

angefertigt an der Universität Rostock, Medizinische Fakultät, Institut für Medizinische
Biochemie und Molekularbiologie

Einfluss von Palmitinsäure auf die mitochondriale Funktion und Morphologie von INS1 Beta-Zellen

Inauguraldissertation

Zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

Der Universitätsmedizin Rostock

Rostock, 2012

Vorgelegt von:

Annekatriin Rickmann

Aus Rostock

Geboren am 22.07.1986 in Rostock

urn:nbn:de:gbv:28-diss2013-0148-4



Gutachter:

1. Gutachterin:

Frau Prof. Dr. rer. nat. Simone Baltrusch

Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Rostock

2. Gutachterin:

Frau Prof. Dr. rer. nat. Martina Düfer

Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Münster

3. Gutachter:

Herr PD Dr. med. Timo Kirschstein

Oskar-Langendorff-Institut für Physiologie, Rostock

Datum der Einreichung: 06.11.2013

Datum der Verteidigung: 02.10.2013

Tagungsbeiträge:

Rickmann A., Baltrusch S., Schultz J: Eine veränderte mitochondriale Netzwerkstruktur korreliert mit einem Verlust der Glukoseresponsivität in INS1 β -Zellen; 46. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Juni 2011, Leipzig

Schultz J., Hempel A., Waterstradt R., Rickmann A., Sharoyko V., Mulder H., Tiedge M., Baltrusch S.: Fis1, a key regulator of the mitochondrial network, controls glucose responsiveness in beta cells; EASD 2012, Berlin

Schultz J., Rickmann A., Tiedge M., Baltrusch S.: Palmitic acid alters the mitochondrial network structure and glucose-responsiveness in INS 832/13 cells; ISG 2012, Rostock

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Diabetes mellitus	1
1.2	β-Zell-Funktion	4
1.3	Fettsäuren in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes mellitus.....	6
1.4	Mitochondriale Dysfunktion	12
1.5	Mitochondriale Dynamik	14
1.5.1	Mitochondrialer Teilungsprozess	16
1.5.2	Mitochondrialer Fusionsprozess	20
1.6	Zielstellung der Arbeit.....	23
2	Material.....	24
2.1	Zelllinie	24
2.2	Zellkultur-Medium	24
2.3	Chemikalien.....	24
2.4	Antikörper	26
2.5	Enzyme.....	27
2.6	Kits	28
2.7	Molekulargewichtsmarker.....	28
2.8	TaqMan [®] Sonden	28
2.9	Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer.....	28
2.10	Verbrauchsmittel	31
2.11	Geräte	31
3	Methoden	33
3.1	INS1-Zelllinie.....	33
3.1.1	Zellkultivierung.....	34
3.1.2	Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest mit Trypanblau	34
3.2	mRNA-Expressionsanalysen.....	35
3.2.1	RNA-Extraktion	35
3.2.2	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	35
3.2.3	cDNA-Synthese.....	35
3.2.4	Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR).....	36
3.3	Proteinchemische Methoden	39
3.3.1	Protein-Präparation.....	39
3.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	39
3.3.3	SDS-Page	40
3.3.4	Proteintransfer	40

3.3.5	Western Blot-Hybridisierung	41
3.4	Immunfluoreszenzfärbung.....	42
3.4.1	Indirekte Immunhistochemie.....	42
3.4.2	Direkte Immunhistochemische Detektion der Mitochondrien	43
3.5	Funktionsanalysen: glukoseinduzierte Insulinsekretion.....	44
3.5.1	Stimulation	44
3.5.2	ATP/ADP-Test.....	44
3.5.3	Insulin-ELISA	45
4	Ergebnisse.....	48
4.1	Expression der Teilungs- und Fusionsproteine in INS1-Zellen	48
4.2	Expression der Fusions- und Teilungsproteine in INS1-Zellen nach Inkubation mit Palmitinsäure	54
4.2.1	Expression des Teilungsproteins Fis1	54
4.2.2	Expression des Teilungsproteins Drp1	58
4.2.3	Expression des Fusionsproteins OPA1.....	61
4.2.4	Expression des Fusionsproteins Mfn1.....	63
4.2.5	Expression des Fusionsproteins Mfn2.....	66
4.2.6	Immunhistochemische Detektion der Mitochondrien	70
4.3	Untersuchungen zur glukosestimulierten Insulinsekretion.....	73
4.3.1	Bestimmung der ATP/ADP-Ratio in INS1-Zellen.....	73
4.3.2	Bestimmung der Glukosestimulierten Insulinsekretion in INS1-Zellen	75
5	Diskussion	78
5.1	Expressionsanalyse der mitochondrialen Dynamik.....	78
5.2	Strukturelle Veränderungen des mitochondrialen Netzwerkes	81
5.3	Einfluss der mitochondrialen Dynamik auf die glukoseinduzierte Insulinsekretion	82
5.4	Ausblick	84
6	Zusammenfassung.....	86
7	Thesen	88
	Abkürzungsverzeichnis.....	90
	Literaturverzeichnis.....	95
	Tabellenverzeichnis	108
	Abbildungsverzeichnis	108
	Eidesstattliche Erklärung.....	IV
	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Danksagung.....	V

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, die ein heterogenes Krankheitsbild aufweist. Es besteht eine komplexe Regulationsstörung des Stoffwechsels, die durch eine chronische Hyperglykämie gekennzeichnet ist [1]. Weltweit sind etwa 230 Millionen Menschen von dieser Erkrankung betroffen [2]. Die Inzidenz nimmt weiter zu und es wird angenommen, dass es bis zum Jahr 2030 über 360 Millionen Erkrankte geben wird [3]. In Deutschland liegt die Prävalenz des Diabetes mellitus derzeit bei etwa sieben bis acht Prozent [4]. Der Diabetes mellitus wird nach den zugrunde liegenden pathogenetischen Mechanismen in 4 Gruppen eingeteilt (Tabelle 1).

Den Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM) kennzeichnet eine progrediente Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas und führt zum absoluten Insulinmangel. Beim Diabetes mellitus Typ 1A liegt ein chronischer Autoimmunprozess vor, dessen Ursache noch weitgehend unbekannt ist. Serologische Marker sind Inselzellantikörper, Insulinautoantikörper, Autoantikörper gegen Glutamat-Decarboxylase der β -Zelle und Autoantikörper gegen Tyrosinphosphatase. Bestimmte HLA („human leukocyte antigen“-)Typen und andere suszeptible Genloci prädisponieren für die Entwicklung eines T1DM [5]. Zusätzlich werden externe Faktoren wie Toxine, Immunstimulatoren, frühkindliche Ernährungskomponenten und vor allem virale Infektionen diskutiert [6,7]. Dem idiopathischen Typ 1B ist keine ätiopathogenetische Kausalität zuzuordnen. In Deutschland ist dieser Typ sehr selten. Vornehmlich tritt der T1DM in jungen Jahren auf. In 10-15% wird die Erkrankung erst im Erwachsenenalter als sogenannter LADA-Diabetes („latent autoimmune diabetes of the adult“) manifest [8].

I. Typ 1 Diabetes

(β -Zell-Zerstörung, die üblicherweise zum absoluten Insulinmangel führt)

- A. Immunologisch vermittelt
- B. Idiopathisch

II. Typ 2 Diabetes

(kann sich von einer vorwiegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz erstrecken)

III. Andere spezifische Diabetes-Typen

A. Genetische Defekte der β -Zell-Funktion, z.B.:

- Chromosom 12, HNF-1 α (frühere Bezeichnung MODY 3)
- Chromosom 7, Glucokinase (GCK) (frühere Bezeichnung MODY 2)
- Chromosom 20, HNF-4 α (frühere Bezeichnung MODY 1)
- Mitochondriale DNA

B. Genetische Defekte der Insulinwirkung, z.B.:

- Typ A Insulinresistenz; Leprechaunismus;
- Rabson-Mendenhall-Syndrom; Lipatrophischer Diabetes

C. Erkrankungen des exokrinen Pankreas, z.B.:

- Pankreatitis; Trauma, Pankreatektomie; Neoplasie; Zystische Fibrose; Hämochromatose
- Fibrosierende verkalkende Pankreopathie (Fibrocalculous pancreopathy-FCPD)

D. Endokrinopathien, z.B.:

- Akromegalie; Cushing-Syndrom; Glukagonom; Phäochromozytom
- Hyperthyreose; Somatostatinom; Aldosteronom

E. Medikamenten- oder chemikalieninduziert, z.B.:

- Neuroleptika (insbes. Clozapin, Olanzapin); Pentamidin; Nikotinsäure; Phenytoin; Thiazide
- Glukokortikoide; Schilddrüsenhormone; Diazoxid; β -adrenerge Agonisten; Alpha-Interferon

F. Infektionen, z.B.:

- Kongenitale Rötelninfektion
- Zytomegalievirus

G. Seltene Formen des immunvermittelten Diabetes, z.B.:

- „Stiff-Person“-Syndrom
- Antiinsulinrezeptorantikörper

H. Andere, gelegentlich mit Diabetes assoziierte genetische Syndrome, z.B.:

- Down-Syndrom; Klinefelter-Syndrom; Turner-Syndrom; Wolfram-Syndrom; Porphyrie
- Friedreich Ataxie; Lawrence-Moon-Biedl-Syndrom; Chorea Huntington;
- Dystrophia myotonica; Prader-Willi-Syndrom

IV. Gestationsdiabetes

Tabelle 1: Ätiologische Klassifikation des Diabetes mellitus (nach American Diabetes Association (ADA) 1997) [1]

Der Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) ist mit 90% die häufigste Form des Diabetes mellitus [9]. Es besteht eine Kombination aus einer peripheren Insulinresistenz [10] und einer Dysfunktion der insulinproduzierenden β -Zellen in Form einer gestörter Insulinsekretion [11], die zunächst zum relativen Insulinmangel führt und später in eine absolute Insulindefizienz übergehen kann. Es besteht eine genetische Determinierung [12], dessen zugrunde liegenden genetischen Faktoren im Detail aber noch unbekannt sind. Eine Reihe suszeptibler Genloci (z.B. TCF7L2, INS, IRS-1, PPAR γ) konnten bereits identifiziert werden [13,14]. Neben der genetischen Prädisposition sind Adipositas, Ernährungsfehler, Bewegungsmangel und ein höheres Lebensalter weitere auslösende Faktoren [15,16]. Die mit der Insulinresistenz assoziierte Glukoseintoleranz steht in enger Korrelation mit einer abdominellen Adipositas, die häufig im Rahmen des metabolischen Syndroms auftritt [10,17,18]. Das metabolische Syndrom ist gekennzeichnet durch eine Glukoseintoleranz oder T2DM, einer abdominellen Adipositas, Dyslipoproteinämie, Hyperurikämie, gestörte Fibrinolyse, Hyperandrogenämie bei Frauen und einer essentiellen arteriellen Hypertonie [19]. Als weitere mögliche Ursache zur Entstehung einer Insulinresistenz und Sekretionsstörung wird zunehmend über die Rolle einer mitochondrialen Dysfunktion diskutiert.

Die beim T2DM entstehende chronische Hyperglykämie führt zur Glykosilierung des Endothels, welche zu mikro- und makroangiopathischen Folgeschäden führt [20]. Hierbei kann es zur Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie kommen. Die Makroangiopathie begünstigt stark das Risiko für die Entwicklung von koronarer Herzkrankheit, Herzinfarkt, Schlaganfall, arterieller Hypertonie und peripherer arterieller Verschlusskrankheit [21]. Trotz der Vielfalt an verfügbaren Therapiemöglichkeiten stellen diese chronischen diabetischen Sekundärkomplikationen weiterhin ein gravierendes Problem dar. Sie sind Hauptursachen der erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsraten von Diabetikern.

Zusätzlich steigt international die Zahl der an T2DM erkrankten Kinder, Jugendlichen und jungen Erwachsenen [22]. Da die möglichen Spätfolgen eines Diabetes mellitus die Lebensqualität und die Lebenserwartung der Patienten drastisch senken, aber zum heutigen Zeitpunkt noch nicht alle Ursachen und pathophysiologischen Prozesse des Diabetes mellitus bekannt sind, zwingt dies zur Erforschung der Pathophysiologie und somit zu einer Entwicklung möglichst sinnvoller Primärprävention und Therapiemöglichkeiten.

1.2 β -Zell-Funktion

Die stark vaskularisierten und innervierten Langerhans'schen Inseln liegen verstreut im exokrinen Pankreas und nehmen ein bis zwei Prozent des Pankreasvolumens ein. In diesen endokrinen Inseln befinden sich die Glukagon-produzierenden α -Zellen, die Insulin-produzierenden β -Zellen (circa 60-80%), die Somatostatin-produzierenden δ -Zellen, die PP-Zellen (Pankreatisches Polypeptid) und die Ghrelin-produzierenden ϵ -Zellen [23]. Die β -Zellen produzieren Insulin, daneben auch Amylin. Amylin wird zusammen mit Insulin in den β -Granula gespeichert und inhibiert die Glukagonsekretion und verlangsamt die Magen-Darm-Passage. Die Hauptaufgabe des Insulins besteht in der Senkung der Blutglukosekonzentration. Als anaboles Hormon fördert es die Aufnahme von Glukose, Fettsäuren und Aminosäuren in das periphere Gewebe und stimuliert dort die Lipogenese, sowie die Glykogen- und Proteinsynthese. Insulin inhibiert die Lipolyse, Proteolyse, Glykogenolyse und Glukoneogenese. Desweiteren fördert Insulin das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung [24]. Der Anstieg der Blutglukosekonzentration ist der wichtigste physiologische Stimulus der Insulinsekretion [25]. Die Beziehung zwischen Glukoseanstieg und Insulinsekretion verläuft sigmoidal und wird durch das Glukosesensorenzym Glukokinase vermittelt [26]. Durch den Anstieg der Blutglukose kommt es zu einem verstärkten Glukosemetabolismus der β -Zelle, der mit einer Insulinsekretion gekoppelt ist [27]. Die Insulinsekretion beginnt bei einer Konzentration von 2-3 mmol/l Glukose und steigt dann bis zu einer Konzentration von 15 mmol/l Glukose. So wird gewährleistet, dass bei jeder Erhöhung der Blutglukose über einen Grenzwert von etwa 3 mmol/l im gesunden Zustand eine dosisabhängige Insulinfreisetzung stattfindet [28]. Über die in hoher Dichte in der β -Zellmembran vorkommenden niedrigaffinen GLUT-2-Transporter wird Glukose in die β -Zelle aufgenommen [29]. Dort wird die Glukose durch die Glukokinase phosphoryliert und in der Glykolyse zu Pyruvat umgewandelt. Pyruvat wird in die mitochondriale Matrix transportiert und dort über Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust. Die dort gebildeten Reduktionsäquivalente werden in der mitochondrialen Atmungskette zur ATP-Generierung genutzt [30]. Durch den Anstieg von ATP und der Abnahme von ADP steigt die ATP/ADP-Ratio in der β -Zelle an und daraufhin kommt es ab einem Schwellenwert zum Schließen des ATP-abhängigen Kaliumkanals in der Plasmamembran. Der verminderte K^+ -Ausstrom bewirkt eine Depolarisation der Plasmamembran [31]. Dadurch werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ geöffnet [32]. Durch den vermehrten Calcium-Einstrom in die β -Zelle werden zusätzlich Ca^{2+} -Ionen über eine Ca^{2+} -induzierte- Ca^{2+} -Freisetzung aus den

internen Speicherkompartimenten freigesetzt [33]. Der Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in der β -Zelle führt zur Fusion der insulinspeichernden Vesikel mit der Plasmamembran und somit zur Exozytose von Insulin in die Blutbahn [34] (Abb. 1).

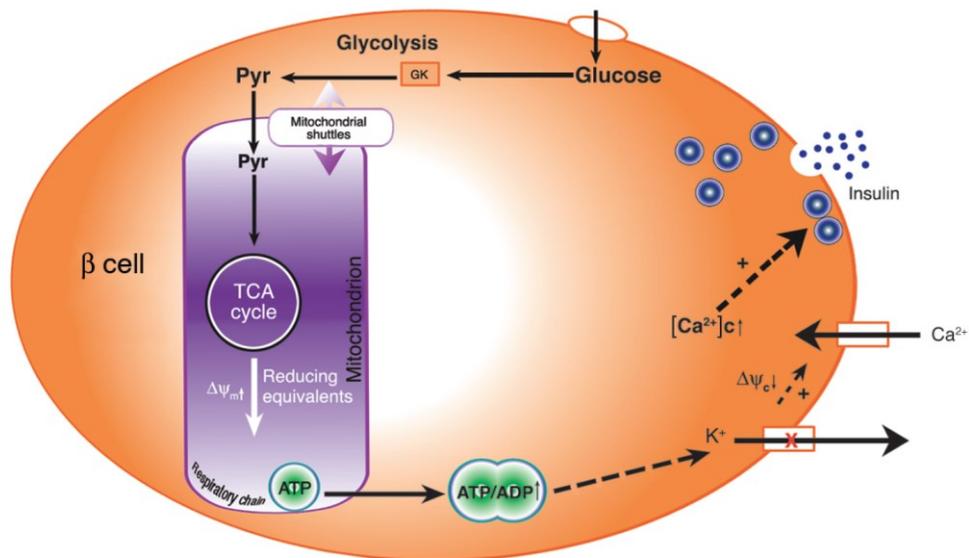


Abbildung 1: Glukose-stimulierte-Insulinsekretion in pankreatischen β -Zellen (Brownlee *et al.*, 2003 [35]): In den β -Zellen wird die Glukose durch die Glukokinase phosphoryliert und in der Glykolyse zu Pyruvat umgewandelt. Pyruvat wird in die mitochondriale Matrix transportiert und dort über Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust. Die dort gebildeten Reduktionsäquivalente werden in der mitochondrialen Atmungskette zur ATP-Generierung genutzt. Durch den Anstieg der ATP/ADP-Ratio werden ATP-sensitive K^+ -Kanäle geschlossen. Durch die folgende Depolarisation der Plasmamembran werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle geöffnet. Dies führt zu einem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, die eine Exozytose der Insulingranula auslöst. $\Delta\psi_m$ – mitochondriales Membranpotenzial, $\Delta\psi_c$ – Zellmembranpotenzial.

Neben Glukose kann eine zusätzliche Verstärkung der Glukosestimulierte Insulinsekretion (GSIS) in der β -Zelle unter anderem durch einige andere Monosaccharide, Aminosäuren, Ketonkörper und freie Fettsäuren hervorgerufen werden [28,36]. Für die Aufrechterhaltung der Blutglukosehomöostase ist eine regulierte Insulinfreisetzung essentiell. Hierfür ist die Funktion der Mitochondrien in der β -Zelle von besonderer Bedeutung. Eine mitochondriale Dysfunktion verursacht über eine Insulinsekretionsstörung eine dysregulierte Glukosehomöostase und führt somit zur Entwicklung eines Diabetes mellitus [37].

1.3 Fettsäuren in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes mellitus

Der Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) ist nicht nur durch eine gestörte Regulation des Glukosemetabolismus charakterisiert, sondern steht auch in Assoziation mit einer Dyslipidämie. Wenn die Insulinsekretion der β -Zellen des Pankreas die Insulinresistenz der peripheren Gewebe nicht mehr kompensieren kann kommt es zu einer Hyperglykämie [5]. Dies wird durch eine β -Zell-Dysfunktion und/oder den Verlust der β -Zell-Masse hervorgerufen [38]. Glukose und freie Fettsäuren regulieren die β -Zell-Funktion [39]. Dabei amplifizieren die freien Fettsäuren die glukosestimulierte Insulinsekretion (GSIS) um ein Vielfaches [28,36]. Die chronische Exposition mit freien Fettsäuren dagegen beeinflusst die β -Zellfunktion negativ und es kommt zu einer reduzierten GSIS [39]. Somit sind erhöhte freie Fettsäuren im Plasma mit einem Diabetes mellitus assoziiert und wirken beschleunigen die Entstehung einer Insulinresistenz und β -Zell-Dysfunktion [40].

Sowohl eine Adipositas, bei der es üblicherweise zu erhöhten freien Fettsäuren kommt, als auch allein die Erhöhung der freien Fettsäuren im Blut ohne Adipositas bewirken pleiotrope Defekte in den Geweben und sind assoziiert mit dem metabolischen Syndrom und T2DM [41,42]. In der Pathogenese des T2DM scheinen vor allem die gesättigten Fettsäuren bedeutend zu sein, während den ungesättigten Fettsäuren eher protektive Funktionen zugeschrieben werden [42,43]. Die häufigste gesättigte Fettsäure im menschlichen Blut ist die Palmitinsäure (physiologisch ca. 28% Gesamtanteil aller Fettsäuren im Blut) [43]. Die normale Fettsäure-Konzentration im Plasma beträgt 350-500 μ M, wobei 98-99% an Albumin gebunden sind.

Freie Fettsäuren werden für die Aufrechterhaltung der normalen β -Zellfunktion benötigt [36]. Sie sind eine wichtige Energiequelle für die β -Zelle. Das aus der β -Oxidation entstandene Acetyl-CoA kann in den Citratzyklus einfließen und somit ATP generieren. Acetyl-CoA dient weiterhin als Ausgangspunkt für die Synthese von Lipiden, wie z.B. TAG (Triacylglycerin), Cholesterin und Ceramiden, sowie für die Synthese von Ketonkörpern. Lipide sind elementare Bestandteile von Membranen. Freie Fettsäuren sind ebenso bedeutend bei der Exozytose von Vesikeln [28].

Eine akute Erhöhung der Fettsäuren verstärkt die GSIS [28,36]. Die stärkste Signaltransduktion erfolgt über den in der β -Zellmembran gelegenen Gq-Protein gekoppelten Rezeptor 40 (GPR40) (Abb. 2) [44]. Über eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) erfolgt eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Nachfolgend kommt es zur Exozytose der Insulin-Vesikel [45,46]. Dies ist

allerdings von der Aktivierung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle durch Glukose und von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig [46]. Durch die Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher kann es zur Depolarisation der Membran kommen und folgend zur Öffnung der Spannungs-abhängigen Ca^{2+} -Kanäle [33]. Die Signalgebung durch DAG (Diacylglycerin) und PLC tragen ebenfalls zur Exozytose der Vesikel bei. Die Energiegewinnung über die β -Oxidation und damit steigende ATP/ADP-Ratio spielt für die Amplifikation der GSIS eine untergeordnete Rolle [47].

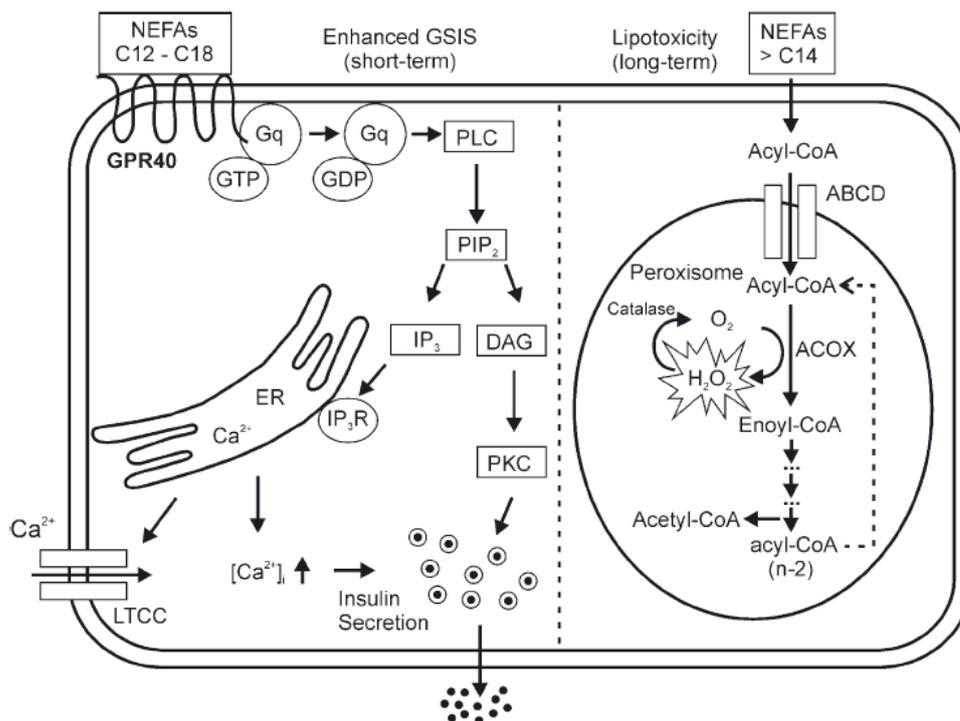


Abbildung 2: Wirkung Fettsäuren auf die β -Zelle (Germann *et al.*, 2010 [47]): Fettsäuren amplifizieren die GSIS via GPR40. Bei langfristiger Exposition mit Fettsäuren kommt es zur Induktion von Lipotoxizität über den peroxisomalen Metabolismus.

Erhöhte Konzentrationen von freien Fettsäuren supprimieren allerdings die Insulinsekretion und wirken lipotoxisch durch die Beeinträchtigung der β -Zellfunktion und die Einleitung einer β -Zell-Apoptose [39,42]. Die Wirkung der Fettsäuren auf die β -Zelle hängt von der Kettenlänge und dem Grad der Sättigung ab [48]. Einen starken zytotoxischen Effekt haben vor allem die langkettigen gesättigten Fettsäuren, wie die Palmitinsäure, während kurzkettige gesättigte und ungesättigte Fettsäuren gut toleriert werden. Der lipotoxische Effekt wird nicht durch die GPR40-Rezeptoren vermittelt [47]. Kurze und mittellange Fettsäuren (C4-8) werden in den Mitochondrien abgebaut. Die β -Oxidation von langen Fettsäuren (C10-16) erfolgt in den Mitochondrien und den Peroxisomen. Fettsäuren mit einer Länge von C17-24 werden vorrangig durch die Peroxisomen abgebaut [49]. Die Aufgabe der Peroxisomen ist die

Kürzung der langen Ketten, um dann die kürzeren Fettsäuren direkt in die β -Oxidation der Mitochondrien einzuschleusen. Die anfallenden Elektronen in der β -Oxidation können im Mitochondrium auf Reduktionsäquivalente übertragen werden. In den Peroxisomen ist der Elektronenakzeptor allerdings Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das eine relativ lange Halbwertszeit hat und Cystein-Gruppen in Proteinen direkt oxidieren kann [50]. β -Zellen besitzen nahezu keine Katalase und sind demnach anfälliger für die Wirkung von H_2O_2 [51]. Geringe Konzentrationen von H_2O_2 können proliferativ auf die Zelle wirken. Bei steigenden Konzentrationen kommt es zum Arrest des Wachstums und zur Apoptose [52]. Die starke Radikalbildung durch H_2O_2 ist bedeutend für die toxische Wirkung der Fettsäuren [47]. Im mitochondrialen Metabolismus werden ebenfalls reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet, die zur Lipotoxizität beitragen. Dabei sind die β -Zellen durch ihre geringen enzymatischen antioxidativen Kapazitäten besonders anfällig für oxidativen Stress [39,51].

Weiterhin kommt es durch die chronische Erhöhung der Fettsäuren zu einer Modifizierung der Genexpression von Genen, die für metabolische Enzyme und Transkriptionsfaktoren kodieren (Abb. 3). So wird die Acyl-CoA-Synthetase (ACS) und das Fettsäure-binding-protein (FABP) hochreguliert, was zur vermehrten Bildung von Acyl-CoA führt [53]. Aus diesen wird vermehrt Cholesterin und Ceramid synthetisiert [54]. Die Cholesterin-Akkumulation in der β -Zelle führt zu einer veränderten Insulinsekretion und einer verminderten β -Zell-Masse [55]. Durch eine Verminderung der β -Oxidation werden die Fettsäuren vermehrt verestert und es kommt zur gesteigerten Bildung von Triacylglyceriden (TAG) [54,56]. Erhöhte TAG-Gehalte scheinen selbst nicht toxisch zu sein, aber dürften ein Marker für die Lipotoxizität sein [42].

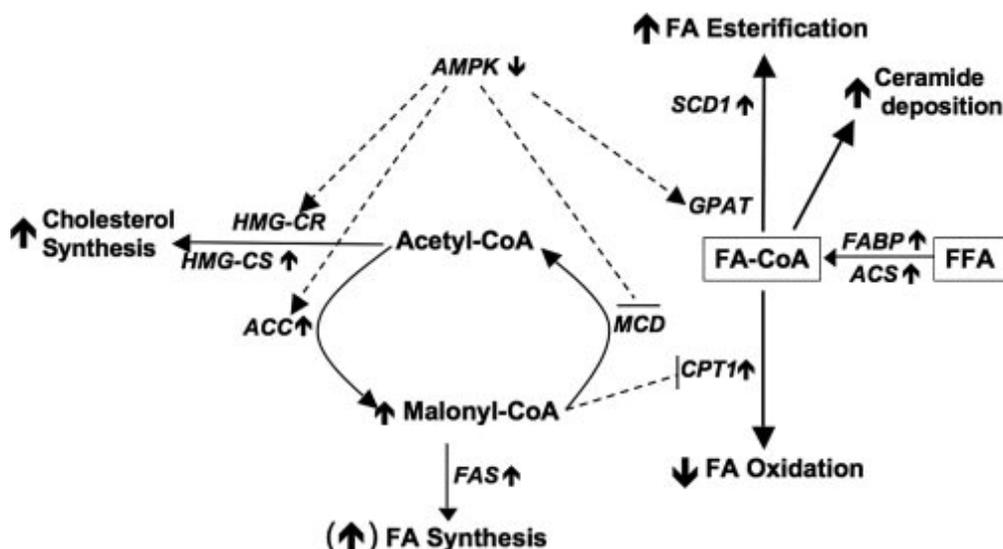


Abbildung 3: Genexpressionsänderung durch Lipotoxizität (El-Assaad *et.al.*, 2010 [54]): FFA - freie Fettsäuren, FABP – Fettsäure-Bindungsprotein, ACS – Acyl-CoA-Synthetase, FAS – Fettsäure-Synthase, HMG-CS – HMG-CoA-Synthase, MCD – Malonyl-CoA-Decarboxylase, AMPK – AMP-Kinase, ACC – Acetyl-CoA-Carboxylase 1, SCD1 – Stearoyl-CoA-Desaturase 1, CPT1 – Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1, HMG-CR - 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reductase, GPAT- Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase

Weiterhin wird die Expression von GLUT-2 (Glukosetransporter Typ 2) und der Glukokinase vermindert [57]. Ebenso die β -Untereinheit der AMPK (AMP-Kinase), die die zelluläre Energie-Homöostase reguliert [58]. Die Schlüsselenzyme des Lipidmetabolismus werden dagegen hochreguliert: Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1 (CPT1), Acetyl-CoA-Carboxylase 1 (ACC1) und die Stearoyl-CoA-Desaturase1 (SCD1) [54]. Das vermehrt anfallende Acetyl-CoA aus dem Abbau von Glukose und den Fettsäuren wird zunehmend zu Malonyl-CoA umgebaut, welches die CPT1 allosterisch hemmt und es somit zu einer verminderten β -Oxidation kommt [59]. Eine Bestätigung des verminderten Energie-Metabolismus findet sich ebenfalls in der Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials, sowie einer Verminderung des zellulären ATP-Gehalts [54]. Weiterhin kommt es zu einer verminderten mRNA-Expression von Insulin und einem geringeren Insulingehalt [54,57].

Freie Fettsäuren induzieren eine erhöhte Lipidperoxidation und einen verminderten Glutathion-Status. Palmitinsäure steigert die NOS-Aktivität (Stickstoffmonoxid-Synthase) und damit die NO-Produktion (Stickstoffmonoxid) [246]. NO reagiert mit dem Radikal O^{2+} zum hochreaktiven Peroxynitrit, welches zu DNA-Schäden und Apoptose führen kann [60]. Das aus den freien Fettsäuren gebildete DAG und Monoacylglycerin sind mit einer chronischer Stimulation von NOX (Stickoxide) assoziiert, welche O^{2+} und H_2O_2 bildet [55]. Die NO-Produktion, sowie die Ceramid-Formation führen zu einer β -Zell-Dekompensation [61].

Palmitinsäure induziert die Phosphorylierung der PERK (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase), die ein Marker für ER-Stress darstellt [62]. Das ER

(Endoplasmatisches Retikulum) ist der zelluläre Ca^{2+} -Hauptspeicher und dient der Faltung und Prozessierung des Proinsulins [63]. Die Ca^{2+} -Homöostase ist essentiell für die ER-Funktion und wird durch chronische Exposition mit Palmitinsäure beeinträchtigt [62]. Es kommt zu vermehrtem ER-Stress [64].

Chronische Exposition mit erhöhten Fettsäure-Konzentrationen induzieren über eine vermehrte ROS-Produktion eine gesteigerte Uncoupling Protein 2 (UCP2)-Expression [65]. UCP ist in der Regulation der mitochondrialen ATP-Produktion involviert. Es führt über die Bildung eines Protonenlecks zu einem reduzierten Protonengradienten an der mitochondrialen Membran. Dadurch vermindert sich die ATP-Produktion und folgend die GSIS [65]. Dies hat vor allem protektive Funktionen, um den Energiefluss zu unterbrechen und somit die ROS-Produktion einzuschränken [66]. ROS induziert eine mitochondriale Dysfunktion und führt somit zu einer verminderten Sekretionsleistung der β -Zelle [67].

Weiterhin kommt es durch chronische Exposition mit Palmitinsäure zur gesteigerten Expression des SREBP-1c (Sterol regulatory element-binding protein-1c). SREBP-1c reguliert unter anderem UCP2 und ist in der gestörten Insulinsekretionsleistung der β -Zelle involviert [68]. Eine verminderte Expression durch Palmitinsäure findet sich bei Pdx-1 (pankreatic und duodenal Homebox 1) und GLP-1R (Glukagon-like peptide-1 Rezeptor). Pdx-1 reguliert die Neogenese, Differenzierung und Apoptose der β -Zelle und reguliert die β -Zell-Funktion [69]. Das Glukagon-like Peptid-1 führt zu einer vermehrten GSIS und reguliert die β -Zellmasse [70].

Freie Fettsäuren aktivieren verschiedene Apoptose-Effektoren. Eine Apoptose wird begünstigt weil die Expression der antiapoptotischen Gene der Bcl-Familie (B-Zell-Lymphom) unter freien Fettsäuren herunter reguliert sind und somit eine Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien erleichtert möglich ist [55].

Die Lipotoxizität hat Bedeutung bei der Entstehung einer beeinträchtigten β -Zell-Funktion mit gestörter Insulinproduktion und Insulinsekretion [42,54,55]. Der genaue Zusammenhang zwischen den freien Fettsäuren und der verminderten Insulinsekretion ist derzeit allerdings noch Gegenstand der Forschung (Abb. 4).

Diese Prozesse stehen allerdings im T2DM auch im Zusammenhang mit einer Glukotoxizität.

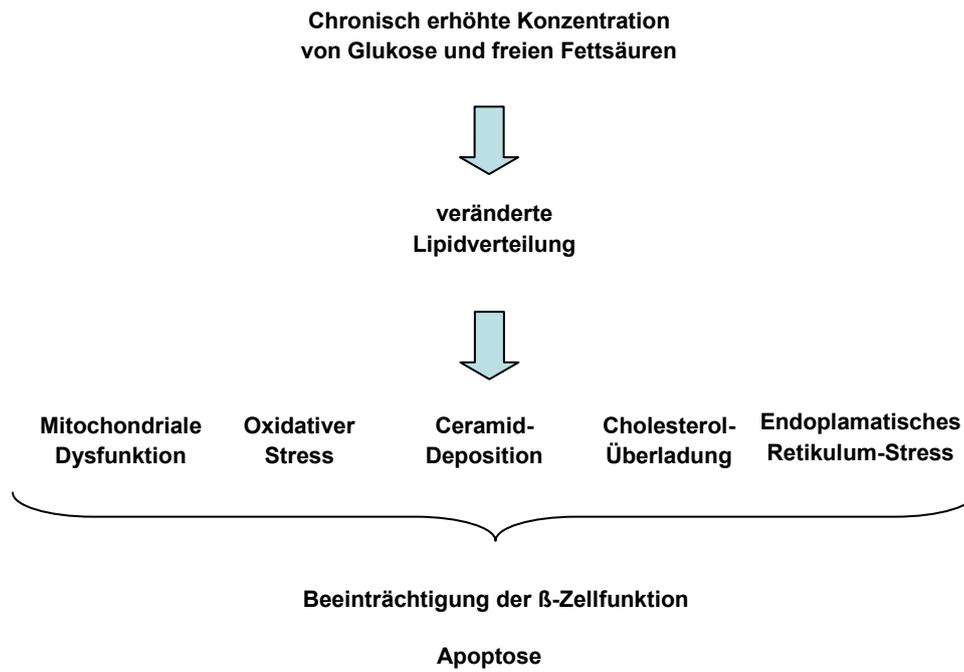


Abbildung 4: Mögliche Mechanismen der Glukolipotoxizität in β -Zellen (modifiziert nach El-Assaad *et.al.*, 2010 [54])

1.4 Mitochondriale Dysfunktion

Postmitotische Gewebe mit einem hohen aeroben Energiebedarf wie die β -Zellen haben ca. 2000-3000 Mitochondrien pro Zelle. Mitochondrien sind essentiell für die Aufrechterhaltung der normalen physiologischen Funktion der β -Zelle. Sie haben eine entscheidende Rolle im Energie-Metabolismus und anderen biosynthetischen Prozessen, sowie der Ca^{2+} -Signalgebung und der Integration von apoptotischen Stimuli. Sie gewährleisten die Kopplung zwischen dem Metabolismus und der Insulinsekretion [72,73].

Mitochondrien sind von einer Doppelmembran umschlossene Organellen. Sie besitzen in den eukaryotischen Zellen zahlreiche essenzielle Funktionen und werden durch ihre wichtige Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) auch als „Kraftwerke“ der Zellen bezeichnet. Fast der gesamte Anteil an intrazellulärer Energie in Form von ATP wird durch die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) generiert. Weiterhin finden bedeutende Stoffwechselwege statt, wie die β -Oxidation von Fettsäuren, der Citratzyklus, die Häm biosynthese, die Synthese einiger Aminosäuren und Eisen-Schwefel-Zentren. Mitochondrien spielen außerdem eine zentrale Rolle bei der Apoptose. Die Außenmembran ist relativ durchlässig für Stoffwechselintermediate. Zwischen den beiden Membranen befindet sich der Intermembranraum. Dieser enthält das mit der Innenmembran assoziierte Hämprotein Cytochrom c, das bei Schädigung der Außenmembran ins Zytosol freigesetzt wird und somit die Caspasen-abhängige Kaskade der Apoptose auslöst. Die Innenmembran ist durch stark gefaltete Cristae und ihre Undurchlässigkeit charakterisiert. Sie enthält die Enzymkomplexe der Atmungskette und die mitochondriale ATP-Synthase. In dem von der Innenmembran eingeschlossenen Matrixraum finden essentielle Stoffwechselwege statt. Ebenso im Matrixraum befindet sich die maternal vererbte zirkuläre mitochondriale mtDNA, die für zwei Präkursor-rRNAs mitochondrialer Ribosomen und für 22 tRNAs, die für die mitochondriale Proteinsynthese benötigt werden, kodiert. Die mtDNA besitzt 13 Gene für die hydrophoben Untereinheiten der Enzymkomplexe 1 und 3-5 der Atmungskette [28]. Da die mtDNA sehr dicht gepackt ist und keine Introns besitzt, die Replikation asymmetrisch erfolgt und es weder Histone noch ein suffizientes Reperatursystem gibt, ist die mtDNA 10 bis 20 mal anfälliger für Mutationen, als die chromosomale DNA im Zellkern. Schäden treten dennoch nicht unmittelbar auf, weil jedes mitochondriale Gen bis zu 1000 Kopien besitzt. Zunächst wird die Energieproduktion der Zelle eingeschränkt bis keine Kompensation mehr stattfinden kann und die Zelle stirbt. Klinisch markante Symptome treten ab 40-50% Schädigung der Kopien auf.

Im Laufe der Jahre kommt es zur Ansammlung von Deletionen, die mit dem physiologischen Alterungsprozess in Verbindung stehen [74]. Änderungen, die mit der Alterung in Mitochondrien vorkommen umfassen Schäden an der mitochondrialen DNA durch freie Radikale, eine verminderte Effizienz des Citratzyklus, Defekte in der Atmungskette aufgrund von Änderungen der Enzymaktivität und Senkung der Membranfluidität [75]. Diese Veränderungen in der mitochondrialen Funktion und Effizienz gehen somit mit einer mitochondrialen Dysfunktion einher und begünstigt so metabolische Erkrankungen wie den T2DM [37].

Eine intakte Mitochondrienfunktion ist vor allem in den β -Zellen des Pankreas essentiell für die Energieversorgung der Zelle mit ATP und für die GSIS. Eine gestörte mitochondriale Dynamik verändert die Energieproduktion der Mitochondrien. Kommt es durch eine mitochondriale Dysfunktion zu einer verminderten ATP/ADP-Ratio sinkt die Insulinsekretion und führt somit zu einer gestörten Glukose-Homöostase und folgend zum T2DM [76].

Störungen im mitochondrialen Metabolismus werden als Mitochondriopathien zusammengefasst [77]. 200 vererbte und erworbene Mitochondriopathien sind bisher bekannt. Hierzu zählen unter anderem Myopathien, Enzephalopathien, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Krebs, Herz-Kreislaufkrankungen, Neuropathien, Hyperlipidämien und Diabetes mellitus [78]. Die mitochondrialen Dysfunktionen können unter anderem durch Mutationen der mtDNA, aber auch durch Mutationen kernkodierter, mitochondrialer Proteine hervorgerufen werden [79]. Störungen in der mitochondrialen Dynamik werden ebenfalls als mitochondriale Dysfunktion bezeichnet, da das mitochondriale Netzwerk eine entscheidende Rolle für die Zellfunktion hat. Hierzu gehört vor allem die Regulation der mitochondrialen Morphologie und der Stoffwechsellistung [76,80,81,82,83]. Störungen der mitochondrialen Dynamik manifestieren sich bei neurodegenerativen Erkrankungen [84,85], Muskelatrophien [86], bei der zellulären Seneszenz (Alterung) [87] und werden ebenfalls bei der Entstehung des T2DM diskutiert [37,88,89]. Interessanterweise finden sich bei diesen Erkrankungen veränderte Morphogenesen von Mitochondrien.

Mitochondrien bilden in den β -Zellen ein dynamisches tubuläres Netzwerk [90]. Für die Erhaltung dieses Netzwerks sind koordinierte Fusions- und Teilungsprozesse der Mitochondrien nötig [91,92]. Die für die mitochondriale Morphologie und Verteilung verantwortlichen Proteine der Fusion und Spaltung konnten in den letzten Jahren identifiziert werden. Diese Proteine sind auch bei Prozessen des Stoffwechsels beteiligt [80]. Ein veränderter Stoffwechsel durch eine Störung der mitochondrialen Dynamik begünstigt die Entstehung eines T2DM [37,80,93]. Die Pathomechanismen dieser mitochondrialen

Dysfunktion, die zum T2DM führt, gilt es demnach aufzuklären. **1.5 Mitochondriale Dynamik**

Das tubuläre Netzwerk der Mitochondrien wird durch ein Gleichgewicht von kontinuierlichen Fusions- und Teilungsprozessen aufrechterhalten [91,92]. Die Balance dieser mitochondrialen Dynamik ist bedeutend für die Regulation der Morphologie, Konnektivität, Verteilung, Transport und Anzahl der Mitochondrien, sowie für die Stoffwechsellistung [76,80,81,82,94]. Die Struktur der Mitochondrien ist hochdynamisch und erlaubt eine Interaktion untereinander [90,95]. Kontinuierlich wird die Häufigkeit von Teilung und Fusion an veränderte Energieanforderungen angepasst [76,94]. Die mitochondriale Dynamik ist essentiell für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase [97]. Zellen mit einer hohen Fusions/Teilungs-Ratio haben wenige Mitochondrien und diese sind lang und untereinander stark verknüpft. Wobei Zellen mit einer geringen Ratio viele Mitochondrien haben, die kleine Kugeln oder kurze Stäbchen darstellen [81,97]. Die Mitochondrien werden aktiv entlang des Zytoskeletts transportiert und können dabei fusionieren und Lipidmembranen und mitochondriale Inhalte austauschen [94,98]. Die Mitochondrien werden in der Zelle zu Orten mit hohem Energieverbrauch rekrutiert [98].

Die mitochondriale Dynamik ist ebenfalls ein Bestandteil des mitochondrialen Lebenszyklus (Abb. 4). Bei den kontinuierlich stattfindenden Zyklen von Fusion und Teilung wechseln die Mitochondrien zwischen einem Post-Fusionsstadium (Netzwerk) und einem Post-Teilungsstadium (Solitary). Die Fusionsphasen sind kurz und veranlassen die Teilung der Mitochondrien. Die mitochondriale Teilung generiert zwei ungleiche Tochterseinheiten mit entweder einem intakten Membranpotential (rote Linie) oder einer Depolarisation (grüne Linie). Ist die Depolarisation nur transient und das Membranpotential wird wieder hergestellt kann das dysfunktionale Mitochondrium durch eine Fusion wieder zu dem aktiven Pool rekrutiert werden (grüner zu rotem Pfeil). Erfolgt keine Repolarisation des Membranpotentials werden die geschädigten Mitochondrien durch Autophagie aus dem Netzwerk entfernt [99]. Eine Akkumulation von geschädigter mtDNA und anderen mitochondrialen Bestandteilen kann so verhindert werden [100]. Nach der Teilung liegen die Mitochondrien in einer längeren Phase einzeln vor (Solitary Period), um dann wieder zu fusionieren [99].

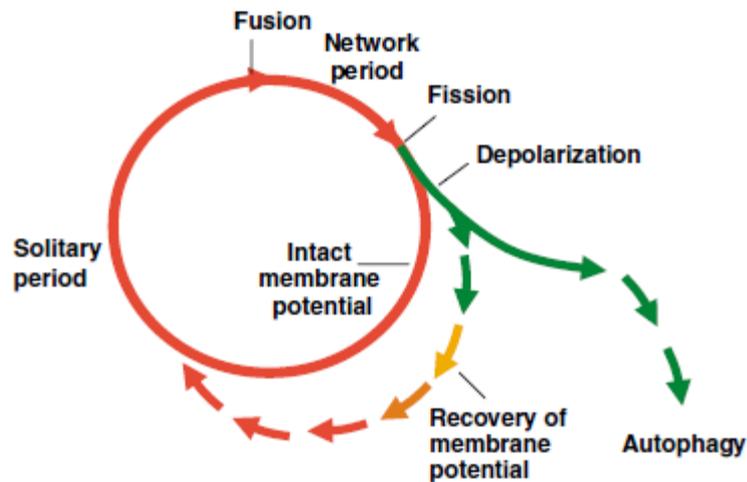


Abbildung 5: Mitochondrialer Lebenszyklus (Twig *et al.*, 2008 [101]): Durch die mitochondriale Fusion entstehen Netzwerke (Network Period). Durch die Teilung entstehen dann wieder einzelne Mitochondrien (Solitary Period). Kann das mitochondriale Membranpotential nicht aufrechterhalten werden, wird das Mitochondrium über die Autophagie entfernt.

Das fusionierte Netzwerk teilt Metabolite und Proteine und ist über elektrochemische Gradienten gekoppelt [73,102]. Die Fusion stellt geschädigte Mitochondrienfunktionen wieder her und hält somit die metabolische Effizienz aufrecht [73]. Segregierte dysfunktionale Mitochondrien verlieren ihr Membranpotential und weisen eine verminderte Expression des mitochondrialen Fusionsproteins Optic Atrophy Protein 1 (OPA1) auf und werden somit durch die Autophagie aus dem Netzwerk entfernt. Eine Akkumulation von depolarisierten Mitochondrien in der β -Zelle ist assoziiert mit oxidativen Schädigungen und der Entwicklung eines T2DM [101]. Die mitochondriale Dysfunktion führt zu einer veränderten Atmungsketten-Aktivität und damit zu einer gestörten GSIS [37]. Autophagie ist somit bedeutend für die Qualitätskontrolle und Protektion der Zelle und wird benötigt für die Aufrechterhaltung der Struktur, Masse und der Funktion der β -Zelle [101,103]. Die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase erfolgt durch Degradation und Recycling von Organellen [103]. Diese mitochondriale Dynamik ermöglicht die Reorganisation des mitochondrialen Netzwerks, die Vererbung der mtDNA und eine Durchmischung von mitochondrialen Komponenten [90]. Defekte Mitochondrien und geschädigte mtDNA können so durch die Fusion mit intakten Mitochondrien komplementiert werden [94,95]. Somit hat Autophagie eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Integrität der Mitochondrien und ist dadurch essentiell für das Überleben und die Funktion der β -Zelle [74,96]. Kommt es zu einer Störung der Autophagie akkumulieren dysfunktionale Mitochondrien in der Zelle [101]. Eine dysregulierte Autophagie spielt neben der Alterung

und diversen degenerativen Erkrankungen eine Rolle in der Pathogenese des T2DM [103,104].

Die mitochondriale Fusion und Teilung spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose [105]. Die mitochondriale Fragmentierung ist ein früher Schritt des intrinsischen Wegs der Apoptose. Die Regulation des programmierten Zelltods erfolgt allerdings nicht durch die mitochondriale Morphologie per se, sondern beruht auf der spezifischen Aktivität der Fusions- und Teilungsproteine [76]. Somit hat die mitochondriale Dynamik eine wichtige funktionelle Bedeutung und ist essentiell für die Entwicklung der Zellen [94]. Störungen in der mitochondrialen Dynamik verursachen zahlreiche Erkrankungen wie die Neuropathien Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 2A, der eine Mutation im mitochondrialen Fusionsprotein Mfn2 (Mitofusin 2) zu Grunde liegt [106] und die autosomal-dominante Opticusatrophie Typ1, dessen Ursache eine Mutation des mitochondrialen Fusionsprotein OPA1 ist [107]. Ebenso bedeutungsvoll und im Blickpunkt aktueller Forschung ist die Assoziation einer gestörten Expression der mitochondrialen Fusions- und Teilungsproteine mit der Entwicklung eines T2DM [37,76,80].

Die Fusions- und Teilungsprozesse der mitochondrialen Dynamik werden durch kernkodierte Proteine reguliert und sind in Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) am besten untersucht. In Mammalia konnten funktionelle Orthologe gefunden werden. Die genaue Koordination und Interaktion der Fusions- und Teilungsproteine ist bisher noch ungeklärt. Ebenso stellt sich die Frage, inwiefern die innere und die äußere Mitochondrienmembran in Abhängigkeit voneinander oder durch separate Fusions- und Teilungsprozesse reorganisiert werden.

1.5.1 Mitochondrialer Teilungsprozess

Die Teilung der mitochondrialen Außenmembran in Mammalia wird durch das mitochondrial-fission Protein 1 (Fis1) und das Dynamin-related Protein 1 (Drp1) gesteuert [95,97,107,108] (Abb. 6 und 7). Ob es eine spezifische Teilung der mitochondrialen Innenmembran gibt, ist noch nicht bewiesen. Bei einer Störung der Teilung kommt es zur Elongation der Mitochondrien und es bilden sich perinukleäre Cluster [97,108,109].

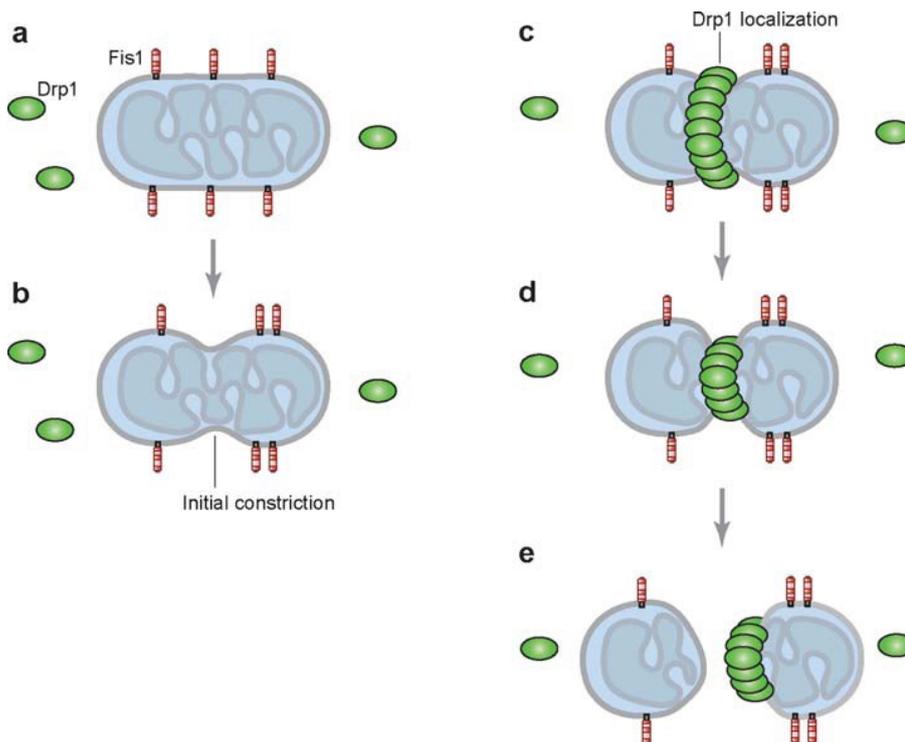


Abbildung 6: Mitochondriale Teilung (Chan, 2006 [95]): a) Fis1 ist in der Außenmembran verankert, während der Hauptteil von Drp1 sich im Cytosol befindet. b) Initiale Konstriktion erfolgt unabhängig von Drp1. c) Drp1-Anlagerung. d) Drp1 vermittelt weitere Konstriktion. e) Nach der Teilung befindet sich der Drp1-Komplex an einem Ende des Tochter-Mitochondrions.

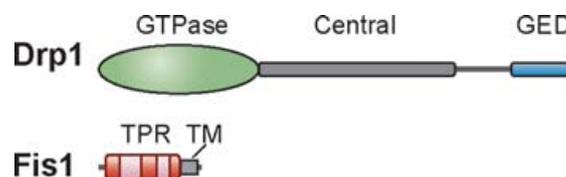


Abbildung 7: Molekularer Aufbau der Fusionsproteine (Chan, 2006 [95]): GTPase-Domäne, TM – Transmembrandomäne, Central – Zentrale Domäne, GED – GTPase Effektor Domäne, TPR – Tetratricopeptide Repeat

Drp1 wird in den verschiedenen Geweben des Menschen unterschiedlich stark exprimiert, wobei im gesamten Pankreas ein mittleres Expressionsniveau zu finden ist [97,108]. Drp1 befindet sich hauptsächlich frei im Cytosol und ein geringer Anteil ist bereits auf den Mitochondrien lokalisiert und markiert dort die Stellen einer späteren Teilung [73,97].

Das 70kDa große Drp1-Protein gehört zu der Dynamin-related Protein Superfamilie [74]. Drp1 besitzt eine dynamin-like central Domäne, eine N-terminale GTPase und eine C-terminale GTPase effector Domäne (GED) [97]. Diese multiplen Motive sind wichtig für die intramolekularen und intermolekularen Interaktionen von Drp1 [110]. Desweiteren enthalten die Domänen die Information für das Targeting an die Mitochondrien [111].

Der initiale Schritt der Teilung ist die Rekrutierung von Drp1 aus dem Cytosol zum Mitochondrium. Einige Studien vermuten eine Abhängigkeit dieses Prozesses von Fis1 [108,112,113]. Drp1 gelangt über das Zytoskelett durch Dynein und Mikrotubuli zur mitochondrialen Außenmembran [114] und lagert sich dort punktuell an. Drp1 interagiert eventuell mit dem in der mitochondrialen Außenmembran verankerten Protein Fis1 [107,108]. Der genaue Mechanismus der Interaktion zwischen Drp1 und Fis1 ist Gegenstand aktueller Forschung und ergab bisher unterschiedliche Theorien [108,115]. Ob es zu einer Interaktion der beiden Proteine kommt, bleibt jedoch weiterhin unklar.

Die initiale Einschnürung der Mitochondrien erfolgt unabhängig von Drp1. Drp1 schnürt dann die Mitochondrien weiter ein um die mitochondriale Teilung zu vermitteln [116]. Dafür polymerisieren sich die Drp1-Moleküle spiralförmig zu multimerischen Strukturen an den Stellen der späteren Kontraktion [97,108]. Dies erfolgt durch die GED-Domäne, die mit der GTPase und der zentralen Domäne von anderen Drp1-Molekülen interagiert [117]. Die GTP-Hydrolyse führt zur Konformationsänderung, die die mitochondriale Teilung vermittelt [97,118]. Dabei ist die intramolekulare Interaktion zwischen der GTPase und der GED Region von Drp1 für die Kopplung der GTP-Hydrolyse nötig [97,109,117].

Die einzelnen Schritte werden durch kovalente Modifikation von Drp1 beeinflusst. So erfolgt eine posttranslationale Modifizierung von Drp1 durch Phosphorylierung, S-Nitrosylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung [118].

Die Rekrutierung von Drp1 zum Mitochondrium wird abhängig von einer basalen oder gesteigerten Teilungsaktivität reguliert und wird eng kontrolliert [76]. So ist zum Beispiel die Rekrutierung während der Apoptose erhöht [105,119]. Die Modellierung der mitochondrialen Cristae durch Drp1 hat eine potentielle Schlüsselrolle in der Kontrolle des intrinsischen Wegs der Apoptose [121]. Die Aktivität von Drp1 wird wiederum durch zelluläre Prozesse moduliert [76]. Kommt es zu einem Verlust von Drp1 bleibt eine Teilung aus, wodurch das mitochondriale Netzwerk verlängert wird [97,115].

Für die Teilungshäufigkeit der Mitochondrien ist das mitochondrial-fission Protein 1 (Fis1) verantwortlich. Es ist ein in der mitochondrialen Außenmembran verankertes Rezeptorprotein, das den mitochondrialen Teilungskomplex initiiert [120]. Fis1 wird ohne große Unterschiede ubiquitär in den Geweben exprimiert [109]. Es wird angenommen, dass Fis1 der limitierende Faktor bei der mitochondrialen Teilung ist und die Teilungshäufigkeit durch die Anzahl der exprimierten Fis1-Moleküle bestimmt wird [86,108]. Das 17 kDa kleine Fis1 besteht aus 152 Aminosäuren [76] (Abb. 8).

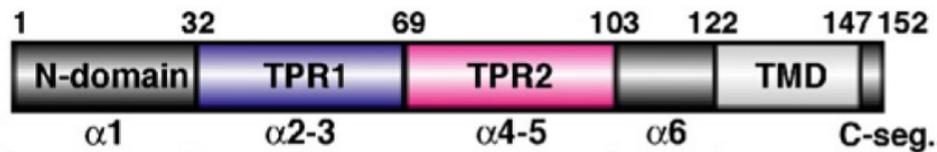


Abbildung 8: Funktionelle Domänen von Fis1 (Jofuku *et al.*, 2005 [121]): α -Helices 1-6, Tetratricopeptid Repeat TPR1 und TPR2 und die Transmembrandomäne TMD

Über eine C-terminale Transmembrandomäne ist das integrale Außenmembranprotein Fis1 verankert [95,107,108,112]. Der Großteil des Proteins ragt dabei ins Zytosol [73]. Die funktionelle zytosolische Domäne besteht aus vier unterschiedlichen Regionen mit sechs antiparallelen α Helices, die ein helikales Bündel formen. Der für die mitochondriale Teilung essentielle N-terminale Abschnitt des Proteins besteht aus 4 Regionen mit 5 α -Helices, die erste 32 Aminosäuren umfassende α -Helix (α 1, 1-32 AS) und die beiden Tetratricopeptide Repeats (TPRs), die von den 4 zentralen α Helices gebildet wird (TPR1: α 2-turn- α 3, 33-69 AS und TPR2: α 4-turn- α 5, 70-103 AS). Der C-terminale Abschnitt, der für die Lokalisation im Mitochondrium essentiell ist, besteht aus einer α -Helix (α 6, 104-122 AS), einer Transmembrandomäne (123-147 AS) und einem C-terminalen Rest (148-152 AS), der in den Intermembranraum ragt [76,107,108,109,121,122].

Die erste α Helix ist essentiell für die Teilungsaktivität und hat eine Schlüsselrolle bei der Fis1-Oligomerisation [76,118,121]. Fis1 kann durch Selbst-Interaktion ca. 200 kDa große homo-oligomere Komplexe formen. Dies ist für die teilungsstimulierende Aktivität von Fis1 von Bedeutung [121]. Durch die erste α -Helix werden diese Fis1-Oligomere über eine Destabilisierung negativ reguliert [109]. Die beiden Helix-Turn-Helix-Motive (TPR1 und TPR2) sind für diese Oligomerisation nicht nötig. Sie bilden eine konkave, hydrophobe Oberfläche und werden für Protein-Protein-Interaktionen benötigt [76,95,121,122]. Fis1 interagiert somit transient mit Drp1 oder Drp1-enthaltenden Komplexen über die TPRs [108,113]. Die Bindung von Teilungsfaktoren wie Drp1 an die TPRs wird negativ reguliert durch die erste α Helix [113]. Inwiefern Drp1 an Fis1 direkt oder indirekt mit Hilfe von Adapterproteinen bindet ist noch Gegenstand aktueller Forschung. Es wird angenommen, dass für die mitochondriale Teilung in Mammalia unterschiedliche Proteine nötig sind, die mit Fis1 interagieren. Die TPRs sind desweiteren bei dem mitochondrialen und peroxismalen Proteintransport beteiligt [123]. Tritt eine Diskontinuität in diesen Domänen auf so wird die mitochondriale Teilungsaktivität von Fis1 blockiert.

Fis1 hat 2 unabhängige Funktionen bei der mitochondrialen Teilung und der Apoptose. Die C-terminale Sequenz von Fis1 hat eventuell eine zusätzliche Funktion bei der Induzierung

von Apoptose, die unabhängig von der mitochondrialen Teilung ist [124]. Die Fis1-Aktivität reguliert zelluläre Prozesse wie die Seneszenz und die Autophagie [108,125]. Die Teilung wird benötigt um gestörte Mitochondrien durch Autophagie aus dem Netzwerk zu entfernen. Eine Down-Regulation von Fis1 reduziert die Autophagie von defekten Mitochondrien [126], somit führt es zu einer Elongation der Mitochondrien. Bei einer Überexpression von Fis1 kommt es zu einer verstärkten Fragmentierung der Mitochondrien bis hin zu Funktionsverlusten [107,108]. Fis1 ist ebenfalls wie Drp1 bei der Teilung der Peroxisomen involviert [112].

1.5.2 Mitochondrialer Fusionsprozess

Die Fusion in Mammalia erfolgt über GTPasen, die homologen Mitofusine Mfn1 und Mfn2, sowie das Optic Atrophy Protein 1 (OPA1) [81,82,95,127] (Abb. 9). Die Fusion der mitochondrialen Außen- und Innenmembran erfolgt separat in 2 Schritten [128]. Bei der Fusion bildet sich ein Komplex aus Mfn1, Mfn2 und OPA1 [73,94,129]. Die Fusion der beiden mitochondrialen Lipidmembranen ist vom Membranpotential und GTP abhängig [130]. Die genauen Mechanismen der Interaktion von Mitofusinen und OPA1 in Mammalia konnte bisher nicht gefunden werden. Bei einer Störung der Fusion kommt es zur Fragmentierung der Mitochondrien zu kurzen Stäbchen oder Kugeln [81,82,131]. Die mitochondriale Fusion ist notwendig für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität und für die Funktion der β -Zellen [95].

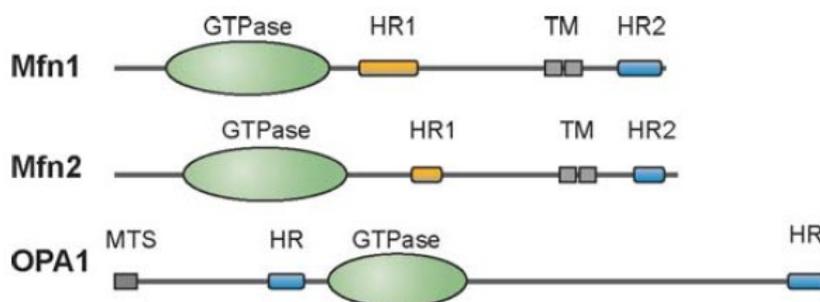


Abbildung 9: Molekularer Aufbau der Fusionsproteine (Chan, 2006 [95]): GTPase-Domäne, HR – Hydrophobe Heptad Repeat Region, TM – Transmembrandomäne.

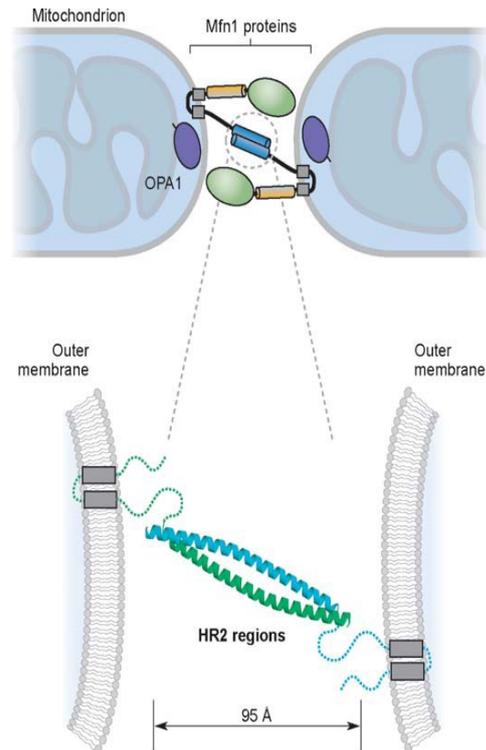


Abbildung 10: Mitochondriale Fusion (Chan, 2006 [95]): Homotypische Komplexbildung von zwei Mfn1-Proteinen über die HR2-Region bei der Anbindung von zwei Mitochondrien.

Die Mitofusine initiieren die Fusion der mitochondrialen Außenmembran [128]. Die homologen Mitofusin Proteine Mfn1 und Mfn2 sind zu 63% identisch [132], haben ähnliche räumliche Strukturen [81,132,133] und können sich durch ihre gleichen biochemischen Aktivitäten funktionell ersetzen [81,95]. Es sind integrale Außenmembranproteine mit einer N-terminalen GTPase, die fein im mitochondrialen Netzwerk verteilt sind [81,83]. Es ist ein atypisch verankertes Protein, da die Transmembran Domäne einen U-förmigen Membrananker formt, so dass die C- und N-terminalen Enden im Cytosol enden [134]. Die N-terminale GTPase Aktivität ist essentiell für die Fusion [81]. Während der Fusion formen Mfn1 und Mfn2 homo- oder heterooligomerische Proteinkomplexe an der mitochondrialen Außenmembran und initiieren den Fusionsprozess [81,129]. Es kommt zu einer Interaktion zwischen den dimeren, antiparallelen C-terminalen HR2 Domänen von Mfn-Molekülen zweier Mitochondrien [129] (Abb. 10). Mfn1 hat dabei eine höhere GTPase-Aktivität und höhere Effizienz bei der Fusion als Mfn2 [76].

Die physiologische pleiotrope Rolle der Mitofusine hat Relevanz für die Schlüsselfunktionen im oxidativen Metabolismus, Zellzyklus, Apoptose und dem axonalen mitochondrialen Transport [76]. Mfn2 stimuliert die Oxidation von Substraten, die Respiration und die Expression von Untereinheiten der Atmungskomplexe [80] und kontrolliert somit den mitochondrialen Metabolismus [82,83,92]. Posttranskriptional und postranslational werden

die Mitofusine durch Ubiquitinierung reguliert [135]. Des Weiteren werden die Mfn-Moleküle in den verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert und haben somit eine unterschiedliche Fusionsaktivität [81,132,134]. Mfn2 ist überall dort präsent, wo Mfn1 abwesend ist. Mfn2 wird spezifischer reguliert und durch andere Zellkomponenten und Prozesse moduliert, die keine Mfn1 Interaktion benötigen [76]. Bei einem Verlust beider Mitofusine kommt es allerdings durch eine ausbleibende Fusion zu einer Zerstörung des mitochondrialen Netzwerks, sowie zu einer Störung der mitochondrialen Funktion [82]. Es entstehen Defekte im mitochondrialen Membranpotential und der respiratorischen Leistung. Es resultiert ein geringeres Wachstum und eine erhöhte Apoptoserate [73,82]. Außerdem kommt es zu einer veränderten Cristae Struktur [81].

OPA1 ist essentiell für die Fusion der inneren Mitochondrienmembran und kontrolliert die Morphologie der Cristae Struktur [127,131,136,137]. OPA1 folgt einem gewebespezifischen Verteilungsmuster und wird unter anderem im gesamten Pankreas am höchsten exprimiert [138]. OPA1 befindet sich im mitochondrialen Intermembranraum und ist mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert [137,138]. OPA1 ist eine Dynamin-related GTPase [138], die durch posttranskriptionelles alternatives Splicen zwischen der TMD und der N-terminalen HR-Domäne in 8 Isoformen vorliegt [138,139,144]. Diese Isoformen haben unterschiedliche Lokalisationen im Mitochondrium [140] und besitzen distinkte Aktivitäten in der Fusionsaktivität und der Formgebung der mitochondrialen Cristae. Diese Isoformen werden durch Proteolyse reguliert [141]. Die 93 kDa OPA1-Isoform gelangt durch die N-terminale mitochondriale Import Sequenz (MIS) zum Mitochondrium und verankert sich durch die Transmembrandomäne (TMD) in der mitochondrialen Außenmembran [76]. Nach der TMD folgt N-terminal eine Hydrophobe Heptad Repeat Region (HR), die eine Protein-Protein-Interaktion erlaubt. Ebenso trägt die C-terminal gelegene zweite HR zur Oligomerisation und Aktivierung von Dynamin bei [142]. Beide HR-Domänen könnten für die Formation von homo-typischen Komplexen zwischen distinkten OPA1-Molekülen verantwortlich sein [143]. Die posttranskriptionelle Regulation von OPA1 ist entscheidend bei der Regulierung der Fusionsaktivität, der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials und somit auch bei der Kontrolle der Autophagie. Desweiteren ist es wichtig für das Cristae Remodelling und die Protektion vor der Cytochrom c Abgabe bei der Apoptose [144]. Darüber hinaus führt eine Inaktivierung der Dynamin-like GTPase von OPA1 zu einem Verlust der Fusion und somit zur Fragmentierung der Mitochondrien [81,82,136].

1.6 Zielstellung der Arbeit

Für die Aufrechterhaltung der Blutglukose-Homöostase ist eine regulierte Insulinfreisetzung aus den β -Zellen des Pankreas essentiell. Hierfür ist die Funktion der Mitochondrien in den β -Zellen von besonderer Bedeutung. Mitochondrien bilden ein dynamisches tubuläres Netzwerk, für dessen Aufrechterhaltung koordinierte Fusions- und Teilungsprozesse der Mitochondrien nötig sind. Eine Beeinträchtigung der β -Zell-Funktion kann durch eine erhöhte Konzentration von freien Fettsäuren hervorgerufen werden. In welchem Zusammenhang eine Dysfunktion der mitochondrialen Dynamik mit einem Verlust der GSIS und der Pathogenese des T2DM stehen ist bislang noch wenig verstanden. Daher war das Ziel dieser Studie:

- 1 Die Expression der Fusions- und Teilungsproteine Fis1, Drp1, OPA1, Mfn1 und Mfn2 in Glukose-responsiven im Vergleich zu Glukose-unresponsiven INS1 β -Zellen zu untersuchen.
- 2 Eine fluoreszenzmikroskopische Analyse des mitochondrialen Netzwerkes in Glukose-responsiven im Vergleich zu Glukose-unresponsiven INS1 β -Zellen durchzuführen
- 3 Den Einfluss von Palmitinsäure auf die Expression der Fusions- und Teilungsproteine sowie auf das mitochondriale Netzwerk in Glukose-responsiven im Vergleich zu Glukose-unresponsiven INS1 β -Zellen zu ermitteln.
- 4 Die ATP/ADP-Ratio und die GSIS in den Glukose-responsiven im Vergleich zu den Glukose-unresponsiven INS1 β -Zellen zu bestimmen.

2 Material

2.1 Zelllinie

Bezeichnung	Spezies	Gewebeherkunft	Hersteller
INS1	Ratte	Insulinom	Lund Universität, Schweden

2.2 Zellkultur-Medium

Medium	Komponenten	Menge/Konzentration
INS1 Kompletmedium	RPMI 1640 mit L-Glutamin	
[145,146]	Hitze-inaktiviertes FCS	10 % (v/v)
	Natriumpyruvat	1 mM
	2-Mercaptoethanol	50 μ M
	HEPES	10 mM
	Penicillin/Streptomycin	1 %

2.3 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %) Ratiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
2/ β -Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Bromphenolblau (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
BSA	PAA, Cölbe, Deutschland
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ x 2H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Dimethylsulfoxid, DMSO (C ₂ H ₆ OS)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Dithiothreitol, DTT (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Ethanol, >99 % (C ₂ H ₆ O)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe, Deutschland
Glukose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Calbiochem (Merck), Darmstadt, Deutschland
Glycerin (C ₃ H ₈ O ₃)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES, 1 M (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	PAA, Cölbe, Deutschland
Isopropanol (2-Propanol, C ₃ H ₈ O)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Methanol (CH ₄ O)	J.T. Baker, Deventer, Netherlands
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Meck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Natrium Desoxycholsäure (C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Natriumdodecylsulfat, SDS, 10 % (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat (C ₃ H ₃ NaO ₃)	PAA, Cölbe, Deutschland
NP-40	Calbiochem (Merck), Darmstadt, Deutschland
Odyssey Blocking Puffer	LI-COR, Bad Homburg, Deutschland
Palmitinsäure	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe, Deutschland

Recombinantes human Insulin	GIBCO® (Invitrogen), Darmstadt, Deutschland
RIPA-Puffer, 10x	Cell Signalling, Danvers, Massachusetts, USA
Roti Block, 10x	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Quant (Bradford-Reagenz)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 mit L-Glutamin	PAA, Cölbe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	J.T. Baker, Deventer, Netherlands
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	J.T. Baker, Deventer, Netherlands
1-Step™ Ultra TMB-ELISA	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
TBE, 10x	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethylendiamin, TEMED, 99 % (C ₆ H ₁₆ N ₂)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TMB Chromogen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100 (C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Trypanblau (C ₃₄ H ₂₈ N ₆ O ₁₄ S ₄)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Trypsin-EDTA, 1x	PAA, Cölbe, Deutschland
Tween® 20 (C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
VectaShield Eindeckungsmittel	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Wasser, Nuklease-freies	Fermantas (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA

2.4 Antikörper

Antikörper Insulin-ELISA	Spezies	Herkunft
Insulin Mouse monoclonal AB (3A6)	mouse	Abcam, Cambridge, UK
Mouse monoclonal (8E2) to Insulin (HRP)	mouse	Abcam, Cambridge, UK
primäre Antikörper	Spezies	Hersteller
β-Tubulin (H-235)	rabbit	Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA

Fis1	rabbit	Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA
Drp1	rabbit	Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA
OPA1	rabbit	Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA
Mfn1	goat	Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA
Mfn2	rabbit	Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA
Fluoreszenz-gekoppelte sekundäre Antikörper		
	Spezies	Hersteller
Cy5	anti-rabbit	Molecular Probes [®] Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
IRDye 680	anti-rabbit	LI-COR, Bad Homburg, Deutschland
IRDye 800	anti-rabbit	LI-COR, Bad Homburg, Deutschland
MitoTracker Green FM		Molecular Probes [®] Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
weitere Farbstoffe		Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)		Molecular Probes [®] Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

2.5 Enzyme

Enzym	Hersteller
Maxima [®] Reverse Transcriptase	Fermentas (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA
Phosphoenolpyruvat (PEP)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Pyruvatkinase (PK)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Rnase	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland

2.6 Kits

Bezeichnung	Hersteller
ATPlite™	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA
RNeasy Mini Kit®	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Venlo, Niederlande
Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Fermentas (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA
TaqMan, Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, California, USA

2.7 Molekulargewichtsmarker

Marker	Hersteller
Precision Plus Protein All Blue Standards	Bio-Rad, München, Deutschland

2.8 TaqMan® Sonden

Bezeichnung/Gen	Spezies	Hersteller
GAPDH	Ratte	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Hprt1	Ratte	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Fis1	Ratte	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Dnm1	Ratte	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
OPA1	Ratte	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Mfn1	Ratte	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Mfn2	Ratte	Applied Biosystems, Foster City, California, USA

2.9 Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Komponenten	Menge/Konzentration
Proteinanalysen		
RIPA-Lysepuffer	Tris HCl pH 8	50 mM
(Radioimmunoprecipitation	NaCl	150 mM

assay buffer)	NP-40	1 % (v/v)
	Natrium Desoxycholsäure	0,5 % (w/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
SDS-PAGE Trenngel 12,5 %	AA/Bis AA	30 %/0,8 %
	Tris/HCl pH 8,8/8,9	1 M
	SDS	10 %
	APS	10 %
	TEMED	9,9 mM
SDS-PAGE Sammelgel 5 %	AA/Bis AA	30 %/0,8 %
	Tris/HCl pH 6,8	1 M
	SDS	10 %
	APS	10 %
	TEMED	4,6 mM
10x SDS Laufpuffer	Tris Base	0,25 M
	SDS	1 % (w/v)
	Glycin	1,92 M
5x SDS Probenpuffer	Tris/HCl pH 6,8	312,5 mM
	SDS	10 % (w/v)
	DTT	325 mM
	Bromphenolblau	0,04 g
	Glycerin	50 %
Anodenpuffer I	Tris	0,3 M
	Natriumazid	0,01 % (w/v)
	Methanol	20 % (v/v)
Anodenpuffer II	Tris	0,25 M
	Natiumazid	0,01 % (w/v)
	Methanol	20 % (v/v)
Kathodenpuffer	SDS	0,01 % (w/v)

	Natriumazid	0,01 % (w/v)
	Methanol	20 % (v/v)
Waschpuffer	PBS pH 7,2	
	Tween 20	0,1 % (v/v)
Funktionsanalysen		
Krebs Ringer Gebrauchslösung (mit BSA), pH 7,4	NaCl	123,4 mM
	KCl	4,7 mM
	KH ₂ PO ₄	1,9 mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mM
	HEPES	10,1 mM
	NaHCO ₃	20 mM
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	2,56 mM
	BSA	0,5 % (w/v)
Stimmulationslösungen	Krebs-Ringer Gebrauchslsg.	
	Glukose	2,8 mM bzw. 20 mM
Puffer A, pH 7,75	HEPES	20 mM
	Magnesiumchlorid	3 mM
Carbonat-Bicarbonat-Puffer, pH 9,6	Na ₂ CO ₃	15 mM
	NaHCO ₃	35 mM
ELISA-Waschpuffer	1x PBS	
	Tween 20	0,05 % (v/v)
weitere Puffer		
PBS (10x), pH 7,2	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄ + KH ₂ PO ₄	12 mM

2.10 Verbrauchsmittel

Verbrauchsmittel	Hersteller
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Einwegpipetten, steril	Greiner Bio-One, Essen, Deutschland
ELISA-MicroPlatte	Greiner Bio-One, Essen, Deutschland
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Microplatte, Schwarz für Fluoreszenz (ATP/ADP Test)	Greiner Bio-One, Essen, Deutschland
Objektträger	Superior Marienfeld Laboratory Glassware
Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
PCR- Gefäße und PCR-Platten	NerbePlus, Winsen/Luhe, Deutschland
PVDF Transfer Membran	Millipore, Schwalbach am Taunus
Ratiolabo® Blottingpapier	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Reagiergefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zählkammer „Neubauer Improved“	Karl Hecht GmbH, Sondheim, Deutschland
Zellkulturflächen, 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
6-well Zellkulturplatte	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.11 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank (Bakterienkultur)	Memmert, Schwabach, Deutschland
Brutschrank Heraeus 6000	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Elektrophorese Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop IX 81	Olympus, Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop Olympus CW2	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Luminometer Victor3 1420	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland

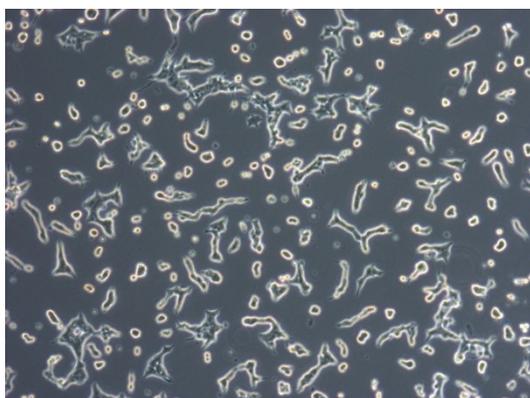
Magnetrührer	Omnilab, Bremen, Deutschland
Odysee Infrared Imager	LI-COR, Bad Homburg, Deutschland
PCR-Cycler	SensoQuest, Göttingen, Deutschland
pH-Meter Ultra Basic	Denver Instrument, NY USA
Pipetten (1-1000 µl)	Gilson International, Limburg, Deutschland
Real-Time PCR System 7900HT	Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA
Thermoblock	Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Schüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
SDS-PAGE Apparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Spannungsgerät Gene Pulser	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Spectrophotometer NanoDrop2000	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Spektralphotometer Ultrospec 2100	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Trans-Blot® Semi-Dry, Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Ultraschallbad Sonoplus	Bandelin electronic GmbH, Berlin, Deutschland
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Waage Sartorius	Omnilab, Bremen, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Wasserbad Julabo 13	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Mikro 20	Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

3 Methoden

3.1 INS1-Zelllinie

Für alle Versuche wurde die adhärenente Glukose-sensitive, Insulin-sezernierende INS1-Zelllinie verwendet. Diese Zelllinie wurde aus einem Röntgen-induziertem Ratten-Insulinom gewonnen. Die Leistung der β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas kann somit durch ein β -Zelloberflächen-Antigen nachgeahmt werden [146]. Das humane Proinsulin wurde dann über eine stabile Transfektion mit einem Plasmid in die Zelllinie gebracht. Nach einer antibiotischen Selektion und klonaler Expansion entstanden Glukose-responsive (GR) und Glukose-unresponsive (GUR) INS1-Zellen. Auf eine Glukosestimulation reagieren die GR INS1-Zellen mit einer gesteigerten Insulinsekretion. Dies erfolgt bei den GUR INS1-Zellen nicht [145]. Desweiteren unterscheiden sich die Subklone in ihrem Metabolismus. Die GUR INS1-Zellen zeigen eine vermehrte Expression von glykolytischen Enzymen und weisen somit eine höhere Glykolyserate auf und damit eine vermehrte Laktatproduktion. Auf eine Glukosestimulation erfolgt keine erhöhte ATP-Produktion und die Atmungskettenkomplexaktivität wird nicht gesteigert. Die GR INS1-Zellen dagegen weisen einen Mangel an Laktat-Dehydrogenase auf und exprimieren vermehrt mitochondriale Enzyme. Somit besteht eine enge metabolische Regulation mit dem mitochondrialen Metabolismus und es erfolgt eine robuste Insulinsekretion auf eine Glukosestimulation [147]. Es besteht kein Unterschied im Insulingehalt beider Zelllinien [145]. Der Insulingehalt von INS1-Zellen entspricht nahezu dem Gehalt der normalen Inseln [146]. Die Insulinsekretion der INS1-Zellen befindet sich im physiologischen Bereich und mimt somit stabil die Funktion der β -Zelle.

GR INS1-Zellen (GR)



GUR INS1-Zellen

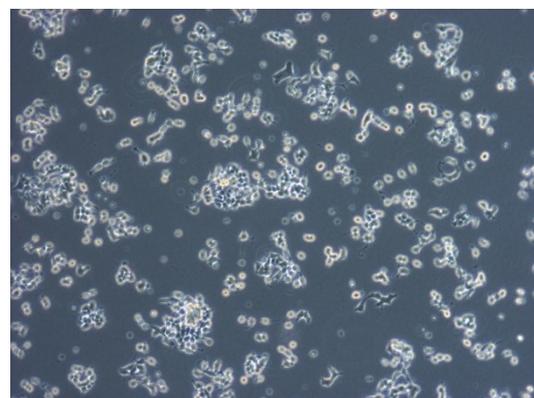


Abbildung 11: Mikroskopische Aufnahmen von GR und GUR INS1-Zellen

3.1.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung der adhärennten INS1-Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C mit 60 % feuchtigkeitsgesättigter CO₂-Atmosphäre im Begasungsbrutschrank. Aliquots der Zelllinie INS1 wurden mit Hilfe der Kryokonservierung in Einfriermedium (FCS mit 10 % (v/v) DMSO) bei -150 °C eingefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut. Sämtliche Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Kultivierung der INS1-Zellen erfolgte in RPMI 1640 Standardmedium mit L-Glutamin unter Zusatz von 10% inaktiviertem (56°C, 30 Minuten) fötalem Kälberserum (FCS), 1mM Natriumpyruvat, 50µM 2-Mercaptoethanol, 10 mM HEPES und 1% Penicillin/Streptomycin.

Die weitere Kultivierung der INS1-Zellen erfolgte durch regelmäßiges Passagieren mit frischem Medium in Zeitabständen von 3-4 Tagen. Die subkonfluenten Kulturen (ca. 80% Zelldichte) wurden mit PBS gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Das Ablösen der adhärennten INS1-Zellen von der Zellkulturflasche erfolgte mit Trypsin-EDTA. Die Zellen wurden für 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde in 37°C vorgewärmtem INS1-Medium resuspendiert und zur Weiterkultivierung in neue Kulturflaschen gesplittet oder nach der Zellzahlbestimmung für Versuche in 6-well Platten und Zellkultur-Schalen ausgesäht. Zur jeweiligen Untersuchungen der INS1-Zelllinien erfolgte eine Inkubation der Zellen mit und ohne unterschiedliche Konzentrationen von Palmitinsäure für 48 Stunden.

3.1.2 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest mit Trypanblau

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mit der „Neubauer improved“ Zählkammer. Diese besteht aus neun großen Quadraten, von denen nur die 4 Eckquadrate mit je 16 kleinen Quadraten ausgezählt wurden. Jedes Eckquadrat hat eine Kantenlänge von 1 mm und eine Fläche von 1 mm².

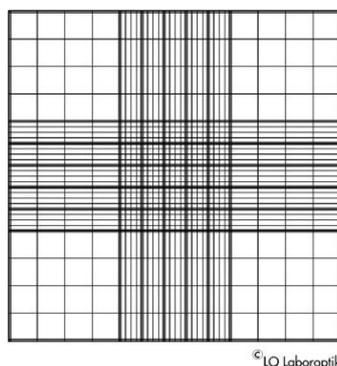


Abbildung 12: Neubauer improved Zählkammer [<http://www.lo-laboroptik.de>]

Für die Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension in einer 1:2 Verdünnung mit Trypanblau versetzt und die Lebendzellzahl unter dem Mikroskop bestimmt. Die Zellzählung in einem Eckquadrat wurde mäanderförmig durchgeführt. Die Zellzahl je μl ergibt sich aus folgender Berechnung:

$$\text{Zellzahl}/\mu\text{l} = \text{Mittelwert der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Schichtdickenfaktor}$$

3.2 mRNA-Expressionsanalysen

3.2.1 RNA-Extraktion

Mit Hilfe des QIAGEN RNeasy Mini Kit[®] wurde die RNA aus den Zellproben extrahiert. Hierfür wurden die Zellpellets mit 500 μl RLT-Puffer resuspendiert und somit eine Disruption der Zellwand und Plasmamembran herbeigeführt. Um die Viskosität des Zelllysats zu verringern erfolgte eine Homogenisierung für 2 min bei 12.000 rpm in einer QIAshredder Spin Säule. Zur Verbesserung der selektiven Bindung von RNA an der RNeasy Membran wurden 500 μl 70% RNase-freies Ethanol hinzugefügt. Danach wurde die Probe auf die RNeasy Spin Säule transferiert und 15 s bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die nun an die RNeasy Membran gebundene RNA wurde mit 500 μl RW1-Puffer gewaschen und 15 s bei 12.000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein DNA-Verdau mit Hilfe des RNase-Free DNase Set (QIAGEN). Hierfür wurden 10 μl DNase und 70 μl RDD-Puffer auf die RNeasy Membran gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgten 3 Waschschrte mit jeweils 500 μl RW1-Puffer und 2 mal RPE-Puffer. Abschließend wurde die RNA mit 20-50 μl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation (1 min, 12.000 rpm) eluiert und in neuen Reaktionsgefäßen bei -20°C gelagert.

3.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Messung der Konzentration der RNA erfolgte mit Hilfe des NanoDrop 2000 Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Als Referenz diente Nuklease-freies Wasser.

3.2.3 cDNA-Synthese

Mit dem Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit wurde der erste Schritt der RT-qPCR, die Reverse Transkription, durchgeführt. Hierbei wurde aus der zuvor isolierten RNA mittels einer Reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, cDNA hergestellt. Dazu wurden 2 μl Reaktions Mix (reaction buffer, dNTPs, oligo (dT) 18 und random hexamer

primer) mit 1 µl Maxima Enzyme Mix (Maxima Reverse Transkriptase, RiboLock RNase Inhibitor) zu 1000 ng RNA hinzugefügt und mit Nuclease freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15 µl gebracht. Im PCR-Cycler erfolgte die cDNA-Synthese nach folgendem Programm:

Schritt	Dauer	Temperatur
1.	10 min	25 °C
2.	15 min	50 °C
3.	5 min	85 °C

Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der cDNA bei -20°C.

3.2.4 Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR)

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression wurde die Real-Time qPCR mittels TaqMan[®]-PCR-Technologie genutzt.

Grundlage der RT-qPCR ist die Kombination der reversen Transkriptase und der Polymerase-Kettenreaktion. Die TaqMan[®]-PCR-Technologie nutzt spezifische *TaqMan*[®]-Sonden. An diesen Oligonukleotid-Sonden ist ein fluoreszierender Reporter-Farbstoff am 5'-Ende und ein nicht fluoreszierender Quencher am 3'-Ende, sowie ein minor groove binder (MGB) am 3'-Ende angebracht. Diese Sonde hybridisiert während der Anbindung (Annealing) zwischen den Primerbindungsstellen an die jeweilige Zielsequenz. Durch die räumliche Nähe des Reporters zum Quencher wird aufgrund des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) die Abstrahlung der Fluoreszenz des Reporters unterdrückt. Während der Extension wird diese Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase gespalten. Durch diese Sondenhydrolyse trennen sich Quencher und Fluorophor voneinander und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden. Die Messung findet am Ende der Elongation, in der exponentiellen Phase der PCR, in jedem Zyklus statt. Diese sequenzspezifische Fluoreszenzintensität ist proportional zur Quantität des produzierten Amplikons.

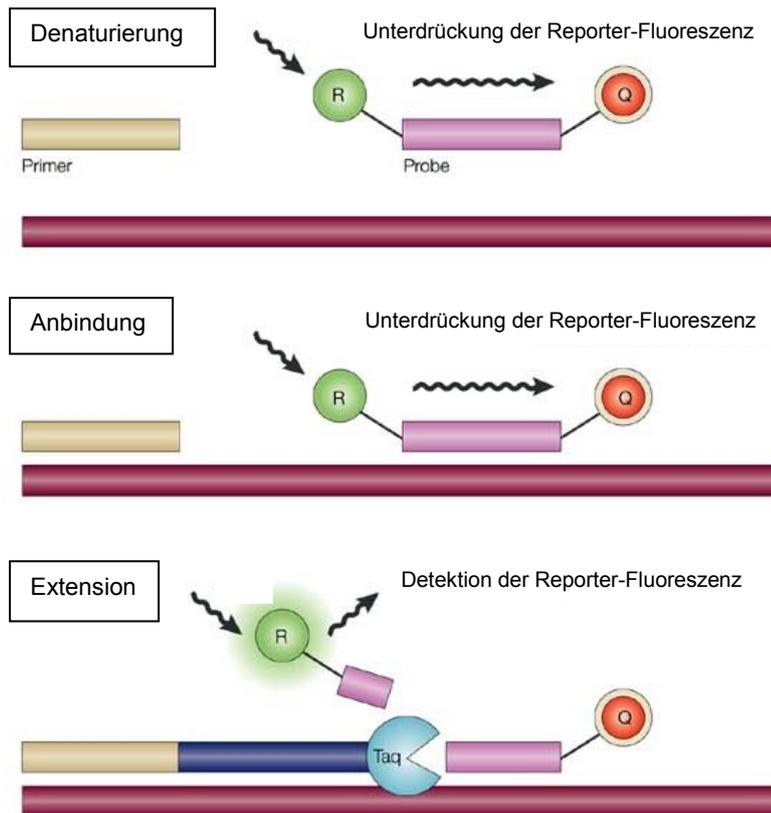


Abbildung 13: Prinzip der RT-qPCR: R - Reporter, Q - Quencher, Taq – Taq-DNA-Polymerase [modifiziert nach <http://www.nature.com/nrd/journal/v3/n9/images/nrd1496-f1.jpg>]

Für die Untersuchung der Expression der mitochondrialen Teilungs- und Fusionsproteine wurden sequenzspezifische Sonden für die Gene Fis1, Drp1, OPA1, Mfn1 und Mfn2 genutzt (Applied Biosystems). Als Referenzgen (housekeeping genes) dienten Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (Hprt1). Als Reporter-Fluoreszenzfarbstoffe wurden FAMTM und VIC[®] verwendet. Folgender Reaktionsansatz wurde für die RT-qPCR verwendet:

cDNA	1 µl
2x <i>TaqMan</i> [®] -Universal PCR Master Mix	5 µl
<i>TaqMan</i> [®] -Sonde	1 µl
Aqua dest.	6 µl

Die RT-qPCR wurde mit dem Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR System mit folgendem Programm durchgeführt:

PCR-Schritt	Dauer	Temperatur
Hold §	2 min	50 °C
Hold	10 min	95 °C
	15 s	95 °C
45 Zyklen	1 min	60 °C

Der PCR-Lauf wurde mit Hilfe des SDS 2.3 Programms erstellt und die Messwerte im RQ Manager 1.2 abgelesen. Die quantitative Auswertung erfolgte nach der Delta-Delta-Ct-Methode. Der Ct-Wert (Cycle of Treshold) beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Für die relative Quantifizierung wurden als interne Kontrolle die homogen exprimierten Referenzgene GAPDH und Hprt1 verwendet. Durch diese Normierung wurden Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten mRNA ausgeglichen. Dazu wurde der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert (Delta-Ct). Danach wurde Delta-Delta-Ct bestimmt durch die Ermittlung der Expressionsänderung einer Zielsequenz der Probe relativ zur gleichen Zielsequenz in einer Kontrolle. Der relative mRNA-Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, wurde durch die Ratio ermittelt.

ΔC_t	$= C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen}$
$\Delta\Delta C_t$	$= \Delta C_t \text{ Probe} - \Delta C_t \text{ Kontrolle}$
Ratio	$= 2^{-\Delta\Delta C_t}$

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Protein-Präparation

Zur proteinchemischen Untersuchung wurden die INS1-Zellen nach Absaugen des RPMI-Mediums aus den Kulturschalen mit PBS gewaschen. Nach Zusetzung von 1 ml PBS wurden mit Hilfe eines Zellschabers die adhärenen Zellen geerntet und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zur Pelletierung erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm. Die Pellets wurden mit RIPA-Lysepuffer resuspendiert und dann für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile durch 10 minütige Zentrifugation bei 10.000 rpm abgetrennt. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur quantitativen Bestimmung der Proteine wurde die kolorimetrische Methode nach Bradford (Bradford, 1976 [148]) durchgeführt. Der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) bildet hierbei in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe. Dadurch wird CBBG in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert und das Absorptionsmaximum verschiebt sich von 465 nm (kationische Form) zu 595 nm. Zur Kalibrierung wurde eine Eichkurve mit 1-14 µl BSA erstellt. Der Proteinprobe von 1 µl wurden 799 µl Aqua dest. und 200 µl Bradford-Reagenz (Roti®-Quant) beigefügt. Entsprechend wurden der Leerprobe der jeweilige Lysispuffer und der Standardprobe BSA hinzugefügt. Nach Hinzugabe des Bradford-Reagenz wurden die Reaktionsgefäße geschwenkt und nach 5 min Inkubation in Einmalküvetten überführt. Die Messung der Absorption bei 595 nm erfolgte im Spektralphotometer. Anhand folgender Formel konnte der Proteingehalt in µg/µl berechnet werden:

$$x = (\text{BSA OD}_{595}) + 0,0652/0,0898$$

$$x = 4\mu\text{g} / x\mu\text{g} = \text{Faktor}$$

$$x = (\text{Probe OD}_{595}) + 0,0652 \times \text{Faktor} / 0,0898$$

$$x / x\mu\text{l} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

3.3.3 SDS-Page

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche, vertikale SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen verwendet. Die Denaturierung kommt durch die Behandlung der Proteine mit dem anionischen Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) zustande. Durch die Behandlung mit SDS werden die Proteine denaturiert. Die Ausbildung von lang gestreckten Protein-SDS-Komplexen führt dazu, dass bei allen Proteinen das gleiche Ladung/Masse-Verhältnis vorliegt, wodurch die Proteine danach gleichmäßig negativ geladen sind. Die anschließende Trennung erfolgt anhand der relativen Größe der Polypeptidketten im Polyacrylamidgel.

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese werden zwei verschiedene Gele verwendet, Sammelgel und Trenngel, die sich durch unterschiedliche Porengröße und pH-Werte unterscheiden. Zunächst wurden die Bio Rad Mini Gele anhand ihrer jeweiligen Konzentration vorbereitet und zwischen 2 Glasplatten mit entsprechenden Spacern gegossen. Hierbei erfolgte die Polymerisation durch Ammoniumperoxidisulfat (APS) und Tetramethyldiamin (TEMED). Der Vernetzungsgrad ist von der Acrylamidkonzentration abhängig. Ein entsprechender Kamm wurde zur Ausbildung von Slots eingesetzt. Nach Auspolymerisation wurden die Gele in die Elektrophoresekammer überführt und die Apparatur mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Proben wurden entsprechend ihrer Menge von 40 µg zu 5 µl SDS-Loadingpuffer hinzugegeben und auf ein Volumen von 15 µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Nach Anzentrifugierung wurden die Proben 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend aufs Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurden 5 µl eines Molekulargewichtsmarker (Bio Rad, Precision Plus Protein All Blue Standard) aufgetragen.

3.3.4 Proteintransfer

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden durch ein diskontinuierliches Semi-Dry Blotting Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung senkrecht zur Laufrichtung des Gels wandern die Proteinbanden aus dem Gel heraus und gelangen auf die Membran, wo sie gebunden werden.

Der Aufbau erfolgte gemäß der Abbildung 14 und der Transfer erfolgte bei 140 mA für 1 Stunde.

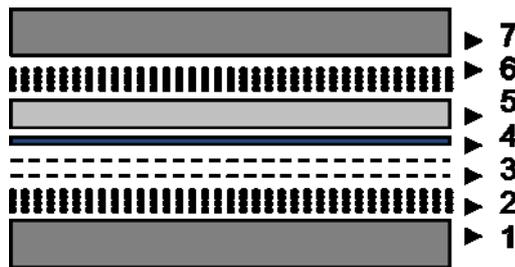


Abbildung 14: Schema der Western Blot Apparatur: Auf die Anode (1) wurden 4 in Anodenpuffer 1 getränkte Blottingpapiere (2) und 2 in Anodenpuffer 2 getränkte Blottingpapiere (3) gelegt. Die PVDF-Membran (4), die zuvor in Isopropanol und Anodenlösung 2 äquilibriert wurde, folgte der Anordnung. Das Polyacrylamidgel (5) und anschließend 4 Blottingpapiere (6) getränkt in Kathodenpuffer wurden vor der Kathode (7) aufgelegt.

3.3.5 Western Blot-Hybridisierung

Die Identifikation der Proteinbanden erfolgte durch Wechselwirkung des Proteins mit spezifischen Antikörpern. Dazu wurde die PVDF-Membran nach dem Proteintransfer für mindestens 30 min auf dem Schüttler mit einer Blockierungslösung inkubiert (Odyssey Blocking Puffer (1:4 verdünnt mit PBS) um so unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Zur Detektion der entsprechenden Proteine mittels Immunfärbung wurde der jeweilige primäre Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die PVDF-Membran dreimal für 10 min mit PBS mit 0,1% (v/v) Tween 20 gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach wiederholtem Waschen mit PBS 0,1% (v/v) Tween 20 erfolgte die Detektion der Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper mit Hilfe des Odyssey Infrared Imager LI-COR.

3.4 Immunfluoreszenzfärbung

Mit Hilfe der Immunhistochemie können Proteine durch fluoreszierende Antikörpern sichtbar gemacht werden. Dies erfolgt durch Bindung von Antikörpern, direkt oder indirekt, an das Antigen. Nach Anregung der an die sekundären Antikörper gebundenen Fluorochrome erfolgt eine Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge, wodurch die Proteine somit qualitativ und quantitativ detektierbar sind.

3.4.1 Indirekte Immunhistochemie

Die INS1-Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro well auf Deckgläschen in einer 6-well Platte ausgesät und mit RPMI-Medium kultiviert. Nach Absaugen des Mediums und Waschen der wells mit PBS wurden die Zellen 15 Minuten mit 4%igem Formalin fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte für 5 min mit 0,2 % Triton X-100. Nach erneutem Waschen mit PBS folgte eine Inkubation mit einem primären Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Der primäre Antikörper bindet an das Epitop der jeweiligen Proteine (Abb. 15). Die nicht gebundenen Anteile wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Im Anschluss wurde der sekundäre, artenspezifische Antikörper, der mit dem Fluorochrom Cy5 (Indodicarbocyanin) gekoppelt ist, für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

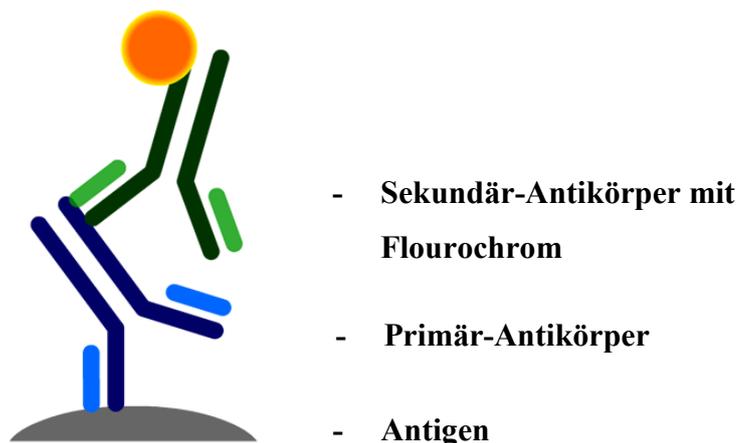


Abbildung 15: Indirekte Immunhistochemie [modifiziert nach: http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/img_fluoreszenz/antibody_2nd_antigen.png]

Eine Gegenfärbung der Zellkerne durch Bindung an DNA erfolgte mit DAPI (4',6 Diamidino-2-phenylindol) für 10 min bei Raumtemperatur. Abschließend wurde 5 mal mit PBS gewaschen. Die in den wells befindlichen Deckgläschen wurden vorsichtig auf einen

Objektträger gebracht und mit dem Eindeckungsmittel VectaShield eingedeckt. Nach Anregung der fluorochromkonjugierten Zweitantikörper mit kurzwelligem Licht erfolgt die Messung der langwelligen Lichtemission bei folgenden Wellenlängen:

Cy5	670 nm
DAPI	461 nm

Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81 mit dem Programm ScanR.

3.4.2 Direkte Immunhistochemische Detektion der Mitochondrien

Für die Detektion der Mitochondrien in INS1-Zellen wurde der Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Green FM verwendet. Der Carbocyanin gekoppelte MitoTracker Green FM diffundiert passiv durch die Plasmamembran und akkumuliert durch seine Chloromethyl-Gruppe in Mitochondrien.

Nach Kultivierung der INS1-Zellen wurde das Zellkultur-Medium abgesaugt und mit warmen PBS gewaschen. Der fluorochrome MitoTracker Green FM wurde in einer Konzentration von 50nM für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die INS1-Zellen erneut mit warmen PBS gewaschen. Nach Anregung bei 490nm erfolgte die Messung von MitoTracker Green FM bei einer Wellenlänge von 516nm. Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte am konfokalen Laserscan-Mikroskop mit dem Programm AutoQuant X2.

3.5 Funktionsanalysen: glukoseinduzierte Insulinsekretion

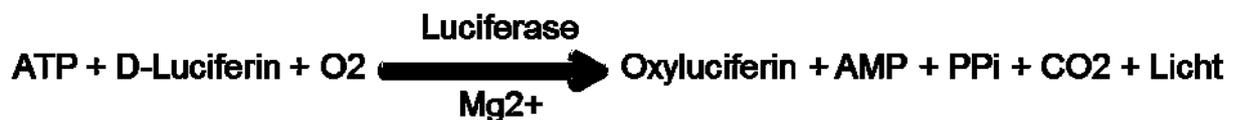
3.5.1 Stimulation

Zur Stimulation der Insulinsekretion mittels Glukose wurden 5×10^5 INS1-Zellen pro well in einer 6-well Platte ausgesät und in RPMI-Medium kultiviert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen zweimal für 30 min bei 37°C mit einer Stimulationslösung (Krebs-Ringer-Lösung, 0,5% BSA, 2,8 mM Glukose) inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation der Zellen mit Krebs Ringer-Lösung und 0,5% BSA, ohne Glukose für 1 h bei 37°C . Die Lösung wurde wieder abgezogen und anschließend wurde den Zellen jeweils Stimulationslösungen (Krebs Ringer-Lösung, 0,5% BSA, Glukose) mit 2,8 mmol/l oder 20 mmol/l Glukose zugesetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss konnten die Zellen für einen ATP/ADP-Test oder Insulin-ELISA verwendet werden.

3.5.2 ATP/ADP-Test

Zur Ermittlung der ATP/ADP Ratio in INS1-Zellen nach Stimulation mit 2,8 mmol/l bzw. 20 mmol/l Glukose wurde der Lumineszenz-Test von PerkinElmer ATPlite™ verwendet.

Das ATPlite Assay basiert auf der Produktion von Licht durch die Reaktion von ATP und D-Luciferin durch das Enzym Luciferase.



Das dabei emittierte Licht ist proportional zu der ATP Konzentration.

Nach der Stimulation mit Glukose wurden die adhärenen Zellen mit 200 μl Lysis Solution lysiert und 2 min auf dem Schüttler inkubiert. Es wurden 20 μl des so gewonnenen Lysats für die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford verwendet. Als Leerwert dienten 20 μl Lysis Solution und als Standardwert diente BSA. Ein Teil des Lysats wurde 1:10 mit Puffer A verdünnt. 350 μl des 1:10 verdünnten Lysats wurden für die Messung der ADP-Konzentration zu 19,5 μl 30 mMol/l Phosphoenolpyruvat (PEP) und 0,5 μl 4 mM Pyruvat-Kinase (PK) zugesetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die ATP-Standardreihe wurde der ATPlite Standard mit Puffer A in folgenden Konzentrationen hergestellt: 20 μM ; 10 μM ; 5 μM , 2 μM ; 1 μM ; 0,5 μM und 0 μM . Für den ADP-Standard wurden 5 μl 10 μmol ADPlite Standard zu 19,5 μl 30 mM Phosphoenolpyruvat (PEP) und 0,5 μl 4 mM Pyruvat-Kinase (PK) zugesetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Messung der

Standardkurve wurde in jedem well 100 µl Lysis Solution (1:10 verdünnt mit Puffer A) für die ATP-Standards und 75,7 µl für die ADP-Standards vorgelegt. Endogene ATPasen werden durch die Lysis Solution inaktiviert. Anschließend wurden 10 µl der jeweiligen Konzentration des ATP- bzw. ADP-Standards pro well aufgetragen und 50 µl ATPlite Lyophilized Substrate Solution zugegeben, welches die Substrate D-Luciferin und Luciferase enthält. Die Standard-Platte wurde für 2 min geschüttelt und 10 min abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Messung der ATP-Konzentration der Proben wurden pro well 100 µl der verdünnten 1:10 Lysate und 50 µl ATPlite Lyophilized Substrate Solution zugegeben. Analog wurde für die Messung der ADP-Konzentration pro well 105,7 µl des ADP-Lysat-Ansatzes und 50 µl ATPlite Lyophilized Substrate Solution aufgetragen. Die Proben-Platte wurde für 2 min geschüttelt und für 10 min bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Sowohl für die Standards als auch für die Proben erfolgten Dreifachbestimmungen. Im Luminometer Victor3 1420 Multilabel Counter erfolgte die Messung der Lumineszenz. In Relation zu den ATP-Standard-Werten und Proteinkonzentrationen konnten die ATP/ADP-Ratio ermittelt werden.

3.5.3 Insulin-ELISA

Zur Detektion der Insulin-Sekretion von INS1-Zellen wurde ein Insulin-ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) verwendet. Dieses immunologische Nachweisverfahren beruht auf einer direkten Sandwich-Technik mit enzymvermittelter Farbreaktion (Abb. 16). Hierfür wird zunächst ein Coating-Antikörper (Mouse monoclonal AB (3A6)) auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden. Das in der Probe enthaltene Insulin bindet an diesen Coating-Antikörper. Ein zweiter Antikörper, der Detection-Antikörper (Mouse monoclonal (8E2) to Insulin (HRP)) ist an das Enzym Meerrettich Peroxidase (HRP) gekoppelt und bindet nun an das Antikörper-Insulin Konjugat und bildet einen enzymgekoppelten Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Beide Antikörper binden an unterschiedlichen Epitopen des Insulins. Durch Hinzufügen des Chromogens 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) erfolgt eine enzymatische Umwandlung von TMB durch HRP, und die so entstehende Farbreaktion detektiert das Insulin. Abgestoppt wird diese Reaktion durch Schwefelsäure und es erfolgt ein erneuter Farbumschlag, der nun bei 450 nm gemessen werden kann. Der Insulingehalt kann so anhand von mitgeführten Insulin Standards bekannter Konzentration quantifiziert werden.

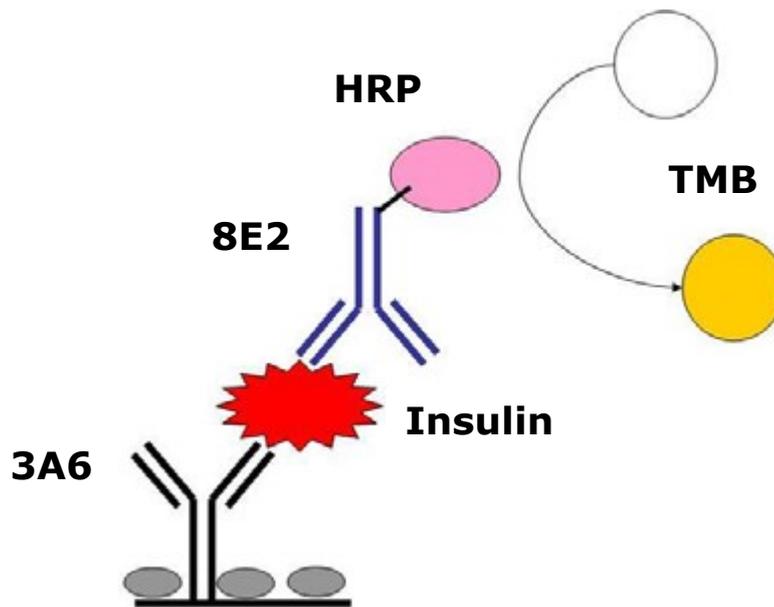


Abbildung 16: Prinzip des Insulin-ELISA

Nach der Stimulation der INS1-Zellen mit 2,8 mmol/l bzw. 20 mmol/l Glukose wurden 1 ml des Überstandes für die Bestimmung der Insulinsekretion abgenommen und 5 min bei 2.135 rpm zentrifugiert und anschließend wurden 800 µl des Überstandes abgenommen. Dieser Überstand wurde für den Insulin-ELISA 1:20 in Krebs Ringer Gebrauchslösung verdünnt. Außerdem erfolgte mit dem Überstand die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode. Die restlichen Zellen im well wurden für die Bestimmung des Insulingehalts mit einem Zellschaber abgetragen und für 45 s mit 90 % Ultraschall behandelt und für 5 min bei 2.135 rpm zentrifugiert. Erneut wurden 800 µl Überstand gewonnen, der für den Insulin-ELISA mit Krebs-Ringer-Gebrauchslösung 1:50 verdünnt wurde. Der Coating-Antikörper „Mouse monoclonal AB (3A6)“ wurde 1:750 in Carbonat-Bicarbonat Puffer verdünnt und jeweils 20 µl je well aufgetragen. Die Mikrotiterplatte wurde mit dem monoklonalen Antikörper, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des Insulin-Moleküls gerichtet ist, für 2 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde 3 mal mit jeweils 100µl Waschpuffer je well (1xPBS und 0,05% Tween 20) gewaschen. Um unspezifische Stellen auf der Mikrotiterplatte zu blockieren, wurden 100 µl je well 1x Roti Block für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 mal mit jeweils 100µl Waschpuffer je well gewaschen. Die Proben mit dem nachzuweisenden Insulin und der Insulinstandard wurden mit jeweils 20 µl je well im Dreifachansatz hinzugefügt und für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Erstellung der Kalibrierungskurve des Insulin-Standards erfolgte mit rekombinantem humanen Insulin (1 mg/ml) und wurde mit der Krebs Ringer Gebrauchslösung auf folgende Konzentrationen verdünnt: 0 ng/ml; 2,5 ng/ml;

5,0 ng/ml; 7,5 ng/ml; 10 ng/ml; 15 ng/ml; 20 ng/ml und 30 ng/ml. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden mit 3 maligem Waschen mit jeweils 100 µl Waschpuffer je well die ungebundenen Bestandteile entfernt. Auf das Antikörper-Insulin-Konjugat wurde nun der Detection-Antikörper „Mouse monoclonal (8E2) to Insulin (HRP), der 1:3.000 in 0,1x Roti Block verdünnt wurde, mit jeweils 20 µl je well aufgetragen und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 mal mit jeweils 100 µl Waschpuffer je well gewaschen. Der Detection-Antikörper bindet mit einem anderen Epitop an das Insulin und bildet den Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Weiterhin ist er an das Enzym HRP (horseradish peroxidase) gekoppelt. Dieses Enzym HRP katalisiert nach Hinzufügen von 50 µl des Chromogens 1-Step™ Ultra TMB-ELISA die Oxidation des Substrates TMB. Nach 15 minütiger abgedunkelter Inkubation auf dem Schüttler kam es zu einem blauen Farbumschlag. Diese Reaktion wurde dann durch Zugabe von 50 µl je well einer 1 M Schwefelsäure abgestoppt und es kam zu einem gelben Farbumschlag. Die Intensität der gebildeten Farbe ist proportional zu der Insulin-Konzentration in der Probe. Die Messung erfolgte bei 450 nm mit dem Luminometer Victor3 1420 Multilabel Counter. Die Insulinkonzentration der Insulinsekretion und des Insulingehaltes konnte anhand der Messwerte ermittelt werden.

5 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene klonale, insulinsezernierende β -Zelllinien verwendet (Abb. 17). Die Glukose-responsiven (GR) 832/13 INS1-Zellen und die Glukose-unresponsiven (GUR) 832/2 INS1-Zellen unterscheiden sich in ihrer Insulinsekretion nach einer Stimulation mit Glukose. Die GR INS1-Zellen steigern nach einer Glukose-Stimulation ihre Insulinsekretion und dienen somit als physiologisches β -Zellmodell. Dagegen erfolgt bei den GUR INS1-Zellen nach Glukose-Stimulation keine Steigerung der Insulinsekretion. Diese Zellen wurden daher als T2DM-Zellmodell verwendet.

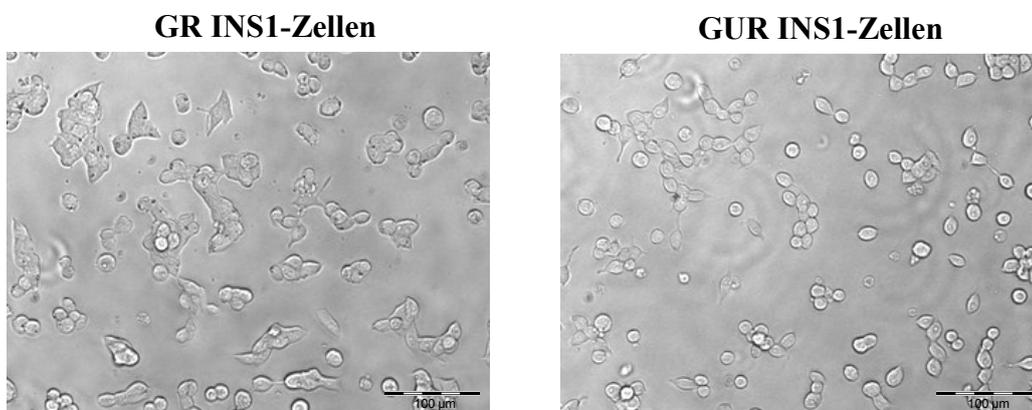


Abbildung 17: Lichtmikroskopische Aufnahme der Glukose-responsiven (GR) und Glukose-unresponsiven (GUR) INS1-Zellen

4.1 Expression der Teilungs- und Fusionsproteine in INS1-Zellen

Eine quantitative Analyse der mitochondrialen Dynamik anhand der Fusions- und Teilungsproteine in INS1-Zellen wurde mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR durchgeführt (siehe 3.2). Es erfolgte eine Expressionsanalyse der mRNA der Teilungsgene *Fis1* und *Drp1* und der Fusionsgene *OPA1*, *Mfn1* und *Mfn2*. Die Normalisierung erfolgte gegen das Referenzgen *Hprt1*. Zur Darstellung der relativen Genexpression wurde die Expression der jeweiligen Fusions- und Teilungsgene in den GR INS1-Zellen hundert Prozent gesetzt.

Eine verminderte Genexpression aller Fusions- und Teilungsproteine zeigte sich bei den GUR INS1-Zellen im Vergleich zu den GR INS1-Zellen (Abb. 18). Die relative mRNA Expression des Teilungsprotein *Fis1* war bei den GUR INS1-Zellen im Vergleich zu den GR INS1-Zellen signifikant um 39% vermindert. *Drp1* war dagegen bei den GUR INS1-Zellen um 23%

vermindert exprimiert als bei den GR INS1-Zellen. Ebenso zeigten die Fusionsproteine in den GUR INS1-Zellen eine verminderte Expression. OPA1 und Mfn1 waren signifikant um 38% bzw. 32% weniger in den GUR INS1-Zellen exprimiert als in den GR INS1-Zellen. Mfn2 zeigte eine um 24% geringere Expression in den GUR INS1-Zellen im Vergleich zu den GR INS1-Zellen.

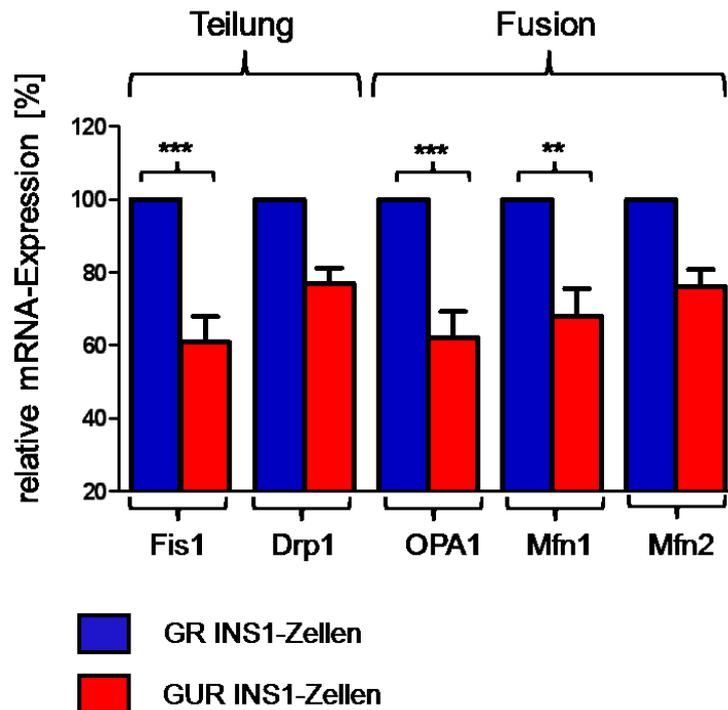


Abbildung 18: Vergleich der relativen mRNA-Expression der Teilungs- und Fusionsgene in INS1-Zellen: Dargestellt sind Werte \pm SEM; Die Expression ist auf das Referenzgen Hprt1 normalisiert. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 7)

Zur Untersuchung der Proteinexpression der Fusions- und Teilungsproteine in INS1-Zellen wurden Western Blots durchgeführt (siehe 3.3). Durch spezifische primäre und fluoreszenzgekoppelte sekundäre Antikörper konnten die jeweiligen Proteine detektiert werden. Um zu überprüfen, dass gleiche Proteinmengen geladen wurden, wurde im Western Blot die Expression von β -Tubulin analysiert.

Im Western Blot konnte auch auf Proteinebene eine verminderte Expression aller Teilungs- und Fusionsproteine in den GUR INS1-Zellen im Vergleich zu den GR INS1-Zellen gezeigt werden (Abb. 19).

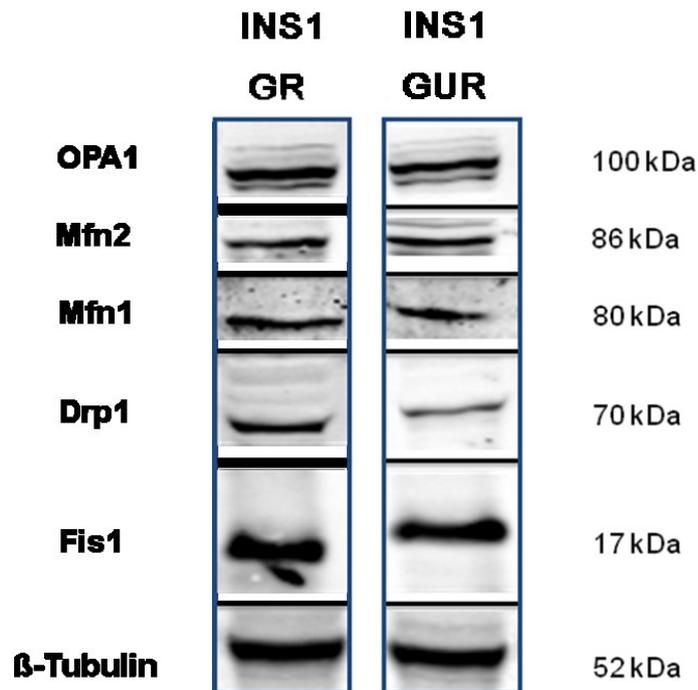


Abbildung 19: Western Blot der mitochondrialen Fusions- und Teilungsproteine in INS1-Zellen: Als Kontrolle wurde β -Tubulin verwendet. (n = 3)

Die Quantifizierung der Proteinexpression im Western Blot bestätigte die Verminderung der relativen Genexpression aller Fusions- und Teilungsproteine der GUR im Vergleich zu den GR INS1-Zellen (Abb. 20). Die Expression der Teilungsproteine Fis1 und Drp1 änderte sich signifikant um 38% bzw. 31% in den GUR INS1-Zellen im Vergleich zu den GR INS1-Zellen. Ebenso verminderte sich die Expression der Fusionsproteine OPA1, Mfn1 und Mfn2 in den GUR INS1-Zellen um 38%, 34% bzw. 25% im Vergleich zu den GR INS1-Zellen.

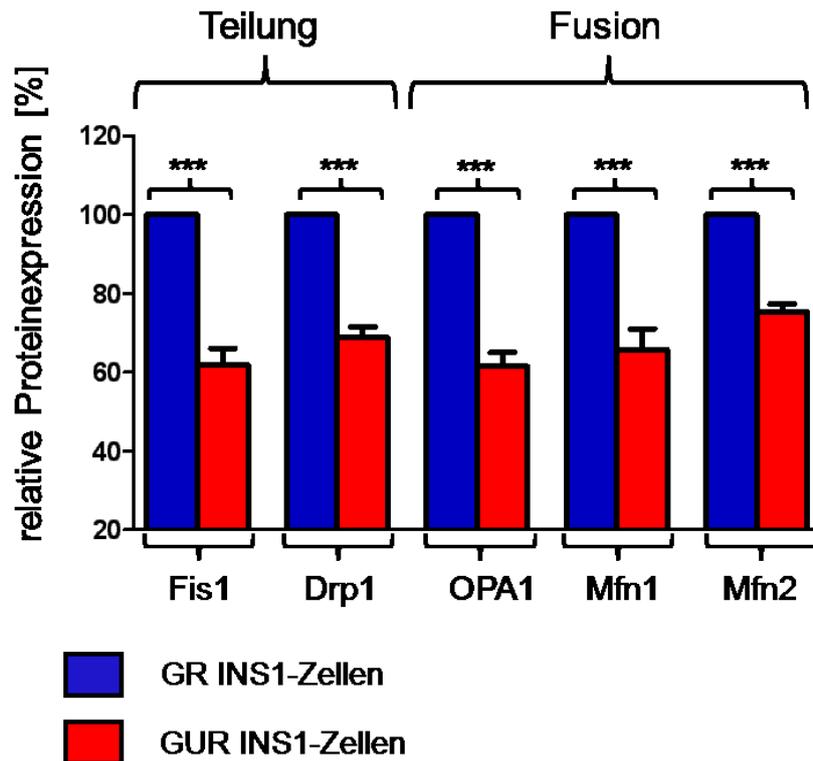


Abbildung 20: Vergleich der relativen Proteinexpression der mitochondrialen Teilungs- und Fusionsproteine in INS1-Zellen: Dargestellt sind Werte \pm SEM; ***, $p < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3)

Zur weiteren Darstellung der Expression der Fusions- und Teilungsproteine wurden Immunfluoreszenzfärbungen der jeweiligen Proteine mittels spezifischer primärer und fluoreszenz-gekoppelten sekundärer Antikörper durchgeführt (siehe 3.4). Hier zeigte sich bei den GUR INS1-Zellen eine verminderte Expression des Teilungsproteins Fis1 und der Fusionsproteine Mfn1 und Mfn2 im Vergleich zu den GR INS1 Zellen (Abb. 21).

Die quantitative Auswertung dieses immunhistochemischen Nachweises ergab eine signifikante Verminderung der relativen Fis1-Expression in den GUR INS1-Zellen um 41% im Vergleich zu den GR INS1-Zellen. Die relative Expression der Fusionsproteine Mfn1 und Mfn2 verminderten sich in den GUR INS1-Zellen signifikant um 39% bzw. 26% im Vergleich zu den GR INS1-Zellen (Abb. 22).

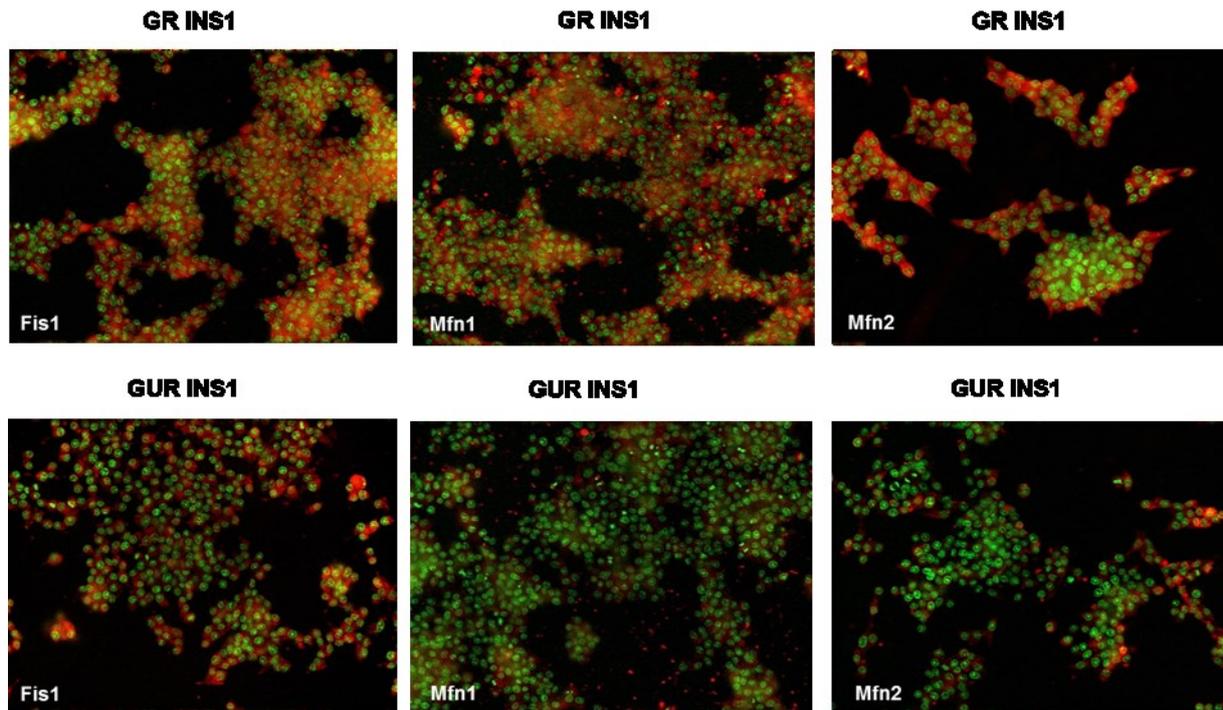
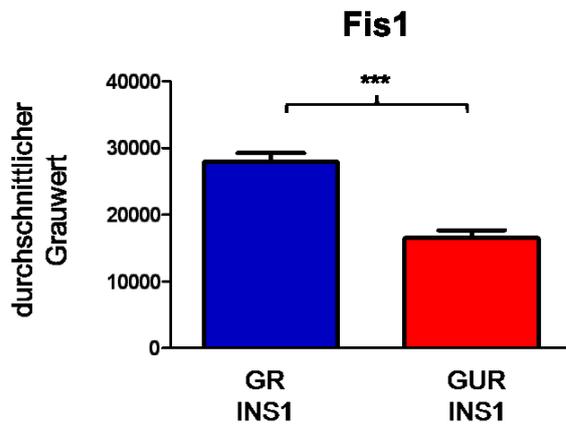
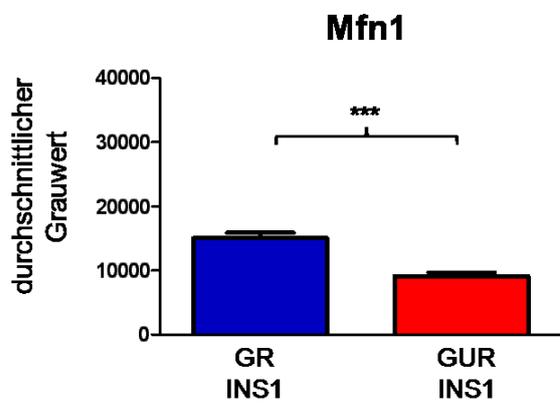


Abbildung 21: Immunhistochemische Darstellung der mitochondrialen Fusions- und Teilungsproteinen in GR und GUR INS1-Zellen: grün = DAPI-Färbung, rot = spezifische Proteinfärbung

A



B



C

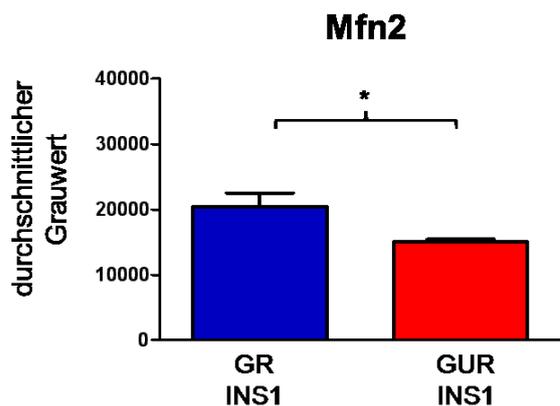


Abbildung 22: Immunhistochemische Quantifizierung der Expression der mitochondrialen Fusions- und Teilungsproteine in INS1-Zellen: Dargestellt sind Werte \pm SEM; (A) Quantifizierung der Fis1-Expression (B) Quantifizierung der Mfn1-Expression (C) Quantifizierung der Mfn2-Expression. *, $p < 0,05$, ***, $p < 0,001$ (Student's t-Test). (n = 3)

4.2 Expression der Fusions- und Teilungsproteine in INS1-Zellen nach Inkubation mit Palmitinsäure

Zur Darstellung der Veränderung der mitochondrialen Dynamik unter Beeinflussung von freien Fettsäuren wurden die Glukose-responsiven (GR) und Glukose-unresponsiven (GUR) INS1-Zellen für 48 Stunden mit Palmitinsäure inkubiert. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen von 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure verwendet, um eine konzentrationsabhängige Veränderung der Expression der Fusions- und Teilungsproteine zu untersuchen.

4.2.1 Expression des Teilungsproteins Fis1

Die Fis1-Expression in den GR und GUR INS1- Zellen verminderte sich im Vergleich zu den unbehandelten GR und GUR INS1-Zellen nach Inkubation mit den unterschiedlichen Konzentrationen von Palmitinsäure jeweils in der mRNA-Expression und der Proteinexpression.

Die relative mRNA-Expression von Fis1 verminderte sich nach Inkubation mit den drei Konzentrationen von Palmitinsäure in beiden Zelllinien im Vergleich zu den unbehandelten GR und GUR INS1-Zellen (Abb. 23). Die Verminderung der relativen Fis1-Expression nach Palmitinsäure-Inkubation war bei den GR INS1-Zellen deutlicher als bei den GUR INS1-Zellen. Nach einer Inkubation mit 0,15 mmol/l Palmitinsäure verminderte sich die relative Fis1-Expression in den GR um 40% im Vergleich zu den unbehandelten GR INS1-Zellen. Eine signifikante Minderung von 52% und 53% ergaben sich bei den Konzentrationen von 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure in den GR INS1-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten GR INS1-Zellen. Weniger deutlich änderte sich die relative Fis1-Expression der GUR INS1-Zellen in Bezug auf die unbehandelten GUR INS1-Zellen. Hier kam es nur zu einer Verminderung der Expression von Fis1 um 2%, 15% bzw. 18% bei den Konzentrationen von 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure. Es konnte somit eine konzentrationsabhängige Verminderung der Fis1-Expression durch Palmitinsäure gezeigt werden.

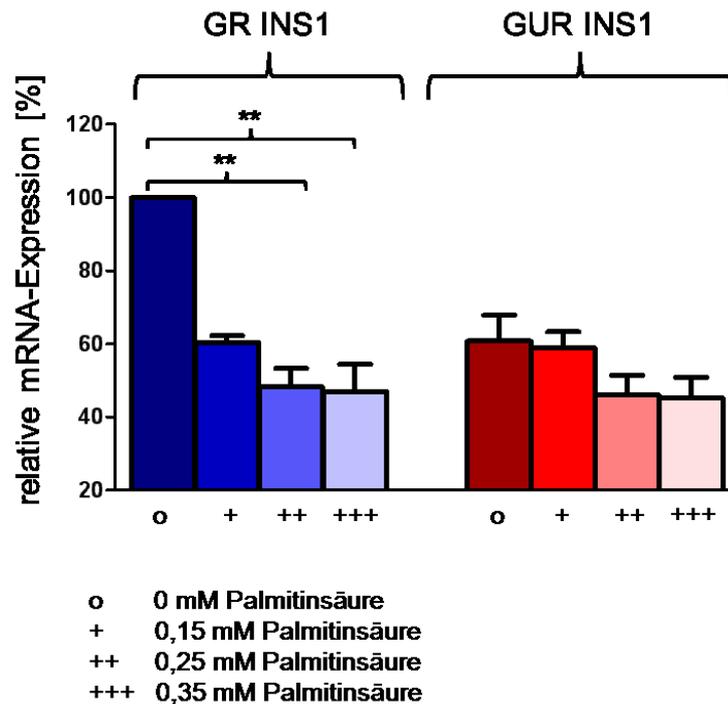


Abbildung 23: Vergleich der relativen mRNA-Expression von Fis1 in INS1-Zellen: Dargestellt sind Werte \pm SEM; nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. Die Expression ist auf das Referenzgen Hprt1 normalisiert. **, $p < 0,01$; (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 6)

Diese konzentrationsabhängige Minderung der Fis1-Expression nach Behandlung mit Palmitinsäure in GR und GUR INS1-Zellen bestätigte sich auch auf Proteinebene (Abb. 24).

Die durchgeführte Quantifizierung der Proteinexpression ergab eine signifikante Minderung der relativen Fis1-Expression der GR INS1-Zellen von 18%, 34% bzw. 41% unter Palmitinsäure-Konzentrationen von 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l im Vergleich zu den unbehandelten GR INS1-Zellen (Abb. 25). Die Expression von Fis1 in den GUR INS1-Zellen änderte sich weniger deutlich. In Bezug auf die unbehandelten GUR INS1-Zellen verminderte sich die relative Fis1-Expression nach Inkubation mit 0,15 mmol/l Palmitinsäure um 9%. Nach Inkubation mit 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure änderte sich die relative Fis-Expression signifikant um 24% und 29% im Vergleich zu den unbehandelten GUR INS1-Zellen.

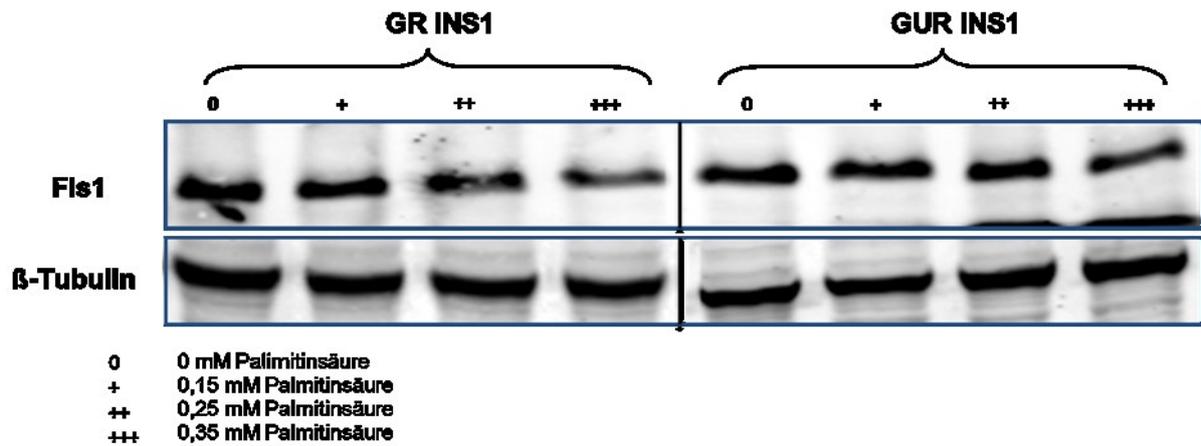


Abbildung 24: Western Blot von Fis1 in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. Als Kontrolle wurde β -Tubulin verwendet. (n = 3)

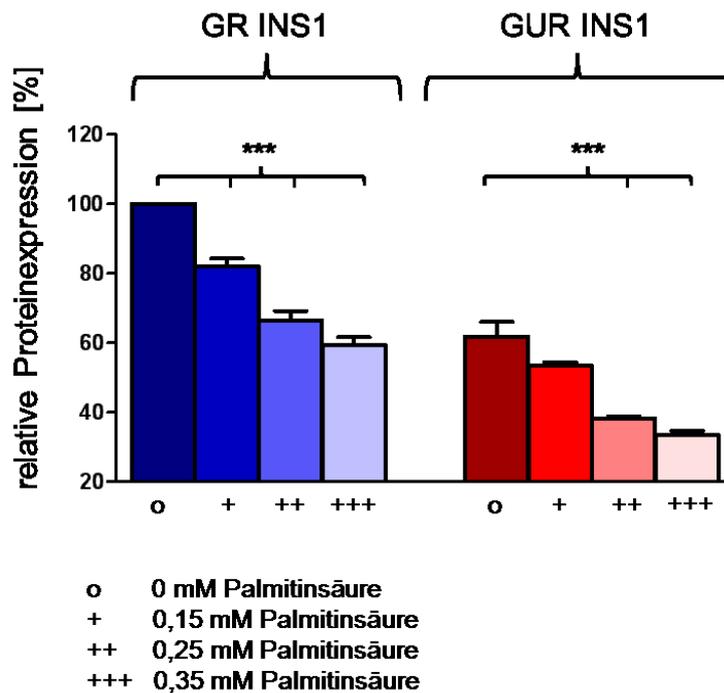


Abbildung 25: Vergleich der relativen Proteinexpression von Fis1 in INS1-Zellen: Dargestellt sind Werte \pm SEM; Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. ***, $p < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni-Test). (n = 3)

Die Immunhistochemische Auswertung zeigte ebenfalls eine Verminderung der Fis1-Expression in beiden Zelllinien nach Inkubation mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure im Vergleich zu den unbehandelten INS1-Zellen (Abb. 26).

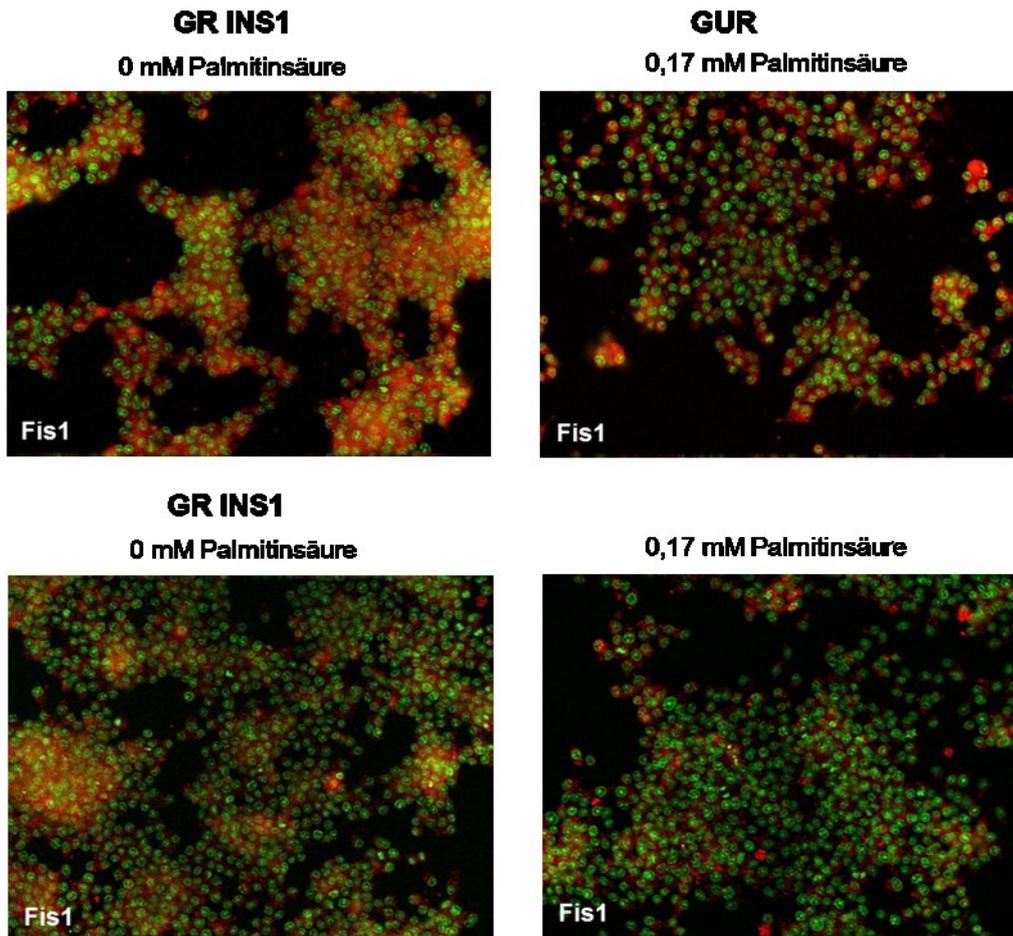


Abbildung 26: Immunhistochemische Darstellung der Fis1-Expression in INS1-Zellen: Nach Behandlung mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. grün = DAPI-Färbung, rot = spezifische Fis1-Färbung

Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Bilder ergab, dass die Fis1-Expression nach der Behandlung mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure bei den GR INS1-Zellen um 39% signifikant war. Bei den GUR INS1-Zellen konnte eine Verminderung um 18% im Bezug auf die unbehandelten INS1-Zellen ermittelt werden (Abb. 27).

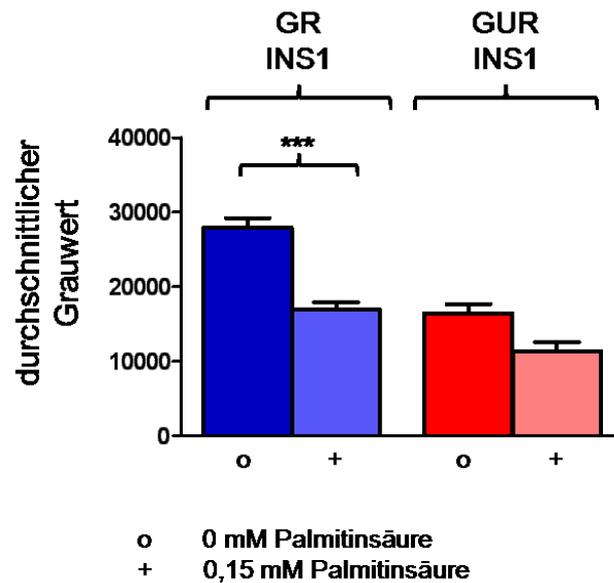


Abbildung 27: Immunhistochemische Quantifizierung der Fis1-Expression in INS1-Zellen: Dargestellt sind Werte \pm SEM; Nach Inkubation mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3)

4.2.2 Expression des Teilungsproteins Drp1

Die Drp1-Expression in den GR und GUR INS1-Zellen verminderte sich im Vergleich zu den unbehandelten GR und GUR INS1-Zellen nach Inkubation mit den unterschiedlichen Konzentrationen von Palmitinsäure in der relativen mRNA-Expression und der Proteinexpression.

Die relative mRNA-Expression von Drp1 verminderte sich nach Inkubation mit den drei Konzentrationen von Palmitinsäure in beiden Zelllinien im Vergleich zu den unbehandelten GR und GUR INS1-Zellen. Die relative Drp1-Expression war nach Inkubation mit Palmitinsäure bei den GR INS1-Zellen stärker vermindert als bei den GUR INS1-Zellen. Bei den Konzentrationen von 0,15 mmol/l und 0,25 mmol/l Palmitinsäure verminderte sich die relative Drp1-Expression in den GR INS1-Zellen um 32% und 42% im Vergleich zu den unbehandelten GR INS1-Zellen. Eine Inkubation mit 0,35 mmol/l Palmitinsäure dagegen zeigte eine nicht signifikant erhöhte Drp1-Expression von 10% in Bezug auf die Behandlung mit 0,25 mmol/l Palmitinsäure. Weniger deutlich änderte sich die relative Drp1-Expression in den GUR INS1-Zellen in Bezug auf die unbehandelten GUR INS1-Zellen. Hier kam es nur zu einer Verminderung der relativen Expression von Drp1 um 12%, 13% bzw. 29% bei den Konzentrationen von 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure (Abb. 28). Es

konnte somit eine konzentrationsabhängige Verminderung der relativen Drp1-Expression durch Palmitinsäure gezeigt werden.

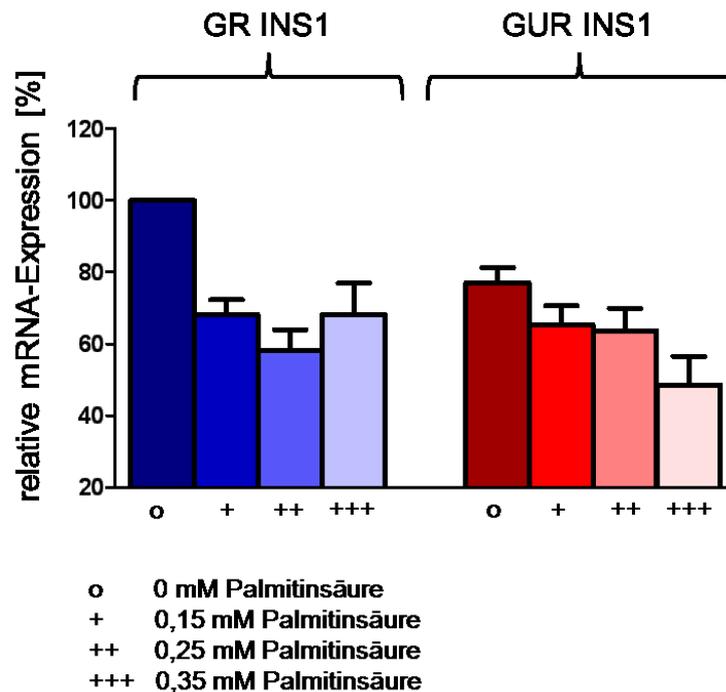


Abbildung 28: Vergleich der relativen mRNA-Expression von Drp1 in INS1-Zellen: Dargestellt sind Werte \pm SEM; Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. Die Expression ist auf das Referenzgen Hprt1 normalisiert. (n=6)

Diese konzentrationsabhängige Minderung der Drp1-Expression in den GR und GUR INS1-Zellen nach Behandlung mit Palmitinsäure bestätigte sich auch auf Proteinebene (Abb. 29). Die durchgeführte Quantifizierung der Proteinexpression ergab eine signifikante Minderung der Drp1-Expression bei den GR INS1-Zellen von 14% und 24% nach der Behandlung mit 0,15 mmol/l und 0,25 mmol/l Palmitinsäure im Vergleich zu den unbehandelten GR INS1-Zellen (Abb. 30). Nach Inkubation mit 0,35 mmol/l Palmitinsäure zeigte sich ebenfalls auf der Proteinebene eine signifikante Erhöhung der Drp1-Expression um 10% in den GR INS1-Zellen im Vergleich zu den GR INS1-Zellen, die mit 0,25 mmol/l Palmitinsäure behandelt wurden. Die Expressionsänderung von Drp1 in den GUR INS1-Zellen verminderte sich im Vergleich zu den unbehandelten GUR INS1-Zellen bei den Konzentrationen von 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure signifikant um 10%, 19% bzw. 27%.

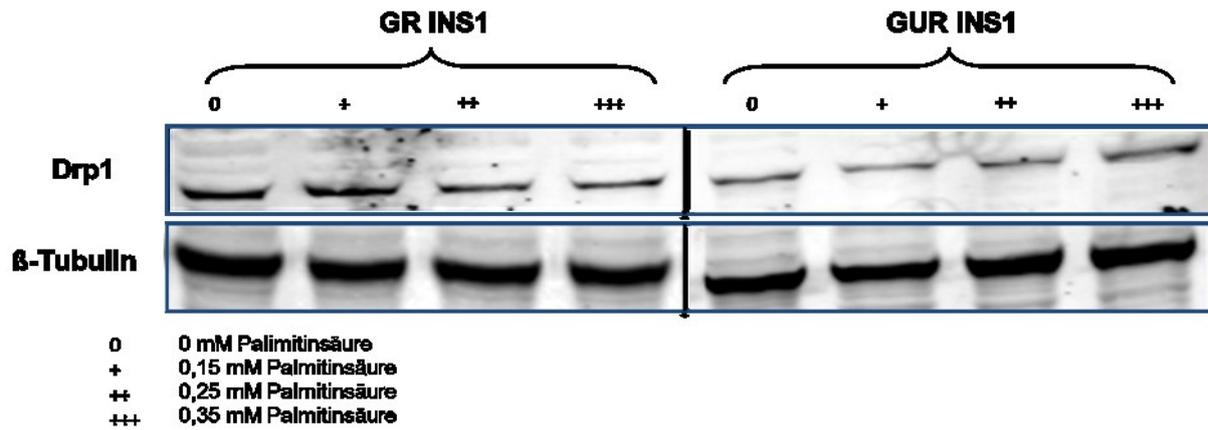


Abbildung 29: Western Blot von Drp1 in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. Als Kontrolle wurde β -Tubulin verwendet. (n = 3)

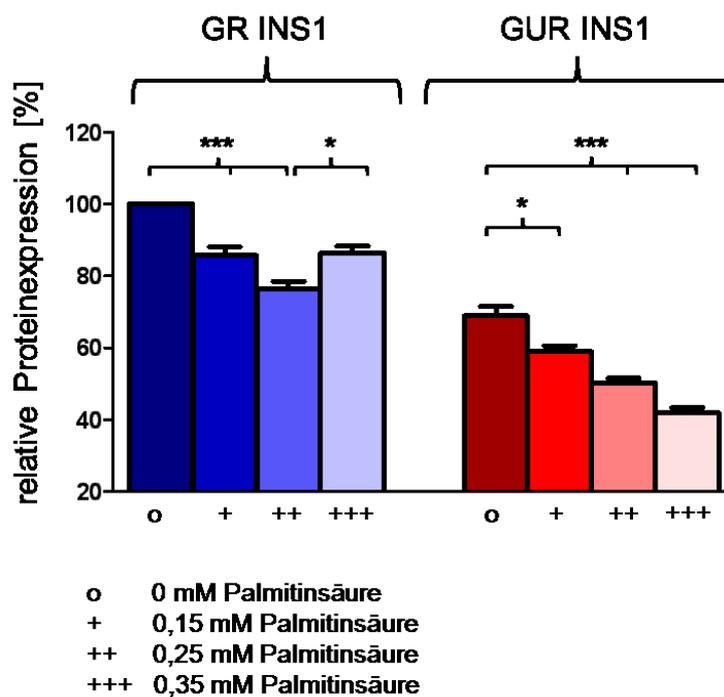


Abbildung 30: Vergleich der relativen Proteinexpression von Drp1 in INS1-Zellen: Dargestellt sind Werte \pm SEM; Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. *, p < 0,05; ***, p < 0,001 (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3)

4.2.3 Expression des Fusionsproteins OPA1

Die relative OPA1-Expression in den GR und GUR INS1-Zellen verminderte sich nach Inkubation mit den unterschiedlichen Konzentrationen von Palmitinsäure in der relativen mRNA-Expression und der Proteinexpression gegenüber den unbehandelten GR und GUR INS1-Zellen.

Die relative mRNA-Expression von OPA1 nach Inkubation mit Palmitinsäure war bei den GR INS1-Zellen deutlicher vermindert als bei den GUR INS1-Zellen (Abb. 31). Bei einer Konzentration von 0,15 mmol/l Palmitinsäure verminderte sich die OPA1-Expression in den GR INS1-Zellen um 29% im Bezug auf die unbehandelten GR INS1-Zellen. Es kam nur zu einer geringen weiteren Verminderung der OPA1-Expression von 32% und 33% bei den Konzentrationen von 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure in den GR INS1-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten GR INS1-Zellen. Weniger deutlich änderte sich die OPA1-Expression in den GUR INS1-Zellen im Bezug auf die unbehandelten GUR INS1-Zellen. Hier kam es zu einer Verminderung der Expression von OPA1 um 9%, 16% bzw. 21% bei den Konzentrationen von 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure. Es konnte somit eine konzentrationsabhängige Verminderung der relativen OPA1-Expression in beiden Zelllinien durch Palmitinsäure gezeigt werden.

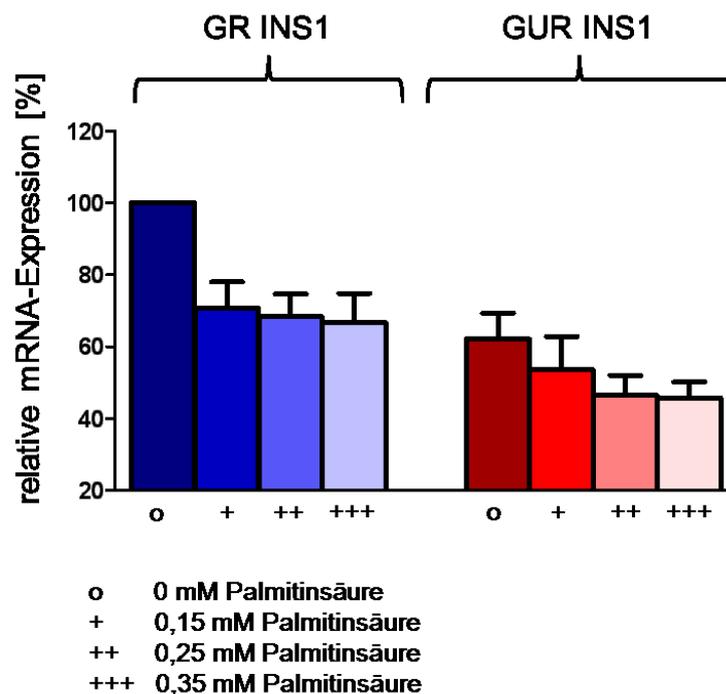


Abbildung 31: Vergleich der relativen mRNA-Expression von OPA1 in INS1-Zellen: Dargestellt sind Werte \pm SEM; Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. Die Expression wurde auf das Referenzgen Hprt1 normalisiert. (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 6)

Diese konzentrationsabhängige Minderung der OPA1-Expression unter Palmitinsäure in GR und GUR INS1-Zellen bestätigte sich auch auf Proteinebene (Abb. 32). Die durchgeführte Quantifizierung der Proteinexpression ergab eine signifikante Minderung der relativen OPA1-Expression bei den GR INS1-Zellen von 21%, 33% bzw. 40% unter den Konzentrationen von 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure im Vergleich zu den unbehandelten GR INS1-Zellen (Abb. 33). Die Expressionsänderung von OPA1 in den GUR INS1-Zellen war dagegen deutlich geringer. Im Vergleich mit den unbehandelten GUR INS1-Zellen verminderte sich die OPA1-Expression signifikant nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure um 14%, 21% und 31%.

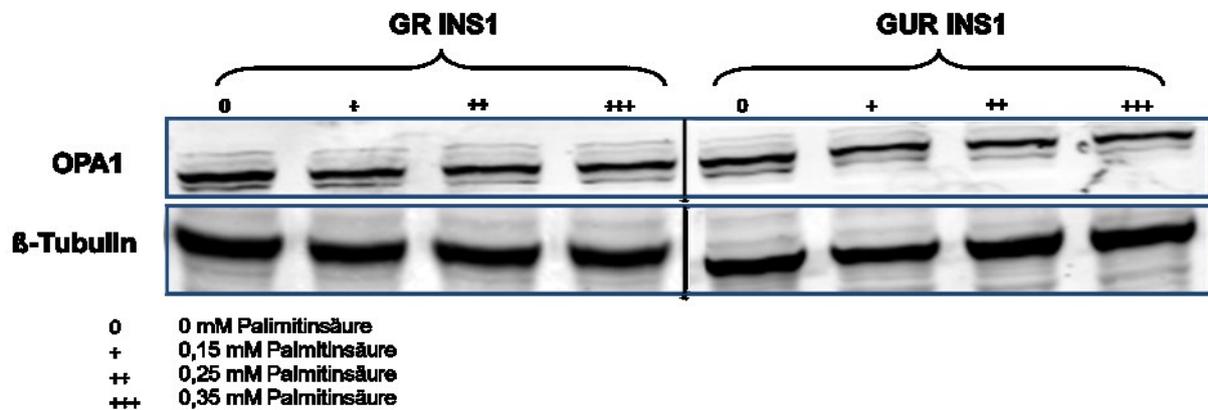


Abbildung 32: Western Blot von OPA1 in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. Als Kontrolle wurde β-Tubulin verwendet. (n = 3)

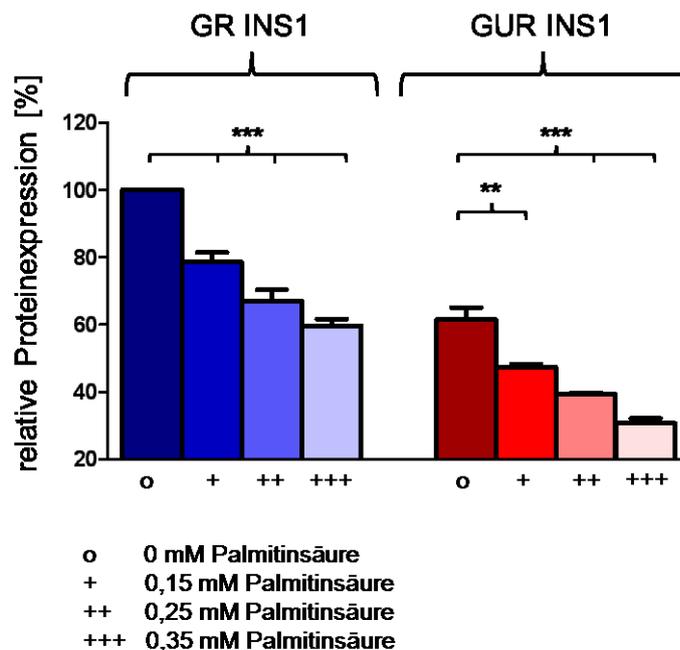


Abbildung 33: Vergleich der relativen Proteinexpression von OPA1 in INS1-Zellen: Dargestellt sind Werte \pm SEM; Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. ***, $p < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3)

4.2.4 Expression des Fusionsproteins Mfn1

Die relative Mfn1-Expression verminderte sich in den beiden Zelllinien im Vergleich zu den unbehandelten GR und GUR INS1-Zellen nach Inkubation mit den unterschiedlichen Konzentrationen von Palmitinsäure in der mRNA-Expression und der Proteinexpression. Die relative mRNA-Expression von Mfn1 war nach Inkubation mit Palmitinsäure bei den GR INS1-Zellen deutlicher vermindert als bei den GUR INS1-Zellen (Abb. 34). Bei den Konzentrationen von 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure verminderte sich die relative Mfn1-Expression in den GR um 19%, 31% bzw. 41% im Vergleich zu den unbehandelten GR INS1-Zellen. Weniger deutlich änderte sich die Mfn1-Expression in den GUR INS1-Zellen in Bezug auf die unbehandelten GUR INS1-Zellen. Hier kam es zu einer verminderten Expression von Mfn1 um 12% bzw. 23% bei den Konzentrationen von 0,15 mmol/l und 0,25 mmol/l Palmitinsäure. Eine signifikante Verminderung der relativen Mfn1-Expression um 33% in Bezug zu den unbehandelten GUR INS1-Zellen zeigte sich bei den GUR INS1-Zellen, die mit 0,35 mmol/l Palmitinsäure inkubiert wurden.

Es konnte somit eine Konzentrationsabhängige Verminderung der relativen mRNA-Expression von Mfn1 nach Palmitinsäure-Inkubation in beiden Zelllinien gezeigt werden.

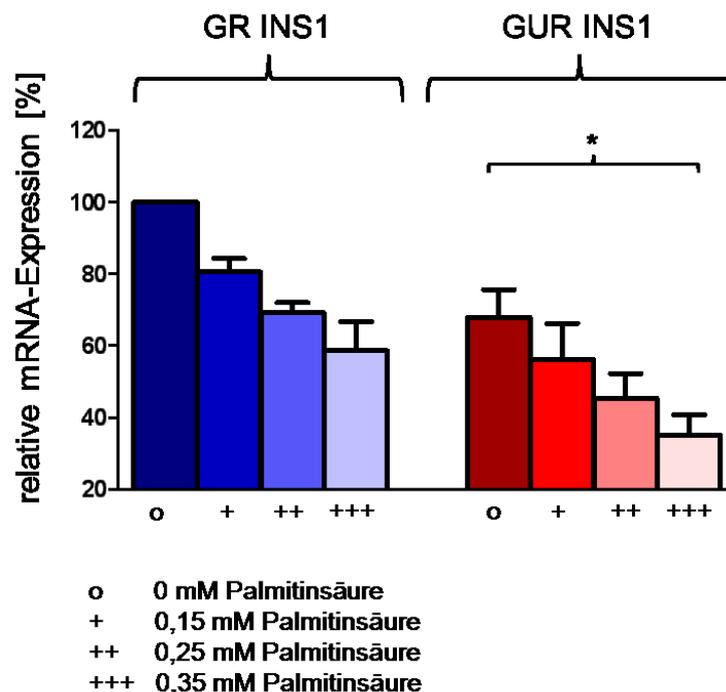


Abbildung 34: Vergleich der relativen mRNA-Expression von Mfn1 in INS1-Zellen: Dargestellt sind Werte \pm SEM; Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. *, $p < 0,05$ (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 6)

Diese konzentrationsabhängige Minderung der Mfn1-Expression unter Palmitinsäure bestätigte sich bei beiden Zelllinien ebenfalls auf Proteinebene (Abb. 35).

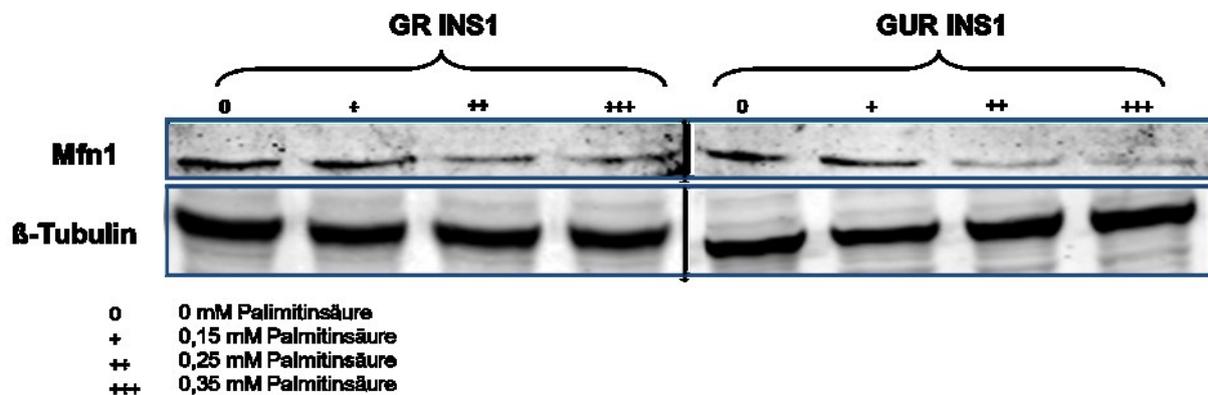


Abbildung 35: Western Blot von Mfn1 in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. Als Kontrolle wurde β-Tubulin verwendet. (n = 3)

Die Quantifizierung der Proteinexpression ergab eine signifikante Minderung der relativen Mfn1-Expression bei den GR INS1-Zellen von 18%, 28% bzw. 49% nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure im Vergleich zu den unbehandelten GR INS1-Zellen (Abb. 36). Die Expression von Mfn1 in den GUR INS1-Zellen verminderte sich ebenfalls signifikant in Bezug auf die unbehandelten GUR INS1-Zellen nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure um 18%, 34% bzw. 36%.

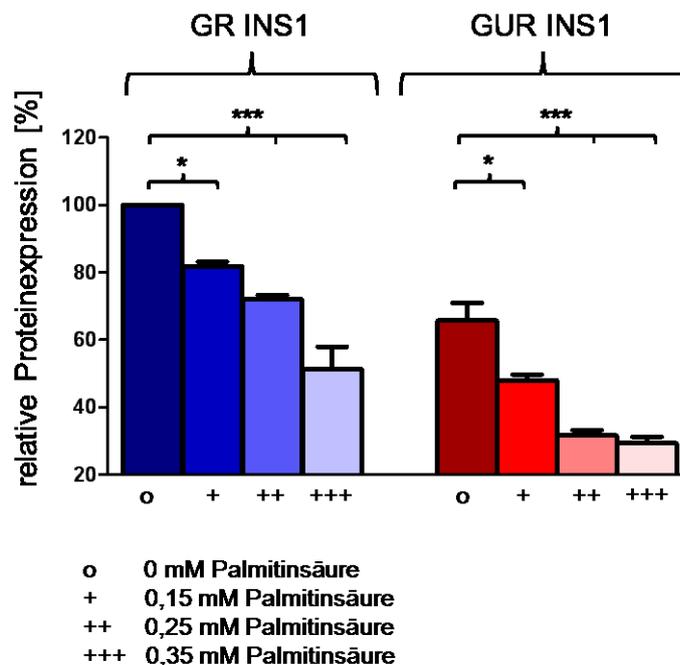


Abbildung 36: Vergleich der relativen Proteinexpression von Mfn1 in INS1-Zellen: Dargestellt sind Werte \pm SEM; nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. ***, p < 0,001 (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3)

Die immunhistochemische Auswertung zeigte ebenfalls eine Verminderung der Mfn1-Expression in den GR und GUR INS1-Zellen nach Inkubation mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure im Vergleich zu den unbehandelten INS1-Zellen (Abb. 37). Die quantitative Auswertung der immunhisto-chemischen Bilder ergab eine deutlichere Abnahme der Mfn1-Expression nach der Behandlung mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure bei den GR INS1-Zellen, mit signifikanter Minderung um 35%, als bei den GUR INS1-Zellen, mit 15% Minderung, jeweils in Bezug auf die unbehandelten INS1-Zellen (Abb. 38).

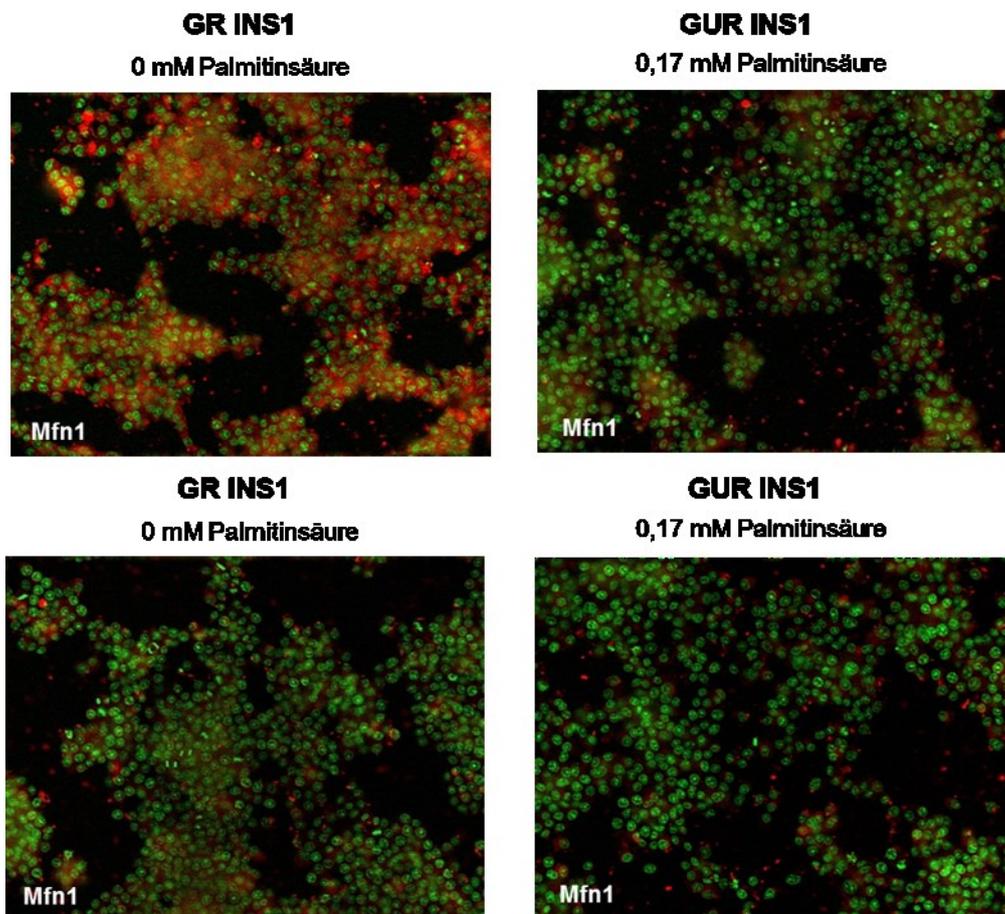


Abbildung 37: Immunhistochemische Darstellung der Mfn1-Expression in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. grün = DAPI-Färbung, rot = spezifische Mfn1-Färbung

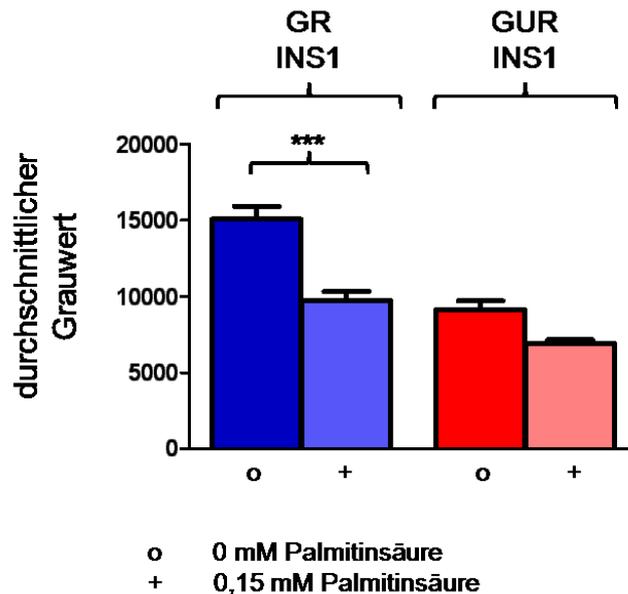


Abbildung 38: Immunhistochemische Quantifizierung der Mfn1-Expression in INS1-Zellen: Dargestellt sind Werte \pm SEM; Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. ***, $p < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3)

4.2.5 Expression des Fusionsproteins Mfn2

Nach Inkubation mit den unterschiedlichen Konzentrationen von Palmitinsäure verminderte sich die Mfn2-Expression der GR und GUR INS1-Zellen in der mRNA-Expression, Proteinexpression und in der Immunfluoreszenz im Vergleich zu den unbehandelten INS1-Zellen.

Die relative mRNA-Expression von Mfn2 verminderte sich nach Inkubation mit den drei Konzentrationen von Palmitinsäure in den GR INS1-Zellen deutlicher als in den GUR INS1-Zellen (Abb. 39). Bei den Konzentrationen von 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure verminderte sich die relative Mfn2-Expression auf Genebene in den GR INS1-Zellen um 28%, 38% bzw. 42% im Vergleich zu den unbehandelten GR INS1-Zellen. Weniger deutlich änderte sich die relative Mfn2-Expression in den GUR INS1-Zellen in Bezug auf die unbehandelten GUR INS1-Zellen. Hier kam es zu einer Verminderung der Expression um 7%, 15% bzw. 19% bei den Konzentrationen von 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure im Vergleich zu den unbehandelten GUR INS1-Zellen. Es konnte somit in beiden Zelllinien eine konzentrationsabhängige Verminderung der Mfn2-Expression durch Palmitinsäure gezeigt werden.

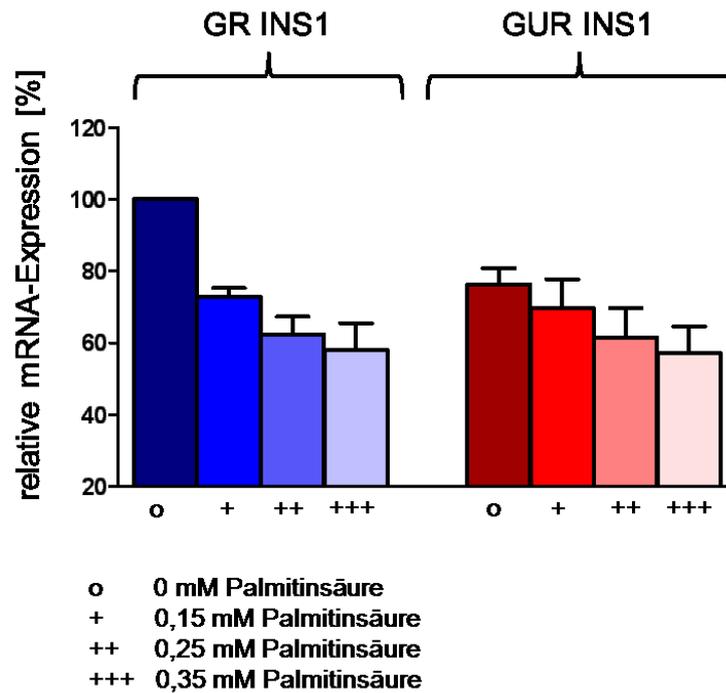


Abbildung 39: Vergleich der relativen mRNA-Expression von Mfn2 in INS1-Zellen: Dargestellt sind Werte \pm SEM; Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. Die Expression wurde auf das Referenzgen Hprt1 normalisiert. (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 6)

Diese konzentrationsabhängige Minderung der Mfn2-Expression nach Behandlung mit Palmitinsäure bestätigte sich ebenfalls auf Proteinebene (Abb. 40).

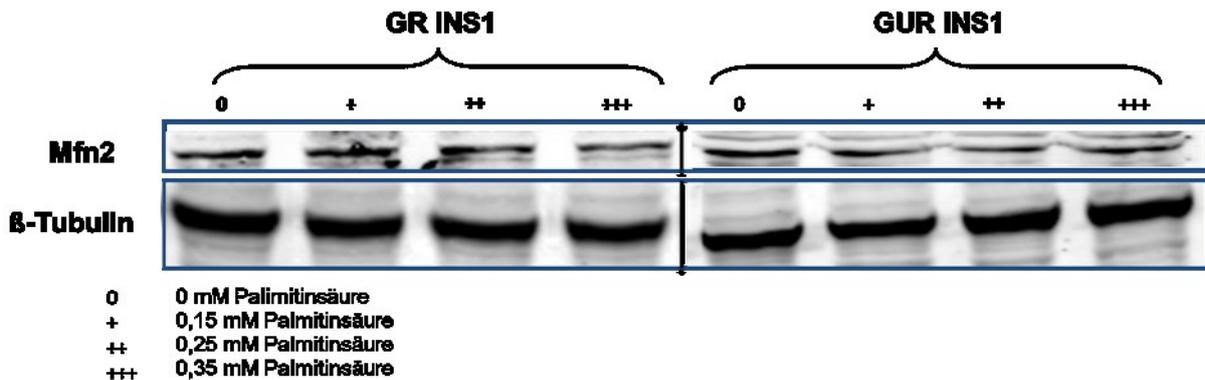


Abbildung 40: Western Blot von Mfn2 in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. Als Kontrolle wurde β -Tubulin verwendet. (n = 3)

Die durchgeführte Quantifizierung der Proteinexpression ergab eine signifikante Minderung der relativen Mfn2-Expression bei den GR INS1-Zellen von 16%, 43% bzw. 47% unter den Konzentrationen von 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure im Vergleich zu den unbehandelten GR INS1-Zellen (Abb. 41). In Bezug auf die unbehandelten GUR INS1-Zellen verminderte sich die Mfn2-Expression nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure um 6%, 11% und 18% und somit weniger deutlich als bei den GR INS1-Zellen.

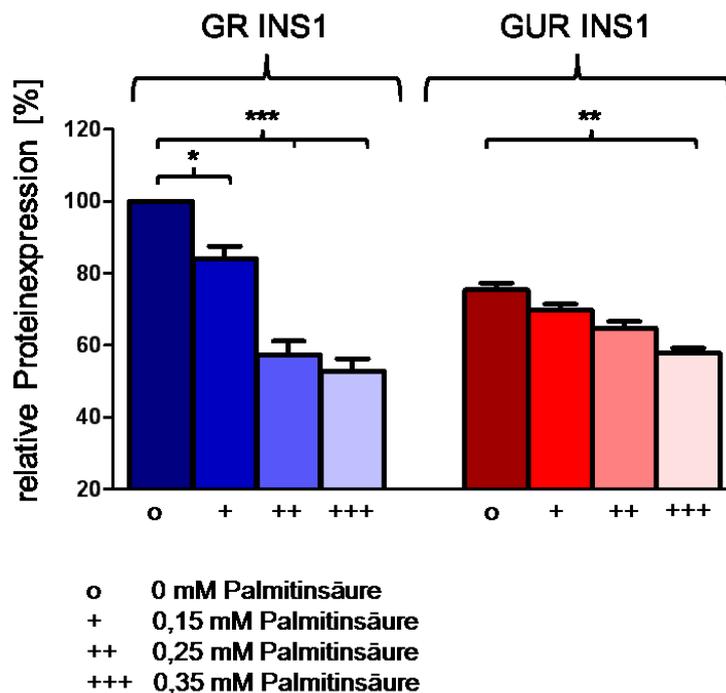


Abbildung 41: Vergleich der relativen Proteinexpression von Mfn2 in INS1-Zellen: Dargestellt sind Werte \pm SEM; Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. ***, $p < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3)

Die immunhistochemische Auswertung zeigte eine verminderte Mfn2-Expression in den GR und GUR INS1-Zellen nach Inkubation mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure im Vergleich zu den unbehandelten INS1-Zellen (Abb. 42). Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Bilder ergab eine deutlichere Abnahme der Mfn2-Expression nach Behandlung mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure bei den GR INS1-Zellen, mit signifikanter Minderung um 37%, als bei den GUR INS1-Zellen, mit 12% Minderung, jeweils im Vergleich zu den unbehandelten INS1-Zellen (Abb. 43).

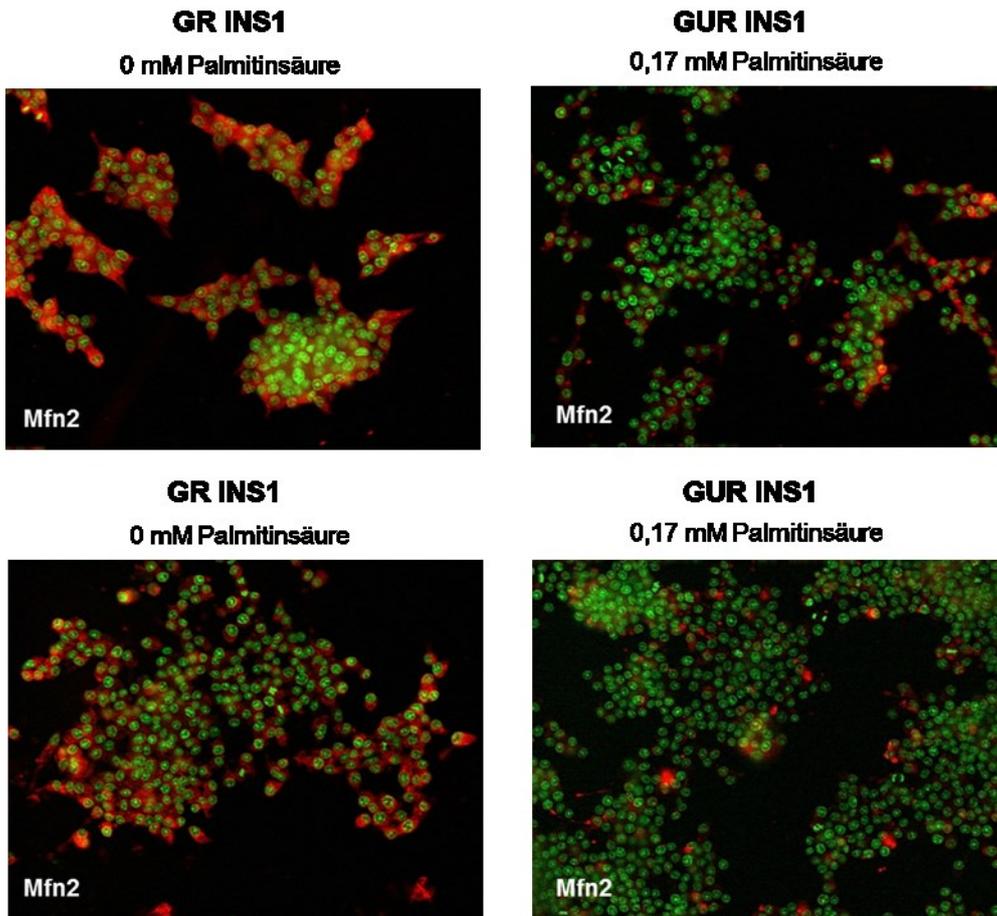


Abbildung 42: Immunhistochemische Darstellung der Mfn2-Expression in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. grün = DAPI-Färbung, rot = spezifische Mfn2-Färbung

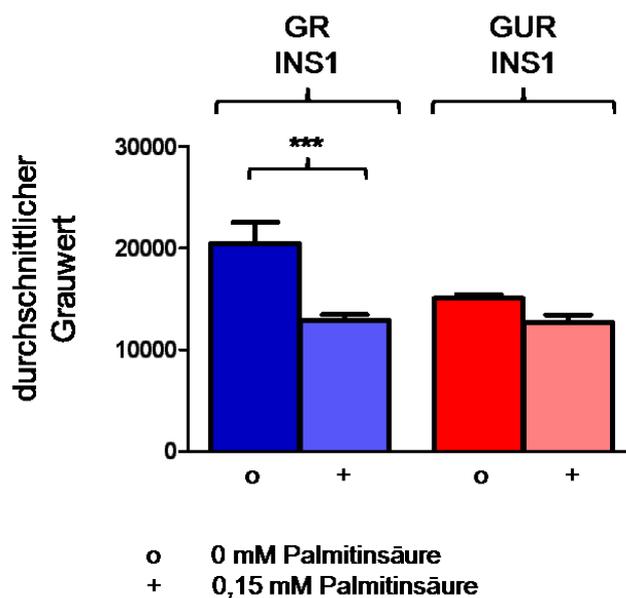


Abbildung 43: Immunhistochemische Quantifizierung der Mfn2-Expression in INS1-Zellen: Dargestellt sind Werte \pm SEM; Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. ***, $p < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3)

4.2.6 Immunhistochemische Detektion der Mitochondrien

Eine morphologische Veränderungen des mitochondrialen Netzwerkes in INS1-Zellen nach Inkubation mit Palmitinsäure erfolgte mittels MitoTracker Green (Abb. 44) (siehe 3.4.2). Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte, dass die GR INS1-Zellen ein verzweigtes tubuläres mitochondriale Netzwerk besitzen, das sich homogen über die gesamte Zelle verteilte. Die GUR INS1-Zellen dagegen wiesen stark elongierte Mitochondrien auf, die zum Teil Cluster bildeten. Nach Inkubation der INS1-Zellen mit Palmitinsäure veränderte sich die Struktur des Mitochondrienetzwerkes. Auffällig waren eine Elongation und Clusterung der Mitochondrien. Die Verteilung der Mitochondrien war inhomogen und in den Zellen konnten Areale ohne Mitochondrien detektiert werden. Morphologisch ließ sich diese Umstrukturierung des mitochondrialen Netzwerkes nach Palmitinsäure-Inkubation vor allem bei den GR INS1-Zellen feststellen. Die Quantifizierung der mitochondrialen Fläche mit Hilfe der Partikelanalyse Auto-Quant-Software, bestätigte diese Beobachtung (Abb.45). So zeigte sich bei den GR INS1-Zellen nach Palmitinsäure-Inkubation eine signifikante Umstrukturierung der Mitochondrien zu Clustern. Die GR INS1-Zellen erreichten damit quantitativ nahezu die Strukturierung der GUR INS1-Zellen. Die GUR INS1-Zellen wiesen bereits ohne Palmitinsäure eine stärkere inhomogene mitochondriale Verteilung in der Zelle auf.

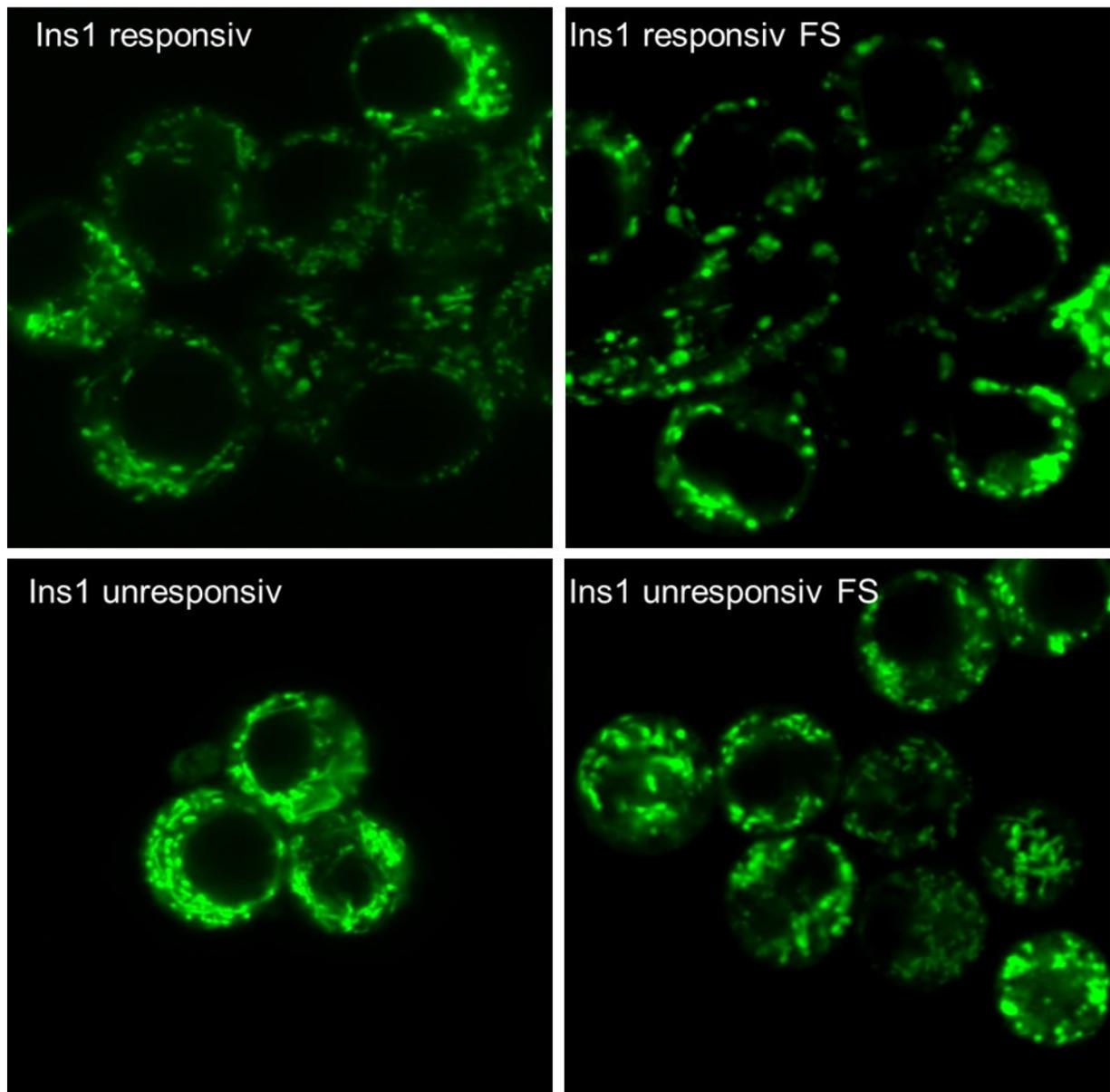


Abbildung 44: Darstellung des Mitochondrienetzwerkes durch MitoTracker Green in GR und GUR INS1-Zellen: Ohne und mit Palmitinsäure-Inkubation von 0,17mmol/l für 48 Stunden.

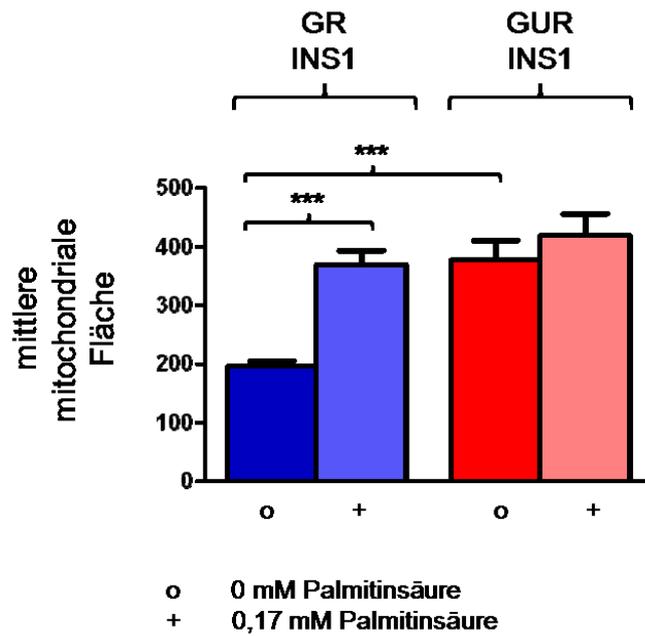


Abbildung 45: Quantifizierung der mittleren mitochondrialen Fläche in INS1-Zellen: Dargestellt sind Werte \pm SEM; mit Palmitinsäure-Inkubation von 0,17mmol/l für 48 Stunden. ***, $p < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3)

4.3 Untersuchungen zur glukosestimulierten Insulinsekretion

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses der mitochondrialen Dynamik auf die Sekretionsleistung wurde die ATP/ADP-Ratio und die glukosestimulierte Insulinsekretion in den Glukose-responsiven (GR) und Glukose-unresponsiven (GUR) INS1-Zellen bestimmt. Anschließend wurde der Effekt von Palmitinsäure auf diese funktionellen Stoffwechsellleistungen der INS1-Zellen untersucht.

4.3.1 Bestimmung der ATP/ADP-Ratio in INS1-Zellen

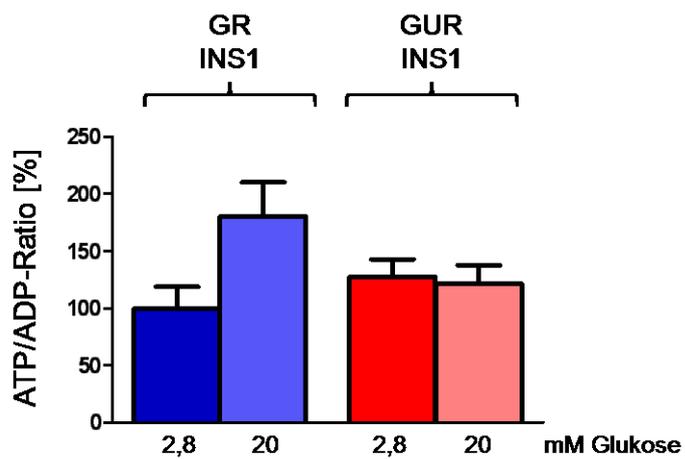
Von den für 2 Stunden mit 2,8 mmol/l und 20 mmol/l Glukose stimulierten INS1-Zellen wurden die ATP- und ADP-Konzentrationen gemessen. Daraus wurde dann die ATP/ADP-Ratio bestimmt (siehe 3.5.2). Zunächst erfolgte die Untersuchung der GR und GUR INS1-Zellen ohne Behandlung mit Palmitinsäure.

Bei den GR und GUR INS1-Zellen zeigte sich bei der basalen Glukose-Konzentration von 2,8 mmol/l Glukose eine etwa gleiche ATP/ADP-Ratio (Abb. 46 A). Auf einen Stimulus mit 20 mmol/l Glukose kam es in den GR INS1-Zellen zu einem Anstieg der ATP/ADP-Ratio von 100% auf 180%. Dagegen änderte sich die ATP/ADP-Ratio in den GUR INS1-Zellen bei einer Stimulation mit 20 mmol/l Glukose nicht.

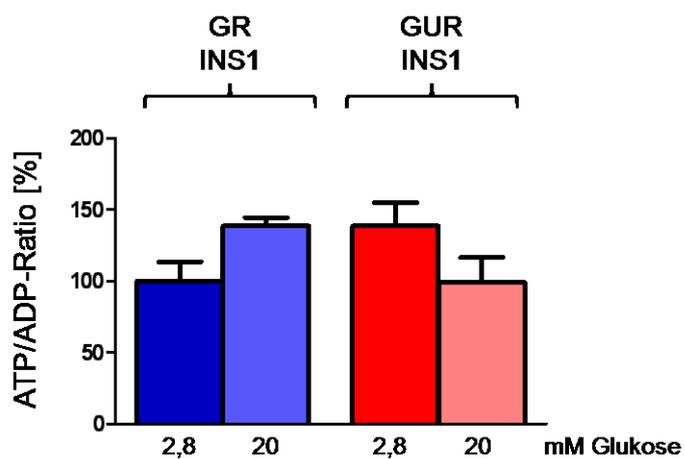
Des Weiteren wurde nach einer Inkubation für 48 Stunden mit 0,085 mmol/l Palmitinsäure die ATP/ADP-Ratio in den INS1-Zellen untersucht (Abb. 46 B). Bei den GR INS1-Zellen stieg die ATP/ADP-Ratio von 100% auf nur noch 139% nach einer Stimulation mit 20 mmol/l Glukose und zeigte demnach einen verminderten Anstieg der ATP/ADP-Ratio im Vergleich zu unbehandelten INS1-Zellen. Die ATP/ADP-Ratio der GUR INS1-Zellen verminderte sich sogar von 139% auf 100% nach Stimulation mit 20 mmol/l Glukose durch die Behandlung mit 0,085 mmol/l Palmitinsäure.

Eine deutlichere Änderung der ATP/ADP-Ratio zeigte sich nach einer Inkubation mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure über 48 Stunden (Abb. 46 C). Hier verminderte sich die ATP/ADP-Ratio in den GR INS1-Zellen von 100% auf 52% nach einer Stimulation mit 20 mmol/l Glukose. Ebenso verminderte sich nach Glukose-Stimulation die ATP/ADP-Ratio in den GUR INS1-Zellen nun von 92% auf 53%.

A



B



C

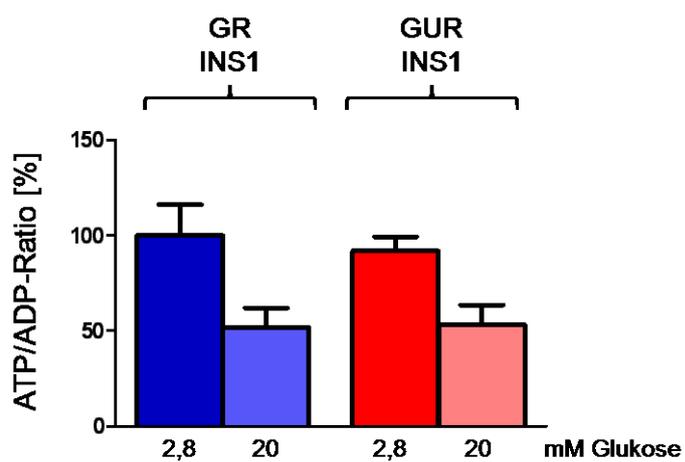


Abbildung 46: (A) ATP/ADP-Ratio ohne Palmitinsäure, (B) ATP/ADP-Ratio nach Inkubation mit 0,085 mmol/l Palmitinsäure, (C) ATP/ADP-Ratio nach Inkubation mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure: Dargestellt sind Werte \pm SEM; Nach einer Inkubation mit 2,8 mmol/l und 20 mmol/l Glukose. *, $p < 0,05$ (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3)

4.3.2 Bestimmung der Glukosestimulierten Insulinsekretion in INS1-Zellen

Die Glukosestimulierte Insulinsekretion wurde mit einem Insulin-ELISA untersucht (siehe 3.5.3). Nach einer 2 stündigen Inkubation mit 2,8 oder 20 mmol/l Glukose wurde die Insulinsekretion der INS1-Zellen gemessen. Die Insulinsekretion wurde auf den Insulingehalt und den Proteingehalt der Zellen bezogen. Die Versuche wurden ebenfalls mit 0,085 mmol/l und 0,17 mmol/l Palmitinsäure durchgeführt.

Die basale Insulinsekretion bei 2,8mmol/l Glukose waren bei den GR und GUR INS1-Zellen vergleichbar (Abb. 51). Eine Änderung der Sekretionsleistung von Insulin zeigte sich nur bei den GR INS1-Zellen mit einer signifikanten Erhöhung um 100% nach Stimulation mit 20 mmol/l Glukose. Die Insulinsekretion der GUR INS1-Zellen dagegen blieb gleich.

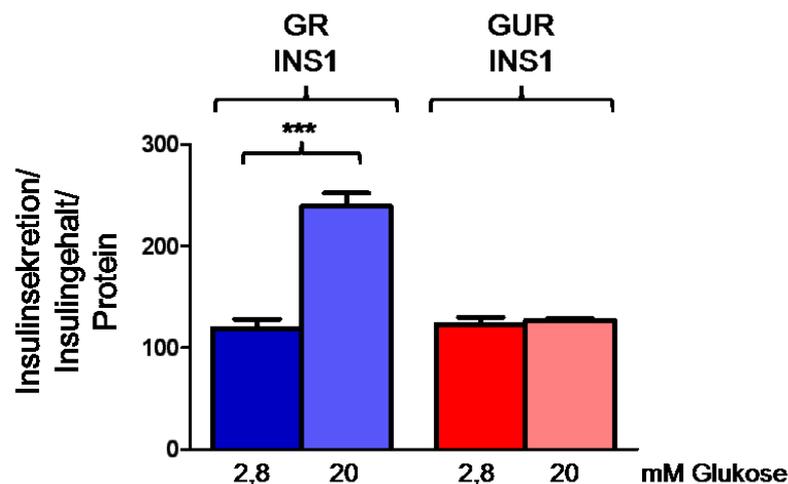


Abbildung 47: Insulinsekretion in INS1-Zellen: Dargestellt sind Werte \pm SEM; Nach einer Inkubation mit 2,8 mmol/l und 20 mmol/l Glukose. ***, $p < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 6)

Nach einer Inkubation mit 0,085 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden veränderte sich die Sekretionsleistung der INS1-Zellen gering (Abb. 52). Die basale Sekretionsleistung beider Zelllinien war vergleichbar mit der Insulinsekretion ohne Palmitinsäure-Inkubation. Nach einer Stimulation mit 20 mmol/l Glukose reagierten die GR INS1-Zellen mit einer geringeren Steigerung der Insulinsekretion von 50% im Vergleich zu den GR INS1-Zellen ohne Palmitinsäure. Die GUR INS1-Zellen zeigten eine leichte Verminderung ihrer Sekretionsleistung nach Stimulation mit 20 mmol/l Glukose um 15%.

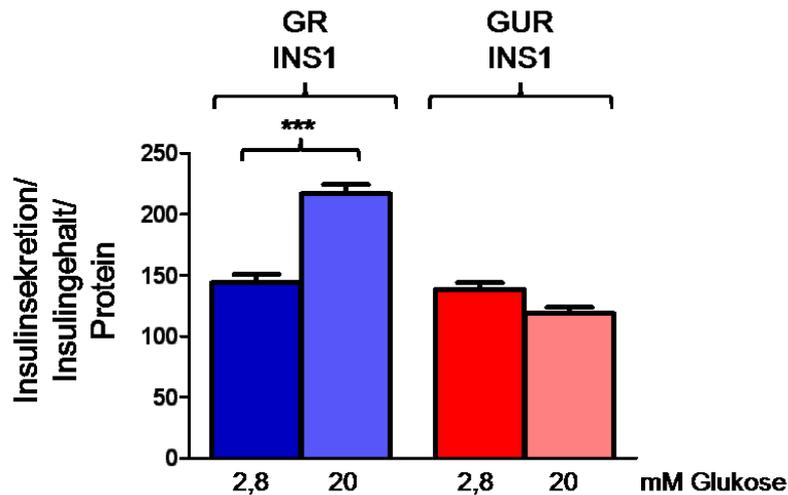


Abbildung 48: Insulinsekretion in INS1-Zellen nach Inkubation mit 0,085 mmol/l Palmitinsäure: Dargestellt sind Werte \pm SEM; Nach einer Inkubation mit 2,8 mmol/l und 20 mmol/l Glukose. ***, $p < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 6)

Eine deutlichere Veränderung der Insulinsekretion zeigte sich nach 48 Stunden Inkubation mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure (Abb. 53). Die basale Sekretionsrate war sowohl bei den GR als auch bei den GUR INS1-Zellen signifikant höher als nach Stimulation mit 20 mmol/l Glukose. Ebenfalls zeigte sich erstmals ein signifikanter Unterschied der basalen Sekretionsleistung der GR und GUR INS1-Zellen, wobei die GUR INS1-Zellen eine um 40% signifikant verminderte Sekretionsleistung im Vergleich zu den GR INS1-Zellen aufwies.

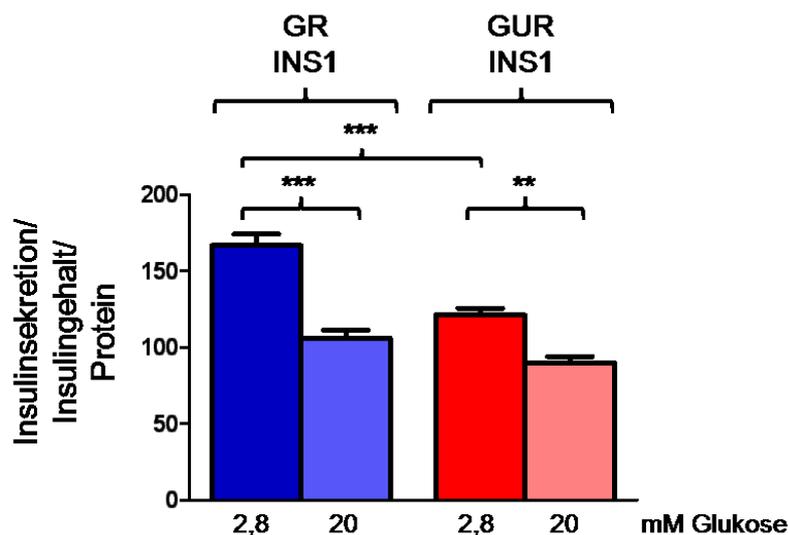


Abbildung 49: Insulinsekretion in INS1-Zellen nach Inkubation mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure: Dargestellt sind Werte \pm SEM; Nach einer Inkubation mit 2,8 mmol/l und 20 mmol/l Glukose. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 6)

Im Vergleich zu den GR INS1-Zellen ohne Behandlung mit Palmitinsäure war die basale Insulinsekretion nach Inkubation mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure signifikant um 29% erhöht (Abb. 54). Die Sekretionsleistung der GR INS1-Zellen verminderte sich nach Stimulation mit 20 mmol/l Glukose signifikant um 56% im Vergleich zu den stimulierten GR INS1-Zellen, die nicht mit Palmitinsäure behandelt wurden. Bei den GUR INS1-Zellen mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure veränderte sich die basale Insulinsekretion in Bezug auf die GUR INS1-Zellen ohne Palmitinsäure nicht. Dagegen verminderte sich die Insulinsekretion der GUR INS1-Zellen signifikant um 29% nach Stimulation mit 20 mmol/l Glukose im Vergleich zu den stimulierten GUR INS1-Zellen ohne Palmitinsäure.

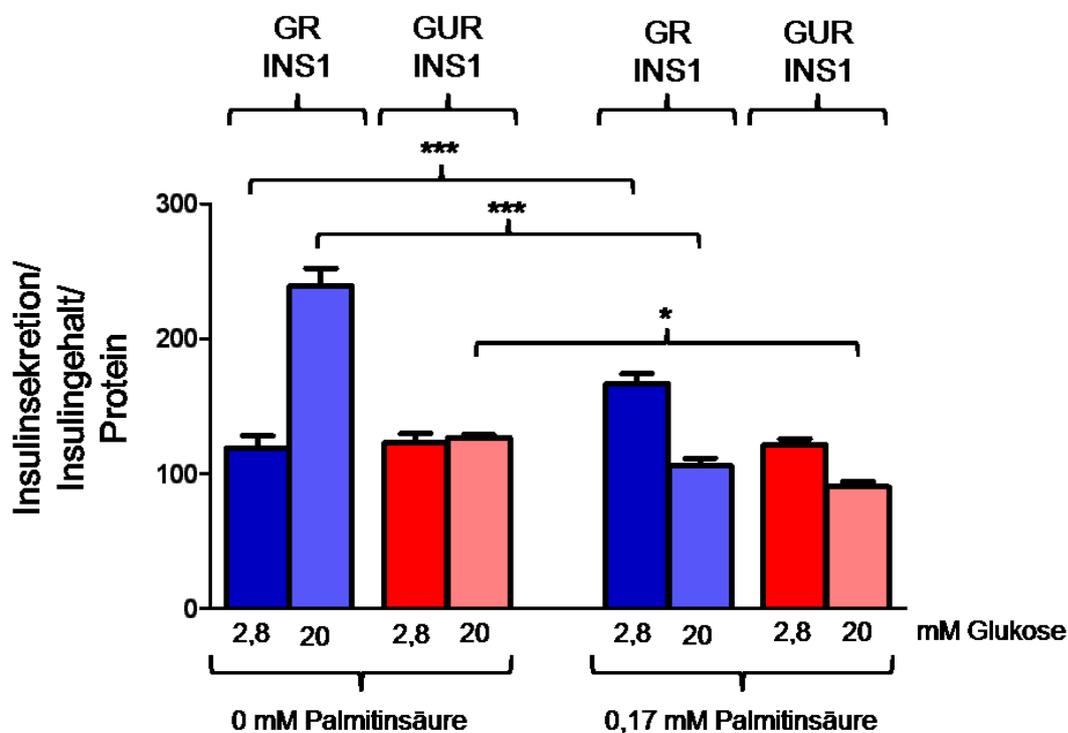


Abbildung 50: Insulinsekretion in INS1-Zellen ohne und mit Inkubation von 0,17 mmol/l Palmitinsäure: Dargestellt sind Werte \pm SEM; Nach einer Inkubation mit 2,8 mmol/l und 20 mmol/l Glukose. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 6)

6 Diskussion

Der Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) ist durch eine periphere Insulinresistenz und eine gestörte Insulinsekretion charakterisiert. Der Metabolismus der β -Zelle reguliert die Insulinsekretion in Abhängigkeit von der Glukose-Konzentration im Blut. Ein wesentliches Signal ist dabei die Erhöhung der zellulären ATP/ADP-Ratio, welche hauptsächlich durch die mitochondriale ATP-Produktion generiert wird. Kommt es zu einer gestörten mitochondrialen Funktion der Morphologie führt dies aufgrund der verminderten ATP-Produktion zu einer verminderten Sekretionsleistung der β -Zelle und begünstigt somit die Entstehung eines T2DM [37]. Es war Ziel dieser Arbeit, den Einfluss der mitochondrialen Dynamik auf die glukosestimulierte Insulinsekretion (GSIS) weiterführend zu analysieren. Dabei wurden insbesondere die für die Regulation der mitochondrialen Morphologie und Funktion verantwortlichen Fusions- und Teilungsproteine untersucht. Der Einfluss dieser Proteine auf die Glukoseresponsivität und das mitochondriale Netzwerk von β -Zellen wurde mit Hilfe des aus zwei Zelllinien bestehenden INS1- β -Zellmodells bestimmt. Die Glukose-responsiven (GR) INS1-Zellen reagieren auf eine Glukose-Stimulation mit einer adäquaten Insulinsekretion und stellen eine funktionsfähige β -Zelle dar. Dagegen bleibt diese Insulinsekretion nach Glukose-Stimulation bei den Glukose-unresponsiven (GUR) INS1-Zellen aus, wie es für den T2DM bekannt ist [145]. Der T2DM ist häufig mit Übergewicht und erhöhten Fettsäure-Konzentrationen im Blut vergesellschaftet. Die Dysregulation der Lipidhomöostase bewirkt neben der Insulinresistenz eine gestörte Insulinsekretion [149]. Daher war es ebenfalls Ziel dieser Arbeit den Einfluss von freien Fettsäuren auf die mitochondriale Dynamik in den GR und GUR INS1-Zellen zu untersuchen.

5.1 Expressionsanalyse der mitochondrialen Dynamik

Die kernkodierte, mitochondrialen Teilungs- und Fusionsgene Fis1, Drp1, OPA1, Mfn1 und Mfn2 bestimmen die Aktivität der mitochondrialen Dynamik. Eine Veränderung ihrer Proteinexpression und damit Störung der mitochondrialen Dynamik hat Einfluss auf die biochemische Integrität der Zelle und ist mit zahlreichen Erkrankungen, wie auch dem T2DM assoziiert [37,88,89]. Untersuchungen zu dem von uns gewähltem β -Zellmodell zeigten bereits in einer Studie von Malmgren et al. Unterschiede in der Expression der Gene für Enzyme des Glukosestoffwechsels sowie für mitochondriale Enzyme zwischen den GR und GUR INS1-Zellen [147].

In dieser Arbeit wurde erstmals die Expression der für die mitochondriale Dynamik verantwortlichen Proteine untersucht. Es konnte eine signifikant verminderte mRNA-Expression aller Teilungs- und Fusionsproteine in den GUR INS1-Zellen im Vergleich zu den GR INS1-Zellen festgestellt werden (siehe 4.1). Diese verminderte Expression der Teilungs- und Fusionsproteine in den GUR INS1-Zellen konnte auf Translationsebene im Western-Blot und in der Immunfluoreszenz bestätigt werden.

Es konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass eine veränderte Expression der Teilungs- und Fusionsproteine zu strukturellen Veränderungen und darüberhinaus zu einem Funktionsverlust der Mitochondrien führt [94,95].

So kommt es bei einem Verlust der Teilungsproteine Drp1 und Fis1 zu einer Elongation von Mitochondrien [97,115], sowie zur Elongation von Peroxisomen [112]. Des Weiteren führt eine Repression von Fis1 zu einer verminderten Zellproliferation und die Zellen wiesen Alterungs-assoziierte phänotypische Veränderungen auf [115,152]. Die für die Zelle essentielle Eliminierung von defekten Mitochondrien durch Autophagie wird ebenfalls durch eine verminderte Fis1-Expression reduziert [101].

Die Arbeitsgruppe um Parone et. al. konnte zeigen, dass eine verminderte Drp1-Expression zu einem Verlust der mitochondrialen DNA, einer verminderten mitochondrialen Respiration und einer vermehrten ROS-Produktion führt [96]. Des Weiteren wurde eine dysorganisierte Struktur der mitochondrialen Innenmembran ermittelt [130,131] und das Membranpotential war vermindert [155].

Eine Repression des Fusionsproteins Mfn1 bewirkte eine Anreicherung der fragmentierten Mitochondrien in der Zellperipherie [72]. Eine andere Studie belegt, dass eine veränderte Expression von Mfn2 ebenfalls zur perinukleären Clusterung der Mitochondrien führt und ein Ausdruck der dysregulierten Mobilität darstellt [76]. Mfn2 kontrolliert ebenfalls die Morphologie des Endoplasmatischen Retikulums und dessen Anbindung an die Mitochondrien [153].

Es konnte bereits in unterschiedlichen Studien gezeigt werden, dass eine Repression des Fusionsproteins OPA1 zu einer veränderten Cristae-Struktur, einem vermindertem Zellwachstum, sowie über eine Regulation der Cytochrom c-Abgabe zur Apoptose der Zellen führt [82,115,119,131,136]. Bei einer Störung des mitochondrialen Membranpotentials kommt es zur Degradation von OPA1 [141] und führt somit zur Hemmung der Fusion. Dadurch kann das mitochondriale Membranpotential nicht wieder hergestellt werden und es kommt zur Autophagie [101].

Es lässt sich daher zusammenfassen, dass eine verminderte Expression der mitochondrialen Teilungs- und Fusionsproteine zu einer Einschränkung im mitochondrialen Vitalitätszyklus führt und die Mitochondrien vermehrt altern, da die geschädigten Mitochondrienbestandteile nicht durch kontinuierliche Fusion und Teilung eliminiert werden können [108,125].

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass GUR INS1-Zellen, die durch eine gestörte GSIS gekennzeichnet sind, eine im Vergleich zu den GR-INS1-Zellen verminderte Expression der mitochondrialen Teilungs- und Fusionsproteine aufweisen. Dieser Expressionsunterschied könnte somit wesentlich zur Dysfunktion der GUR INS1 Zellen beitragen.

Eine zusätzliche vermehrte Bildung von oxidativem Stress wie z.B. durch Exposition mit freien Fettsäuren begünstigt die Schädigung der Mitochondrien. Daher wurde weiterführend der Einfluss von Palmitinsäure auf die mitochondriale Dynamik in beiden INS1-Zelllinien untersucht (siehe 4.2). Es zeigte sich, dass nach Inkubation mit Palmitinsäure die Teilungs- und Fusionsproteine sowohl bei den GR, als auch bei den GUR INS1-Zellen vermindert exprimiert waren. Dabei zeigten die GR INS1-Zellen eine stärkere Expressionsreduktion der Proteine. Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l Palmitinsäure für 24h war die Expression aller Teilungs- und Fusionsproteine deutlich vermindert. Die Expressionsreduktion des Teilungsproteins Fis1 war hierbei am stärksten. Die Erhöhung der Palmitinsäurekonzentration führte nur minimal zu einer weiteren Erniedrigung des Expressionsniveaus in den GR INS1-Zellen. Somit konnte gezeigt werden, dass Palmitinsäure in einer Konzentration die noch keine zytotoxischen Effekte hervorruft, die Expression der Fusions- und Teilungsproteine vermindert. In den GUR INS1-Zellen dagegen verminderte sich die Expression der Fusions- und Teilungsproteine nach 0,15 mmol/l Palmitinsäure-Inkubation nur geringfügig. Erst nach Inkubation mit 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure zeigte sich eine deutliche Verminderung der Expression.

Interessanterweise führte die Inkubation mit Palmitinsäure für 48h zu einer Repression der Fusions- und Teilungsproteine der GR INS1-Zellen auf das Expressionsniveau der GUR INS1-Zellen.

Eine dauerhafte Erhöhung von gesättigten Fettsäuren könnte somit eine gestörte mitochondriale Dynamik verursachen, die sich auf die mitochondriale Funktion und die GSIS in den β -Zellen auswirkt.

5.2 Strukturelle Veränderungen des mitochondrialen Netzwerkes

Die Arbeitsgruppe um Yoon et al. zeigte, dass eine Störung der Fusions- und Teilungsprozesse zu morphologischen Veränderungen der Mitochondrien führt [151]. Durch fluoreszenzmikroskopische Detektion der mit MitoTracker Green markierten Mitochondrien wurde in dieser Studie das mitochondriale Netzwerk in lebenden INS1-Zellen beurteilt (siehe 4.2.6). Dabei zeigten die GR INS1-Zellen ein verzweigtes Mitochondrien-Netzwerk, das sich homogen über die gesamte Zelle verteilte. In den GUR INS1-Zellen wurde dagegen ein inhomogenes mitochondriales Netzwerk mit elongierten Mitochondrien detektiert, die in den Zellen teilweise Cluster bildeten. Nach Inkubation der GR INS1-Zellen mit Palmitinsäure veränderte sich die Mitochondrienstruktur und Verteilung. Im Vordergrund standen Elongation und Clusterung der Mitochondrien. Auffällig war zudem die inhomogene Verteilung der Mitochondrien in den Zellen. Zusammenfassend zeigte sich bei den GR INS1-Zellen nach Palmitinsäure-Inkubation nahezu die Strukturierung des mitochondrialen Netzwerkes der GUR INS1-Zellen. Die GUR INS1-Zellen wiesen bereits ohne Palmitinsäure eine stärkere inhomogene mitochondriale Verteilung in den Zellen auf. Nach Palmitinsäure-Inkubation verstärkte sich diese mitochondriale Clusterung nur geringfügig. Diese Strukturveränderungen konnten mittels einer Partikelanalyse quantifiziert werden. Dabei wurden Mitochondrien und mitochondriale Cluster als Partikel erfaßt und automatisch die Fläche bestimmt. Eine zunehmende Clusterung der Mitochondrien stellt sich somit in einer erhöhten mittleren mitochondrialen Fläche dar. Diese mittlere mitochondriale Fläche war in den GUR INS1-Zellen signifikant höher als in den GR INS1-Zellen. Interessant ist zudem, dass die Inkubation mit Palmitinsäure in einer Konzentration, die keinen Einfluß auf die GUR INS1-Zellen hat, in den GR INS1-Zellen korrelierend das Expressionsniveau der Fusions- und Teilungsproteine und die Mitochondrienstruktur auf das Niveau der GUR INS1-Zellen reduzierte. Somit konnte gezeigt werden, dass das unterschiedliche Expressionsniveau der Fusions- und Teilungsproteine der GUR INS-Zellen im Vergleich zu den GR INS1-Zellen zu einer Veränderung der Mitochondrienstruktur führt.

Die Mitochondrien in β -Zellen von gesunden Individuen sind durch ein dynamisches Netzwerk durch eine Balance der Teilungs- und Fusionsprozesse gekennzeichnet [154]. Dagegen zeigten diabetische Ratten ein dysintegriertes mitochondriales Netzwerk in pankreatischen β -Zellen [151]. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit weiterführend bestätigt werden.

5.3 Einfluss der mitochondrialen Dynamik auf die glukoseinduzierte Insulinsekretion

Es ist bereits bekannt, dass die GR INS1-Zellen auf eine Stimulation mit Glukose mit einer gesteigerten Insulinsekretion reagieren, wobei diese Reaktion in den GUR INS1-Zellen ausbleibt [145]. Die GUR INS1-Zellen zeigen eine veränderte Expression von Enzymen des Glukosestoffwechsels und weisen somit eine für β -Zellen untypische vermehrte Laktat-Produktion auf. Auf eine Glukose-Stimulation erfolgt keine vermehrte ATP-Produktion und die Atmungskettenaktivität wird nicht gesteigert [147]. Die GUR INS1-Zellen weisen eine geringere Aktivität in den Atmungskettenkomplexen 1, 3 und 4 auf und generieren somit weniger ATP als GR INS1-Zellen [147], was die fehlende Responsivität auf Glukose nicht erklären kann. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die GUR INS1-Zellen eine verminderte cAMP-abhängige Proteinkinase A-Aktivität besitzen [147]. Es besteht allerdings kein Unterschied im Insulingehalt beider Zelllinien [145]. Ebenfalls ist die Expression der Ca^{2+} -Kanäle gleich und damit nicht für die diskrepante Insulinsekretion verantwortlich [150].

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass GR und GUR INS1-Zellen bei einer basalen Glukose-Konzentration eine vergleichbare ATP/ADP-Ratio und Insulinsekretion aufweisen (siehe 4.3). Auf einen Glukose-Stimulus reagierten die GR INS1-Zellen mit einem Anstieg der ATP/ADP-Ratio und einer Steigerung ihrer Insulinsekretion. Bei den GUR INS1-Zellen dagegen blieben die ATP/ADP-Ratio und die Insulinsekretion auf dem basalen Niveau. Damit konnten die Ergebnisse vorangegangener Studien bestätigt werden [158,159]. Für den Verlust der GSIS in den GUR INS1-Zellen als auch in den GR INS1-Zellen nach Palmitinsäureinkubation könnte die deutlich verminderte Fis1-Expression verantwortlich sein. Sowohl eine Repression als auch eine Überexpression von Fis1 beeinflusst den mitochondrialen Metabolismus und folgend die Insulinsekretion [101,154]. Es kommt zu einer reduzierten oxidativen Phosphorylierung und somit zur Reduzierung des zellulären ATP-Gehalts und einer verminderten GSIS [72,101]. Die Arbeitsgruppe um Twig et al. konnte bereits zeigen, dass eine Repression des mitochondrialen Teilungsproteins Drp1 des weiteren zur verminderten ATP-Produktion und respiratorischen Aktivität führt [101]. Unterstützt werden diese Daten durch Parone et al., die zeigen konnten, dass eine verminderte Expression von Drp1 zu einer mitochondrialen Dysfunktion und vermehrten ROS-Produktion führt, welche weiterführend eine Hemmung der Zellproliferation und Autophagie bewirkt [96]. Mehrere Studien weisen demnach darauf hin, dass eine Hemmung der Teilung zu einer

verminderten Autophagie und damit zur Akkumulation von oxidierten mitochondrialen Proteinen, einer verminderten Respiration und einer gestörten GSIS führt. In der vorliegenden Arbeit konnte dies weiterführend bestätigt werden. GUR INS1-Zellen, die Fis1 und Drp1 vermindert exprimierten, zeigten eine Clusterung der Mitochondrien und einen Verlust des glukoseinduzierten Anstiegs der ATP/ADP-Ratio sowie der GSIS.

Eine Reduktion der Expression der Fusionsproteine OPA1, Mfn1 und Mfn2 wurde aber ebenfalls in den GUR INS1-Zellen detektiert und könnte auch zu den metabolischen Veränderungen führen [76]. Es wurde bereits beschrieben, dass die Repression der mitochondrialen Fusionsproteine zu einer Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials führt [82,131]. Des Weiteren verminderte sich die respiratorische Kapazität und der Sauerstoff-Verbrauch [73,82,94]. Es wird diskutiert, ob die gestörte mitochondriale Energieproduktion vor allem auf Änderungen in der Expression von Mfn2 zurückzuführen ist. Es ist bereits bekannt, dass eine Störung der Mfn2-Expression mit proliferativen vaskulären Erkrankungen und dem T2DM assoziiert ist [76].

Palmitinsäure ist die häufigste gesättigte Fettsäure im menschlichen Blut [43]. Eine kurzzeitige Erhöhung von freien Fettsäuren amplifiziert die GSIS [28,36]. Eine prolongierte Exposition mit Fettsäuren über 24 bis 48 Stunden dagegen führt zu einer gestörten β -Zell-Funktion [39,54,157]. Dabei wird die basale Insulinsekretion erhöht und die relative Antwort auf eine Glukose-Stimulation vermindert [158,159]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit für die GR INS1-Zellen gezeigt werden. Nach Inkubation mit 0,085 mmol/l Palmitinsäure kam es bereits zu einer erhöhten basalen Insulinsekretion. Nach Inkubation mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure zeigte sich zudem eine signifikante Reduktion der GSIS. In den GUR INS1-Zellen fiel die GSIS nach Inkubation mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure unter das Niveau der basalen Insulinsekretion ab.

5.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Verminderung der Expression der Teilungs- und Fusionsproteine ursächlich für den Verlust der GSIS in INS1 β -Zellen sein könnte.

Für die Arbeit wurde ein β -Zellmodell verwendet, da die Isolierung von primären Inseln aus dem Pankreas aufwendig ist und nur wenig Material zur Verfügung steht. Das INS1 β -Zellmodell kommt den primären β -Zellen sehr nah, da sich die Insulinsekretion nahezu im physiologischen Bereich befindet. Der Insulingehalt von INS1-Zellen entspricht zudem annähernd dem primärer β -Zellen [146]. Insbesondere interessant an dem INS1 β -Zellmodell ist der direkte Vergleich zwischen den GR und GUR INS1-Zellen. Der Verlust der GSIS nimmt eine wesentliche Stellung in der Pathogenese des T2DM ein. So sind die konkreten Pathomechanismen, die zu einer gestörten GSIS führen noch nicht hinreichend geklärt. Ebenfalls ist der Einfluss durch erhöhte Konzentrationen von freien Fettsäuren in diesem Prozess noch weitgehend unklar. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Palmitinsäure korrelierend zu einer Störung der mitochondrialen Dynamik und der GSIS führt. Da ein Einfluss auf alle Fusions- und Teilungsproteine festgestellt werden konnte, gilt es weiterführend zu klären, welchem dieser Proteine möglicherweise eine Schlüsselfunktion zukommt. Dies könnte mittels spezifischer Down-Regulation der einzelnen Proteine in den GR INS1-Zellen und nachfolgend in primären β -Zellen erfolgen.

In der vorliegenden Studie wurde ausschließlich der Einfluß der im Blut am häufigsten vorkommenden gesättigten Fettsäure Palmitinsäure untersucht. Gesättigten Fettsäuren werden schädliche Wirkungen und ungesättigten Fettsäuren protektive Funktionen zugesprochen [42,43]. Es wäre weiterführend interessant zu untersuchen inwiefern eine Exposition mit ungesättigten Fettsäuren einen Einfluss auf die mitochondriale Dynamik aufweist bzw. die Wirkung der gesättigten Palmitinsäure moduliert.

In dieser Arbeit konnte eine Korrelation zwischen einer veränderten mitochondrialen Dynamik und einer gestörten β -Zellfunktion im Vergleich zwischen den GR und GUR INS1-Zellen dargestellt werden. Die Regulation der mitochondrialen Dynamik ist mit den untersuchten Proteinen allerdings nach wie vor in Mammalia nicht hinreichend geklärt. So gibt es zum Beispiel in Hefen neben Fis1, Drp1, Opa1, Mfn1 und Mfn2 weitere Proteine, die für die Regulation der Dynamik essentiell sind, zu denen aber bisher keine Orthologe in Mammalia gefunden werden konnten. [156,167,168]. Deswegen werden Proteine in Mammalia diskutiert, die insbesondere auch modulierend auf die mitochondriale Funktion wirken könnten. Bei der Teilung der mitochondrialen Außenmembran in Mammalia könnten

ebenfalls Endophilin B1 [169] und GDAP 1 (Ganglioside-induced differentiation activated protein 1) beteiligt sein [171]. Für die Teilung der mitochondrialen Innenmembran wird über MTP18 (Mitochondrial protein 18 kDa) diskutiert [173]. Bei der mitochondrialen Fusion könnte das mitoPLD (mitochondrial phospholipase D) wesentlich sein [173]. Weiterhin wurde im Zytosol der Rattenleber das Mitofusinbinding Protein (Mib) entdeckt, dass möglicherweise über eine Beeinflussung von Mfn1 und eventuell Mfn2 die mitochondriale Morphologie und dessen Fragmentierung kontrolliert [176]. Ob diese Proteine allerdings eine wichtige Funktion in der mitochondrialen Dynamik von β -Zellen haben, ist nicht geklärt. Weitere Proteine, die an der mitochondrialen Dynamik beteiligt sein könnten sind MULAN (mitochondrial ubiquitin ligase activator of NF κ B), Miro (mitochondrial-Rho-GTPase) [166] und Mff (mitochondrial fission factor) [174]. Eine Untersuchung in dem in dieser Arbeit verwendeten INS1-Zellmodell scheint von Interesse.

Wenn die genaue Regulation der mitochondrialen Dynamik und dessen Einfluss auf die Funktion der β -Zellen hinreichend bekannt ist, könnten diese Proteine zukunftsorientiert Angriffspunkt einer gezielten pharmakologischen Therapie sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Expression von Mfn2 in Muskelzellen durch β_3 -adrenerge Agonisten gesteigert werden konnte [76]. MARCH-V (mitochondrial ubiquitin-ligase membrane associated ring CH) ubiquitiniert und kontrolliert Drp1 und könnte somit ein Angriffspunkt in der Regulation der mitochondrialen Dynamik auf Teilungsebene sein [175]. Ein weiteres Therapiekonzept wäre die Protektion vor einer Lipotoxizitäts-induzierten mitochondrialen Dysfunktion in der β -Zelle. Diese Wirkung besitzt z.B. Topimarat [180]. Eine weitere Option wäre die pharmakologische Hemmung des Fettsäure-Transporter (FABP4) [179]. Eine Reduktion der freien Fettsäuren durch Acipimox verbessert die Insulinresistenz und GSIS bei Patienten mit einem erhöhten Risiko für T2DM [170]. Die Verminderung der Aufnahme von Fettsäuren in die Zelle und eine Hemmung der β -Oxidation kann durch Etomoxir bewirkt werden [177]. Darüberhinaus verbessern PPAR (Peroxisome proliferator-activated rezeptor) die mitochondriale Biogenese, Funktion und Morphologie [178].

Die Ergebnisse dieser Studie korrelieren mit den aktuellen klinischen Therapieempfehlungen bei der Behandlung des T2DM, die eine Fettmodifikation und Reduktion der gesättigten Fettsäuren empfiehlt. Das Sekretionsdefizit der β -Zelle wird nach wie vor in der Therapie des T2DM oft vernachlässigt und zu spät behandelt. Durch weiterführende Untersuchungen der Korrelation zwischen einer veränderten mitochondrialen Dynamik und der Funktion der β -Zellen könnte dies zu einem besseren Verständnis der pankreatischen β -Zellphysiologie und der Pathogenese des T2DM beitragen.

7 Zusammenfassung

Der Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) ist eine komplexe Regulationsstörung des Stoffwechsels, die durch eine periphere Insulinresistenz und eine gestörte Insulinsekretion gekennzeichnet ist. Ein weiteres Charakteristikum des Typ 2 Diabetes mellitus ist eine Assoziation mit Übergewicht und erhöhten Fettsäure-Konzentrationen im Blut. Eine Dysregulation der Lipidhomöostase bewirkt neben der Insulinresistenz ebenfalls eine gestörte Insulinsekretion. Für die Aufrechterhaltung der Blutglukosehomöostase ist eine regulierte Insulinfreisetzung essentiell. Als Ursache einer gestörten Insulinsekretion wird zunehmend über eine mitochondriale Dysfunktion in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas diskutiert.

Mitochondrien bilden ein dynamisches Netzwerk in den Zellen, für dessen Aufrechterhaltung koordinierte Fusions- und Teilungsprozesse der Mitochondrien nötig sind. Die kernkodierte mitochondrialen Teilungs- und Fusionsgene Fis1, Drp1, OPA1, Mfn1 und Mfn2 bestimmen die Aktivität dieser mitochondrialen Dynamik. Eine Veränderung der Expression dieser Proteine führt zu einer Störung der mitochondrialen Dynamik und hat damit Einfluss auf die biochemische Integrität der Zelle und steht in einer Assoziation mit zahlreichen Erkrankungen, wie auch dem Typ 2 Diabetes mellitus.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Expression der mitochondrialen Fusions- und Teilungsproteine unter physiologischen Bedingungen und nach erhöhten Palmitinsäure-Konzentrationen anhand eines β -Zellmodells mit Glukose-responsiven (GR) und Glukose-unresponsiven (GUR) INS1-Zellen zu untersuchen. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression der Fusions- und Teilungsproteine in den GUR INS1-Zellen bereits im Vergleich zu den GR INS1-Zellen vermindert war. Nach Inkubation mit Palmitinsäure konnte eine Repression der Fusions- und Teilungsproteine insbesondere in den GR INS1-Zellen gezeigt werden, dessen Expressionsniveau sich auf das der GUR INS1-Zellen verminderte. Die verminderte Protein-Expression resultierte in einer gestörten mitochondrialen Dynamik. Das homogene mitochondriale Netzwerk ging in den GR INS1-Zellen verloren. Die Quantifizierung der mittleren mitochondrialen Fläche zeigte, dass diese nach Palmitinsäureinkubation in den GR INS1-Zellen auf das Niveau der GUR INS1-Zellen erhöht war. Dies entspricht einer erhöhten Bildung von Mitochondrienclustern.

Es konnte somit gezeigt werden, dass der Verlust der GSIS in den GUR INS1-Zellen mit einer reduzierten Expression von Proteinen korreliert, die für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Dynamik essentiell sind. Eine verstärkte mitochondriale Alterung und der

damit einhergehende mitochondriale Funktionsverlust sind somit eine Erklärung für das Ausbleiben des Anstiegs der ATP/ADP-Ratio auf den Stimulus Glukose in den GUR INS1-Zellen im Vergleich zu den GR INS1-Zellen.

Dieser Pathomechanismus könnte im T2DM eine wesentliche Rolle spielen. Eine Erhöhung an freien Fettsäuren wie der gesättigten Palmitinsäure wird als Trigger für die Manifestation einer gestörten Insulinsekretion diskutiert. Die Inkubation mit Palmitinsäure führte in den GR INS1-Zellen zu eine den GUR INS1-Zellen vergleichbaren mitochondrialen Dysfunktion. Somit konnte nicht nur bestätigt werden das eine veränderte mitochondriale Dynamik die Manifestation des T2DM begünstigen könnte, sondern ein zugrunde liegender Regulationsmechanismus aufgezeigt werden, den es weiterführend zu klären gilt.

8 Thesen

1 Der Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) ist eine komplexe Regulationsstörung des Stoffwechsels und durch eine periphere Insulinresistenz und eine gestörte Insulinsekretion der β -Zellen des Pankreas gekennzeichnet.

2 Adipositas ist ein wesentlicher Risikofaktor des T2DM und geht mit einer dauerhaften Erhöhung der freien Fettsäurekonzentration einher.

3 Es ist bekannt, dass ein kurzzeitiger Anstieg an freien Fettsäuren die glukosestimulierte Insulinsekretion (GSIS) der β -Zellen verstärkt. Eine chronisch erhöhte freie Fettsäurekonzentration führt dagegen zum Verlust der GSIS.

4 Das Hauptsignal für die GSIS ist eine Erhöhung der ATP/ADP-Ratio in den β -Zellen, zu der die mitochondriale ATP-Produktion wesentlich beiträgt. Liegt eine mitochondriale Funktionsstörung in den β -Zellen vor, ist somit die GSIS beeinträchtigt.

5 Mitochondrien bilden in der Zelle ein dynamisches Netzwerk, für dessen Aufrechterhaltung koordinierte Fusions- und Teilungsprozesse notwendig sind. Die kernkodierte mitochondrialen Teilungsproteine Fis1 und Drp1 sowie die Fusionsproteine OPA1, Mfn1 und Mfn2 bestimmen wesentlich die Aktivität der mitochondrialen Dynamik. Diese ist wiederum für die mitochondriale Funktion essentiell.

6 Eine Veränderung der mitochondrialen Dynamik hat Einfluss auf die biochemische Integrität der β -Zelle und wird aktuell als möglicher Pathomechanismus für die Manifestation eines T2DM diskutiert.

7 Ziel dieser Arbeit war es daher, die Expression der mitochondrialen Fusions- und Teilungsproteine und die Morphologie des mitochondrialen Netzwerkes in Glukose-responsiven (GR) und Glukose-unresponsiven (GUR) INS1 β -Zellen zu untersuchen.

8 Sowohl die Gen- als auch die Proteinexpression der Fusions- und Teilungsproteine war in den GUR INS1-Zellen im Vergleich zu den GR INS1-Zellen signifikant vermindert. Dadurch ist die Frequenz von mitochondrialen Fusions- und Teilungsprozessen in den GUR INS1-Zellen herabgesetzt.

9 Die GUR INS1-Zellen zeigten im Vergleich zu den GR INS1-Zellen ein inhomogenes mitochondriales Netzwerk. Areale ohne Mitochondrien sowie Mitochondriencluster waren in den GUR INS1-Zellen sichtbar. Somit kann von einer Anreicherung an gealterten Mitochondrien ausgegangen werden, die aufgrund der reduzierten mitochondrialen Dynamik nicht eliminiert oder umstrukturiert werden.

10 Somit konnte durch den Vergleich der GUR INS1-Zellen mit den GR INS1-Zellen gezeigt werden, dass eine Dysfunktion innerhalb der mitochondrialen Dynamik mit dem Verlust der GSIS korreliert.

11 Weiterführend wurde der Einfluss einer chronischen Fettsäureinkubation auf die GUR INS1-Zellen und die GR INS1-Zellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen für 48 Stunden mit verschiedenen Palmitinsäure-Konzentrationen inkubiert.

12 Während die GUR INS1-Zellen nach einer Inkubation mit 0,15 mmol/l Palmitinsäure kaum Veränderungen zeigten, war in den GR INS1-Zellen die Expression der Fusions- und Teilungsproteine auf das Niveau der GUR INS1-Zellen reduziert. Zudem war eine mitochondriale Netzwerkstruktur vergleichbar zu dem der GUR INS1-Zellen sichtbar.

13 Diese Befunde korrelierten mit einem Verlust des glucoseinduzierten Anstiegs der ATP/ADP-Ratio und der GSIS. Somit konnte gezeigt werden, dass chronisch erhöhte Fettsäurekonzentrationen über eine Störung der mitochondrialen Dynamik zum Verlust der Glucoseresponsivität in β -Zellen beitragen.

14 Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Störungen der mitochondrialen Dynamik zur Manifestation eines T2DM beitragen und chronisch erhöhte Fettsäurekonzentrationen einen möglichen Trigger dieses Prozesses darstellen.

Abkürzungsverzeichnis

AA/Bis AA	Acrylamid/Bisacrylamid
ACC1	Acetyl-CoA-Carboxylase 1
ACS	Acyl-CoA-Synthetase
ADP	Adenosindiphosphat
AMPK	AMP-Kinase
AP	Alkaline Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
CBBG	Coomassie-Brillant-Blau G-250
CPT1	Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1
CoA	Coenym A
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C _t	Cycle of Threshold
Cy5	Indodicarbocyanin
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA, cDNA, mtDNA	Desoxyribonukleinsäure, komplementäre -, mitochondriale DNA
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Drp1	Dynamamin-related Protein 1
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure

ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
ER	Endoplasmatischen Retikulum
FABP	Fettsäure-binding-protein
FAS	Fettsäure-Synthase
FCS	fetales Kalberserum
Fis1	mitochondrial-fission Protein 1
FFA	freie Fettsäuren
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLP-1R	Glukagon-like peptide-1 Rezeptor
GLUT-2	Glukosetransporter Typ 2
GPAT	Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase
GPR40	G-Protein gekoppelten Rezeptor 40
GR	Glukose responsiv
GSIS	glukosestimulierte Insulinsekretion
GUR	Glukose unresponsive
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF-1 α	hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HMG-CR	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reductase
HMG-CS	HMG-CoA-Synthase
Hprt1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HR	Hydrophobe Heptad Repeat Region
HRP	Horseradish Peroxidase
K ⁺	Kalium
MARCH-V	mitochondrial ubiquitin-ligase membrane associated ring CH
MCD	Malonyl-CoA-Decarboxylase
Mff	mitochondrial fission factor

Mfn1/2	Mitofusin ½
MGB	Minor Groove Binder
Mib	Mitofusinbinding Protein
min	Minute
Miro	mitochondrial-Rho-GTPase
MIS	mitochondriale Import Sequenz
mitoPLD	mitochondrial phospholipase D
ml	Milliliter
mmol/l	Millimol je Liter
MTP18	Mitochondrial protein 18 kDa
MULAN	mitochondrial ubiquitin ligase activator of NFkB
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)
Na	Natrium
NFQ	Nicht-Fluoreszierenden Quencher
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOX	Stickoxide
O ²⁺	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
OPA1	Optic Atrophy Protein 1
OXPPOS	oxidative Phosphorylierung
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Pyruvatcarboxylase
PCR	Polymerasechainreaction
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
Pdx-1	pankreatic und duodenal Homebox 1
PEP	Phophoenolpyruvat
PERK	protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1- α

PK	Pyruvatkinase
PLC	Phospholipase C
PPAR γ	Peroxisom Proliferator-Activated Receptor γ
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer
RNA, mRNA	Ribonukleinsäure, messengerRNA
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen je Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR	Real-Time quantitative PCR
SCD1	Stearoyl-CoA-Desaturase 1
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SREBP-1c	Sterol regulatory element-binding protein-1c
TAG	Triacylglyceriden
T1DM	Typ 1 Diabetes mellitus
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidine
TPR	Tandem Tetratricopeptide Repeats
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
U	Units
UCP-2	Uncoupling Protein 2
VDAC	voltage-dependent anion channel
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation

w/v	Masse pro Volumen
Δ	delta (Differenz)
%	Prozent
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta
ε	epsilon
$\Delta\psi_m$	mitochondriales Membranpotenzial
$\Delta\psi_c$	Zellmembranpotenzial
μl	Mikroliter

Literaturverzeichnis

1. **Kerner W, Brückel J, Böhm BO** (Oktober 2004) Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. **Scherbaum WA, Kiess W** (eds.): Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft
http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/leitlinien/EBL_Klassifikation_Update_2004.pdf
2. **Reimann M, Bonifacio E, Solimena M, Schwarz P, Ludwig B, Hanefeld M & Bornstein S** (2009). An update on preventive and regenerative therapies in diabetes mellitus. *Pharmacol. Ther.*, 121:317-331
3. **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
4. **Giani G, Janka H, Hauner H, Standl E, Schiel R, Neu A, Rathmann W, Rosenbauer J** (2004) Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) - Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland
5. **Ounissi-Benkalha H, Polychronakos C** (2008) The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanisms. *Trends Mol. Med.*, 14:268-275
6. **Knip M, Veijola R, Virtanen S, Hyoty H, Vaarala O, Akerblom H** (2005) Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes*, 54 Suppl 2:S125-S136
7. **Salminen K, Sadeharju K, Lonnrot M, Vahasalo P, Kupila A, Korhonen S, Ilonen J, Simell O, Knip M, Hyoty H** (2003) Enterovirus infections are associated with the induction of beta-cell autoimmunity in a prospective birth cohort study. *J. Med. Virol.*, 69:91-98
8. **Daneman D** (2006) Type 1 diabetes. *Lancet*, 367:847-858
9. **Gerich J** (2003) Contributions of insulin-resistance and insulin-secretory defects to the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Mayo Clin. Proc.*, 78:447-456
10. **Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR** (1992) Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* 340 (8825) 925-929
11. **Prentki M, Nolan CJ** (2006) Islet β cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116(7):1802-1812
12. **Suchindran S, Vana AM, Shaffer RA, Alcaraz JE, McCarthy JJ** (2009) Racial differences in the interaction between family history and risk factors associated with diabetes in the National Health and Nutritional Examination Survey, 1999-2004. *Genet. Med.*, 11:542-547
13. **Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P** (2007) A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*, 445:881-885

14. **Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM, Barrett JC, Shields B, Morris AP, Ellard S, Groves CJ, Harries LW, Marchini JL, Owen KR, Knight B, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Morris AD, Doney AS, McCarthy MI, Hattersley AT** (2007) Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science*, 316:1336-1341
15. **Reaven G** (1993) Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu Rev Med* 44:121-131
16. **Hull RL, Kodama K, Utzschneider KM, Carr DB, Prigeon RL and Kahn SE** (2005) Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. *Diabetologia* 48(7):1350-1358
17. **Saltiel AR** (2000) Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases. *J.Clin.Invest*, 106:163-164
18. **Wellen KE and Hotamisligil GS** (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *J.Clin.Invest*, 115:1111-1119
19. **Gallagher EJ, LeRoith D, and Karnieli E** (2010) Insulin Resistance in Obesity as the Underlying Cause for the Metabolic Syndrome. *Mt Sinai J Med* 77(5):511-523
20. **Boulton AJ** (2000) The diabetic foot: a global view. *Diabetes Metab Res Rev* 16 (Suppl. 1):S2-S5.
21. **Hien P and Böhm B** (2007). *Diabetes-Handbuch - Eine Anleitung für Praxis und Klinik*. Springer, 5. Auflage:91-117
22. **Alberti G, Zimmet P, Shaw J, Bloomgarden Z, Kaufman F and Silink M** (2004) Type 2 diabetes in the young: the evolving epidemic: the international diabetes federation consensus workshop. *Diabetes Care* 27:1798-1811
23. **Steiner DF, Kim A, Miller K & Hara M** (2010) Pancreatic islet plasticity-Interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets* 2:3, 1-11
24. **Saltiel AR, and Kahn CR** (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806
25. **Jensen MV, Joseph JW, Ronnebaum SM, Burgess SC, Sherry AD & Newgard CB** (2008) Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, 295:E1287-E1297
26. **Baltrusch S, Tiedge M** (2006) Glucokinase Regulatory Network in Pancreatic β -Cells and Liver. *Diabetes* 55:S55-S64
27. **Malaisse WJ** (1996): Metabolic signaling of insulin secretion. *Diabetes Res* 4:145-159
28. **Löffler G** (2008) *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage. Springer Medizin Verlag, ISBN-10 3-540-32680-4, Heidelberg

29. **Schuit FC, Huypens P, Heimberg H, Pipeleers DG** (2001) Glucose sensing in pancreatic β -cells. *Diabetes* 50:1-11
30. **Mitchell P & Moyle J** (1967) Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* 213:137-139
31. **Ashcroft FM, Rorsman P** (1989) Electrophysiology of the pancreatic β -cell. *Prog Biophys Mol Biol* 54:87-143
32. **Dunne MJ, Harding EA, Jaggar JH, Squires PE** (1994) Ion channels and the molecular control of insulin secretion. *Biochem Soc Trans* 22: 6-12
33. **Miura Y, Henquin JC, Gilon P** (1997) Emptying of intracellular Ca^{2+} stores stimulates Ca^{2+} entry in mouse pancreatic β -cells by both direct and indirect mechanism. *J Physiol* 503: 387-398
34. **Panten U** (1987) Rapid control of insulin secretion from pancreatic islets. *ISI Atlas Sci Pharmacol* 1: 307-310
35. **Brownlee M** (2003) A rapid explanation for glucose-induced β -cell dysfunction. *J Clin Invest* 112(12): 1788-1790
36. **Nolan CJ, Murthy L, Madiraju SR, Delghingaro-Augusto V, Peyot ML and Prentki M** (2006) Fatty Acid Signaling in the β -Cell and Insulin Secretion *Diabetes* 55 (Suppl. 2):S16-S23
37. **Lowell BB & Shulman GI** (2005) Mitochondriale Dysfunktion und Typ 2 Diabetes. *Science* 307 (5708):384-7
38. **Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC** (2003) β -cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102-110
39. **Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, Curi R** (2007) Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J. Physiol.* 583,9-24
40. **Boden G and Shulman GI** (2002) Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 32 Suppl 3:14-23
41. **Boden G** (2008) Obesity and free fatty acids. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37:635-646,viii-ix
42. **Poitout V, Robertson RP** (2008) Glucolipotoxicity: Fuel Excess and β -Cell Dysfunction. *Endocrine Reviews* 29(3):351-366
43. **Eitel K, Staiger H, Brendel MD, Brandhorst H, Bretzel RG, Haring HU, Kellerer M** (2003) Apoptosis induced by free fatty acids. *Med. Klin.* 98, 248-252
44. **Itoh Y, Kawamata Y, Harada M et al** (2003) Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 2003; 422:173-176

45. **Schnell S, Schaefer M, Schofl C** (2007) Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from beta-cells through activation of GPR40. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 263: 173–180
46. **Shapiro H, Shachar S, Sekler I, Hershinkel M, Walker MD** (2005) Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 97–104
47. **Gehrmann W, Elsner M & Lenzen S** (2010) Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic β -cells. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 12 (Suppl. 2):149–158
48. **Dhayal S, Welters HJ, Morgan NG** (2008) Structural requirements for the cytoprotective actions of mono-unsaturated fatty acids in the pancreatic beta-cell line, BRIN-BD11. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 1718–1727
49. **Wanders RJ, Waterham HR** (2006) Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* 2006; 75: 295–332.
50. **Lenzen S** (2008) Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans* 2008; 36:343–347
51. **Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J and Lenzen S** (1997) Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46, 1733–1742
52. **Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG** (2007) Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 722–728
53. **Larsson O, Deeney JT, Bränström R, Berggren PO, Corkey BE** (1996) Activation of the ATP-sensitive K-channel by long chain acyl-CoA. A role in modulation of pancreatic β -cell glucose sensitivity. *J Biol Chem* 271:10623–10626
54. **El-Assaad W, Joly E, Barbeau A, Sladek R, Buteau J, Maestre I, Pepin E, Zhao S, Iglesias J, Roche E and Prentki M** (2010) Glucolipotoxicity Alters Lipid Partitioning and Causes Mitochondrial Dysfunction, Cholesterol, and Ceramide Deposition and Reactive Oxygen Species Production in INS832/13 β -Cells. *Endocrinology* 151: 3061–3073
55. **Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, Patane G, Boggi U, Piro S, Anello M, Bergamini E, Mosca F, Di Mario U, Del Prato S, Marchetti P** (2002) Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes* 51: 1437–1442
56. **Roche E, Farfari S, Witters LA, Assimacopoulos-Jeannet F, Thumelin S, Brun T, Corkey BE, Saha AK, Prentki M** (1998) Long-term exposure of β -INS cells to high glucose concentrations increases anaplerosis, lipogenesis, and lipogenic gene expression. *Diabetes* 47:1086–1094
57. **Marchetti P, Dotta F, Lauro D, Purello F** (2008) An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: Implications for treatment. *Regulatory peptides* 2008; 146:4-11

58. **Ruderman N, Prentki M** (2004) AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov* 3:340–351
59. **McGarry JD, Brown NF** (1997) The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system: from concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 244:1–14
60. **Rachek IL, Musiyenko SI, Le Doux SP, Wilson GL** (2007) Palmitate induced mitochondrial Deoxyribonucleic Acid damage and Apoptosis in L6 Rat Skeletal Muscle Cells. *Endocrinology*, 2007; 148(1):293-299
61. **Shimabukuro M, Zhou Y-T, Levi M, Unger RH** (1998) Fatty acid-induced β -cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2498–2502
62. **Gwiazda K, Yang TL, Lin Y and Johnson JD** (2009) Effects of palmitate on ER and cytosolic Ca^{2+} homeostasis in β -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E690-E701
63. **Guest PC, Bailyes EM, Hutton JC** (1997) Endoplasmic reticulum Ca^{2+} is important for the proteolytic processing and intracellular transport of proinsulin in the pancreatic beta-cell. *Biochem J* 323: 445–450
64. **Laybutt DR, Preston AM, Akerfeldt MC et al.** (2007) Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007; 50: 752–763
65. **Echtay KS, Roussel D, St Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC and Brand MD** (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415, 96–99
66. **Joseph JW, Koshkin V, Saleh MC, Sivitz WI, Zhang CY, Lowell BB, Chan CB and Wheeler MB** (2004) Free Fatty Acid-induced β -Cell Defects Are Dependent on Uncoupling Protein 2 Expression. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 279, No. 49, December 3, pp. 51049–51056
67. **Li N, Frigerio F and Maechler P** (2008) The sensitivity of pancreatic β -cells to mitochondrial injuries triggered by lipotoxicity and oxidative stress. *Biochem. Soc Trans.* 36, 930–934
68. **Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z, Pan W, Shimomura I, Unger RH** (2000) Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8536–8541
69. **Johnson JD, Bernal-Mizrachi E, Alejandro EU, Han Z, Kalynyak TB, Li H, Beith JL, Gross J, Warnock GL, Townsend RR, Permutt MA, Polonsky KS** (2006) Insulin protects islets from apoptosis via Pdx1 and specific changes in the human islet proteome. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19575–19580
70. **Holst JJ** (2007) The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* 87: 1409–1439
71. **Moore PC, Ugas MA, Hagman DK, Parazzoli SD, Poitout V** (2004) Evidence against the involvement of oxidative stress in fatty acid inhibition of insulin secretion. *Diabetes* 53: 2610–2616

72. **Park KS, Wiederkehr A, Kirkpatrick C, Mattenberger Y, Martinou JC, Marchetti P, Demaurex N, Wollheim CB** (2008) Selective actions of mitochondrial fission/fusion genes on metabolism-secretion coupling in insulin releasing cells. *J Biol Chem* 2008; 283:33347–33356
73. **Chen H and Chan DC** (2005) Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission *Human Molecular Genetics*, 2005, Vol. 14, Review Issue 2 R283–R289
74. **Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW, Shulman GI** (2003) Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 300: 1140–1142
75. **Cortopassi G und Wang A** (1999) Mitochondrien in Organismen Alterung und Degeneration, *Biochimica bei Biophysica Acta*, 1999, 1410:183-193
76. **Liesa M, Palacin M, Zorzano A** (2009) Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease *Physiol Rev* 89: 799–845
77. **Zeviani M and Di Donato S** (2004) Mitochondrial disorders. *Brain* 127(10): 1047-1053
78. **Piecznik SR and Neustadt J** (2007) Mitochondrial dysfunction and molecular pathway of disease. *Exp Mol Pathol* 83(1): 84-92
79. **Schapira AHV** (2006) Mitochondrial disease. *Lancet* 368(9543): 70-82
80. **Zorzano A, Liesa M, Palacin M** (2009) Die Rolle der mitochondrialen Proteine Dynamik in der Pathophysiologie der Adipositas und Typ 2 Diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 2009 Okt; 41(10):1846-54
81. **Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC** (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160: 189–200
82. **Chen H, Chomyn A, Chan DC** (2005) Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 280: 26185–26192
83. **Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacin M, Zorzano A** (2005) The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet* 14: 1405–1415
84. **Van Laar VS & Berman SB** (2009) Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 218, 247–256
85. **Wang X, Su B, Lee H, Li X, Perry G, Smith MA & Zhu X** (2009) Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29, 9090–9103
86. **Romanello V, Guadagnin E, Gomes L, Roder I, Sandri C, Petersen Y, Milan G, Masiero E, Piccolo PD, Foretz M et al** (2010) Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO J* 29, 1774–1785

87. **Park YY, Lee S, Karbowski M, Neutzner A, Youle RJ & Cho H** (2010) Loss of MARCH5 mitochondrial E3 ubiquitin ligase induces cellular senescence through dynamin-related protein 1 and mitofusin 1. *J Cell Sci* 123, 619–626
88. **Chen H and Chan DC** (2009) Mitochondrial dynamics – fusion, fission, movement, and mitophagy – in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 18(R2): R169-R176
89. **Sauvanet C, Arnauné-Pelloquin L, David C, Belenguer P, and Rojo M** (2010) Mitochondrial morphology and dynamics: actors, mechanism and functions. *Med Sci (Paris)* 26(10): 823-829
90. **Okamoto K, Shaw JM** (2005) Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 39: 503–536
91. **Bereiter-Hahn J, and Voth M** (1994) Dynamics of Mitochondria in Living Cells: Shape Changes, Dislocations, Fusion, and Fission of Mitochondria. *Microsc Res Tech* 27(3): 198-219
92. **Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Dagaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacin M, Vidal H, Rivera F, Brand M, and Zorzano A** (2003) Mitofusin-2 Determines Mitochondrial Network Architecture and Mitochondrial Metabolism. *J Biol Chem* 278(19): 17190-17197
93. **Zorzano A, Liesa M, Palacin M** (2009) Mitochondriale Dynamik als Brücke zwischen mitochondriale Dysfunktion und Insulinresistenz *Arch Physiol Biochem.* 2009 Feb; 115(1):1-12
94. **Detmer SA and Chan DC** (2007) Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Molecular cell biology* Vol.8, Nov. 2007, 870-879
95. **Chan DC** (2006) Mitochondrial Fusion and Fission in Mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:79–99
96. **Parone PA, Da Cruz S, Tondera D, Mattenberger Y, James DI, Maechler P, Barja F, Martinou J** (2008) Preventing Mitochondrial Fission Impairs Mitochondrial Function and Leads to Loss of Mitochondrial DNA. *PLoS ONE* September 2008, Volume 3, Issue 9, e3257
97. **Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van Der Blik AM** (2001) Dynamin-related protein drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 12:2245–56
98. **Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M** (2004) The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119:873–87
99. **Mouli PK, Twig G, and Shirihai OS** (2009) Frequency and Selectivity of Mitochondrial Fusion are Key to its Quality Maintenance Function. *Biophys Journal* 96(9): 3509-3518
100. **Ono T, Isobe K, Nakada K, Hayashi Ji** (2001) Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat Genet* 2001;28:272-275

101. **Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS** (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 27: 433–446
103. **Hur KY, Jung HS & Lee M** (2010) Role of autophagy in β -cell function and mass. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 12 (Suppl. 2): 20–26
104. **Bergamini E, Cavallini G, Donati A, Gori Z** (2004) The role of macroautophagy in the ageing process, anti-ageing intervention and age-associated diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 2392–2404
105. **Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ** (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1: 515–525
106. **Young, P. and Suter, U** (2003) The causes of Charcot–Marie–Tooth disease. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60, 2547–2560
107. **James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou JC** (2003) hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J. Biol. Chem.* 278:36373–79
108. **Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA** (2003) The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin like protein DLP1. *Mol. Cell Biol.* 23:5409–20
109. **Stojanovski D, Koutsopoulos OS, Okamoto K and Ryan MT** (2004) Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J. Cell Sci.* 117, 1201-1210
110. **Chang C, Blackstone C** (2007) Cyclic AMP-dependent Protein Kinase Phosphorylation of Drp1 Regulates Its GTPase Activity and Mitochondrial Morphology. *The J of Biol Chem* Vol. 282, No. 30, pp. 21583–21587, July 27
111. **Pitts KR, McNiven MA, Yoon Y** (2004) Mitochondria-specific function of the dynamin family protein DLP1 is mediated by its C-terminal domains. *J Biol Chem* 279: 50286–50294
112. **Koch A, Yoon Y, Bonekamp NA, McNiven MA, Schrader M** (2005) A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2005; 16:5077–86
113. **Yu T, Fox RJ, Burwell LS, Yoon Y** (2005) Regulation of mitochondrial fission and apoptosis by the mitochondrial outer membrane protein hFis1. *J Cell Sci* 2005; 118:4141–4151
114. **Varadi A, Johnson-Cadwell LI, Cirulli V, Yoon Y, Allan VJ, Rutter GA** (2004) Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J Cell Sci* 117: 4389–4400

115. **Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ** (2004) Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 15:5001–5011
116. **Horn J and Sheu SS** (2009) Morphological dynamics of mitochondria – A special emphasis on cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 46(6): 811-820
117. **Zhu P, Patterson A, Stadler J, Seeburg DP, Sheng M and Blackstone C** (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 35967–35974
118. **Chang C, Blackstone C** (2010) Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1201 (2010) 34–39
119. **Arnoult D, Rismanchi N, Grodet A, Roberts RG, Seeburg DP, Estaquier J, Sheng M, Blackstone C** (2005) Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. *Curr Biol* 15:2112–2118
120. **Westermann B** (2008) Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. *J Biol Chem* 283, 13501–13505
121. **Jofuku A, Ishihara N, Mihara K** (2005) Analysis of functional domains of rat mitochondrial Fis1, the mitochondrial fission-stimulating protein *Biochem Biophys Res Commun* 333: 650–659
122. **Suzuki M, Jeong SY, Karbowski M, Youle RJ and Tjandra N** (2003) The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle. *J. Mol. Biol.* 334, 445-458
123. **D’Andrea LD and Regan L** (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem. Sci.*, 28, 655–662
124. **Alirol E, James D, Huber D, Marchetto A, Vergani L, Martinou JC, Scorrano L** (2006) The mitochondrial fission protein hFis1 requires the endoplasmic reticulum gateway to induce apoptosis. *Mol Biol Cell* 17: 4593–4605
125. **Lee S, Jeong SY, Lim WC, Kim S, Park YY, Sun X, Youle RJ, Cho H** (2007) Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J Biol Chem* 282: 22977–22983
126. **Wang CH, Wang CC, Wei YH** (2010) Mitochondrial dysfunction in insulin insensitivity: implication of mitochondrial role in type 2 diabetes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1201 (2010) 157–165
127. **Cipolat S, Martins dB, Dal Zilio B, Scorrano L** (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15927–15932
128. **Malka F, Guillery O, Cifuentes-Diaz C, Guillou E, Belenguer P et al.** (2005) Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep.* 6:853–59

129. **Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC** (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305: 858–862
130. **Meeusen S, McCaffery JM, Nunnari J.** (2004) Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 305:1747–52
131. **Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, et al.** (2003) Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278:7743–46
132. **Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT** (2003) Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* 116: 2763–2774
133. **Legros F, Lombes A, Frachon P, Rojo M** (2002) Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol. Biol. Cell* 13:4343–54
134. **Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombes A** (2002) Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* 115: 1663–1674
135. **Cohen MM, Leboucher GP, Livnat-Levanon N, Glickman MH, Weissman AM** (2008) Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of a mitofusin, a critical regulator of mitochondrial fusion. *Mol Biol Cell* 19: 2457–2464
136. **Griparic L, Kanazawa T, van der Blik AM** (2007) Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol* 178: 757–764
137. **Olichon A, Emorine LJ, Descoins E, Pelloquin L, Brichese L, Gas N, Guillou E, Delettre C, Valette A, Hamel CP, Ducommun B, Lenaers G, Belenguer P** (2002) The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett* 523: 171–176
138. **Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquelléc L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP** (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26: 207–210
139. **Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, et al.** (2001) Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum. Genet.* 109:584–91
140. **Satoh M, Hamamoto T, Seo N, Kagawa Y, Endo H** (2003) Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 300: 482–493
141. **Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC** (2007) OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, Yme1L. *J Cell Biol* 178: 749–755

142. **Praefcke GJ, McMahon HT** (2004) The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 133–147
143. **Akepati VR, Muller EC, Otto A, Strauss HM, Portwich M, Alexander C** (2008) Characterization of OPA1 isoforms isolated from mouse tissues. *J Neurochem* 106: 372–383
144. **Olichon A, Elachouri G, Baricault L, Delettre C, Belenguer P, Lenaers G** (2007) OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death Differ* 14: 682–692
145. **Hohmeier HE, Mulder H, Chen G, Henkel-Rieger R, Prentki M, Newgard CB** (2000) Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and – independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49(3): 424–430
146. **Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, and Wollheim CB** (1992) Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130(1): 167–178
147. **Malmgren S, Nicholls DG, Taneera J, Bacos K, Koeck T, Tamaddon A, Wilborn R, Groop L, Ling C, Mulder H, and Sharoyko W** (2009) Tight coupling between glucose and mitochondrial metabolism in clonal beta-cells is required for robust insulin secretion. *J Biol Chem* 284(47): 32395–32404
148. **Bradford MM** (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254
149. **Kusminski CM, Shetty S, Orci L, Unger RH, Scherer PE** (2009) Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis* 14, 1484–1495
150. **Nitert MD, Nagorny CL, Wendt A, Eliasson L, and Mulder H** (2008) *J. Mol. Endocrinol.* 41, 1–11
151. **Dlaskova A, Spacek T, Santorova J, Plecita-Hlavata L, Berkova Z, Saudek F, Lessard M, Bewersdorf J, and Jezek P** (2010) 4Pi microscopy reveals an impaired three-dimensional mitochondrial network of pancreatic islet beta-cells, an experimental model of type-2 diabetes. *Biochim Biophys Acta* 1797, 1327–1341
152. **Lee S, Jeong SY, Lim WC, Kim S, Park YY, Sun X, Youle RJ and Cho H** (2007) Mitochondrial Fission and Fusion Mediators, hFis1 and OPA1, Modulate Cellular Senescence. *The J of Biol Chem* Vol. 282, No. 31, pp. 22977–22983
153. **De Brito OM, Scorrano L** (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456: 605–610
154. **Molina A, Wikstrom JD, Stiles L, Las G, Mohamed H, Elorza A, Walzer G, Twig G, Katz S, Corkey BE and Shirihai OS** (2009) Mitochondrial Networking Protects β -Cells From Nutrient-Induced Apoptosis. *Diabetes* 58:2303–2315

155. **Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, and Rossignol R** (2007) Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci* 120, 838-848
156. **Wong ED, Wagner JA, Scott SV, Okreglak V, Holewinske TJ, Cassidy-Stone A and Nunnari J** (2003) The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.*, 160, 303–311
157. **Kahn SE** (2001) Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4047–4058
158. **Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH** (1994) β -Cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte- β -cell relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10878 –10882
159. **Zhou YP, Grill VE** (1994) Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J Clin Invest* 93: 870–876
166. **Fransson U, Rosengren AH, Schuit F, Renstrom E, and Mulder H** (2006) Anaplerosis via pyruvate carboxylase is required for the fuel-induced rise in the ATP:ADP ratio in rat pancreatic islets. *Diabetologia* 49 (7), 1578-1586
167. **Sesaki H, Southard SM, Hobbs AE and Jensen RE** (2003) Cells lacking Pep1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 308, 276–283
168. **Griffin EE, Graumann J and Chan DC** (2005) The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J. Cell Biol.*, 170, 237–248
169. **Karbowski M, Jeong SY, Youle RJ** (2004) Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J Cell Biol* 166: 1027–1039
170. **Cusi K, Kashyap S, Gastaldelli A, Bajaj M, Cersosimo E** (2007) Effects on insulin secretion and insulin action of a 48-h reduction of plasma free fatty acids with acipimox in nondiabetic subjects genetically predisposed to type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: E1175-81
171. **Niemann A, Ruegg M, La P, V, Schenone A, Suter U** (2005) Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* 170: 1067–1078
172. **Tondera D, Czauderna F, Paulick K, Schwarzer R, Kaufmann J, Santel A** (2005) The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Sci* 118: 3049–3059
173. **Choi SY, Huang P, Jenkins GM, Chan DC, Schiller J, Frohman MA** (2006) A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* 8: 1255–1262

174. **Gandre-Babbe S, van der Blik AM** (2008) The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 19: 2402–2412
175. **Nakamura N, Kimura Y, Tokuda M, Honda S & Hirose S** (2006) MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep.* 7, 1019–1022
176. **Eura Y, Ishihara N, Oka T & Mihara K** (2006) Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (Mfn) protein function. *J. Cell Sci.* 119, 4913–4925
177. **Luiken JJFP, van Nieuwenhoven FA, America G, van der Vusse GJ, Glatz JFC** (1997) Uptake and metabolism of palmitate by isolated cardiac myocytes from adult rats: involvement of sarcolemmal proteins. *J Lipid Res* 38:745–758
178. **Wilson-Fritch L, Burkart A, Bell G, et al.** (2003) Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol. Cell. Biol.* 23: 1085–1094
179. **Furuhashi M, Tuncman G, Gorgun CZ, Makowski L, Atsumi G, Vaillancourt E, et al.** (2007) Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty acid-binding protein aP2. *Nature* 2007; 447:959-65
180. **Frigerio** (2006) The antiepileptic drug topiramate preserves metabolism-secretion coupling in insulin secreting cells chronically exposed to the fatty acid oleate. *biochemical pharmacology* 72: 965–973

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ätiologische Klassifikation des Diabetes mellitus (nach American Diabetes Association (ADA) 1997) [1].....	2
--	---

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Glukose-stimulierte-Insulinsekretion in pankreatischen β-Zellen (Brownlee <i>et al.</i>, 2003 [35]): In den β -Zellen wird die Glukose durch die Glukokinase phosphoryliert und in der Glykolyse zu Pyruvat umgewandelt. Pyruvat wird in die mitochondriale Matrix transportiert und dort über Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust. Die dort gebildeten Reduktionsäquivalente werden in der mitochondrialen Atmungskette zur ATP-Generierung genutzt. Durch den Anstieg der ATP/ADP-Ratio werden ATP-sensitive K^+ -Kanäle geschlossen. Durch die folgende Depolarisation der Plasmamembran werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle geöffnet. Dies führt zu einem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, die eine Exozytose der Insulingranula ausgelöst. $\Delta\psi_m$ – mitochondriales Membranpotenzial, $\Delta\psi_c$ – Zellmembranpotenzial.	5
Abbildung 2: Wirkung Fettsäuren auf die β-Zelle (Germann <i>et al.</i>, 2010 [47]): Fettsäuren amplifizieren die GSIS via GPR40. Bei langfristiger Exposition mit Fettsäuren kommt es zur Induktion von Lipotoxizität über den peroxismalen Metabolismus.	7
Abbildung 3: Genexpressionsänderung durch Lipotoxizität (El-Assaad <i>et al.</i>, 2010 [54]): FFA - freie Fettsäuren, FABP – Fettsäure-Bindungsprotein, ACS – Acyl-CoA-Synthetase, FAS – Fettsäure-Synthase, HMG-CS – HMG-CoA-Synthase, MCD – Malonyl-CoA-Decarboxylase, AMPK – AMP-Kinase, ACC – Acetyl-CoA-Carboxylase 1, SCD1 – Stearoyl-CoA-Desaturase 1, CPT1 – Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1, HMG-CR - 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reductase, GPAT- Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase.....	9
Abbildung 4: Mögliche Mechanismen der Glukolipotoxizität in β-Zellen (modifiziert nach El-Assaad <i>et al.</i>, 2010 [54]).	11
Abbildung 5: Mitochondrialer Lebenszyklus (Twig <i>et al.</i>, 2008 [101]): Durch die mitochondriale Fusion entstehen Netzwerke (Network Period). Durch die Teilung entstehen dann wieder einzelne Mitochondrien (Solitary Period). Kann das mitochondriale Membranpotential nicht aufrechterhalten werden, wird das Mitochondrium über die Autophagie entfernt.....	15
Abbildung 6: Mitochondriale Teilung (Chan, 2006 [95]): a) Fis1 ist in der Außenmembran verankert, während der Hauptteil von Drp1 sich im Cytosol befindet. b) Initiale Konstriktion erfolgt unabhängig von Drp1. c) Drp1-Anlagerung. d) Drp1 vermittelt weitere Konstriktion. e) Nach der Teilung befindet sich der Drp1-Komplex an einem Ende des Tochter-Mitochondriums.	17
Abbildung 7: Molekularer Aufbau der Fusionsproteine (Chan, 2006 [95]): GTPase-Domäne, TM – Transmembrandomäne. Central – Zentrale Domäne, GED – GTPase Effektor Domäne, TPR – Tetratricopeptide Repeat	17

Abbildung 8: Funktionelle Domänen von Fis1 (Jofuku <i>et al.</i>, 2005 [121]): α -Helices 1-6, Tetratricopeptid.....	19
Abbildung 9: Molekularer Aufbau der Fusionsproteine (Chan, 2006 [95]): GTPase-Domäne, HR – Hydrophobe Heptad Repeat Region, TM – Transmembrandomäne.....	20
Abbildung 10: Mitochondriale Fusion (Chan, 2006 [95]): Homotypische Komplexbildung von zwei Mfn1-Proteinen über die HR2-Region bei der Anbindung von zwei Mitochondrien.....	21
Abbildung 11: Mikroskopische Aufnahmen von GR und GUR INS1-Zellen.....	33
Abbildung 12: Neubauer improved Zählkammer [http://www.lo-laboroptik.de]	34
Abbildung 13: Prinzip der RT-qPCR: R - Reporter, Q - Quencher, Taq – Taq-DNA-Polymerase [modifiziert nach http://www.nature.com/nrd/journal/v3/n9/images/nrd1496-f1.jpg].....	37
Abbildung 14: Schema der Western Blot Apparatur: Auf die Anode (1) wurden 4 in Anodenpuffer 1 getränkte Blottingpapiere (2) und 2 in Anodenpuffer 2 getränkte Blottingpapiere (3) gelegt. Die PVDF-Membran (4), die zuvor in Isopropanol und Anodenlösung 2 äquilibriert wurde, folgte der Anordnung. Das Polyacrylamidgel (5) und anschließend 4 Blottingpapiere (6) getränkt in Kathodenpuffer wurden vor der Kathode (7) aufgelegt.....	41
Abbildung 15: Indirekte Immunhistochemie [modifiziert nach: http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/img_fluoreszenz/antibody_2nd_antigen.png]	42
Abbildung 16: Prinzip des Insulin-ELISA.....	46
Abbildung 17: Lichtmikroskopische Aufnahme der Glukose-responsiven (GR) und Glukose-unresponsiven (GUR) INS1-Zellen.....	48
Abbildung 18: Vergleich der relativen mRNA-Expression der Teilungs- und Fusionsgene in INS1-Zellen: Die Expression ist auf das Referenzgen Hprt1 normalisiert. **, P < 0,01; ***, P < 0,001 (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 7)	49
Abbildung 19: Western Blot der mitochondrialen Fusions- und Teilungsproteine in INS1-Zellen: Als Kontrolle wurde β -Tubulin verwendet. (n = 3).....	50
Abbildung 20: Vergleich der relativen Proteinexpression der mitochondrialen Teilungs- und Fusionsproteine in INS1-Zellen: ***, P < 0,001 (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3)	51
Abbildung 21: Immunhistochemische Darstellung der mitochondrialen Fusions- und Teilungsproteinen in GR und GUR INS1-Zellen: grün = DAPI-Färbung, rot = spezifische Proteinfärbung.....	52
Abbildung 22: Immunhistochemische Quantifizierung der Expression der mitochondrialen Fusions- und Teilungsproteine in INS1-Zellen: (A) Quantifizierung der Fis1-Expression (B) Quantifizierung der Mfn1-Expression (C) Quantifizierung der Mfn2-Expression. *, P < 0,05, ***, P < 0,001 (Student's t-Test). (n = 3).....	53

Abbildung 23: Vergleich der relativen mRNA-Expression von Fis1 in INS1-Zellen: nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. Die Expression ist auf das Referenzgen Hprt1 normalisiert. **, P < 0,01; (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 6)	55
Abbildung 24: Western Blot von Fis1 in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. Als Kontrolle wurde β -Tubulin verwendet. (n = 3).....	56
Abbildung 25: Vergleich der relativen Proteinexpression von Fis1 in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. ***, P < 0,001 (ANOVA/Bonferroni-Test). (n = 3).....	56
Abbildung 26: Immunhistochemische Darstellung der Fis1-Expression in INS1-Zellen: Nach Behandlung mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. grün = DAPI-Färbung, rot = spezifische Fis1-Färbung	57
Abbildung 27: Immunhistochemische Quantifizierung der Fis1-Expression in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001 (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3)	58
Abbildung 28: Vergleich der relativen mRNA-Expression von Drp1 in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. Die Expression ist auf das Referenzgen Hprt1 normalisiert. (n = 6)	59
Abbildung 29: Western Blot von Drp1 in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. Als Kontrolle wurde β -Tubulin verwendet. (n = 3).....	60
Abbildung 30: Vergleich der relativen Proteinexpression von Drp1 in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. *, P < 0,05; ***, P < 0,001 (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3).....	60
Abbildung 31: Vergleich der relativen mRNA-Expression von OPA1 in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. Die Expression wurde auf das Referenzgen Hprt1 normalisiert. (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 6).....	61
Abbildung 32: Western Blot von OPA1 in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. Als Kontrolle wurde β -Tubulin verwendet. (n = 3).....	62
Abbildung 33: Vergleich der relativen Proteinexpression von OPA1 in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. ***, P < 0,001 (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3).....	62
Abbildung 34: Vergleich der relativen mRNA-Expression von Mfn1 in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. *, P < 0,05 (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 6)	63

Abbildung 35: Western Blot von Mfn1 in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. Als Kontrolle wurde β -Tubulin verwendet. (n = 3).....	64
Abbildung 36: Vergleich der relativen Proteinexpression von Mfn1 in INS1-Zellen: nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. ***, P < 0,001 (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3).....	64
Abbildung 37: Immunhistochemische Darstellung der Mfn1-Expression in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. grün = DAPI-Färbung, rot = spezifische Mfn1-Färbung.....	65
Abbildung 38: Immunhistochemische Quantifizierung der Mfn1-Expression in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. ***, P < 0,001 (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3).....	66
Abbildung 39: Vergleich der relativen mRNA-Expression von Mfn2 in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. Die Expression wurde auf das Referenzgen Hprt1 normalisiert. (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 6).....	67
Abbildung 40: Western Blot von Mfn2 in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. Als Kontrolle wurde β -Tubulin verwendet. (n = 3).....	67
Abbildung 41: Vergleich der relativen Proteinexpression von Mfn2 in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. ***, P < 0,001 (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3).....	68
Abbildung 42: Immunhistochemische Darstellung der Mfn2-Expression in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. grün = DAPI-Färbung, rot = spezifische Mfn2-Färbung.....	69
Abbildung 43: Immunhistochemische Quantifizierung der Mfn2-Expression in INS1-Zellen: Nach Inkubation mit 0,15 mmol/l, 0,25 mmol/l und 0,35 mmol/l Palmitinsäure für 48 Stunden. ***, P < 0,001 (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3).....	69
Abbildung 44: Darstellung des Mitochondrienetzwerkes durch MitoTracker Green in GR und GUR INS1-Zellen: Ohne und mit Palmitinsäure-Inkubation von 0,17 mmol/l für 48 Stunden.....	71
Abbildung 45: Quantifizierung der mittleren mitochondrialen Fläche in INS1-Zellen: Ohne und mit Palmitinsäure-Inkubation von 0,17mmol/l für 48 Stunden. ***, P < 0,001 (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3).....	72
Abbildung 46: (A) ATP/ADP-Ratio ohne Palmitinsäure, (B) ATP/ADP-Ratio nach Inkubation mit 0,085 mmol/l Palmitinsäure, (C) ATP/ADP-Ratio nach Inkubation mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure: Nach einer Inkubation mit 2,8 mmol/l und 20 mmol/l Glukose. *, P < 0,05 (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 3)	74

- Abbildung 47: Insulinsekretion in INS1-Zellen:** Nach einer Inkubation mit 2,8 mmol/l und 20 mmol/l Glukose. ***, $P < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 6) 75
- Abbildung 50: Insulinsekretion in INS1-Zellen nach Inkubation mit 0,085 mmol/l Palmitinsäure:** Nach einer Inkubation mit 2,8 mmol/l und 20 mmol/l Glukose. ***, $P < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 6) 76
- Abbildung 51: Insulinsekretion in INS1-Zellen nach Inkubation mit 0,17 mmol/l Palmitinsäure:** Nach einer Inkubation mit 2,8 mmol/l und 20 mmol/l Glukose. **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 6) 76
- Abbildung 52: Insulinsekretion in INS1-Zellen ohne und mit Inkubation von 0,17 mmol/l Palmitinsäure:** Nach einer Inkubation mit 2,8 mmol/l und 20 mmol/l Glukose. *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni's-Test). (n = 6)..... 77

Eidesstattliche Erklärung

An Eides statt erkläre ich, dass ich diese an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Promotion vorgelegte Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe durchgeführt und keine anderen als die in der Dissertationsschrift angeführten Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ich habe weder diese noch eine andere Arbeit an einer in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät als Dissertation vorgelegt.

Rostock, den 06.11.2012

Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Baltrusch für die Vergabe des Themas, sowie für die stets sehr hilfreiche und umfangreiche Unterstützung und für die Ermöglichung der Teilnahme an der 46. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich für jegliche Hilfestellung, Rat, Motivation und Geduld bei Frau Dr. Julia Schultz und Frau Rica Waterstradt und allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität Rostock.

Vielen Dank an meine Freunde und Familie, die mich dabei unterstützt haben.