alpha_2\beta_2$ ). Die  $\alpha$ -Untereinheiten befinden sich an der Außenseite der insulinabhängigen Gewebe (Pessin & Saltiel 2000). An

diese Untereinheiten bindet das Insulin und es kommt zu einer Konformationsänderung innerhalb des Rezeptors, die zu einer Aktivierung des zytosolischen Abschnitts der  $\beta$ -Untereinheiten führt. Dadurch kommt es zu einer ATP-abhängigen Autophosphorylierung intrazellulärer Insulinrezeptorsubstrate (IRS). Die Phosphorylierung der IRS resultiert in der Aktivierung der Phosphatidylinositolkinase 3 (Sivitz & Yorek 2010). Im Muskel- und Fettgewebe führt die Aktivierung der Phosphatidylinositolkinase 3 zur Translokation des Glucosetransporters Typ 4 (GLUT 4) in die Zellmembran und damit zu einer stark erhöhten Glucoseaufnahme in die Zelle. In der Leber führt die durch Insulin ausgelöste Signalkaskade zur Hemmung der Gluconeogenese und zur Verringerung der Glucosefreisetzung (Pessin & Saltiel 2000). Eine Störung dieser Signalkaskade führt unter anderem zu einer mangelhaften Glucoseaufnahme in Muskel- und Fettgewebe sowie zur Fehlregulierung von Glucosestoffwechselprozessen der Leber (Kashyap & DeFronzo 2007). Diesen Zustand bezeichnet man als Insulinresistenz.

In den folgenden Absätzen werden zwei mögliche Mechanismen erläutert, durch die eine fettreiche Diät die Insulinsensitivität verschlechtern kann.

1.) Die Fettsäureoxidation findet generell im Mitochondrium statt. Sind die Plasmakonzentrationen der Fettsäuren über einen längeren Zeitraum erhöht, z. B. durch fettreiche Diät, kommt es in Myozyten zu einer vermehrten Fettsäureaufnahme. Die  $\beta$ -Oxidation kann nicht unendlich gesteigert werden, so dass bei erhöhter intrazellulärer Fettsäurekonzentration die Fettsäuren akkumulieren. Vor allem der erhöhte Gehalt von Diacylglycerin (DAG) ist mit der Entstehung von Insulinresistenz assoziiert. DAG entsteht beim Abbau der Triacylglycerine (TAG), eine Speicherform der Fettsäuren, durch die TAG-Lipase unter Abspaltung einer Fettsäure. Die TAG-Lipase kommt vor allem im Fettgewebe vor, aber auch im Skelett- und Herzmuskel (Löffler *et al.* 2006). DAG führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase C, die wiederum zu einer Aktivierung einer Serinkinase führt. Dadurch wird ein Serinrest des IRS-1 phosphoryliert und damit inhibiert. Auf diese Weise wird die Tyrosinkinase-Kaskade des Insulinrezeptors und der sich anschließende Signalweg des IRS-1 blockiert (Sivitz & Yorek 2010).

2.) Für die korrekte Signalübertragung des Insulins via Insulinrezeptor auf das IRS-1 ist eine ATP-abhängige Autophosphorylierung notwendig. Folglich kann eine verminderte ATP-Synthese in den insulinabhängigen Geweben an der Entwicklung der Insulinresistenz beteiligt sein. Die Arbeitsgruppe von M. Abdul-Ghani konnte an isolierten Mitochondrien aus Skelettmuskel vom Menschen und von Mäusen zeigen, dass Palmitylcarnitin die ATP-Synthese hemmt. Palmitylcarnitin ist ein Fettsäuremetabolit, der zu einer Hemmung des Sauerstoffver-

brauches in isolierten Mitochondrien führt und darüber hinaus die Reduktion des Cytochrom c, einem wichtigen Bestandteil der Atmungskette, inhibiert (Abdul-Ghani *et al.* 2008).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich die Insulinsensitivität beider Genotypen unter fettreicher Diät deutlich verschlechtert. Da zwischen den beiden Genotypen kein Unterschied bestand, kann daraus geschlossen werden, dass die Signaltransduktion des Insulinrezeptors durch die Mutation des *mt-Atp-8*-Gens nicht gestört ist, so dass die Mutation vor allem zu einer Beeinträchtigung der Insulinsekretion und weniger der Insulinwirkung führt. Daraus lässt sich ableiten, dass die Peripherie, d. h. die insulinabhängigen Gewebe (Muskulatur, Fettgewebe, Leber usw.) durch die Mutation des *mt-Atp-8*-Gens nicht so stark beeinträchtigt sind, wie die  $\beta$ -Zellen.

### 4.3.3 Seruminsulinspiegel

Beim Vergleich der Seruminsulinspiegel in der 8. und 16. Woche fiel bei den  $B6mt^{AKR}$  Tieren unter Lipidbelastung eine Zunahme des Seruminsulins auf, während sich die Seruminsulinkonzentration der  $B6mt^{FVB}$  Tiere nicht änderte. Unter 4.3.2 wurde erwähnt, dass sich durch die fettreiche Diät die Insulinsensitivität beider Genotypen signifikant verschlechtert. Betrachtet man die Blutglucoseverläufe, fällt auf, dass trotz der verschlechterten Insulinsensitivität nur zwei Tiere pathologische Blutglucosewerte entwickelt haben.

Zwischen Insulinsensitivität und Insulinsekretion besteht eine Feedbackschleife, so dass Veränderungen der Sensitivität von gegenteiligen Veränderungen der Sekretion begleitet werden (Bruning *et al.* 1997). Das bedeutet, dass eine Verschlechterung der Insulinsensitivität, die zur Hyperglykämie führen würde, von einer gesteigerten Insulinsekretion kompensiert wird, so dass eine normoglykämische Stoffwechsellage erhalten bleibt. Bei einer insuffizienten Hyperinsulinämie kann der erhöhte Glucosespiegel nicht mehr kompensiert werden und es kommt zum Diabetes mellitus (Reaven 1993). Bei Untersuchungen an einem insulinresistenten Mausmodell konnte festgestellt werden, dass Insulinresistenz zu einer Steigerung der basalen Insulinsekretion führt (Asghar *et al.* 2006). Darüber hinaus konnte an Tiermodellen gezeigt werden, dass die Hyperinsulinämie durch Zunahme der Insulinsekretion und durch erhöhte  $\beta$ -Zellmasse gewährleistet wird (Kubota *et al.* 2000) (s. 4.2 u. 4.3.4).

Im Gegensatz zu den  $B6mt^{FVB}$  Tieren entwickelten die  $B6mt^{AKR}$  Tiere durch die fettreiche Diät eine deutliche Hyperinsulinämie. Bei den  $B6mt^{FVB}$  Tieren könnte diese Adaptation vor

allem durch eine eingeschränkte Insulinsekretionsleistung bedingt sein und weniger durch unzureichende Vergrößerung des insulinsezernierenden Gewebes (s. Kap. 4.3.4).

#### **4.3.4 Anzahl und Größe der Langerhansschen Inseln sowie Größe der Mitochondrien in pankreatischen $\beta$ -Zellen**

Wie bereits bei den NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tieren beobachtet werden konnte, zeigten sich auch bei den B6mt<sup>FVB</sup> Tieren unter fettreicher Diät größere Inseln als bei den B6mt<sup>AKR</sup> Tieren. Außerdem wiesen die B6mt<sup>FVB</sup> Tiere signifikant mehr Inseln auf. Wie unter 4.2 erläutert, scheint es sich dabei um einen Kompensationsmechanismus zu handeln. Die durch ROS geschädigten Zellen sind nur noch eingeschränkt zur GSIS fähig und durch die Abnahme der Insulinsensitivität besteht ein Insulinmangel. Wie unter 4.3.2 beschrieben, kommt es bei den B6mt<sup>FVB</sup> Tieren unter fettreicher Diät zu einer signifikant verstärkten Insulinresistenz. Eine Abnahme der Insulinsensitivität geht immer mit einer Hyperinsulinämie einher, so dass eine normoglykämische Stoffwechsellage beibehalten werden kann (Bruning *et al.* 1997). Die Arbeitsgruppe von N. Kubota konnte zeigen, dass der erhöhte Seruminsulinspiegel sowohl durch gesteigerte basale Insulinsekretion als auch durch Zunahme der  $\beta$ -Zellmasse erreicht werden kann (Kubota *et al.* 2000). Die  $\beta$ -Zellmasse kann durch verschiedene Mechanismen erhöht werden, wie  $\beta$ -Zell-Replikation, -Hypertrophie oder Formation neuer Inseln durch Neogenese (Weir & Bonner-Weir 2007). Der genaue Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt, jedoch scheint das Enzym Glucokinase eine wichtige Rolle zu spielen (Matschinsky 1996).

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich, dass die  $\beta$ -Zellen der B6mt<sup>FVB</sup> Tiere unter fettreicher Diät signifikant kleinere Mitochondrien aufwiesen als die B6mt<sup>AKR</sup> Tiere. Unter Kontrolldiät wurde die gegenteilige Beobachtung gemacht: die Mitochondrien der B6mt<sup>FVB</sup> Tiere waren signifikant größer als die Mitochondrien der B6mt<sup>AKR</sup> Tiere.

Die Arbeitsgruppe von M. Fex zeigte an weiblichen B6 Mäusen, dass die Größe der Mitochondrien durch fettreiche Diät zunimmt. Diese Arbeitsgruppe stellte diese Beobachtung als Kompensationsmechanismus dar, wobei die Mitochondrien auf Insulinresistenz mit einer Größenzunahme reagieren. Diese Volumenzunahme geht mit einer Steigerung des mitochondrialen Stoffwechsels (gesteigerte ATP-Synthese) einher, die letztendlich zu einer Hyperinsulinämie führt. Durch die vermehrte Insulinsekretion kann trotz einer Insulinresistenz eine normoglykämische Stoffwechsellage aufrecht erhalten werden (Fex *et al.* 2007).

Eine alternative Erklärung für die Volumenzunahme der Mitochondrien ist die Bildung von Megamitochondrien. Wenn der intrazelluläre ROS-Spiegel die Konzentration übersteigt, die die Zelle kompensieren kann, kommt es zur Formierung von Megamitochondrien. In den Megamitochondrien ist der Sauerstoffgehalt geringer und die ATP-Synthese ist vermindert. Da 1 – 2 % des mitochondrialen Sauerstoffverbrauches in der Entstehung von ROS resultieren (Chance *et al.* 1979), ist durch einen verminderten Sauerstoffverbrauch folglich die ROS-Entstehung verringert (Wakabayashi 2002). Die Volumenzunahme könnte einen protektiven Mechanismus gegenüber der Bildung von ROS darstellen. Die Arbeitsgruppe von T. Wakabayashi konnte zeigen, dass die Inhibition der Lipid-Peroxidation, unter anderem mit  $\alpha$ -Tocopherol, auch die Bildung von Megamitochondrien verhindert (Wakabayashi *et al.* 1997). Vermutlich können die Mitochondrien der B6mt<sup>FVB</sup> Tiere nicht mit einer Volumenzunahme auf die Lipidbelastung und den sich einstellenden Insulinmangel reagieren. Die Mutation des mt-*Atp-8*-Gens könnte diesen Kompensations- (Fex *et al.* 2007) oder Schutzmechanismus (Wakabayashi *et al.* 1997) stören. Stattdessen kommt es zu einer kompensatorischen Größenzunahme und zu einer vermehrten Anzahl der Langerhansschen Inseln.

Bei den von T. Wakabayashi beschriebenen Megamitochondrien könnte es sich um Mitochondrien handeln, die zu einem Netzwerk fusioniert sind. Die reduzierte Mitochondriengröße der B6mt<sup>FVB</sup> Mäuse könnte durch eine Störung der mitochondrialen Dynamik bedingt sein, durch die die Mitochondrien nicht mehr in der Lage sind zu fusionieren.

Mitochondrien sind aktive Strukturen, die sich innerhalb der Zelle bewegen und fusionieren, so dass Netzwerke entstehen und sich auch wieder aus den Netzwerken abspalten oder teilen (Civitarese & Ravussin 2008). Da fusionierte Mitochondrien gemeinsame Metabolite nutzen und einen gemeinsamen elektrochemischen Gradienten nutzen, ist die Ausbildung solcher Netzwerke wichtig für die Funktionalität und Integrität der Zellen und Mitochondrien (Skulachev 2001). Darüber hinaus können durch die Fusion Genprodukte ausgetauscht und mitochondriale Mutationen ausgeglichen werden (Chan 2006). Die Arbeitsgruppe von A. Molina konnte zeigen, dass eine fett- und glucosereiche Diät zu einer vermehrten Fragmentierung mitochondrialer Netzwerke führt. Als mögliche Ursache nannte die Arbeitsgruppe eine Abnahme der Fusionsrate (Molina *et al.* 2009).

Durch die bereits schon basal gesteigerte ROS-Synthese könnten Mitochondrien der B6mt<sup>FVB</sup> Tiere sehr anfällig für die durch die fettreiche Diät hervorgerufene Fusionsverminderung sein. Die Fusionsaktivität der Mitochondrien der B6mt<sup>AKR</sup> Tiere könnte eine längere und intensivere Lipidbelastung tolerieren, so dass die B6mt<sup>FVB</sup> Tiere kleinere, stärker vereinzelte Mitochondrien aufweisen mit geringerer Toleranz gegenüber ROS.

## 4.4 Untersuchungen der Auswirkungen des $mt^{FVB/N}$ -Genotyps auf mitochondriale Funktionen

### 4.4.1 $H_2O_2$ -Produktion in isolierten Milz-Mitochondrien

Bei der Quantifizierung der  $H_2O_2$ -Produktion in isolierten Mitochondrien zeigten sich sowohl beim NOD Stamm als auch bei den B6 Tieren signifikant erhöhte  $H_2O_2$ -Konzentrationen in Mitochondrien der Tiere mit dem  $mt^{FVB}$ -Genom. Das ist ein Hinweis dafür, dass die Mutation im  $mt$ -*Atp-8*-Gen, unabhängig vom nukleären Genom, mit einem erhöhten Vorkommen von ROS assoziiert ist.

ROS rufen nicht immer eine unmittelbare Schädigung der Mitochondrien und/oder Zellen hervor. Mitochondrien und Zellen besitzen eine Reihe von Mechanismen, um sich vor oxidativem Stress zu schützen. Zu den mitochondrialen Schutzmechanismen gehören das Entkoppeln der Respiration von der ATP-Synthese durch UCPs sowie der Abbau der ROS durch enzymatische Reaktionen, z. B. durch die Glutathion-Peroxidase und Peroxiredoxin (Green *et al.* 2004). Erst wenn diese Schutzsysteme überfordert sind, kommt es zu funktionellen und/oder strukturellen Einschränkungen der Zelle bzw. des Mitochondriums. Die Ausstattung der Zellen mit diesen Schutzmechanismen ist nicht überall gleich und so sind einige Gewebe empfindlicher als andere. Die pankreatischen  $\beta$ -Zellen sind besonders anfällig für durch ROS induzierte Schäden, da die Expression von antioxidativen Enzymen hier niedrig ist (Lenzen *et al.* 1996).

Die Arbeitsgruppen von Pi und Leloup konnten zeigen, dass die mitochondriale Produktion von ROS für die Insulinsekretion bedeutsam ist. Vorrübergehende, leicht erhöhte ROS-Konzentrationen, vor allem in der Form von  $H_2O_2$ , unterstützen die GSIS oder sind für die GSIS sogar essentiell (Pi *et al.* 2007). Als möglicher Mechanismus wird diskutiert, dass  $H_2O_2$  L-Typ Kalzium-Kanäle in den  $\beta$ -Zellen öffnet, so dass es zu einer kurzfristigen Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels kommt, der wiederum die Insulinsekretion initiiert (Leloup *et al.* 2009). Aufgrund der Mutation des  $mt$ -*Atp-8*-Gens kommt es bei den Tieren mit dem  $mt^{FVB}$ -Genom statt einer kurzfristigen und vorrübergehenden Erhöhung der ROS-Produktion, zu einer dauerhaft erhöhten ROS-Synthese, so dass die physiologischen ROS-Spiegel (Leloup *et al.* 2009) weit und dauerhaft überschritten werden. Vermutlich haben daher die erhöhten ROS-Spiegel bei den Tieren mit dem  $mt^{FVB}$  Genom keinen sekretionsunterstützenden Effekt, sondern eine schädigende Auswirkung auf zelluläre und mitochondriale Makromoleküle, die eher zu einer Sekretionsstörung führt. Zusätzlich führen erhöhte ROS-Spiegel, z. B. durch

gesteigerte Aktivität des Transkriptionsfaktors Nrf 2, zu einer vermehrten Expression antioxidativer Enzyme (Nguyen *et al.* 2003). Durch den Anstieg der antioxidativen Kapazität wird die durch ROS vermittelte Signalwirkung, die von Pi und Leloup beschrieben wird, abgeschwächt und damit auch die GSIS vermindert (Pi *et al.* 2007).

Die Arbeitsgruppe von R. Robertson postulierte, dass stark erhöhte ROS-Spiegel die Funktion der  $\beta$ -Zellen durch verminderte Expression der Transkriptionsfaktoren Pdx-1 und MafA verschlechtern können (Robertson 2006). Die Transkriptionsfaktoren Pdx-1 und MafA sind für die Expression des *Insulin*-Gens wichtig. In ihrer Abwesenheit oder bei Mutationen der Bindungsstellen am *Insulin*-Promoter kommt es zu verminderten Insulin-mRNA-Spiegeln, reduziertem Insulingehalt und Verschlechterung der Insulinsekretion (Robertson 2006). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit antioxidativ wirkendem N-Acetylcystein in Situationen, die zu vermehrter ROS-Synthese führen, vor verminderter Expression von Pdx-1 und MafA *in vitro* sowie vor verminderter Expression des *Insulin*-Gens *in vivo* schützen (Kaneto *et al.* 1999).

Wie unter 4.3.1 erwähnt, könnte eine vermehrte UCP 2-Expression, die durch ROS induziert wird, einen Schutzmechanismus gegen eine übermäßige ROS-Produktion darstellen (Krauss *et al.* 2003). Durch die Entkopplung kommt es zu einer Senkung des Potentials an der inneren Mitochondrienmembran und dadurch zu einer Reduktion der ROS-Synthese. Allerdings geht die UCP 2-Expression auch mit einer Abnahme der GSIS einher (Lowell & Shulman 2005).

#### **4.4.2 Aktivität des ATPase-Komplexes in isolierten Milz-Mitochondrien**

Sowohl bei den Tieren des NOD Stammes als auch des B6 Stammes zeigte sich bei den Tieren mit  $mt^{FVB}$ -Genom eine erhöhte Aktivität der ATPase. Daraus ergibt sich, dass die Aktivität des Enzyms unabhängig vom nukleären Genom durch die Mutation des *mt-Atp-8*-Gens nicht eingeschränkt, sondern eher vermehrt aktiv ist.

Wie bereits erwähnt, ist die ROS-Entstehung vom Potential der inneren Mitochondrienmembran abhängig. Je höher das Membranpotential ist, desto mehr ROS werden generiert. Dementsprechend ist die ROS-Produktion bei einem niedrigeren Membranpotential geringer (Krauss *et al.* 2003). Eine Möglichkeit das Membranpotential zu senken, besteht in der Entkopplung der Atmungskette durch UCPs. Dabei gelangen die Protonen ohne ATP-Synthese von dem Intermembranraum in die mitochondriale Matrix zurück (Skulachev 1998).

Eine weitere Möglichkeit das Membranpotential zu senken, ist eine gesteigerte ATP-Synthese im Komplex V der Atmungskette (Korshunov *et al.* 1997). Der Protonengradient, der durch den Protonentransport in den Intermembranraum entstanden ist, wird vom ATPase-Komplex genutzt, um ATP zu synthetisieren. Der ATPase-Komplex besteht aus zwei Anteilen: dem membranständigen F<sub>O</sub>-Teil, der als Protonenkanal dient und dem katalytischen F<sub>1</sub>-Teil, der in den mitochondrialen Matrixraum ragt. Beide Anteile bestehen aus mehreren Untereinheiten. Durch eine Reihe von Konformationsänderungen ist die Protonenpassage an die ATP-Synthese gekoppelt (da Fonseca *et al.* 2008).

Die erhöhte Aktivität der ATPase könnte einen Schutzmechanismus darstellen, wobei das Mitochondrium versucht durch eine gesteigerte ATP-Synthese das Membranpotential zu senken und damit die ROS-Entstehung zu reduzieren (Korshunov *et al.* 1997). Jedoch gelingt dieser Mechanismus nur teilweise. Durch die gesteigerte ATP-Synthese kann zwar das Membranpotential gesenkt werden, allerdings führt die erhöhte Aktivität der Atmungskette zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch, durch den wiederum mehr ROS entstehen (s. Kap. 4.4.3). Hier könnte die Ursache für das vermehrte ROS-Vorkommen der Tiere mit dem mt<sup>FVB</sup>-Genom liegen.

In der pankreatischen  $\beta$ -Zelle ist ATP essentiell für die Insulinsekretion. Eine vermehrte ATP-Synthese könnte daher auch für eine vermehrte Insulinsekretion genutzt werden. Das wäre vor allem in Insulin-Mangelzuständen notwendig, die aus einer Funktionseinschränkung der  $\beta$ -Zellen und/oder peripherer Insulinresistenz resultieren.

Es muss bedacht werden, dass die ATPase-Aktivität in Milz-Mitochondrien untersucht wurde, deren Eigenschaften u. U. nicht vollständig mit denen der pankreatischen  $\beta$ -Zellen übereinstimmen.

#### **4.4.3 Sauerstoffverbrauch von isolierten Leber-Mitochondrien**

Da sich die Mitochondrien in intakten Zellen entweder im Zustand 3 oder 4 der fünf Fließgleichgewichte der Atmungskette befinden, wurde in der vorliegenden Arbeit der Sauerstoffverbrauch von isolierten Mitochondrien unter Bedingungen der Zustände 3 und 4 gemessen und der Sauerstoffverbrauch der Zustände 3 und 4 ins Verhältnis zueinander gesetzt. Dabei fiel auf, dass das Verhältnis Zustand 3 : Zustand 4 bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren signifikant größer war als bei den NOD Tieren. Dieses Ergebnis ist auf einen erhöhten Sauerstoffverbrauch der NODmt<sup>FVB</sup> Tiere im Zustand 3 zurückzuführen. Da der mitochondriale Sauerstoffver-

brauch der NODmt<sup>FVB</sup> Tiere gegenüber den NOD Tieren erhöht war, leiten sich daraus auch ein erhöhter Substratverbrauch und eine gesteigerte ATP-Synthese in der Atmungskette ab.

Wie unter 4.4.2 beschrieben, könnte es sich bei einer gesteigerten ATP-Synthese, die mit gesteigerten Sauerstoff- und Substratverbrauch einhergeht, um einen Schutzmechanismus handeln. Durch die verstärkte oxidative Phosphorylierung kommt es zu einer Senkung des Membranpotentials. Da 1 – 2 % des mitochondrialen Sauerstoffverbrauches nicht zur Energiegewinnung genutzt werden, sondern in die ROS-Produktion eingehen (Chance *et al.* 1979), führt ein erhöhter Sauerstoffverbrauch auch zu einer gesteigerten Bildung von ROS, was die erhöhte ROS-Konzentration in Mitochondrien des mt<sup>FVB</sup>-Genoms erklären könnte.

Ein erhöhter ATP-Gehalt in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen führt unter physiologischen Bedingungen während der GSIS zum Schließen ATP-abhängiger Kaliumkanäle. Dadurch kommt es zur Depolarisation der Zellmembran, wodurch sich spannungsabhängige Kalziumkanäle öffnen. Kalzium strömt in die Zelle und der intrazelluläre Kalziumspiegel erhöht sich rasch. In erster Linie führt der erhöhte Kalziumspiegel zur Aktivierung von Proteinkinasen, wodurch es letztendlich zur Exozytose von Insulin kommt (Newsholme *et al.* 2006). Eine Unterbrechung des Kalziumeinstroms in die Zelle ist jedoch wichtig für die Funktionsfähigkeit der Zellen, da ein weiterer Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration zur Stimulation der ROS-Produktion führen kann (Kruman *et al.* 1998). Kalzium könnte via Proteinkinase C zu einer Aktivierung der NADPH-Oxidase sowie mitochondrialer Oxidasen führen und damit die ROS-Synthese steigern und so zu oxidativem Stress und/oder Apoptose führen (Newsholme *et al.* 2007). Die NADPH-Oxidase ist ein an die Plasmamembran assoziiertes Enzym dessen Aktivierung zur ROS-Synthese führt. Die NADPH-Oxidase katalysiert die Elektronenübertragung von NADPH auf Sauerstoff, so dass ein Superoxid ( $O_2^-$ ) entsteht. Im inaktiven Zustand befinden sich einige regulatorische Untereinheiten des Enzyms frei im Zytosol. Eine durch Proteinkinase C aktivierte Signalkaskade führt zur Translokation der Untereinheiten an die Membran und damit zur Aktivierung der Oxidase und zur ROS-Produktion (Babior 2002).

Die „klassische“ NADPH-Oxidase kommt in phagozytierenden Zellen des Immunsystems vor in denen ROS vor allem antimikrobielle Funktionen besitzen. Es sind Isoformen der NADPH-Oxidase bekannt, die auch in anderen Zellen vorkommen, z. B. der pankreatischen  $\beta$ -Zelle (Newsholme *et al.* 2007). So könnte der gesteigerte Sauerstoffverbrauch, der bei den NODmt<sup>FVB</sup> Mitochondrien beobachtet wurde, zu einer übermäßigen, durch Kalzium getriggerten, ROS-Produktion führen. Durch die gesteigerte Aktivität der Atmungskette kann ein erhöhter ATP-Spiegel über eine längere Zeit aufrecht erhalten werden, wodurch die Kalziumkanäle länger geöffnet bleiben und letztendlich mehr Kalzium in die  $\beta$ -Zelle strömt.

Ein anderes Erklärungsmodell für den vermehrten mitochondrialen Sauerstoffverbrauch der NODmt<sup>FVB</sup> Tiere stellt die Entkopplung der Atmungskette durch UCPs dar. Wie unter 4.3.1 erläutert, führen UCPs zu einem Rückstrom der Protonen aus dem Intermembranraum des Mitochondriums in die Matrix ohne, dass ATP synthetisiert wird. Folglich ist im entkoppelten Zustand die ATP-Synthese im Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch geringer als im gekoppelten Zustand (Sivitz & Yorek 2010). Da die Insulinsekretion aus den  $\beta$ -Zellen ATP abhängig ist, verringert sich durch die Entkopplung der Atmungskette auch die Insulinsekretionsfähigkeit (Lowell & Shulman 2005). Um diese Sekretionsverminderung auszugleichen, könnten die Mitochondrien durch eine Steigerung des Sauerstoffverbrauches die ATP-Synthese stimulieren, um so wieder ausreichend ATP für den Sekretionsvorgang zu produzieren. Gelingt diese Adaptation nicht, kommt es zum Insulindefizit.

Für die Untersuchung des Sauerstoffverbrauches wurden Leber-Mitochondrien verwendet, da die Mitochondrienpräparation aus  $\beta$ -Zellen unzureichendes Untersuchungsmaterial ergab. Die Ergebnisse sind daher unter Umständen nicht vollständig auf Mitochondrien aus  $\beta$ -Zellen übertragbar.

## 4.5 Ausblick

Es ist bekannt, dass sich erhöhte ROS-Konzentrationen schädigend auf  $\beta$ -Zellen auswirken. Desweiteren stellen ROS einen Hauptfaktor für die Manifestation und Entwicklung des T2DM dar (Newsholme *et al.* 2007).

In dieser Arbeit werden zwei Tiermodelle vorgestellt, die es ermöglichen den Einfluss von mitochondrial gebildeten ROS auf mitochondriale und zelluläre Eigenschaften zu untersuchen. Da die NOD Maus ein klassisches Modell für den T1DM ist, bietet das conplastische Mausmodell NODmt<sup>FVB</sup> die Möglichkeit den Einfluss von ROS auf autoimmune Pathomechanismen im Hinblick auf den T1DM zu untersuchen. Mit dem conplastischen Mausmodell B6mt<sup>FVB</sup> können die durch eine erhöhte Produktion von ROS hervorgerufene Pathomechanismen untersucht werden.

Da sich die Mutation des *mt-Atp-8*-Gens nicht nur in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen befindet, ergibt sich zusätzlich die Möglichkeit die Rolle von ROS bei der Entstehung der Insulinresistenz zu untersuchen ebenso wie den Einfluss von ROS auf Langzeitkomplikationen des Diabetes mellitus.

Mit Hilfe dieser beiden conplastischen Tiermodelle kann außerdem der Einfluss mitochondrialer Funktionen auf die Pathogenese des Diabetes mellitus weiter erforscht werden und so zu einem besseren Verständnis und zur Entwicklung von besseren Therapiemöglichkeiten führen. Es könnten Medikamente konzipiert werden, die ihren Wirkmechanismus direkt im Mitochondrium entfalten. Ein möglicher Angriffspunkt stellt der Transport antioxidativer Substanzen in das Mitochondrium dar, um die antioxidative Abwehr zu steigern. Zusätzlich könnte die Transkription antioxidativ wirkender Substanzen angeregt werden. Ein weiterer Ansatz könnte die Stimulation zur Fusion der Mitochondrien sein, so dass Genprodukte besser ausgetauscht und Mutationen einzelner Mitochondrien besser ausgeglichen werden können.

Darüber hinaus lässt sich anhand der hier vorgestellten Tiermodelle die Rolle von Ernährungsfaktoren auf die Entstehung und Auswirkung von oxidativem Stress sowie deren Wirkung auf die  $\beta$ -Zelle untersuchen. Insbesondere bei der NODmt<sup>FVB</sup> Maus könnte das Zusammenwirken von metabolischer Belastung, oxidativem Stress und Autoimmunität dargestellt werden.

Auf diese Weise wird es möglich neue Therapiekonzepte abzuleiten, die das Zusammenspiel zellulärer und mitochondrialer Pathomechanismen positiv beeinflussen, so dass die Progression des Diabetes mellitus abgeschwächt wird und Langezeitschäden verringert werden.

## 5 Zusammenfassung

Mitochondrien spielen im Glucosemetabolismus eine wichtige Rolle, da sie Energie in Form von ATP erzeugen, die in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen für die Insulinsekretion essentiell ist. Veränderungen der mitochondrialen Funktionsweise können daher zu Störungen der Insulinsekretion führen und damit zur Verschlechterung des Glucosestoffwechsels bis zum klinisch manifesten Diabetes mellitus.

In dieser Arbeit werden zwei Tiermodelle vorgestellt, die eine Mutation des mitochondrialen (mt) *Atp-8*-Gens aufweisen. Das mitochondriale Genom des FVB Stammes und des NOD Stammes unterscheiden sich an drei Stellen, wobei vor allem die Variation des mt-*Atp-8*-Gens die Diabetes-Suszeptibilität zu vermitteln scheint. Das mitochondriale Genom des FVB Stammes und des AKR Stammes unterscheiden sich lediglich im mt-*Atp-8*-Gen, so dass hier eine gezielte Untersuchung der Mutation ermöglicht wird. Die ATP-8 Untereinheit scheint für den Aufbau und damit für die korrekte Funktionsweise der ATP-Synthase der Atmungskette wichtig zu sein.

Die Ziele dieser Arbeit sind (1.) den Einfluss der Mutation des mt-*Atp-8*-Gens auf die Entstehung des T1DM und (2.) auf mitochondriale Funktionen zu untersuchen sowie (3.), das Zusammenspiel der Mutation und metabolischer Belastung auf den Glucosestoffwechsel zu charakterisieren.

Die Blutglucosewerte der NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere wurden regelmäßig dokumentiert und die Serumspiegel von Insulin-Autoantikörpern (IAA) wurden bestimmt. Die Blutglucosewerte der NODmt<sup>FVB</sup> Tiere waren signifikant höher und vor allem bei den männlichen Tieren früher pathologisch. Die IAA-Konzentrationen waren bei den Tieren mit dem mt<sup>FVB</sup>-Genom gegenüber den NOD Tieren erhöht.

Für Lipotoxizitätsuntersuchungen erhielten NODmt<sup>FVB</sup> und NOD Tiere über zwölf Wochen eine fettreiche Diät (60 % cal aus Fett). Dabei wurden die Blutglucose dokumentiert, die glucosestimulierte Insulinsekretion (GSIS) ermittelt und histologische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wiesen die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere unter fettreicher Diät deutlich mehr pankreatische Inseln auf als die NOD Tiere. Auch B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> Tiere erhielten über zwölf Wochen eine fettreiche Diät. Die Blutglucose wurde überwacht. Die Glucosetoleranz, die Insulinsensitivität sowie der Seruminsulingehalt wurden überprüft und es wurden histologische Untersuchungen durchgeführt. Die fettreiche Diät führte bei den B6mt<sup>FVB</sup> Tieren zu einer signifikanten Verschlechterung der Glucosetoleranz und zu vermindertem Seruminsulingehalt. Die

Blutglucose, das Körpergewicht und die Insulinsensitivität waren im Vergleich mit den B6mt<sup>AKR</sup> Tieren nicht verändert.

Die Mitochondrien der NODmt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>FVB</sup> Tiere zeigten gegenüber den jeweiligen Kontrollen eine signifikant gesteigerte ROS-Synthese. Die Aktivität des ATPase-Komplexes war bei den Tieren mit dem mt<sup>FVB</sup>-Genom gesteigert. Die Mitochondrien der NODmt<sup>FVB</sup> Tiere zeigten gegenüber den NOD Tieren einen erhöhten Sauerstoffverbrauch.

Die Mutation des mt-*Atp-8*-Gens führte zur gesteigerten mitochondrialen ROS-Synthese, ohne die Aktivität der Atmungskette einzuschränken. Das gesteigerte ROS-Vorkommen kann zur Dysfunktion der pankreatischen  $\beta$ -Zellen führen und dadurch Störungen des Glucosestoffwechsels hervorrufen. Das schien insbesondere für metabolische Belastung zu zutreffen, wobei die Insulinwirkung in der Peripherie vermutlich nicht verändert war.

Die Mutation des mt-*Atp-8*-Gens verstärkte die Autoimmunität des NOD Stammes, insbesondere durch das vermehrte Auftreten von Autoantikörpern. Die Ergebnisse sind konform mit denen aktueller Studien, die ebenfalls zeigen, dass ROS unmittelbar in die Mechanismen von Insulinsekretion und  $\beta$ -Zellfunktion eingreifen. Somit sind beide Stämme interessante Modelle, um Mutationen des mitochondrialen Genoms und deren Auswirkungen auf die  $\beta$ -Zellfunktion zu untersuchen.

## 6 Literaturverzeichnis

**Abdul-Ghani, M. A., Muller, F. L., Liu, Y., Chavez, A. O., Balas, B. et al. (2008)** Deleterious action of FA metabolites on ATP synthesis: possible link between lipotoxicity, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **295**, E678-685.

**Asghar, Z., Yau, D., Chan, F., Leroith, D., Chan, C. B. et al. (2006)** Insulin resistance causes increased beta-cell mass but defective glucose-stimulated insulin secretion in a murine model of type 2 diabetes. *Diabetologia*, **49**, 90-99.

**Babior, B. M. (2002)** The activity of leukocyte NADPH oxidase: regulation by p47PHOX cysteine and serine residues. *Antioxid Redox Signal*, **4**, 35-38.

**Baekkeskov, S., Warnock, G., Christie, M., Rajotte, R. V., Larsen, P. M. et al. (1989)** Revelation of specificity of 64K autoantibodies in IDDM serums by high-resolution 2-D gel electrophoresis. Unambiguous identification of 64K target antigen. *Diabetes*, **38**, 1133-1141.

**Banerji, M. A. & Lebovitz, H. E. (1989)** Insulin-sensitive and insulin-resistant variants in NIDDM. *Diabetes*, **38**, 784-792.

**Belevich, I., Verkhovsky, M. I. & Wikstrom, M. (2006)** Proton-coupled electron transfer drives the proton pump of cytochrome c oxidase. *Nature*, **440**, 829-832.

**Belfort, R., Mandarino, L., Kashyap, S., Wirfel, K., Pratipanawatr, T. et al. (2005)** Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes*, **54**, 1640-1648.

**Bennett, S. T. & Todd, J. A. (1996)** Human type 1 diabetes and the insulin gene: principles of mapping polygenes. *Annu Rev Genet*, **30**, 343-370.

**Bonifacio, E., Atkinson, M., Eisenbarth, G., Serreze, D., Kay, T. W. et al. (2001)** International Workshop on Lessons From Animal Models for Human Type 1 Diabetes: identification of insulin but not glutamic acid decarboxylase or IA-2 as specific autoantigens of humoral autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Diabetes*, **50**, 2451-2458.

**Bonner-Weir, S. (2000)** Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology*, **141**, 1926-1929.

**Brand, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., Green, K., Lambert, A. J. et al. (2004)** Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med*, **37**, 755-767.

- Bruning, J. C., Winnay, J., Bonner-Weir, S., Taylor, S. I., Accili, D. et al. (1997)** Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell*, **88**, 561-572.
- Cederholm, J. & Wibell, L. (1985)** Evaluation of insulin release and relative peripheral resistance with use of the oral glucose tolerance test: a study in subjects with normoglycaemia, glucose intolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest*, **45**, 741-751.
- Chan, D. C. (2006)** Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **22**, 79-99.
- Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. (1979)** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, **59**, 527-605.
- Chance, B., Williams, G. R., Holmes, W. F. & Higgins, J. (1955)** Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. V. A mechanism for oxidative phosphorylation. *J Biol Chem*, **217**, 439-451.
- Chang, L., Chiang, S. H. & Saltiel, A. R. (2004)** Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med*, **10**, 65-71.
- Chinnery, P. (2006)** Mitochondrial Disorders Overview. In *GeneReview*: NCBI Bookshelf.
- Civitarese, A. E. & Ravussin, E. (2008)** Mitochondrial energetics and insulin resistance. *Endocrinology*, **149**, 950-954.
- Crofts, A. R., Holland, J. T., Victoria, D., Kolling, D. R., Dikanov, S. A. et al. (2008)** The Q-cycle reviewed: How well does a monomeric mechanism of the bc(1) complex account for the function of a dimeric complex? *Biochim Biophys Acta*, **1777**, 1001-1019.
- Curran, J. E., Johnson, M. P., Dyer, T. D., Goring, H. H., Kent, J. W. et al. (2007)** Genetic determinants of mitochondrial content. *Hum Mol Genet*, **16**, 1504-1514.
- da Fonseca, R. R., Johnson, W. E., O'Brien, S. J., Ramos, M. J. & Antunes, A. (2008)** The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC Genomics*, **9**, 119.
- Devenish, R. J., Prescott, M., Roucou, X. & Nagley, P. (2000)** Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *Biochim Biophys Acta*, **1458**, 428-442.
- Dudkina, N. V., Kouril, R., Peters, K., Braun, H. P. & Boekema, E. J. (2009)** Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim Biophys Acta*.
- Fex, M., Nitert, M. D., Wierup, N., Sundler, F., Ling, C. et al. (2007)** Enhanced mitochondrial metabolism may account for the adaptation to insulin resistance in islets from C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Diabetologia*, **50**, 74-83.

- Foulis, A. K., Liddle, C. N., Farquharson, M. A., Richmond, J. A. & Weir, R. S. (1986)** The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia*, **29**, 267-274.
- Gepts, W. & De Mey, J. (1978)** Islet cell survival determined by morphology. An immunocytochemical study of the islets of Langerhans in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*, **27 Suppl 1**, 251-261.
- Gillespie, K. M. (2006)** Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ*, **175**, 165-170.
- Goto, Y., Nonaka, I. & Horai, S. (1990)** A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, **348**, 651-653.
- Green, K., Brand, M. D. & Murphy, M. P. (2004)** Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*, **53 Suppl 1**, S110-118.
- Hauner, H., Köster, I. & von Färber, L. (2003)** Prävalenz des Diabetes mellitus in Deutschland 1998-2001. *Dtsch Med Wschr*, **128**, 2632-2638.
- Hedekov, C. J. (1980)** Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiol Rev*, **60**, 442-509.
- Hien & Böhm (2007)** *Diabetes Handbuch*: Springer Verlag.
- Ho, J. K., Duclos, R. I., Jr. & Hamilton, J. A. (2002)** Interactions of acyl carnitines with model membranes: a <sup>13</sup>C-NMR study. *J Lipid Res*, **43**, 1429-1439.
- Holt, I. J., Harding, A. E. & Morgan-Hughes, J. A. (1988)** Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, **331**, 717-719.
- Hu, Y., Nakagawa, Y., Purushotham, K. R. & Humphreys-Beher, M. G. (1992)** Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. *Am J Physiol*, **263**, E607-614.
- Hürter & Lange (2005)** *Diabetes bei Kindern und Jugendlichen*: Springer Verlag.
- IDF (2009)** IDF Diabetes Atlas 4th edition. International Diabetes Federation.
- Ikegamie, H. & Makino, S. (2001)** *The NOD Mouse and its related strains*: Harwood Academic Publishers London.
- In't Veld, P., Lievens, D., De Grijse, J., Ling, Z., Van der Auwera, B. et al. (2007)** Screening for insulinitis in adult autoantibody-positive organ donors. *Diabetes*, **56**, 2400-2404.
- Jacksch-Angerer, M., Hoffman, S., Bauer, M., Gempel, K., Obermaier-Kusser, B. et al. (1999)** Mitochondriale Erkrankungen; biochemisch-molekularbiologische Diagnostik von Defekten der Atmungskette. *Deutsches Ärzteblatt*, **96**, 2972-2981.

- Johns, D. R. (1995)** Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Mitochondrial DNA and disease. *N Engl J Med*, **333**, 638-644.
- Johnson, D. T., Harris, R. A., Blair, P. V. & Balaban, R. S. (2007)** Functional consequences of mitochondrial proteome heterogeneity. *Am J Physiol Cell Physiol*, **292**, C698-707.
- Kaneto, H., Kajimoto, Y., Miyagawa, J., Matsuoka, T., Fujitani, Y. et al. (1999)** Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes*, **48**, 2398-2406.
- Karp (2006)** *Molekulare Zellbiologie* (trans. K. Beginnen, S. Vogel & S. Kuhlmann-Krieg) (1 edn): Springer Verlag.
- Kashyap, S. R. & Defronzo, R. A. (2007)** The insulin resistance syndrome: physiological considerations. *Diab Vasc Dis Res*, **4**, 13-19.
- Kellerer, M. & Danne, T. (2009)** Praxis-Leitlinien der DDG 2009. *Diabetologie und Stoffwechsel*, **4**, 113-200.
- Kerner, W., Brückel, J. & Böhm, B. (2004)** Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. In *Evidenzbasierte Leitlinie DDG - Aktualisierung 10/2004* (ed D. D. Gesellschaft), pp. 1-11.
- Kikutani, H. & Makino, S. (1992)** The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol*, **51**, 285-322.
- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P. & Starkov, A. A. (1997)** High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*, **416**, 15-18.
- Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F. & Vercesi, A. E. (2009)** Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*, **47**, 333-343.
- Krauss, S., Zhang, C. Y., Scorrano, L., Dalgaard, L. T., St-Pierre, J. et al. (2003)** Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest*, **112**, 1831-1842.
- Kruman, I., Guo, Q. & Mattson, M. P. (1998)** Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res*, **51**, 293-308.
- Kubota, N., Tobe, K., Terauchi, Y., Eto, K., Yamauchi, T. et al. (2000)** Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes*, **49**, 1880-1889.

- Kurien, B. T. & Scofield, R. H. (2008)** Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens. *Autoimmun Rev*, **7**, 567-573.
- Lan, M. S., Wasserfall, C., Maclaren, N. K. & Notkins, A. L. (1996)** IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6367-6370.
- Langin, D. (2001)** Diabetes, insulin secretion, and the pancreatic beta-cell mitochondrion. *N Engl J Med*, **345**, 1772-1774.
- Larsson, L. I., Sundler, F. & Hakanson, R. (1976)** Pancreatic polypeptide - a postulated new hormone: identification of its cellular storage site by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Diabetologia*, **12**, 211-226.
- Leloup, C., Turrel-Cuzin, C., Magnan, C., Karaca, M., Castel, J. et al. (2009)** Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes*, **58**, 673-681.
- Lenzen, S., Drinkgern, J. & Tiedge, M. (1996)** Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med*, **20**, 463-466.
- Lillioja, S., Mott, D. M., Spraul, M., Ferraro, R., Foley, J. E. et al. (1993)** Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med*, **329**, 1988-1992.
- Löffler, G., Petrides, P. E. & Heinrich, P. C. (2006)** *Biochemie und Pathobiochemie* (8. edn): Springer Verlag.
- Logan, D. C. (2006)** The mitochondrial compartment. *J Exp Bot*, **57**, 1225-1243.
- Lowell, B. B. & Shulman, G. I. (2005)** Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*, **307**, 384-387.
- Maechler, P., Wang, H. & Wollheim, C. B. (1998)** Continuous monitoring of ATP levels in living insulin secreting cells expressing cytosolic firefly luciferase. *FEBS Lett*, **422**, 328-332.
- Majithia, A. R. & Florez, J. C. (2009)** Clinical translation of genetic predictors for type 2 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, **16**, 100-106.
- Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y. & Katagiri, K. (1981)** Effect of castration on the appearance of diabetes in NOD mouse. *Jikken Dobutsu*, **30**, 137-140.
- Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K. et al. (1980)** Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu*, **29**, 1-13.

- Many, M. C., Maniratunga, S. & Deneff, J. F. (1996)** The non-obese diabetic (NOD) mouse: an animal model for autoimmune thyroiditis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **104 Suppl 3**, 17-20.
- Mathews, C. E., Leiter, E. H., Spirina, O., Bykhovskaya, Y., Gusdon, A. M. et al. (2005)** mt-Nd2 Allele of the ALR/Lt mouse confers resistance against both chemically induced and autoimmune diabetes. *Diabetologia*, **48**, 261-267.
- Matschinsky, F. M. (1996)** Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes*, **45**, 223-241.
- Mkaouar-Rebai, E., Kammoun, F., Chamkha, I., Kammoun, N., Hsairi, I. et al. (2010)** A de novo mutation in the adenosine triphosphatase (ATPase) 8 gene in a patient with mitochondrial disorder. *J Child Neurol*, **25**, 770-775.
- Molina, A. J., Wikstrom, J. D., Stiles, L., Las, G., Mohamed, H. et al. (2009)** Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes*, **58**, 2303-2315.
- Moore, P. C., Ugas, M. A., Hagman, D. K., Parazzoli, S. D. & Poitout, V. (2004)** Evidence against the involvement of oxidative stress in fatty acid inhibition of insulin secretion. *Diabetes*, **53**, 2610-2616.
- Mussig, K., Staiger, H., Kantartzis, K., Fritsche, A., Kanz, L. et al. (2010)** [Diabetes, insulin, insulin analogues, and cancer]. *Dtsch Med Wochenschr*, **135**, 924-929.
- Newsholme, P., Brennon, L. & Bender, K. (2006)** Aminoacid metabolism,  $\beta$ -dysfunction, and diabetes. *Diabetes*, 39-47.
- Newsholme, P., Haber, E. P., Hirabara, S. M., Rebelato, E. L., Procopio, J. et al. (2007)** Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol*, **583**, 9-24.
- Nguyen, T., Sherratt, P. J. & Pickett, C. B. (2003)** Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **43**, 233-260.
- Nicholls, D. G. & Locke, R. M. (1984)** Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev*, **64**, 1-64.
- Palmer, J. P. (1987)** Insulin autoantibodies: their role in the pathogenesis of IDDM. *Diabetes Metab Rev*, **3**, 1005-1015.
- Pessin, J. E. & Saltiel, A. R. (2000)** Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*, **106**, 165-169.

- Pi, J., Bai, Y., Zhang, Q., Wong, V., Floering, L. M. et al. (2007)** Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*, **56**, 1783-1791.
- Pirot, P., Cardozo, A. K. & Eizirik, D. L. (2008)** Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, **52**, 156-165.
- Ratzmann, K. (1991)** Eine Analyse von alters- und geschlechtsspezifischer Diabetesprävalenz sowie Behandlungsart: die Berlin-Studie. *Aktuelle Endokrinologie und Stoffwechsel*, **12**, 220-223.
- Reaven, G. M. (1993)** Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu Rev Med*, **44**, 121-131.
- Reichert, A. (2007)** Morphologie von Mitochondrien - Regulation, Funktion und Dynamik. *BioSpektrum*, **13**, 364-366.
- Richardson, S. J., Willcox, A., Bone, A. J., Morgan, N. G. & Foulis, A. K. (2010)** Immunopathology of the human pancreas in type-I diabetes. *Semin Immunopathol*.
- Ridderstrale, M. & Groop, L. (2009)** Genetic dissection of type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol*, **297**, 10-17.
- Robertson, R. P. (2006)** Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes. *Curr Opin Pharmacol*, **6**, 615-619.
- Rorsman, P. (1997)** The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia*, **40**, 487-495.
- Rousset, S., Alves-Guerra, M. C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A. M. et al. (2004)** The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*, **53 Suppl 1**, S130-135.
- Salomon, B., Rhee, L., Bour-Jordan, H., Hsin, H., Montag, A. et al. (2001)** Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. *J Exp Med*, **194**, 677-684.
- Saltiel, A. R. & Kahn, C. R. (2001)** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, **414**, 799-806.
- Santiago, A. P., Chaves, E. A., Oliveira, M. F. & Galina, A. (2008)** Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues. *Biochimie*, **90**, 1566-1577.
- Schapira, A. H. (2006)** Mitochondrial disease. *Lancet*, **368**, 70-82.
- Schon, E. A., Bonilla, E. & DiMauro, S. (1997)** Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J Bioenerg Biomembr*, **29**, 131-149.
- Schrauwen, P. & Hesselink, M. K. (2004)** Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. *Diabetes*, **53**, 1412-1417.

- Silva, J. P., Kohler, M., Graff, C., Oldfors, A., Magnuson, M. A. et al. (2000)** Impaired insulin secretion and beta-cell loss in tissue-specific knockout mice with mitochondrial diabetes. *Nat Genet*, **26**, 336-340.
- Sivitz, W. I. & Yorek, M. A. (2010)** Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, **12**, 537-577.
- Skulachev, V. P. (1998)** Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*, **1363**, 100-124.
- Skulachev, V. P. (2001)** Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci*, **26**, 23-29.
- Taniguchi, C. M., Ueki, K. & Kahn, R. (2005)** Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *J Clin Invest*, **115**, 718-727.
- Terauchi, Y., Takamoto, I., Kubota, N., Matsui, J., Suzuki, R. et al. (2007)** Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, **117**, 246-257.
- Trigwell, S. M., Radford, P. M., Page, S. R., Loweth, A. C., James, R. F. et al. (2001)** Islet glutamic acid decarboxylase modified by reactive oxygen species is recognized by antibodies from patients with type 1 diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol*, **126**, 242-249.
- Wakabayashi, T. (2002)** Megamitochondria formation - physiology and pathology. *J Cell Mol Med*, **6**, 497-538.
- Wakabayashi, T., Adachi, K., Matsushashi, T., Wozniak, M., Antosiewicz, J. et al. (1997)** Suppression of the formation of megamitochondria by scavengers for free radicals. *Mol Aspects Med*, **18 Suppl**, S51-61.
- Wallace, D. C. (2001)** Mouse models for mitochondrial disease. *Am J Med Genet*, **106**, 71-93.
- Wallace, D. C. & Lott, M. T. (2002)** Mitochondrial genes in degenerative diseases, cancer and aging. In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* (eds D. L. Rimoin, J. M. Connor, R. E. Pyeritz, et al). New York: McGraw-Hill.
- Weir, G. C. & Bonner-Weir, S. (2007)** A dominant role for glucose in beta cell compensation of insulin resistance. *J Clin Invest*, **117**, 81-83.
- Weisiger, R. A. & Fridovich, I. (1973)** Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem*, **248**, 3582-3592.
- WHO (1965)** Diabetes mellitus. Report of a WHO expert committee. *World Health organization technical report series*, **310**, 1-44.

- Wiederkehr, A. & Wollheim, C. B. (2006)** Minireview: implication of mitochondria in insulin secretion and action. *Endocrinology*, **147**, 2643-2649.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. & King, H. (2004)** Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, **27**, 1047-1053.
- Wollheim, C. B. & Maechler, P. (2002)** Beta-cell mitochondria and insulin secretion: messenger role of nucleotides and metabolites. *Diabetes*, **51 Suppl 1**, S37-42.
- Youngren, J. F. (2007)** Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci*, **64**, 873-891.
- Yu, X., Gimsa, U., Wester-Rosenlof, L., Kanitz, E., Otten, W. et al. (2009a)** Dissecting the effects of mtDNA variations on complex traits using mouse conplastic strains. *Genome Res*, **19**, 159-165.
- Yu, X., Wester-Rosenlof, L., Gimsa, U., Holzhueter, S. A., Marques, A. et al. (2009b)** The mtDNA nt7778 G/T polymorphism affects autoimmune diseases and reproductive performance in the mouse. *Hum Mol Genet*, **18**, 4689-4698.
- Ziegler, A. G., Hummel, M., Schenker, M. & Bonifacio, E. (1999)** Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes*, **48**, 460-468.

## 7 Thesen

- 1) Diabetes mellitus ist die häufigste Stoffwechselerkrankung in westlichen Industrieländern, von der ca. 6 – 8 % der Bevölkerung betroffen sind. Dabei erkranken 10 % der Patienten an einem Typ 1, der sich durch eine Autoimmunzerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas mit resultierendem, absoluten Insulinmangel auszeichnet. 90 % der Patienten erkranken an einem Typ 2, dem als pathogenetische Mechanismen eine Insulinresistenz sowie einer Sekretionsstörung der  $\beta$ -Zellen zugrunde liegen.
- 2) Betazellen des Pankreas zeigen eine metabolische Stimulussekretionskopplung, bei der ATP als Schlüsselsignal der Exozytoseauslösung eine zentrale Rolle spielt. Mitochondrien generieren als zentrale Drehscheibe des Metabolismus das Signal für die Änderung des ATP/ADP Verhältnisses. Es war das Ziel der Arbeit, die Bedeutung des ATP-Synthasekomplexes (*mt-Atp-8*-Gen) für die  $\beta$ -Zellfunktion und die Suszeptibilität gegenüber Autoimmunzerstörung in conplastischen FVB Mausmodellen zu untersuchen.
- 3) Mitochondrien verfügen über ein eigenständiges Genom, das unter anderem für 13 Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe codiert. Das *mt-Atp 8*-Gen spielt eine wichtige Rolle für die korrekte Assemblierung des ATP-Synthase-Komplexes. Als Modell wurde das mitochondriale FVB Genom mittels Rückkreuzung auf den nukleären Hintergrund der NOD und C57BL6 (B6) Mausstämme übertragen.
- 4) Das mitochondriale Genom des Stammes NOD<sup>FVB</sup> und des Stammes NOD unterscheidet sich an drei Stellen, wobei vor allem die Variation im *mt-Atp-8*-Gen für die erhöhte Diabetes-Suszeptibilität verantwortlich zu sein scheint. Der NOD Mausstamm entwickelt spontan im Alter zwischen 12 und 20 Wochen einen Autoimmundiabetes.
- 5) Vom mitochondrialen Genom des Stammes B6<sup>AKR</sup> unterscheidet sich das B6<sup>FVB</sup>-Genom nur durch einen Polymorphismus im *mt-Atp-8*-Gen, so dass hier eine gezielte Untersuchung der Auswirkungen dieses Polymorphismus möglich ist.
- 6) Die Untersuchung der Stämme NOD und NOD<sup>FVB</sup> diente der Charakterisierung der Auswirkung der Mutation auf die autoimmunen Eigenschaften des Stammes. Dafür wurden die Tiere über einen Zeitraum von 36 Wochen untersucht. Darüber hinaus wurde mit

Hilfe einer fettreichen Diät (60 % cal aus Fett über zwölf Wochen) das Zusammenspiel von metabolischem Stress und *mt-Atp-8*-Gen-Mutation untersucht.

Die Stämme B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> dienten als Kontrollstamm der keine Autoimmunität entwickelt. An beiden Stämmen wurde vor allem die Reaktionen auf metabolische Belastung charakterisiert. Zur Untersuchung des Sauerstoffverbrauches, der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und der ATP-Spiegel wurden Mitochondrien aller vier Genotypen aus verschiedenen Geweben isoliert.

- 7) Sowohl bei den Tieren des Stammes B6 als auch des Stammes NOD erzeugten die isolierten Mitochondrien mit dem mt<sup>FVB</sup>-Genom höhere ROS-Konzentrationen, als die Mitochondrien der Kontrolltiere ohne Mutation des *mt-Atp-8*-Gens.
- 8) Im Zustand 3 der Atmungskette (aktiver Zustand) verbrauchten die isolierten Leber-Mitochondrien der NODmt<sup>FVB</sup> Tiere mehr Sauerstoff als die Mitochondrien der NOD Tiere.  
Die Aktivität der ATPase des Komplexes V war in isolierten Mitochondrien der Milz sowohl bei NODmt<sup>FVB</sup> Tieren als auch bei den B6mt<sup>FVB</sup> Tieren gesteigert. Isolierte Mitochondrien mit der *mt-Atp-8*-Genmutation zeigten eine erhöhte ROS-Generierung.
- 9) Im Serum der NODmt<sup>FVB</sup> Tiere wurde zu einem früheren Zeitpunkt ein signifikant höherer Insulin-Autoantikörper-Spiegel gemessen als bei den NOD Tieren. Bei den NODmt<sup>FVB</sup> Tieren zeigte sich eine erhöhte Diabetesinzidenz. Somit bewirkte die Mutation des *mt-Atp-8*-Gens eine erhöhte Autoimmunität auf dem nukleären Hintergrund des NOD Stammes.
- 10) Unter metabolischer Belastung durch eine zwölfwöchige, fettreiche Diät (60 % cal aus Fett) wiesen die NODmt<sup>FVB</sup> Tiere in der prädiabetischen Phase eine signifikant erhöhte  $\beta$ -Zellmasse auf als die NOD Tiere.
- 11) Die Mutation des *mt-Atp-8*-Gens führte vor dem NOD-Hintergrund prinzipiell zu einer fulminanteren Infiltration von Pankreasinseln durch Immunzellen, die mit einer erhöhten Diabetes-Suszeptibilität einherging.
- 12) Die Glucosetoleranz der B6mt<sup>FVB</sup> Tiere war nach metabolischer Belastung durch eine fettreiche Diät vermindert. Obwohl die fettreiche Diät zu einer Abnahme der Insulinsen-

sitivität führte, zeigten sich bei den beiden Genotypen B6mt<sup>FVB</sup> und B6mt<sup>AKR</sup> keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zwischen der 8. und 16. Woche wiesen B6mt<sup>AKR</sup> Tiere unter fettreicher Diät im Gegensatz zu B6mt<sup>FVB</sup> Tieren erhöhte Seruminsulinspiegel auf. Desweiteren zeigte sich bei den B6mt<sup>FVB</sup> Tieren unter fettreicher Diät eine signifikant erhöhte Dichte von Langerhansschen Inseln im Pankreas als bei den B6mt<sup>AKR</sup> Tieren. In der morphometrischen Analyse waren die Mitochondrien in  $\beta$ -Zellen von B6mt<sup>FVB</sup> Tieren deutlich in der Größe vermindert.

- 13) Die Mutation des *mt-Atp-8*-Gens führte vor dem B6-Hintergrund zu einer Verschlechterung der  $\beta$ -Zellfunktion und damit zu einer Einschränkung der Insulinsekretion. Metabolischer Stress durch eine fettreiche Diät induzierte in B6mt<sup>FVB</sup> Tieren eine adaptative Zunahme der  $\beta$ -Zellmasse, die in dem B6mt<sup>AKR</sup> Stamm nicht in diesem Ausmaß nachweisbar war.
- 14) Die Mutation des *mt-Atp-8*-Gens führte somit in  $\beta$ -Zellen des Pankreas durch gesteigerte mitochondriale ROS-Generierung zu einer Störung der metabolischen Insulinsekretionskopplung und einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber Autoimmunzerstörung auf dem NOD Hintergrund.

## Veröffentlichungen

Wester-Rosenloef L, Yu X, **Koch C**, Weiss H, Tiedge M, Ibrahim S. (2008). Role of mitochondrial ROS for increased incidence of autoimmune diabetes induced by natural variant of the Fo/F1-ATP synthase (ATP8). *Diabetologia* 2008 51:[Suppl1]: S95

Weiss H, **Koch C**, Wester-Rosenloef L, Ibrahim S, Tiedge M. (2010). Untersuchung der Auswirkung der mitochondrialen *Atp8*-Mutation im NOD und B6 Mausmodell auf Betazellfunktion und Diabetessuszeptibilität. *Diabetologie und Stoffwechsel* 2010 Suppl. 1, S87

Weiss H, **Koch C**, Wester-Rosenloef L, Ibrahim S, Tiedge M. (2010). The *Atp8* mutation of complex V impairs secretory function of beta cells – role of mitochondrial ROS and ATP in response to glucose challenge  
*Diabetologia* 2010 53:[Suppl1]: S201

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich diese der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Promotion vorgelegte Arbeit unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. Tiedge selbstständig durchgeführt und keine anderen als die in der Dissertationsschrift angeführten Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht oder die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Rostock, den 17.12.2010

Christiane Koch

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Angaben:**

Name: Christiane Koch  
Geburtsdatum: 19. August 1983  
Geburtsort: Cottbus  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung:**

1990 – 1994 Grundschole Kastanienhof Sarstedt  
1994 – 1996 Orientierungsstufe Sarstedt  
1996 – 2003 Gymnasium Sarstedt  
Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife

### **Studium:**

10/2004 – 11/2010 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock  
09/2006 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
11/2010 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Rostock, den 17.12.2010

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Markus Tiedge danke ich für die Überlassung des Themas, seine hilfreiche Unterstützung und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Frau Dr. Heike Weiss danke ich für ihr außergewöhnliches Engagement, die großartige Unterstützung und die unermüdliche Diskussionsbereitschaft, die einen großen Anteil zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Frau Lena Wester-Rosenloef, Ph. D. danke ich für freundliche Unterstützung, die vielen Tipps und Tricks beim experimentellen Arbeiten sowie die ständige Diskussionsbereitschaft.

Frau Lisa Heye danke ich für die stete Hilfe bei der Durchführung der Versuche sowie die vielen problemlösenden Ideen.

Frau Dr. Anja Siefert und Frau Annett Kott danke ich für das schnelle und unkomplizierte Einspringen bei personellen Engpässen.

Den Mitarbeitern, Doktoranden und Diplomanden des Instituts für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie danke ich für die freundliche Aufnahme und die ständige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Arbeit.

Frau Kathrin Sievert und Frau Ilona Klamfuß danke ich für die Tierbetreuung und die Einführung in spezielle mikrochirurgische Arbeitstechniken.

Meinem Freund Mathias danke ich für die vielen computertechnischen Hilfestellungen ohne die ich bei der Fertigstellung dieser Arbeit viel mehr Zeit gebraucht hätte.

Meinen Eltern danke ich für die beispiellose Unterstützung in finanzieller wie auch in jeglicher anderer Hinsicht. Ohne euch wäre das alles niemals möglich gewesen. DANKE!