



Einfluss des mitochondrialen Teilungsfaktors Drp1 auf die Struktur und Funktion der Betazelle

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

am Institut für medizinische Biochemie
und Molekularbiologie
der Universitätsmedizin Rostock

Rostock, Dezember 2023

Vorgelegt von: **Magdalena Otte**

Geboren am 11.10.1993 in Wittingen

aus Rostock

Gutachter: **Prof. Dr. rer. nat. Simone Erika Baltrusch**

Universität Rostock

Medizinische Fakultät

Institut für Medizinische Biochemie und
Molekularbiologie

Prof. Dr. rer. nat. Marc Nowaczyk

Universität Rostock

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Institut für Biowissenschaften

Datum der Disputation: 14. Juni 2024

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	II
II.	Abkürzungsverzeichnis.....	VI
III.	Abbildungsverzeichnis.....	X
IV.	Tabellenverzeichnis.....	XIII
1.	Einleitung	14
1.1	Diabetes mellitus.....	14
1.1.1	Klassifikation und Definition	14
1.1.2	Diabetes mellitus Typ 1	15
1.1.3	Diabetes mellitus Typ 2.....	16
1.2	Die Betazelle des Pankreas	17
1.2.1	Insulinsekretion und seine Wirkung.....	17
1.3	Das Mitochondrium	19
1.3.1	Aufbau und Funktion	19
1.4	Mitochondriale Dysfunktion in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2	20
1.5	Mitochondriale Dynamik	21
1.5.1	Mitochondriale Fusion	22
1.5.2	Mitochondriale Teilung	23
1.5.2.1	Das Teilungsprotein Drp1.....	24
1.5.2.2	Der Drp1-Inhibitor mdivi-1	26
1.6	Zielstellung der Arbeit.....	28
2.	Material	29
2.1	Zellen	29
2.1.1	Zellkultur-Medium.....	29
2.2	Transfektionsreagenz.....	29
2.3	Vektoren.....	29
2.4	Taqman Sonden.....	30
2.5	Enzyme	30
2.6	Molekulargewichtsmarker	30
2.7	Antikörper.....	31
2.7.1	Primärantikörper Western Blot	31
2.7.2	Primärantikörper Immunfluoreszenz.....	31
2.7.3	Fluoreszenz gekoppelte Sekundärantikörper	31
2.8	Fluoreszenzfarbstoffe.....	32
2.9	Kits.....	32
2.10	Chemikalien	32
2.11	Lösungen und Puffer.....	33

2.12 Verbrauchsmaterialien	34
2.13 Geräte.....	35
2.14 Software.....	35
3. Methoden	36
3.1 Zelllinien.....	36
3.1.1 MIN 6	36
3.2 Zellkultur	36
3.3 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest mit Trypanblau	36
3.4 Zellvitalität	37
3.4.1 Alamar Blue	37
3.5 Transfektion	37
3.5.1 JetPei® - Transfektion.....	37
3.6 Herstellung stabiler Klone	38
3.7 mRNA-Expressionsanalysen.....	39
3.7.1 RNA-Extraktion	39
3.7.2 RNA-Konzentrationsbestimmung	39
3.7.3 cDNA-Synthese.....	39
3.7.4 Quantitative Real-Time PCR	40
3.8 Methoden zur Proteinanalyse.....	42
3.8.1 Proteinpräparation.....	42
3.8.2 Proteingehaltsbestimmung mittels BCA Assay Kit.....	42
3.8.3 Proteinbestimmung nach Bradford	43
3.8.4 SDS – PAGE.....	44
3.8.5 Western Blot	45
3.8.6 Revert 700 Total Protein Stain Normalization	46
3.9 Immunfluoreszenz.....	46
3.9.1 Indirekte Immunfluoreszenz	46
3.10 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials.....	47
3.11 Analyse der mitochondrialen Morphologie mittels Lebendzellfärbung.....	48
3.12 Bestimmung der ATP/ADP Ratio.....	48
3.13 Bestimmung Glucose-stimulierter Insulin Sekretion.....	49
3.13.1 Insulin-ELISA	50
3.14 Statistische Auswertung	51
4. Ergebnisse	52
4.1 Verwendete Zelllinien	52
4.1.1 Morphologie der verwendeten Zelllinien	52
4.1.2 Zellvitalitätsmessung bei Behandlung mit mdivi-1	54
4.2 Die Expression von Drp1.....	54

4.2.1	Genexpressionsanalyse von Drp1 in K38A, Drp1+ und mdivi-1 Zellen.....	55
4.2.2	Proteinexpressionsanalyse von Drp1 in K38A und Drp1+ Zellen.....	56
4.2.3	Proteinexpressionsanalyse in mdivi-1 behandelten Zellen	56
4.2.4	Immunhistochemische Untersuchung nach Drp1 Beeinflussung	57
4.3	Expressionsanalyse ausgewählter Gene mit Einfluss auf die mitochondriale Dynamik	59
4.3.1	Genexpressionsanalyse der Fusionsproteine Mfn1, Mfn2 und Opa1.....	59
4.3.2	Genexpressionsanalyse der mitochondrialen Teilungsproteine Fis1 und Mff.....	60
4.4	Genexpressionsanalyse ausgewählter Proteine der Autophagie und Mitophagie	61
4.4.1	Genexpressionsanalyse der Autophagie Proteine LC3/ATG8 und ATG9A.....	61
4.4.2	Genexpressionsanalyse der Mitophagie-assoziierten Proteine PINK1 und Parkin	62
4.5	Genexpressionsanalyse ausgewählter Proteine der mitochondrialen Atmungskette.....	63
4.5.1	Genexpressionsanalyse der kerncodierten Proteine der Atmungskette Atp5a1 und Ndufb8.....	64
4.5.2	Genexpressionsanalyse mitochondrial codierter Untereinheiten der Atmungskette ATP8 und ND5/ND6.....	65
4.6	Genexpressionsanalyse von antioxidativ wirksamen Proteinen.....	66
4.6.1	Genexpressionsanalyse der Superoxiddismutasen 1 und 2 , der Catalase, der Gluthationperoxidase und dem Peroxiredoxin	66
4.7	Proteinexpressionsanalyse des mitochondrialen oxidativen Phosphorylierungs Systems (OXPHOS) in K38A, Drp1+ und mdivi-1 Zellen.....	68
4.7.1	Proteinexpressionsanalyse des mitochondrialen oxidativen Phosphorylierungssystems (OXPHOS) in K38A Zellen	68
4.7.2	Proteinexpressionsanalyse des mitochondrialen oxidativen Phosphorylierungs Systems (OXPHOS) in Drp1+ Zellen.....	70
4.7.3	Proteinexpressionsanalyse des mitochondrialen oxidativen Phosphorylierungssystems (OXPHOS) in mdivi-1 Zellen.....	71
4.8	Immunhistochemische Untersuchungen.....	72
4.8.1	Immunhistochemische Untersuchung zur Insulin und Glucokinase Expression in K38A, Drp1+ und mdivi-1 Zellen.....	72
4.8.2	Immunhistochemische Untersuchung zur LC3 Expression in K38A, Drp1+ und mdivi-1 Zellen.....	75
4.9	Analyse des mitochondrialen Netzwerks nach Beeinflussung der Drp1 Expression und seiner Aktivität	76
4.9.1	Analyse der Mitochondrienmorphologie nach Beeinflussung von Drp1	76
4.10	Analyse der Sphärizität der Mitochondrien und des mitochondrialen Volumens in K38A, Drp1+ und mdivi-1 Zellen	78
4.10.1	Vergleich der Sphärizität und des mitochondrialen Volumens in K38A Zellen	78
4.10.2	Vergleich der Sphärizität und des mitochondrialen Volumen in Drp1+ Zellen	79

4.10.3	Vergleich der Sphärizität und des mitochondrialen Volumens in mdivi-1 Zellen	80
4.11	Analyse des mitochondrialen Membranpotentials in K38A, Drp1+ und mdivi-1 Zellen	81
4.11.1	Quantifizierung des mitochondrialen Membranpotentials in Drp1 beeinflussten Zellen	81
4.12	Analyse der Anreicherung an reaktiven Sauerstoffspezies in K38A, Drp1+ und mdivi-1 Zellen	84
4.13	Bestimmung der ATP/ADP Ratio in K38A, Drp1+ und mdivi-1 Zellen	86
4.14	Untersuchung der Glucose stimulierten Insulinsekretion in K38A und Drp1+ Zellen	87
4.15	Untersuchung der Glucose stimulierten Insulinsekretion in mdivi-1 behandelten Zellen	89
5.	Diskussion.....	91
5.1	Mitochondriale Dynamik	94
5.2	Mitochondriales Netzwerk und Morphologie	97
5.3	Membranpotential und ATP/ADP Ratio	98
5.4	Auswirkung auf zellulären oxidativen Stress.....	100
5.5	Insulinsekretion	104
6.	Zusammenfassung.....	107
V.	Literatur.....	CX
VII.	Eigenständigkeitserklärung	CXXXI
VIII.	Danksagung	CXXXII

II. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
AA	Acrylamid
ADA	American Diabetes Association
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATG	Autophagy related Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄	Natrium Desoxycholsäure
C ₂ H ₆ OS	2/β-Mercaptoethanol
Ca	Calcium
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Calciumchlorid Dihydrat
CBBG	Coomassie-Brilliant-Blau G-250
C _t	Cycle threshold
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Drp1	Dynamin related protein 1
Drp1+	Drp1 Überexpressions Mutante
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FAM	Carboxyfluorescein
FCS	Fetales Kälberserum
Fis1	Fission Factor 1
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
G2	Interphase (Zellzyklus)
G418	Genetecin

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GED	GTPase effector domain
GLUT	Glucosetransporter
Gpx	Glutathionperoxidase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HbA1c	Hämoglobin A 1c
HCl	Salzsäure
IAA	Insulinantikörper
ICA	Inselzellenantikörper
IgG	Immunglobulin G
K ⁺	Kalium
K38A	Drp1 Negativmutante
KCl	Kalziumchlorid
kDa	Kilo Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumphosphat
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LNF	Lane Normalization Factor
M	Mitose (Zellzyklus)
Mdivi-1	mitochondrial division inhibitor 1
Mdv1	Mitochondrial Division Protein 1
MEF	Mouse embryonic fibroblast
Mff	Mitochondrial Fission Factor
Mfn	Mitofusin
Mg/dl	Milligramm pro Deziliter
Mg/ml	Milligramm pro Milliliter
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄ x 7H ₂ O	Magnesiumsulfat
MiD	Mitochondrial Dynamic Protein
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm ²	Quadratmillimeter
mmol/l	Millimol pro Liter

mmol/mol	Millimol pro Mol
mRNA	Messenger RNA
mtDNA	Mitochondrial DNA
Mtc01	Mitochondrially Encoded Cytochrom C Oxidase I
n	Biologische Replikate
NaCl	Natrium Chlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaN ₃	Natriumazid
ND	NADH-Dehydrogenase
Ndufb	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit
nm	Nanometer
Opa1	Optische Atrophie Protein 1
OXPHOS	oxidatives Phosphorylierungssystem
P	Signifikanzwert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PINK1	PTEN-induced kinase 1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radioimmunoprecipitation-assay buffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNR2	Ribosomal 45S Cluster 2
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SDHB	Succinate Dehydrogenase Complex Iron Sulfur Subunit B
SDS	Natriumlaurylsulfat
SD-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel- Elektrophorese
SEM	Standardfehler
siRNA	Small interfering RNA
SOD	Superoxide dismutase
SUMO	Small Ubiquitin-Related Modifier
TEMED	Tetramethylethylendiamin

TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMRE	Tetramethylrhodamin, Ethylester, Perchlorat
U	Unit
Uqcrc2	Ubiquinol-Cytochrom C Reductase Core Protein
ZnT8	Zinktransporter 8 22
α -Zellen	Alphazellen
β -Oxidation	Betaoxidation

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematischer Aufbau eines Mitochondrium bearbeitet nach [89]	20
Abbildung 2 Die mitochondriale Dynamik schematisch dargestellt nach [118]	22
Abbildung 3 Aufbau des Dynamin related-protein 1	25
Abbildung 4 Reaktion des Drp1 am Mitochondrium; Abbildung nach [146]	25
Abbildung 5 Chemische Strukturformel des Chinazolin Derivat mdivi-1	26
Abbildung 6 Neubauer improved Zählkammer [192]	37
Abbildung 7 Schematische Abbildung einer quantitativen Real Time PCR	42
Abbildung 8 Schematische Darstellung der Durchführung einer SDS - Page	45
Abbildung 9 Schematischer Aufbau eines Western Blots	45
Abbildung 10 Schematische Darstellung der Immunfluoreszenz	47
Abbildung 11 Schematischer Aufbau eines Sandwich-ELISA	50
Abbildung 12 Exemplarische Darstellung mikroskopischer Aufnahmen	53
Abbildung 13 Darstellung der Zellvitalität von MIN 6 Zellen	54
Abbildung 14 Vergleich der relativen mRNA Expression des Teilungsprotein Drp1	55
Abbildung 15 Proteinexpression von Drp1	56
Abbildung 16 Proteinexpression von Drp1 (mdivi-1)	57
Abbildung 17 Exemplarische immunhistochemische Darstellung und Quantifizierung des Drp1 Gehalts	58
Abbildung 18 Vergleich der relativen mRNA Expression der Fusionsproteine Mfn1 (A), Mfn2 (B) und Opa1 (C)	60
Abbildung 19 Vergleich der relativen mRNA Expression der Teilungsproteine Fis1 (A) und Mff (B)	61
Abbildung 20 Vergleich der relativen mRNA Expression der Autophagie assoziierten Proteine ATG8 (A) und ATG9A (B)	62
Abbildung 21 Vergleich der relativen mRNA Expression der Mitophagie assoziierten Proteine PINK1 (A) und Parkin (B)	63
Abbildung 22 Vergleich der relativen mRNA Expression einer Auswahl kerncodierter Bestandteile der mitochondrialen Atmungskette Atp5a1 (A) und Ndufb 8 (B)	64

Abbildung 23 Vergleich der relativen mRNA Expression der mitochondrial exprimierten Bestandteile der Atmungskette der Mitochondrien ATP8 (A) und ND5/ND6 (B)	65
Abbildung 24 Vergleich der relativen mRNA Expression der antioxidativ wirksamen Proteine der SOD1 (A), der SOD2 (B) und der nachgeschalteten Catalase (C)	67
Abbildung 25 Vergleich der relativen mRNA Expression der antioxidativ wirksamen Proteine der Gpx (A) und Prdx (B)	68
Abbildung 26 Western Blot zur Proteinexpression des OXPHOS in stabil transfizierten K38A Klonen (A) Quantitative Auswertung und (B)	69
Abbildung 27 Western Blot zur Proteinexpression des OXPHOS in stabil transfizierten Drp1 Überexpressionsklonen (A) in Quantitativer und (B)	70
Abbildung 28 Western Blot zur Proteinexpression des OXPHOS in MIN 6 Zellen transient mit pcDNA transfiziert und für 24h mit 50 µmol/l mdivi-1 behandelt in (A) quantitativer Auswertung und (B)	72
Abbildung 29 Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Glucokinase und des Insulins in stabil transfizierten MIN 6 Zellen mit pcDNA als Kontrolle und dem Drp1 Negativmutante K38A	73
Abbildung 30 Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Glucokinase und des Insulins in stabil transfizierten MIN 6 Zellen mit pcDNA als Kontrolle und dem Drp1 Überexpressionsvektor	73
Abbildung 31 Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Glucokinase und des Insulins in MIN 6 Zellen mit pcDNA transfiziert und 50 µmol/l mdivi-1 behandelt für 24h	74
Abbildung 32 Exemplarische immunhistochemische Darstellung und Quantifizierung der LC3 Expression	75
Abbildung 33 Exemplarisch Darstellung der mitochondrialen Morphologie	77
Abbildung 34 Exemplarische Darstellung der Verteilung des mitochondrialen Volumens in MIN 6 Zellen mit einer stabilen Expression der Drp1 Negativmutante K38A.	79
Abbildung 35 Exemplarische Darstellung der Verteilung des mitochondrialen Volumens in MIN 6 Zellen mit einer stabilen Expression der Drp1 Überexpression Drp1+	80

Abbildung 36 Exemplarische Darstellung der Verteilung des mitochondrialen Volumens in MIN 6 Zellen mit einer transienten Expression des Leervektor pcDNA und einer Inkubation mit 50 μ mol/l mdivi-1 für 24h.....	81
Abbildung 37 Exemplarische Lebendzellfärbung zur Detektion und Quantifizierung des Membranpotentials	83
Abbildung 38 Exemplarische immunhistochemische Darstellung und Quantifizierung der Superoxidgehalte.....	85
Abbildung 39 Bestimmung des ATP und ADP Gehalts	87
Abbildung 40 Untersuchung der Glucose-stimulierten Insulinsekretion in den stabilen Klonen	89
Abbildung 41 Untersuchung der Glucose-stimulierten Insulinsekretion in mdivi-1 behandelten Zellen.	90
Abbildung 42 Forschungsgebiete des mdivi-1 nach [176].....	92
Abbildung 43 Streuung der eingesetzten mdivi-1 Konzentrationen in vitro (links) und in vivo/ ex vivo (rechts) Untersuchungen nach [176].....	93
Abbildung 44 Übersicht der generierter Ergebnisse für MIN 6 Zellen.....	104

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Transfektionsansatz des Plasmid-DNA Mastermix.....	38
Tabelle 2 Transfektionsansatz des jetPei® Mastermix	38
Tabelle 3 Cycler Programm zur Synthese von cDNA	40
Tabelle 4 Reaktionsansatz zur quantitativen Real-Time PCR.....	41
Tabelle 5 Real-Time PCR Programm des Piko Real 96.....	41
Tabelle 6 Pipettierschema der BSA - Eichgerade	43
Tabelle 7 Mastermix Zusammensetzung des Pro BCA Assay Kit in Abhängigkeit der Probenanzahl	43
Tabelle 8 Darstellung verwendete Fluorophore und ihr Spektrum	47
Tabelle 9 Darstellung verwendeter Lebendzellfarbstoffe und ihrer Spektren	48
Tabelle 10 ATP - Standardreihe	49
Tabelle 11 Beeinflussung von Drp1 in MIN 6 Zellen	52

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Klassifikation und Definition

Diabetes mellitus ist der Überbegriff unterschiedlich pathologischer Stoffwechselerkrankungen, deren gemeinsame Charakteristik sich in einem dauerhaft erhöhten Plasmaglucosespiegel manifestiert [1]. Unterschieden werden kann hierbei zwischen dem Diabetes mellitus Typ 1, der sich durch einen absoluten Insulinmangel aufgrund des Verlusts von pankreatischen Betazellen auszeichnet und dem Diabetes mellitus Typ 2, dessen Pathogenese in einer Minderung der Insulinwirksamkeit in Assoziation mit einer relativen Insulinsekretionsstörung liegt [1, 2]. Als eine der molekularbiologischen Ursachen für eine – dem Diabetes zu Grunde liegende – Dysfunktion oder Verlust der Betazellen, wird ein Defekt der Mitochondrien diskutiert [3, 4].

Ein Diabetes mellitus wird diagnostiziert, sofern

- der HbA1c-Wert $\geq 6,5\%$ ($\geq 48\text{ mmol/mol}$) bemessen wird
- und/oder der Gelegenheits-Plasmaglucosewert $\geq 11,1\text{ mmol/l}$ (200 mg/dl)
- und/oder der venöse Nüchtern-Plasmaglucosewert (nach 8 – 12h Nahrungs- und Alkoholkarenz) $\geq 7\text{ mmol/l}$ (126 mg/dl)
- venöser Plasmaglucosewert nach 2h oralen Glucosetoleranz Test $\geq 11,1\text{ mmol/l}$ (200 mg/dl) [5, 6]

Die chronische Hyperglykämie kann schwerwiegende Langzeitschäden in verschiedenen Geweben, wie dem kardiovaskulären System [7–9], dem zentralen Nervensystem [10–12], dem Auge [13], der Leber [14] und den Nieren [13, 15] hervorrufen. Seit Jahren zeigen sich weltweit steigende Zahlen für die Morbidität des Diabetes mellitus ([16–21]). Als Grund für den Anstieg des Diabetes mellitus Typ 2, wird insbesondere der vermehrte Konsum von verarbeiteten und zuckerhaltigen Lebensmitteln bei gleichzeitiger verminderter körperlicher Aktivität vermutet, was Risikofaktoren wie Übergewicht und Bluthochdruck begünstigt [22–24]. Aufgrund des demografischen Wandels, der besseren medizinischen Versorgung und der damit einhergehenden höheren Lebenserwartung, werden sinkende Patientenzahlen in den kommenden Jahrzehnten nicht erwartet. 2021 litten 573 Millionen Menschen zwischen 20 und 79 Jahren an Diabetes mellitus (2021), 6,2 Millionen davon lebten in Deutschland [6]. Die Diagnose bedeutet für die Betroffenen eine starke Minderung der Lebensqualität und eine hohe Belastung des Gesundheitssystems [21, 25, 26]. Kahn et al. errechneten 2019, dass die Ausgaben an Gesundheitsgeldern für einen Diabetespatienten etwa 3,2-mal höher sind, als die üblichen Ausgaben pro Kopf. Bei Komplikationen steigen die Kosten sogar bis auf das 9,4-

fache [26]. Komplikationen ergeben sich aus den auftretenden Folgeerkrankungen, wie das diabetische Fußsyndrom, diabetische Retinopathie, und diabetische Nephropathie, die mit der steigenden Inzidenzen des Diabetes mellitus vermehrt auftreten [27, 28].

1.1.2 Diabetes mellitus Typ 1

Der Diabetes mellitus Typ 1, ist eine Form des Diabetes, die sich durch den Verlust der Insulinproduktion aufgrund kontinuierlicher Zerstörung der Insulin-sezernierenden Betazellen charakterisiert. Innerhalb der Kategorie des Diabetes mellitus Typ 1 unterscheidet man zwischen der autoimmunologischen Form, bei welcher autoimmune Prozesse zum Untergang der Betazellen führen [29, 30] und der idiopathischen Form. Bei dieser ist kein permanenter Insulinmangel vorherrschend, stattdessen kommt es zu kurzen Episoden schwerer hyperglykämischer Symptome bei niedrigen HbA1c Werten und hohen pankreatischen Enzymkonzentrationen im Serum [31]. Für die Diagnose werden serologische Marker bestimmt in Form von:

- Inselzellenantikörper (ICA) [29]
- Insulinantikörper (IAA) [30]
- Autoantikörper gegen die Glutamat-Decarboxylase in Betazellen [32–34]
- Autoantikörper gegen die Trypsinphosphatase (IA-2A) [32–34]
- Autoantikörper gegen den Zinktransporter 8 der Betazelle (ZnT8) [35]

Von der American Diabetes Association (ADA) werden drei Stadien für die Diagnose empfohlen: Im präsymptomatischen Stadium 1 können zwei serologische Marker bei Normoglykämie nachgewiesen werden. Das präsymptomatische Stadium 2 liegt vor bei Auftreten zweier Autoantikörper und dem Vorhandensein einer gestörten Glucosetoleranz oder eines abweichenden Nüchternglucosewertes. Stadium 3 charakterisiert sich durch das Auftreten einer Hyperglykämie nach den Glucosekriterien für einen Diabetes (siehe 1.1.1) [36]. Als Ursachen für das Auslösen einer derartigen Autoimmunreaktion gegen die Betazellen des Pankreas werden neben der genetischen Vorbelastung und der Einwirkung verschiedener Umweltfaktoren vor allem die Ernährung während der Schwangerschaft und im frühen Kindesalter, sowie virale Infektionen in den ersten Lebensmonaten diskutiert [37]. Aufgrund der mangelnden Kenntnisse zu den Ursachen des Diabetes mellitus Typ 1, ist es bisher nicht gelungen wirkungsvolle Präventionen zu entwickeln [5]. 2019 waren knapp 373 000 Menschen in Deutschland mit einem Typ 1 Diabetes mellitus diagnostiziert [38]. Der epidemiologische Gipfel in der Manifestation des Typ 1 Diabetes liegt kurz vor der Pubertät, wobei die Manifestation generell in jedem Alter auftreten kann [39]. Eine so frühe Diagnose bedeutet eine langanhaltende Belastung für den Körper und ein mit dem Alter steigendes Risiko für Komorbiditäten und Komplikationen [40]. Studien in Schweden und Australien gaben an, dass

eine Diabetes mellitus Typ-1 Erkrankung die Lebenserwartung der Betroffenen um 10 – 12 Jahre senkt [41, 42]. Durch zusätzliche Risikofaktoren, wie Rauchen oder eine schlechte Einstellung des Blutzuckers, wird die Lebenserwartung der Patienten weiter verkürzt [43]. Aus diesen Gründen ist eine Früherkennung und gezielte Therapie zur Vermeidung weiterer Komplikationen für die Betroffenen von dringender Notwendigkeit.

1.1.3 Diabetes mellitus Typ 2

Der Diabetes mellitus Typ 2 wird charakterisiert durch eine Insulinresistenz bei relativem Insulinmangel. Aufgrund eines Defekts reagieren die Zellen nicht mehr sensitiv auf Insulin, wodurch Glucose vermehrt außerhalb der Zellen im Blut verbleibt und eine Hyperglykämie bedingt. Häufig kommt es zunächst zu einer verstärkten Insulinsekretion des Pankreas, um der Resistenz entgegenzuwirken, die schlussendlich aus der chronischen Hyperglykämie resultiert [44, 45]. Der Diabetes mellitus Typ 2 manifestiert sich meist schleichend. Obwohl in vielen Fällen bereits Jahre vor der Diagnose eine Störung der Blutzuckerregulation nachweisbar ist [44], wird die Erkrankung aufgrund unspezifischer Symptome häufig erst spät erkannt. Zu den typischen Symptomen gehören, genau wie im Falle eines Diabetes mellitus Typ 1, die Polyurie (krankhaft erhöhte Urinausscheidung) und begleitende Polydipsie (chronisch gesteigertes Durstgefühl), sowie Seh-Störungen und die vermehrte Produktion von Ketonkörpern, die eine Ketoazidose verursachen können [46]. Die anfänglichen Symptome des Diabetes mellitus Typ2 sind zunächst gemildert und das Risiko einer Ketoazidose niedriger, als beim Diabetes mellitus Typ 1, aber Studien zeigen, dass Patienten des Diabetes mellitus Typ 2 im Gegenzug häufiger Komplikationen erleiden [47]. Ein Grund hierfür wird darin vermutet, dass sich bei Typ-1-Patienten ein metabolisches Syndrom erst mit der Dauer der Erkrankung entwickeln kann, während es bei Patienten des Diabetes mellitus Typ 2 bereits von Beginn an vorhanden ist [48]. Dabei ist die meistverbreitete Komorbidität beim Typ-2-Diabetes die Hypertonie, gefolgt von der Neuropathie [28]. Als Hauptrisikofaktoren, welche die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ-2 begünstigen, gelten Übergewicht und mangelnde körperliche Bewegung [17, 49]. Weiterhin steigern auch eine genetische Vorprägung, Rauchen, eine nicht-alkoholische Fettleber, Hypertonie, Dyslipidämie und die ethnische Herkunft das Risiko einer Erkrankung [22]. Die unterschiedliche Prävalenz zwischen Ost- (11,5%) und Westdeutschland (9%) [18], sowie die Verteilung im ländlichen (8,3%) und urbanen Bereich (12,1%) [6] und ein genrelles Auftreten bei Unter- bis Normalgewichtigen Patienten [50] zeigen, dass das Risiko einer Diabetes mellitus Typ 2 Erkrankung multifaktoriell ist. Bei 90% der weltweiten Diabetes mellitus Diagnosen, handelt es sich um einen Typ-2-Diabetes [6]. Eine besorgniserregende Entwicklung zeichnet sich unter Kindern und Jugendlichen ab, unter denen in Deutschland jährlich etwa 175 Neuerkrankungen auftreten (Stand: 2014 - 2016) [38]. 2021 waren 6,2

Millionen Menschen von einem Diabetes mellitus Typ 2 in Deutschland betroffen. Hochrechnung ergaben, dass sich diese Zahl bis 2040 um 21% auf einen Wert von 8,9 Millionen steigern wird [19]. Der Diabetes mellitus Typ 2 zeigt ein äußerst heterogenes Krankheitsbild und erfordert aus diesem Grund eine möglichst individuell auf den Patienten zugeschnittene Therapie [51, 52]. Ein wichtiger erster Schritt besteht in der Minderung des Körpergewichts durch eine angepasste Ernährung und einer Steigerung der Aktivität [53]. Begleitend wird häufig eine Kombination oraler Antidiabetika verabreicht. Hierbei ist Metformin in den meisten Fällen das Medikament der Wahl, aufgrund guter Verträglichkeit und geringem Risiko einer Hypoglykämie [52, 54]. Erst als letzte mögliche Therapie sollte Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 eine Insulinsubstitution verschrieben werden [54], wie sie bei Menschen mit diagnostizierten Diabetes mellitus Typ 1 zwingend erforderlich ist.

1.2 Die Betazelle des Pankreas

Die pankreatische Betazelle gehört zu den endokrinen Zellen. Ihre Hauptfunktion besteht in der Produktion, Speicherung und Freisetzung von Insulin zur strikten Regulation der Blutglucosekonzentration. Dabei zeigen die Betazellen ein hohes Maß an Adaptionsfähigkeit für verschiedene Stimuli und Anforderungen des Körpers [55]. Betazellen sind Bestandteil der Langerhans'schen Inseln, die 1 – 2 % des gesamten Pankreas bilden [56]. Innerhalb der Inseln stellen Betazellen 60 – 70 % der darin auftretenden Zellen dar [57, 58]. Mit den zusätzlich in Inselzellen befindlichen Glucagon-produzierenden α -Zellen, so wie den Somatostatin-enthaltenden δ -Zellen und den pankreatischen Polypeptid produzierenden Zellen stehen die innerhalb der Insel verteilten Betazellen in hoher Konnektivität [58], um die Glucosehomöostase aufrecht zu erhalten. Dabei beweisen Langerhans'sche Inseln eine hohe Plastizität, sowohl in verschiedenen Spezies, als auch in unterschiedlichen Zuständen, in denen der Organismus sich befindet. Beispielsweise bei einer Schwangerschaft oder bei Auftreten von Übergewicht variiert die Menge und Verteilung der jeweiligen Zellspezies, um sich den Anforderungen anzupassen [59]. Im Falle einer Diabetes Erkrankung ist bei Typ-1-Diabetikern eine signifikante Reduktion der Insulinproduzierenden Betazellen zu erkennen, während Typ-2-Diabetiker keine strukturelle Veränderung der Inseln aufzeigen [60]. Jedoch weist die Population von Betazellen innerhalb der Inseln selbst Heterogenität in ihren Eigenschaften und Funktionen auf [61]. So konnten bei Typ-2-Diabetikern eine unterschiedliche Verteilung von Betazell-Subtypen nachgewiesen werden, die sich von gesunden Inselzellen unterscheiden [62].

1.2.1 Insulinsekretion und seine Wirkung

Insulin ist das einzige blutzuckersenkende Hormon des menschlichen Körpers. Seine Sekretion erfordert eine exakte Regulation, um die ausreichende Menge Insulin im

notwendigen Timing zu garantieren [63]. Die Wirkung des Insulins entfaltet sich durch die Bindung an seinen spezifischen Rezeptor auf der Zellmembran insulinempfindlicher Gewebe, der über seine Tyrosinkinaseaktivität eine Signalkaskade im Inneren der Zelle auslöst [76]. In Folge der Insulinbindung kommt es zur Translokation von intrazellulärer Membranstrukturen in Form von Glucosetransportern, die in die Zellmembran eingebaut werden, wodurch die zelluläre Glucoseaufnahme, insbesondere in Skelettmuskulatur und Fettzellen, erhöht wird [77]. Hepatisch wirkt Insulin vorrangig darauf, die Glucosefreisetzung und Gluconeogenese zu inhibieren [78]. Zusätzlich wirkt Insulin sich auf den Fettstoffwechsel aus, indem es den Aufbau von Triacylglyceriden fördert, während die Lipolyse drastisch gehemmt wird. Seine anabole Wirkung zeigt Insulin durch die Förderung der Aufnahme essentieller Aminosäuren und der Proteinbiosynthese, bei gleichzeitiger Herabsetzung der Proteolyse und Aminosäureabgabe [79].

Als stärkster Stimulus für die Insulinsekretion wirkt die Steigerung der Plasmaglukosekonzentration nach Aufnahme kohlenhydratreicher Nahrungsmittel [64, 65]. Glucose wird von Betazellen über den Glucosetransporter GLUT1 aufgenommen [66]. Eine Veränderung der Glukosekonzentration im Blut wird innerhalb der Betazelle mit Hilfe des Enzyms Glukokinase wahrgenommen [67]. Aufgrund ihrer geringen Affinität zum Edukt der Glucose, wird erst bei einem erhöhten Blutglukoselevel, diese von der Glukokinase der Betazelle zu Glucose-6-phosphat umgesetzt, wodurch das Enzym der Zelle als zuverlässiger Sensor dient [68]. Nach Umsatz der Glucose zu Glucose-6-phosphat, wird dies in der Glykolyse unter ATP Gewinn zu Pyruvat umgesetzt. Dies wird der Atmungskette in den Mitochondrien der Zelle zugeführt und durch die vollständige Oxidation des Moleküls und dem entstehenden Protonengradienten weitere Moleküle ATP generiert. So kommt es in Gegenwart von Glucose zu einer Depolarisation der Betazelle [69], ausgelöst durch die Änderung der ATP/ADP Ratio innerhalb der Zelle, in Folge der Metabolisierung der Glucose [55, 70]. Dies resultiert in einer Schließung von K^+ - Kanälen, welche die Depolarisation initiieren mittels Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle. Der Einstrom von Ionen führt zur Insulinausschüttung [71, 72]. Ca^{2+} wirkt hier als Antrieb für die Fusion der Insulingefüllten Vesikel mit der Plasmamembran der Zelle [73]. Die Insulinantwort der Betazelle erfolgt biphasisch. Zunächst kommt es zu einer schnellen ersten Insulinsekretion (5-10 min) aus Vesikeln des ‚Readily releasable Pool‘, gefolgt von einer zweiten Antwort mit einer langsam konstant ansteigenden Insulinmenge aus dem ‚Reserve Pool‘ stammend [74, 75]. Durch eine pulsatile Ausschüttung des Insulins wird die Wirkung des Hormons auf seine peripheren Zielorgane verstärkt [76]. Unterschieden wird zwischen der basalen Insulinsekretion – welche eine besondere Rolle in der Aufrechterhaltung des Blutglukosespiegels im nüchternen Zustand spielt – und der stimulierten Sekretion. Der basale Insulinbedarf ist nahrungsunabhängig und sorgt für ein Gleichgewicht zwischen dem Glucoseverbrauch und der hepatischen Produktion.

Sobald dem Körper Glucose zugeführt wird, erfolgt der Wechsel zur Glucose stimulierten Insulinsekretion. Ein Defekt in einer der beiden Sekretionsformen ist Ursache für eine gestörte Glucosetoleranz. Bei einer Störung beider Formen, sprechen wir von einem Diabetes mellitus [77, 78].

1.3 Das Mitochondrium

1.3.1 Aufbau und Funktion

Die Mitochondrien nehmen als Energieversorger der Zelle eine essentielle Rolle für den Organismus ein. Mit Ausnahme reifer Erythrozyten sind sie ubiquitär im Körper zu finden. Die Zellorganellen besitzen eine durchschnittlichen Länge von 2-8 μm und eine Breite von 0,2-1 μm (siehe Abb. 1) [79]. Der Endosymbionten Theorie zur Folge handelt es sich bei den Mitochondrien um ehemals autonome aerobe Bakterien, welche von einem anaeroben Eukaryoten aufgenommen wurden und mit diesem eine symbiotische Verbindung eingingen [80]. Ein stützendes Argument hierfür bildet das den Mitochondrien eigene Genom, in Form einer zirkulären DNA, die für eine geringe Anzahl mitochondrialer Proteine codiert. Der Großteil der mitochondrialen Proteine wird aber im Zellkern codiert [79, 81]. Ein weiterer Faktor, der die Theorie der Endosymbiose stützt, ist die Begrenzung der Organellen durch eine Doppelmembran, die das Mitochondrium in vier Reaktionsräume unterteilt:

- äußere mitochondriale Membran
- innere mitochondriale Membran
- Intermembranraum
- mitochondriale Matrix [82].

Die innere Membran bildet durch Einstülpungen, die eine zusätzliche Oberflächenvergrößerung ermöglichen, Cristae aus, die in die mitochondriale Matrix hineinragen [83]. In diese Membran integriert befinden sich die Komplexe der Atmungskette und die ATP-Synthase [84, 85]. Neben dem Recycling des ADP zu ATP, besitzen Mitochondrien viele weitere wichtige Funktionen für die Zelle: Sie sind beispielsweise Ort der β -Oxidation, der Harnstoffsynthese in der Leber und Plattform für zahlreiche Signalwege innerhalb der Zelle [81, 86]. Üblicherweise liegen Mitochondrien als hoch dynamisches und interkonnectives Netzwerk vor, das ständigen Fusions- und Teilungsprozessen unterliegt [87]. Form, Anzahl und Verteilung der Organellen werden dabei von den energetischen Bedürfnissen des Gewebes beeinflusst [86]. Zusätzlich zeigen sie ein hohes Level an Pleomorphismus, so dass bereits die Mitochondrien innerhalb einer Zelle starke Unterschiede in ihrer Form und in der Anzahl der Cristae aufweisen [88, 89].

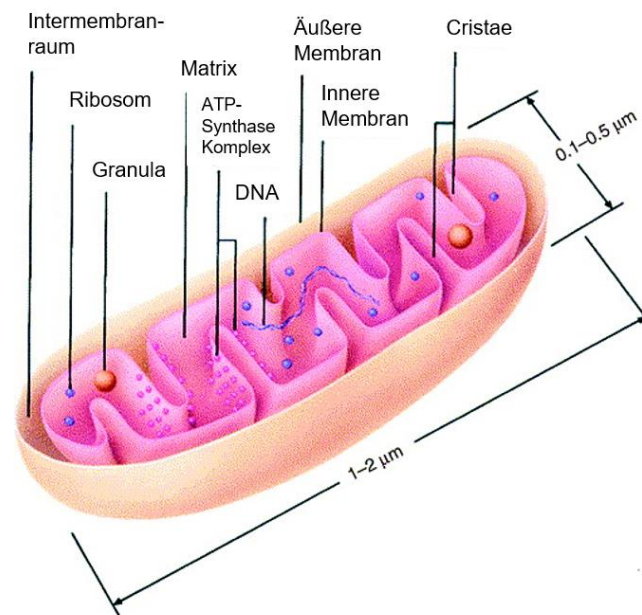


Abbildung 1 Schematischer Aufbau eines Mitochondrion bearbeitet nach [89]

1.4 Mitochondriale Dysfunktion in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2

Aufgrund ihrer Rolle in der Energieversorgung der Zelle, hat eine Dysfunktion der Mitochondrien häufig schwerwiegende Folgen für den Organismus. Störungen der mitochondrialen Funktion werden diskutiert als Ursache unterschiedlicher Erkrankungen, unter anderem beim Diabetes mellitus Typ 2 [90]. Aufgrund fehlender Reparaturmechanismen und der Ermangelung von Histonen, bietet die mitochondriale DNA ein leichtes Ziel für Schäden. Die hohe Anzahl an Mitochondrien innerhalb einer Zelle, ermöglicht das gleichzeitige Auftreten geschädigter und gesunder Mitochondrien, was als Heteroplasmie bezeichnet wird [84]. Eine Verschiebung des Verhältnisses zu einem übermäßigen Aufkommen dysfunktionaler Mitochondrien kann Auslöser für die Ausbildung eines Defekts im Gewebe sein. Eine naheliegende Hypothese für das vermehrte Auftreten von Komplikationen im Alter wird mit der Akkumulation defekter Mitochondrien über die Jahre geliefert. Eine Dysfunktion der Mitochondrien ist häufig Folge einer gesteigerten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Verbindung mit einer geminderten antioxidativen Wirkung zum Beispiel der Superoxid Dismutasen [91, 92]. In manchen Fällen kommt es bei den Mitochondrien außerdem zur Ausbildung von Permeability-transition-pores, welche einen Kollaps des Membranpotentials und ein damit einhergehendes Absterben der Organelle zur Folge haben [93]. Eine Dezimierung der Mitochondrien Anzahl in der Zelle wiederum, führt zu unvollständigen Abläufen des Fettsäuremetabolismus und zur Entstehung toxischer

Metabolite, welche sich anreichern und das Gewebe beispielsweise für eine Insulinresistenz anfällig machen [94, 95]. Eine zusätzliche Minderung der Phosphorylierungskapazität hat eine Verringerung der Plastizität des mitochondrialen Netzwerks zur Folge, um sich an die energetischen Bedürfnisse der Zelle anzupassen [96]. So ergaben Studien von Petersen et al., dass ein Rückgang der mitochondrialen Phosphorylierung mit steigendem Alter mit einer Insulinresistenz assoziiert ist [97]. Ein besonderes Risiko zur Ausbildung eines Diabetes mellitus Typ 2 bei einem gestörten mitochondrialen Metabolismus zeigt sich, wenn Leber, Fettgewebe oder Muskel davon betroffen sind [98, 99]. Genetische Studien an Ratten ergeben zusätzlich, dass mögliche – auch spontan auftretende – Mutationen innerhalb des mitochondrialen Genoms, das Risiko für eine metabolische Störung, die eine Insulinresistenz zur Folge hat, begünstigen [100]. In Betazellen haben die Mitochondrien und ihr tubulär ausgebildetes Netzwerk [101] eine essentielle Rolle, in dem es die Nährstoffversorgung über die ATP Generierung sensiert und in die Sekretion von Insulin übersetzt. Eine Störung der Balance aus Fusions- und Teilungsprozessen der Mitochondrien in Betazellen hat schwerwiegende Folgen, in Form von Dysfunktionen bis hin zum vollständigen Funktionsverlust. Eine solche Veränderung der Betazellfunktion hat dabei immer Auswirkung auf den Metabolismus des Organismus [102].

1.5 Mitochondriale Dynamik

Mitochondrien besitzen eine essentielle Rolle bei der Energie Homöostase der Zelle, durch die Bereitstellung von ATP. Zur optimalen Versorgung muss eine Anpassung an energetische Bedürfnisse erfolgen. Dazu und zur Erhaltung einer gesunden mitochondrialen Population bilden Mitochondrien ein hoch dynamisches Netzwerk. Dieses verändert sich aktiv innerhalb der Zelle durch gerichteten Transport entlang von Aktinfilamenten [103], erneuert sich durch ständige Fusions- und Teilungsprozesse und durchläuft eine Qualitätskontrolle durch den selektiven Abbau mittels Autophagie [104, 105]. Beeinflusst werden diese Vorgänge unter anderem von der Nährstoffversorgung der Zelle [106–108], physischem Training [109] und dem Alterungsprozess [110–113]. Aufgrund der engen Verzahnung der dynamischen Abläufe, haben Störungen der Dynamik auf jeder Ebene, mitochondriale Dysfunktionen zur Folge, die die Ursache für zahlreiche degenerative Krankheiten bilden oder ihre Pathogenese fördern können [114, 115]. Gleichzeitig bietet die Regulation der mitochondrialen Dynamik ein vielversprechendes Ziel für klinische Therapien [109, 116, 117].

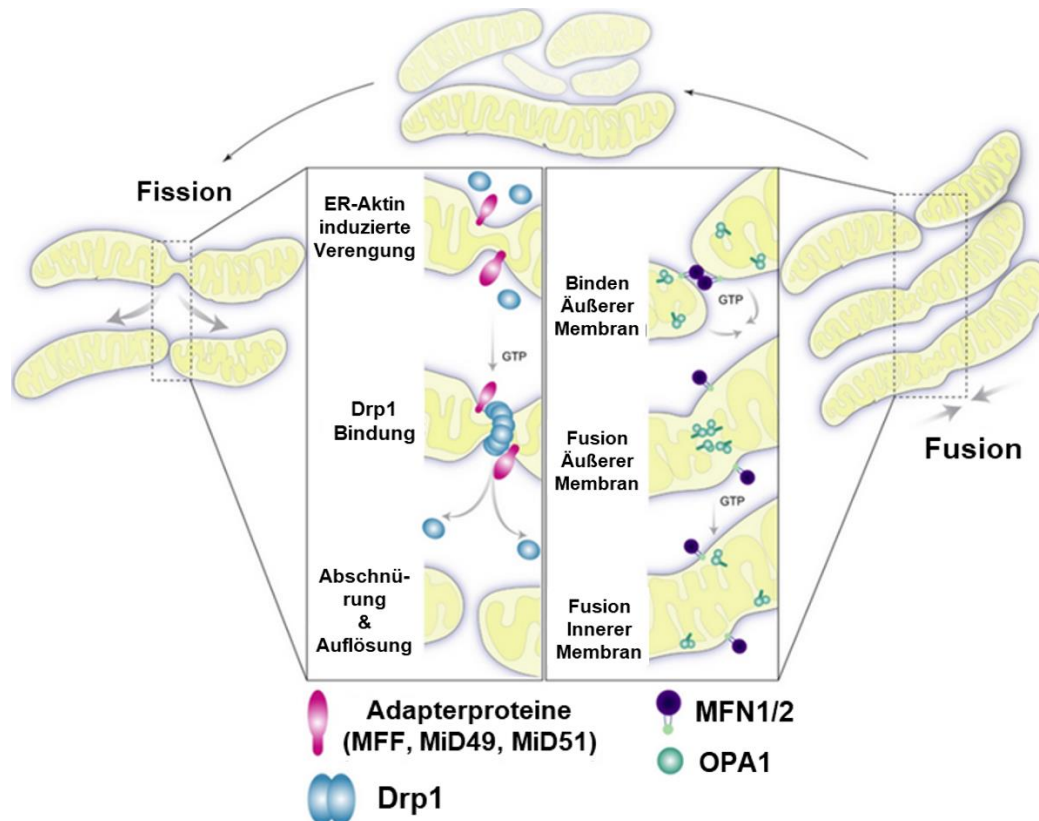


Abbildung 2 Die mitochondriale Dynamik schematisch dargestellt nach [118]

1.5.1 Mitochondriale Fusion

Die mitochondriale Fusion wird durch drei GTPasen kontrolliert. Die Fusion der äußeren mitochondrialen Membran wird durch die homologen Proteine Mitofusin 1 (Mfn1) und Mitofusin 2 (Mfn2) reguliert, während in der inneren Membran das Optische Atrophie Protein 1 (Opa1) wirkt [119]. Opa1 erhielt seinen Namen aufgrund der Entdeckung, dass eine Mutation dieses Proteins Ursache für die autosomal dominant vererbte Optikusatrophie bildet [120]. Eine Mutation im Mfn2, führt zu Nervenschädigungen und zur Ausbildung der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung [121]. Für die Fusion zweier Mitochondrien muss zunächst eine räumliche Nähe gegeben sein. Sobald zwei Mitochondrien Kopf-an-Kopf oder Kopf-an-Seite in Verbindung treten, kann es zur Fusion der Organellen kommen (siehe Abb. 2) [122]. Die Mitofusine sind als Transmembranproteine in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert. Für die Fusion der Membranen können sie Hetero- oder Homodimere bilden [123, 124]. Eine Fusion der inneren Membran wird im Anschluss durch das Opa1 initiiert, wobei es ausreicht, wenn dieses auch nur in einem der beiden Mitochondrien vorkommt [125]. Neben der Fusion der inneren Membran, besitzt Opa1 eine wichtige Rolle für die Organisation der Cristae [125] und bei der Einleitung der Apoptose [126]. Als spezifisches Substrat oder Energielieferant zum Antrieb der Fusionsprozesse dient das GTP, welches von allen drei GTPasen verbraucht wird [127].

Die Fusion der Mitochondrien bestimmt maßgeblich ihre Morphologie, die Biogenese und ist

essentiell für den Erhalt der Homöostase der Zelle [128]. Sie ermöglicht den Mitochondrien sich untereinander mit Metaboliten, Proteinen und der mtDNA auszutauschen, zu versorgen und mögliche Defekte damit wieder auszugleichen [129]. Ein Fehlen beider Mitofusine wirkt embryonal lethal [123]. Der Funktionsverlust oder die Minderung der Aktivität beider Mitofusine oder des Opa1 führt zur Fragmentierung und Steigerung der Heterogenität innerhalb der Mitochondrien Population, da Störungen des Membranpotentials in einer Subpopulation von Mitochondrien vermehrt auftreten [124, 129, 130]. Die Akkumulation von Mutationen in der mtDNA hat schwere Dysfunktionen zur Folge [131], wie die einer geminderten Respiration [124], einer Glucoseintoleranz [130], bis hin zu Atrophien [122].

1.5.2 Mitochondriale Teilung

Das Gegenstück der mitochondrialen Fusion bildet die mitochondriale Teilung. Sie dient vorrangig der Verteilung der Mitochondrien auf die Zellen nach Zellteilung und der Qualitätskontrolle des Netzwerks. So können beschädigte Komponenten in kleinen Mitochondrien isoliert und dem Abbau mittels Autophagie zugeführt werden [132–134]. Die Maschinerie der Fission setzt sich zusammen aus der GTPase Dynamin-related Protein 1 (Drp1) und seinen membrangebundenen Rezeptoren an der äußeren mitochondrialen Membran [135]. Das Drp1 ist ein ubiquitär, cytosolisch vorkommendes Protein, das für die Teilung an die Mitochondrien rekrutiert wird. Die Bindung an seine Adaptern bildet die Initiation des Mechanismus. Aus Untersuchungen in der Hefe ist Fis1 als Hauptrezeptor an der äußeren Mitochondrienmembran bekannt, welches gemeinsam mit Mdv1 und Caf4 agiert, um Drp1 an die Mitochondrien zu rekrutieren [136, 137]. Studien zur mitochondrialen Dynamik ergaben, dass die Bindung von Drp1 und Fis1 in Säugetieren jedoch eine andere Bedeutung und Funktion besitzt, die noch nicht vollständig geklärt ist [138]. Der Mitochondrial Fission Factor (Mff) wurde in Säugern als Drp1-Rezeptor mit essentieller Rolle für die Teilung bestimmt [138, 139]. Mff ist ein membrangebundenes Protein mit GTPase Aktivität, das fähig ist Drp1 mittels transients Bindung an die Mitochondrien und an Peroxisomen zu rekrutieren [138]. Ein Verlust des Proteins führt zur Minderung der Teilungsereignisse [139]. Zwei weitere transmembrane Proteine der äußeren Mitochondrienmembran, gehören zur Fissions-Maschinerie aufgrund ihrer Adapterfunktion für das Drp1: Das MiD49 und MiD51 [140, 141]. Die beiden Proteine zeigen sich unabhängig der anderen Adapterproteine und mit einer eindeutigen Spezialisierung auf die mitochondriale Dynamik [142]. Eine weitere wichtige Rolle für die Teilung der Mitochondrien, wird dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) beigemessen. Untersuchungen ergaben, dass dort, wo ER und Mitochondrium in direktem Kontakt stehen – insbesondere da, wo das ER das Mitochondrium umschließt – die Orte sind, an denen die Teilung abläuft [143]. Als Funktion für das ER an dieser Stelle wird vermutet, dass es den

Durchmesser des Mitochondrium verringert, und so dem Drp1 den Zugang erleichtert [144]. Durch die Bindung des Drp1 an seine Rezeptoren wird die Teilung initiiert. Nun beginnt das Drp1 zu polymerisieren und sich in Form einer Helix um das Mitochondrium zu legen (siehe Abb.2) [145]. Durch die Hydrolyse von GTP kommt es zur Kontraktion der Spirale, was eine Abschnürung der Mitochondrien voneinander zur Folge hat [146]. Dem Prozess der Teilung wird zusätzlich eine Rolle im Signalweg des gezielten Zelltods - der Apoptose – zugeschrieben. Eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks und die Freisetzung des Cytochrom c, konnte bei Untersuchungen nahezu zeitgleich bemessen werden [147]. Eine Inhibition der Teilung durch geminderte Expression von Drp1 verzögert den Vorgang der Apoptose, ohne ihn gänzlich zu verhindern [148]. Gleichzeitig hat eine Minderung der mitochondrialen Teilung auch den Verlust von mtDNA, eine Abnahme der Respiration und damit verbunden geringere ATP Level zur Folge, sowie eine verstärkte Produktion von ROS, die schädlich auf die Zelle und ihre Mitochondrien wirken [133].

1.5.2.1 Das Teilungsprotein Drp1

Hauptmediator der mitochondrialen Teilung ist das Dynamin related-protein 1 (Drp1) [149]. Dabei handelt es sich um eine cytosolische GTPase mit einer Größe von etwa 80 kDa [150]. Seine zentrale Rolle zeigt sich in seiner stark konservierten Sequenz, die sich in allen Arten und Reichen der Lebewesen und zellulären Organismen wieder findet [150, 151]. Eine Mutation im Drp1 codierenden Gen mit vollständigem Funktionsverlust, kann sich embryonal lethal auswirken, aufgrund schwerer Fehlbildungen im Gehirn [152, 153]. Als Mitglied der Dynamin ähnlichen Proteinfamilie besitzt das Drp1 einen typischen Aufbau bestehend aus

- a) N-terminaler GTPase,
- b) einer Mitteldomäne,
- c) der Insert B Domäne,
- d) einer GTP Effektor Domäne und
- e) dem prolinreichen C-Terminus [154].

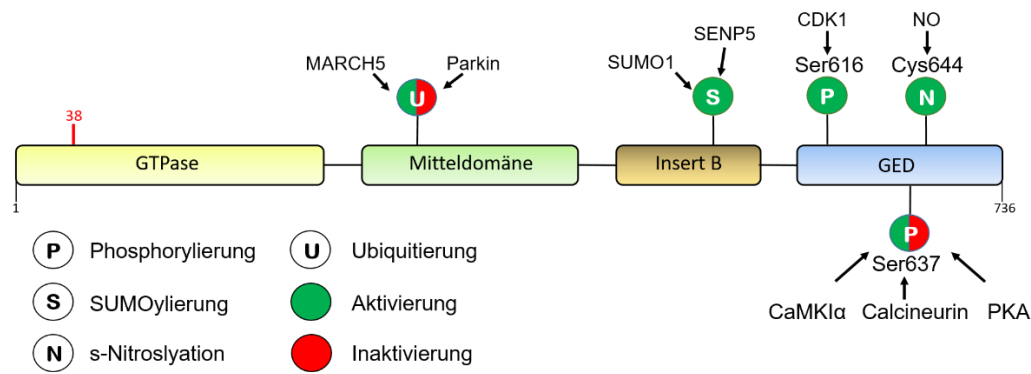


Abbildung 3 Aufbau des Dynamin related-protein 1 mit seinen Domänen und seine posttranslationalen Modifikationen aktivierend (grün) und inhibierend (rot), einschließlich der Markierung der Punktmutation zur Herstellung der Drp1 Negativmutante K38A, erstellt nach [155]

Drp1 tritt im Cytosol ursprünglich als Di- oder Tetramer auf. Eine Bindung von Drp1 an seine Adapter über die Insert B Domäne initiiert die Teilung [156, 157]. In Gegenwart von GTP oligomerisiert Drp1 zu helikalen Strukturen, die sich tubulär um Mitochondrien und Peroxisomen formen [158–160]. Die Hydrolysierung des gebundenen GTP führt zur Kontraktion des Drp1-Polymers, was eine Abschnürung der Mitochondrien an dieser Stelle voneinander zur Folge hat (siehe Abb.4) [146].

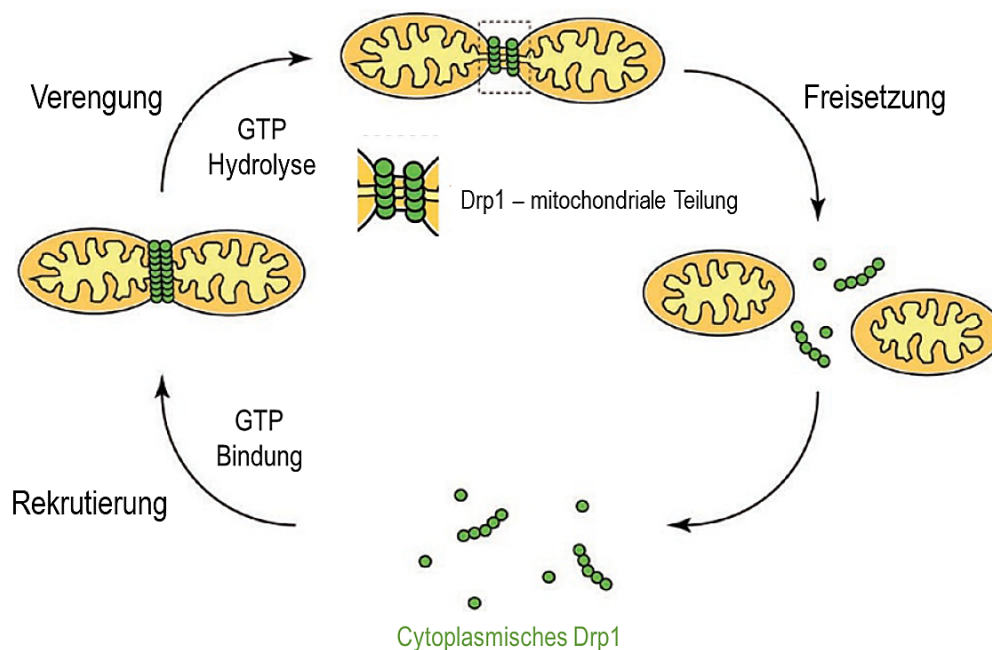


Abbildung 4 Reaktion des Drp1 am Mitochondrium; Abbildung nach [146]

Reguliert wird die Drp1 Aktivität während dieses Prozesses durch posttranslationale Modifikationen. Die Phosphorylierung von Serinresten im Protein besitzt je nach Lokation eine aktivierende oder inhibierende Wirkung auf die GTPase Aktivität oder beeinflusst die

Rekrutierung von Drp1 an die Mitochondrien (siehe Abb.3). Weitere nachgewiesene Modifikationen sind SUMOylierung, s-Nitrosylation oder die Ubiquitierung [161–163]. Die strenge Regulation des Drp1 zeigt, die essentielle Rolle, welches es bei der Teilung der Organellen für den Organismus besitzt. Eine Punktmutation innerhalb der GTP-Bindedomäne hat einen dominant negativen Effekt auf die Funktion des Drp1 [164]. Die Drp1 Negativmutante K38A – welche eine Punktmutation an der Aminosäure 38 in seiner Bindedomäne besitzt –, ist eine etablierte Form für Analysen zur Funktion und Bedeutung des Teilungsproteins [149]. Weitere Untersuchungen zeigten außerdem, dass im menschlichen Körper verschiedene Isoformen von Drp1 existieren, die insbesondere im neuronalen Gewebe deren Aktivität und Zielstrukturen beeinflussen [165, 166]. Aufgrund der hohen Bedeutung für die mitochondriale Teilung und dem Zusammenhang zwischen einer gestörten mitochondrialen Dynamik und der Ausbildung von – insbesondere neurodegenerativer – Krankheiten [155, 167], ist das Drp1 Protein ein interessantes Ziel für die Forschung an neuen Therapieansätzen [168, 169]. In Untersuchungen zeigte sich, dass Drp1 ebenso einen wichtigen Einfluss auf die Insulinsekretion hat [170, 171] und seine Regulation somit mit protektiven Eigenschaften für das betroffene Gewebe assoziiert wird [168, 172]. Für MIN 6 Zellen wurde in anderen Untersuchungen nach der Suppression der Drp1 Expression ein Protonenverlust mit der Folge einer geminderten Insulinsekretion und ATP Synthese nachgewiesen [171].

1.5.2.2 Der Drp1-Inhibitor mdivi-1

Das Chinazolin Derivat ‚mitochondrial division inhibitor‘ (mdivi-1) ist ein chemischer Inhibitor des Drp1, der 2008 von der Arbeitsgruppe um Cassidy-Stone bei einem Screening identifiziert wurde. Gesucht wurde in dieser Studie ein Molekül zur Herabregulation der Drp1-abhängigen mitochondrialen Teilung, das zur Verhinderung der Initiation der Apoptose führen sollte [173]. Mdivi-1 wirkt, in dem es durch seine allosterische Bindung an Drp1 eine Zusammenlagerung der Proteine am Mitochondrium und die darauffolgende kollektive GTP Hydrolyse verhindert [173].

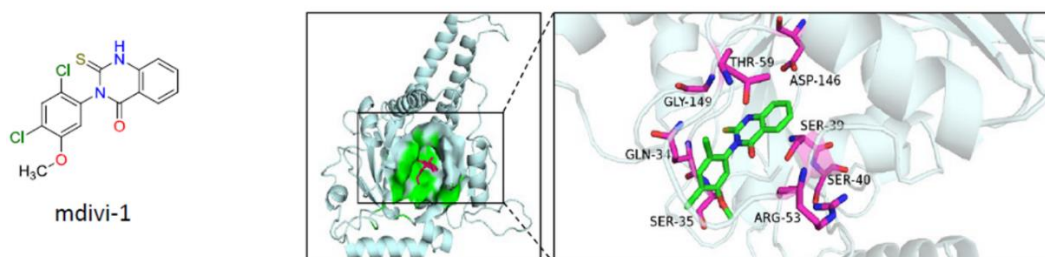


Abbildung 5 Chemische Strukturformel des Chinazolin Derivat mdivi-1 und seine Interaktion mit seiner Zielstruktur Protein; Abbildung nach [174]

Die Inhibition ist reversibel und tritt bereits nach kurzer Inkubationszeit auf [175–177]. Während mdivi-1 bei seiner Entdeckung als selektiv für Drp1 galt [173], wird diese Spezifität und seine Wirkung auf das Drp1 in den letzten Jahren kontrovers diskutiert [178, 179]. 2017 stellte die Arbeitsgruppe um Bordt et al. die spezifische Wirkung des mdivi-1 in Frage, nachdem sie dessen Effekte für das in Säugetieren vorkommende Drp1 (im Vergleich zum in Hefe vorkommenden Analogon Dnm1), nicht reproduzieren konnten. Stattdessen fanden Sie eine inhibitorische Wirkung des Moleküls auf den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette [178].

Einige Studien zeigen Drp1 unabhängige Wirkungen von mdivi-1 [175, 180], während der größere Teil an Untersuchungen Effekte auf die Mitochondrien, über die Drp1-abhängige Teilung nachweist [168, 179, 181, 182]. Die Behandlung mit mdivi-1 besitzt neuroprotektive Eigenschaften [12, 169, 180, 183]; stabilisiert den Metabolismus [4, 12, 184–187], reduziert die Gewebeschäden durch Ischämie / Reperfusion [175] und zeigt in Zellen anti-fungale, [151, 188] sowie cytotoxische Wirkung auf hyperproliferierende Zellen [176]. Obgleich die Selektivität von mdivi-1 zu diskutieren bleibt, bildet der Inhibitor ein vielversprechendes Ziel zur Entwicklung von Therapeutika [151, 182]. Für Betazellen ist bereits eine Steigerung der Zellvitalität unter hypoxischen Bedingungen durch eine Behandlung mit mdivi-1 bekannt [189]. Für eine Inkubation von MIN 6 Zellen mit mdivi-1 für 1 h, wurde bisher ein inhibitorischer Effekt auf deren Insulinsekretion nachgewiesen [171].

1.6 Zielstellung der Arbeit

Mitochondrien spielen aufgrund ihrer vielseitigen Funktionen eine essentielle Rolle für die Zellhomöostase und somit für die Funktionalität des gesamten Organismus. Zur Aufrechterhaltung ihres Netzwerks sind sie ständigen Fusions- und Teilungsprozessen ausgesetzt. Eine Störung dieser Prozesse führt zu einer mitochondrialen Dysfunktion, was die Ursache für die Pathogenese schwerwiegender Krankheiten sein kann bzw. deren Ausbildung und Entwicklung fördert.

Auch in Betazellen des Pankreas kann solch eine Dysfunktion zum Verlust der Zellfunktion führen. Die mangelnde Versorgung mit Energie in Form von ATP, hat eine Störung der daran gekoppelten Glucose-stimulierten Insulinsekretion zur Folge, die zentrale Bedeutung für die Glucosehomöostase im Blut hat. Zur Aufrechterhaltung eines gesunden Metabolismus benötigen Betazellen eine intakte mitochondriale Dynamik. Das Drp1 Protein ist nicht nur ein zentraler Bestandteil des Teilungsprozesses, sondern für die Vitalität des mitochondrialen Netzwerkes essentiell. Somit hat eine exakte Regulation dieser GTPase eine hohe Priorität für die Zellfunktion. Eine veränderte mitochondriale Teilungsaktivität wird mit der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 in Verbindung gebracht. Aus diesem Grund wurde in der folgenden Arbeit die Wirkung der Drp1 Aktivität auf die Funktion der Betazelle durch i) eine Überexpression des Drp1; ii) der Expression der Drp1 Negativmutante K38A und iii) der Behandlung mit dem chemischen Inhibitor mdivi-1 untersucht und verglichen. Folgende konkrete Ziele wurden bearbeitet:

1. Die Auswirkungen der Drp1 Überexpression und der Inhibition von Drp1 auf Genexpression sowohl von Proteinen der mitochondrialen Dynamik, als auch der Autophagie und im speziellen der Mitophagie in Insulin-sekretierenden MIN 6 Betazellen zu untersuchen.
2. Den Einfluss von Drp1 auf die mitochondriale Atmungskette in Form von Gen- und Proteinexpressionsanalysen in MIN 6 Zellen zu bestimmen.
3. Eine Analyse des Ausmaßes an oxidativen Stress bei Regulation von Drp1 in MIN 6 Zellen mit Hilfe der Bestimmung der ROS Bildung in Lebendzellfärbungen und Analyse der Genexpression oxidativer Abwehrmechanismen.
4. Das mitochondriale Netzwerk in MIN 6 Zellen durch Bestimmung der Morphologie über Volumen und Sphärizität der Mitochondrien sowie des Membranpotential jeweils anhand von spezifischen Fluoreszenz-Lebendzellfärbungen zu charakterisieren.
5. Die Funktion der MIN 6 Zellen mittels der ATP/ADP Ratio und der Glucose-stimulierten Insulinsekretion unter Beeinflussung der Drp1 Aktivität zu bestimmen.

2. Material

2.1 Zellen

Bezeichnung Zelllinie	Spezies	Gewebeherkunft
MIN 6	Maus	Insulinom

2.1.1 Zellkultur-Medium

Medium	Komponenten	Menge	Firma
DMEM (1X) + GlutaMAX TM -I (Dulbecco's modified eagle's medium)	Glucose	4500 mg/l	GIBCO® (Invitrogen), Darmstadt, Deutschland
	Natriumpyruvat	1%	GIBCO® (Invitrogen), Darmstadt, Deutschland
	Hitzeinaktiviertes Fetales Kälberserum (FCS)	10% (v/v)	GIBCO® (Invitrogen), Darmstadt, Deutschland
	Penecelin/Streptomycin	1%	GIBCO® (Invitrogen), Darmstadt, Deutschland
Einfriermedium	FCS	90%	GIBCO® (Invitrogen), Darmstadt, Deutschland
	DMSO	10%	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland

2.2 Transfektionsreagenz

Reagenzien	Hersteller
jetPEI®	Polyplus, Illkirch, Frankreich

2.3 Vektoren

Vektoren	Hersteller
pcDNA 3.1 (+)	Addgene, Teddington, United Kingdom
pcDNA 3.1 (+) Drp1	Addgene, Teddington, United Kingdom
pcDNA 3.1 (-) Myc/His mouse Drp1 K38A	Addgene, Teddington, United Kingdom

2.4 Taqman Sonden

Die verwendeten Genexpressionssonden stammten jeweils von Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts (USA)

Sonde	Assay-Kennung
ATG8	Mm00490678_m1
ATG 9A	Mm01264420_m1
Atp5a1	Mm00662408_m1
ATP8	Mm04225236_g1
Catalase	Mm01340247_m1
Dnm1l (Drp1)	Mm01342914_m1
Fis1	Mm00481579_m1
GAPDH	Mm99999915_g1
Gluthationperoxidase	Mm00656767
Mff	Mm00512718_m1
Mfn1	Mm01289369_m1
Mfn2	Mm01255785_m1
ND5/ND6	Mm04225315_s1
Ndufb8	Mm00482663_m1
Opa1	Mm01349716_m1
Parkin	Mm00450187_m1
Peroxiredoxin	Mm00545848_m1
PINK1	Mm0055827_m1
RNR2	Mm04260181_s1
SOD1	Mm01700393_g1
SOD2	Mm00690588_m1

2.5 Enzyme

Enzym	Hersteller
DNAse I RNase-frei	Qiagen, Venlo, Niederlande
Maxima® Reverse Transkriptase	Fermentas (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA
Pryuvatkinase	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA

2.6 Molekulargewichtsmarker

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

2.7 Antikörper

2.7.1 Primärantikörper Western Blot

Antikörper	Spezies	Hersteller
Beta-Actin (13E5)	Kanninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Drp1 (Dnml1 Polyclonal)	Kanninchen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
GAPDH (14C10)	Kanninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
OXPHOS (Total OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail)	Maus	Abcam, Cambridge, United Kingdom

2.7.2 Primärantikörper Immunfluoreszenz

Antikörper	Spezies	Hersteller
Dynamin 1-Like Antikörper (AA 69-213)	Kaninnchen	Antibodies-online
Glucokinase GCKR H-300 (sc11416)	Kaninnchen	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, Deutschland
Insulin (ab7842)	Meerschwein	Abcam, Cambridge, United Kingdom
LC3 (L8918)	Kaninnchen	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland

2.7.3 Fluoreszenz gekoppelte Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller
Goat Anti-Guinea Pig IgG H&L Alexa Fluor®647	Ziege	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Goat Anti-Rabbit IgG Alexa Fluor®594	Ziege	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Goat Anti-Rabbit IgG Alexa Fluor®488	Ziege	Abcam, Cambridge, United Kingdom
IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG	Ziege	Li-COR Biosciences, Nebraska, USA
IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG	Ziege	Li-COR Biosciences, Nebraska, USA
IRDye® 800RD Goat anti-Mouse IgG	Ziege	Li-COR Biosciences, Nebraska, USA
IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG	Ziege	Li-COR Biosciences, Nebraska, USA

2.8 Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoffe	Hersteller
Eindeckmedium - Roti®-Mount FluorCare DAPI	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MitoSOX™ Mitochondrial Superoxide Indicator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MitoTracker™ Green FM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tetramethylrhodamin, Ethylester, Perchlorat (TMRE) (T669)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.9 Kits

Kit	Hersteller
ATPlite Luminescence Assay System	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA
Maxima® First Strand cDNA Synthesis	Fermentas, Thermo (Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA
Mouse High Range Insulin Elisa	Alpco Salem, NH, USA
QuantiPro™ BCA Assay Kit	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Revert™ 700 Total Protein Stain	Li-COR Biosciences, Nebraska, USA
RNeasy Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Venlo, Niederlande
TaqMan universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, California, USA

2.10 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
2/β-Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Acrylamid (AA)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
alamarBlue™ Zellviabilitätsreagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Albumin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Bisacrylamid (Bis AA)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Bradford Reagenz (Roti®-Quant)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roh, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ethanol absolut (unvergällt)	Walter CMP, Kiel, Deutschland
FCS	GIBCO® (Invitrogen), Darmstadt, Deutschland
Formafix 4%	Grimm med. Logistik GmbH, Torgelow, Deutschland
Genetecin (G418)	GIBCO® (Invitrogen), Darmstadt, Deutschland

Gluucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hepes	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Kaliumphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Kalziumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ x 2H ₂ O)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ x 7H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Mdivi-1	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) – steril	Polyplus, Illkirch, Frankreich
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium Desoxycholsäure (C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Nonident™ P-40	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Phosphoenolpyruvat	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau	GIBCO® (Invitrogen), Darmstadt, Deutschland
0,05% Trypsin-EDTA (1X)	GIBCO® (Invitrogen), Darmstadt, Deutschland
Wasser RNase-frei	Qiagen, Venlo, Niederlande
Tween 20	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.11 Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung	
Antikörper Puffer (Western Blot)	Intercept® (PBS) Blocking Buffer	
	0,1%	Tween 20
Krebs-Ringer-Lösung (500ml)	33,605g	NaCl
	1,752g	KCl
	1,880g	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
	0,816g	KH ₂ PO ₄
	1,479g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
Krebs-Ringer-Gebrauchslösung (100ml)	10 ml Krebs-Ringer	
pH 7,4	0,24g	HEPES
	0,168g	NaHCO ₃
	90 ml	H ₂ O
	0,1g	BSA
PBS (Phosphat buffered saline) (1 L)	8,0 g	NaCl
	0,2 g	KCl

	1,42 g	NaHCO ₃
	0,27 g	KH ₂ PO ₄
Puffer A	20 mM	HEPES
pH 7,75	3 mM	MgCl ₂
RIPA-Lysepuffer (Radioimmunoprecipitationassay buffer)	50 mM	Tris HCl pH 8
	150 mM	NaCl
	1 %	NP-40
	0,5 %	Natrium Desoxycholsäure
	0,1 %	SDS
10x SDS-Laufpuffer (1 L)	0,25 M	Tris
	1,92 M	Glycin
	1%	SDS
	0,01%	NaN ₃
5x Ladungspuffer (10ml)	250 mM	Tris/HCl pH 6,8
	10%	SDS
	0,5%	Bromphenolblau
	500 mM	DTT
	50%	Glycerol
Intercept® (PBS) Blocking Buffer		
SDS-Page Trenngel 12,5% (10,2 ml)	4,25 ml	AA/Bis AA (30%/8%)
	4 ml 1 M	Tris/HCl pH 8,8
	1,75 ml	H ₂ O
	108 µl	10% SDS
	120 µl	10% APS
	15 µl	TEMED
SDS-Page Sammelgel 5% (5 ml)	0,875 ml	AA/Bis AA (30%/8%)
	0,625 ml	1 M Tris/ HCl pH 6,8
	3,5 ml	H ₂ O
	50 µl	10% SDS
	70 µl	10% APS
	7 µl	TEMED

2.12 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Deckgläser (24x50 mm)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Filter Pipettenspitzen (1 – 1000 µl)	Starlab, Hamburg, Deutschland
Mini Protean® TGX™ Gel	Bio-Rad, München, Deutschland
Parafilm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR-8er-Kette 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (1 – 5000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PVDF-Membran	Bio-Rad, München, Deutschland
QIAshredder Columns	Qiagen, Venlo, Niederlande
Reaktionsgefäße (1,5 – 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße RNase-frei (1,5 ml)	Eppendorf, Wesseling, Deutschland
Schraubrohre (15 und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (2, 5, 10 und 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TaqMan Array Plate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Trans-Blot Turbo Transfer Pack	Bio-Rad, München, Deutschland

x-Well Zellkulturkammer auf Glasobjektträger (ablösbar)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche (75 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
6er-Well Kulturplatte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
12er-Well Kulturplatte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
24er- Well Kulturplatte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96er-Well Kulturplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschale (Glasboden)	MatTek Life Science, Ashland, Massachusetts, USA

2.13 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Dual Gel Coaster	Hoefer Pharmacia Biotech Inc, California, USA
Elektrophorese Kammer SE250 Mighty Small II	Hoefer Pharmacia Biotech Inc, California, USA
FluoView FV 10i	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mini-Zentrifuge	Eppendorf, Wesseling, Deutschland
NanoDrop 2000 Spektralphotometer	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
Neubauer Zell-Zählkammer ‚improved‘	Poly-Optik GmbH, Bad Blankenburg, Deutschland
PCR-Cycler	SensoQuest, Göttingen, Deutschland
Real-Time PCR System 7900HT	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
Pipette (0,5 – 5000 µl)	Eppendorf, Wesseling, Deutschland
Pipettierhilfe	Drummond Scientific Company, Pennsylvania, USA
Power Supply (Model 1000/500)	Bio-Rad, München, Deutschland
Rotator	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Schüttler IKA-Vibrax-VXR	Omnilab, Bremen, Deutschland
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad, München, Deutschland
Ultraschall Homogenisator	Bandelin, Berlin, Deutschland
Victor ³ _{TM} Multilabel Reader	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
Vortexer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland

2.14 Software

Software	Hersteller
Grpah Pad Prism	Dotmatics, Boston, USA
Imaris Mircoscopy Image Analysis Software	Oxford Instruments, Abingdon, England
Image Studio Lite 5.2	Li-COR Biosciences, Nebraska, USA
Piko Real Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

3. Methoden

3.1 Zelllinien

3.1.1 MIN 6

Bei der verwendeten MIN 6-Zelllinie handelt es sich um Maus Betazellen, die aus Insulinomen gewonnen wurden, welche durch die gezielte Expression des Simian Virus 40 T Antigen Gens in transgenen Mäusen induziert worden sind [190]. MIN 6 Zellen sind morphologisch homogen, wachsen in Clustern und besitzen endokrine Granula [190]. Die Zellen sind Glucose-sensitiv und reagieren demnach auf die Stimulation mittels Glucose mit einer bis zu 7-fach gesteigerten Insulinsekretion. Diese Reaktion ist vergleichbar zu der von isolierten Inselzellen aus Mäusen [191].

3.2 Zellkultur

Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂-Atmosphäre und 60% Luftfeuchte im Brutschrank inkubiert. Die Kultivierung erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), versetzt mit 5% Penicilin-Streptomycin und 10% Fetalem Kälberserum (FCS). Mittels Kryokonservierung wurden Aliquots in Einfriermedium (FCS mit 10% (v/v) DMSO) erstellt und bei -150°C aufbewahrt. Diese konnten bei Bedarf rekultiviert werden. Alle Arbeitsschritte der Zellkultivierung wurden unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Bei einer Zelldichte von etwa 80% innerhalb der Zellkulturflaschen wurden die Zellen regelmäßig mit frischem Medium passagiert. Durch Zugabe von Trypsin EDTA und einer kurzen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen von der Oberfläche gelöst. Es erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 10 000 rpm. Das erhaltene Zellpellet wurde in vorgewärmten Medium resuspendiert. Entsprechend der Dichte wurden die Zellen gesplittet oder für weitere Untersuchungen gezählt und demgemäß in Zellkulturschalen oder auf Objektträgern ausgesät.

3.3 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest mit Trypanblau

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe der ‚Neubauer improved‘ Zählkammer. Diese besteht aus 9 großen Quadranten, von denen die 4 äußeren Großquadranten mit ihren jeweils 16 Kleinquadranten darin ausgezählt wurden. Die 4 Großquadranten besitzen eine Kantenlänge von 1 mm und ein daraus resultierendes Flächenmaß von 1 mm². Die Zellsuspension wurde gut durchmischt und 1:2 mit Trypanblau verdünnt. Dadurch wurden tote Zellen blau eingefärbt, während lebende farblos verblieben. Von dieser Lösung wurden 10 µl unter das Deckglas

gegeben und die farblosen Zellen innerhalb der 4 Großquadranten gezählt. Die Zellzahl pro μl ergab sich aus der folgenden Formel:

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

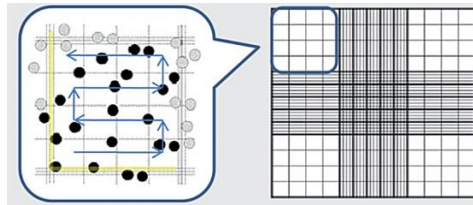


Abbildung 6 Neubauer improved Zählkammer [192]

3.4 Zellvitalität

3.4.1 Alamar Blue

Zur Bestimmung der zu verwendenden Konzentration des chemischen Inhibitors mdivi-1 wurde ein Zellvitalitäts Assay von Alamar Blue durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen gleichmäßig auf einer 96er – Well-Kulturplatte ausgesät und in 200 μl Kulturmedium inkubiert. Insgesamt wurden 6 verschiedene mdivi-1 Konzentrationen in den ausgesäten MIN 6 Zellen untersucht: 0, 25, 50, 100, 200 und 400 $\mu\text{mol/l}$. Die entsprechenden Konzentrationen wurden auf die Zellen in Kulturmedium aufgetragen und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde Resazurin-haltiges Kulturmedium angesetzt, indem Alamar Blue 1:10 im Medium verdünnt wurde. Das Behandlungsmedium wurde von den Zellen entfernt und durch das Alamar Blue Medium mit 200 μl pro Well ersetzt. Damit erfolgte zunächst eine sofortige Fluoreszenzmessung der Platte als Bezugswert. Danach inkubierten die Zellen 3 h bei 37 °C. Bei einem Wachstum der Zellen kam es zur Reduzierung des Mediums und somit einem Farbumschlag des Alamar Blue von blau zu rot. Ein reduziertes Wachstum dagegen hatte eine Oxidation des Mediums zur Folge, die in einer Stabilisierung der Blaufärbung resultierte. Nach der Inkubation erfolgte eine Analyse des Wachstums mittels erneuter Fluoreszenzmessung der Platte bei 530 nm Extinktion und 590 nm Emission.

3.5 Transfektion

3.5.1 JetPei® - Transfektion

Die verwendeten MIN 6 Zellen wurden mit Hilfe des jetPei® Transfection Kits transfiziert. JetPei® ist ein Polyethylenimin Derivat zur Einbringung von fremd DNA in adhärente oder suspendierte Zellen. Dabei verpackt das jetPei® die DNA in positiv geladene Partikel, die mit

der Oberfläche der Zellmembran interagieren und über Endozytose aufgenommen zu werden. Das jetPei® verhindert auf diese Weise einen Abbau der DNA im Endosom und sichert ihren Transport ins Cytosol.

Für die Transfektion wurden 5×10^5 Zellen in 6 Well-Kulturplatten ausgesät und für 24 h kultiviert. Für jeden Ansatz wurden zunächst 50 µl sterilen 150 mM NaCl's mit 1 µg der zu verwendenden Plasmid-DNA versetzt.

Tabelle 1 Transfektionsansatz des Plasmid-DNA Mastermix

Reagenz	Menge pro Well
Steriles NaCl 150 mM	50 µl
Plasmid-DNA	1 µg

In einem weiteren Eppendorfgefäß wurde parallel ein zweiter Master Mix angesetzt mit 50 µl des 150 mM NaCl und 2 µl des jetPei®.

Tabelle 2 Transfektionsansatz des jetPei® Mastermix

Reagenz	Menge pro Well
Steriles NaCl 150 mM	50 µl
jetPei®	2 µl

Beide Lösungen wurden in einem Reaktionsgefäß zusammengegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden jeweils 100 µl in jedes Well gegeben und die Zellen für 24 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgt ein Mediumwechsel und weitere 24 h Inkubation bei 37 °C.

3.6 Herstellung stabiler Klone

Die MIN 6 Zellen wurden mit Hilfe des jetPei® Transfection Kits transfiziert. Dazu wurden 1 µg DNA in die Zellen eingebracht. Daraufhin inkubierten die Zellen für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in 6-Well-Kulturplatten. Anschließend wurde das Medium mit 0,75 mg/ml Genetecin als Selektionsantibiotikum versetzt. In einem Abstand von 48h wurde das Medium ersetzt, bis sich Zellkolonien am Boden der Zellkulturflasche gebildet hatten. Von diesen wurden 20 Klone gepickt und in eine 96-Well-Kulturplatte übertragen. Sobald die Wells dicht bewachsen waren, erfolgte die Übertragung der Zellen durch abtrypsinieren und Zugabe von frischem Medium mit 0,75 mg/ml Antibiotikum auf eine 48-Well-Kulturplatte. Danach wurden die Zellen bei ausreichender Zellzahl auf 24- und anschließend auf 12-Well-Kulturplatten und auf 6-Well-Kulturplatten übertragen. Damit war die Zellzahl ausreichend, um Genexpressionsanalysen

zur Überprüfung der gewünschten Klone durchzuführen. Positive Klone wurden zur weiteren Kultivierung in Zellkulturflaschen angezogen. Zusätzlich wurden Aliquots von den positiv getesteten Klonen angefertigt und bei -150 °C gelagert.

3.7 mRNA-Expressionsanalysen

3.7.1 RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA erfolgte mittels des QIAGEN RNeasy Mini-Kits®. Für eine Analyse wurden 5×10^5 Zellen in 6-Well-Kulturplatten ausgesät und für 48 h inkubiert. Zum Aufschluss der Zellmembran wurde RLT Puffer mit Mecaptoethanol (Verdünnung 1:9) verwendet und für 5 min inkubiert. Das Zelllysate wurde anschließend auf QIA Shredder Spin Säulen übertragen. Diese wurden für 2 min bei 12.000 rpm zentrifugiert um eine Homogenisierung und reduzierte Viskosität der Zelllysate zu erreichen. Durch Zugabe von 350 µl 70 %igem RNase-freiem Ethanol wurde die RNA ausgefällt. Daraufhin wurden die Proben auf RNeasy Spin Säulen übertragen und für 15 s bei 12.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die RNeasy Membran, an welche die RNA gebunden hatte, mittels 500 µl RW1 Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Zusätzliche DNA wurde mit Hilfe des QIAGEN RNase-Free DNase-Set hydrolysiert, in dem ein Gemisch aus 10 µl DNase und 70 µl RDD-Puffer auf die RNeasy Membran in den Säulen gegeben wurde. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde die Membran einmal mit 500 µl RW1 und zweimal mit 500 µl RPE Puffer gewaschen. Durch eine weitere Zentrifugation für 2 min bei 12.000 rpm wurde die Membran getrocknet und im Anschluss die RNA mit 20 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation bei 12.000 rpm für 1 min eluiert. Die gewonnene RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.7.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte mit Hilfe des NanoDrop 2000 Spektralphotometers durch Messung von 1 µl RNA-Eluat bei 260 nm. Als Referenzwert diente RNase-freies Wasser.

3.7.3 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA aus dem RNA-Template erfolgte über eine Reverse Transkription und wurde mit Hilfe des Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kits durchgeführt. Dieses enthält eine Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase), welche auch bei

Temperaturen zwischen 42 – 50 °C aktiv bleibt. Folgender Reaktionsansatz wurde für die Reaktion angesetzt:

2 µl Maxima Enzym Mix

4 µl Reaction Mix

1 µg RNA-Template

Mit RNase-freiem Wasser wurde auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese im PCR-Cycler mit dem folgenden Programm:

Tabelle 3 Cycler Programm zur Synthese von cDNA

Schritt	Dauer in min	Temperatur in °C
1.	10	25
2.	15	50
3.	5	85
4.	5	4

Die gewonnene cDNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.7.4 Quantitative Real-Time PCR

Die Analyse der Genexpression erfolgte mittels quantitativer Real-Time PCR nach dem TaqMan™ Prinzip. Hierbei wurden spezifische Gensonden eingesetzt. Diese besitzen am 5'-Ende des Oligonukleotids einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff, während am 3'-Ende ein Quencher-Molekül sitzt und durch einen Phosphatrest blockiert wird. Aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher wird die Fluoreszenz des 5'-Endes mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) unterdrückt. Während der PCR wird im ersten Schritt durch Erhöhung der Temperatur die doppelsträngige DNA zu Einzelsträngen voneinander gelöst. Durch die Senkung der Temperatur im nächsten Reaktionsschritt, können Primer und die spezifische Sonde mit der Zielsequenz hybridisieren. Anschließend erfolgt die DNA Synthese mittels Taq-Polymerase. Diese trifft daraufhin auf die Sonde und welche durch die 5'-Nukleaseaktivität gespalten wird. Damit wird der Farbstoff vom Quencher getrennt. Mit jedem Zyklus nimmt die Akkumulation des Amplifikat zu und steigert hiermit die Fluoreszenz des Reporters. Die nach jedem Amplifikationszyklus gemessene Fluoreszenzintensität ist somit proportional zur Quantität des PCR-Produkts. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente bei den Messungen stets als Referenzgen. Als Reporter-Fluorophor wurden FAM™ oder VIC® genutzt. Der qRT-PCR Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 4 Reaktionsansatz zur quantitativen Real-Time PCR

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

Die qRT-PCR wurde mit Hilfe des Thermo Scientific Piko Real 96 Real-Time PCR System nach folgendem Programm durchgeführt:

Tabelle 5 Real-Time PCR Programm des Piko Real 96

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer
Hold	50 °C	2 min
Hold	95 °C	10 min
40 Zyklen	95 °C	15 Sekunden
	60 °C	1 min
Hold	60 °C	30 Sekunden

Eine anschließende Auswertung der Ergebnisse erfolgte quantitativ nach der Delta-Delta- C_t -Methode. Dabei wurde die Expression der Zielgene mit Hilfe des Vergleichs zum Referenzgen normalisiert. Der C_t -Wert entspricht dabei der Anzahl der Zyklen, in denen sich die Fluoreszenzintensität des Gens signifikant von der Hintergrund-Fluoreszenz abhebt. Die Berechnung der Ratio dient der Ermittlung des Expressionsunterschieds zwischen der internen Kontrolle und den Zielgenen. Berechnet wird diese wie folgt:

$$\Delta C_t = C_{t \text{ Zielgen}} - C_{t \text{ Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ Zielgen}} - \Delta C_{t \text{ Referenzgen}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

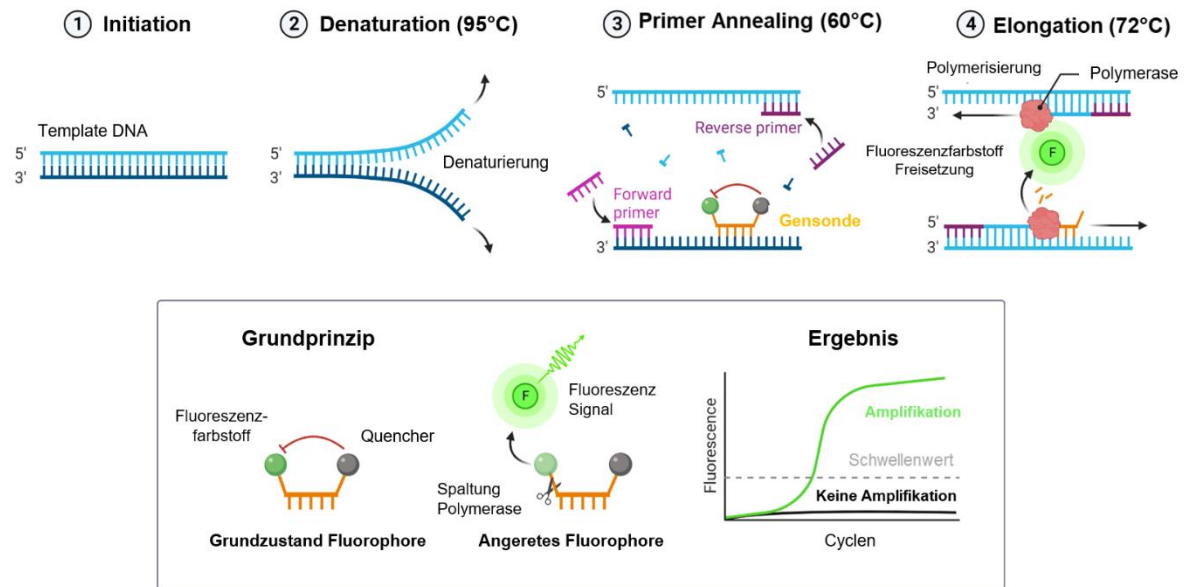


Abbildung 7 Schematische Abbildung einer quantitativen Real Time PCR, verändert nach 'Fluorescent Probe-Based Real Time PCR' von BioRender.com

3.8 Methoden zur Proteinanalyse

3.8.1 Proteinpräparation

Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^5 in 6-Well-Kulturplatten ausgesät, gegebenenfalls transfiziert und für 48 h inkubiert. Durch Zugabe von 500 µl PBS und mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von der Oberfläche gelöst und für 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das erhaltene Pellet in RIPA-Lysepuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde daraufhin auf Eis inkubiert und im Abstand von 5 min mit Hilfe des Vortexers gemischt. Danach wurde zur Trennung des Zelllysats von seinen unlöslichen Bestandteilen ein weiteres Mal für 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden in frische Eppendorfgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.8.2 Proteingehaltsbestimmung mittels BCA Assay Kit

Die Proteingehaltsbestimmung wurde mit Hilfe des QuantiPro BCA Assay Kits durchgeführt. Dafür wurde zunächst eine BSA Eichgerade im Doppelansatz erstellt und in eine 96-Well Mikrotiterplatte aufgetragen.

Tabelle 6 Pipettierschema der BSA - Eichgerade

BSA 0,1 mg/ml (µl)	Aqua dest (µl)	Lysis Puffer 1:10 (µl)
0	140	10
2,25	137,5	10
3,75	136,25	10
7,5	132,5	10
10	130	10
15	125	10
20	120	10
30	110	10

Die Proben wurden mit 10 µl in die Vertiefungen gegeben und mit Aqua dest auf ein Gesamtvolumen von 150 µl pro Well aufgefüllt.

In Abhängigkeit der Anzahl der Proben wurde ein MasterMix aus im QuantiPro BCA Assay Kit enthaltenen Puffern QA, QB und QC angesetzt.

Tabelle 7 Mastermix Zusammensetzung des Pro BCA Assay Kit in Abhängigkeit der Probenanzahl

Probenanzahl	QA (ml)	QB (ml)	QC (ml)
6	0,5	0,5	0,02
34	2,5	2,5	0,10
68	5,0	5,0	0,20
96	7,25	7,25	0,29
105	7,75	7,75	0,31

Von diesem Puffergemisch wurden jeweils 150 µl zu den Ansätzen in der 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Diese wurden für 60 min bei 60 °C inkubiert, ehe die Extinktionsmessung bei 562 nm am Luminometer Victor3 1420 Multilabel Counter erfolgte. Diese Form der Proteinbestimmung wurde insbesondere im Anschluss an die Bestimmung der ATP/ADP Ratio und der Glucose-stimulierten Insulinsekretion Bestimmung durch einen ELISA durchgeführt.

3.8.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung mittels Bradford-Reagenz ist eine photometrische Methode zur Quantifizierung des enthaltenen Proteins in Lösung. Hierbei bildet der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (CBBG) in saurer Lösung Proteinkomplexe aus. CBBG wird in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfatform stabilisiert, womit sich sein Absorptionsmaximum von 470 auf 595 nm verschiebt. Dadurch können die komplexierten Proben photometrisch gegen den freien Farbstoff gemessen werden, um ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung zu erhalten. Für die Kalibrierung wurde eine Eichreihe in Doppelbestimmung von 1 bis 30 µg BSA erstellt. Für die Konzentrationsbestimmung in den Proteinproben wurden zu 2 µl Protein, 200 µl Bradford-

Reagenz (Roti®-Quant) zugegeben und mit Aqua dest. auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Die Reaktionsgefäße wurden nach Zugabe aller Bestandteile gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, ehe sie in Küvetten überführt wurden. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 595 nm. Die Proteinkonzentration in µg/µl wurde wie folgt berechnet:

$$x = (\text{BSA OD595}) + 0,0652/0,0898$$

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

$$x = (\text{Probe OD595}) + 0,0652 \times \text{Faktor} / 0,0898$$

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

3.8.4 SDS – PAGE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit Hilfe einer diskontinuierlichen vertikalen SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese), welche Proteine nach ihrem Molekulargewicht separiert. Dabei handelt es sich um ein Polyacrylamidgel, welches aus einem Sammel- und einem Trenngel besteht. Die beiden Gele unterscheiden sich in ihrem pH-Wert und Polyacrylamidanteil. Letzterer entscheidet über die Porengröße innerhalb des Gels. Im Sammelgel werden die Proteine aus der Lösung konzentriert, ehe sie im Trenngel ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Zu Beginn wurden die Acrylamid – Gele in ihrer jeweiligen Konzentration zwischen zwei Glasplatten gegossen und entsprechende Spacer eingesetzt. Mittels Tetramethyldiamin (TEMED) und Ammoniumperoxiddisulfat (APS) wurden die Gele polymerisiert. Eine Übersichtung mit Isopropanol hatte die Glättung des Trenngels zur Folge. Sobald dieses entfernt wurde, wurde das Sammelgel gegossen und zügig ein für die Anzahl der Proben geeigneter Kamm eingeführt, der zur Ausbildung von Taschen für die Befüllung der Proben diente. Die Auspolymerisation der Gele war nach 1 h abgeschlossen. Anschließend konnten die Gele in der Elektrophoresekammer eingespannt und mit 1x SDS – Laufpuffer übergossen werden. Die Proben wurden durch Zugabe von Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) gleichmäßig negativ beladen. Dafür wurden zu 30 µg Protein 1:1 zweifacher SDS – Loadingpuffer hinzugefügt und gründlich vermengt. Die Denaturierung erfolgte durch Aufkochen der Proteinproben für 15 min bei 95 °C, ehe diese mit dem gesamten Volumen auf das Gel aufgetragen wurden. Als Größenstandard wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt. Für die Auftrennung des Proteingemischs wurde schließlich eine Stromquelle an die Apparatur angeschlossen und das Gel 1 h bei 97 Volt laufen gelassen.

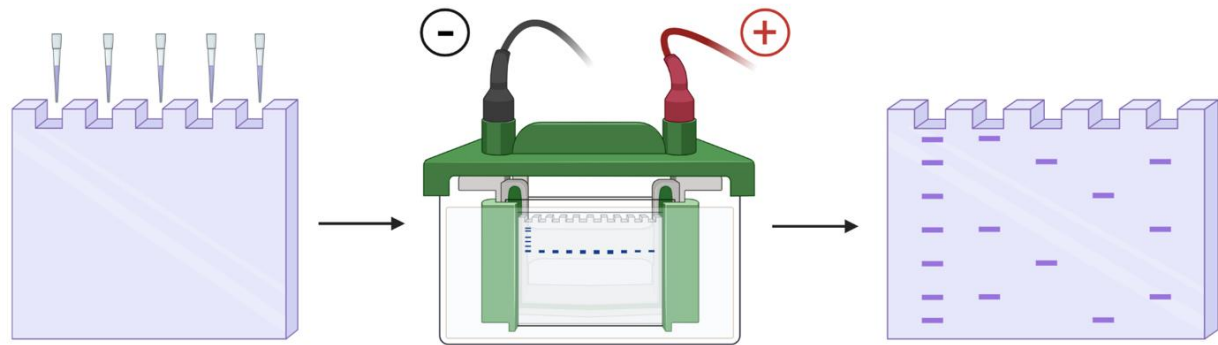


Abbildung 8 Schematische Darstellung der Durchführung einer SDS - Page, erstellt mittels BioRender.com

3.8.5 Western Blot

Mit Hilfe eines diskontinuierlichen Semi-Dry Blots wurden die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine im nächsten Schritt auf eine PVDF-Membran übertragen. Dafür wurde der folgende Aufbau genutzt:



Abbildung 9 Schematischer Aufbau eines Western Blots: Auf die Kathode werden vier in Kathodenpuffer getränkte Blottpapiere gelegt, darauf folgt das Polyacrylamidgel, anschließend die PVDF Membran, die in Anodenlösung II und Isopropanol äquilibriert wird. Vor der Anode werden vier in Anodenpuffer I getränkte und zwei in Anodenpuffer II getränkte Blottingpapiere aufgelegt.

Für die Übertragung der Proteine aus dem Gel in die PVDF Membran, wurde im Trans-Blot Turbo Transfer System von Bio Rad das entsprechende Turbo – Programm ausgewählt mit einer elektrischen Spannung von 1.300 mA für 7 min. Die Detektion der Proteine erfolgte über die Hybridisierung mit spezifischen primären Antikörpern auf der PVDF – Membran. Zuerst wurde die Membran für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in Odyssey Blocking Puffer (1:4 Verdünnung mit 1xPBS) inkubiert, um unspezifische freie Proteinbindestellen zu blockieren. Anschließend wurde der 1:1000 in Antikörperpuffer (Odyssey Blocking Puffer + 0,1% Tween) verdünnte primäre Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit einem Waschpuffer aus PBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20 auf dem Schüttler, erfolgte die Inkubation mit dem Fluoreszenz gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:2 000 in

Antikörperpuffer) für 2 h bei 37 °C im Drehgestell. Die Detektion des Fluoreszenzsignals des sekundären Antikörpers erfolgte anschließend mit Hilfe des Odyssey Infrared Imager von LI-COR.

3.8.6 Revert 700 Total Protein Stain Normalization

Zur internen Ladungskontrolle wurde die geblottete Membran mit Revert 700 Total Protein Stain von LI-COR gefärbt. Dafür wurde die Membran zunächst für 10 min bei 37 °C vollständig getrocknet. Darauf folgte eine Rehydrierung durch eine 30-sekündige Inkubation in 100 % Methanol.

Anschließend wurde die Membran für 5 min in 1x PBS bei Raumtemperatur geschwenkt. Danach wurde sie mittels destilliertem Wasser gespült, ehe sie in 5 ml der Revert 700 Total Protein Stain unter schütteln inkubiert wurde. Im Anschluss wurde die Membran mit 5 ml Revert 700 Wash Solution zweimal für jeweils 30 Sekunden und unter vorsichtigem Schwenken bei Raumtemperatur gewaschen. Die Membran wurde in destilliertem Wasser feucht gehalten und zügig im 700 nm Kanal am Odyssey® Imaging System ausgelesen. Für eine Detektion von Antikörpern ebenfalls im 700 nm Kanal, wurde die Membran anschließend wieder entfärbt. Dafür wurde sie für 5 bis 10 min unter Schwenken in 5 ml Revert Destaining Solution inkubiert, ehe mit dem Blockieren und der Immunmarkierung fortgefahren wurde.

3.9 Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenz nutzt man die Möglichkeit Protein mittels Bindung eines spezifischen Antikörpers mit zellulär räumlicher Auflösung zu detektieren. Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung hybridisieren Proteine mit spezifischen primären Antikörpern, welche durch einen sekundären Fluorophor-gekoppelten Antikörper sichtbar gemacht werden. Ein Proteinnachweis erfolgt durch die Anregung mit Licht einer entsprechenden Wellenlänge.

3.9.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro Well auf x-Well mit Zellkulturkammern ausgesät und über Nacht in Zellkulturmedium im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS dreimal gewaschen und anschließend mit Hilfe einer 15-minütigen Inkubation in 4 % Formalin fixiert. Anschließend wurde das Formalin wieder entfernt und die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte durch eine 5-minütige Inkubation mit 500 µl Triton X100.

Nach wiederholtem Waschen wurde der primäre Antikörper in einer 1:100 Verdünnung in PBS, für mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch erneutes Waschen mit PBS wurden ungebundene Antikörperreste entfernt. Im Anschluss wurde ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Sekundärantikörper mit einer 1:250 Verdünnung (in PBS) für 1 h im Dunkeln auf

dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen, wurde das Präparat mit Eindeckmedium (Roti®-Mount FluorCare DAPI) stabilisiert. Dieses enthält den Farbstoff Dapi (4,6-Diamidin-2-Phenylindol), so dass die Zellkerne gleichzeitig gegengefärbt wurden. Abschließend wurde das Präparat mit einem Deckglas versiegelt. Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung wurde am konfokalen Laserscannmikroskop FluoView 10i mit einem UPLASAPO 60x Ölobjektiv (NA 1.35) durchgeführt. Mittels einer Laserdiode erfolgte die Anregung entsprechend des sekundären Antikörpers.

Tabelle 8 Darstellung verwendete Fluorophore und ihr Spektrum

Fluorophor	Excitation Maximum	Emission Maximum	Laserquelle
DAPI	359 nm	461 nm	405 nm
Alexa Fluor 488	499 nm	520 nm	473 nm
Alexa Fluor 594	590 nm	618 nm	559 nm

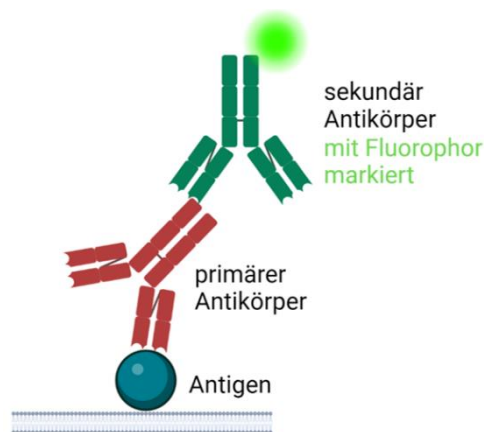


Abbildung 10 Schematische Darstellung der Immunfluoreszenz, erstellt mittels BioRender.com

3.10 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials

Das Membranpotential der Mitochondrien wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs TMRE (Tetramethylrhodaminester) untersucht. Hierbei handelt es sich um eine Technik der Lebendzellfärbung. TMRE ist ein stabiler, Membran-gängiger, orangeroter Lebendfarbstoff und wird bei Licht einer Wellenlänge von 559 nm angeregt. TMRE ermöglicht eine quantitative Analyse des mitochondrialen Membranpotentials aktiver Mitochondrien, in welchen er aufgrund seiner positiven Ladung akkumuliert. Für die Untersuchung wurden Zellen in einer Dichte von 5×10^5 auf den Collagen beschichteten Glasboden eines Dishes der Firma MatTek ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und für 30 min in Zellkulturmedium, in welchem TMRE 1:20.000 verdünnt wurde, bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit vorgewärmten Kulturmedium versorgt. Die Auswertung erfolgte am konfokalen

Laserscanmikroskop Olympus Flouview 10i mit einem UPLASAPO 60x Ölobjektiv (NA 1.35). Eine quantitative Analyse wurde in der Software Olympus Fluoview FV10-ASW- Viewer Software Ver.4.1 durchgeführt.

Tabelle 9 Darstellung verwendeter Lebendzellfarbstoffe und ihrer Spektren

Lebendzellfarbstoff	Excitation Maximum	Emission Maximum	Laserquelle
Fluorescein (FITC)	495 nm	519 nm	473 nm
Tetramethylrhodamine (TRITC)	552 nm	578 nm	559 nm
MitoSOX™ Red	396 nm	610 nm	559 nm

3.11 Analyse der mitochondrialen Morphologie mittels Lebendzellfärbung

Die mitochondriale Morphologie wurde mit Hilfe einer Lebendzellfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Green® (MTG®) durchgeführt. MTG gelangt durch passive Diffusion in die Mitochondrien und akkumuliert in der mitochondrialen Matrix nach Bindung an mitochondriale Proteine. Der Farbstoff reagiert dabei mit einer freien Thiol-Gruppe Cystein-haltiger Proteine. Die Bindung erfolgt unabhängig ihres mitochondrialen Membranpotentials. Für die Färbung wurden Zellen in einer Dichte von 5×10^5 pro Collagen beschichteten, Glasboden Dish der Firma MatTek ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und für 30 min mit MTG® in einer 1:10.000 Verdünnung in Kulturmedium bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit vorgewärmten Kulturmedium versorgt. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserscanmikroskop Olympus Fluoview 10i mit einem UPLASAPO 60x Ölobjektiv (NA 1.35). Eine quantitative Analyse wurde mit der Olympus Fluoview FV10-ASW- Viewer Software Ver.4.1 durchgeführt.

In der Software Imaris wurden die 3D Datensätze hinsichtlich des Mitochondrien Netzwerkes ausgewertet. Mit dem Schwellenwertverfahren (Thresholding) wird anhand der Fluoreszenzmarkierung eine Oberfläche erstellt. Hierbei kommen Algorithmen zum Einsatz, die die Intensität zur lokalen Umgebung berücksichtigen. Nachfolgend wird jedes als solches detektierte Objekt (Mitochondrium) einzeln erfasst, mit einer ID Nummer klassifiziert und seine Eigenschaften bestimmt. Die Ergebnisse können in Form einer Excel-Tabelle ausgelesen werden und dienen der quantitativen 3D Bilddatenauswertung in Prism.

3.12 Bestimmung der ATP/ADP Ratio

Für die Untersuchung der ATP/ADP Ratio wurde das ATPLite Luminescence Assay System Kit verwendet. Hierfür wurden 5×10^5 Zellen pro Well in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Diese wurden zweimal mit PBS gewaschen und im Anschluss mit 200 µl Lysis Puffer für 5 min auf dem Schüttler inkubiert. Das Zelllysate wurde in Eppendorfgefäße überführt und

für 5 min auf Eis inkubiert. 70 µl des Zelllysats wurden mit 630 µl Puffer A versetzt und auf zwei 350 µl Ansätzen verteilt. Ein Ansatz diente der ADP Bestimmung, welches über dessen Umsetzung zu ATP durch Zugabe von Phosphoenolpyruvat untersucht wurde:



Für diese Reaktion wurde ein Mastermix aus 30 mM Phosphoenolpyruvat (PEP) und 4 U Pyruvatkinase angesetzt in einem Volumen von 20 µl, dem ADP-Ansatz hinzugegeben und die Proben für 15 min bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die ADP-Ansätze mit dem PEP und Pyruvat versetzt. Die andere Hälfte des Zelllysats, welche für die Messung des ATP-Gehalts diente, wurde mit jeweils 100 µl pro Vertiefung in Doppelansätzen in 96-Well-Mikrotiterplatten gegeben. Um einer Überstrahlung der Signale zu vermeiden, wurde zwischen den befüllten Vertiefungen immer eine Vertiefung in jede Richtung ausgelassen. Zu jeder Probe wurden 50 µl Substrat hinzugegeben und die Platte abgedunkelt für 2 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte nach einer zusätzlichen 8-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur, am Luminometer Victor3 1420 Multilabel Counter. Zusätzlich mitgeführt wurde eine ATP-Standardreihe. Hierbei wurden 10 mM ATP in Puffer A verdünnt.

Tabelle 10 ATP - Standardreihe

Konzentration µmol/l	10 mM ATP Stock (µl)	Puffer A (µl)
0	0	250
50	1	199
100	1	99
500	2,5	47,5
1 000	5	45
2 500	10	20
5 000	20	20

Der Lysis Puffer wird 1:10 mit Puffer A verdünnt und je 100 µl in eine Mikrotiterplatte gegeben. Dazu werden 10 µl der unterschiedlichen ATP Konzentrationen hinzugefügt. Zu jeder Probe wurden 50 µl Substrat hinzugegeben und die Platte im Luminometer gemessen.

3.13 Bestimmung Glucose-stimulierter Insulin Sekretion

Für die Untersuchung der Glucose-stimulierten Insulinsekretion wurden MIN 6 Zellen mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen je Well in 6er-Well- Kulturplatten ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Das Medium wurde von den Zellen entfernt und diese zweimal mit einer vorgewärmten Krebs-Ringer-Gebrauchslösung (Krebs-Ringer mit 0,1% BSA) gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 2 ml der Gebrauchslösung bedeckt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung vollständig entfernt und die Zellen mit 1,5 ml einer Krebs-Ringer-Lösung mit 3 mM oder 25 mM Glucose für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach

wurden jeweils 1 ml der Überstände in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden dreimal mit reiner Krebs-Ringer-Lösung gewaschen, mit einem Zellschaber von der Oberfläche der Kulturplatte abgelöst, in 1 ml Krebs Ringer Lösung aufgenommen und ebenfalls in Eppendorfgefäße überführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte auf Eis durch eine Ultraschallbehandlung für 45 Sekunden in 5 Zyklen mit 90 % Beschallungsintensität. Zur Separierung des Zellinhalts und der festen Zellbestandteile wurden diese daraufhin für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und die Zelllysate 1:5 mit Krebs-Ringer-Lösung verdünnt. Die Überstände der Glucose-Stimulierung wurden 1:2 in reiner Krebs-Ringer-Lösung verdünnt und bei – 80 °C gelagert.

3.13.1 Insulin-ELISA

Zur Bestimmung des sezernierten Insulins wurde ein ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbend Assay) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Enzym gekoppeltes Immunabsorptionsverfahren, welches durch die Bildung eines Sandwich-Komplexes aus einem primären Antikörper und nachzuweisenden Molekül mit einem weiteren Antikörper erfolgt.

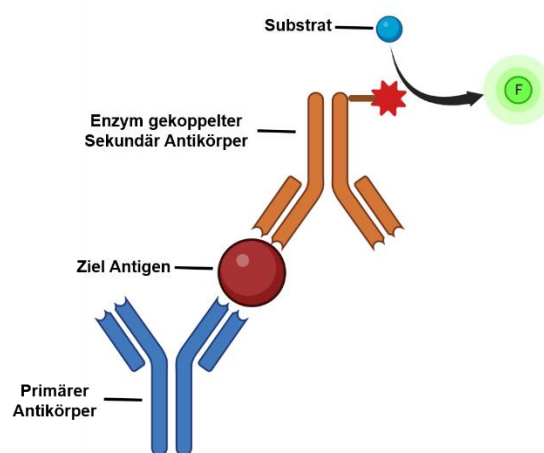


Abbildung 11 Schematischer Aufbau eines Sandwich-ELISA erstellt mittels BioRender.com

Dafür wurden mit einem primären Antikörper gegen Insulin beschichtete Mikrotiterplatten verwendet. Auf diese wurden die verdünnten Überstände zur Messung der in ihnen enthaltenen Mengen des sekretierten Insulins und die Zelllysate zur Bemessung des Insulingehalts der Zellen aufgebracht. Das Konjugat wurde zunächst 1:10 in Konjugatpuffer verdünnt und mit 75 µl zu jedem Well hinzugefügt. Die Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte für 2 h auf dem Schüttler bei 700 – 900 rpm. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Reporterenzym, welches an einen weiteren Antikörper gebunden ist. Dieser bindet spezifisch an den zuvor entstandenen Antikörper-Insulin-Komplex, so dass ein Antikörper-Antigen-Antikörper Sandwich-Komplex ausgebildet wird. Im Anschluss zur Inkubation mit dem

Konjugat wurde die Platte sechsmal gründlich mit Waschpuffer gewaschen, um ungebundene Antikörperreste zu entfernen. Der Nachweis erfolgte durch das Hinzufügen der chromogenen 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidinelösung (TMB), welches durch das enthaltene Enzym zu einem Farbumschlag führte. Dafür wurde zu jedem Well 100 µl TMB Reagenz hinzugefügt, die Platte abgedunkelt und für 30 min bei RT auf dem Schüttler bei 700-900 rpm inkubiert. Durch die anschließende Zugabe von Schwefelsäure wurde die Reaktion abgestoppt und daraufhin die Extinktion bei 450 nm im Luminometer Victor3 1420 Multilabel Counter gemessen. Für eine quantitative Auswertung wurde eine Standardkurve mit folgenden Konzentrationen 0 ng/ml, 3 ng/ml, 7,5 ng/ml, 30 ng/ml, 75 ng/ml und 150 ng/ml erstellt. Zur ergänzenden Bestimmung der enthaltenden Proteinmenge wurde außerdem eine Proteingehaltsbestimmung mit Hilfe des QuantiPro BCA Assay Kits durchgeführt.

3.14 Statistische Auswertung

Alle dargestellten grafischen Auswertungen in Form von Diagrammen wurden mit der Software GraphPad Prism erstellt. Für die Mittelwerte der jeweiligen Datengruppen wurden die Daten mit dem jeweiligen Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aufgetragen. Um eine redundanzfreie Darstellung der Daten zu erlangen, wurden die Datengruppen normalisiert. Dafür wurde der Mittelwert der Kontrolle 100% und 0% dem Wert 0 zugeordnet. Für den Vergleich zwischen Datengruppen wurde der Student's t-Test angewendet.

Analysen, die einen Vergleich von mehr als zwei Datengruppen erforderten, wurden mittels One – Way – ANOVA mit einem anschließenden Bonferroni-Post-Test statistisch ausgewertet. Ein Signifikanzwert (P-Wert) wurde innerhalb der Diagramme in den Stufen * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ und ***, $P < 0,001$ angegeben. Dabei entspricht das Symbol *, ** signifikanten Unterschieden zwischen den untersuchten Datensätzen.

4. Ergebnisse

4.1 Verwendete Zelllinien

In dieser Arbeit wurde die Rolle des Drp1 für die Morphologie und Funktion der Mitochondrien in den Insulin sezernierenden MIN 6 Zellen untersucht. Dabei handelte es sich um eine Zelllinie aus einem Maus Insulinoma, welche die Charakteristika pankreatischer Betazellen besitzen. Für die Untersuchungen wurde das Protein Drp1 unterschiedlich beeinflusst. Betrachtet wurde A) eine Überexpression des Proteins durch die stabile Expression des pcDNA 3.1 Drp1+ Vektor (weiterhin als Drp1+ bezeichnet), B) eine Minderung der Aktivität des Drp1 durch die stabile Expression der Negativmutante K38A (weiterhin als K38A bezeichnet), welche eine Punktmutation in der GED-Domäne des Proteins besitzt, die die Hydrolyse von GTP verhindert und C) eine Hemmung der Drp1-Aktivität durch die Verwendung des chemischen Inhibitors mdivi-1.

Als Kontrolle dienten mit dem Leervektor pcDNA stabil transfizierte Zellen. Für die Vergleichbarkeit der Daten, wurden auch die Zellen für Untersuchungen mit mdivi-1 zunächst mit pcDNA transient transfiziert. Eine mdivi-1 unbehandelte Charge hiervon diente in den Analysen zur Kontrolle.

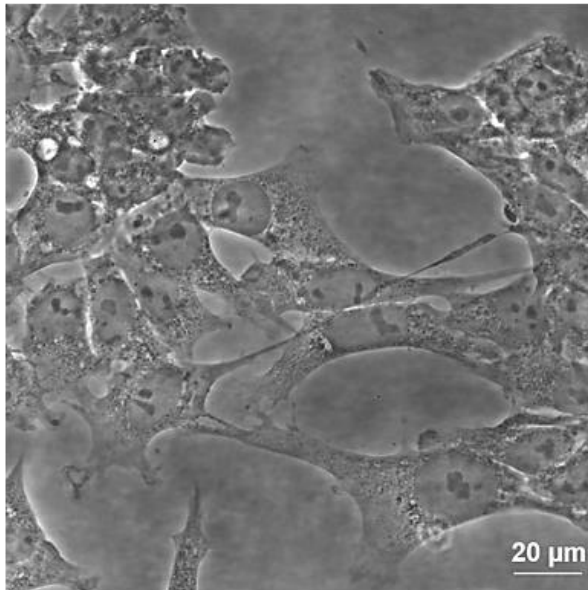
Tabelle 11 Beeinflussung von Drp1 in MIN 6 Zellen

Verwendete Zelllinie	Effekt	Expression
pcDNA 3.1 Drp1+	Drp1 Überexpression	Stabil exprimiert
pcDNA K38A	Negativmutante	Stabil exprimiert
pcDNA	Keine Auswirkung auf Drp1	Stabil exprimiert
Mdivi-1	Chemischer Inhibitor	Temporär inkubiert
pcDNA	Keine Auswirkung auf Drp1	Transient transfiziert

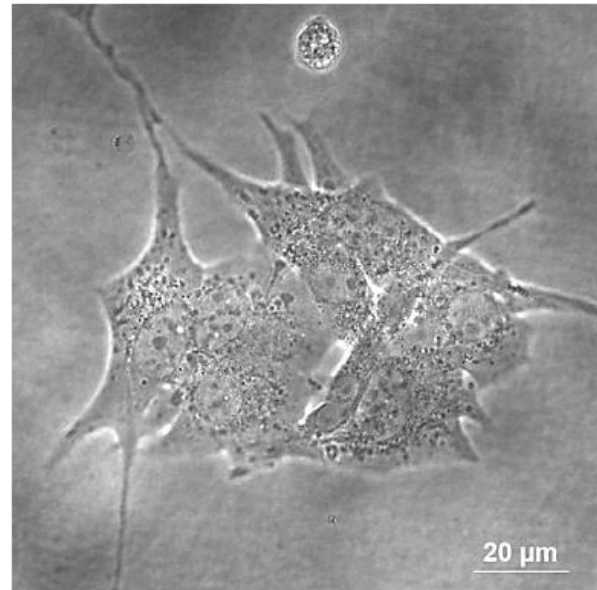
4.1.1 Morphologie der verwendeten Zelllinien

Die native unbehandelte MIN 6 Zelle zeigte einen flächigen Auswuchs mit spitzen Ausläufern und einer hohen Konnektivität zu anderen MIN 6 Zellen. Die Zellen fanden sich häufig in großflächigen Kolonien adhärent am Boden der Zellkulturgefäße zusammen. Eine stabile wie transiente Transfektion mit dem Leervektor hatte keinerlei Einfluss auf die Morphologie der MIN 6 Zellen (siehe Abb.12). K38A resultierte bei stabiler Expression in einer Verkleinerung der Zellen, so wie einer stärkeren Konnektivität, die zur Ausbildung kleinerer Kolonien führte (siehe Abb.12 K38A). Dies zeigte sich in einer geminderten Proliferation der Zellen. Die stabile Expression von Drp1+ hatte eine Verringerung der Konnektivität der Zellen untereinander zur Folge. Es zeigten sich eine Vielzahl weniger dichter Kolonien innerhalb der Zellkulturgefäße im Gegensatz zur unbehandelten oder Kontrollzelle (siehe Abb. 12, Drp1+). Die Inkubation mit mdivi-1 hatte deutliche Auswirkungen auf die Zellen in Form von Abrundungen und vergleichsweise weniger Verbindungen zu den umliegenden Zellen (siehe Abb. 12, mdivi-1).

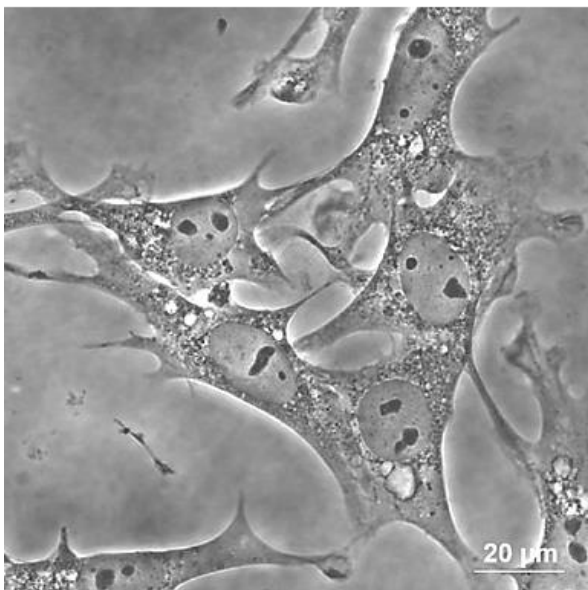
Kontrolle



K38A



Drp1+



Mdivi-1

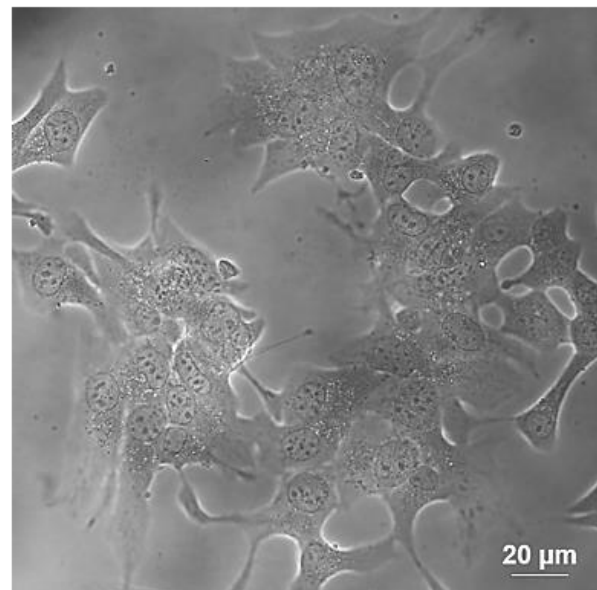


Abbildung 12 Exemplarische Darstellung mikroskopischer Aufnahmen von MIN 6 Zellen stabil transfiziert mit pcDNA als Kontrolle, stabil transfiziert mit der Drp1 Negativmutante K38A, stabil transfiziert mit einem Drp1 Überexpressionsvektor (Drp1+) und behandelt mit dem chemischen Drp1 Inhibitor mdivi-1. Vergrößerung 60-fach

4.1.2 Zellvitalitätsmessung bei Behandlung mit mdivi-1

Um die korrekte Konzentration des chemischen Inhibitors mdivi-1 für die MIN 6 Zellen zu ermitteln, wurde ein Vitalitäts-Assay mittels Alamar Blue durchgeführt. Die Untersuchung, welche eine Aussage zum Wachstum der Zellen durch die Reduzierung des Mediumfarbstoffs Alamar Blue und einem damit einhergehenden Farbumschlag ermöglichte, ergab eine signifikante Reduktion des Zellwachstums bei mdivi-1 Konzentrationen über 50 $\mu\text{mol/l}$. Bis zu einer Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ ist die Reduzierung der Zellvitalität nicht signifikant (siehe Abb. 13). Aus diesem Grund wurde eine Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ mdivi-1 für die folgenden Untersuchungen zur Beeinflussung der Drp1-Aktivität gewählt.

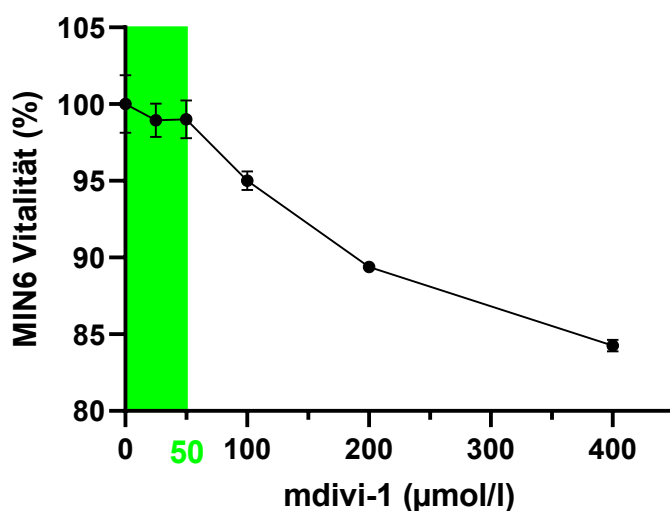


Abbildung 13 Darstellung der Zellvitalität von MIN 6 Zellen, die mit unterschiedlichen mdivi-1 Konzentrationen behandelt wurden. (n=4)

4.2 Die Expression von Drp1

Die Veränderungen der an der mitochondrialen Dynamik beteiligten Proteine, nach Beeinflussung des Drp1-Gehalts und seiner Aktivität in MIN 6 Zellen, wurde mittels Genexpressionsanalyse der bekannten Teilungs- und Fusionsproteine untersucht. Hierzu wurde Drp1 in MIN6 Zellen verstärkt exprimiert (Drp1+), eine GTPase-inaktive Drp1-Negativmutante zusätzlich exprimiert (K38A) oder die endogene GTPase Aktivität mit Hilfe des Inhibitors mitochondrial division inhibitor (mdivi-1) blockiert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mittels einer quantitativen Real-Time PCR. Eine Analyse der Proteinexpression wurde mit Hilfe von Western Blots durchgeführt. Zusätzlich konnte der Gehalt von Drp1 immunhistochemisch durch die Verwendung eines geeigneten spezifischen Antikörpers quantifiziert werden.

4.2.1 Genexpressionsanalyse von Drp1 in K38A, Drp1+ und mdivi-1 Zellen

Die Analyse der Drp1 Expression zeigte, dass sowohl die stabile Transfektion mit der Negativmutante K38A, als auch die Vektor vermittelte Drp1 Überexpression, die Expression des Proteins verdoppelte im Vergleich zu den Kontrollzellen. In MIN 6 Zellen, welche mit pcDNA transfiziert und für 24 h mit 50 $\mu\text{mol/l}$ mdivi-1 inkubiert wurden, zeigte sich keine Veränderung in der Genexpression von Drp1 im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen.

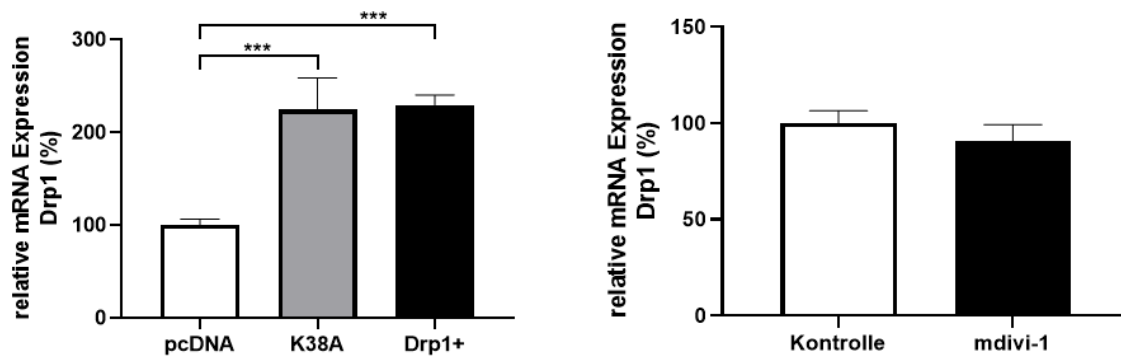


Abbildung 14 Vergleich der relativen mRNA Expression des Teilungsprotein Drp1 in stabil transfizierten MIN 6 Zellen mit pcDNA, Drp1 Negativmutante K38A und Drp1 Überexpressionsvektor und in MIN 6 Zellen mit pcDNA transfiziert und mit 50 $\mu\text{mol/l}$ mdivi-1 behandelt für 24 h. Die Genexpression wurde auf das Referenzgen GAPDH normalisiert ***, $P < 0,001$ (Student's t-Test) (n=6-20)

4.2.2 Proteinexpressionsanalyse von Drp1 in K38A und Drp1+ Zellen

Die Analyse der Proteinexpression von Drp1 in Min6 Zellen, welche stabil mit der Drp1-Negativmutante transfiziert wurden, ergab eine geminderte Expression des mitochondrialen Teilungsproteins Drp1 im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen (siehe Abb. 15 A). Die Untersuchung der Drp1 Expression in Min6 Zellen mit einer stabilen Überexpression des mitochondrialen Teilungsproteins Drp1 bestätigte eine signifikante Steigerung der Proteinexpression in Drp1+ Zellen, verglichen mit den pcDNA transfizierten Kontrollzellen (siehe Abb. 15 B).

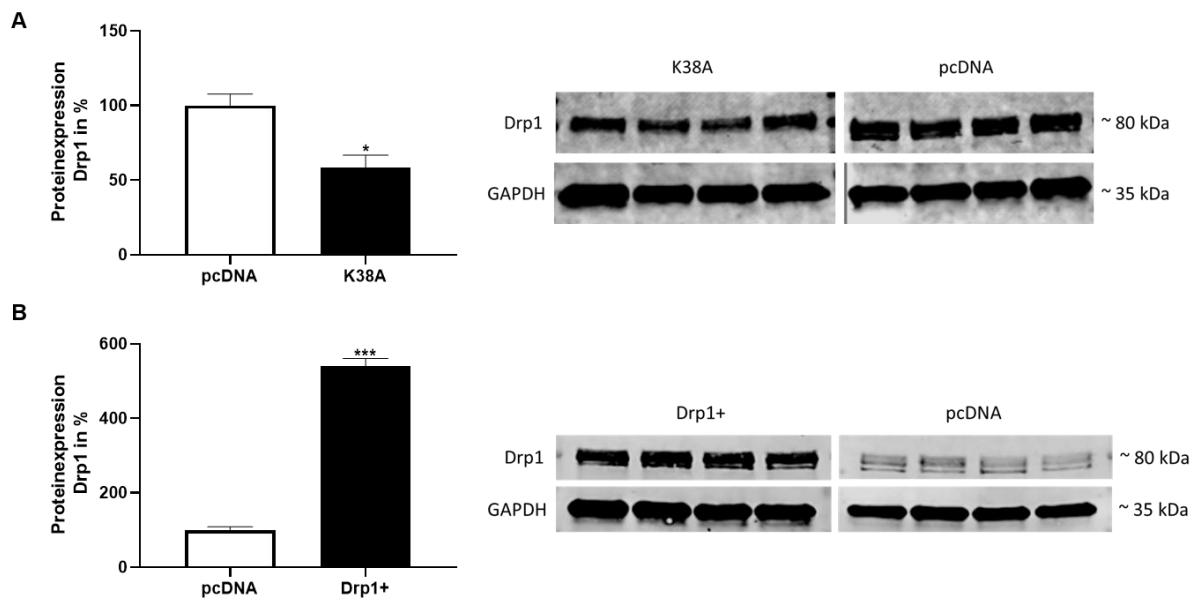


Abbildung 15 Proteinexpression von Drp1. Quantifiziert und mit repräsentativem Blot in stabil transfizierten K38A Klonen (A) und stabilen Drp1 Überexpressionsklonen Drp1+ (B). Normiert wurde auf die Proteinmenge des GAPDH. (n=4) * P < 0,05, * P < 0,001 (Student's t-Test).**

4.2.3 Proteinexpressionsanalyse in mdivi-1 behandelten Zellen

Eine Untersuchung der Proteinexpression des mitochondrialen Teilungsprotein Drp1 in MIN 6 Zellen, welche 24 h mit 50 µmol/l mdivi-1 behandelt wurden, ergab – ähnlich wie bei der Inaktivierung durch Expression der Negativmutante – keine signifikante Änderung im Expressionslevel des Proteins bei einer Gegenüberstellung mit kontrolltransfizierten Zellen (siehe Abb. 16). Aufgrund dessen, dass eine Wirkung von mdivi-1 auf die Expression des Referenzproteinen nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde zur Normalisierung eine Total Protein Färbung durchgeführt.

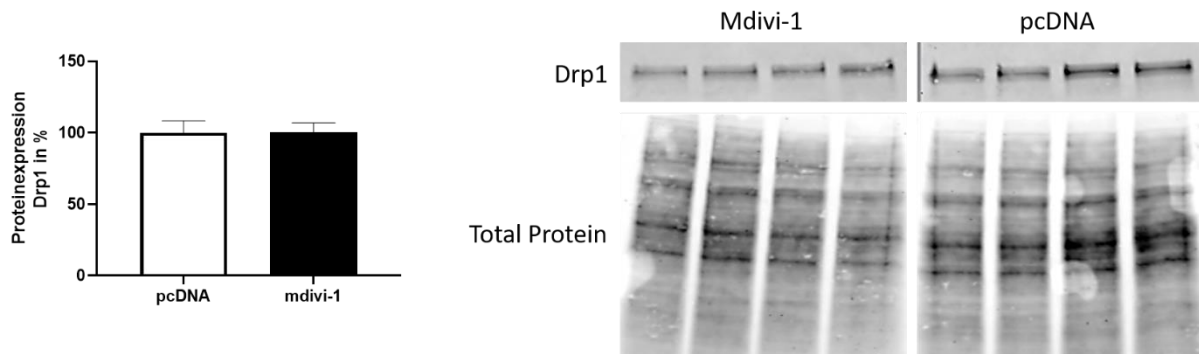


Abbildung 16 Proteinexpression von Drp1 quantifiziert und mit repräsentativem Western Blot in MIN 6 Zellen, die für 24 h mit 50 $\mu\text{mol/l}$ mdivi-1 behandelt und mit pcDNA transient transfiziert wurden. Normiert wurde durch eine Total Protein Färbung und Ermittlung des Lane Normalization Factor (LNF). (Student's t-Test)

4.2.4 Immunhistochemische Untersuchung nach Drp1 Beeinflussung

Die Auswirkung der stabilen Transfektion mit einem Drp1 Überexpressionsvektor oder einer Drp1-Negativmutante, sowie die Behandlung von MIN 6 Zellen mit mdivi-1, auf den Drp1 Gehalt und die Verteilung in der Zelle, wurde zusätzlich mit Hilfe von Immunfärbungen mit einem Antikörper gegen das endogene Drp1 untersucht. Die Markierung mittels sekundären Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper ermöglichte die Detektion. Bei der stabilen Transfektionen mit einer Drp1-Negativmutante wie auch bei der Überexpression von Drp1 konnte im Vergleich zur Kontrolle ein erhöhter Drp1 Gehalt nachgewiesen werden (siehe Abb. 17). Wobei in Zellen der Negativmutante zusätzlich teilweise eine Clusterung des Proteins bei der Verteilung des Drp1 zu beobachten ist (siehe Abb. 17 A). In MIN6 Zellen, die transient mit pcDNA transfiziert und mit mdivi-1 behandelt wurden, zeigte sich dagegen kein Unterschied im Drp1 Gehalt im Vergleich zu ihrer Kontrolle, bestehend aus nur mit pcDNA transient transfizierten Zellen (siehe Abb. 17).

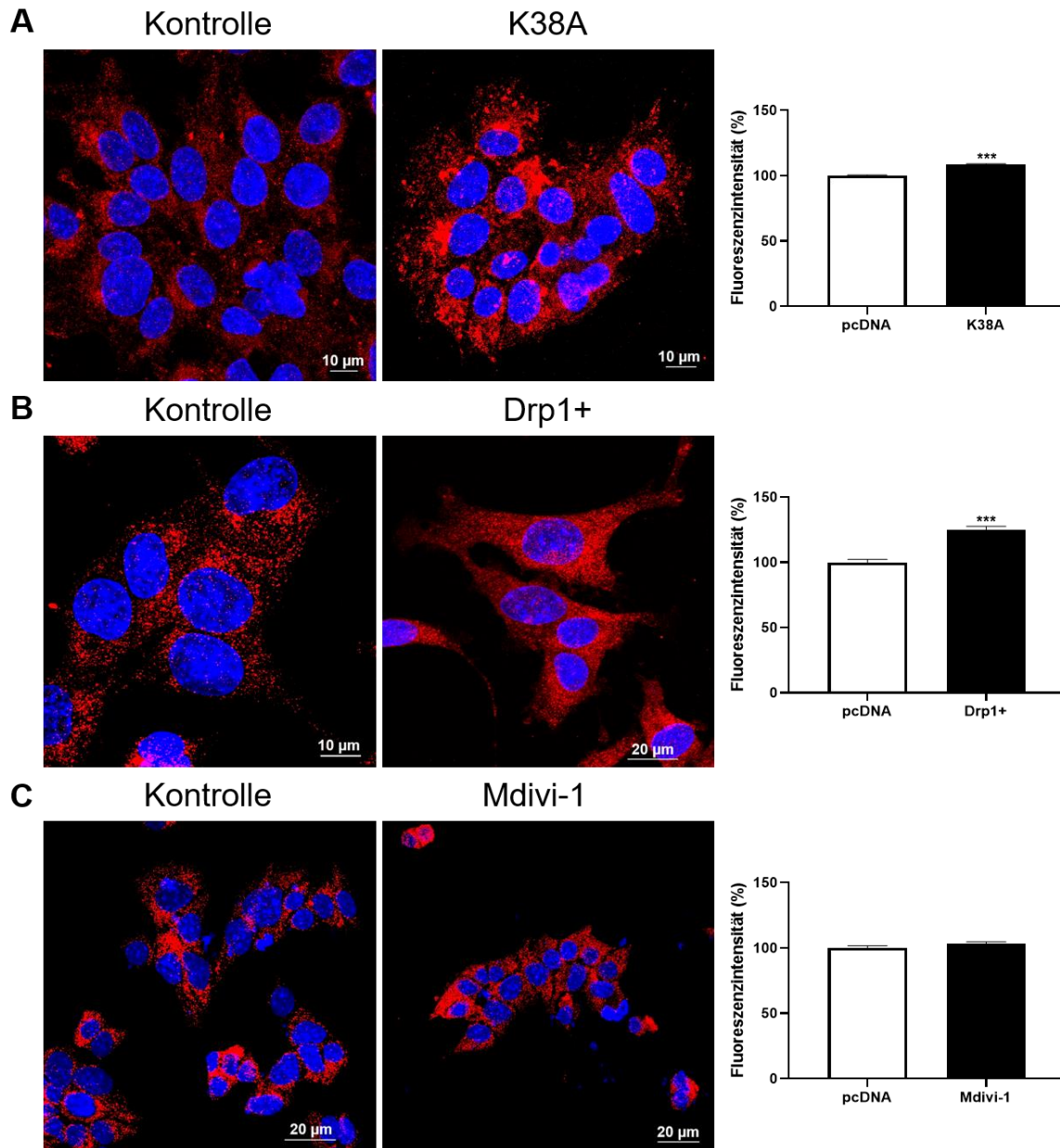


Abbildung 17 Exemplarische immunhistochemische Darstellung und Quantifizierung des Drp1 Gehalts in stabil transfizierten MIN 6 Zellen mit pcDNA, Drp1 Negativmutante K38A (A) und mit dem Drp1 Überexpressionsvektor (B) und in MIN 6 Zellen mit pcDNA transfiziert und 50 µmol/l mdivi-1 behandelt für 24 h (C). Rot=Drp1; Blau=Dapi; *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$ (Student's t-Test)

4.3 Expressionsanalyse ausgewählter Gene mit Einfluss auf die mitochondriale Dynamik

Die Auswirkungen der Veränderung des Drp1 Gehalts oder seiner Aktivität auf die Regulation der mitochondrialen Dynamik wurde anhand von Genexpressionsanalysen von bekannten Fusions- und Teilungsproteinen in den MIN 6 Zellen untersucht. Als Referenzgen diente GAPDH.

4.3.1 Genexpressionsanalyse der Fusionsproteine Mfn1, Mfn2 und Opa1

Die homologen Fusionsproteine Mitofusion 1 und Mitofusion 2 (Mfn1 und Mfn2), der äußeren mitochondrialen Membran, wurden in den K38A Zellen zu 65 % erhöht exprimiert, während sie in den Zellen mit Drp1 Überexpression keinen signifikanten Unterschied in ihrem Expressionslevel im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigten (siehe Abb. 6 A und B). In den mit mdivi-1 behandelten Zellen konnte im Vergleich zur Kontrolle, kein Unterschied in der Expression des Mfn1 gezeigt werden, während das Homolog Mfn2 zu ca. 40 % verstärkt exprimiert wurde (siehe Abb. 18 A und B). Auch das Fusionsprotein der inneren Membran der Mitochondrien – Optic atrophy 1 (Opa1) –, wurde sowohl in den K38A Zellen, als auch den Zellen der Drp1 Überexpression gegenüber der Kontrolle um 115 % vermehrt exprimiert. Zellen, welche mit mdivi-1 behandelt wurden, zeigten ebenso wie bei der Reduzierung der Drp1-Aktivität mittels K38A, eine signifikant erhöhte Expression (20%) auf mRNA Ebene (siehe Abb. 18 C).

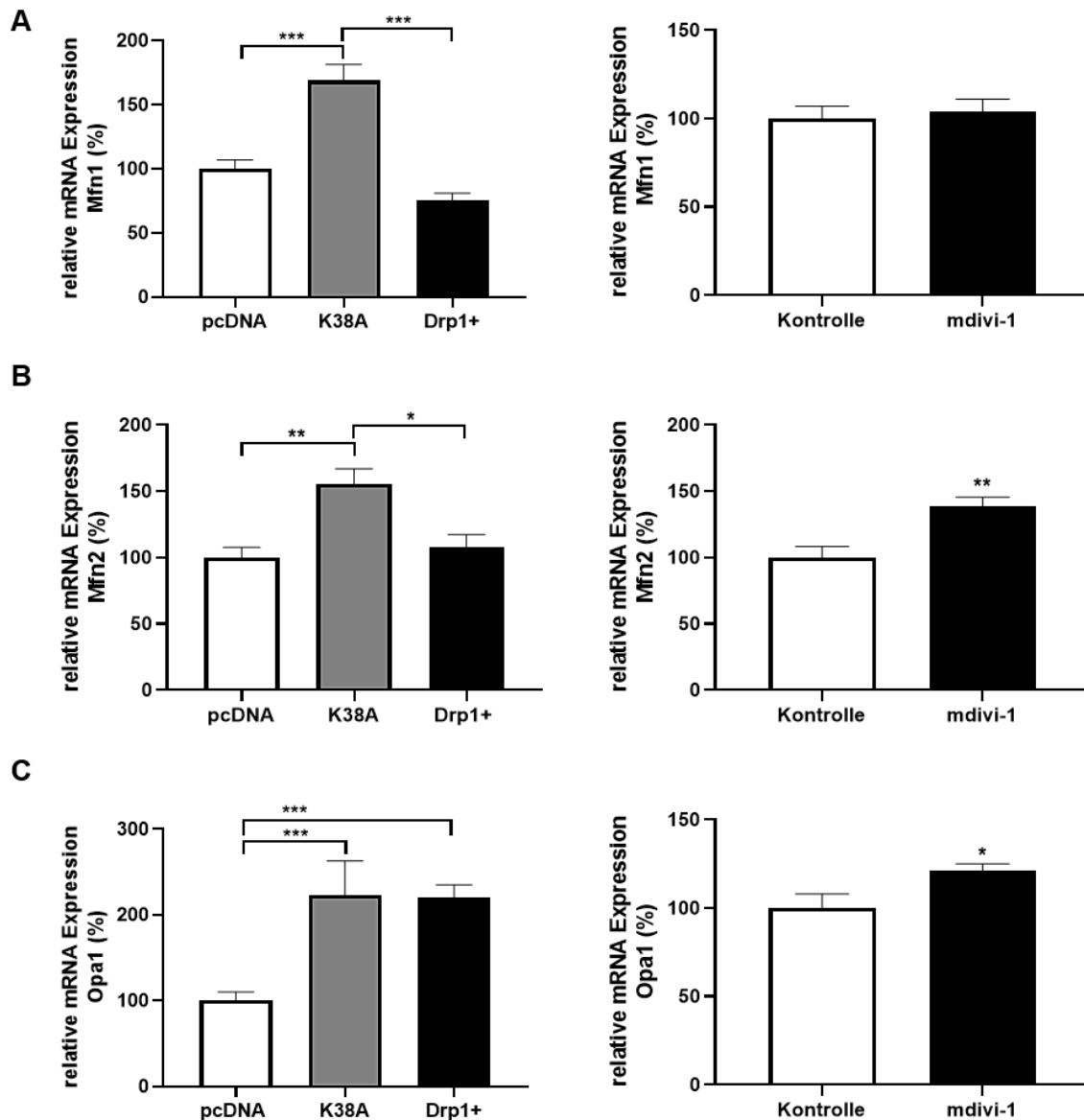


Abbildung 18 Vergleich der relativen mRNA Expression der Fusionsproteine Mfn1 (A), Mfn2 (B) und Opa1 (C) in stabil transfizierten MIN 6 Zellen mit pcDNA, Drp1 Negativmutante K38A und Drp1 Überexpressionsvektor und in MIN 6 Zellen mit pcDNA transfiziert und 50 $\mu\text{mol/l}$ mdivi-1 behandelt für 24 h. Die Genexpression wurde auf das Referenzgen GAPDH normalisiert* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ (Student's t-Test) (n = 6 - 20)

4.3.2 Genexpressionsanalyse der mitochondrialen Teilungsproteine Fis1 und Mff

Das Protein der mitochondrialen Teilung Mitochondrial Fission Protein 1 (Fis1) zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine um 50 % gesteigerte Expression in den K38A Zellen. Eine Überexpression von Drp1 in den Zellen, führte dagegen zu ca. 25 % verminderter Fis 1-Expression. MIN 6 Zellen, die mit mdivi-1 inkubiert wurden, wiesen keinen Unterschied im Expressionslevel von Fis1, verglichen mit der Kontrolle auf (siehe Abb. 19 A). Einer der Drp1-

Rezeptoren, welcher die Rekrutierung des Drp1 an die mitochondriale Membran vermittelt – Mitochondrial fission factor (Mff) – wurde weder in Zellen mit der Drp1 Negativmutante K38A, noch in Drp1 überexprimierenden Zellen, verglichen mit der Kontrolle, signifikant verändert exprimiert. Zellen, welche mit dem Inhibitor mdivi-1 behandelt wurden, zeigten im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Unterschied im Expressionslevel (siehe Abb. 19 B).

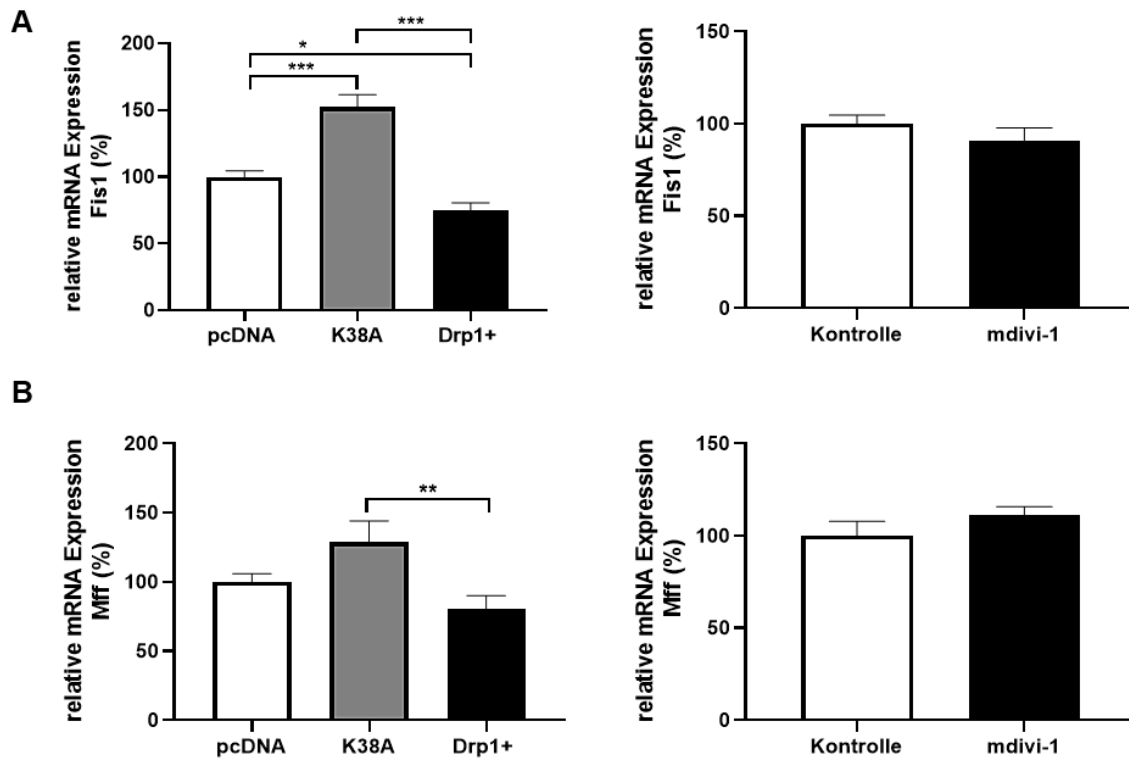


Abbildung 19 Vergleich der relativen mRNA Expression der Teilungsproteine Fis1 (A) und Mff (B) in stabil transfizierten MIN 6 Zellen mit pcDNA, Drp1 Negativmutante K38A und Drp1 Überexpressionsvektor und in MIN 6 Zellen mit pcDNA transfiziert und 50 $\mu\text{mol/l}$ mdivi-1 behandelt für 24 h. Die Genexpression wurde auf das Referenzgen GAPDH normalisiert*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ (Student's t-Test) (n=6-20)

4.4 Genexpressionsanalyse ausgewählter Proteine der Autophagie und Mitophagie

Anhand von Genexpressionsanalysen wurde untersucht, welchen Einfluss eine veränderte Drp 1 Expression bzw. eine verminderte Drp1 Aktivität auf die Regulation der Autophagie und im Besonderen auf die – für den Abbau der Mitochondrien spezifische – Mitophagie hatte.

4.4.1 Genexpressionsanalyse der Autophagie Proteine LC3/ATG8 und ATG9A

Das Markerprotein der Autophagie LC3 wurde mittels einer Sonde für das aus der Hefe homologe ATG8 untersucht. In den Zellen, welche stabil mit der Drp1 Negativmutante transfiziert wurden, war die ATG8 Expression im Vergleich zur Kontrolle stark erhöht. Die Drp1

überexprimierenden Zellen zeigten kein signifikant verändertes ATG8 Expressionslevel, während Zellen, die mit mdivi-1 inkubiert wurden, ähnlich wie die K38A Zellen, ATG8 um 50 % vermehrt exprimierten (siehe Abb. 20 A). Das Autophagosomen bildende Protein ATG9A wurde im Unterschied zur Kontrolle, in K38A Zellen ebenfalls erhöht exprimiert. In Zellen mit Drp1 Überexpression zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Expressionslevel verglichen mit den Kontrollzellen. Zellen, die mit dem Drp1 Inhibitor mdivi-1 behandelt wurden, wiesen hier (im Gegensatz zur K38A Mutante), keine signifikante Veränderung in der Expression von ATG9A im Vergleich zu ihren Kontrollzellen auf (siehe Abb. 20 B).

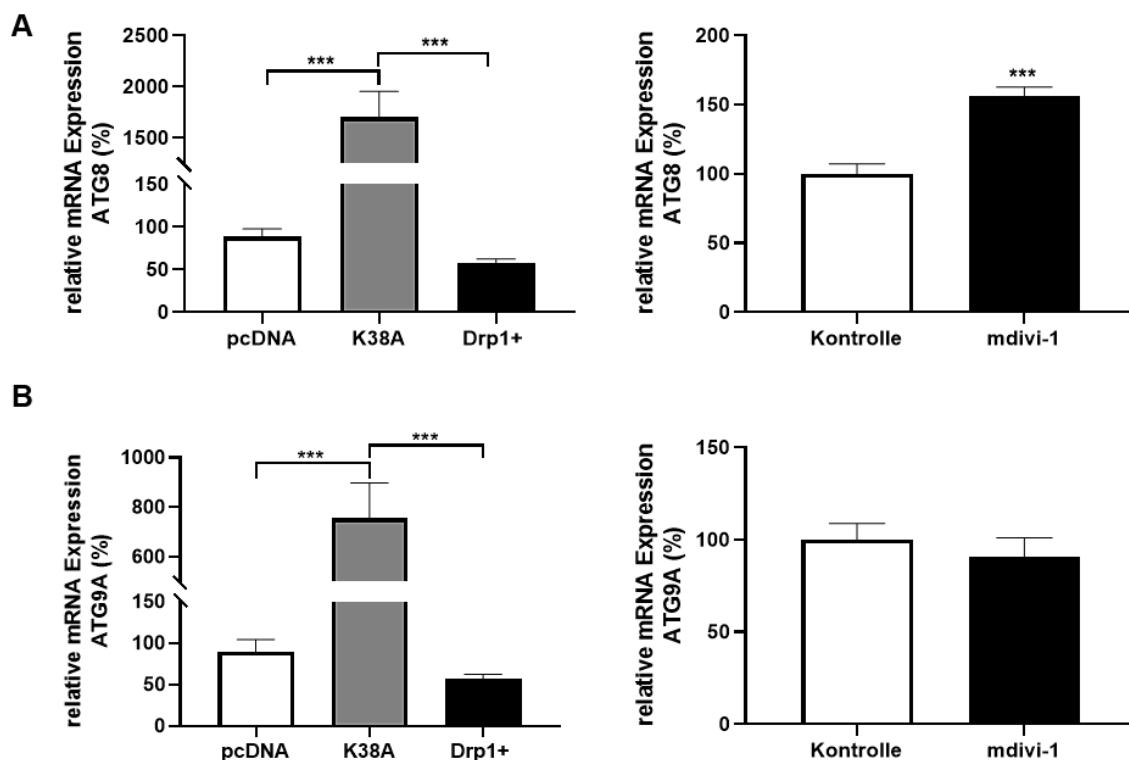


Abbildung 20 Vergleich der relativen mRNA Expression der Autophagie assoziierten Proteine ATG8 (A) und ATG9A (B) in stabil transfizierten MIN 6 Zellen mit pcDNA, Drp1 Negativmutante K38A und Drp1 Überexpressionsvektor und in MIN 6 Zellen mit pcDNA transfiziert und 50 µmol/l mdivi-1 behandelt für 24 h. Die Genexpression wurde auf das Referenzgen GAPDH normalisiert; ***, $P < 0,001$ (Student's t-Test) (n=6-20)

4.4.2 Genexpressionsanalyse der Mitophagie-assoziierten Proteine PINK1 und Parkin

Die Kinase PTEN-induced kinase 1 (PINK1) und die Protein-Ubiquitin-Ligase Parkin, die mit dem Signalweg der Mitochondrien spezifischen Autophagie – der Mitophagie – assoziiert werden, wurden mittels Genexpressionsanalyse untersucht. In den K38A Zellen war das Expressionslevel von PINK1 im Vergleich zu den mit pcDNA kontrolltransfizierten Zellen sechsfach erhöht. Die Zellen mit einer Drp1 Überexpression zeigten keinen Unterschied in der PINK1-Expression.

Auch in Zellen, welche eine Behandlung mit dem Drp1 Inhibitor mdivi-1 erhielten, konnte keine signifikant veränderte Expression von PINK1 nachgewiesen werden, im Gegensatz zur Aktivitätsreduzierung durch die Expression der Negativmutante (siehe Abb. 21 A). Die K38A Zellen zeigten eine signifikant erhöhte Expression der Ubiquitin-Ligase Parkin, verglichen mit den pcDNA Kontrollzellen. Drp1 überexprimierende Zellen wiesen im Vergleich zu ihrer Kontrolle keinen Unterschied im Expressionslevel von Parkin auf. MIN 6 Zellen, welche mit mdivi-1 inkubiert wurden, zeigten eine gesteigerte Expression von Parkin von etwa 130 %, im Vergleich zu den Kontrollzellen und ähnlich der K38A Zellen (siehe Abb. 21 B).

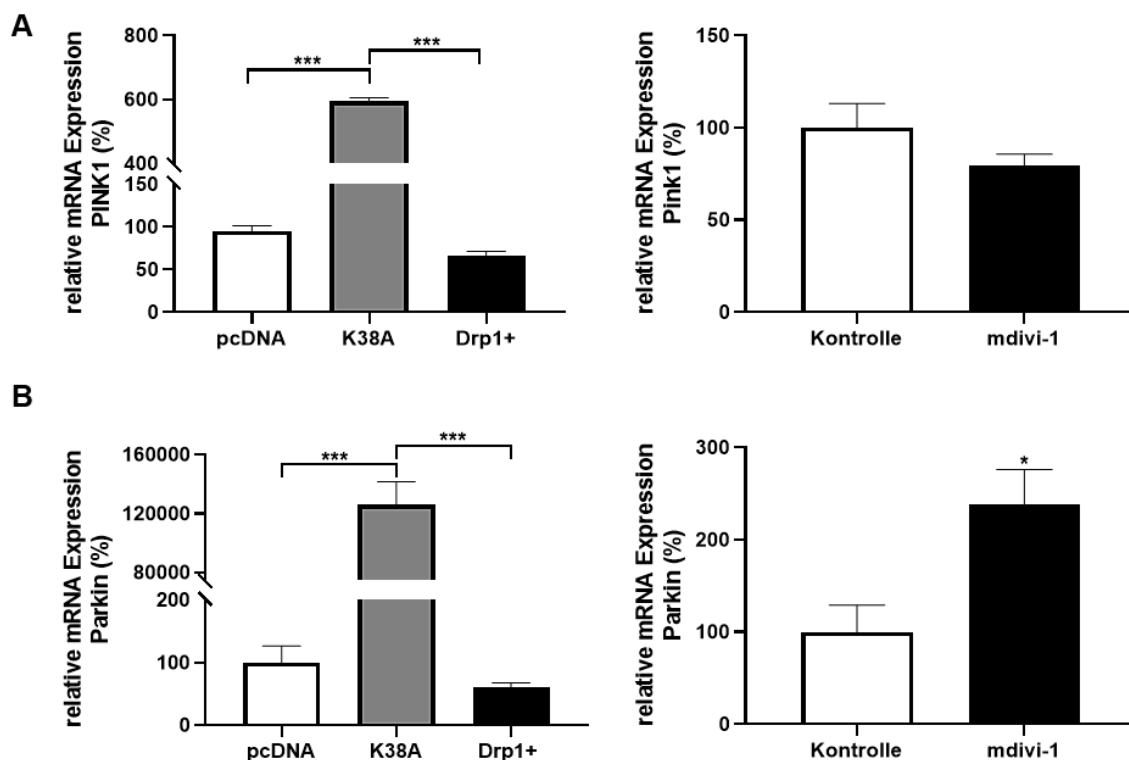


Abbildung 21 Vergleich der relativen mRNA Expression der Mitophagie assoziierten Proteine PINK1 (A) und Parkin (B) in stabil transfizierten MIN 6 Zellen mit pcDNA, Drp1 Negativmutante K38A und Drp1 Überexpressionsvektor und in MIN 6 Zellen mit pcDNA transfiziert und 50 $\mu\text{mol/l}$ mdivi-1 behandelt für 24 h. Die Genexpression wurde auf das Referenzgen GAPDH normalisiert*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ (Student's t-Test) (n=6-20)

4.5 Genexpressionsanalyse ausgewählter Proteine der mitochondrialen Atmungskette

Zur Untersuchung der Auswirkungen der Beeinflussungen von Drp1 auf den Energiehaushalt der Zelle, wurden einige ausgewählte kerncodierte und mitochondrial codierte Proteine der Komplexe der Atmungskette mittels Genexpressionsanalyse untersucht.

4.5.1 Genexpressionsanalyse der kerncodierten Proteine der Atmungskette Atp5a1 und Ndufb8

Die untersuchten kerncodierten Untereinheiten der Atmungskette, waren die ATP Synthase F1 Subunit Alpha (Atp5a1) - die Untereinheit der ATPase des Komplex V und eine Untereinheit der NADH-Dehydrogenase des Komplex I, die NADH Ubiquinone Oxidoreductase Subunit 8 (Ndufb8). In den Zellen, welche die Drp1 Negativmutante K38A exprimierten, wurde kein Unterschied im Expressionslevel von Atp5a1 im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen. Die Drp1 Überexpressionszellen wiesen eine um 50 % erhöhte Expression des Atp5a1 verglichen mit den pcDNA Zellen auf. In MIN 6 Zellen, welche mit mdivi-1 behandelt wurden, konnte keine signifikante Veränderung des Expressionslevels nachgewiesen werden, gleich wie bei der Aktivitätsminderung durch die Expression von K38A (siehe Abb. 22 A). Die Atmungskettenuntereinheit Ndufb8 wurde in den K38A Zellen 70 % stärker exprimiert, als es in den Kontrollzellen festgestellt wurde. Auch in Drp1 überexprimierenden Zellen war die Expression des Ndufb8 im Vergleich zur Kontrolle um 230 % gesteigert. Keine signifikante Veränderung im Expressionslevel zeigte sich zwischen Kontrollzellen und Zellen, welche mit mdivi-1 inkubiert wurden (siehe Abb. 22 B).

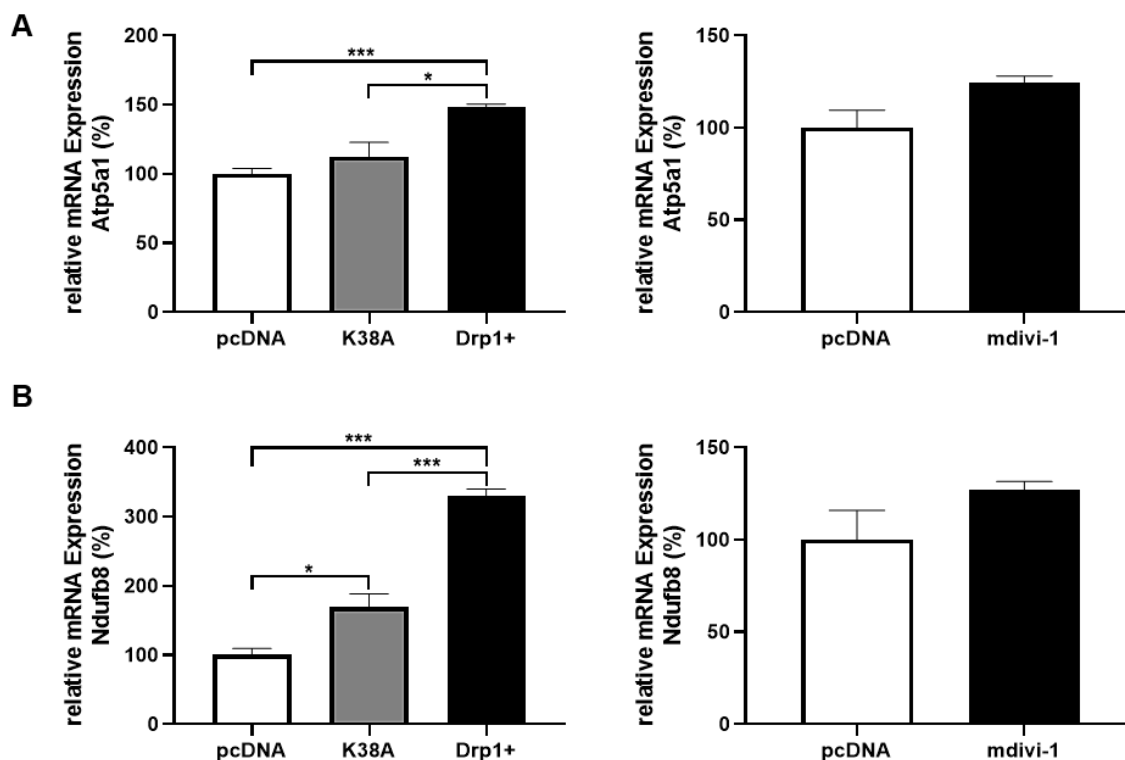


Abbildung 22 Vergleich der relativen mRNA Expression einer Auswahl kerncodierter Bestandteile der mitochondrialen Atmungskette Atp5a1 (A) und Ndufb8 (B) in stabil transfizierten MIN 6 Zellen mit pcDNA, Drp1 Negativmutante K38A und Drp1 Überexpressionsvektor und in MIN 6 Zellen mit pcDNA transfiziert und 50 μ mol/l mdivi-1 behandelt für 24 h. Die Genexpression wurde auf

das Referenzgen GAPDH normalisiert*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ (Student's t-Test) (n=6-20)

4.5.2 Genexpressionsanalyse mitochondrial codierter Untereinheiten der Atmungskette ATP8 und ND5/ND6

Als Auswahl an auf der mtDNA codierten Bestandteile der Atmungskette wurde die Untereinheit 8 der ATP Synthase F_0 des Komplex V (ATP8) und eine Untereinheit der NADH-Oxidoreduktase des Komplex I, das ND5/ND6 analysiert. MIN 6 Zellen, welche stabil die Drp1 Negativmutante K38A exprimierten, zeigten eine um 65 % geminderte Expression von ATP8, während die Zellen mit Überexpression von Drp1 eine zu 50 % verringerte Expression aufwiesen, verglichen mit den Kontrollzellen. In MIN 6 Zellen, die eine Behandlung mit mdivi-1 erhalten hatten, war das Expressionslevel von ATP8 um ca. 20 % im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Damit wurde ähnlich wie bei Zellen, die K38A exprimieren eine Reduktion beobachtet, die aber weniger ausgeprägt war (siehe Abb. 23 A). Bei der Expression von ND5/ND6 konnte keine Veränderung der Expression zwischen Kontrolle und K38A-Zellen bemessen werden. Die Drp1 überexprimierenden Zellen wiesen eine um 100 % gesteigerte Expression auf. Genau wie bei der Aktivitätsinhibition durch die Negativmutante, wurde auch bei der Aktivitätssenkung durch mdivi-1 kein Unterschied im Level der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen (siehe Abb. 23 B).

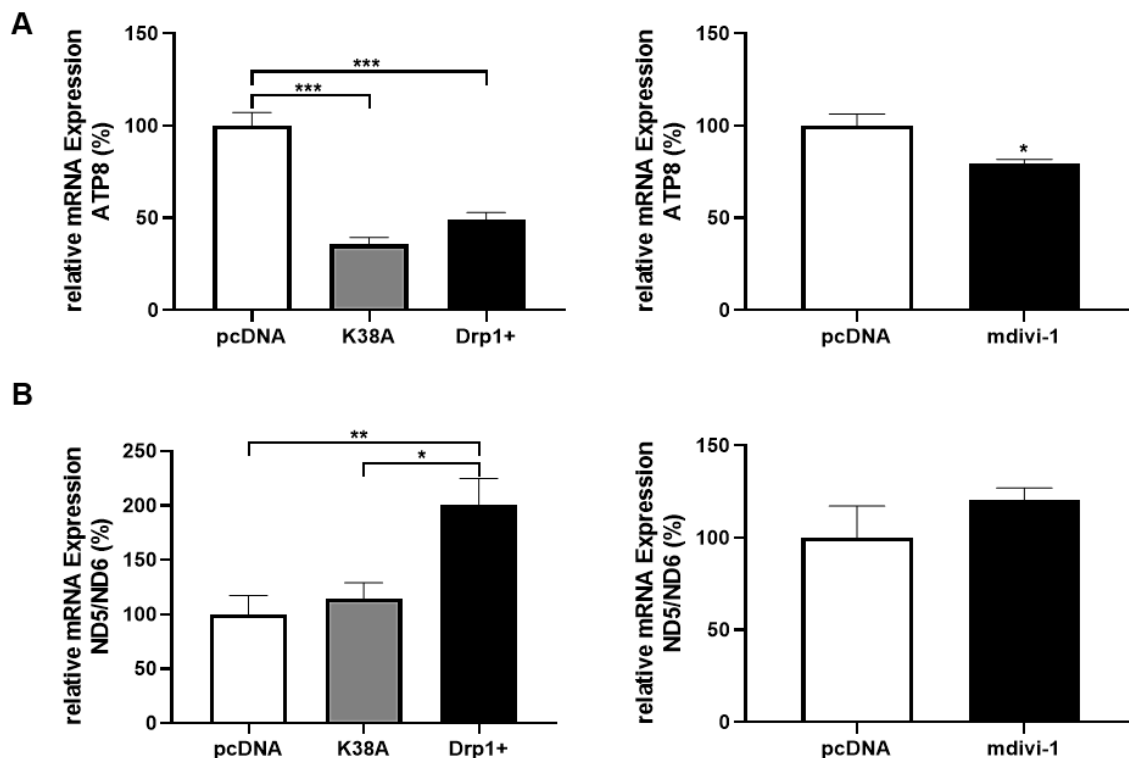


Abbildung 23 Vergleich der relativen mRNA Expression der mitochondrial exprimierten Bestandteile der Atmungskette der Mitochondrien ATP8 (A) und ND5/ND6 (B) in stabil transfizierten MIN 6 Zellen mit pcDNA, Drp1 Negativmutante K38A und Drp1 Überexpressionsvektor und in MIN 6

Zellen mit pcDNA transfiziert und 50 $\mu\text{mol/l}$ mdivi-1 behandelt für 24 h. Die Genexpression wurde auf das Referenzgen GAPDH normalisiert*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ (Student's t-Test) (n=6-20)

4.6 Genexpressionsanalyse von antioxidativ wirksamen Proteinen

Zur Untersuchung, ob die Zellen nach Beeinflussung von Drp1 oxidativen Stress ausgesetzt sind, an den möglicherweise eine Anpassung erfolgt, wurde die Genexpression anti-oxidativ wirksamer Proteine analysiert.

4.6.1 Genexpressionsanalyse der Superoxiddismutasen 1 und 2 , der Catalase, der Glutathionperoxidase und dem Peroxiredoxin

Der Radikalfänger, die Superoxiddismutase 1 (SOD1), zeigte in Zellen, welche Drp1 überexprimierten im Vergleich zur Kontrolle, eine signifikant erhöhte Expression, aber in den Zellen mit Drp1 Negativmutante K38A keinen Unterschied. Auch in Zellen, welche mit mdivi-1 behandelt wurden, wurde kein Unterschied in der Expression von SOD1 im Vergleich zu der Kontrolle festgestellt (siehe Abb. 12 A). Für die Superoxiddismutase 2 (SOD2) zeigte sich sowohl in den Zellen der Drp1 Überexpression, als auch den K38A Zellen eine Steigerung der Expression um 85 % (K38A) und 300 % (Drp1+). Auch MIN 6 Zellen, deren Drp1 Aktivität durch mdivi-1 inhibiert war, wiesen ein 60 % höheres Expressionslevel für SOD2 auf im Vergleich zu ihrer Kontrolle (siehe Abb. 12 B). Im Gegensatz dazu kam es zu einer signifikanten Reduktion der Expression von Catalase um mehr als 90 % sowohl nach Drp1 Überexpression, als auch bei der Expression der K38A Negativmutante. Eine Inkubation der MIN 6 Zellen mit mdivi-1 führte hingegen zu einem signifikanten Anstieg der Catalase Expression (220 %) (siehe Abb. 12 C). Weiterhin wurden zwei weitere Enzyme der zellulären antioxidativen Abwehr, die Glutathionperoxidase (Gpx) und das Peroxiredoxin (Prdx) hinsichtlich ihres Expressionslevel analysiert. Die Glutathionperoxidase zeigte keine veränderte Expression, weder in K38A, noch Drp1+ Zellen, im Vergleich zu ihren Kontrollzellen. Auch mdivi-1 hatte keine signifikante Auswirkung auf die Expression, verglichen mit der Kontrolle (siehe Abb. 25 A). Beim Peroxiredoxin wurde ebenfalls keine Veränderung der Expressionslevel in den unterschiedlich behandelten Zellen zur Drp1 Beeinflussung nachgewiesen, verglichen mit ihren jeweiligen Kontrollen (siehe Abb. 25 B).

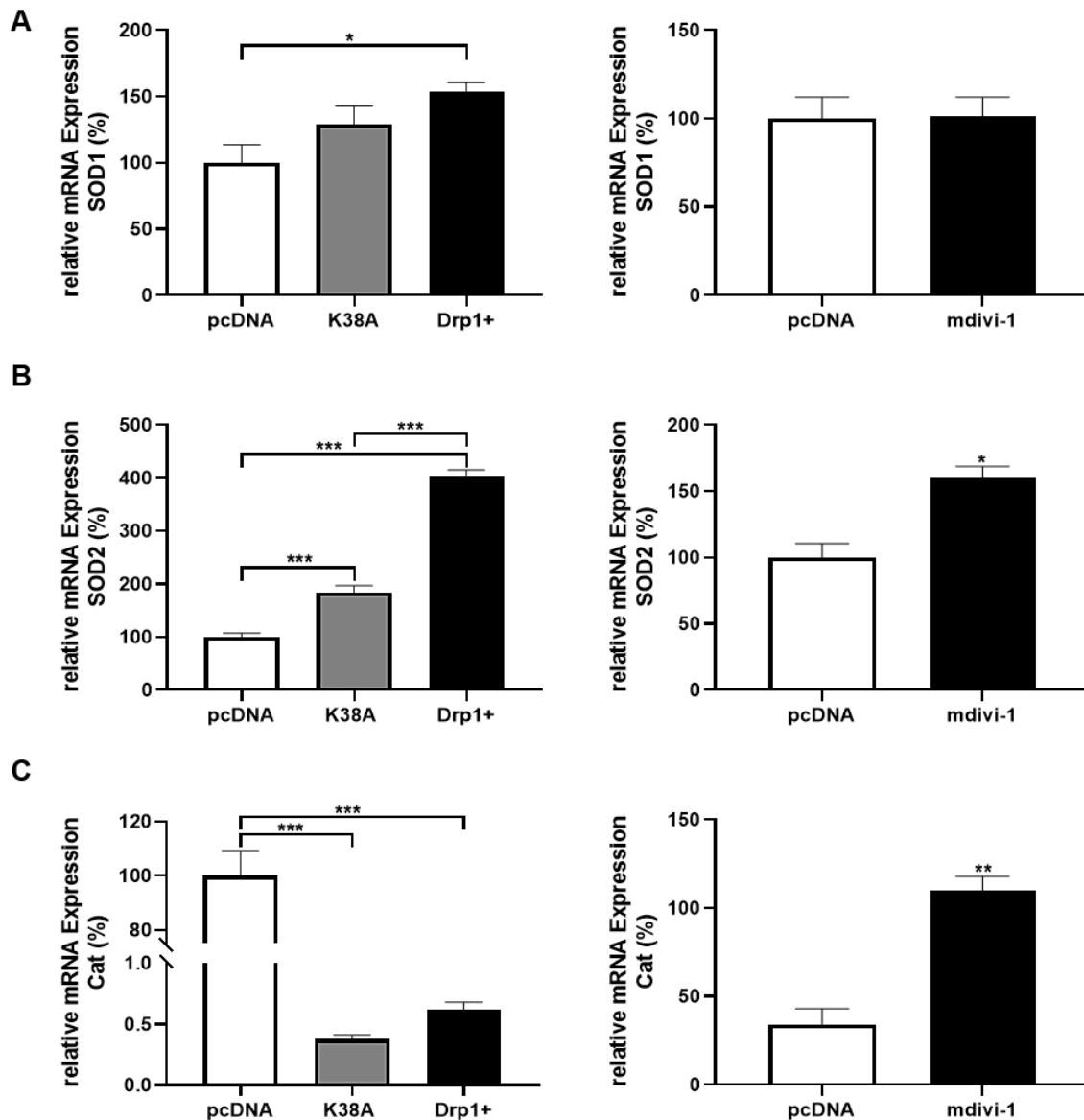


Abbildung 24 Vergleich der relativen mRNA Expression der antioxidativ wirksamen Proteine der SOD1 (A), der SOD2 (B) und der nachgeschalteten Catalase (C) in stabil transfizierten MIN 6 Zellen mit pcDNA, Drp1 Negativmutante K38A und Drp1 Überexpressionsvektor und in MIN 6 Zellen mit pcDNA transfiziert und 50 $\mu\text{mol/l}$ mdivi-1 behandelt für 24 h. Die Genexpression wurde auf das Referenzgen GAPDH normalisiert*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ (Student's t-Test) (n=6-20)

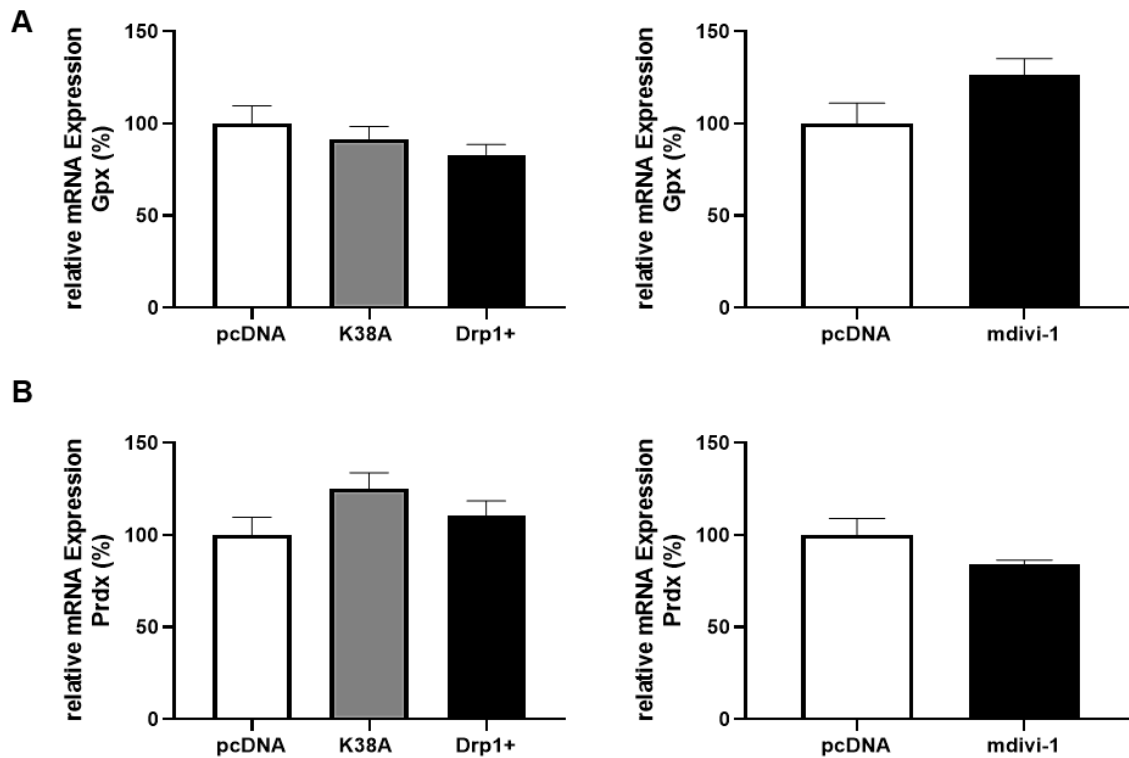


Abbildung 25 Vergleich der relativen mRNA Expression der antioxidativ wirksamen Proteine der Gpx (A) und Prdx (B) in stabil transfizierten MIN 6 Zellen mit pcDNA, Drp1 Negativmutante K38A und Drp1 Überexpressionsvektor und in MIN 6 Zellen mit pcDNA transfiziert und 50 $\mu\text{mol/l}$ mdivi-1 behandelt für 24 h. Die Genexpression wurde auf das Referenzgen GAPDH normalisiert (Student's t-Test) (n=6-20)

4.7 Proteinexpressionsanalyse des mitochondrialen oxidativen Phosphorylierungs Systems (OXPHOS) in K38A, Drp1+ und mdivi-1 Zellen

4.7.1 Proteinexpressionsanalyse des mitochondrialen oxidativen Phosphorylierungssystems (OXPHOS) in K38A Zellen

Für die Analyse der Proteinexpression des Oxidativen Phosphorylierungssystems wurden verschiedene Untereinheiten des Systems näher betrachtet: das kerncodierte Ubiquinol-Cytochrom C Reductase Core Protein (Uqcrc2) des Atmungskomplex III, die Mitochondrially Encoded Cytochrom C Oxidase I (Mtc01) aus dem Atmungskomplex IV, die Succinate Dehydrogenase Complex Iron Sulfur Subunit B (SDHB) des Atmungskomplex II und die Ubiquinone Oxidoreductase Subunit B8 (Ndufb8) aus dem Atmungskomplex I stammend. Alle vier untersuchten Untereinheiten zeigten, verglichen mit der Kontrolle und bezogen auf β -Actin, eine gesteigerte Proteinexpression. Insbesondere SDHB und Ndufb8 zeigten in der

Analyse eine 15- (SDHB) bis 25-fache (Ndufb8) Erhöhung ihres Expressionslevel in den K38A Zellen (siehe Abb. 26).

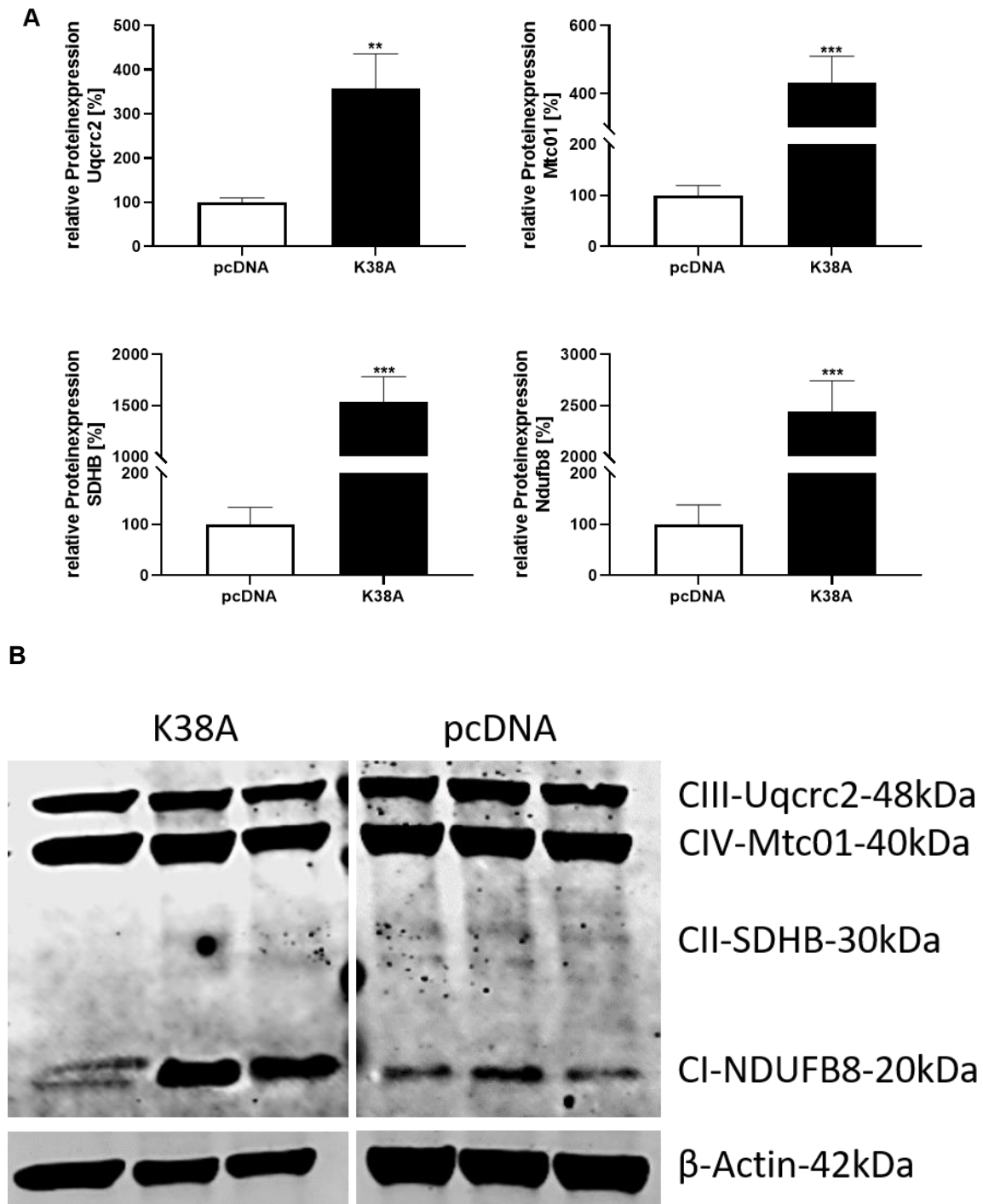


Abbildung 26 Western Blot zur Proteinexpression des OXPHOS in stabil transfizierten K38A Klonen (A) Quantitative Auswertung und (B) repräsentativer Western Blot. Die relative Proteinexpressionsanalyse wurde auf die β -Actin-Menge normalisiert; (n=3) * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (Student's t-Test)

4.7.2 Proteinexpressionsanalyse des mitochondrialen oxidativen Phosphorylierungs Systems (OXPHOS) in Drp1+ Zellen

Für die Analyse des oxidativen Phosphorylierungssystems wurden vier Untereinheiten aus vier Komplexen der Atmungskette näher betrachtet und quantifiziert. Sowohl die kerncodierten (Uqcrc2, SDHB, Ndufb8), als auch die mitochondrial codierte Untereinheit (Mtc01), die hier analysiert wurden, zeigten eine erhöhte Expression im Vergleich zur Kontrolle in Drp1+ Zellen, die aber durch die Varianz der Werte keine Signifikanz erreichte (siehe Abb. 27).

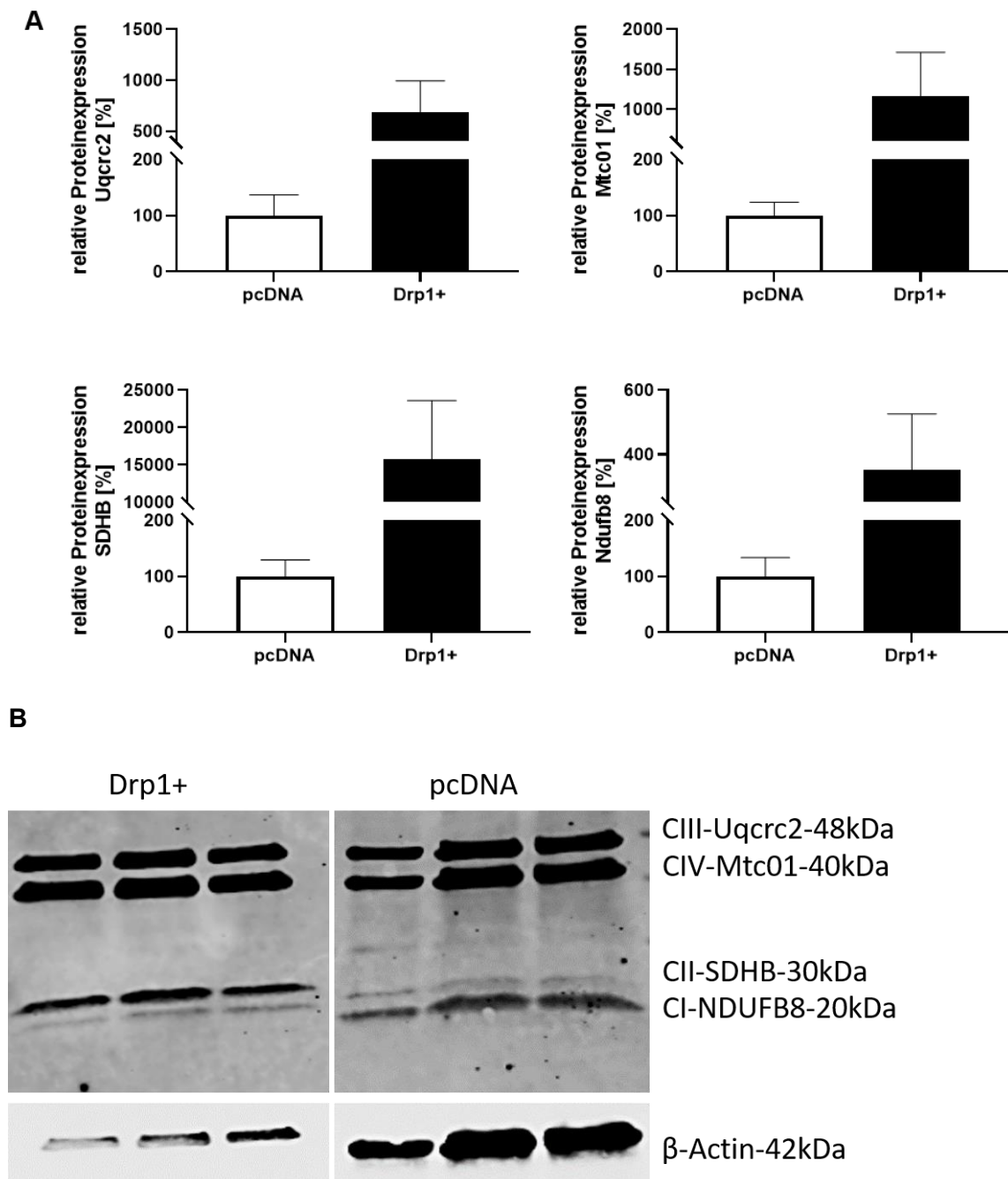
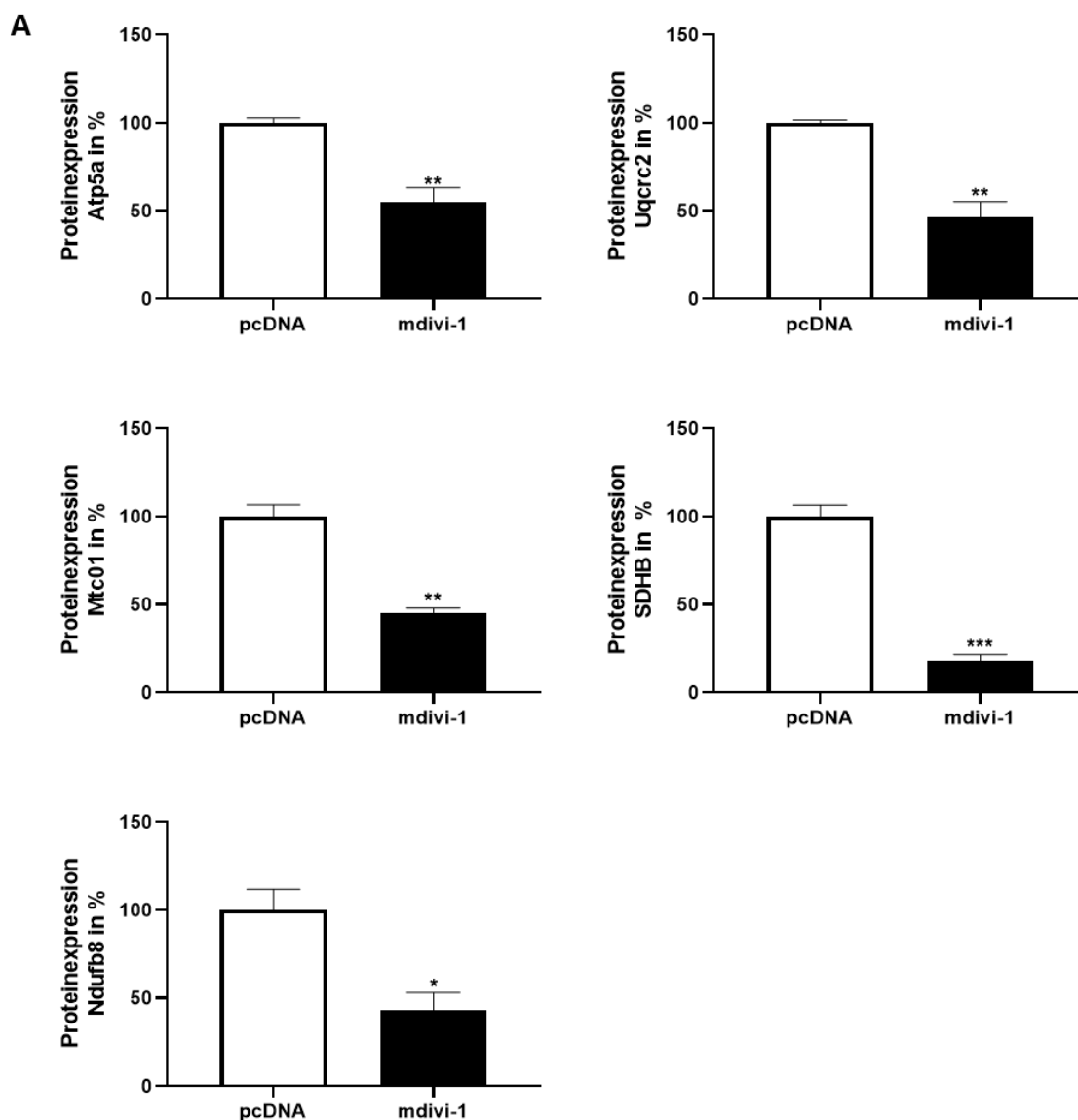


Abbildung 27 Western Blot zur Proteinexpression des OXPHOS in stabil transfizierten Drp1 Überexpressionsklonen (A) in quantitativer Auswertung und (B) repräsentativer Western Blot.

Die relative Proteinexpressionsanalyse wurde auf die β -Actin Menge normalisiert; (n=3)
(Student's t-Test)

4.7.3 Proteinexpressionsanalyse des mitochondrialen oxidativen Phosphorylierungssystems (OXPHOS) in mdivi-1 Zellen

Die Analyse der Proteinexpression des oxidativen Phosphorylierungssystems in Zellen, die transient mit pcDNA transfiziert und dann zu einem Teil mit mdivi-1 behandelt wurden ergab, dass sowohl die kerncodierten Bestandteile des Systems Uqcrc2 und Ndufb8 als auch die beiden untersuchten mitochondrial codierten Komplexe Atp5a und Mtc01 eine signifikant niedrigere Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen aufwiesen (siehe Abb. 28). Aufgrund der Tatsache, dass eine Beeinflussung von mdivi-1 auf die Expression von Referenzproteinen nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde stattdessen mittels Total Protein Färbung eine Ladungskontrolle durchgeführt, durch welche der Lane Normalization Factor (LNF) bestimmt und zur Normierung verwendet wurde.



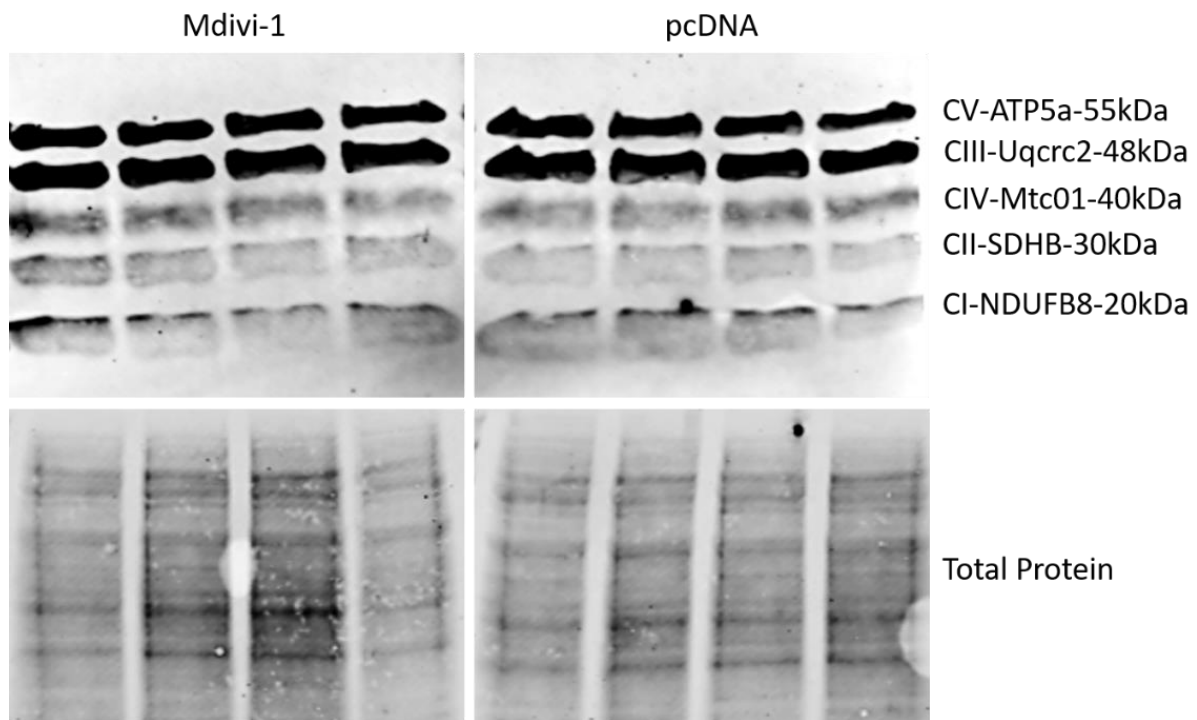
B

Abbildung 28 Western Blot zur Proteinexpression des OXPHOS in MIN 6 Zellen transient mit pcDNA transfiziert und für 24 h mit 50 $\mu\text{mol/l}$ mdivi-1 behandelt in (A) quantitativer Auswertung und (B) mit repräsentativem Western Blot. Zur Normalisierung wird eine Total Protein Färbung durchgeführt und der LNF bestimmt. (n=4) *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (Student's t-Test)

4.8 Immunhistochemische Untersuchungen

4.8.1 Immunhistochemische Untersuchung zur Insulin und Glucokinase Expression in K38A, Drp1+ und mdivi-1 Zellen

Die Auswirkung der Beeinflussung von Drp1 auf die Funktion der Betazelle des Pankreas wurde mittels Immunfluoreszenz Färbung des Glucosesensor-Enzyms Glucokinase und des Hormons Insulin untersucht. Die Quantifizierung ergab, dass die Herabsetzung der Aktivität von Drp1 durch die Expression einer Drp1 Negativmutante K38A, eine gesteigerte Expression von Glucokinase und Insulin zur Folge hatte (siehe Abb. 29). In Zellen, mit Drp1 Überexpression, waren weder die Glucokinase noch das Insulin in ihrer in den Zellen vorkommenden Menge verändert, verglichen mit dem Gehalt in der pcDNA Kontrolle (siehe Abb. 30). Zellen, die mit mdivi-1 behandelt wurden, zeigten in der Quantifizierung eine signifikant erhöhte Expression von Insulin, (genau wie bei Zellen der genetischen Aktivitätsminderung durch K38A), während die Glucokinase Expression nur eine tendenzielle Erhöhung aufwies (siehe Abb. 31).

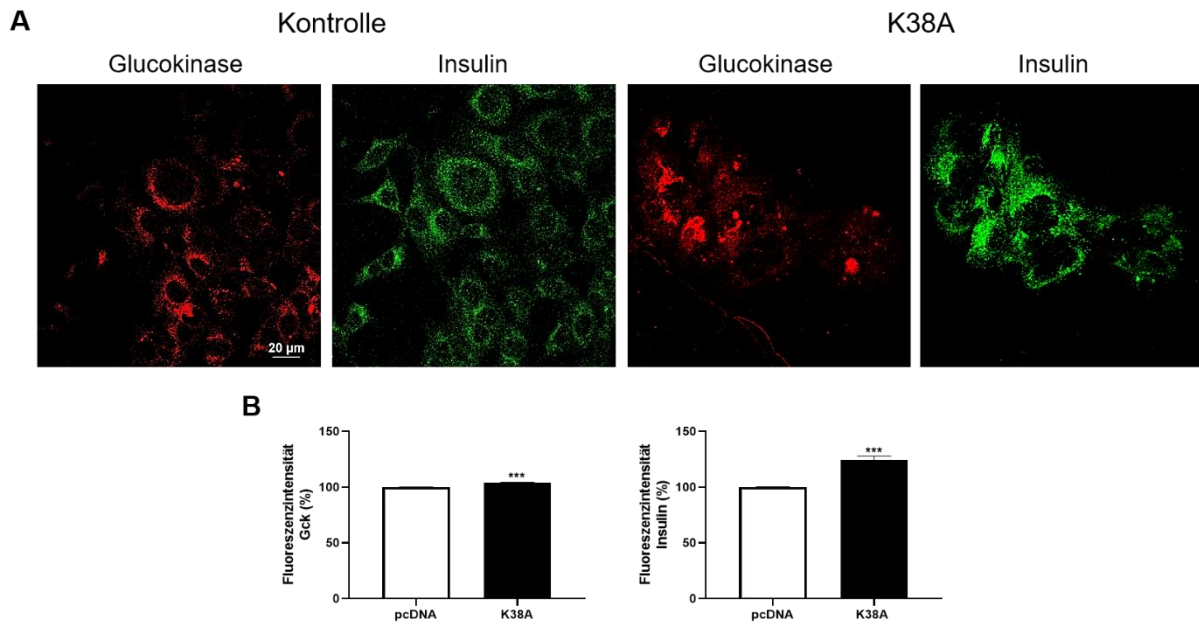


Abbildung 29 Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Glucokinase und des Insulins in stabil transfizierten MIN 6 Zellen mit pcDNA als Kontrolle und dem Drp1 Negativmutante K38A; Rot= Glucokinase; Grün=Insulin (A) und Quantifizierung des Glucokinase und Insulin Gehalts in den Zellen (B) (n=18) ;***P < 0,001 (Student's t-Test).

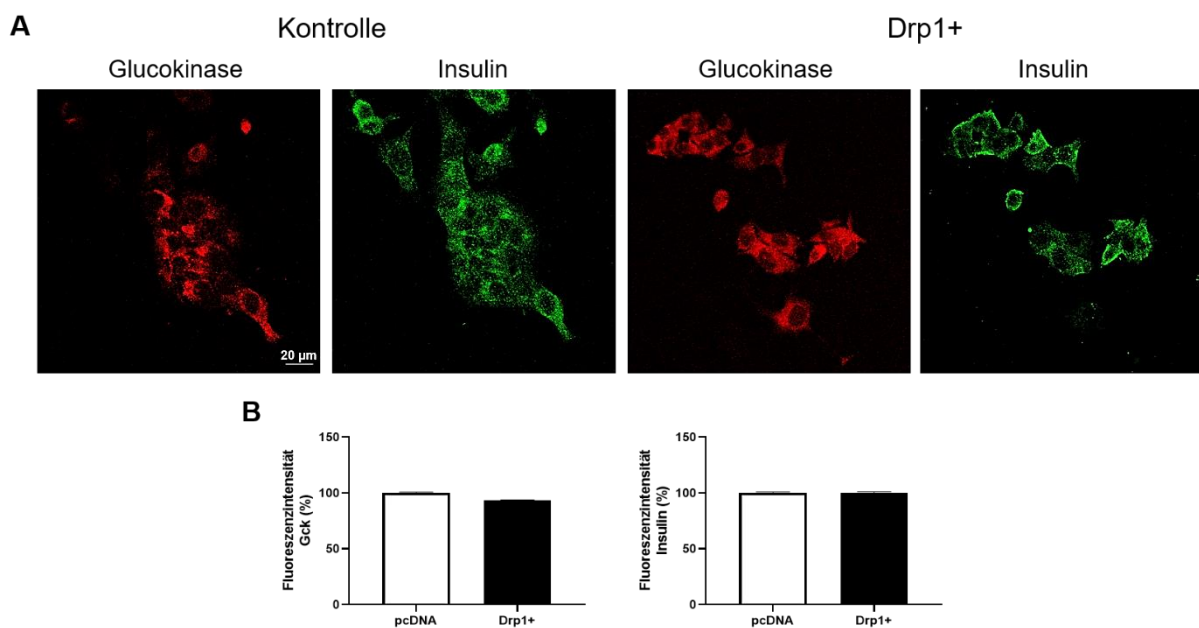


Abbildung 30 Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Glucokinase und des Insulins in stabil transfizierten MIN 6 Zellen mit pcDNA als Kontrolle und dem Drp1 Überexpressionsvektor; Rot= Glucokinase; Grün=Insulin (A) und Quantifizierung des Glucokinase und Insulin Gehalts in den Zellen (B) (n=15) (Student's t-Test).

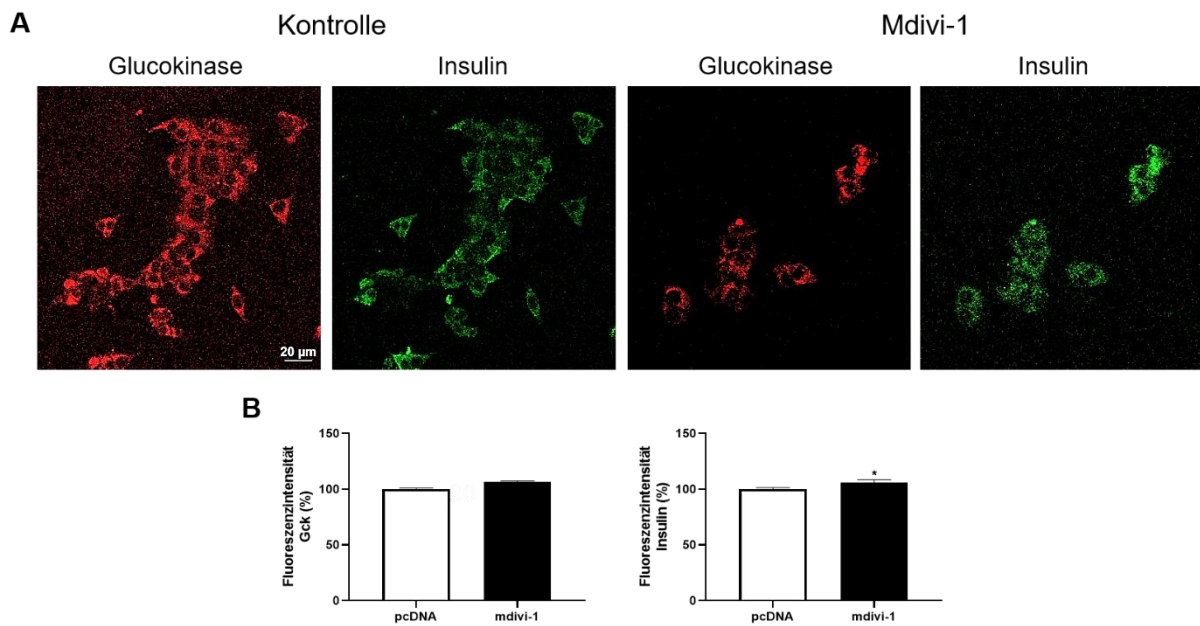


Abbildung 31 Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Glucokinase und des Insulins in MIN 6 Zellen mit pcDNA transfiziert und 50 µmol/l mdivi-1 behandelt für 24 h; Rot= Glucokinase; Grün=Insulin (A) und Quantifizierung des Glucokinase und Insulin Gehalts in den Zellen (B) (n=21) ;* P < 0,05 (Student's t-Test).

4.8.2 Immunhistochemische Untersuchung zur LC3 Expression in K38A, Drp1+ und mdivi-1 Zellen

Die Expression von LC3 als Autophagiemarker, wurde mit Hilfe einer Immunfluoreszenz Färbung bei unterschiedlichen Drp1 Beeinflussungen untersucht. Die Quantifizierung ergab, dass im Vergleich zur Kontrolle, die Steigerung des Drp1 Gehalts in Drp1+ Zellen eine signifikante Steigerung des LC3 Gehalts zur Folge hatte. Die Inhibition der Drp1-Aktivität über eine Negativmutante oder den chemischen Inhibitor mdivi-1, besaßen keinen signifikanten Einfluss auf den LC3 Gehalt, verglichen mit der Kontrolle (siehe Abb. 32).

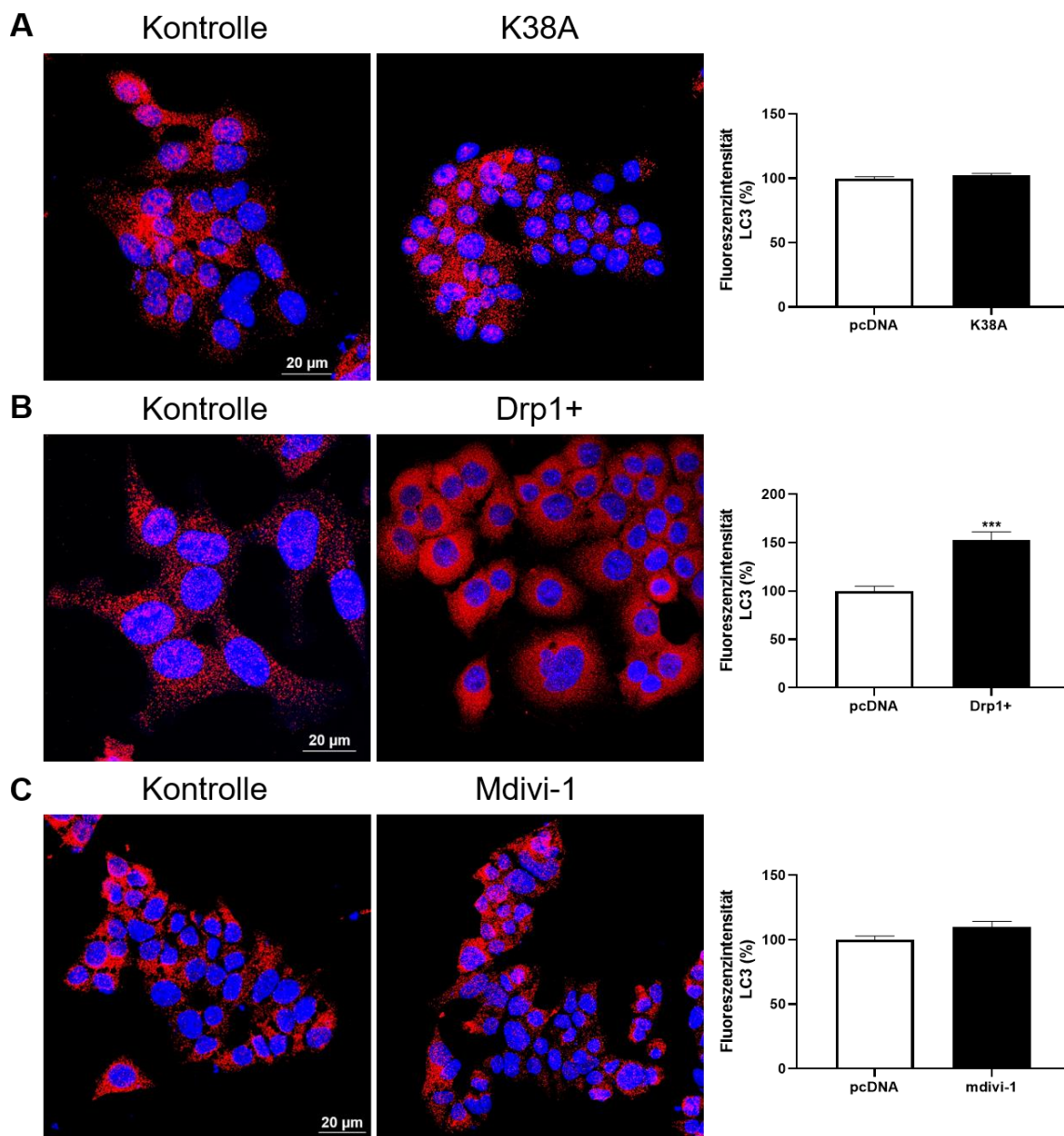


Abbildung 32 Exemplarische immunhistochemische Darstellung und Quantifizierung der LC3 Expression in stabil transfizierten MIN 6 Zellen mit pcDNA, Drp1 Negativmutante K38A (A) und Drp1 Überexpressionsvektor (B) und in MIN 6 Zellen mit pcDNA transfiziert und 50 µmol/l mdivi-1 behandelt für 24 h (C). Rot=LC3; Blau = Dapi; ***P < 0,001 (Student's t-Test)

4.9 Analyse des mitochondrialen Netzwerks nach Beeinflussung der Drp1 Expression und seiner Aktivität

Die Beeinflussung von Drp1 als zentraler Mediator der mitochondrialen Teilung hat einen großen Einfluss auf die Form des Mitochondrien-Netzwerks in den Zellen. Für die Analyse der mitochondrialen Morphologie wurden die zu untersuchenden Zellen mit MitoTracker™ Green FM angefärbt und anschließend mittels konfokaler Laserscanmikroskopie untersucht.

4.9.1 Analyse der Mitochondrienmorphologie nach Beeinflussung von Drp1

Die Kontrollzellen zeigten nach Anfärbung mit MitoTracker™ Green FM ein homogenes, tubuläres, mitochondriales Netzwerk (Abb. 33, Kontrolle). Im Gegensatz dazu, zeigte sich in K38A Zellen, ein in großen Teilen inhomogenes mitochondriales Netzwerk mit elongierten Mitochondrien. Zusätzlich führte die Expression der Drp1 Negativmutante K38A zu einer verstärkten mitochondrialen Clusterung nahe des Nucleus (Abb. 33, K38A). In den Zellen, die Drp1 überexprimierten, wies das mitochondriale Netzwerk eine starke Fragmentierung der Mitochondrien auf. Die fragmentierten Mitochondrien zeigten sich verkürzt und geschwollen. Zusätzlich wurde eine verstärkte Clusterung der Mitochondrien beobachtet (Abb. 33, Drp1+). Zellen welche zur Kontrolle transient mit pcDNA transfiziert wurden, zeigten ein ausgeglichenes Netzwerk aus fusionierten und fragmentierten Mitochondrien, ähnlich der stabil transfizierten Zellen. MIN 6 Zellen, welche mit pcDNA transfiziert und anschließend mit mdivi-1 behandelt wurden, charakterisierten sich durch eine Verschiebung zu vermehrt fusionierten Mitochondrien. Dies verdeutlichte sich insgesamt in einem elongierten zellulären Netzwerk, ebenso wie es bei K38A Zellen beobachtet werden konnte (Abb. 33, mdivi-1).

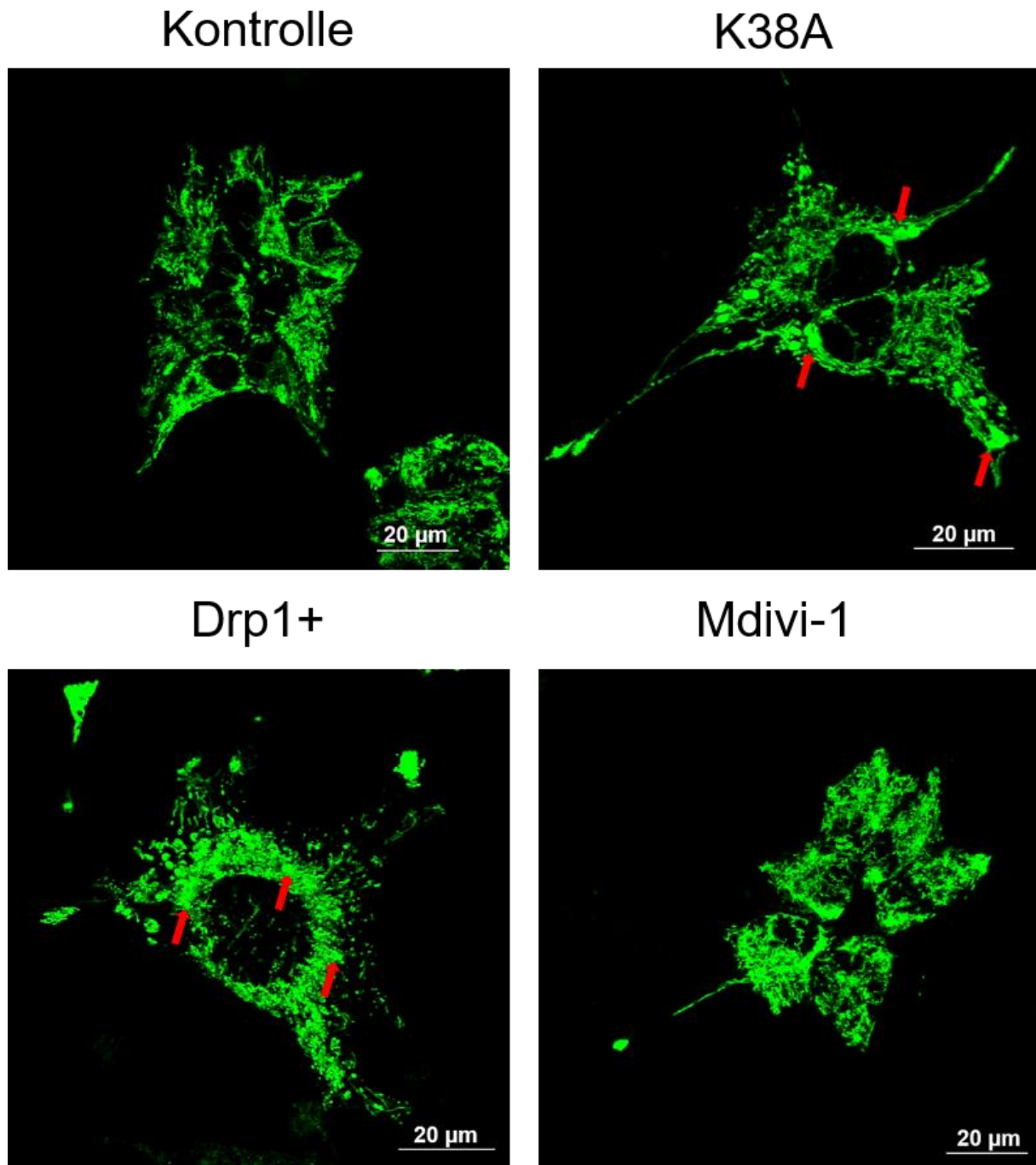


Abbildung 33 Exemplarische Darstellung der mitochondrialen Morphologie in MIN 6 Zellen, welche stabil den Leervektor pcDNA exprimierten, die Drp1 Negativmutante K38A, einen Drp1 Überexpressionsvektor oder mit 50 µmol/l für 24 h des chemischen Drp1 Inhibitors mdivi-1 behandelt wurden. Rote Pfeile zeigen Clusterungen der Mitochondrien an. Grün = MitoTracker™ Green FM

4.10 Analyse der Sphärizität der Mitochondrien und des mitochondrialen Volumens in K38A, Drp1+ und mdivi-1 Zellen

Die Sphärizität ist eine Kenngröße, welche beschreibt, wie sehr ein Körper der Form einer Kugel gleicht. Für die Mitochondrien ergibt sich damit eine zu bestimmende Größe für den Grad der Fragmentierung mit anschließender Schwellung, denn fragmentierte Mitochondrien unterscheiden sich in ihrer Größe deutlich von elongierten Mitochondrien. Dies ermöglicht die mittels Immunfluoreszenz gezeigten Veränderungen durch Verwendung der Imaris Software zu quantifizieren. Der Wert der Sphärizität kann in Verbindung gebracht werden mit dem Volumen der Mitochondrien innerhalb des zellulären Netzwerks, um die Ergebnisse zusätzlich auf der dreidimensionalen Ebene bewerten zu können.

4.10.1 Vergleich der Sphärizität und des mitochondrialen Volumens in K38A Zellen

Für MIN 6 Zellen, welche die Drp1 Negativmutante K38A exprimierten, konnte in der Strukturanalyse des mitochondrialen Netzwerks gezeigt werden, dass sie ein im Mittel gesteigertes Volumen gegenüber den Mitochondrien in Kontrollzellen besitzen. Die Sphärizität der einzelnen Mitochondrien zeigte ein signifikant niedrigeres Level, als es in Zellen der Kontrolle bemessen wurde (Abb. 34), womit die quantitative Analyse die subjektive visuelle Beurteilung der Immunfluoreszenzbilder bestätigte.

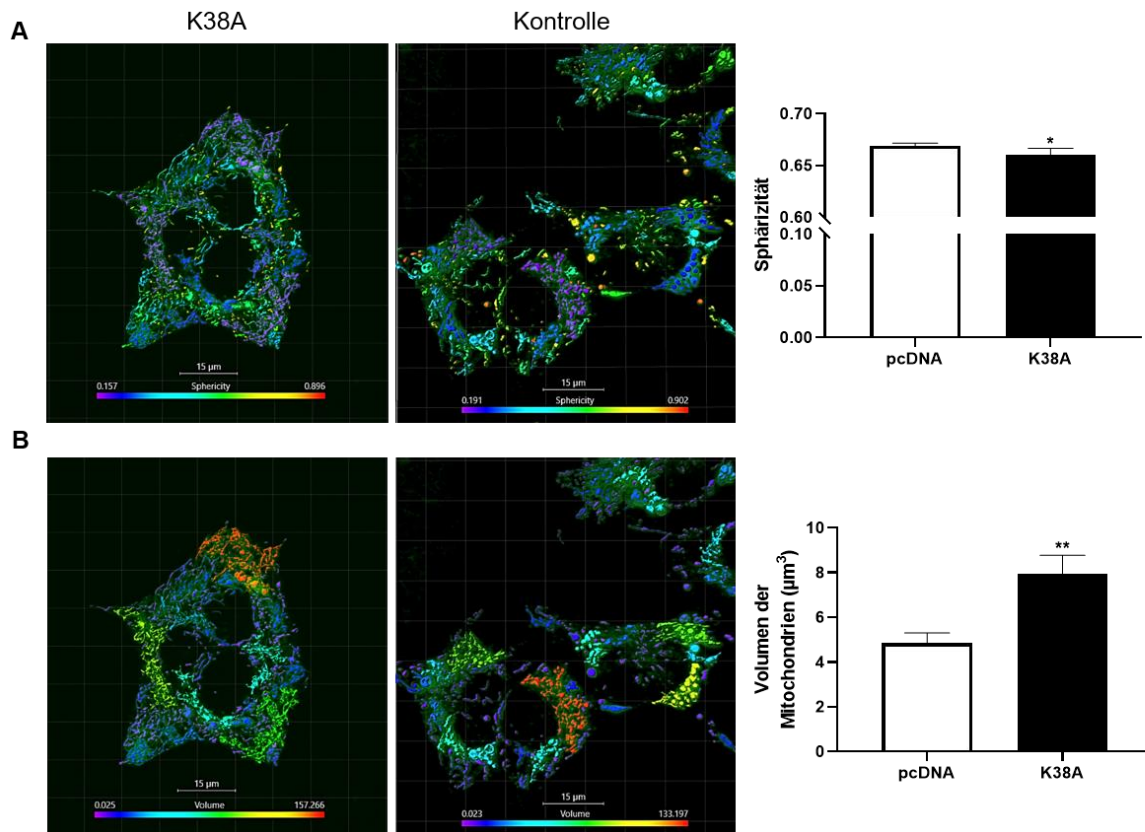


Abbildung 34 Exemplarische Darstellung der Verteilung des mitochondrialen Volumens in MIN 6 Zellen mit einer stabilen Expression der Drp1 Negativmutante K38A im Vergleich zu den pcDNA stabil exprimierenden Kontrollzellen sowie Verteilung und Quantifizierung der Sphärizität der Mitochondrien innerhalb der Zellen, nach Partikelidentifizierung und Oberflächenanalyse mittels der Software Imaris (Bitplane). Der Grad der Sphärizität ist dargestellt in Form einer Farbskalierung von blau = geringe Sphärizität bis hin zu rot = hoher Grad an Sphärizität (A) Darstellung und Quantifizierung der Volumengröße mittels Farbskala von blau = geringes Volumen zu rot = großes Volumen. (B). * $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; (Student's t-Test) (n=10-12).

4.10.2 Vergleich der Sphärizität und des mitochondrialen Volumen in Drp1+ Zellen

In MIN 6 Zellen, die Drp1 stabil überexprimierten, konnte der visuelle Eindruck der Clusterung der Mitochondrien quantitativ über das höhere mitochondriale Volumen dargestellt werden. Als Kontrolle dienten mit pcDNA Leervektor transfizierte Zellen. In der mittleren Sphärizität zeigte sich dagegen kein Unterschied zur Kontrolle (Abb. 35).

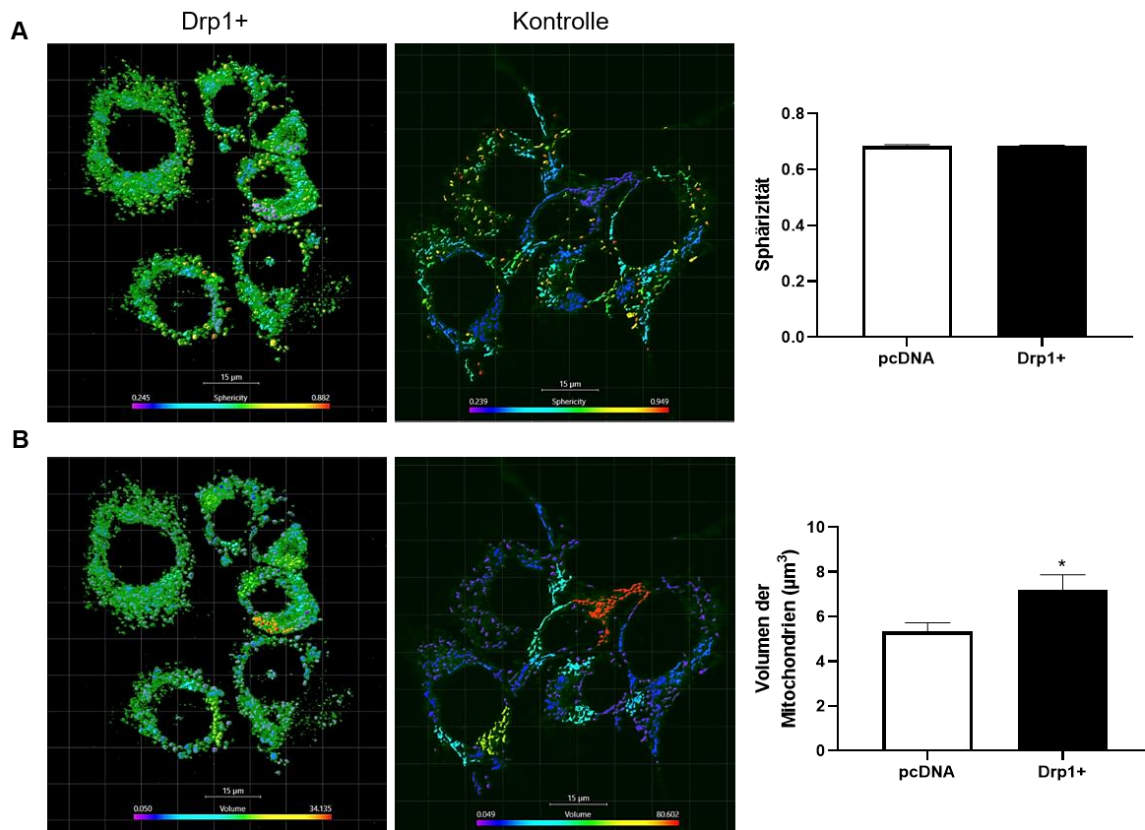


Abbildung 35 Exemplarische Darstellung der Verteilung des mitochondrialen Volumens in MIN 6 Zellen mit einer stabilen Expression der Drp1 Überexpression Drp1+ im Vergleich zu den pcDNA stabil exprimierenden Kontrollzellen sowie Verteilung und Quantifizierung der Sphärizität der Mitochondrien innerhalb der Zellen, nach Partikelidentifizierung und Oberflächenanalyse mittels der Software Imaris (Bitplane). Der Grad der Sphärizität ist dargestellt in Form einer Farbskalierung von blau = geringe Sphärizität bis hin zu rot = hoher Grad an Sphärizität (A). Darstellung und Quantifizierung der Volumengröße mittels Farbskala von blau = geringes Volumen zu rot = großes Volumen. (B). * $P < 0,05$ (Student's t-Test)(n=8-9)

4.10.3 Vergleich der Sphärizität und des mitochondrialen Volumens in mdivi-1 Zellen

Die Sphärizität der Mitochondrien war bei den mdivi-1 behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant niedriger, was den erhöhten Elongationsgrad auch quantitativ widerspiegelt (Abb. 36 A). MIN 6 Zellen, welche zuvor für 24 h mit dem Drp1 Inhibitor mdivi-1 behandelt wurden, wiesen (ebenso wie die Zellen der Negativmutante K38A) ein signifikant erhöhtes mitochondriales Volumen auf (Abb. 36 B).

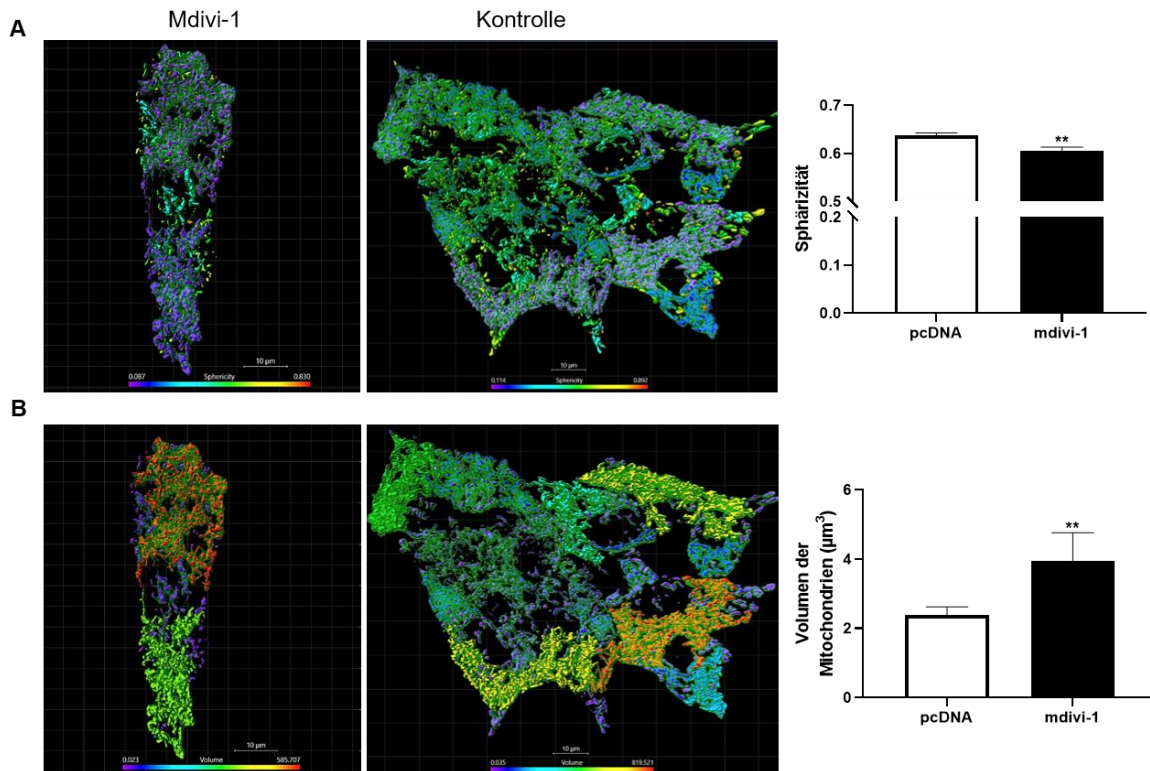


Abbildung 36 Exemplarische Darstellung der Verteilung des mitochondrialen Volumens in MIN 6 Zellen mit einer transienten Expression des Leervektor pcDNA und einer Inkubation mit 50 $\mu\text{mol/l}$ mdivi-1 für 24 h im Vergleich zu den transient transfizierten pcDNA Kontrollzellen sowie Verteilung und Quantifizierung der Sphärizität der Mitochondrien innerhalb der Zellen, nach Partikelidentifizierung und Oberflächenanalyse mittels der Software Imaris (Bitplane). Der Grad der Sphärizität ist dargestellt in Form einer Farbskalierung von blau = geringe Sphärizität bis hin zu Rot = hoher Grad an Sphärizität (A). Quantifizierung und Darstellung der Volumengröße mittels Farbskala von blau = geringes Volumen zu Rot = großes Volumen (B). **, $P < 0,01$ (Student's t-Test) ($n=9-11$).

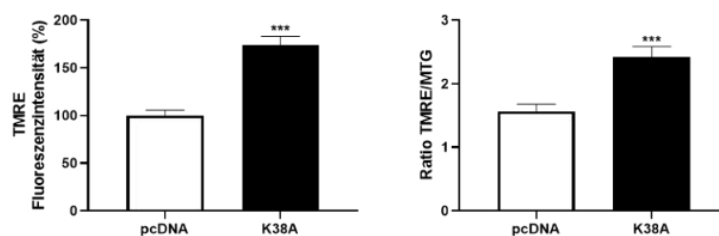
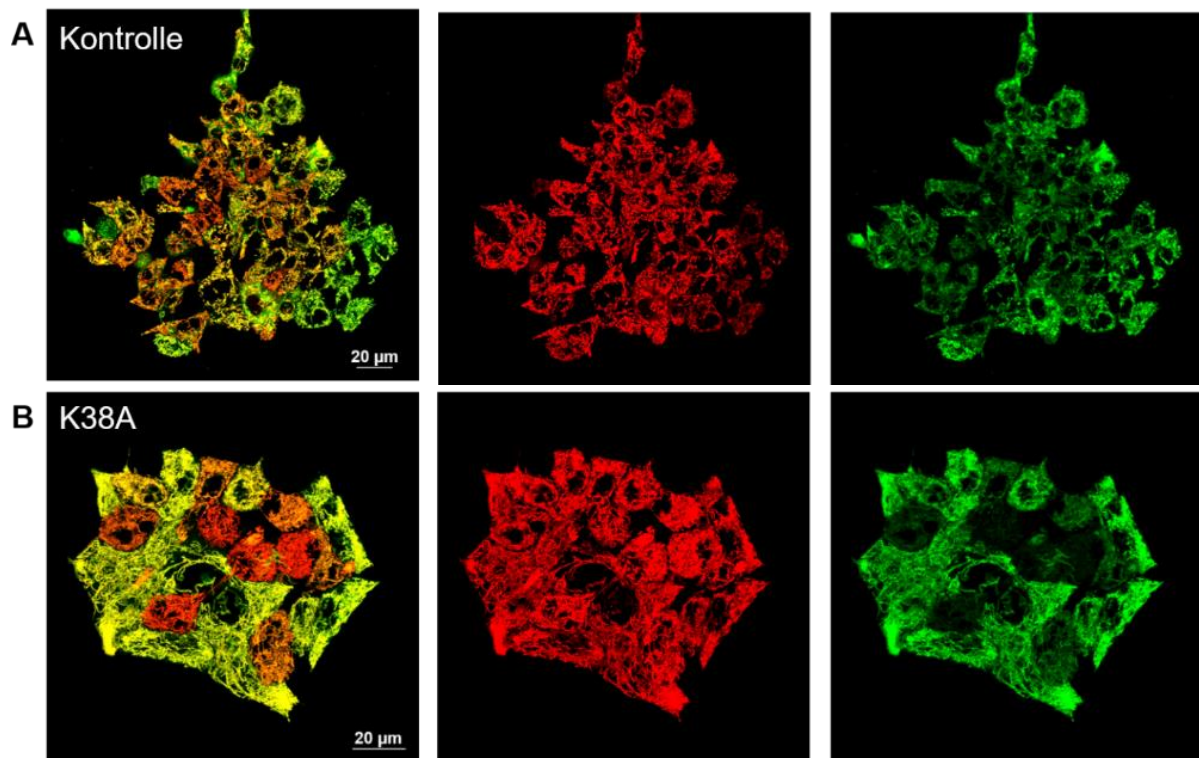
4.11 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials in K38A, Drp1+ und mdivi-1 Zellen

4.11.1 Quantifizierung des mitochondrialen Membranpotentials in Drp1 beeinflussten Zellen

Um das mitochondriale Membranpotential in den unterschiedlich behandelten Zellen zu analysieren, wurden diese mit Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE) gefärbt und anschließend am konfokalen Laserscanningmikroskop ausgewertet. Zur Verifizierung der Erfassung aller Mitochondrien wurde zusätzlich eine Lebendzellfärbung mit MitoTracker™ Green FM durchgeführt und die Ratio aus der Fluoreszenzintensität beider Färbungen gebildet.

Die Analyse der MIN 6 Zellen, welche die Drp1 Negativmutante K38A stabil exprimierten

ergab, dass diese eine signifikant gesteigerte TMRE Fluoreszenzintensität aufwiesen und somit ein erhöhtes Membranpotential. Dieses Ergebnis wurde zusätzlich durch die Ratio, die sich mit der Mito TrackerTM Green FM Färbung ergab, bestätigt (Abb. 37 B). In Zellen mit einer Drp1 Überexpression waren die reine Fluoreszenzintensität und die Ratio der beiden Lebendzellfärbungen unverändert, verglichen mit den Kontrollzellen (Abb. 37 C). MIN 6 Zellen, welche eine Behandlung mit mdivi-1 erhalten hatten, zeigten in der Fluoreszenzintensität von TMRE (ähnlich der K38A Zellen) einen eindeutigen Trend zur Erhöhung des Membranpotentials jedoch keinen signifikanten Unterschied zu den Werten der Kontrollzellen aufgrund der Varianz der Einzelwerte. Nach Bildung der Ratio mit der Fluoreszenzintensität von Mito TrackerTM Green FM, zeigte sich eine signifikante Steigerung des Membranpotentials in mdivi-1 behandelten Zellen (Abb. 37 D).



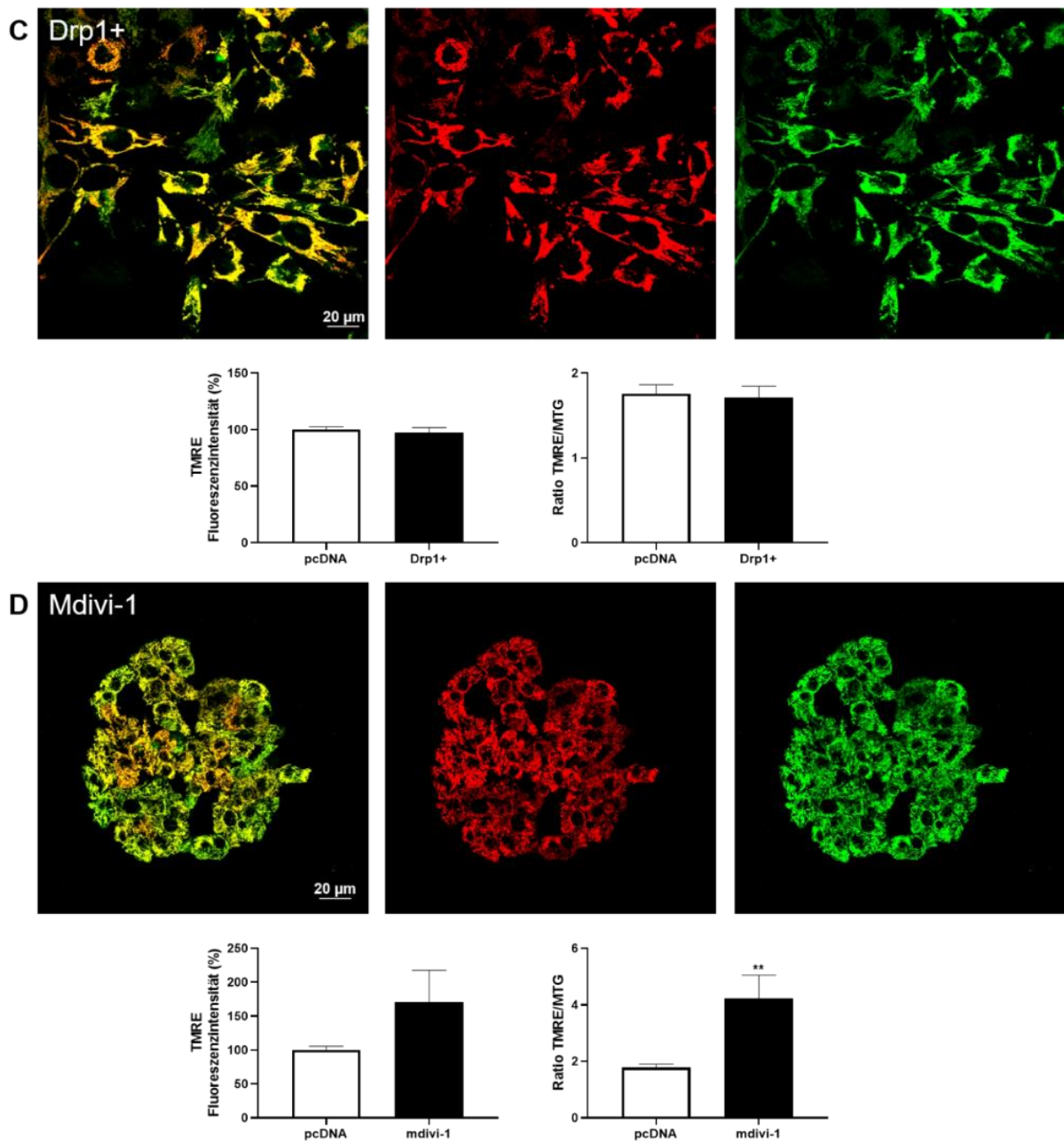


Abbildung 37 Exemplarische Lebendzellfärbung zur Detektion und Quantifizierung des Membranpotentials in stabil transfizierten MIN 6 Zellen mit dem Leervektor pcDNA (A), Drp1 Negativmutante K38A (B), Drp1 Überexpressionsvektor (C) und in transient transfizierten MIN 6 Zellen mit pcDNA (Kontrolle) und mit 50 µmol/l mdivi-1 für 24 h behandelt (D). Die Quantifizierung erfolgte durch Bestimmung der Fluoreszenzintensität und Bestimmung der Ratio der membrangängigen Lebendzellfärbungen mit TMRE und MitoTracker™ Green FM. Rot=TMRE; Grün=MitoTracker™ Green FM. (n=9-10); **, P < 0,01; ***P < 0,001 (Student's t-Test).

4.12 Analyse der Anreicherung an reaktiven Sauerstoffspezies in K38A, Drp1+ und mdivi-1 Zellen

Zur Untersuchung des mitochondrialen oxidativen Stresslevels, wurde die Entstehung von Superoxid-Radikalen betrachtet. Dies erfolgte mit Hilfe einer Lebendzellfärbung mit dem Farbstoff MitoSOXTM. Dabei handelt es sich um einen zellgängigen Farbstoff, der bei Oxidation durch Superoxid-Anione rot fluoresziert und sich spezifisch in Mitochondrien anreichert. Eine gesteigerte MitoSOXTM Fluoreszenzintensität korreliert dementsprechend mit einem hohen Superoxid-Anion Gehalt. In Zellen, welche stabil die Drp1 Negativmutante K38A exprimierten, konnte eine Steigerung der Superoxid-Anionen um 25 % gegenüber den Kontrollzellen festgestellt werden (Abb. 38 B). Bei den Drp1 überexprimierenden Zellen war der Gehalt an Superoxid-Anionen um ca. 10 % erhöht (Abb. 38 C). MIN 6 Zellen, welche zuvor mit mdivi-1 behandelt wurden, zeigten dagegen keinerlei Veränderungen in der Menge der messbaren Superoxid-Anionen im Vergleich zu ihren Kontrollzellen (Abb. 38 D).

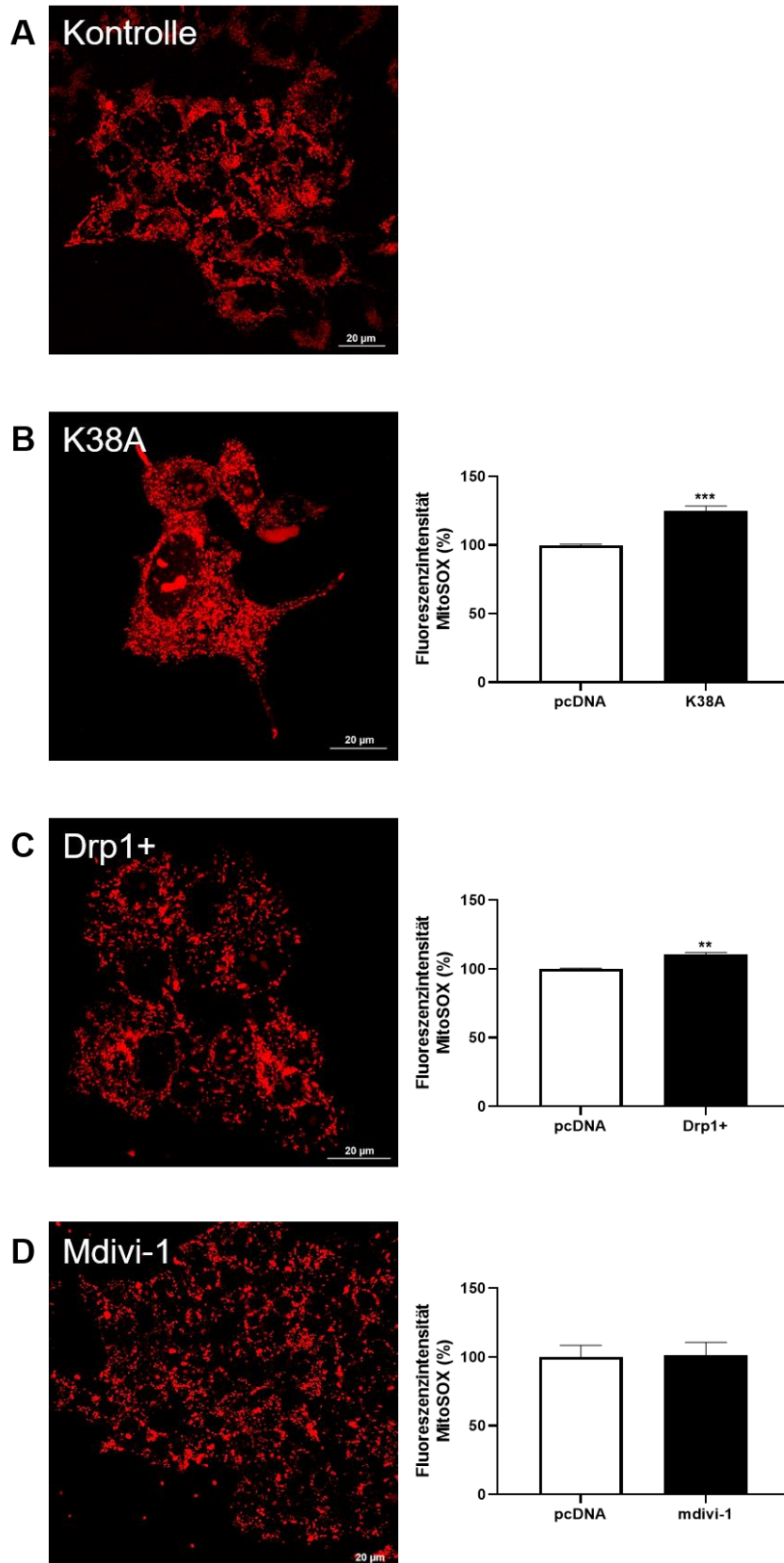
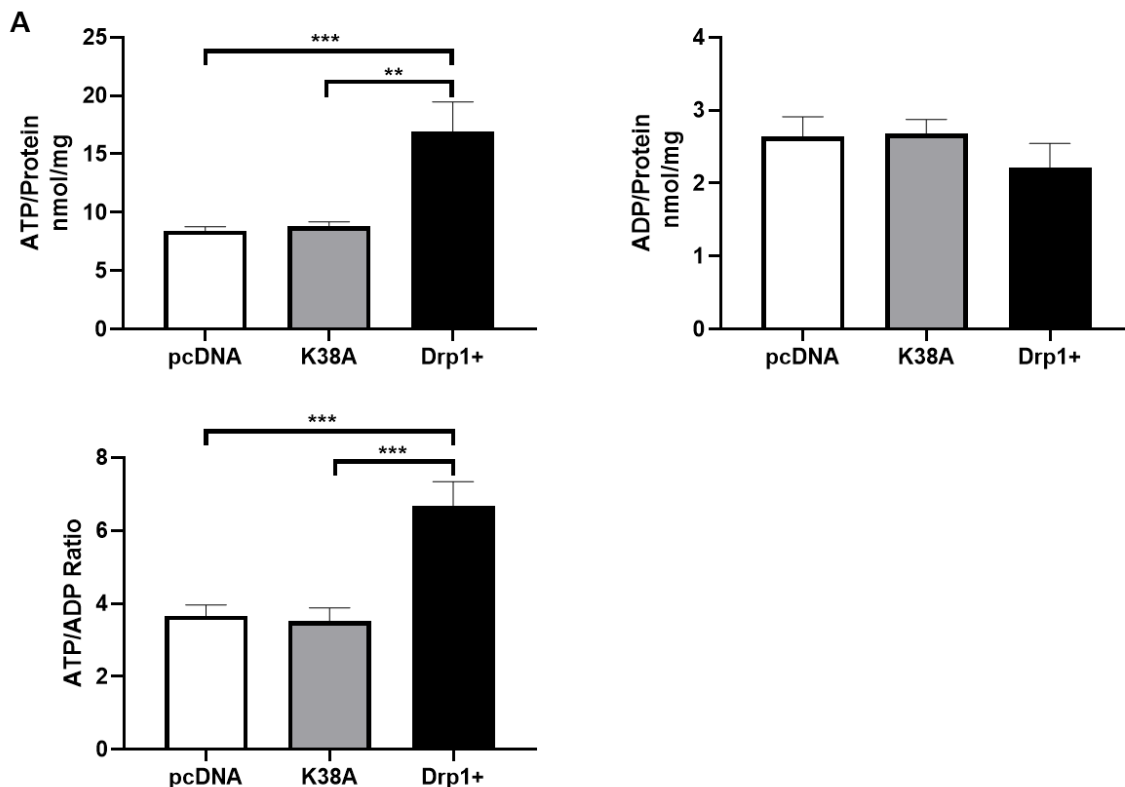


Abbildung 38 Exemplarische immunhistochemische Darstellung und Quantifizierung der Superoxidgehalte in stabil transfizierten MIN 6 Zellen mit dem Leervektor pcDNA (A), der Drp1 Negativmutante K38A (B) und dem Drp1 Überexpressionsvektor (C) und in MIN 6 Zellen mit pcDNA transfiziert und 50 $\mu\text{mol/l}$ mdivi-1 behandelt für 24 h (D). Rot = MitoSOXTM, (n=13-15); **, $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (Student's t-Test).

4.13 Bestimmung der ATP/ADP Ratio in K38A, Drp1+ und mdivi-1 Zellen

Zur Untersuchung der Folgen, die eine Beeinflussung von Drp1 auf den Energiehaushalt der Zellen hat, wurde eine Analyse der ATP/ADP Ratio durchgeführt. Hierfür wurde der ATP und ADP Gehalt in den zu untersuchenden Zellen mittels Lumineszenz-Test von PerkinElmer ATPLite™ quantifiziert sowie die Ratio von ATP zu ADP berechnet. Die Drp1 Negativmutante exprimierenden Zellen zeigten im ATP und ADP Gehalt keine Veränderung zu den Kontrollzellen. Dementsprechend wurde in der Ratio ATP/ADP ebenfalls kein signifikanter Unterschied nachgewiesen (Abb. 39 A). In Drp1 überexprimierenden Zellen wurde ein signifikant erhöhtes ATP Level im Vergleich zu den K38A – und den Kontrollzellen gemessen. Bei tendenziell erniedrigten ADP Gehalt ergab sich in der daraus gebildeten Ratio ATP/ADP eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den pcDNA Zellen als Kontrolle und der Drp1 Negativmutante K38A (Abb. 39 A). MIN 6 Zellen, in denen durch mdivi-1 Behandlung endogenes Drp1 inhibiert wurde, zeigten einen signifikant niedrigeren Gehalt an ATP und an ADP, verglichen mit ihrer Kontrolle. Insgesamt konnte aber keine signifikante Veränderung der ATP/ADP Ratio zur Kontrolle nachgewiesen werden, da die Varianz der ermittelten Ratio Werte vergleichsweise weit gestreut war (Abb. 39 B).



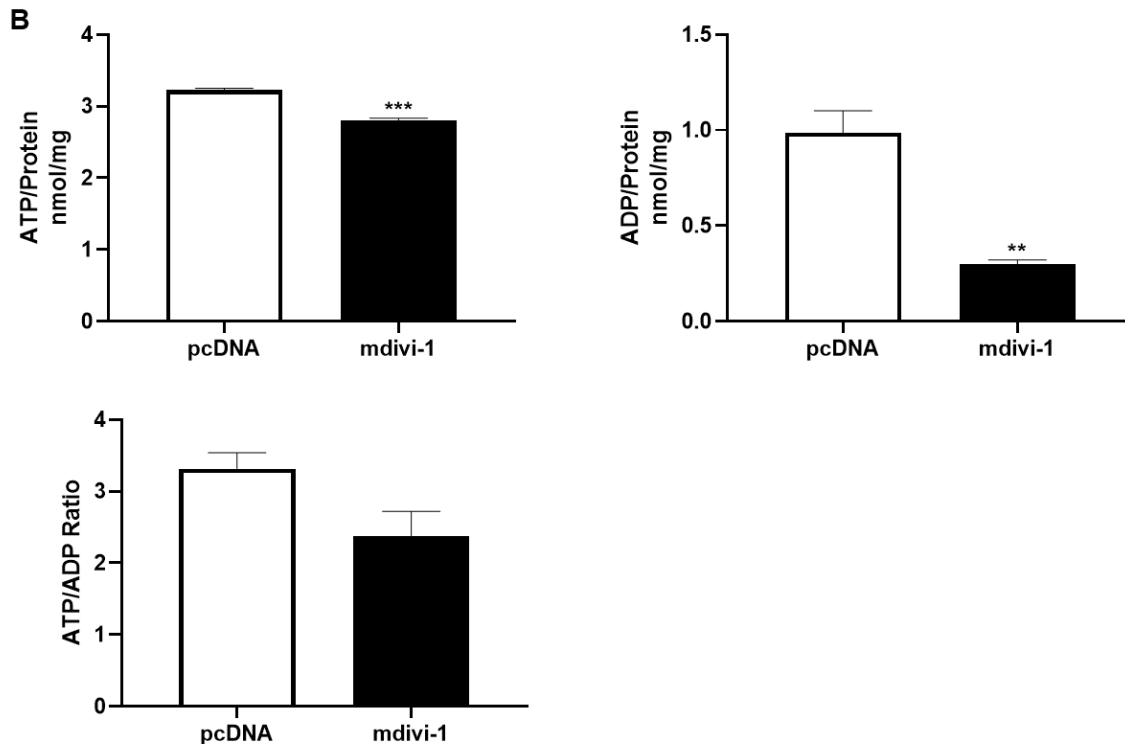
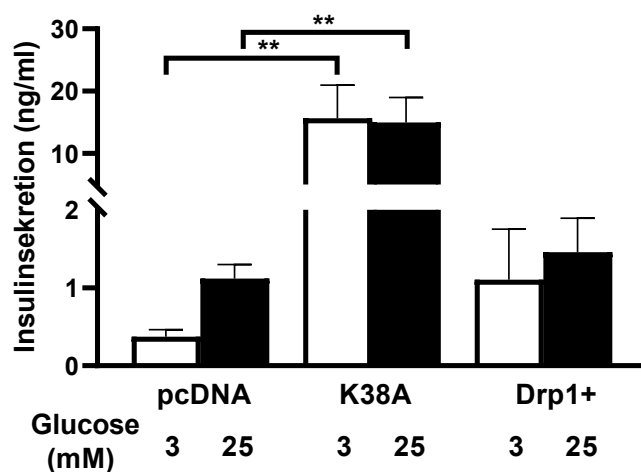
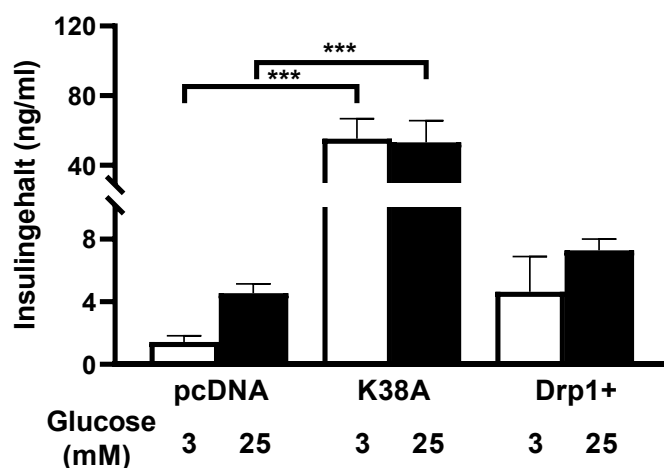


Abbildung 39 Bestimmung des ATP und ADP Gehalts in Abhängigkeit zum enthaltenen Protein in den Zellen, welche den Leervektor pcDNA als Kontrolle exprimieren, solche die eine Drp1 Negativmutante K38A exprimieren und solche, die stabil einen Überexpressionsvektor für Drp1 exprimieren (A). Zusätzlich wurden MIN 6 Zellen untersucht, die transient pcDNA exprimieren und zum Teil mit dem Drp1-Inhibitor mdivi-1 mit 50 µmol/l für 24 h behandelt wurden (B). **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ (Student's t-Test) $n=6$

4.14 Untersuchung der Glucose stimulierten Insulinsekretion in K38A und Drp1+ Zellen

Eine Funktionsanalyse der unterschiedlich transfizierten Zelllinien hinsichtlich ihrer Glucose-stimulierten Insulinsekretion erfolgte mittels eines Insulin-ELISA. Die Insulinsekretion wurde nach 1 h hungern in Krebs-Ringer-Lösung und anschließender Inkubation für 1 h mit 3 oder 25 mM Glucose im Überstand bestimmt. Der Insulingehalt wurde durch Aufschluss der Zellen erhalten. Die Insulinsekretion wurde abschließend auf den Insulin- und Proteingehalt der Zellen bezogen dargestellt. Im Vergleich zu den Kontrollzellen kam es sowohl in den K38A als auch in den Zellen mit Drp1 Überexpression zu einem Verlust der Glucose Responsivität. In K38A Zellen entsprach die basale Insulinsekretion demselben Level, wie nach einer Stimulierung mit 25 mM Glucose. Sie war signifikant erhöht, 20-fach im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle und 4-fach im Vergleich zur mit Glucose stimulierten Kontrolle. (siehe Abb. 40). In Zellen der Drp1 Überexpression war die Insulinsekretion basal und nach Glucose Stimulation auf dem Level der Kontrollzellen nach Stimulation. In den Zellen der Drp1

Negativmutante K38A zeigte sich basal, als auch nach Stimulierung mit 25 mM Glucose in den Zellen ein Insulingehalt, der signifikant erhöht war verglichen mit der Kontrolle. In den Drp1 überexprimierenden Zellen wurde eine tendenzielle Erhöhung im basalen und stimulierten Insulingehalt gemessen, ohne Signifikanz zu erreichen. Nach Bezug der Insulinsekretion auf Protein- und Insulingehalt der Zellen, zeigte sich wiederum eine Responsivität der Kontrollzellen, die sowohl in den K38A als auch Drp1+ Zellen nicht dargestellt werden konnten. Beide zeigten sowohl im basalen Zustand als auch nach Stimulation höhere Werte, als die Kontrolle, aber keinen signifikanten Unterschied zwischen der basalen und der stimulierten Sekretion. In den Zellen der Drp1 Überexpression war sowohl die basale, als auch die stimulierte Insulinsekretion dennoch insgesamt signifikant höher, verglichen mit der Sekretion in Kontrollzellen als auch in den Zellen, die die Negativmutante K38A exprimierten (siehe Abb. 40).

A**B**

C

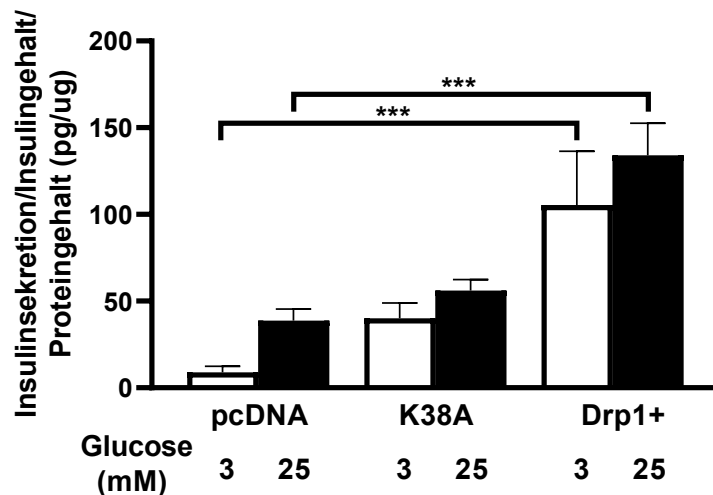
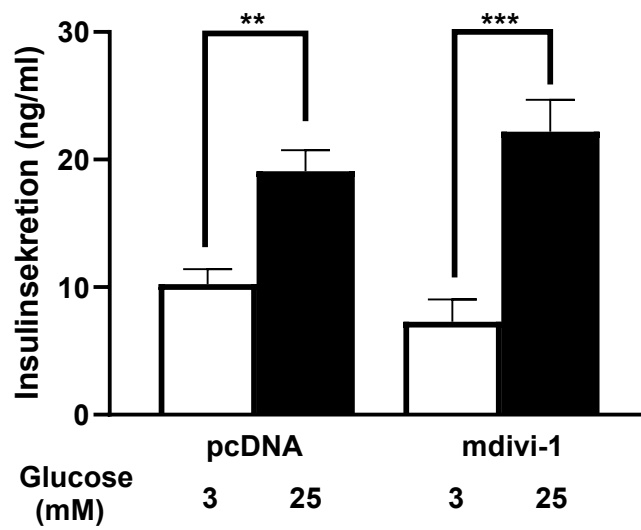


Abbildung 40 Untersuchung der Glucose-stimulierten Insulinsekretion einschließlich der Insulinsekretion (A), des Insulingehalts (B) und der Insulinsekretion bezogen auf Insulin- und Proteingehalt (C) von Zellen stabil transfiziert mit dem Leervektor pcDNA, der Drp1 Negativmutante und der Drp1 Überexpression. **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni-Test),(n=3-12).

4.15 Untersuchung der Glucose stimulierten Insulinsekretion in mdivi-1 behandelten Zellen

Die Insulin-sezernierende Zelllinie MIN 6, welche transient mit pcDNA transfiziert und anschließend zusätzlich für 24 h mit 50 $\mu\text{mol/l}$ mdivi-1, einem Drp1 Inhibitor, behandelt wurde, wurde hinsichtlich der Glucose-stimulierten Insulinsekretion mittels Insulin-ELISA untersucht. Nachdem die Zellen 1 h in Glucose-freiem Medium inkubiert worden waren, wurden sie mit 3 oder 25 mM Glucose versetzt. Die Messung der Sekretion erfolgte im Überstand der Zellen, während der Insulingehalt in den mechanisch lysierten Zellen bestimmt wurde. Bei der Insulinsekretion wurde eine Responsivität auf die Stimulierung mit Glucose im Vergleich zur Basalsekretion beobachtet, die in mit mdivi-1 behandelten Zellen deutlicher war, als in den Kontrollzellen (siehe Abb. 41 B). Der Insulingehalt zeigte sich durch die Behandlung mit mdivi-1 verglichen mit der Kontrolle nur tendenziell reduziert (siehe Abb. 41 A). Aufgrund der Tatsache, dass eine Beeinflussung von mdivi-1 auf die Proteinexpression nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde ein solcher Bezug in diesem Fall nicht geführt.

A



B

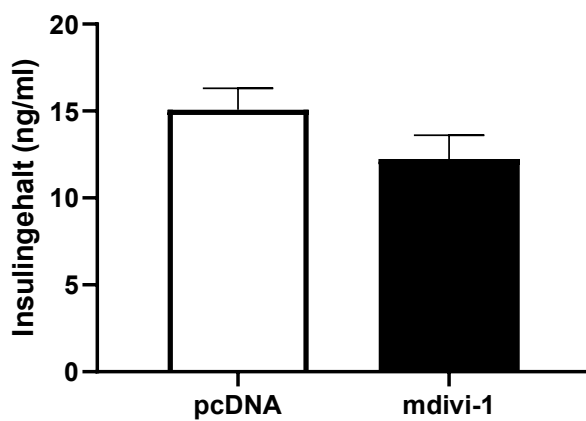


Abbildung 41 Untersuchung der Glucose-stimulierten Insulinsekretion einschließlich der Insulinsekretion (A) und des Insulingehalts (B) von MIN 6 Zellen, die mit dem Leervektor pcDNA transient transfiziert und mit 50 μ mol/l mdivi-1 für 24 h behandelt wurden, **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$, (ANOVA/Bonferroni-Test) (n=4-8).

5. Diskussion

Ein Diabetes mellitus Typ 2 ist charakterisiert durch eine Insulinresistenz oder mangelnde Insulinproduktion der Betazelle und eine daraus resultierende chronische Hyperglykämie [1]. Eine pankreatische Betazellinsuffizienz steht häufig in Verbindung mit einer Dysfunktion des mitochondrialen Netzwerks [3, 4]. Um langfristig die mitochondriale Qualität zu erhalten, sind ständige Fusions- und Teilungsprozesse innerhalb des Netzwerks notwendig [105]. Der Hauptmediator der Teilung ist hierbei das Dynamin Related Protein 1 – Drp1. Dabei handelt es sich um ein Protein der Dynamin Familie, welches GTPase Aktivität besitzt. Durch Oligomerisierung [159, 160] an der äußeren mitochondrialen Membran von elongierten Mitochondrien und durch Kontraktion der dabei ausgebildeten Spiralen kommt es zur Abschnürung und Ausbildung von zwei Organellen [146].

Studien zeigen, dass bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und einer geminderten Insulinsensitivität die zelluläre Mitochondrien Population von signifikant geringerer Größe ist [49]. Daraus lässt sich ableiten, dass mitochondriale Veränderungen zur Pathogenese des Diabetes mellitus beitragen. Aus diesem Grund wird das mitochondriale Netzwerk und der zugrunde liegende Lebenszyklus in der Betazelle als vielversprechendes Ziel für zukünftige Therapieansätze diskutiert.

Ein erster Ansatz dafür ist ein chemischer Inhibitor der Drp1 GTPase-Aktivität – das mdivi-1 [173]. Es supprimiert die mitochondriale Teilung, in dem es eine GTP Hydrolyse am Drp1 und die daraus resultierende Kontraktion der Drp1-Spirale und Abschnürung der Mitochondrien voneinander verhindert [173]. Der Inhibitor zeigte in durchgeführten Studien insbesondere in Geweben mit hohem Energieverbrauch, wie Herz, zentralem Nervensystem und Muskeln, aber auch Krebszellen, ausgeprägte Effekte. Ein Großteil der Studien hat einen protektiven Effekt durch die Behandlung mit mdivi-1 nachgewiesen [169]. Zu diesen gehörte die Senkung der ROS Produktion in Mitochondrien [184, 186], eine Steigerung des ATP Gehalts [12] und der Erhalt der mitochondrialen Struktur [183] – einschließlich des mitochondrialen Membranpotentials [4, 177]. Einige Studien beschreiben außerdem eine Minderung der Drp1 aktivierenden Phosphorylierung am Serin616 – mit positiven Folgen für das untersuchte Gewebe [175, 193].

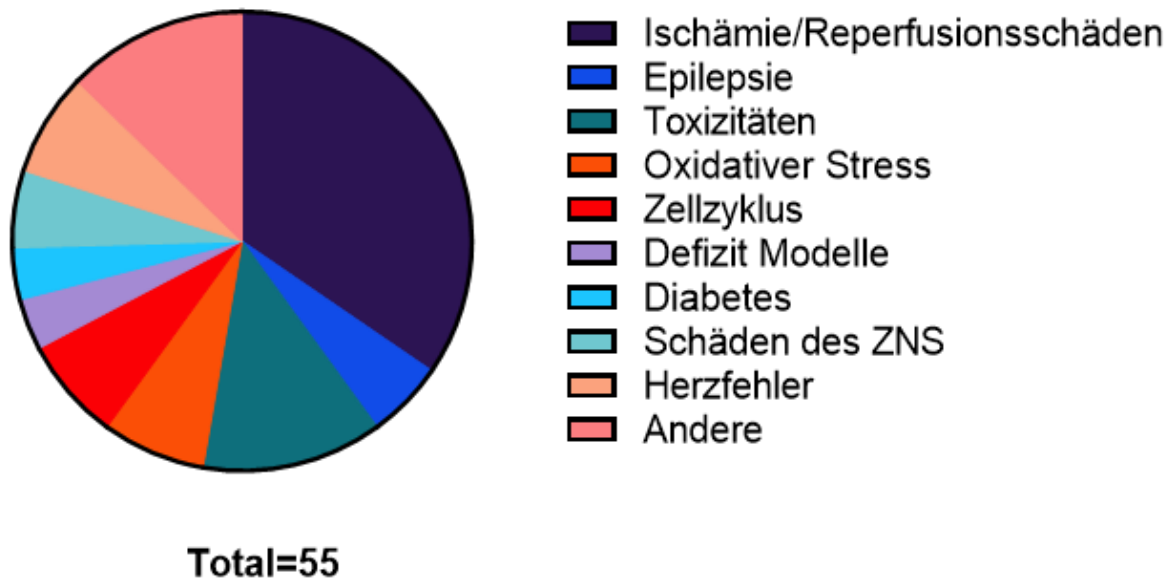


Abbildung 42 Forschungsgebiete des mdivi-1 nach [176]

Seine potentielle Wirkung in Form einer Diabetes Therapie wurden bereits in der Verhinderung der Ausbildung einer Insulinresistenz im Skelettmuskel [186, 194], einer Reduktion des Betazellmasseverlusts unter hypoxischen Bedingungen [189] und durch die Wiederherstellung Kognitiver- und Gedächtnisleistungen in Kombination mit Metformin beschrieben [195]. Weiterhin intensiv untersucht wurden die positiven Eigenschaften des Moleküls auf neuronale Zellen [180, 183, 193, 196] und seine Wirksamkeit gegen die Aggressivität von Tumoren [197, 198].

Insbesondere die Suppression der krankhaften Teilung von Mitochondrien als Resultat von Gewebeschädigungen [199] und die Blockierung der daraus resultierende Ansammlung von ROS, erwies sich in vorangegangenen Arbeiten als vermutlich wichtigste Eigenschaft des mdivi-1 [185]. Eine mögliche Hypothese für die zytotoxische Wirkung auf hoch proliferative Zellen ist die mangelnde Bereitstellung an Energie, durch die Minderung der mitochondrialen Masse in Folge der Hemmung der mitochondrialen Teilung [198]. Zu den zytotoxischen Eigenschaften des mdivi-1 auf Krebszellen gehören die Initiierung des Noxa-abhängigen Apoptosewegs, die Störung der DNA Replikation und die Induktion eines G2/M Zellzyklus-Stops [176].

Einige Studien der letzten Jahre beschreiben dagegen allerdings auch Drp1 unabhängige Effekte des mdivi-1 [175, 180, 187]. So zeigen sich in den untersuchten NCI - H460 Zellen von Dai et al. [187] zwar ein elongiertes, mitochondriales Netzwerk, aber seine Wirkung auf den oxidativen Metabolismus der Krebszellenlinie war unabhängig von den veränderten Drp1 Eigenschaften. Auch zytotoxische Wirkungen des mdivi-1 werden mittlerweile als Drp1

unabhängige Wirkungen des Moleküls diskutiert [176]. Diese und weitere widersprüchliche Ergebnisse, insbesondere eine Veröffentlichung der Arbeitsgruppe um Bordt et al. von 2017 [178], in der die Spezifität des mdivi-1 auf das Drp1 in Frage gestellt und stattdessen ein inhibitorischer Effekt auf den Komplex I der Atmungskette postuliert wurde, haben zu einer anhaltenden Diskussion über die Wirkung des mdivi-1 geführt [179]. So schreiben Bordt et al. in Ihren weiterführenden Untersuchungen 2022 dem mdivi-1 eine Funktion als Antioxidans zu [200]. Mögliche Ursachen für die insgesamt teilweise wenig reproduzierbaren und kontroversen Ergebnisse der Untersuchungen mit mdivi-1 ergeben sich in der Varianz der verwendeten Konzentrationen, der Inkubationszeiten und dem verwendeten Lösungsmittel. Unumstritten besitzt mdivi-1 ein großes Potential als Therapeutikum bei Herzkrankheiten [201], neurodegenerativen Erkrankungen [202], als Unterstützung in der Krebstherapie [197, 198] sowie bei Stoffwechselerkrankungen wie dem Diabetes mellitus Typ 2 [186, 194, 195]. Aufgrund der anhaltenden Diskussionen im Hinblick auf seine Spezifität für das Teilungsprotein Drp1 und seine Wirkung auf Insulin-sekretierende Zellen, wird das mdivi-1 in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu einer Drp1 Überexpression und der Expression einer Drp1 Negativmutante K38A in der Maus Insulinoma Zelllinie MIN 6 untersucht. Es wurde dabei ein Versuchsansatz gewählt, der einen bestmöglichen Vergleich erlaubt.

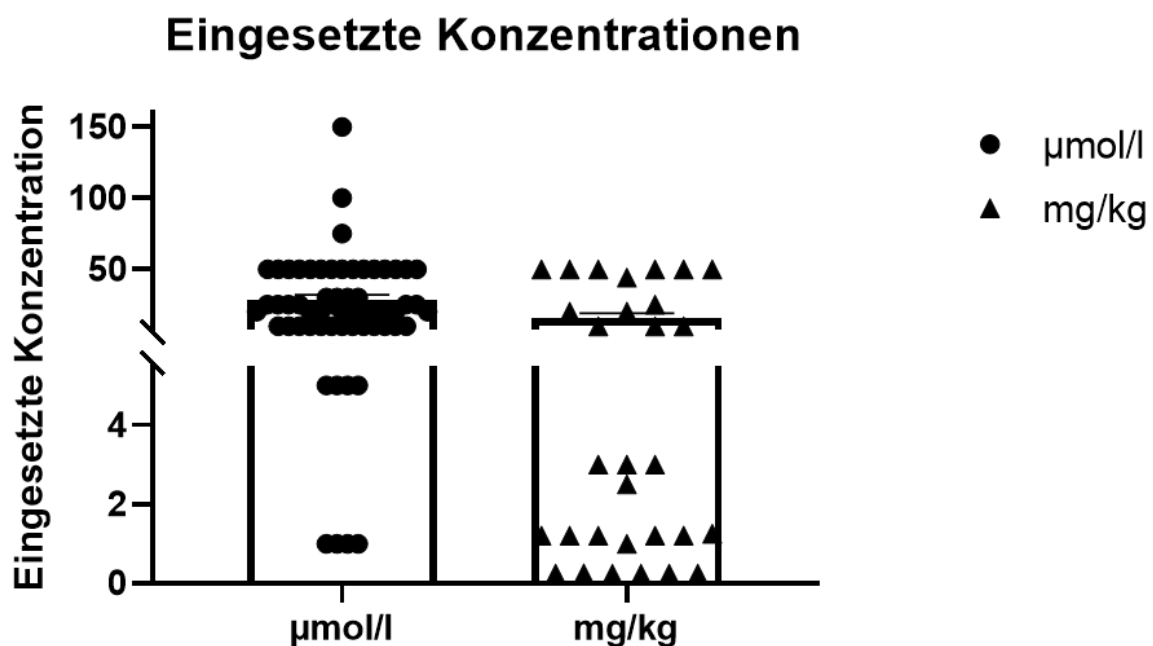


Abbildung 43 Streuung der eingesetzten mdivi-1 Konzentrationen in vitro (links) und in vivo/ ex vivo (rechts) Untersuchungen nach [176]

5.1 Mitochondriale Dynamik

Mitochondrien sind hoch dynamische Organellen, die ständig ihre Gestalt und Lokalisation innerhalb der Zelle verändern, um sich den gewebspezifischen Energieanforderungen anzupassen [107, 108]. Hinzu kommt die Dynamik innerhalb der Population in Form von Fusions- und Teilungsprozessen. Diese unterliegen einer strengen Regulation durch Proteinkomplexe. Für die Fusion verantwortlich sind die großen GTPasen Mfn1, Mfn2 und Opa1 [125]. Die Teilung wird über die Rezeptoren Fis1 [138], Mff [139], MiD 49, MiD 51 [140] und dem Hauptmediator Drp1 vermittelt. Die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Dynamik sorgt für den Erhalt einer gesunden Population von Mitochondrien. Eine weitere Dimension der Dynamik bildet die Balance zwischen Biogenese und dem spezifischen Abbau beschädigter Mitochondrien durch den Prozess der Mitophagie [116]. Die Mitophagie ist hierbei der zielgerichtete Abbau von Mitochondrien durch dafür von der Zelle gebildete Autophagosomen. Aufgrund ihrer zentralen Rolle zur Energieversorgung in den Geweben, birgt eine Störung der mitochondrialen Dynamik ein hohes Risiko zur Ausbildung schwerwiegender Erkrankungen [105, 116], wie beispielsweise der Verlust einer adäquaten Insulinantwort in Betazellen des Pankreas [115, 203]. Gleichzeitig besitzt das Verständnis der mitochondrialen Dynamik ein großes Potential, Zielstrukturen für mögliche Therapieansätze zu identifizieren [114].

Im Rahmen dieser Arbeit war es das Ziel, die Effekte einer Behandlung mit mdivi-1 im Vergleich mit einer Drp1 Überexpression und der Expression der Drp1 Negativmutante K38A auf die mitochondriale Dynamik von MIN 6 Zellen zu untersuchen. Eine Behandlung mit dem Inhibitor mdivi-1 hatte, wie auf Basis der Literatur erwartet, weder auf der Gen- noch der Protein Ebene einen Effekt auf den Drp1 Gehalt. Dies konnte auch mittels Immunfluoreszenz noch einmal nachgewiesen werden. Die Überexpression von Drp1 konnte ebenfalls mittels unterschiedlicher Methoden dargestellt werden. Eine Expression der Drp1 Negativmutante K38A konnte auf Genebene in einem verstärkten Drp1 mRNA Expressionslevel gezeigt werden. Auf Proteinebene ergaben sich diskrepante Ergebnisse. In der Immunfluoreszenz Färbung zeigte sich ein gesteigertes Vorliegen in der Zelle, während bei Western Blot Analysen ein Rückgang des Drp1 Gehalts im Vergleich zur Kontrolle gemessen wurde. Andere Arbeitsgruppen erhielten an dieser Stelle abweichende Ergebnisse. Hier ergab eine Prüfung der Expression der Drp1 Negativmutante in verschiedenen Zellmodellen mittels Proteinexpressionsanalyse eine vergleichbare Überexpression, wie die des Drp1 Wildtyps [204, 205]. Ursache für die niedrig ausfallende Proteinexpression der Negativmutante in dieser Arbeit könnte in einem Schutzmechanismus der Zelle liegen, die bei einem vermehrten Auftreten funktionsunfähigen Drp1 mit einem raschen Abbau des Proteins reagiert, um Schäden durch eine gestörte Teilung der Organellen vorzubeugen. Eine weitere Möglichkeit

wäre eine Akkumulierung der Drp1 Moleküle, wie sie auch von der Arbeitsgruppe Jia et al., [205] bei der Expression der Negativmutante K38A beschrieben wurde. In der Untersuchung des Drp1 Gehalts mittel Immunfluoreszenz ist auch im Zuge dieser Arbeit eine Clusterung der Drp1 Moleküle in der Zelle sichtbar. Aufgrund der Akkumulierung wäre ein Nachweis über die beim Proteinnachweis zur Detektion verwendeten Antikörper durch Blockade der spezifischen Bindungsstellen, nicht möglich.

Eindeutig fielen hingegen diejenigen Effekte aus, die eine Expression der Drp1 Negativmutante auf die Zelle zeigten. So konnte eine Genexpressionsanalyse der Proteine der mitochondrialen Fusion: Mfn1, Mfn2 und Opa1, mit einem signifikant höheren Expressionslevel in K38A Zellen gemessen werden. Bei der Inhibition durch Behandlung mit mdivi-1 zeigten Mfn2, als auch Opa1 eine gesteigerte Expression. Diese zelluläre Veränderung, die durch die Negativmutante und mdivi-1 gleichermaßen induziert wurde, resultiert in einer Verschiebung der mitochondrialen Dynamik hin zu Fusionsprozessen. Dabei handelte es sich um einen Effekt, der auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt wurde [171, 206]. Bereits bekannt ist, dass insbesondere das Mfn2 eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Metabolismus besitzt [129, 130] und eine Steigerung der Mitofusine einen protektiven Effekt auf die Insulinsensitivität hat [184]. In der Behandlung von HeLa Zellen mit mdivi-1 wurde der Mfn2 Expressionsanstieg als essentieller Faktor für die Elongation diskutiert [177]. Die Überexpression von Drp1 hatte eine eindeutige Fragmentierung der Mitochondrien zur Folge. Hier zeigte das Fusionsprotein der inneren mitochondrialen Membran, Opa1, eine vermehrte Expression. Grund dafür ist, dass die Fragmentierung zu einer Veränderung der Form der Mitochondrien und damit einhergehenden Umstrukturierungen der Cristae im Inneren führt. Vermittelt wird die Cristae Ausbildung durch das Opa1 [125] so dass hier von einer kompensatorischen Adaption auszugehen ist. Während ein Knockout des Drp1 in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen keinen signifikanten Effekt auf den Gehalt von Fis1 und Mff in den untersuchten Zellen hatte [207], wird Fis1 von K38A-Zellen verstärkt exprimiert. Dies mag eine Anpassung der Zelle an die niedrige Aktivität des Drp1 bei Auftreten der Negativmutante sein, um die Teilungsprozesse minimal aufrecht zu erhalten. Anders verhält es sich in Zellen der Drp1 Überexpression, in welchen beide Adapterproteine tendenziell auf geringerem Niveau als in der Kontrolle exprimiert wurden – im Falle des Fis1 dies auch signifikant. Dabei handelt es sich vermutlich um einen protektiven Effekt der Zelle, um sich vor Schäden durch die übermäßige Teilung der Organellen, hervorgerufen durch die nicht reguliert erhöhte Drp1 Expression, zu schützen. In anderen Untersuchungen zeigte sich, dass Reize, die stimulierend auf die Drp1 Expression wirken, auch einen stimulierenden Reiz auf die Expression des Mff haben [189]. Dies ist interessant, da Mff die Rolle eines Regulators für die Dynamik von Mitochondrien und Peroxisomen

zugesprochen wird [208, 209] und es somit einen wichtigen Einfluss auf den zellulären Metabolismus besitzt [210].

Die Autophagie ist ein Prozess der Zelle, der diese zum einen bei längeren Hungerperioden durch zelleigene Bestandteile mit den notwendigen Nährstoffen versorgt, zum anderen dem Schutz vor Dysfunktionen durch Eliminierung beschädigter Zellbestandteile dient. Dies erfolgt durch die Aufnahme und den Abbau von cytosolischen Materials in Autophagosomen, welche sich mit Lysosomen zu Autophagolysosomen vereinen. Die zielgerichtete Entfernung von beschädigten Mitochondrien, wird als Mitophagie bezeichnet. Zur Untersuchung der Autophagie in Zellen, in denen Drp1 moduliert wurde, wurden spezifische assoziierte Proteine der Autophagosomen Bildung, das ATG8 – ein Homolog des menschlichen LC3 Proteins – und das ATG9A auf ihre Genexpression analysiert. Bei einer Inaktivierung der Drp1 Funktion durch die Negativmutante K38A oder den chemischen Inhibitor ergab sich eine verstärkte Expression des ATG8. K38A Zellen zeigten außerdem ein erhöhtes Expressionslevel des ATG9A, das in den mit mdivi-1 behandelten Zellen nicht gemessen werden konnte. Bereits die Arbeit von Parone et al. [133] beschrieb, dass eine Herabsetzung der mitochondrialen Teilung zu einer Steigerung im Autophagie Prozess führt. Die weitere Untersuchung des LC3 Gehalts auf Proteinebene durch eine Immunofluoreszenzfärbung im Zuge der hier dargelegten Arbeit ergab allerdings keine signifikante Veränderung in den Drp1 Zellen. Drp1 überexprimierende Zellen zeigten dagegen keine signifikante Veränderung in der Genexpression der untersuchten Proteine. Das Ergebnis der Immunfluoreszenzuntersuchung wies allerdings eine signifikante Steigerung im LC3 Gehalt auf Proteinebene auf. In einer anderen Arbeit wurde die Entstehung vermehrter ungleicher Tochterzellen, die in Folge einer gestärkten mitochondrialen Teilung zu beobachten waren und zur Ausbildung einer Subpopulation von Mitochondrien führte, die nicht erneut fusionierten und mittels Mitophagie aus der Zellen entfernt werden mussten als Ursache für eine gesteigerte Mitophagie beschrieben [104]. Jedoch konnte dieses Ergebnis in der vorliegenden Arbeit durch eine Genexpressionsanalyse der zentralen Regulatoren der Mitophagie, PINK1 und Parkin, nicht reproduziert werden. Stattdessen zeigte sich ein erhöhtes Expressionslevel beider Proteine in den Zellen der Drp1 Negativmutante. Auch eine Inhibition mittels mdivi-1 erzielte eine signifikant verstärkte Expression des Parkin. Aus anderen Arbeiten geht hervor, dass die Expression der Drp1 Negativmutante K38A in INS Zellen zu einer Minderung der Mitophagie und Akkumulierung von oxidierten mitochondrialen Proteinen führte [104]. Auch protektive Eigenschaften des mdivi-1 auf Cardiomyocyten wird auf eine Inhibition der Mitophagie insbesondere des PINK1/Parkin Signalwegs zurückgeführt [201]. Eine Abweichung der Ergebnisse könnte darin begründet sein, dass Yin et al. [201] einen Nachweis über den direkten Proteingehalt in ihrer Arbeit erbrachten, während die Ergebnisse dieser Arbeit sich auf die Genexpressionsanalyse beschränkten.

5.2 Mitochondriales Netzwerk und Morphologie

Mitochondrien besitzen je nach Gewebe unterschiedliche Formen und liegen unterschiedlich ausgeprägt fusioniert oder fragmentiert vor [88]. Mit ihrer zentralen Funktion in der Energiebereitstellung für die Zellen, hat jede Veränderung der mitochondrialen Morphologie eine Auswirkung auf die Bioenergetik der Zelle [86]. Daraus ergibt sich, dass sich gerade bei Stoffwechselkrankheiten ein stark verändertes Bild der Form und Vernetzung der Mitochondrien zeigt. Bekannt ist bereits, dass bei einem Diabetes mellitus zwar eine höhere Dichte an Mitochondrien auftritt, diese aber eine abgerundete Form und nur geringe Größe aufweisen [211, 212]. Für die im Zuge dieser Arbeit untersuchten Drp1 – Aktivitätszustände, wurde ebenfalls eine Analyse der mitochondrialen Morphologie und des Netzwerks mittels Lebendzellfärbung mit MitoTracker™ Green FM durchgeführt. Während die Kontrollzellen jeweils ein homogenes mitochondriales Netzwerk, das von einer Balance aus Fusions- und Teilungsprozessen geformt wurde, zeigten, kam es in den untersuchten Zellen zu deutlichen Veränderungen.

Die Expression der Drp1 Negativmutante hatte eine Elongation des mitochondrialen Netzwerks und Clusterungen nahe dem Zellkern zur Folge. Diese Veränderungen waren das Ergebnis eines Ausbleibens von Teilungsereignissen und einer Verschiebung hin zu vermehrter Fusion der Mitochondrien. Das gleiche Bild der Elongation ergab sich auch für Zellen, welche mit dem chemischen Inhibitor mdivi-1 behandelt wurden. Die Fusion dient als wichtiger Schutzmechanismus, in dem sie den Mitochondrien erlaubt bei mtDNA Schäden – oder anderweitig auftretenden Mutationen – genetische Informationen untereinander auszutauschen, um ein gesundes Netzwerk aufrecht zu erhalten [213, 214]. Weiterhin wurde bei Nährstoffmangel beobachtet, dass die Mitochondrien im fusionierten Zustand verbleiben, um eine ATP Versorgung der Zelle zu gewährleisten [108]. Auch in diesem Falle zeigten die Zellen ein typisches Wachstum und die mitochondriale Organisation blieb stabil, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass es sich um einen transienten Zustand eines gesunden mitochondrialen Netzwerks handelte. MIN 6 Zellen mit einer Drp1 Überexpression dagegen wiesen ein eindeutig inhomogenes fragmentiertes Netzwerk auf. Die Mitochondrien zeigten sich verkürzt, geschwollen und abgerundet. Eine morphologische Veränderung, wie man sie auch bei der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 beispielsweise beobachtet [12, 211]. Dabei handelt es sich um die für eine Drp1 Überexpression typische, bereits beschriebene Reaktion des mitochondrialen Netzwerks [215, 216]. Auch Stimuli des Drp1, wie zum Beispiel mittels der Fettsäure Palmitat, die eine gesteigerte Aktivität des Proteins zur Folge haben, induzierten eine Fragmentierung des zellulären Netzwerks der Mitochondrien [45, 115]. Neben der essentiellen Aufgabe der ausgeglichenen Verteilung von Mitochondrien auf entstehende Tochterzellen [163], hat die gesteigerte Teilung sowohl einen teilweise

schützenden Effekt, als auch negative Wirkungen auf das Gewebe. Die Teilung ermöglicht es der Zelle, geschädigte Teile der mitochondrialen Population abzuspalten und mittels Mitophagie zu eliminieren [116]. Weiterhin leitet eine gesteigerte Teilung die Apoptose geschädigter Zellen ein [148], was sich insbesondere in der Tumorthherapie zu Nutze gemacht wird [217]. Als negative Folgen der Fragmentierung werden der Verlust des ATP Gehalts [12, 115], eine reduzierte Aktivität des Komplex I [12] und der Verlust von mtDNA beschrieben [122].

Zur näheren Verifizierung der Veränderungen des Netzwerks wurde in dieser Arbeit zusätzlich eine 3D Analyse zur Untersuchung der Sphärizität und des Volumens der Mitochondrien mittels der Imaris Software durchgeführt. Die Sphärizität beschreibt dabei wie nahe ein Objekt die Form einer Kugel annimmt.

Auf diese Weise war es möglich die visuell detektierbaren Ergebnisse der Lebendzellfärbung für die Negativmutante K38A und die Behandlung mit dem mdivi-1 weiter zu analysieren. In beiden Fällen zeigte sich eine signifikante Minderung der Sphärizität der Mitochondrien bei gleichzeitiger signifikanter Zunahme des mitochondrialen Volumens. Damit wurde eine Elongation des Netzwerks erfolgreich quantifiziert und in ihrer Dreidimensionalität verifiziert. Für die Drp1 Überexpression ergab sich in den Imaris Untersuchungen keine Veränderung in Sphärizität oder Volumen der Mitochondrien im Vergleich zur Kontrolle. Die Vermutung liegt nahe, dass eine genaue Zuordnung der einzelnen Partikel und anschließenden Oberflächenanalyse, mit der die Software vorgeht, im Falle der Fragmentierung und gleichzeitigen engen Clusterung der Mitochondrien verhindert wird. Damit scheint eine Formveränderung zur Fragmentierung und begleitender Clusterung durch die hier gewählte Auswerteroutine und Mittelwertdarstellung nicht ausreichend erfassbar zu sein.

5.3 Membranpotential und ATP/ADP Ratio

Das Membranpotential baut sich zwischen zwei unterschiedlich geladenen Flüssigkeitsräumen auf, die durch eine Membran getrennt werden. Es kann von jeder Zelle ausgebildet werden. Insbesondere für erregbare Zellen, wie die Nerven- und Sinneszellen, besitzt es eine besondere Bedeutung, um eine Signalübertragung zu ermöglichen. In den Mitochondrien ist das Membranpotential unerlässlich, um die Atmungskette und damit die ATP Produktion zu gewährleisten [218]. Auch eine Fusion der Mitochondrien ist nur bei einem intakten Membranpotential der jeweiligen beteiligten Mitochondrien sichergestellt [87]. Eine Schädigung der mitochondrialen Dynamik hat in den meisten Fällen den Verlust des Membranpotentials zur Folge [124, 126, 139, 216]. Folge eines solchen Defizits ist in der Regel ein anschließender Abbau durch Mitophagie [104]. Daher lässt das Membranpotential eine Aussage über das metabolische Reservoir und die Vitalität der Mitochondrien zu [218].

Die Untersuchungen zum Membranpotential im Zuge dieser Arbeit wurden mit Hilfe einer Membranpotential spezifischen Lebendzellfärbung und in Bezug auf eine Färbung der gesamten mitochondrialen Masse durchgeführt. Daraus ergab sich für Zellen, welche die Drp1 Negativmutante K38A exprimierten, dass diese ein gesteigertes Membranpotential in der alleinigen Färbung und in Bezug auf die MitoTracker™ Green FM Färbung des Netzwerks zeigten. Im Vergleich dazu war die Steigerung des Membranpotentials in der spezifischen Färbung mittels TMRE in den mit mdivi-1 behandelten Zellen nicht direkt signifikant. In Bezug zum Gesamtnetzwerk gesetzt, zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Membranpotentials in den Zellen. Das Stabilisieren des Membranpotentials unter lipotoxischen Bedingungen durch die Zugabe von mdivi-1, wurde bereits in der Literatur beschrieben [219]. Ebenso wie die Stabilisierung des Membranpotentials in den Podozyten eines diabetischen Mausmodells nach der Behandlung mit mdivi-1 [4]. Die Steigerung des Membranpotentials in Folge einer Reduzierung der Drp1 Aktivität, lässt darauf schließen, dass diese Beeinflussung einen positiven Effekt auf das mitochondriale Netzwerk der Zelle besitzt. Ein hohes mitochondriales Membranpotential fördert zusätzlich die Elongation der Mitochondrien [87] und damit den Austausch zwischen den Organellen zum Erhalt einer gesunden Population. Bei der Überexpression des Drp1 hingegen, war weder in der spezifischen TMRE Färbung, noch bei Bezug auf die Färbung des gesamten Netzwerks eine Veränderung im mitochondrialen Membranpotential zu messen. Obwohl bereits häufig eine hohe Heterogenität der Mitochondrien nach Fragmentierung in anderen Arbeiten beschrieben wurde [122, 218], beobachteten auch Szabadkai et al. (2004) [215] bei einer Drp1 Überexpression – transient oder stabil – in HeLa Zellen, keine Auswirkung auf das mitochondriale Membranpotential. Der Unterschied könnte in der zielgerichteten und kontrolliert verstärkten Expression des Proteins gegenüber der indirekten Stimulierung durch andere Einflüsse wie Hyperglykämie [218] oder dem Verlust der Mitofusine für die Fusion [122] liegen. Ein Ausbleiben eines Membranpotential Kollapses zeigt, dass das mitochondriale Netzwerk trotz der Drp1 Überexpression anpassungsfähig und intakt ist. Dies zeigte sich auch im regelmäßigen Wachstum der Zellen. Ein intaktes Membranpotential ist essentiell für die ATP Generierung in den Mitochondrien. Zur Prüfung der Energiehomöostase der unterschiedlich in ihrem mitochondrialen Teilungsverhalten aktiven Zellen, wurden diese auf ihre ATP/ADP Ratio mittels ATPlite Luminescence Assay System untersucht. Dabei ergab sich bei der Expression der Drp1 Negativmutante K38A keine Veränderung weder im ATP, noch dem ADP Gehalt und daraus resultierend auch keinen Unterschied in der ATP/ADP Ratio im Vergleich zu Kontrollzellen. Zellen, welche eine mdivi-1 Behandlung erfahren hatten, zeigten sowohl im ATP Gehalt, als auch im ADP Gehalt eine signifikante Reduktion verglichen zu ihrer Kontrolle. In der Ratio dagegen blieb zwar ein Trend hin zur Verminderung, der aber keine Signifikanz erreichte. Dabei war außerdem zu beachten, dass die Werte der mdivi-1 behandelten Zellen deutlich

niedriger ausfielen, als in den Untersuchungen der stabilen Klone. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigten einen positiven Effekt der Behandlung von mdivi-1 auf neuronale Zellen, in denen das ATP Level durch eine Inkubation mit dem Inhibitor gesteigert werden konnte [12]. Eine Zusammenstellung von bisherigen Ergebnissen zu mdivi-1 zeigt allerdings, dass eine Erhöhung der ATP Produktion in den Zellen bisher vor allem in neuronalen Zellen nachgewiesen werden konnte [176]. Die Verwendung unterschiedlicher Zelltypen könnte eine Rolle bei der Wirkung des mdivi-1 auf die ATP Produktion spielen. So ergab eine Untersuchung in HeLa Zellen, bei der die Drp1 Aktivität durch eine Suppression mittels siRNA gemindert wurde, dass die damit hervorgerufene mitochondriale Dysfunktion einen geminderten ATP Gehalt in den Zellen zur Folge hatte [133]. Die Transfektion von Cardiomyocyten mit Drp1-K38A erzielte in anderen Arbeiten eine Steigerung des ATP Level in den Zellen und konnte den Verlust des ATP Gehalts bei Ischämie/Reperfusionsschäden verhindern [220]. In Insulin-sekretierenden INS-1E Zellen dagegen hatte die Expression der K38A-Mutante im Basalzustand keine Auswirkung auf das ATP Level. Erst in Folge der Stimulierung mit Glucose zeigte sich eine signifikante Reduzierung [203]. Ähnlich wie bei der Behandlung mit mdivi-1 wäre es möglich, dass die Auswahl der zu analysierenden Zellen und die Auswahl der Versuchsbedingungen den entscheidenden Unterschied machen, wie stark eine Minderung der Drp1 Aktivität sich auf die ATP Menge der Zelle auswirkt. Eine Untersuchung in MEF Zellen mit einem genetischen Drp1 Knockout zeigte beispielsweise ebenfalls keine Veränderung des ATP Gehalts [153]. Häufig beschrieben ist, dass eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks eine Verringerung des ATP Gehalts in den Zellen zur Folge hat [115, 221]. Bei der Untersuchung von Muskelzellen eines transgenen Mausstamms, der Drp1 überexprimierte, konnte dagegen keinerlei Veränderung des ATP Gehalts nachgewiesen werden [222]. Die Arbeitsgruppe um Kabra et al. (2022) [223] fand bei der Analyse des ATP Gehalts in MIN 6 Zellen nach Überexpression von Drp1 ebenfalls keinen Unterschied zur Kontrolle. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die Ergebnisse des ATP Gehalts in diesem Fall auf den DNA Gehalt der Zelle bezogen wurden, während in der vorliegenden Arbeit mit dem Proteingehalt gearbeitet wurde, was eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse in Frage stellt.

5.4 Auswirkung auf zellulären oxidativen Stress

Als zellulärer oxidativer Stress ist ein Zustand beschrieben, in welchem die Anzahl oxidativer Substanzen in einem Kompartiment größer ist, als die antioxidativer. Oxidative Moleküle, sind aufgrund ihrer Ladung besonders reaktiv und gehen daher schnell unspezifische und zumeist schädliche Verbindungen für die Zellen ein. Insbesondere in Mitochondrien kommt es im Zuge der oxidativen Phosphorylierung zur ATP Generierung, häufig zur Bildung von reaktiven

Sauerstoffspezies (ROS). Durch fehlende Reparaturmechanismen bergen die entstehenden ROS besonders für das ebenfalls in den Organellen gelegene eigene Genom ein großes Risiko Dysfunktionen hervorzubringen. Eine Ansammlung dieser von ROS verursachten Schäden an der mtDNA, wie sie im Laufe des Lebens im Alter auftritt wurde hypothetisiert als begünstigend für typische im Alter gehäuft auftretende Krankheiten [112]. Darunter unter anderem auch das früher als Alters-Diabetes bekannte Diabetes mellitus Typ 2. Teil dieser Arbeit war auch die Untersuchung von oxidativen Stress in MIN 6 Zellen mit modulierter Drp1 Expression. Um einen kausalen Zusammenhang mit der Kapazität der Atmungskette herstellen zu können, wurde eine Genexpression von gleichermaßen nukleären und mitochondrial codierten Bestandteilen durchgeführt, so wie ein Western Blot auf Untereinheiten von Komplexen der oxidativen Phosphorylierung.

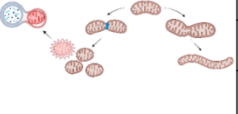
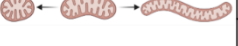






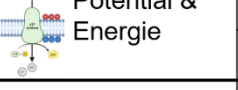

Die Genexpressionsanalyse der kerncodierten Bestandteile der Atmungskette Atp5a1 (Komplex V) und Ndufb8 (Komplex I), ergab bei der Drp1 Inhibition durch die Expression von K38A eine signifikant vermehrte Expression des Ndufb8. Diese wurde im OXPHOS Western Blot noch einmal bestätigt. Eine gesteigerte Expression ergab sich im Western Blot für alle weiteren darin untersuchten kerncodierten Proteine: Uqcrc2 (Komplex III) und SDHB (Komplex II). In den Untersuchungen zu den mitochondrial codierten Bestandteilen wurde eine herabregulierte Expression des ATP8 (Komplex V) in der Genexpressionsanalyse und des Mtc01 (Komplex IV) in der Proteinexpression detektiert. Das Ergebnis signifikant gesteigert exprimierter OXPHOS Komplexe, wurde durch die Arbeit von Kraus et al. [135] bestätigt, die herausfanden, dass ein elongiertes mitochondriales Netzwerk vermehrt zur Energiebereitstellung auf OXPHOS zurückgreift, statt diese auf den glykolytischen Weg zu gewinnen [107]. Allerdings zeigte sich dafür kein eindeutiges Bild der Herauf- oder Herabregulation der Atmungskettenbestandteile in K38A Zellen. Eindeutig war jedoch ein Eingriff in die Atmungskette, den die Inhibition mittels Negativmutante ausübt. Während die Genexpressionanalyse der kerncodierten Proteine für mdm1-1 keine signifikante Veränderung zeigen konnten, ergab die Proteinexpressionsanalyse für alle untersuchten kerncodierten Bestandteile eine signifikante Minderung in der Expression. Bei der Expression der mitochondrial codierten Bestandteile konnte in der Genexpression eine signifikante Senkung der ATP8 Expression und im Western Blot bei Mtc01 nachgewiesen werden. Untersuchungen in neonatalen primären Cardiomyocyten [224] und in hepatischen Sternzellen [225], konnten ebenfalls eine geminderte Expression der OXPHOS Bestandteile messen. Eine mögliche Ursache für diesen Effekt lag bei Aishwarya et al. [224] allerdings in der supprimierenden Wirkung des mdm1-1 auf die Drp1 Expression in ihren Analysen. Ein Effekt, der in der vorliegenden Arbeit in einer insulinproduzierenden Zelllinie nicht reproduziert werden konnte. Dagegen zeigten die Analysen von Kabra et al. (2017) zur Auswirkung des Drp1 Silencing mittels Lentivirus, dass eine Minderung der Drp1 Aktivität in MIN 6 Zellen keine

Auswirkung auf die Atmungskette der Mitochondrien aufwies [171]. Eine Überexpression von Drp1 dagegen, hatte auf der Ebene der Genexpression eine signifikante Steigerung aller untersuchten Bestandteile zur Folge. Auf Ebene der Proteinexpression erreichte die Steigerung der Expression keine Signifikanz. Anders herum wurde die Fragmentierung der Mitochondrien in Folge einer Inhibition der Atmungskettenkomplexe bereits in anderen Arbeiten als Anpassung an die niedrige Energiebereitstellung gezeigt [226]. Durch Erhöhung der Mitochondrien Masse, kann die Zelle auch die Menge an Atmungskettenkomplexen als Bestandteile der mitochondrialen Membran steigern, um die ATP Generierung zu steigern. Andere Untersuchungen zur Drp1 Überexpression in MIN 6 Zellen auf die Atmungskette, ergaben allerdings keinen Unterschied, zumindest in der Konzentration respiratorischer Komplexe [223]. Gewebeanalysen zu Krankheitsbildern, wie der Fanconi Anämie zeigten, dass eine krankhafte Fragmentierung auch zu einer Störung der Atmungskette innerhalb der Mitochondrien und zu einer gestörten Intermembranen Struktur führt [227]. Ein Bild, das sich so auch bei der Behandlung isolierter Mitochondrien mit zusätzlichem Drp1 zeigte [228].

Betrachtet man die Entstehung von ROS bei Drp1 Überexpression in den Zellen, die anhand einer Färbung mit dem Lebendzellfarbstoff MitoSOXTM analysiert wurden, ergab sich durch die erhöhte Expression der Atmungskettenbestandteile auch eine damit einhergehende signifikante Steigerung der auftretenden reaktiven Spezies. Der Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression des Drp1 und dem vermehrten Auftreten von ROS in den betroffenen Zellen, wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben [205, 228]. MIN 6 Zellen, welche die Drp1 Negativmutante K38A exprimierten zeigten ebenfalls ein vermehrtes Auftreten von ROS innerhalb der Zellen. Die Minderung der mitochondrialen Teilung ist nachweislich ein Mediator der ROS Produktion [133, 172, 229]. Dies zeigt die essentielle Rolle, die die mitochondriale Teilung in der Eliminierung von beschädigten Mitochondrien hat, um diese aus der Population mittels Mitophagie zu entfernen. Sobald die Teilung ausbleibt, kommt es zur Ansammlung dysfunktionaler Mitochondrien und häufig einer Störung oder einem vollständigen Verlust der Funktion des betroffenen Gewebes. Die Analyse der mit mdivi-1 behandelten Zellen ergab keine Veränderung der ROS Produktion. In anderen Untersuchungen zeigte sich darüber hinaus, dass die ROS Produktion bei Behandlung mit mdivi-1 sogar bei Inkubation der Zellen mit potentiell schädlichen Substanzen [4, 183] gleich blieb. Die Arbeitsgruppe von Bordt et al., welche die spezifische Wirkung des mdivi-1 auf das Drp1 in Frage stellte 2017 [178], hatte in einer Untersuchung eine Minderung der ROS Generierung nach der Behandlung mit mdivi-1 festgestellt und hypothesisierte 2022 daraufhin eine antioxidantische Wirkung des Moleküls [200].

Zur weiteren Verifizierung des Ausmaßes an oxidativen Stress für die Zellen, wurde die Genexpression des entsprechenden Abwehrsystems in Form der SOD1 und 2,

Glutathionperoxidase, Peroxiredoxin und Catalase untersucht. Die antioxidative SOD2 wurde bei Drp1 Aktivitätsreduzierung durch die Expression der Negativmutante signifikant in ihrem Expressionslevel erhöht gemessen, während die Catalase in ihrer Expression deutlich gemindert war. Die Ergebnisse der Drp1 Inaktivierung mittels des Inhibitor mdivi-1 unterschieden sich insoweit, dass nicht nur die SOD2 Expression, sondern auch die Catalase Expression signifikant gesteigert war im Vergleich zu der untersuchten Kontrolle. Der Effekt, der vermehrten Expression von SOD und Catalase in mdivi-1 behandelten Zellen wurde auch von Liu et al. in ihren Untersuchungen beschrieben [230] und für die geringe ROS Produktion verantwortlich gemacht – gemeinsam mit der Öffnung von Calcium- und Kaliumkanälen. Eine andere Studie zeigte, dass die Expression der K38A Mutante in optischen Ganglien zu einer Minderung der SOD Expression führte, was gleichgesetzt wurde mit einer Senkung des oxidativen Stress in der Zelle [231]. Dementsprechend scheint eine Steigerung der SOD2 Expression in Bezug auf die vermehrte ROS Produktion, die bereits mittels Lebendzellfärbung nachgewiesen wurde, eine logische Folge auf den damit ausgelösten oxidativen Stress für die Betazelle. Ungewöhnlich war die Herabgesetzte Expression der Catalase, welche der SOD2 nachgeschaltet in der oxidativen Abwehr ist und die endgültige Reaktion vom entstehenden H_2O_2 hin zum nicht toxischen H_2O katalysiert. Möglicherweise ist darin auch der Unterschied begründet, dass in den MIN 6 Zellen, welche die Drp1 Negativmutante exprimieren der oxidative Stress mit einem gesteigerten ROS Gehalt weiterhin besteht, während in mit mdivi-1 behandelten Zellen die oxidative Abwehr gleichmäßig gesteigert reagiert und somit, keine Steigerung der ROS Produktion zulässt. Zellen welche Drp1 überexprimieren, besaßen ein höheres Expressionslevel sowohl für die SOD1, als auch die SOD2, während die Catalase ein gemindertes Expressionslevel aufwies. Passend zu den bereits beschriebenen Ergebnissen auch von anderen Arbeitsgruppen, zeugten die erhöhten Werte der Dismutasen von einem verstärkten oxidativen Stress, der durch den Mangel der Catalase-Aktivität nicht aufgehoben werden kann.

		Drp1+	K38A	Mdivi-1
 Mitochondriale Dynamik	Fusion	=	+	+
	Teilung	=	+	=
	Autophagie	=	+	+
	Mitophagie	=	+	+
 Morphologie & Netzwerk	Morphologie			
	Sphärizität			
	Volumen	+	+	+
 Potential & Energie	Membranpotential	=	+	+
	ATP/ADP	+	=	=
 Zellulär oxidativer Stress	Antioxidanzen (Gen)	+	+/-	+
	OXPHOS (nuklear)	+	+	-
	OXPHOS (mitochondrial)	+/-	-	=
	MitoSOX	+	+	=

+ : verstärkt; - : gehemmt; = : unverändert im Vergleich zur Kontrolle; +/-: anteilig verstärkt und gemindert

Abbildung 44 Übersicht der generierter Ergebnisse für MIN 6 Zellen, welche i) stabil Drp1 überexprimieren (Drp1+), ii) stabil eine Drp1 Negativmutante exprimieren (K38A) und iii) mit pcDNA transfiziert und mdivi-1 behandelt wurden; Abbildungen erstellt mittels BioRender.com

5.5 Insulinsekretion

Abschließend stellte sich die Frage, welchen spezifischen Einfluss die Veränderung der Drp1 Expression auf insulinproduzierende Zellen hat. Hierzu wurde in den MIN 6 Zellen der Insulin- und Glucokinase Gehalt mittels Immunfluoreszenzfärbung verglichen und der Insulingehalt in Verbindung mit der Insulinsekretion mittels ELISA bestimmt. Das Enzym Glucokinase besitzt eine geringe Affinität zum Substrat Glucose und eine Kooperativität, so dass die Aktivität postprandial zunimmt. Aus diesem Grund wird die Glucokinase als Glucosesensor der Zellen bezeichnet [232]. Höheren Mengen des Glucokinase Enzyms in Betazellen, haben eine gesteigerte Insulinsekretion zur Folge [68].

Die genetische Aktivitätsminderung des Drp1 durch Expression der Negativmutante ergab immunhistochemisch einen gesteigerten Glucokinase- und Insulingehalt in den Zellen. Mittels ELISA zeigte sich, dass die Insulinmenge der Zellen, ebenso wie die entsprechend sekretierte Menge deutlich höher war als in den weiteren untersuchten Zellen in dieser Arbeit. Zwischen basalem und Glucose stimulierten Zustand konnte in den MIN 6 Zellen, welche die Drp1 Negativmutante K38A exprimierten keinen Unterschied im Insulingehalt oder der Insulinsekretion nachgewiesen werden. Auch nach Korrelation auf die Proteinmenge der

Zellen, bestätigte sich der Verlust der Glucose Responsivität im Vergleich zu Kontrollzellen. Im Gegensatz zu den K38A Zellen konnte hier aber eine deutliche Sensibilität der Zellen aufgezeigt werden. Durch Stimulation mittels Glucose, steigerte sich die Insulinsekretion signifikant gegenüber der basalen Ausschüttung. Dabei war der Effekt allerdings im Vergleich zu Kontrollzellen nur tendenziell erhöht. Eine signifikante Verbesserung konnte in diesem Versuchsansatz nicht nachgewiesen werden. Dies zeigte sich auch im Insulingehalt der Zellen, der bei der Behandlung mit mdivi-1 keine Veränderung zeigte.

Aus Untersuchungen wird postuliert, dass eine inhibierte Teilung die Plastizität der Mitochondrien aufhebt, so dass es ihnen nicht möglich ist, eine adäquate Insulinantwort auf die Steigerung des Blutzuckerspiegels auszulösen. Stattdessen kommt es zur Blockierung der Insulinsekretion und zum Protonenverlust [203]. Eine solche Herabsetzung der mitochondrialen Plastizität wird als begünstigende Ursache für die Ausbildung eines Diabetes mellitus Typ 2 beschrieben [96].

Die Folge der geminderten Insulinsekretion in MIN 6 Zellen nach genetischem Silencing von Drp1 wurde auch in anderen Studien nachgewiesen [171]. Die Behandlung mit mdivi-1 wurde in einer Studie als förderlich für die Insulinantwort der Betazellen beschrieben [184]. Zwar fehlt der signifikante Nachweis im Vergleich zu Kontrollzellen in dieser Studie, aber der positive Effekt konnte durch eine hohe Signifikanz der Glucose Responsivität selbst eindeutig bestätigt werden. Weitere Studien fokussieren sich auf das insulinsensitive Gewebe und weniger auf die Betazellfunktion. In Mäusen beispielsweise, die eine Hochfettdiät erhielten, konnte die Behandlung mit mdivi-1 die Ausbildung einer Insulinresistenz verhindern [186]. Bei einer akuten Insulinresistenz in Mäusen, konnte die Behandlung mit mdivi-1 eine Besserung der mitochondrialen Funktion herbeiführen, unter anderem durch Aktivierung der mitochondrialen Biogenese und Steigerung der Insulinsensitivität [194].

Bei einer Drp1 Überexpression wurde kein Unterschied im immunhistochemisch bestimmten Glucokinase- und Insulingehalt ermittelt. Die Überexpression von Drp1 in den MIN 6 Zellen hatte zudem keinen direkten Einfluss auf den mittels ELISA bestimmten Insulingehalt oder die Menge des sekretierten Insulins. Eine Reaktion auf die Stimulierung mittels Glucose wurde in gleichem Ausmaß, wie in den untersuchten Kontrollzellen detektiert. Auch der Bezug der Insulinsekretion auf Insulin- und Proteingehalt ergab das gleiche Ergebnis in den Drp1 überexprimierenden Zellen. Die Fragmentierung der Mitochondrien in Inselzellen von Patienten mit Diabetes mellitus wurde bereits beschrieben [49]. Genaue Analysen ergaben einen geringeren ATP Gehalt, einen niedrigeren Insulingehalt und daraus resultierenden eine gestörte Insulinsekretion der Inselzellen [211]. Auch in der Arbeit von Kabra et al. (2022) wurde bestätigt, dass eine Überexpression des Drp1 in MIN 6 Zellen, zwar zunächst keine Auswirkung auf den Phänotyp besitzt, aber die langfristige Anwesenheit des Proteins eine

Minderung des Insulingehalts zur Folge hatte, der sich schlussendlich negativ auf die Insulinsekretion auswirkte [223]. Als Ursache wurde hier der durch die Drp1 Überexpression ausgelöste ER-Stress hypothetisiert, der in einer gestörten Insulinproduktion resultierte [223]. Das Ausbleiben der Übereinstimmung der Ergebnisse zum Insulingehalt und seiner Sekretion zwischen der vorliegenden Arbeit und der von Kabra et al. (2022) könnte darin begründet sein, dass Kabra et al. ihre Ergebnisse auf den DNA Gehalt der Zellen beziehen, während in dieser Arbeit ein Bezug zum absoluten Proteingehalt gezogen wurde. Außerdem untersuchte Kabra et al. nur transient mit Drp1 transfizierte Zellen gegenüber dem in dieser Arbeit vorliegenden stabilen Klon. Weiterführend sind hier Untersuchungen an isolierten Primärzellen notwendig, um den Aspekt tiefergehender zu betrachten.

6. Zusammenfassung

Die Stoffwechselerkrankung des Diabetes mellitus wird als eine weltweit steigende Pandemie bezeichnet [18, 25]. Charakterisiert wird die Krankheit durch eine chronische Hyperglykämie ausgelöst durch einen Insulinmangel oder eine Insulinresistenz [22]. Der kontinuierlich erhöhte Blutzuckerspiegel kann schwerwiegende Folgen für die Gewebe haben [12] und zur Ausbildung von unterschiedlichen Komplikationen führen [10, 11, 13]. Als Hauptenergieproduzenten mittels oxidativer Phosphorylierung, sind Mitochondrien essentielle Bestandteile der Zelle. Aus diesem Grund wird eine Dysfunktion der Organellen unter anderem auch mit der Ausbildung von Stoffwechselkrankheiten assoziiert [55]. Insbesondere beim Diabetes mellitus besitzt die Generierung von ATP durch Mitochondrien für den Sekretionsreiz des Blutzucker senkenden Hormons Insulin eine wesentliche Bedeutung [45, 94]. Um ihre Aufgabe zu erfüllen, sind die Mitochondrien in dynamischen Netzwerken organisiert, die durch Fusions- und Teilungsprozesse auf Veränderungen in den Bedürfnissen der Zelle reagieren können und durch Informationsaustausch und Qualitätskontrolle eine gesunde Population erhalten [107]. Eine Störung der Plastizität der Organellen ist somit immer mit einem Verlust an Energie für die Zelle verbunden [96, 203]. Im Falle des Diabetes mellitus Typ 2 wird eine Veränderung des mitochondrialen Netzwerks hin zur Fragmentierung beobachtet, die nicht nur mit Verlust der Insulinsensitivität [49], sondern auch dem Insulingehalt und der Sekretion in Betazellen des Pankreas einhergeht [211]. Eine übermäßige Fragmentierung der Mitochondrien ist die Folge einer Störung der mitochondrialen Dynamik, die durch unterschiedliche Proteine reguliert wird. Die Fusion der äußeren Membran der Organellen wird durch die Mitofusine 1 und 2 [124, 129] vermittelt, während die innere Membran durch das Opa1 miteinander verbunden wird [125, 126]. Auf die Fusion folgt in der Regel eine Teilung der Mitochondrien voneinander [104]. Der Hauptmediator dieses Prozesses bildet das Drp1. Die Bindung des Proteins an seine Rezeptoren in der äußeren Mitochondrien Membran bildet den Initiationsprozess der Teilung [134]. Die Balance zwischen Fusion und Teilung ist wesentlich, um eine gesunde mitochondriale Population aufrecht zu erhalten [90, 116]. Aus diesem Grund bildet der Erhalt bzw. die Wiederherstellung des Gleichgewichts in der mitochondrialen Dynamik ein vielversprechendes Ziel bei der Therapie verschiedener Krankheiten [116]. Insbesondere für den Diabetes mellitus Typ 2 erscheint eine Therapie in Form der pharmazeutischen Regulation der Fragmentierung der Mitochondrien als Behandlungsmethode attraktiv. Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung des Drp1 in der Funktion der Betazelle untersucht.

Dafür wurde die Aktivität des Proteins unterschiedlich beeinflusst, um seine Rolle zu validieren. Zu diesem Zweck wurden MIN 6 Zellen, die i) Drp1 stabil überexprimieren; ii) eine Drp1 Negativmutante mit einer Punktmutation in der GTPase stabil exprimieren und iii) mit dem

chemischen Inhibitor mdivi-1 behandelt wurden, verglichen. Besondere Aufmerksamkeit lag dabei auf dem vielversprechenden, aber auch kontrovers diskutierten, mdivi-1 und seine Wirkung auf die Betazelle und ihre Mitochondrien. Die Überexpression des Drp1 Proteins zeigte sich zunächst nicht dementsprechend beeinträchtigt, wie die Ergebnisse aus der Literatur zur Fragmentierung von Mitochondrien in Betazellen erwarten ließ. Zwar war eine signifikante Fragmentierung der Organellen in Folge der erhöhten Drp1 Expression zu beobachten, allerdings zeigte diese keine Auswirkung auf die Betazellfunktion. Erwähnenswert ist die Steigerung in der Expression der Atmungsketten Komplexe, die eine Erhöhung des ATP Gehalts und der ATP/ADP Ratio zur Folge hat. Daraus resultiert im Endeffekt, eine vermehrte Sekretion von Insulin. Kurzzeitig hat die Steigerung der Mitochondrien Anzahl für die Zelle – den Ergebnissen zu Folge – eine Leistungssteigernde Wirkung. Allerdings resultiert die Veränderung der Atmungskette auch in einer amplifizierten Produktion von ROS, die über einen längeren Zeitraum zur Reduktion der Zellfunktion führen wird. Die zunächst übermäßige Insulinsekretion der Betazelle als Antwort auf eine Insulinresistenz und die sich anreichernden Schäden durch die entstehenden ROS bergen ein hohes Risiko der Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 2. Hier lässt sich anhand der in dieser Studie erhobenen Ergebnisse ein Zusammenhang mit einer erhöhten Drp1 Expression und Fragmentierung der Mitochondrien postulieren. Für die Inaktivierung des Drp1 konnte gezeigt werden, dass sich die Beeinträchtigung der Drp1 Aktivität durch die Expression der Negativmutante neben einigen Gemeinsamkeiten ber insgesamt von der mittels chemischen Inhibitor, mdivi-1, unterscheidet. Der Effekt auf die Morphologie der Mitochondrien war in der Verschiebung zu vermehrten Fusionsereignissen und Clusterungen der Mitochondrien in Nucleus Nähe vergleichbar. Diese Veränderung des Netzwerks konnte durch die 3D Bilddatenanalyse des erhöhten Volumens und der geminderten Sphärizität in beiden Fällen auch quantitativ als signifikant verifiziert werden. Beide Inhibitionsformen haben zusätzlich den positiven Einfluss eines gesteigerten Membranpotentials der Mitochondrien – ein Parameter, der häufig für die Untersuchung der Gesundheit und Vitalität der Organellen genutzt wird – gemeinsam.

Während mdivi-1 behandelte Zellen eine Tendenz zur gesteigerten Glucose Responsivität in der Insulinsekretion zeigten, kam es bei MIN 6 Zellen mit Expression der Negativmutante K38A zum Verlust derselben. Diese protektive Eigenschaft der mdivi-1 Behandlung steht in Einklang mit der ermittelten moderaten Erhöhung der Auto- und Mitophagie und Steigerung des Membranpotentials bei unveränderter ROS Produktion. Die Inhibition mittels der Drp1 Negativmutante K38A zeigte dagegen eine Adaptation der Expression von Proteinen, die die mitochondriale Dynamik, die Mitophagie und die oxidative Phosphorylierung regulieren. Schlussendlich resultierte dieser aber weder in einer Steigerung der ATP Bildung, noch in den protektiven Effekten, sondern in verstärkter ROS Bildung. Daraus lässt sich postulieren, dass

die erhöhte Drp1 Expression trotz Inaktivierung der GTPase-Aktivität, dauerhaft einen negativen Einfluss auf die Betazelle hat. Ob die mit der mdivi-1 Behandlung ermittelten Ergebnisse in den MIN 6 Zellen allein auf die spezifische Inhibierung von Drp1 zurückzuführen sind, lässt sich mit dem Vergleich der Negativmutante K38A nicht eindeutig schlussfolgern. Mdivi-1 könnte auch weitere Zielstrukturen innerhalb der Zelle besitzen. Im Gegensatz zu den kontrovers diskutierten Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Bordt et al. (2017) [178], die eine unspezifische Reaktion des mdivi-1 auf das Drp1 und eine inhibitorische Wirkung stattdessen auf den Komplex I postulieren, kann in der vorliegenden Arbeit in MIN 6 Zellen eine Korrelation der induzierten Veränderungen mit der Drp1 Aktivität gezeigt werden. Auch Kabra et al. haben bereits 2017 MIN 6 Zellen mit mdivi-1 behandelt [171]. Auf Basis dieser Arbeit wird vermutet, dass Unterschiede zwischen den Studien hauptsächlich in der Handhabung des Inhibitors begründet sind. Bisher mangelt es an einem einheitlichen Protokoll für die Verwendung von mdivi-1. Die Unterschiede variieren von der Lagerung, über die Konzentration der Stocklösung, das Lösungsmittel, die verwendete Menge und Inkubationszeit. Um das Potential eines Drp1 Inhibitors reproduzierbar abzubilden, bedarf es geeigneter Protokolle und noch ausstehende Untersuchungen an isolierten Primärzellen und in Tiermodellen. Nur so kann das Potential für eine mögliche Pharmakotherapie aussagekräftig bewertet werden.

V. Literatur

1. Arnold M (2012) Diabetologie für die Praxis : fallorientierte Darstellung - Diagnostik und Therapie. Thieme, Stuttgart
2. Abholz H-H (2000) Diabetes mellitus. Urban und Fischer, München
3. Lowell BB, Shulman GI (2005) Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307(5708):384–387. doi:10.1126/science.1104343
4. Ayanga BA, Badal SS, Wang Y, Galvan DL, Chang BH, Schumacker PT, Danesh FR (2016) Dynamin-Related Protein 1 Deficiency Improves Mitochondrial Fitness and Protects against Progression of Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 27(9):2733–2747. doi:10.1681/ASN.2015101096
5. Harreiter J, Roden M (2019) Diabetes mellitus – Definition, Klassifikation, Diagnose, Screening und Prävention (Update 2019). *Wien Klin Wochenschr* 131(Suppl 1):6–15. doi:10.1007/s00508-019-1450-4
6. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, Stein C, Basit A, Chan JCN, Mbanya JC, Pavkov ME, Ramachandaran A, Wild SH, James S, Herman WH, Zhang P, Bommer C, Kuo S, Boyko EJ, Magliano DJ (2022) IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 183:109119. doi:10.1016/j.diabres.2021.109119
7. Werner C, Schmidt S (2021) Makrovaskuläre Folgeerkrankungen und Prognose des Diabetes mellitus ELSEVIER ESSENTIALS Diabetes. Elsevier, S 83–91
8. Resl M, Clodi M (2010) Diabetes und kardiovaskuläre Komplikationen. *Epidemiologie zur Morbidität und Mortalität. Wien Med Wochenschr* 160(1-2):3–7. doi:10.1007/s10354-010-0744-y
9. Robertson RP, Harmon JS (2006) Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. *Free Radic Biol Med* 41(2):177–184. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.04.030
10. Ramos-Rodriguez JJ, Molina-Gil S, Ortiz-Barajas O, Jimenez-Palomares M, Perdomo G, Cozar-Castellano I, Lechuga-Sancho AM, Garcia-Alloza M (2014) Central proliferation and neurogenesis is impaired in type 2 diabetes and prediabetes animal models. *PLoS One* 9(2):e89229. doi:10.1371/journal.pone.0089229
11. Behrens M, Borchert P, Kress S Körperliche Aktivität in jedem Alter Gesundheitsbericht 2018, S 259–266
12. Huang S, Wang Y, Gan X, Du Fang, Zhong C, Wu L, Hu G, Sosunov AA, McKhann GM, Yu H, Yan SS (2015) Drp1-mediated mitochondrial abnormalities link to synaptic injury in diabetes model. *Diabetes* 64(5):1728–1742. doi:10.2337/db14-0758

13. Voigt M, Wolf G (2021) Mikrovaskuläre Folgeerkrankungen ELSEVIER ESSENTIALS Diabetes. Elsevier, S 73–81
14. Stefan N, Roden M (2020) Diabetes und Fettleber. Diabetologie und Stoffwechsel 15(S 01):S156-S159. doi:10.1055/a-1193-3913
15. American Diabetes Association Nephropathy in Diabetes Diabetes Care, 27/2004, S 79–83
16. Hauner H, Köster I, Ferber L von (2003) Ambulante Versorgung von Patienten mit Diabetes mellitus im Jahr 2001. Analyse einer Versichertenstichprobe der AOK Hessen/KV Hessen. Dtsch Med Wochenschr 128(50):2638–2643. doi:10.1055/s-2003-45484
17. Centers for Disease Control and Prevention (2020) National Diabetes Statistics Report, 2020, Atlanta
18. Goffrier B, Schulz Mandy, Bätzing-Feigenbaum J (2017) Administrative Prävalenzen und Inzidenzen des Diabetes mellitus von 2009 bis 2015. Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland (Zi)
19. Tönnies T, Röckl S, Hoyer A, Heidemann C, Baumert J, Du Y, Scheidt-Nave C, Brinks R (2019) Projected number of people with diagnosed Type 2 diabetes in Germany in 2040. Diabet Med 36(10):1217–1225. doi:10.1111/dme.13902
20. Schmidt C, Reitzle L, Dreß J, Rommel A, Ziese T, Heidemann C (2020) Prävalenz und Inzidenz des dokumentierten Diabetes mellitus – Referenzauswertung für die Diabetes-Surveillance auf Basis von Daten aller gesetzlich Krankenversicherten. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 63(1):93–102. doi:10.1007/s00103-019-03068-9
21. Heidemann C, Du Y, Schubert I, Rathmann W, Scheidt-Nave C (2013) Prävalenz und zeitliche Entwicklung des bekannten Diabetes mellitus: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 56(5-6):668–677. doi:10.1007/s00103-012-1662-5
22. Mekala KC, Bertoni AG (2020) Epidemiology of diabetes mellitus Transplantation, Bioengineering, and Regeneration of the Endocrine Pancreas. Elsevier, S 49–58
23. Mensink GBM, Schienkiewitz A, Haftenberger M, Lampert T, Ziese T, Scheidt-Nave C (2013) Übergewicht und Adipositas in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 56(5-6):786–794. doi:10.1007/s00103-012-1656-3
24. Wang Y, Rimm EB, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB (2005) Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men. Am J Clin Nutr 81(3):555–563. doi:10.1093/ajcn/81.3.555

25. Tönnies T, Rathmann W (2021) Epidemiologie des Diabetes in Deutschland. In: Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) und diabetesDE - Deutsche Diabetes-Hilfe (Hrsg) Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2021. Die Bestandsaufnahme, 1. Aufl. Verlag Kirchheim + Co GmbH, Mainz, S 9–16
26. Khan MAB, Hashim MJ, King JK, Govender RD, Mustafa H, Al Kaabi J (2020) Epidemiology of Type 2 Diabetes - Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *J Epidemiol Glob Health* 10(1):107–111. doi:10.2991/jegh.k.191028.001
27. Reitzle L, Schmidt C, Du Y, Icks A, Hagen B, Ziese T, Scheidt-Nave C (2020) Einschätzungen zur Prävalenz mikrovaskulärer Folgeerkrankungen bei Diabetes mellitus in Deutschland. Analyse von Versichertendaten aller gesetzlichen Krankenkassen für die Jahre 2012 und 2013. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 63(10):1219–1230. doi:10.1007/s00103-020-03211-x
28. Weber D, Kaltheuner M (2019) Komorbiditäten bei Typ-2-Diabetes. *Diabetologe* 15(2):114–119. doi:10.1007/s11428-018-0405-0
29. Bottazzo G, Florin-Christensen A, Doniach D (1974) ISLET-CELL ANTIBODIES IN DIABETES MELLITUS WITH AUTOIMMUNE POLYENDOCRINE DEFICIENCIES. *The Lancet* 304(7892):1279–1283. doi:10.1016/S0140-6736(74)90140-8
30. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL (1983) Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 222(4630):1337–1339. doi:10.1126/science.6362005
31. Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y (2000) A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. Osaka IDDM Study Group. *N Engl J Med* 342(5):301–307. doi:10.1056/NEJM200002033420501
32. Bingley PJ, Bonifacio E, Mueller PW (2003) Diabetes Antibody Standardization Program: first assay proficiency evaluation. *Diabetes* 52(5):1128–1136. doi:10.2337/diabetes.52.5.1128
33. Wiest-Ladenburger U, Hartmann R, Hartmann U, Berling K, Böhm BO, Richter W (1997) Combined analysis and single-step detection of GAD65 and IA2 autoantibodies in IDDM can replace the histochemical islet cell antibody test. *Diabetes* 46(4):565–571. doi:10.2337/diab.46.4.565
34. Törn C, Mueller PW, Schlosser M, Bonifacio E, Bingley PJ (2008) Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. *Diabetologia* 51(5):846–852. doi:10.1007/s00125-008-0967-2
35. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW, Hutton JC (2007) The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major

- autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(43):17040–17045.
doi:10.1073/pnas.0705894104
36. American Diabetes Association (2018) Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care* 41(Suppl 1):S1-S2. doi:10.2337/dc18-Sint01
37. Craig ME, Kim KW, Isaacs SR, Penno MA, Hamilton-Williams EE, Couper JJ, Rawlinson WD (2019) Early-life factors contributing to type 1 diabetes. *Diabetologia* 62(10):1823–1834.
doi:10.1007/s00125-019-4942-x
38. Rosenbauer J, Neu A, Rothe U, Seufert J, Holl RW (2019) Diabetestypen sind nicht auf Altersgruppen beschränkt: Typ-1-Diabetes bei Erwachsenen und Typ-2-Diabetes bei Kindern und Jugendlichen. doi:10.25646/5981
39. Kordonouri O, Kerner W (2021) Diabetes mellitus Typ 1 – Update. *Internist (Berl)* 62(6):627–637.
doi:10.1007/s00108-021-01009-w
40. Patterson CC, Harjutsalo V, Rosenbauer J, Neu A, Cinek O, Skrivarhaug T, Rami-Merhar B, Soltesz G, Svensson J, Parslow RC, Castell C, Schoenle EJ, Bingley PJ, Dahlquist G, Jarosz-Chobot PK, Marčiulionytė D, Roche EF, Rothe U, Bratina N, Ionescu-Tirgoviste C, Weets I, Kocova M, Cherubini V, Rojnic Putarek N, deBeaufort CE, Samardzic M, Green A (2019) Trends and cyclical variation in the incidence of childhood type 1 diabetes in 26 European centres in the 25 year period 1989-2013: a multicentre prospective registration study. *Diabetologia* 62(3):408–417.
doi:10.1007/s00125-018-4763-3
41. Petrie D, Lung TWC, Rawshani A, Palmer AJ, Svensson A-M, Eliasson B, Clarke P (2016) Recent trends in life expectancy for people with type 1 diabetes in Sweden. *Diabetologia* 59(6):1167–1176.
doi:10.1007/s00125-016-3914-7
42. Huo L, Harding JL, Peeters A, Shaw JE, Magliano DJ (2016) Life expectancy of type 1 diabetic patients during 1997-2010: a national Australian registry-based cohort study. *Diabetologia* 59(6):1177–1185. doi:10.1007/s00125-015-3857-4
43. an Tran-Duy, Knight J, Clarke PM, Svensson A-M, Eliasson B, Palmer AJ (2021) Development of a life expectancy table for individuals with type 1 diabetes. *Diabetologia* 64(10):2228–2236.
doi:10.1007/s00125-021-05503-6
44. Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR, Bergman RN (1992) Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *The Lancet* 340(8825):925–929. doi:10.1016/0140-6736(92)92814-V
45. Las G, Oliveira MF, Shirihaï OS (2020) Emerging roles of β -cell mitochondria in type-2-diabetes. *Mol Aspects Med* 71:100843. doi:10.1016/j.mam.2019.100843
46. Varlemann H Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 Heilberufe/ Das Pflegemagazin, 3/2018, S 14–16

47. Dabelea D, Stafford JM, Mayer-Davis EJ, D'Agostino R, Dolan L, Imperatore G, Linder B, Lawrence JM, Marcovina SM, Mottl AK, Black MH, Pop-Busui R, Saydah S, Hamman RF, Pihoker C (2017) Association of Type 1 Diabetes vs Type 2 Diabetes Diagnosed During Childhood and Adolescence With Complications During Teenage Years and Young Adulthood. *JAMA* 317(8):825–835. doi:10.1001/jama.2017.0686
48. Reindel J, Zander E, Heinke P, Kohnert K-D, Allwardt C, Kerner W (2004) Metabolisches Syndrom bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1. Auswirkungen auf das kardiovaskuläre Risikoprofil und die kardiovaskuläre Morbidität. *Herz* 29(5):463–469. doi:10.1007/s00059-004-2606-0
49. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB (2002) Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51(10):2944–2950. doi:10.2337/diabetes.51.10.2944
50. Gujral UP, Weber MB, Staimez LR, Narayan K MV (2018) Diabetes Among Non-Overweight Individuals: an Emerging Public Health Challenge. *Curr Diab Rep* 18(8):60. doi:10.1007/s11892-018-1017-1
51. Ahlqvist E, Storm P, Käräjämäki A, Martinell M, Dorkhan M, Carlsson A, Vikman P, Prasad RB, Mansour Aly D, Almgren P, Wessman Y, Shaat N, Spegel P, Mulder H, Lindholm E, Melander O, Hansson O, Malmqvist U, Lernmark Å, Lahti K, Forsén T, Tuomi T, Rosengren AH, Groop L (2017) Clustering of adult-onset diabetes into novel subgroups guides therapy and improves prediction of outcome. *bioRxiv*:186387. doi:10.1101/186387
52. Scherbaum WA, Hamann A (2018) Typ-2-Diabetes – Update 2018. *Diabetologie* 14(5):294–308. doi:10.1007/s11428-018-0356-5
53. Kabisch S, Rubin D (2021) Die Rolle der Ernährung in der Diabetesprävention. In: Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) und diabetesDE - Deutsche Diabetes-Hilfe (Hrsg) Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2021. Die Bestandsaufnahme, 1. Aufl. Verlag Kirchheim + Co GmbH, Mainz, S 25–32
54. Landgraf R, Aberle J, Birkenfeld AL, Gallwitz B, Kellerer M, Klein H, Müller-Wieland D, Nauck MA, Reuter H-M, Siegel E (2019) Therapy of Type 2 Diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 127(S 01):S73-S92. doi:10.1055/a-1018-9106
55. Rutter GA, Georgiadou E, Martinez-Sanchez A, Pullen TJ (2020) Metabolic and functional specialisations of the pancreatic beta cell: gene disallowance, mitochondrial metabolism and intercellular connectivity. *Diabetologia* 63(10):1990–1998. doi:10.1007/s00125-020-05205-5
56. Tiedge M, Baltrusch S (2011) Der Blick in die Betazelle: neue Bildgebungstechniken in der Inselforschung. *Dtsch Med Wochenschr* 136(21):1130–1134. doi:10.1055/s-0031-1280525
57. Lacy PE (1967) The pancreatic beta cell. Structure and function. *N Engl J Med* 276(4):187–195. doi:10.1056/NEJM196701262760401

58. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren P-O, Caicedo A (2006) The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7):2334–2339. doi:10.1073/pnas.0510790103
59. Steiner DJ, Kim A, Miller K, Hara M (2010) Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets* 2(3):135–145. doi:10.4161/isl.2.3.11815
60. Stefan Y, Orci L, Malaisse-Lagae F, Perrelet A, Patel Y, Unger RH (1982) Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes* 31(8 Pt 1):694–700. doi:10.2337/diab.31.8.694
61. Giordano E, Bosco D, Cirulli V, Meda P (1991) Repeated glucose stimulation reveals distinct and lasting secretion patterns of individual rat pancreatic B cells. *J Clin Invest* 87(6):2178–2185. doi:10.1172/JCI115251
62. Dorrell C, Schug J, Canaday PS, Russ HA, Tarlow BD, Grompe MT, Horton T, Hebrok M, Streeter PR, Kaestner KH, Grompe M (2016) Human islets contain four distinct subtypes of β cells. *Nat Commun* 7:11756. doi:10.1038/ncomms11756
63. Newsholme P, Cruzat V, Arfuso F, Keane K (2014) Nutrient regulation of insulin secretion and action. *J Endocrinol* 221(3):R105–20. doi:10.1530/JOE-13-0616
64. ANDERSON E, LONG JA (1947) The effect of hyperglycemia on insulin secretion as determined with the isolated rat pancreas in a perfusion apparatus. *Endocrinology* 40(2):92–97. doi:10.1210/endo-40-2-92
65. Hellman B, Lernmark Å, Sehlin J, Täljedal I, Whistler RL (1973) The pancreatic β -cell recognition of insulin secretagogues—III. *Biochemical Pharmacology* 22(1):29–35. doi:10.1016/0006-2952(73)90251-7
66. Campbell JE, Newgard CB (2021) Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22(2):142–158. doi:10.1038/s41580-020-00317-7
67. Bedoya FJ, Wilson JM, Ghosh AK, Finegold D, Matschinsky FM (1986) The glucokinase glucose sensor in human pancreatic islet tissue. *Diabetes* 35(1):61–67. doi:10.2337/diab.35.1.61
68. Schmitt H, Lenzen S, Baltrusch S (2011) Glucokinase mediates coupling of glycolysis to mitochondrial metabolism but not to beta cell damage at high glucose exposure levels. *Diabetologia* 54(7):1744–1755. doi:10.1007/s00125-011-2133-5
69. Dean PM, Matthews EK (1968) Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature* 219(5152):389–390. doi:10.1038/219389a0
70. Sekine N, Cirulli V, Regazzi R, Brown LJ, Gine E, Tamarit-Rodriguez J, Girotti M, Marie S, MacDonald MJ, Wollheim CB (1994) Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol

- phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing. *J Biol Chem* 269(7):4895–4902. doi:10.1016/S0021-9258(17)37629-9
71. Dean PM, Matthews EK (1970) Electrical activity in pancreatic islet cells: effect of ions. *J Physiol* 210(2):265–275. doi:10.1113/jphysiol.1970.sp009208
72. Hedekov CJ (1980) Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiol Rev* 60(2):442–509. doi:10.1152/physrev.1980.60.2.442
73. Dahl G, Gratzl M Calcium-induced fusion of isolated secretory vesicles from the islet of Langerhans. *Cytobiologie - Zeitschrift für experimentelle Zellforschung* 1976(12):344–355
74. Grodsky GM (1972) A threshold distribution hypothesis for packet storage of insulin and its mathematical modeling. *J Clin Invest* 51(8):2047–2059. doi:10.1172/JCI107011
75. Bratanova-Tochkova TK, Cheng H, Daniel S, Gunawardana S, Liu Y-J, Mulvaney-Musa J, Schermerhorn T, Straub SG, Yajima H, Sharp GWG (2002) Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* 51 Suppl 1:S83-90. doi:10.2337/diabetes.51.2007.S83
76. Pørksen N (2002) The in vivo regulation of pulsatile insulin secretion. *Diabetologia* 45(1):3–20. doi:10.1007/s125-002-8240-x
77. Del Prato S, Marchetti P, Bonadonna RC (2002) Phasic insulin release and metabolic regulation in type 2 diabetes. *Diabetes* 51 Suppl 1:S109-16. doi:10.2337/diabetes.51.2007.S109
78. Eliasson L, Abdulkader F, Braun M, Galvanovskis J, Hoppa MB, Rorsman P (2008) Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. *J Physiol* 586(14):3313–3324. doi:10.1113/jphysiol.2008.155317
79. Rehner G, Daniel H (2010) *Biochemie der Ernährung*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg
80. Margulis L (1975) Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol* (29):21–38
81. Chinnery PF, Schon EA (2003) Mitochondria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74(9):1188–1199. doi:10.1136/jnnp.74.9.1188
82. Marom M, Azem A, Mokranjac D (2011) Understanding the molecular mechanism of protein translocation across the mitochondrial inner membrane: still a long way to go. *Biochim Biophys Acta* 1808(3):990–1001. doi:10.1016/j.bbamem.2010.07.011
83. PALADE GE (1953) An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* 1(4):188–211. doi:10.1177/1.4.188
84. Löffler G (2014) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin [u.a.]

85. Tielens AG, Rotte C, van Hellemond JJ, Martin W (2002) Mitochondria as we don't know them. *Trends in Biochemical Sciences* 27(11):564–572. doi:10.1016/S0968-0004(02)02193-X
86. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S (2006) Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* 16(14):R551-60. doi:10.1016/j.cub.2006.06.054
87. Bartolák-Suki E, Imsirovic J, Nishibori Y, Krishnan R, Suki B (2017) Regulation of Mitochondrial Structure and Dynamics by the Cytoskeleton and Mechanical Factors. *Int J Mol Sci* 18(8). doi:10.3390/ijms18081812
88. DEMPSEY EW (1956) Variations in the structure of mitochondria. *J Biophys Biochem Cytol* 2(4 Suppl):305–312. doi:10.1083/jcb.2.4.305
89. Frey TG, Mannella CA (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences* 25(7):319–324. doi:10.1016/S0968-0004(00)01609-1
90. Carvalho C, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI (2015) Alzheimer's disease and type 2 diabetes-related alterations in brain mitochondria, autophagy and synaptic markers. *Biochim Biophys Acta* 1852(8):1665–1675. doi:10.1016/j.bbadis.2015.05.001
91. Chattopadhyay M, Khemka VK, Chatterjee G, Ganguly A, Mukhopadhyay S, Chakrabarti S (2015) Enhanced ROS production and oxidative damage in subcutaneous white adipose tissue mitochondria in obese and type 2 diabetes subjects. *Mol Cell Biochem* 399(1-2):95–103. doi:10.1007/s11010-014-2236-7
92. Hesselink MKC, Schrauwen-Hinderling V, Schrauwen P (2016) Skeletal muscle mitochondria as a target to prevent or treat type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 12(11):633–645. doi:10.1038/nrendo.2016.104
93. Prasun P (2020) Role of mitochondria in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Metab Disord* 19(2):2017–2022. doi:10.1007/s40200-020-00679-x
94. Ritov VB, Menshikova EV, Azuma K, Wood R, Toledo FGS, Goodpaster BH, Ruderman NB, Kelley DE (2010) Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(1):E49-58. doi:10.1152/ajpendo.00317.2009.
95. Choo H-J, Kim J-H, Kwon O-B, Lee CS, Mun JY, Han SS, Yoon Y-S, Yoon G, Choi K-M, Ko Y-G (2006) Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. *Diabetologia* 49(4):784–791. doi:10.1007/s00125-006-0170-2
96. Szendroedi J, Phielix E, Roden M (2011) The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 8(2):92–103. doi:10.1038/nrendo.2011.138

97. 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(5622):1140–1142. doi:10.1126/science.1082889
98. Patti M-E, Corvera S (2010) The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 31(3):364–395. doi:10.1210/er.2009-0027
99. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI (2004) Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 350(7):664–671. doi:10.1056/NEJMoa031314
100. Pravenec M, Hyakukoku M, Houstek J, Zidek V, Landa V, Mlejnek P, Miksik I, Dudová-Mothejzikova K, Pecina P, Vrbacky M, Drahota Z, Vojtiskova A, Mracek T, Kazdova L, Oliyarnyk O, Wang J, Ho C, Qi N, Sugimoto K, Kurtz T (2007) Direct linkage of mitochondrial genome variation to risk factors for type 2 diabetes in conplastic strains. *Genome Res* 17(9):1319–1326. doi:10.1101/gr.6548207
101. Park K-S, Wiederkehr A, Kirkpatrick C, Mattenberger Y, Martinou J-C, 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* 283(48):33347–33356. doi:10.1074/jbc.M806251200
102. Stiles L, Shrihai OS (2012) Mitochondrial dynamics and morphology in beta-cells. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26(6):725–738. doi:10.1016/j.beem.2012.05.004
103. Boldogh IR, Pon LA (2006) Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1763(5-6):450–462. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.02.014
104. Twig G, Elorza A, Molina AJA, 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, Shrihai OS (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 27(2):433–446. doi:10.1038/sj.emboj.7601963
105. Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, Hernandez-Mijares A, Rocha M, Victor VM (2017) Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biol* 11:637–645. doi:10.1016/j.redox.2017.01.013
106. Rambold AS, Kostecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J (2011) Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(25):10190–10195. doi:10.1073/pnas.1107402108
107. Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, Rossignol R (2007) Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci* 120(Pt 5):838–848. doi:10.1242/jcs.03381

108. Liesa M, Shirihai OS (2013) Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab* 17(4):491–506. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.002
109. Moore TM, Zhou Z, Cohn W, Norheim F, Lin AJ, Kalajian N, Strumwasser AR, Cory K, Whitney K, Ho T, Ho T, Lee JL, Rucker DH, Shirihai O, van der Bliek AM, Whitelegge JP, Seldin MM, Lusis AJ, Lee S, Drevon CA, Mahata SK, Turcotte LP, Hevener AL (2019) The impact of exercise on mitochondrial dynamics and the role of Drp1 in exercise performance and training adaptations in skeletal muscle. *Mol Metab* 21:51–67. doi:10.1016/j.molmet.2018.11.012
110. Sebastián D, Palacín M, Zorzano A (2017) Mitochondrial Dynamics: Coupling Mitochondrial Fitness with Healthy Aging. *Trends Mol Med* 23(3):201–215. doi:10.1016/j.molmed.2017.01.003
111. Sebastián D, Soriano E, Segalés J, Irazoki A, Ruiz-Bonilla V, Sala D, Planet E, Berenguer-Llgero A, Muñoz JP, Sánchez-Feutrie M, Plana N, Hernández-Álvarez MI, Serrano AL, Palacín M, Zorzano A (2016) Mfn2 deficiency links age-related sarcopenia and impaired autophagy to activation of an adaptive mitophagy pathway. *EMBO J* 35(15):1677–1693. doi:10.15252/embj.201593084
112. Marzetti E, Calvani R, Cesari M, Buford TW, Lorenzi M, Behnke BJ, Leeuwenburgh C (2013) Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling pathways to clinical trials. *Int J Biochem Cell Biol* 45(10):2288–2301. doi:10.1016/j.biocel.2013.06.024
113. Crane JD, Devries MC, Safdar A, Hamadeh MJ, Tarnopolsky MA (2010) The effect of aging on human skeletal muscle mitochondrial and intramyocellular lipid ultrastructure. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65(2):119–128. doi:10.1093/gerona/glp179
114. Whitley BN, Engelhart EA, Hoppins S (2019) Mitochondrial dynamics and their potential as a therapeutic target. *Mitochondrion* 49:269–283. doi:10.1016/j.mito.2019.06.002
115. Jheng H-F, Tsai P-J, Guo S-M, Kuo L-H, Chang C-S, Su I-J, Chang C-R, Tsai Y-S (2012) Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 32(2):309–319. doi:10.1128/MCB.05603-11
116. Suárez-Rivero JM, Villanueva-Paz M, La Cruz-Ojeda P de, La Mata M de, Cotán D, Oropesa-Ávila M, Lavera I de, Álvarez-Córdoba M, Luzón-Hidalgo R, Sánchez-Alcázar JA (2016) Mitochondrial Dynamics in Mitochondrial Diseases. *Diseases* 5(1). doi:10.3390/diseases5010001
117. Whitley BN, Lam C, Cui H, Haude K, Bai R, Escobar L, Hamilton A, Brady L, Tarnopolsky MA, Dengle L, Picker J, Lincoln S, Lackner LL, Glass IA, Hoppins S (2018) Aberrant Drp1-mediated mitochondrial division presents in humans with variable outcomes. *Hum Mol Genet* 27(21):3710–3719. doi:10.1093/hmg/ddy287
118. Yapa NMB, Lisnyak V, Reljic B, Ryan MT (2021) Mitochondrial dynamics in health and disease. *FEBS Lett* 595(8):1184–1204. doi:10.1002/1873-3468.14077

119. Gao S, Hu J (2021) Mitochondrial Fusion: The Machineries In and Out. *Trends Cell Biol* 31(1):62–74. doi:10.1016/j.tcb.2020.09.008
120. Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS, Wissinger B (2000) OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 26(2):211–215. doi:10.1038/79944
121. Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe P de, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schröder JM, Vance JM, Battaloglu E (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36(5):449–451. doi:10.1038/ng1341
122. Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM, Chan DC (2010) Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 141(2):280–289. doi:10.1016/j.cell.2010.02.026
123. 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(2):189–200. doi:10.1083/jcb.200211046
124. Chen H, Chomyn A, Chan DC (2005) Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 280(28):26185–26192. doi:10.1074/jbc.M503062200
125. Song Z, Ghochani M, McCaffery JM, Frey TG, Chan DC (2009) Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol Biol Cell* 20(15):3525–3532. doi:10.1091/mbc.e09-03-0252
126. Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, Lenaers G (2003) Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 278(10):7743–7746. doi:10.1074/jbc.C200677200
127. Meeusen S, McCaffery JM, Nunnari J (2004) Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 305(5691):1747–1752. doi:10.1126/science.1100612
128. Cartoni R, Léger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, Ziltener J-L, Luthi F, Dériaz O, Zorzano A, Gobelet C, Kralli A, Russell AP (2005) Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol* 567(Pt 1):349–358. doi:10.1113/jphysiol.2005.092031
129. Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Daugaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacín M, Vidal H, Rivera F, Brand M, Zorzano A (2003) Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and

- mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* 278(19):17190–17197. doi:10.1074/jbc.M212754200
130. Sebastián D, Hernández-Alvarez MI, Segalés J, Sorianello E, Muñoz JP, Sala D, Waget A, Liesa M, Paz JC, Gopalacharyulu P, Orešič M, Pich S, Burcelin R, Palacín M, Zorzano A (2012) Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(14):5523–5528. doi:10.1073/pnas.1108220109
131. Yakes FM, van Houten B (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(2):514–519. doi:10.1073/pnas.94.2.514
132. Elgass K, Pakay J, Ryan MT, Palmer CS (2013) Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta* 1833(1):150–161. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.05.002
133. Parone PA, Da Cruz S, Tondera D, Mattenberger Y, James DI, Maechler P, Barja F, Martinou J-C (2008) Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One* 3(9):e3257. doi:10.1371/journal.pone.0003257
134. Otera H, Ishihara N, Mihara K (2013) New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta* 1833(5):1256–1268. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.02.002
135. Kraus F, Roy K, Pucadyil TJ, Ryan MT (2021) Function and regulation of the divisome for mitochondrial fission. *Nature* 590(7844):57–66. doi:10.1038/s41586-021-03214-x
136. Griffin EE, Graumann J, Chan DC (2005) The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J Cell Biol* 170(2):237–248. doi:10.1083/jcb.200503148
137. Tieu Q, Okreglak V, Naylor K, Nunnari J (2002) The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J Cell Biol* 158(3):445–452. doi:10.1083/jcb.200205031
138. Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, Mihara K (2010) Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* 191(6):1141–1158. doi:10.1083/jcb.201007152
139. Gandre-Babbe S, van der Bliek AM (2008) The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 19(6):2402–2412. doi:10.1091/mbc.E07-12-1287
140. Palmer CS, Osellame LD, Laine D, Koutsopoulos OS, Frazier AE, Ryan MT (2011) MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep* 12(6):565–573. doi:10.1038/embor.2011.54

141. Samangouei P, Crespo-Avilan GE, Cabrera-Fuentes H, Hernández-Reséndiz S, Ismail NI, Katwadi KB, Boisvert WA, Hausenloy DJ (2018) MiD49 and MiD51: New mediators of mitochondrial fission and novel targets for cardioprotection. *Cond Med* 1(5):239–246
142. Palmer CS, Elgass KD, Parton RG, Osellame LD, Stojanovski D, Ryan MT (2013) Adaptor proteins MiD49 and MiD51 can act independently of Mff and Fis1 in Drp1 recruitment and are specific for mitochondrial fission. *J Biol Chem* 288(38):27584–27593. doi:10.1074/jbc.M113.479873
143. Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK (2011) ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334(6054):358–362. doi:10.1126/science.1207385
144. Rowland AA, Voeltz GK (2012) Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(10):607–625. doi:10.1038/nrm3440
145. Ingeman E, Perkins EM, Marino M, Mears JA, McCaffery JM, Hinshaw JE, Nunnari J (2005) Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* 170(7):1021–1027. doi:10.1083/jcb.200506078
146. Mears JA, Lackner LL, Fang S, Ingeman E, Nunnari J, Hinshaw JE (2011) Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat Struct Mol Biol* 18(1):20–26. doi:10.1038/nsmb.1949
147. Estaquier J, Arnoult D (2007) Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell Death Differ* 14(6):1086–1094. doi:10.1038/sj.cdd.4402107
148. Youle RJ, Karbowski M (2005) Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(8):657–663. doi:10.1038/nrm1697
149. Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN, van der Bliek AM (1998) A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* 143(2):351–358. doi:10.1083/jcb.143.2.351
150. Yoon Y, Pitts KR, Dahan S, McNiven MA (1998) A novel dynamin-like protein associates with cytoplasmic vesicles and tubules of the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *J Cell Biol* 140(4):779–793. doi:10.1083/jcb.140.4.779
151. Koch B, Traven A (2019) Mdivi-1 and mitochondrial fission: recent insights from fungal pathogens. *Curr Genet* 65(4):837–845. doi:10.1007/s00294-019-00942-6
152. Waterham HR, Koster J, van Roermund CWT, Mooyer PAW, Wanders RJA, Leonard JV (2007) A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N Engl J Med* 356(17):1736–1741. doi:10.1056/NEJMoa064436
153. Ishihara N, Nomura M, Jofuku A, Kato H, Suzuki SO, Masuda K, Otera H, Nakanishi Y, Nonaka I, Goto Y-I, Taguchi N, Morinaga H, Maeda M, Takayanagi R, Yokota S, Mihara K (2009)

- Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol* 11(8):958–966. doi:10.1038/ncb1907
154. van der Bliek AM (1999) Functional diversity in the dynamin family. *Trends Cell Biol* 9(3):96–102. doi:10.1016/S0962-8924(98)01490-1
155. Haun F, Nakamura T, Lipton SA (2013) Dysfunctional Mitochondrial Dynamics in the Pathophysiology of Neurodegenerative Diseases. *J Cell Death* 6:27–35. doi:10.4137/JCD.S10847
156. Bui HT, Karren MA, Bhar D, Shaw JM (2012) A novel motif in the yeast mitochondrial dynamin Dnm1 is essential for adaptor binding and membrane recruitment. *J Cell Biol* 199(4):613–622. doi:10.1083/jcb.201207079
157. Kalia R, Wang RY-R, Yusuf A, Thomas PV, Agard DA, Shaw JM, Frost A (2018) Structural basis of mitochondrial receptor binding and constriction by DRP1. *Nature* 558(7710):401–405. doi:10.1038/s41586-018-0211-2
158. Yoon Y, Pitts KR, McNiven MA (2001) Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. *Mol Biol Cell* 12(9):2894–2905. doi:10.1091/mbc.12.9.2894
159. Fukushima NH, Brisch E, Keegan BR, Bleazard W, Shaw JM (2001) The GTPase effector domain sequence of the Dnm1p GTPase regulates self-assembly and controls a rate-limiting step in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell* 12(9):2756–2766. doi:10.1091/mbc.12.9.2756
160. Basu K, Lajoie D, Aumentado-Armstrong T, Chen J, Koning RI, Bossy B, Bostina M, Sik A, Bossy-Wetzel E, Rouiller I (2017) Molecular mechanism of DRP1 assembly studied in vitro by cryo-electron microscopy. *PLoS One* 12(6):e0179397. doi:10.1371/journal.pone.0179397
161. Chang C-R, Blackstone C (2010) Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann N Y Acad Sci* 1201:34–39. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05629.x
162. Santel A, Frank S (2008) Shaping mitochondria: The complex posttranslational regulation of the mitochondrial fission protein DRP1. *IUBMB Life* 60(7):448–455. doi:10.1002/iub.71
163. Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K (2007) Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 282(15):11521–11529. doi:10.1074/jbc.M607279200
164. van der Bliek AM, Redelmeier TE, Damke H, Tisdale EJ, Meyerowitz EM, Schmid SL (1993) Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol* 122(3):553–563. doi:10.1083/jcb.122.3.553
165. Macdonald PJ, Francy CA, Stepanyants N, Lehman L, Baglio A, Mears JA, Qi X, Ramachandran R (2016) Distinct Splice Variants of Dynamin-related Protein 1 Differentially Utilize Mitochondrial

- Fission Factor as an Effector of Cooperative GTPase Activity. *J Biol Chem* 291(1):493–507. doi:10.1074/jbc.M115.680181
166. Itoh K, Adachi Y, Yamada T, Suzuki TL, Otomo T, McBride HM, Yoshimori T, Iijima M, Sesaki H (2018) A brain-enriched Drp1 isoform associates with lysosomes, late endosomes, and the plasma membrane. *J Biol Chem* 293(30):11809–11822. doi:10.1074/jbc.RA117.001253
167. Li H, Alavian KN, Lazrove E, Mehta N, Jones A, Zhang P, Licznarski P, Graham M, Uo T, Guo J, Rahner C, Duman RS, Morrison RS, Jonas EA (2013) A Bcl-xL-Drp1 complex regulates synaptic vesicle membrane dynamics during endocytosis. *Nat Cell Biol* 15(7):773–785. doi:10.1038/ncb2791
168. Ikeda Y, Shirakabe A, Maejima Y, Zhai P, Sciarretta S, Toli J, Nomura M, Mihara K, Egashira K, Ohishi M, Abdellatif M, Sadoshima J (2015) Endogenous Drp1 mediates mitochondrial autophagy and protects the heart against energy stress. *Circ Res* 116(2):264–278. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303356.
169. Grohm J, Kim S-W, Mamrak U, Tobaben S, Cassidy-Stone A, Nunnari J, Plesnila N, Culmsee C (2012) Inhibition of Drp1 provides neuroprotection in vitro and in vivo. *Cell Death Differ* 19(9):1446–1458. doi:10.1038/cdd.2012.18;
170. Hennings TG, Chopra DG, DeLeon ER, VanDeusen HR, Sesaki H, Merrins MJ, Ku GM (2018) In Vivo Deletion of β -Cell Drp1 Impairs Insulin Secretion Without Affecting Islet Oxygen Consumption. *Endocrinology* 159(9):3245–3256. doi:10.1210/en.2018-00445
171. Kabra UD, Pfuhlmann K, Migliorini A, Keipert S, Lamp D, Korsgren O, Gegg M, Woods SC, Pfluger PT, Lickert H, Affouret C, Tschöp MH, Jastroch M (2017) Direct Substrate Delivery Into Mitochondrial Fission-Deficient Pancreatic Islets Rescues Insulin Secretion. *Diabetes* 66(5):1247–1257. doi:10.2337/db16-1088
172. Lin J-R, Shen W-L, Yan C, Gao P-J (2015) Downregulation of dynamin-related protein 1 contributes to impaired autophagic flux and angiogenic function in senescent endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35(6):1413–1422. doi:10.1161/ATVBAHA.115.305706.
173. Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingeman E, Song C, Yoo C, Kuwana T, Kurth MJ, Shaw JT, Hinshaw JE, Green DR, Nunnari J (2008) Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev Cell* 14(2):193–204. doi:10.1016/j.devcel.2007.11.019
174. Wu D, Dasgupta A, Chen K-H, Neuber-Hess M, Patel J, Hurst TE, Mewburn JD, Lima PDA, Alizadeh E, Martin A, Wells M, Snieckus V, Archer SL (2020) Identification of novel dynamin-related protein 1 (Drp1) GTPase inhibitors: Therapeutic potential of Drpitor1 and Drpitor1a in cancer and cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 34(1):1447–1464. doi:10.1096/fj.201901467R

175. Duan C, Wang L, Zhang J, Xiang X, Wu Y, Zhang Z, Li Q, Tian K, Xue M, Liu L, Li T (2020) Mdivi-1 attenuates oxidative stress and exerts vascular protection in ischemic/hypoxic injury by a mechanism independent of Drp1 GTPase activity. *Redox Biol* 37:101706. doi:10.1016/j.redox.2020.101706
176. Rosdah AA, K Holien J, Delbridge LMD, Dusting GJ, Lim SY (2016) Mitochondrial fission - a drug target for cytoprotection or cytodestruction? *Pharmacol Res Perspect* 4(3):e00235. doi:10.1002/prp2.235
177. Ciarlo L, Vona R, Manganelli V, Gambardella L, Raggi C, Marconi M, Malorni W, Sorice M, Garofalo T, Matarrese P (2018) Recruitment of mitofusin 2 into "lipid rafts" drives mitochondria fusion induced by Mdivi-1. *Oncotarget* 9(27):18869–18884. doi:10.18632/oncotarget.24792
178. Bordt EA, Clerc P, Roelofs BA, Saladino AJ, Tretter L, Adam-Vizi V, Cherok E, Khalil A, Yadava N, Ge SX, Francis TC, Kennedy NW, Picton LK, Kumar T, Uppuluri S, Miller AM, Itoh K, Karbowski M, Sesaki H, Hill RB, Polster BM (2017) The Putative Drp1 Inhibitor mdivi-1 Is a Reversible Mitochondrial Complex I Inhibitor that Modulates Reactive Oxygen Species. *Dev Cell* 40(6):583–594.e6. doi:10.1016/j.devcel.2017.02.020
179. Smith G, Gallo G (2017) To mdivi-1 or not to mdivi-1: Is that the question? *Dev Neurobiol* 77(11):1260–1268. doi:10.1002/dneu.22519
180. Ruiz A, Alberdi E, Matute C (2018) Mitochondrial Division Inhibitor 1 (mdivi-1) Protects Neurons against Excitotoxicity through the Modulation of Mitochondrial Function and Intracellular Ca²⁺ Signaling. *Front Mol Neurosci* 11:3. doi:10.3389/fnmol.2018.00003
181. Manczak M, Kandimalla R, Yin X, Reddy PH (2019) Mitochondrial division inhibitor 1 reduces dynamin-related protein 1 and mitochondrial fission activity. *Hum Mol Genet* 28(2):177–199. doi:10.1093/hmg/ddy335
182. Numadate A, Mita Y, Matsumoto Y, Fujii S, Hashimoto Y (2014) Development of 2-thioxoquinazoline-4-one derivatives as dual and selective inhibitors of dynamin-related protein 1 (Drp1) and puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA). *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 62(10):979–988. doi:10.1248/cpb.c14-00333
183. Kim S, Kim C, Park S (2017) Mdivi-1 Protects Adult Rat Hippocampal Neural Stem Cells against Palmitate-Induced Oxidative Stress and Apoptosis. *Int J Mol Sci* 18(9). doi:10.3390/ijms18091947
184. Lin H-Y, Weng S-W, Chang Y-H, Su Y-J, Chang C-M, Tsai C-J, Shen F-C, Chuang J-H, Lin T-K, Liou C-W, Lin C-Y, Wang P-W (2018) The Causal Role of Mitochondrial Dynamics in Regulating Insulin Resistance in Diabetes: Link through Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Oxid Med Cell Longev* 2018:7514383. doi:10.1155/2018/7514383

185. Wang Q, Zhang M, Torres G, Wu S, Ouyang C, Xie Z, Zou M-H (2017) Metformin Suppresses Diabetes-Accelerated Atherosclerosis via the Inhibition of Drp1-Mediated Mitochondrial Fission. *Diabetes* 66(1):193–205. doi:10.2337/db16-0915
186. Kugler BA, Deng W, Duguay AL, Garcia JP, Anderson MC, Nguyen PD, Houmard JA, Zou K (2021) Pharmacological inhibition of dynamin-related protein 1 attenuates skeletal muscle insulin resistance in obesity. *Physiol Rep* 9(7):e14808. doi:10.14814/phy2.14808
187. Dai W, Wang G, Chwa J, Oh ME, Abeywardana T, Yang Y, Wang QA, Jiang L (2020) Mitochondrial division inhibitor (mdivi-1) decreases oxidative metabolism in cancer. *Br J Cancer* 122(9):1288–1297. doi:10.1038/s41416-020-0778-x
188. Koch B, Barugahare AA, Lo TL, Huang C, Schittenhelm RB, Powell DR, Beilharz TH, Traven A (2018) A Metabolic Checkpoint for the Yeast-to-Hyphae Developmental Switch Regulated by Endogenous Nitric Oxide Signaling. *Cell Rep* 25(8):2244–2258.e7. doi:10.1016/j.celrep.2018.10.080
189. Da Zhang, Liu Y, Tang Y, Wang X, Li Z, Li R, Ti Z, Gao W, Bai J, Lv Y (2018) Increased mitochondrial fission is critical for hypoxia-induced pancreatic beta cell death. *PLoS One* 13(5):e0197266. doi:10.1371/journal.pone.0197266
190. Miyazaki J, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T, Shibasaki Y, Oka Y, Yamamura K (1990) Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* 127(1):126–132. doi:10.1210/endo-127-1-126
191. Ishihara H, Asano T, Tsukuda K, Katagiri H, Inukai K, Anai M, Kikuchi M, Yazaki Y, Miyazaki JI, Oka Y (1993) Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia* 36(11):1139–1145. doi:10.1007/BF00401058
192. Schrödel A (2010) Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer. *Biologie in unserer Zeit* 40(5):298. doi:10.1002/biuz.201090074
193. Kim H, Lee JY, Park KJ, Kim W-H, Roh GS (2016) A mitochondrial division inhibitor, Mdivi-1, inhibits mitochondrial fragmentation and attenuates kainic acid-induced hippocampal cell death. *BMC Neurosci* 17(1):33. doi:10.1186/s12868-016-0270-y
194. Lee H, Ha TY, Jung CH, Nirmala FS, Park S-Y, Huh YH, Ahn J (2021) Mitochondrial dysfunction in skeletal muscle contributes to the development of acute insulin resistance in mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 12(6):1925–1939. doi:10.1002/jcsm.12794
195. Hu Y, Zhou Y, Yang Y, Tang H, Si Y, Chen Z, Shi Y, Fang H (2022) Metformin Protects Against Diabetes-Induced Cognitive Dysfunction by Inhibiting Mitochondrial Fission Protein DRP1. *Front Pharmacol* 13:832707. doi:10.3389/fphar.2022.832707

196. Rong R, Xia X, Peng H, Li H, You M, Liang Z, Yao F, Yao X, Xiong K, Huang J, Zhou R, Ji D (2020) Cdk5-mediated Drp1 phosphorylation drives mitochondrial defects and neuronal apoptosis in radiation-induced optic neuropathy. *Cell Death Dis* 11(9):720. doi:10.1038/s41419-020-02922-y
197. Wan Y-Y, Zhang J-F, Yang Z-J, Jiang L-P, Wei Y-F, Lai Q-N, Wang J-B, Xin H-B, Han X-J (2014) Involvement of Drp1 in hypoxia-induced migration of human glioblastoma U251 cells. *Oncol Rep* 32(2):619–626. doi:10.3892/or.2014.3235
198. Courtois S, Luxán-Delgado B de, Penin-Peyta L, Royo-García A, Parejo-Alonso B, Jagust P, Alcalá S, Rubiolo JA, Sánchez L, Sainz B, Heeschen C, Sancho P (2021) Inhibition of mitochondrial dynamics preferentially targets pancreatic cancer cells with enhanced tumorigenic and invasive potential
199. Luo Z, Wang J, Tang S, Zheng Y, Zhou X, Tian F, Xu Z (2020) Dynamic-related protein 1 inhibitor eases epileptic seizures and can regulate equilibrative nucleoside transporter 1 expression. *BMC Neurol* 20(1):353. doi:10.1186/s12883-020-01921-y
200. Bordt EA, Zhang N, Waddell J, Polster BM (2022) The Non-Specific Drp1 Inhibitor Mdivi-1 Has Modest Biochemical Antioxidant Activity. *Antioxidants (Basel)* 11(3). doi:10.3390/antiox11030450
201. Yin J, Guo J, Zhang Q, Cui L, Zhang L, Zhang T, Zhao J, Li J, Middleton A, Carmichael PL, Peng S (2018) Doxorubicin-induced mitophagy and mitochondrial damage is associated with dysregulation of the PINK1/parkin pathway. *Toxicol In Vitro* 51:1–10. doi:10.1016/j.tiv.2018.05.001
202. Liu X, Song L, Yu J, Huang F, Li Y, Ma C (2022) Mdivi-1: a promising drug and its underlying mechanisms in the treatment of neurodegenerative diseases. *Histol Histopathol* 37(6):505–512. doi:10.14670/HH-18-443
203. Jhun BS, Lee H, Jin Z-G, Yoon Y (2013) Glucose stimulation induces dynamic change of mitochondrial morphology to promote insulin secretion in the insulinoma cell line INS-1E. *PLoS One* 8(4):e60810. doi:10.1371/journal.pone.0060810
204. Parra V, Bravo-Sagua R, Norambuena-Soto I, Hernández-Fuentes CP, Gómez-Contreras AG, Verdejo HE, Mellado R, Chiong M, Lavandero S, Castro PF (2017) Inhibition of mitochondrial fission prevents hypoxia-induced metabolic shift and cellular proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863(11):2891–2903. doi:10.1016/j.bbadis.2017.07.018
205. Jia Y, Zhou L, Tian C, Shi Y, Wang C, Tong Z (2015) Dynamin-related protein 1 is involved in micheliolide-induced breast cancer cell death. *Onco Targets Ther* 8:3371–3381. doi:10.2147/OTT.S91805

206. Möpert K, Hajek P, Frank S, Chen C, Kaufmann J, Santel A (2009) Loss of Drp1 function alters OPA1 processing and changes mitochondrial membrane organization. *Exp Cell Res* 315(13):2165–2180. doi:10.1016/j.yexcr.2009.04.016
207. Osellame LD, Singh AP, Stroud DA, Palmer CS, Stojanovski D, Ramachandran R, Ryan MT (2016) Cooperative and independent roles of the Drp1 adaptors Mff, MiD49 and MiD51 in mitochondrial fission. *J Cell Sci* 129(11):2170–2181. doi:10.1242/jcs.185165
208. Nasca A, Nardecchia F, Commone A, Semeraro M, Legati A, Garavaglia B, Ghezzi D, Leuzzi V (2018) Clinical and Biochemical Features in a Patient With Mitochondrial Fission Factor Gene Alteration. *Front Genet* 9. doi:10.3389/fgene.2018.00625
209. Wu K, Mao Y, Chen Q, Zhang B, Zhang S, Wu H, Li Y (2021) Hypoxia-induced ROS promotes mitochondrial fission and cisplatin chemosensitivity via HIF-1 α /Mff regulation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cell Oncol*. 44(5):1167–1181. doi:10.1007/s13402-021-00629-6
210. Passmore JB, Carmichael RE, Schrader TA, Godinho LF, Ferdinandusse S, Lismont C, Wang Y, Hacker C, Islinger M, Fransen M, Richards DM, Freisinger P, Schrader M (2020) Mitochondrial fission factor (MFF) is a critical regulator of peroxisome maturation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1867(7):118709. doi:10.1016/j.bbamcr.2020.118709
211. Anello M, Lupi R, Spampinato D, Piro S, Masini M, Boggi U, Del Prato S, Rabuazzo AM, Purrello F, Marchetti P (2005) Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 48(2):282–289. doi:10.1007/s00125-004-1627-9
212. Edwards JL, Quattrini A, Lentz SI, Figueroa-Romero C, Cerri F, Backus C, Hong Y, Feldman EL (2010) Diabetes regulates mitochondrial biogenesis and fission in mouse neurons. *Diabetologia* 53(1):160–169. doi:10.1007/s00125-009-1553-y
213. Nakada K, Inoue K, Ono T, Isobe K, Ogura A, Goto YI, Nonaka I, Hayashi JI (2001) Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med* 7(8):934–940. doi:10.1038/90976
214. Yoneda M, Miyatake T, Attardi G (1994) Complementation of mutant and wild-type human mitochondrial DNAs coexisting since the mutation event and lack of complementation of DNAs introduced separately into a cell within distinct organelles. *Mol Cell Biol* 14(4):2699–2712. doi:10.1128/mcb.14.4.2699-2712.1994
215. Szabadkai G, Simoni AM, Chami M, Wieckowski MR, Youle RJ, Rizzuto R (2004) Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca²⁺ waves and protects against Ca²⁺-mediated apoptosis. *Mol Cell* 16(1):59–68. doi:10.1016/j.molcel.2004.09.026

216. Cho HM, Ryu JR, Jo Y, Seo TW, Choi YN, Kim JH, Chung JM, Cho B, Kang HC, Yu S-W, Yoo SJ, Kim H, Sun W (2019) Drp1-Zip1 Interaction Regulates Mitochondrial Quality Surveillance System. *Mol Cell* 73(2):364-376.e8. doi:10.1016/j.molcel.2018.11.009
217. Suzuki-Karasaki Y, Fujiwara K, Saito K, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T, Soma M (2015) Distinct effects of TRAIL on the mitochondrial network in human cancer cells and normal cells: role of plasma membrane depolarization. *Oncotarget* 6(25):21572–21588. doi:10.18632/oncotarget.4268
218. Wikstrom JD, Katzman SM, Mohamed H, Twig G, Graf SA, Heart E, Molina AJA, Corkey BE, Vargas LM de, Danial NN, Collins S, Shirihai OS (2007) beta-Cell mitochondria exhibit membrane potential heterogeneity that can be altered by stimulatory or toxic fuel levels. *Diabetes* 56(10):2569–2578. doi:10.2337/db06-0757.
219. Kim B, Kim J-S, Yoon Y, Santiago MC, Brown MD, Park J-Y (2013) Inhibition of Drp1-dependent mitochondrial division impairs myogenic differentiation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 305(8):R927-38. doi:10.1152/ajpregu.00502.2012.
220. Zepeda R, Kuzmich J, Parra V, Troncoso R, Pennanen C, Riquelme JA, Pedrozo Z, Chiong M, Sánchez G, Lavandero S (2014) Drp1 loss-of-function reduces cardiomyocyte oxygen dependence protecting the heart from ischemia-reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 63(6):477–487. doi:10.1097/FJC.0000000000000071
221. Las G, Serada SB, Wikstrom JD, Twig G, Shirihai OS (2011) Fatty acids suppress autophagic turnover in β -cells. *J Biol Chem* 286(49):42534–42544. doi:10.1074/jbc.M111.242412
222. Touvier T, Palma C de, Rigamonti E, Scagliola A, Incerti E, Mazelin L, Thomas J-L, D'Antonio M, Politi L, Schaeffer L, Clementi E, Brunelli S (2015) Muscle-specific Drp1 overexpression impairs skeletal muscle growth via translational attenuation. *Cell Death Dis* 6(2):e1663. doi:10.1038/cddis.2014.595
223. Kabra UD, Moruzzi N, Berggren P-O, Jastroch M (2022) Drp1 Overexpression Decreases Insulin Content in Pancreatic MIN6 Cells. *Int J Mol Sci* 23(20). doi:10.3390/ijms232012338
224. Aishwarya R, Alam S, Abdullah CS, Morshed M, Nitu SS, Panchatcharam M, Miriyala S, Kevil CG, Bhuiyan MS (2020) Pleiotropic effects of mdivi-1 in altering mitochondrial dynamics, respiration, and autophagy in cardiomyocytes. *Redox Biol* 36:101660. doi:10.1016/j.redox.2020.101660
225. Zhou Y, Long D, Zhao Y, Li S, Liang Y, Wan L, Zhang J, Xue F, Feng L (2022) Oxidative stress-mediated mitochondrial fission promotes hepatic stellate cell activation via stimulating oxidative phosphorylation. *Cell Death Dis* 13(8):689. doi:10.1038/s41419-022-05088-x
226. Zheng Q, Zhao Y, Guo J, Zhao S, Fei C, Xiao C, Wu D, Wu L, Li X, Chang C (2018) Iron overload promotes mitochondrial fragmentation in mesenchymal stromal cells from myelodysplastic

- syndrome patients through activation of the AMPK/MFF/Drp1 pathway. *Cell Death Dis* 9(5):515. doi:10.1038/s41419-018-0552-7
227. Bertola N, Bruno S, Capanni C, Columbaro M, Mazzarello AN, Corsolini F, Regis S, Degan P, Cappelli E, Ravera S (2023) Altered Mitochondrial Dynamic in Lymphoblasts and Fibroblasts Mutated for FANCA-A Gene: The Central Role of DRP1. *Int J Mol Sci* 24(7). doi:10.3390/ijms24076557
228. Bras M, Yuste VJ, Roué G, Barbier S, Sancho P, Virely C, Rubio M, Baudet S, Esquerda JE, Merle-Béral H, Sarfati M, Susin SA (2007) Drp1 mediates caspase-independent type III cell death in normal and leukemic cells. *Mol Cell Biol* 27(20):7073–7088. doi:10.1128/MCB.02116-06
229. Kornfeld OS, Qvit N, Haileselassie B, Shamloo M, Bernardi P, Mochly-Rosen D (2018) Interaction of mitochondrial fission factor with dynamin related protein 1 governs physiological mitochondrial function in vivo. *Sci Rep* 8(1):14034. doi:10.1038/s41598-018-32228-1
230. Liu J-M, Yi Z, Liu S-Z, Chang J-H, Dang X-B, Li Q-Y, Zhang Y-L (2015) The mitochondrial division inhibitor mdivi-1 attenuates spinal cord ischemia-reperfusion injury both in vitro and in vivo: Involvement of BK channels. *Brain Res* 1619:155–165. doi:10.1016/j.brainres.2015.03.033
231. Kim K-Y, Perkins GA, Shim MS, Bushong E, Alcasid N, Ju S, Ellisman MH, Weinreb RN, Ju W-K (2015) DRP1 inhibition rescues retinal ganglion cells and their axons by preserving mitochondrial integrity in a mouse model of glaucoma. *Cell Death Dis* 6(8):e1839. doi:10.1038/cddis.2015.180
232. Matschinsky FM (1990) Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 39(6):647–652. doi:10.2337/diab.39.6.647

VII. Eigenständigkeitserklärung

Hiermit bestätigte ich, dass ich die hier vorliegende Dissertation zur Erlangung des mathematisch naturwissenschaftlichen Doktorgrades an der Universität Rostock selbst und ohne unzulässige Zuhilfenahme Dritter verfasst und erstellt habe. Ich bestätige keine anderen, als die im Literaturverzeichnis hinterlegten Quellen für die Erstellung verwendet und die vorliegende Arbeit in keinem anderen Promotionsverfahren vorgelegt zu haben. Weiterhin bin ich damit einverstanden, dass die hier vorliegende Promotionsarbeit veröffentlicht wird.

Rostock, 19. Dezember 2023

.....

Magdalena Otte

VIII. Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Simone Baltrusch, die mir überhaupt ein Forschungsprojekt in diesem Bereich ermöglichte und mich kontinuierlich bei der Bearbeitung unterstützte. Ich möchte mich bedanken für die gute Betreuung und Begleitung und die zahlreichen hilfreichen Hinweise.

Weiterhin möchte ich mich auch bei unserem Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. Markus Tiedge bedanken, der mir die Möglichkeit gab, meine Doktorarbeit am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universitätsmedizin Rostock anfertigen zu können.

Ein besonderer Dank gilt außerdem Frau Dr. Schultz, die mich bei dem Projekt an die Hand genommen und tatkräftig begleitet hat. Außerdem Frau Dr. Cindy Zehm und Dr. Anja Schaeper nicht nur als liebevolle Kolleginnen, sondern auch als Ansprechpartnerinnen für meine Korrekturen. Bei Claudia Fahle und Kathleen Arndt möchte ich mich für die herausragende Zusammenarbeit in jedem Bereich und die gemeinsame Zeit im besten Labor-Büro Rostocks bedanken. Grit Koch, Rica Waterstradt, Anett Kott, Tom Büchse, Agnes Müller, Thomas Bittorf, Thomas Schöppe, Lars Barthel, Susanne Schröder, Elke Köhler, Mandy Wietzke und Julius Noebel möchte ich für die vergangenen 6 Jahre danken. Danke für eure Hilfe, eure Unterstützung, euer offenes Ohr, eure Inspiration, eure Nachsicht, euer Lachen und eure Zeit! Und danke für die letzte Mozartkugel!

Ein besseres Team hätte ich mir nicht wünschen können. Worte können nicht beschreiben, was ich in der Zeit bei euch gelernt und mitgenommen habe.

Ich bedanke mich bei meiner Familie, insbesondere bei meiner Schwester für die vielen Telefonate und das offene Ohr für jegliche Form an Sorgen und Nöten. Ein wichtiger Dank gebührt außerdem meiner Patentochter Tilda, die niemals zuließ, dass es mir an der nötigen Leichtigkeit und Frohsinn mangelte. Auch ihren Eltern Anna und Ferdinand möchte ich danke sagen für die Sicherheit und immer einen Platz, an den ich gehörte. Ich danke Lisa, die mich immer wertfrei und nach bestem Gewissen beraten hat und schon so lange begleitet. Ebenso wie Greta und die ganze Familie Schulze, die mich nie an mir zweifeln ließen und stets mit regem Interesse meinen Werdegang begleiteten. Außerdem sei dem Frauen Team der HSG Warnemünde gedankt – insbesondere Carolin und Jörg – für diesen wundervollen Platz der Begegnungen, für den Ausgleich zum Arbeitsstress und für das Band, das uns verbindet.

Danke Hannah für die unzähligen viel zu langen Montagabende auf deiner Couch, die schlecht für meinen Schlafrhythmus, aber Balsam für die Seele waren. Danke Lukas für unseren gemeinsamen Garten, die Feinkostabende und den Spaß am Spiel. Danke Jan, dass du – du

bist und immer für mich da. Danke Amelie für die 5 besten Südstadt-WG Jahre, für deine Kreativität, deine Backwerke, deine Offenheit und dein wundervolles Wesen. Danke AnKi, dass du mir das Ankommen in einer neuen Stadt und fremden Umgebung so einfach gemacht und mir mein erstes Zuhause außerhalb von Zuhause gegeben hast.

Und danke Melli für deine stetige Begleitung, deinen Zuspruch, deine Zuversicht, für die kleinen und großen Auszeiten, für die Herausforderungen und Belohnungen, für die Albernheiten, die Neuanfänge, die Traditionen, die Beständigkeit und all diese wertvollen Erinnerungen, die wir geschaffen haben.

Ich danke euch allen, denen ich in den vergangenen Jahren in Rostock begegnet bin, von denen ich lernen durfte, mit denen ich gemeinsam wachsen konnte und dir mir so unzählige wichtige Dinge mit auf den Weg gegeben haben. Danke.