Einfluss von Hypoxie und Fettsäuren auf Glrx 1 und Glrx 5 in MIN6-Zellen

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.) des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

> vorgelegt von Sun, Lia Mingzhe aus Beijing, China

> > Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen Medizinische Klinik und Poliklinik III

> Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Linn Gutachterin: PD Dr. med. Natascha Sommer

> > Tag der Disputation: 01. Juni 2021

Inhaltsverzeichnis

1	EINLE	ITUNG	1
	1.1 D	DIABETES MELLITUS	1
	1.1.1	Definition	1
	1.1.2	Prävalenz	1
	1.1.3	Klassifikation	1
	1.1.3	5.1 Typ 1 Diabetes Mellitus	2
	1.1.3	3.2 Typ 2 Diabetes Mellitus	2
	1.	.1.1.1.1 Symptome	2
	1.	.1.1.1.2 Diagnose	2
	1.	.1.1.1.3 Komplikationen	3
	1.	.1.1.1.4 Pathophysiologie und Risikofaktoren	3
	1.	.1.1.1.5 Therapieformen	5
	1.1.3	Gestationsdiabetes	6
	1.1.3	Andere spezifische Diabetes-Typen	6
	1.2 R	REDOX-REGULIERTE SIGNALWEGE UND OXIDATIVER STRESS	7
	1.2.1	Oxidative Spezies: ROS und RNS	7
	1.2.2	Redox-regulierte Signalwege	8
	1.2.3	Oxidativer Stress	9
	1.3 C	XIDATIVER STRESS UND DIABETES MELLITUS	.11
	1.3.1	.1 Glukotoxizität	11
	1.3.1	.2 Lipotoxizität	12
	1.3.1	.3 Hypoxie	14
	1.4 G	GLUTAREDOXINE	.15
	1.4.1	Klassifikation und Reaktionsmechanismen	.15
	1.4.2	Glrx 1	.17
	1.4.3	Glrx 5	.18
	1.5 N	/IN6-Zelllinie	.19
	1.6 Z	ZIELE DER ARBEIT	.20
2	MATEI	RIAL UND METHODEN	.21
-	21 N		21
	2.1 N	Zalllinia	.21
	2.1.1	Conzito	.21 21
	2.1.2	Gebrauchsartikal	.21
	2.1.3	Chamikalian	.22 22
	2.1.4	Chemikulen.	.23 24
	2.1.3	rujjer, Losungen una Mealen	.24
	2.1.6	Kits	.24

2.1.1	7 Prir	nersequenzen für die qRT-PCR	25
2.1.0	8 Soft	ware	25
2.2	METH	ODEN	25
2.2.	1 Zell	kultur	25
2.	.2.1.1	Auftauen von Zellen	26
2.	.2.1.2	Passagieren von Zellen	
2.	.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl	
2.2.2	2 Her	stellung der Fettsäure-Medien	27
2.2	3 Auf	bereitung der Proben	
2.	.2.3.1	Herstellung der Proben für die qRT-PCR	29
2.	.2.3.2	Herstellung der Proben für die Proteinanalyse	29
2.2.4	4 MT	T- Test	
2.3	Prote	INANALYSE	30
2.3.	1 ELI	SA	30
2.	.3.1.1	Insulin ELISA	30
2.	.3.1.2	Glrx 1 und Glrx 5 ELISA	31
2.3.2	2 Pro	teinbestimmung nach Bradford	31
2.4	GENEX	KPRESSIONSANALYSE	32
2.4.	1 RNA	A-Isolierung	32
2.4.2	2 cDI	VA-Synthese	32
2.4	3 Que	Intitative Real-Time-PCR	33
2.	.4.3.1	Effizienzermittlung der PCR-Primer	33
2.	.4.3.2	Durchführung der qRT-PCR	
2.5	STATE	STIK	35
3 ERG	EBNIS	SE	
3.1	GUTE	VIABILITÄT DER MIN6-ZELLEN UNTER FETTSÄUREBEHANDLUNG	36
3.2	Einfli	uss von Fettsäuren	
3.2.	1 Ein	fluss von Fettsäuren auf Insulin	
3.	.2.1.1	Signifikante Erniedrigung des Insulingehaltes unter Palmitinsäurebehandlung und ter	ndenzielle
E	rniedrigu	g der Insulinsekretion und der Insulingenexpression	
3.	.2.1.2	Signifikante Erniedrigung der Insulinsekretion unter Ölsäurebehandlung und ter	ndenzielle
E	rniedrigu	ng des Insulingehaltes und der Insulingenexpression	41
3.2.2	2 Einj	fluss von Fettsäuren auf Glrx 1	43
3.	.2.2.1	Trend zur Erniedrigung des Glrx 1-Gehaltes und der Genexpressio	on unter
Pa	almitinsäu	rebehandlung	43
3.	.2.2.2	Ölsäurebehandlung erniedrigt den Glrx 1 Gehalt signifikant	45
3.2	3 Einj	fluss von Fettsäuren auf Glrx 5	46
3.	.2.3.1	Signifikante Verminderung des Glrx 5-Gehaltes durch Palmitinsäurebehandlung	46
3.	.2.3.2	Ölsäurebehandlung erniedrigt den Glrx 5-Gehalt signifikant und die Glrx 5- Gene	xpression
te	endenziell	48	

	3.3	EINFLUSS VON HYPOXIE	49
	3.3	3.1 Einfluss von Hypoxie auf Insulin	49
		3.3.1.1 Hypoxie verminderte die Insulinsekretion und steigerte gleichzeitig den Insulingehalt	49
		3.3.1.2 Hypoxie erniedrigte die Genexpression von Insulin	51
	3.3	3.2 Einfluss von Hypoxie auf Glutaredoxine 1 und 5	52
		3.3.2.1 Durch Hypoxie nahm der Glrx 1-Gehalt signifikant und die Glrx 1-Genexpression tendenzi	ell
		ab 52	
		3.3.2.2 Hypoxie verminderte sowohl den Glrx 5-Gehalt als auch die Glrx 5-Genexpression	54
	3.4	EINFLUSS BEIDER BEHANDLUNGEN ZUM GLEICHEN ZEITPUNKT	55
	3.4	4.1 Signifikante Erniedrigung der Insulinsekretion, des Insulingehaltes ut	nd
	Ins	sulingenexpression unter kombinierter Behandlung mit Hypoxie und Palmitinsäure	55
	3.4	4.2 Einfluss von Hypoxie und Palmitinsäure auf Glrx 5	59
		3.4.2.1 Signifikante Erniedrigung des Glrx 5-Gehaltes bei Kombination von Hypoxie u	nd
		Palmitinsäure und tendenzielle Verminderung der Glrx 5-Genexpression	59
	3.4	4.3 Kombinierte Behandlung von Hypoxie und Ölsäure senkte die Insulinsekretion u	nd
	die	e Insulingenexpression signifikant	50
	3.4	4.4 Einfluss von Hypoxie und Ölsäure auf Glrx 5	53
		3.4.4.1 Kombination der Behandlungen mit Ölsäure und Hypoxie erniedrigte den Glrx 5-Geh	alt
		signifikant und die Glrx 5 -Genexpression tendenziell	63
	3.5	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	55
4	DIS	KUSSION	67
	4.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ZENTRALEN ERGEBNISSE	67
	4.2	INTERPRETATION	67
		21 Veränderung der Effekte bei Kombination der Behandlungen	72
	1.2	2.1 Vertimerung der Effekte bei Kombination der Denandtungen	73
	4.2		' J 72
	4.5	KONSEQUENZ	13
	4.4	LIMITATIONEN	/4
	4.5	ZUKUNFTSPERSPEKTIVEN	75
5	ZUS	SAMMENFASSUNG	76
6	SUN	MMARY	77
U	SUL		,,
7	ABI	KÜRZUNGS-, ABBILDUNGS-, TABELLENVERZEICHNIS	78
	7.1	Abkürzungsverzeichnis	78
	7.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	31
	7.3	TABELLENVERZEICHNIS	33
8	ТЛТ	TERATURVERZEICHNIS	84
υ			J -
9	PUI	BLIKATIONSVERZEICHNIS1	02

10	ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION1	103
11	DANKSAGUNG1	104
12	CURRICULUM VITAE1	105

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Definition

Kennzeichnend für den Diabetes mellitus (griechisch: "honigsüßer Durchfluss") ist die chronische Hyperglykämie. Ursächlich hierfür ist entweder eine Störung in der Insulinsekretion, Insulinwirkung oder eine Kombination beider Faktoren. Ein auf Dauer erhöhter Blutzuckerspiegel löst langfristig verschiedene Mikro- und Makroangiopathien aus. Hierbei reagieren einige Organe besonders empfindlich, beispielsweise Augen, Nieren, Nerven und das kardiovaskuläre System (Nationale Versorgungsleitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes, 2014).

1.1.2 Prävalenz

Diabetes mellitus zählt inzwischen zu einer der vier bedeutsamsten nichtübertragbaren Krankheiten, da die Erkrankung eine der wichtigsten Ursachen vorzeitiger Todesfälle und Behinderungen ist.

In den letzten Jahrzehnten ist die Zahl der Diabetiker kontinuierlich angestiegen. Waren es 1980 noch 108 Millionen Erwachsene, ist die Zahl der Diabetiker weltweit bis zum Jahre 2019 bereits auf 463 Millionen angestiegen (International Diabetes Foundation, 2019). Teilweise, jedoch nicht ausschließlich, sind die Bevölkerungszunahme und das Älterwerden der Bevölkerung hierfür verantwortlich. Eine Zunahme an Übergewicht spiegelt die steigenden Prävalenzen wider und ist eng mit Diabetes mellitus verknüpft (World Health Organization, 2016).

1.1.3 Klassifikation

Ätiologisch wird der Diabetes mellitus in vier verschiedene Typen eingeteilt (American Diabetes Association, 2019).

- 1. Typ 1 Diabetes mellitus
- 2. Typ 2 Diabetes mellitus
- 3. Gestationsdiabetes
- 4. andere spezifische Diabetes-Typen

1.1.3.1 Typ 1 Diabetes Mellitus

Im Allgemeinen tritt der Typ 1 Diabetes eher in der Jugend oder Adoleszenz auf, jedoch kann er sich auch noch im späteren Lebensalter manifestieren. Durch die mangelnde Insulinproduktion und dem damit verbundenem absoluten Insulinmangel, äußert sich das Krankheitsbild mit seinen typischen Symptomen Polyurie, Polydipsie, Gewichtsverlust bis hin zur Ketoazidose, die im schlimmsten Fall zum Coma diabeticum führt.

Innerhalb des Typ 1 Diabetes wird weiterhin zwischen Subtyp 1a und 1b unterschieden. Subtyp 1a ist immunologisch vermittelt, demzufolge können bestimmte serologische Marker im Blut nachgewiesen werden. Suptyp 1b hingegen ist idiopathisch vermittelt und dementsprechend sind auch keine immunologischen Marker auffindbar (Deutsche Diabetes Gesellschaft, 2011).

1.1.3.2 Typ 2 Diabetes Mellitus

1.1.1.1.1 Symptome

Der Typ 2 Diabetes zeigt anfangs oft keine spezifischen Frühsymptome, weswegen Patienten häufig erst viel zu spät mit der Erkrankung diagnostiziert werden (Nationale Versorgungsleitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes, 2014).

1.1.1.1.2 Diagnose

Wenn diabetestypische Symptome wie Gewichtsverlust, Polyurie und Polydipsie auftreten, ein erhöhtes Diabetes Risiko besteht oder bei einer Untersuchung auffällige Nüchtern- oder Gelegenheitsplasmaglukosewerte festgestellt wurden, werden im nächsten Schritt ein oraler Glukosetoleranztest oder die Messung des HbA1c-Wertes durchgeführt (Deutsche Diabetes Gesellschaft, 2019).

1.1.1.1.3 Komplikationen

Vor allem Patienten mit langer Erkrankungsdauer und langer Phasen schlechter Einstellung leiden häufig an schwerwiegenden Folge- und Begleiterkrankungen. Die häufigste mikrovaskuläre Komplikation stellt die diabetische Neuropathie dar, die typischerweise in den unteren Extremitäten auftritt. Die schlecht verheilenden Fußulzera werden als "diabetisches Fußsyndrom" zusammengefasst. Im schlimmsten Falle erfolgt eine Amputation der unteren Extremitäten. Im Vergleich zu Nicht-Diabetikern ist die Amputationsrate bei Diabetes-Patienten 10- bis 20-fach erhöht. Die zweithäufigste mikrovaskuläre Komplikation des Diabetes sind die diabetischen Retinopathien. Die Beeinträchtigung des Sehvermögens kann bis zur Erblindung fortschreiten. Eine weitere schwerwiegende Komplikation des Diabetes ist die Nephropathie, wobei das Risiko für eine chronische Niereninsuffizienz bei Diabetikern 10-fach höher ist.

Neben den mikrovaskulären Schäden haben Diabetiker auch ein 2- bis 3-fach höheres Risiko an kardiovaskulären Krankheiten, wie arterieller Hypertonie oder Apoplex, zu erkranken. Hierbei steigt das Risiko kontinuierlich mit dem Plasmaglukosespiegel an, auch wenn diese laut Leitlinie noch keinem Diabetes entspricht.

Aufgrund des erhöhten Risikos für sämtliche schwerwiegenden Komplikationen des Typ 2 Diabetes sind nach den Nationalen Versorgungsleitlinen zur Therapie des Typ 2 Diabetes verschiedene Screenings für Patienten empfohlen (Nationale Versorgungsleitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes, 2014; World Health Organization, 2016).

1.1.1.1.4 Pathophysiologie und Risikofaktoren

Typ 2 Diabetes ist charakterisiert durch eine Reihe metabolischer Abnomalitäten. Hierzu gehören Insulinresistenz, Hyperglykämie, Hyperlipidämie, erhöhte freie Fettsäuren, erhöhte Advanced-Glycation-Endproducts (AGEs) und erhöhte Produktion von Superoxidanionen (Rochette *et al.*, 2014). Es handelt sich um eine multifaktorielle Erkrankung, die sich unter Risikofaktoren klinisch manifestiert. Pathophysiologisch liegen der Erkrankung dementsprechend auch verschiedene Ursachen zugrunde. Hierzu gehört zum einen die gestörte postprandiale Insulinsekretion und zum anderen die Insulinresistenz des insulinabhängigen Gewebes, wie Leber, Skelettmuskel und Fett (Nationale Versorgungsleitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes, 2014).

Kennzeichnend für den Diabetes ist die fortschreitende Zerstörung der beta-Zellen. Diese sind für die Insulinproduktion verantwortlich und befinden sich im endokrinen Teil des Pankreases, den sogenannten Langerhans'schen Inseln (Rahier, 1988).

Die glukosestimulierte Insulinsekretion ist inzwischen weitgehendst untersucht worden. Physiologischerweise wird eine dem metabolischen Zustand angepasste Menge an Insulin sekretiert, indem die beta-Zelle Veränderungen der Plasmaglukosekonzentration wahrnimmt. Abgesehen von Glukose reagiert die beta-Zelle ebenfalls auf Aminosäuren und Fettsäuren, jedoch schwächer.

Glukose gelangt über den Glukosetransporter GLUT2 in die beta-Zelle. Durch anschließende Glykolyse entsteht ATP (Adenosintriphosphat) und führt zur Schließung von ATP-sensitiven Kaliumkanälen. Hierdurch wird die Plasmamembran wiederum depolarisiert und öffnet spannungsabhängige Calciumkanäle. Durch den Einstrom von Calcium wird letzendlich Insulin durch Exozytose aus seinen Granula in den Blutstrom freigesetzt, wo es an die Insulinrezeptoren von insulinabhängigen Geweben bindet (Ashcroft and Rorsman, 2012; Fu, R. Gilbert and Liu, 2013).

Die Menge an ausgeschüttetem Insulin ist abhängig vom Plasmaglukosespiegel und der Insulinempfindlichkeit des insulinabhängigen Gewebes. Bei Entwicklung einer Insulinresistenz erhöht sich die Insulinsekretion zu Beginn der Erkrankung und führt sogar zur Hyperinsulinämie. Mit der vermehrten Insulinausschüttung versucht das Pankreas die normale Glukosetoleranz aufrecht zu erhalten. Im Verlauf der Erkrankung nimmt die endogene Insulinsekretion jedoch stetig ab und kann im späten Stadium auch fast zum Stillstand kommen. Der Blutglukosespiegel steigt an und es manifestiert sich der Zustand der gestörten Glukosetoleranz (IGT) oder ein abnormal erhöhter Nüchternglukose-Werte (IFG). Bei suboptimaler oder keiner Intervention zeigt sich dann schließlich das Vollbild eines Diabetes mellitus (Kahn, Cooper and Del Prato, 2014).

Bestimmte Gene und Umwelteinflüsse sind ebenfalls entscheidend für die Erkrankung an Typ 2 Diabetes (Kahn, Cooper and Del Prato, 2014). In der heutigen Wohlstandsgesellschaft sind Überernährung und Bewegungsmangel meist Ursachen für das "metabolische Syndrom". Dieses gilt als eines der wichtigsten Risikofaktoren an Typ 2 Diabetes zu erkranken. Unter dem "metabolischen Syndrom" wird eine abdominelle Adipositas mit zwei zusätzlichen Faktoren (Dyslipoproteinämie, Hypertonie oder gestörte Glukosetoleranz) zusammengefasst (Zimmet, Alberti and Shaw, 2005). Nicht nur die Dysfunktion der beta-Zellen, sondern auch ihre Anzahl spielt eine Rolle in der Entstehung des Typ 2 Diabetes. In einer Studie wurden Proben von Pankreasautopsien untersucht. Diese bestand aus Probanden mit Adipositas und Typ 2 Diabetes oder IFG oder ohne Diabetes. Weiterhin wurden auch Pankreasproben von normalgewichtigen Probanden untersucht. In dieser Studie zeigte sich, dass das relative beta-Zellvolumen bei den Probanden mit Typ 2 Diabetes oder IFG signifikant erniedrigt war (Butler *et al.*, 2002). Die Abnahme der beta-Zellzahl erfolgt wiederum multifaktoriell. Beispielsweise gehen die beta-Zellen durch oxidativen Stress, welcher unter anderem durch Glukolipotoxizität erzeugt wird, vermehrt in Apoptose (Poitout and Robertson, 2008).

1.1.1.1.5 Therapieformen

Bevor sich ein manifester Typ 2 Diabetes entwickelt hat, kann durch eine Basistherapie mit Änderung des Lebensstils, Steigerung der körperlichen Aktivität und Schulung die Progression der Krankheit verlangsamt werden. Entwickelt sich dennoch ein manifester Typ 2 Diabetes wird nach einem Stufenprinzip therapiert, wobei die Basistherapie als erste Stufe gilt und in allen Stufen begleitend wirken soll. Auf der zweiten Stufe wird eine Pharmaka-Monotherapie, meist mit Metformin, angestrebt. Bei Unverträglichkeit gegen Metformin werden Sulfonylharnstoffe, Alpha-Glukosidasehemmer, DPP-4-Inhibitoren, SGLT2-Inhibitoren, Glinide oder Glitazone als Alternativen eingesetzt. Falls die Monotherapie nicht ausreicht, wird auf der dritten Stufe entweder ein weiteres orales Antidiabetikum hinzugezogen oder es erfolgt ein Wechsel auf eine Insulintherapie. Hierbei gibt es wiederum verschiedene Therapiemodelle, beispielsweise die basalunterstützte orale Therapie (BOT), die konventionelle Insulintherapie (CT), die supplementäre Insulintherapie (SIT) und die intensivierte Insulintherapie (ICT). In der vierten Behandlungsstufe können auch orale Antidiabetika mit Insulin kombiniert gegeben werden (Nationale Versorgungsleitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes, 2014).

Tabelle 1: Stufenmodell zur Behandlung des Typ 2 Diabetes mellitus (NationaleVersorgungsleitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes, 2014)

1. Stufe: Basistherapie
2. Stufe: Basistherapie + Pharmaka-Monotherapie (1. Wahl: Metformin)
3. Stufe: Basistherapie + nur Insulin oder Pharmaka-Zweifachtherapie
4. Stufe: Basistherapie + Intensivierte Insulin- und Kombinationstherapieformen

1.1.3.3 Gestationsdiabetes

Der Gestationsdiabetes ist eine meist vorübergehende Glukosestoffwechselstörung während der Gravidität, welche mittels des oralen Glukosetoleranztests diagnostiziert werden kann (Kleinwechter, 2012). Das Risiko für Komplikationen während der Schwangerschaft sind für Mutter und Kind erhöht (World Health Organization, 2016). Zudem ist die Wahrscheinlichkeit im Anschluss an einen Typ 2 Diabetes mellitus zu erkranken ebenfalls erhöht (Bellamy *et al.*, 2009).

1.1.3.4 Andere spezifische Diabetes-Typen

Tabelle 2: Andere spezifische Diabetes-Typen (Nationale Versorgungsleitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes, 2014)

Subtyp A	yp A Genetische Defekte der b-Zell-Funktion		
Subtyp B	Genetische Defekte der Insulinwirkung		
Subtyp C	Erkrankung des exokrinen Pankreas		
Subtyp D Diabetes durch Endokrinopathien			
Subtyp E	Medikamenten- oder Chemikalieninduziert		
Subtyp F Diabetes durch Infektionen			
Subtyp G	Seltene Formen des immunvermittelten Diabetes		
Subtyp H	andere gelegentlich mit Diabetes assoziierten genetischen		
	Syndrome		

1.2 Redox-regulierte Signalwege und oxidativer Stress

1.2.1 Oxidative Spezies: ROS und RNS

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS = engl. reactive oxygen species) oder Stickstoffspezies (RNS = engl. reactive nitrogen species) sind charakterisiert durch ihre hohe Reaktivität mit verschiedenen biologischen Zielen (Schieber and Chandel, 2014).

Zu ROS zählen beispielsweise Superoxidanion $(O_2 \cdot \overline{})$, Hydrogenperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale $(OH \cdot)$. ROS entstehen entweder während des normalen Zellmetabolismuses oder über externe Quellen (e.g. Zigarettenrauch, Medikamente etc.) (Pham-Huy, He and Pham-Huy, 2008). Endogen entstehen sie vorranging in den Mitochondrien, vor allem in Komplex I und III der Atmungskette, und durch die NADPH-Oxidase (NOX). Weitere Entstehungsorte sind die Xanthin-Oxidasen, die Cyclooxygenasen (COX), Cytochrom p450 Enzyme und Lipoxygenasen (Finkel, 2011).

Zu RNS zählen beispielsweise Stickstoffmonoxid (·NO), Nitrosylkation (NO⁺), Nitrosylanion NO⁻) und Peroxinitrit (ONOO⁻) (Dröge, 2002). Die Entstehung von Stickstoffmonoxid wird durch NO-Synthasen (NOS) katalysiert. Je nach Mikroumgebung kann Stickstoffmonoxid in weitere RNS umgewandelt werden (Dröge, 2002).

Diese reaktiven Spezies werden häufig mit oxidativem Stress assoziiert, wobei sie Lipide, Proteine und DNA schädigen können. Inzwischen wurde jedoch auch festgestellt, dass sie der Zelle nicht nur Schaden bringen, sondern auch als Signalmoleküle dienen, um biologische und physiologische Prozesse zu regulieren (Schieber and Chandel, 2014).

Hierbei aktivieren sie beispielsweise die MAPK (mitogen-aktivierte Proteinkinase) und ERK (extrazelluläre-signalregulierte Kinase) (Asmat, Abad and Ismail, 2016).

Die biologische Funktion von ROS unter physiologischen Umständen enthalten wichtige fundamentale Prozesse wie Zellteilung und kontrollierte Zellelemination während Gewebserneuerung (Sies and Jones, 2007).

1.2.2 Redox-regulierte Signalwege

Redox-regulierte Signalwege sind Signalwege in denen physiologische, also nicht toxische, Konzentrationen von oxidativen Spezies (e.g. ROS und RNS) als Signalmoleküle dienen, um posttranslationale reversible Modifikationen an Proteinen hervorzurufen (Bindoli and Rigobello, 2013). Hierbei modifizieren die ROS bzw. RNS insbesondere die thiolhaltigen Cysteine-Reste von redoxsensitiven Proteinen. Durch Oxidation dieser Reste formiert sich reaktive Sulfensäure (-SOH), welches dann intramolekulare Disulfidbrücken mit benachbarten Cysteinen (-S-S-) bildet oder weiter zu Sulfinsäure (-SO₂H) oder Sulfonsäure (-SO₃H) oxidiert wird. Wenn sich Stickstoff in der Nähe befindet, kann Sulfensäure auch damit reagieren und Sulfenamide bilden (Groitl and Jakob, 2014). Sulfensäure kann zudem gemischte intermolekulare Disulfidbrücken eingehen, vor allem häufig mit Glutathion (GSH). Diesen Vorgang bezeichnet man als S-Glutathionylierung. S-Glutathionylierung ist also die reversible Entstehung von Disulfiden zwischen GSH und Cysteinyl-Resten mit niedrigem pKa-Wert. Dies geschieht auch unter physiologischen Bedingungen und nicht nur unter oxdiativen Stressbedingungen. Es wurde nun vermutet, dass die Veränderung an Thiol-Resten ein wichtiger Mechanismus sein könnte, um Proteine durch "thiol-based redox switches" (auch "thiol-switches") posttranslational zu modifizieren, insbesondere als Reaktion auf oxidativen und nitrosativen Stress. Als "thiol-switches" werden reversible Modifikationen an Thiol-Resten von Cystein bezeichnet. Cystein-Reste befinden sich häufig an der Außenseite von Proteinen und können als "Redox-Sensoren" der Zelle dienen (Dalle-Donne et al., 2007; Groitl and Jakob, 2014). Die Regulation von Proteinen über vorübergende oxdiative Thiolmodifikationen können so häufig und wichtig sein wie Proteinphosphorylierung (Herrmann and Dick, 2012). S-Gluthathionylierung ist jedoch auch in vielen physiologischen, Redox-regulierten Prozessen wie Modifikation von Proteinfunktionen involviert und verhindert zudem eine weitere Oxidation von Cystein-Resten um sie vor "Überoxidation" zu schützen (Bindoli and Rigobello, 2013). Diese oxidativen Modifikationen haben zur Folge, dass die Konformation und/oder die Funktion des Proteins sich verändert (Ray, Huang and Tsuji, 2012; Bindoli and Rigobello, 2013), oder die Anfälligkeit für Proteolyse zunimmt (Dröge, 2002). Sulfensäure und Disulfide sind die niedrigsten Oxidationsstufen und komplett durch reduzierende Systeme reversibel. Reversibilität ist eine zwingende Notwendigkeit für Redox-regulierte Signalwege und Sensing (Ray, Huang and Tsuji, 2012; Bindoli and Rigobello, 2013). Durch die Formation von Disulfidbrücken werden verschiedene zytoplasmatische Proteine aktiviert oder inaktiviert. Bisher deuten alle Hinweise darauf, dass zytosolische Proteine ihre Cystein-Reste in der nativen Form bevorzugen, und die meisten sezernierten Proteine stabiler sind, wenn ihre Cysten-Reste als Disulfidbindungen existieren. Daher können Veränderung in der reduzierenden Umgebung des Zytosols schwere Effekte auf Faltung und Aktivität von Proteinen haben (Åslund and Beckwith, 1999).

Es haben sich spezifische Mechanismen entwickelt, um lokale Veränderungen der Redoxbedinungen wahrzunehmen und diese Information in Signalwegen weiterzugeben. Als ein sehr gut erforschtes Beispiel dient der Transkriptionsfaktor OxyR in E. coli. Er wurde zu Beginn als Sensor für den H₂O₂-Spiegel entdeckt. Erhöhen sich in E. coli die H₂O₂-Konzentrationen, wird als Reaktion darauf der OxyR-Transkriptionsfaktor kurzfristig oxidiert, somit aktiviert und die Expression von Enzymen werden eingeleitet, welche die Zelle dann gegen oxidativen Stress schützt. Oxidiertes OxyR wird dann durch das Glutaredoxin-System wieder reduziert und somit inaktiviert (Bindoli and Rigobello, 2013).

Hormone, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter und Zytokine haben nachweislich die Eigenschaft, H₂O₂ in Säugetierzellen vorübergehend ansteigen zu lassen, welches dann als Signalmolekül fungiert (Bindoli and Rigobello, 2013). Hierzu gehört auch das Hormon Insulin. H₂O₂ wird insulinabhängig generiert und hat sowohl einen Einfluss auf die frühe Insulinfreisetzungskaskade als auch auf spätere Signalwege, die letzendlich den insulinhabhängigen Glukosetransport in die Zelle vermitteln (Mahadev *et al.*, 2001).

1.2.3 Oxidativer Stress

Wenn die Entstehung und der Abbau von oxidativen Signalstoffen jedoch nicht mehr im Gleichgewicht sind, und ROS bzw. RNS in Zellkompartimenten akkumulieren, entsteht eine Dysregulation in der Zelle. Physiologischerweise wird ein Basislevel an ROS produziert (Abbildung 1 I)). Im Sinne von Redox-regulierten Signalwegen kann das ROS-Level kurzzeitig als regulatorische Komponente ansteigen (Abbildung 1 II)). Ist ROS jedoch dauerhaft erhöht (Abbildung 1 III)) wird die Regulation in der Zelle gestört.



Abbildung 1: Konzentrationsschwankungen oxidativer Spezies unter verschiedenen Bedingungen (modifiziert nach Dröge, 2002).

Das Konzept des oxidativen Stresses wurde vor über 30 Jahren 1985 erstmals durch Helmut Sies vorgestellt. Als oxidativer Stress wird ein Ungleichgewicht oder eine Störung zwischen Oxidantien und Antioxidantien mit Bevorzugung der Oxidantien bezeichnet, welches schließlich zur Schädigung zellulärer Makromoleküle (Proteine, Lipide und DNA) führen kann (Johansen *et al.*, 2005; Sies and Jones, 2007). Die Balance von Pro- und Antioxidantien kann nicht als einzelne grosse Einheit betrachtet werden, sondern ist in Kompartimente aufgeteilt. Eine Veränderung des Redoxgleichgewichts bewirkt nicht die Verschiebung des "Gesamten"-Redoxgleichgewichts, sondern führt durch einzelne individuelle Signalwege zur Erwiderung auf verschiedene physiologische oder toxische Stimuli (Jones, 2006).

Die Produktion von ROS erhöht sich unter oxidativem Stress. Dieses Phänomen wird "oxidative Burst" genannt und beschreibt einen schnellen, vorübergehenden Anstieg von ROS innerhalb Minuten bis Stunden als Reaktion auf Stress (Schmitt et al., 2014). Da übermäßige ROS DNA, Proteine und Lipide oxidieren können, ergab sich die Vermutung, dass oxidativer Stress ein pathophysiologisch relevanter Faktor in der Entstehung vieler degenerativer Erkrankungen sind (Abbildung 2). Hierzu zählt auch der Typ 2 Diabetes mellitus. Unglücklicherweise haben beta-Zellen besonders niedrige Konzentrationen an Antioxidantien (e.g. Superoxiddismutase (SOD), Katalase, and Glutathionperoxidase). Dies macht sie besonders anfällig gegenüber Redoxveränderungen bzw. oxidativen Stress durch erhöhte oxidative Spezies (Tiedge et al., 1997; Robertson, 2004).



Abbildung 2: Oxidativer Stress als pathophysiologisch relevanter Faktor in der Entstehung degenerativer Erkrankungen (modifiziert nach Pham-Huy, He and Pham-Huy, 2008).

1.3 Oxidativer Stress und Diabetes mellitus

1.3.1.1 Glukotoxizität

Glukotoxizität ist definiert als eine nicht-physiologische und möglicherweise irreversible beta-Zellschädigung durch chronisch erhöhte supraphysiologische Glukosekonzentrationen. Durch die beta-Zellschädigung werden Schritte von der Insulingenexpression bis zur Insulinfreisetzung beeinträchtigt und somit der Insulingehalt und die Insulinsekretion ins Blut gestört. Diese beinhalten verminderte Translationsraten in der Insulinsynthese, die Suppression von Glukokinasegenexpression, gestörte mitochondriale Funktionen, die Beeinträchtigung von Exozytose und eine vermehrte Apoptose (Butler et al., 2002; Robertson et al., 2003). Zudem spielt die Dedifferenzierung der beta-Zelle durch Glukotoxizität eine entscheidende Rolle. Dedifferenzierung bezeichnet hierbei den Zustand, dass reife beta-Zellen zu einem bestimmten Ausmaß ihren differenzierten Phänotyp und ihre zelluläre Identität verlieren und somit keine funktionalen beta-Zellen mehr darstellen (Bensellam, Laybutt and Jonas, 2012).

Die Idee, dass eine verminderte Insulinsekretion aus Hyperglykämie resultieren kann, hat zum Konzept der Glukotoxizität geführt. In beta-Zellen führt der oxidative Glukosemetabolismus ohnehin unweigerlich zur Produktion von ROS. Diese werden unter normalen Umständen von Katalase oder Superoxiddismutase eleminiert (Stumvoll, Goldstein and Van Haeften, 2005). Bei chronischer Hyperglykämie steigt die ROS-Produktion in den beta-Zellen jedoch enorm an, sodass eine Schädigung zellulärer Bestandteile resultiert. Zudem erhöhen ROS die Aktivität von NFkappaB, welches eventuell Apoptose in beta-Zellen induziert (Stumvoll, Goldstein and Van Haeften, 2005).

Die Wirkung von Glukotoxizität auf die Insulingenexpression spiegelt sich im Verlust von PDX-1 (pancreatic and duodenal homebox 1) und MafA. Diese beiden Transkriptionsfaktoren sind essentiell für die Insulinpromoteraktivität. Somit folgen daraufhin verringerte Insulinsnythese, erniedrigter Insulingehalt und Störungen in der Insulinsekretion (Robertson, 2004).

1.3.1.2 Lipotoxizität

Freie Fettsäuren haben eine unabdingbare Stellung in allen Lebensformen, von primitiven Einzellern bis zu komplexen Säugetieren. Die beiden vorwiegenden freien Fettsäure (FFS) im Plasma sind die gesättigte Palmitinsäure (C16:0, 27% aller freien Fettsäuren im Plasma) und die einfach-ungesättigte Ölsäure (C18:1, 31% aller freier Fettsäuren im Plasma) (Busch *et al.*, 2002; Palomer *et al.*, 2017). Freie Fettsäuren sind die Verbindung zwischen viszeraler Adipositas und Insulinresistenz (Evans *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass die Konzentration an freien Fettsäuren in Patienten mit Typ 2 Diabetes signifikant höher sind als in gesunden Probanden. Hierbei ist bei Patienten mit Diabetes der Palmitinsäureplasmaspiegel in der Nacht oder postprandial um das 1.5- bis 3-fache erhöht (Miles *et al.*, 2003). Daraus entstand die Vermutung, dass die Verschlechterung der beta-Zellfunktion in diabetischen Patienten auch durch die chronisch erhöhten Konzentrationen an Lipiden entstehen kann. Dies führte zur Hypothese der Lipotoxizität (Robertson, 2004).

Unter normalen Umständen sind freie Fettsäuren physiologische Kraftstoffe für die beta-Zelle, werden jedoch toxisch bei chronischer Erhöhung. Bei physiologischen Glukosespiegeln werden freie Fettsäuren in den Mitochondrien durch beta-Oxidation verarbeitet. Sind jedoch Glukose- und Fettsäurespiegel beide erhöht, werden Fettsäuren in Richtung Esterifizierung gebracht, nachdem die kompensatorische Oxidation der

überschüssigen Fettsäuren versagt. Dessen Metabolite akkumulieren und schädigen die beta-Zelle durch exzessive Produktion von RNS und Ceramiden (Briaud et al., 2001; Unger, 2002; Robertson et al., 2004). Ceramide sind intrazelluläre Mediatoren bei der TNF-alpha abhängigen Apoptose (Obeid et al., 1993). Sowohl in vitro als auch in vivo wurde gezeigt, dass freie Fettsäuren den proinflammatorischen NfkappaB-Signalweg aktivieren. Dies kann unter anderem durch Aktivierung von Signalwegen zur Insulinresistenz führen (Hirosumi et al., 2002). Freie Fettsäuren erhöhen durch Aktivierung der NADPH-Oxidase die ROS-Produktion und bewirken eine Störung der Insulinsekretion (Carlsson, and Welsh, 1999). Weiterhin wird Borg die Insulingenexpression durch die Inhibition der Insulinpromoter Aktivität gestört, welches mit Veränderungen von PDX-1 und MafA einhergeht (Briaud et al., 2001; Kelpe et al., 2003; Robertson, 2004; Rochette et al., 2014). Freie Fettsäuren verursachen nachweislich auch ER-Stress und mitochondriale Dysfunktion, mit unter auch in beta-Zellen (Kharroubi et al., 2004; Sobczak, Blindauer and Stewart, 2019). ER-Stress kann wiederum über JNK-Aktivierung in Insulinresistenz resultieren (Nguyen et al., 2005). Die Kombination von Glukotoxizität und Lipotoxizität wird als Glukolipotoxizität beschrieben, wobei der Begriff "Toxizität" den beta-Zellschaden bereits impliziert (Robertson, 2004).



Abbildung 3: Folgen bei chronischer Erhöhung von freien Fettsäuren (modifiziert nach Evans *et al.*, 2002).

1.3.1.3 **Hypoxie**

Hypoxie ist ein Zustand erniedrigten Sauerstoffpartialdrucks und kann aus verschiedenen Gründen entstehen. Entweder ist die Sauerstoffversorgung erniedrigt (e.g. Krebs, ischämische Herzerkrankungen etc.) oder es wird vermehrt Sauerstoff verbraucht (z.B. Inflammation, Proliferation und Hormonsekretion, wie z.B. Insulinsekretion) (Goda and Kanai, 2012). Die Insulinsekretion in den beta-Zellen bedarf ohnehin sehr viel Sauerstoff, da die Mitochondrien diesen für die Atmungskette und ATP-Produktion benötigen (Jitrapakdee *et al.*, 2010). Glukosestimulation senkt also den zellulären Sauerstoffspiegel und steigert gleichzeitig die Insulinsekretion und Aktivität der mitochondrialen Atmungskette. Insulinsekretion und mitochondriale Funktion sind eng miteinander verknüpft. Eine Studie mit Knockout mitochondrialer DNA in MIN6-Zellen zeigte, dass die mitochondriale Atmungskette streng notwendig für die glukosestimulierte Insulinsekretion ist (Soejima *et al.*, 1996). Weiterhin haben Experimente in isolierten humanen Pankreasinseln gezeigt, dass die Insulinsekretion unter Hypoxie ernsthaft erniedrigt wurde (Garcia-Contreras *et al.*, 2017).

Durch die Glukosestimulation und die dadurch resultierende hypoxische Stoffwechsellage wird eine Aktivierung vom Hypoxie-induzierten Faktor 1 (HIF-1) verursacht (Bensellam, Laybutt and Jonas, 2012). HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor der aus den Untereinheiten HIF-1alpha und -1beta besteht. Er wirkt über die Aktivierung verschiedener Gene (HRE = hypoxia-response elements) als Regulator der Sauerstoffhomöostase. Diese dienen zur Anpassung der Zelle an die erniedrigte Sauerstoffversorgung (Bell *et al.*, 2007; Cash, Pan and Simon, 2007; Semenza, 2007; Goda and Kanai, 2012). Die Aktivierung des HIF-Systems stellt eine wichtige Adaption in ischämischen und metabolischen Erkrankungen dar (Rochette *et al.*, 2014).

Auch der ROS-Status verändert sich während Hypoxie. Ob sie erhöht oder erniedrigt werden ist jedoch bisher nicht vollständig geklärt. In einer Studie setzten die Plasmamembranen von Endothelzellen unter Hypoxie weniger H₂O₂ frei als unter Normoxie. Dies würde für eine Erniedrigung der ROS-Produktion unter Hypoxie sprechen (Zulueta *et al.*, 1995). Andere Studien zeigten wiederum, dass die ROS-Produktion unter Hypoxie gesteigert wird (Chandel *et al.*, 1998; Guzy *et al.*, 2005).

1.4 Glutaredoxine

1.4.1 Klassifikation und Reaktionsmechanismen

Glutaredoxine werden nach Anzahl ihrer Cystein-Reste im aktiven Zentrum in Dithiol-Glrx (Cys-X-X-Cys) und Monothiol-Glrx (Cys-X-X-Ser) eingeteilt (Holmgren, 1989; Holmgren and Aslund, 1995). Daher gibt es zwei verschiedene Reaktionsmechanismen. Dithiol-Glrx können vermutlich beide Mechanismen nutzen, also auch den Monothiol-Mechanismus, wohingegen Monothiol-Glrx ausschließlich den Monothiol-Mechanismus unterlaufen können (Couturier *et al.*, 2015).

Beim Dithiol-Mechanismus greift das N-terminale Cys des Glrx das Zielprotein nukleophil an und beide gehen eine gemischte Disulfidbindung ein (Abbildung 4 (1)). Daraufhin greift das C-terminale Cys die Bindung an und es wird ein reduziertes Zielprotein und ein oxidiertes Glrx freigesetzt (Abbildung 4 (2)). Durch GSH wird das Glrx zum Schluss wieder reduziert (Abbildung 4 (3)).

Die Reduktion von Disulfidbindungen zwischen Proteinen und Glutathion geschieht beispielsweise durch den Monothiol-Mechanismus. Hierbei ist nur das N-terminale Cys beteiligt. Aus der Reaktion geht ein reduziertes Zielprotein hervor und ein Glrx-S-SG (Abbildung 4 (6)). Wie beim Dithiol-Mechanismus auch wird das Glrx durch GSH wieder reduziert (Abbildung 4 (4)).

In beiden Mechanismen wird GSSG durch GR wieder zu GSH reduziert. Die hierfür benötigten Elektronen liefert NADPH (Abbildung 4 (5)) (Bushweller *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1998).



Abbildung 4: Dithiol- und Monothiol-Mechanismus von Glrx (modifiziert nach Lillig, Berndt and Holmgren, 2008).

Glutaredoxine schützen Proteine intrazellulär vor oxidativem Stress und sind somit wichtig für die Aufrechterhaltung des intrazellulären Redox-Status durch Regulation der Thiolmodifikationen (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999; Berndt, Lillig and Holmgren, 2006; Groitl and Jakob, 2014). In allen Spezies in denen GSH vorkommt, konnten auch Glutaredoxine gefunden werden. Sie kommen somit in fast allen lebenden Organismen vor, inklusive des Menschen (Holmgren and Aslund, 1995; Fernandes and Holmgren, 2004).

Es besteht die Vermutung, dass Glutaredoxine im Allgemeinen einen schützenden Einfluss auf pankreatische beta-Zellen haben, wobei die genaue Art ihres Einflusses noch nicht vollends erforscht ist.

Bisher wurden vier verschiedene Glutaredoxine in Säugetieren nachgewiesen. Glrx 1 und Glrx 2 sind Dithiol-Glutaredoxine und Glrx 3 und Glrx 5 zählen zu den Monothiol-Glutaredoxinen (Hanschmann *et al.*, 2013). Glrx 2 und Glrx 3 wurden erstmals aus E. coli bei Null-Mutationen ohne Trx 1 und Glrx 1 isoliert (Fernandes and Holmgren, 2004). Glrx 2 spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen oxidativen Stress, insbesondere gegen H₂O₂ (Vlamis-Gardikas *et al.*, 2002). In einer Studie zeigte Glrx 2 schützende Eigenschaften vor Dopamin-vermittelter Apoptose bei zerebralen Neuronen (Daily *et al.*, 2001). Glrx 3 hat eine wichtige Funktion bei der Regulation der Eisenhomöostase und auch zur Verteilung von Eisen (Ojeda *et al.*, 2006; Haunhorst *et al.*, 2013). Zudem schützt Glrx 3 Zellen ebenfalls gegen oxidativen Stress. Ein kompletter Verlust von Glrx 3 führte in Mäuseembryos zum Tod. Dies geschah vermutlich durch die Entwicklung eines defekten Zellzykluses während der späten Mitose (Cheng *et al.*, 2011). Glrx 3 wurde auch eine Rolle in der Regulation und Metastasierung bei Mamma-Karzinomen via Regulation der Redoxhomöostase und NFkappaB-Signalwege zugesprochen (Qu *et al.*, 2011).

In Vorarbeiten aus unserer Forschungsgruppe wurden erniedrigte Konzentrationen und Genexpressionen aller Glutaredoxine in Inselzellen diabetischer db/db Mäuse im Vergleich zu ihren heterozygoten db/+ Gegenstücken gemessen. Hierbei waren die Unterschiede für Glrx 1 und Glrx 5 besonders ausgeprägt, sodass in der vorliegenden Studie diese beiden Glutaredoxine näher untersucht wurden (Petry, 2015).

1.4.2 Glrx 1

Thioredoxine wurden 1964 erstmals als Wasserstoffdonator der Ribonukleotid-Reduktase (RNR) in E. coli entdeckt (Laurent *et al.*, 1964). Sie haben alle eine ähnliche Thioredoxin-Proteinfaltstruktur, welche aus drei alpha-Helices und vier beta-Faltblättern besteht (

Abbildung 5) (Martin, 1995). Die RNR spielt eine unentbehrliche Rolle im Synthesevorgang und Reparatur von DNA (Holmgren and Sengupta, 2010).

Glrx 1 wurde anschließend 1976 als alternativer Elektronendonator in E. coli Mutanten beschrieben, die keine Thioredoxine aufwiesen. Es gehört zur Gruppe der Dithiol-Glutaredoxine und befindet sich überwiegend im Zytoplasma (Holmgren, 1976; Lundberg et al., 2004). Seit der Entdeckung von Glrx 1 wurden noch weitere Funktionen hinzugezählt. Eine wichtige Funktion von Glrx 1 ist die Fähigkeit reversible Formationen von gemischten Disulfiden zu katalysieren (Finkel, 2011). Sie bevorzugen insbesondere die Bildung von gemischten Disulfiden mit GSH via des Monothiol-Reaktionsweges, da sie eine aktive GSH-Bindungsstelle haben (Fernandes and Holmgren, 2004). Diese Bindungen können dann Teil des katalytischen Zykluses oder Teil des regulatorischen Zykluses sein (Åslund and Beckwith, 1999). Glrx 1 ist auch ein spezifischer und effizienter Katalysator der Protein-SSG Deglutathionylierung und trägt somit zur Reversibiliät der S-Glutathionylierung bei (Mieyal et al., 2008). Die Regulation der Thiol-Disulfid-Homöostase via S-Glutathionylierung spielt eine wichtige protektive Rolle indem sie beispielsweise die irreversible Oxidation von Proteinen während oxidativen Stresses verhindern. Veränderungen der Glutaredoxin-Aktivität stören den normalen Redox-Signalweg und führen dadurch zu Pathologien (e.g. Diabetes mellitus) (Shelton, Kern and Mieyal, 2007).

Eine Überexpression von Glrx 1 konnte in einer Studie Retinal Pigment Epithelial (RPE) Zellen vor Apoptose, die durch oxidativen Stress (e.g. H₂O₂) ausgelöst wurde, schützen (Liu *et al.*, 2015). Glrx 1 hat zudem eine Funktion in der Glukose-abhängigen Insulinausschüttung via NADPH. Die genauen Mechanismen sind hierbei jedoch noch nicht vollends erforscht (Ivarsson *et al.*, 2005). Glrx1 reguliert darüber hinaus auch NfkappaB-Signalwege über die Glutathionylierung (Shelton, Kern and Mieyal, 2007).



Abbildung 5: Thioredoxin Proteinfaltstruktur bestehend aus drei alpha-Helices und vier beta-Faltblättern (Martin, 1995).

1.4.3 Glrx 5

Glrx 5 zählt zur Gruppe der Monothiol-Glutaredoxine und befindet sich in den Mitochondrien (Rodriguez-Manzaneque, 2002). Monothiol-Glutaredoxine haben eine vernachlässigbar geringe oder sehr niedrige Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasenaktivität. Sie sind jedoch in vitro und in vivo nachweislich ein wichtiger Bestandteil für die mitochondriale Zusammensetzung von Eisen-Schwefel-Clustern (Rodriguez-Manzaneque, 2002; Zhang *et al.*, 2013). Hierbei transportiert Glrx 5 die Cluster vom Gerüstprotein zu zahlreichen Zielproteinen unter Interaktion mit ISCA 1 und ISCA 2 (Banci *et al.*, 2014). Eine Studie zeigte, dass eine Verminderung des Glrx 5-Proteinlevels zur Akkumulierung von Eisen-Schwefel-Clustern führte (Mühlenhoff *et al.*, 2003).

Eine weitere mögliche Funktion des Glrx 5 ist die Reparatur von Eisen-Schwefel-Clustern (Rodriguez-Manzaneque, 2002; Couturier *et al.*, 2015). Eisen ist ein wichtiges und notwendiges Spurenelement. Beispielsweise sind Proteine mit Eisen-Schwefel Clustern als ROS-Sensoren entscheidend und an der Regulation von zellulären Funktionen beteiligt (Kiley and Beinert, 2003). Freies Eisen ist jedoch ein effizienter Kataylsator der Fenton-Reaktion, welche Hydroxy-Radikale generiert (Winterbourn, 1995). Eisen-Schwefel-Cluster sind wiederum vulnerabel gegenüber oxidativen Schäden und werden somit manchmal als Sensor für Sauerstoff und Eisen genutzt. Weiterhin könnten sie regulatorische Funktionen bei der zellulären Antwort auf oxidative Spezies haben (Beinert and Kiley, 1999).

Hefestämme mit einem Glrx 5-Knockout akkumulieren Eisen in ihren Zellen und sind sehr anfällig gegenüber Hydrogenperoxid, Menandion und insgesamt gegenüber

oxidativem Stress (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999; Rodriguez-Manzaneque, 2002; Fernandes and Holmgren, 2004). In Shiraz-Zebrabärblingen führte ein Mangel von Glrx 5 über den Verlust von Eisen-Schwefel-Clustern zur Störung der Häm-Biosynthese und letztendlich zu einer Anämie und dem Tod der Embryos (Wingert *et al.*, 2005). Ähnliches konnte auch bei einem männlichen Patienten beobachtet werden, der an einem Glrx 5-Mangel litt. Er litt unter anderem mit einer Anämie, einer Eisenüberladung und einem Typ 2 Diabetes mellitus (Camaschella *et al.*, 2007). Diabetes ist eine mögliche Folgeerscheinung von Eisenüberladung, wobei noch nicht alle molekularen Mechanismen dieser Verbindung erforscht sind. Epidemiologische Studien zeigten jedoch statistisch signifikante Assoziationen zwischen Körpereisen und Diabetes (Simcox and McClain, 2013; Basuli *et al.*, 2014).

1.5 MIN6-Zelllinie

Die MIN6-Zellline entstammte ursprünglich einem transgenen Mausinsulinom. Die transgenen Mäuse bildeten im Alter von dreizehn Wochen pankreatische beta-Zell-Tumore ("Insulinom") und aus einem geklonten, einzelnen Tumor entstand die MIN6-Zelllinie (Miyazaki *et al.*, 1990). Sie ist inzwischen eine der meist genutzten beta-Zelllienien in der diabetischen Grundlagenforschung (Skelin, Rupnik and Cencic, 2010). MIN6 Zellen haben morphologische Ähnlichkeiten zur pankreatischen beta-Zelle. Sie bilden ausschließlich GLUT-2 Transporter aus, welche notwendig für die glukoseabhängige Insulinsekretion ist (Miyazaki *et al.*, 1990). Es kann somit angenommen werden, dass die MIN6-Zelllinie in ihrem Glukose-Metabolismus und ihrer glukoseabhängigen Insulinsekretion der normalen pankreatischen beta-Zelle stark ähneln (Ishihara *et al.*, 1993).

Mäuse haben, wie Ratten auch, zwei Insulingene, Ins 1 und Ins 2 (Markussen, 1970; Bünzli *et al.*, 1972). Diese haben vermutlich dieselbe Herkunft und beide Gene sind unentbehrlich zur Aufrechterhaltung wichtiger Funktionen in Mäusen. Sie sind beide im Pankreas exprimiert und codieren für Proinsulinpeptide (Shiao *et al.*, 2008).

Auch MIN6-Zellen exprimieren als murine Zelllinie beide Insulingene. Hierbei ist die Genexpression für Ins 1 und Ins 2 bei frühen Passagen annäherend gleich, in späteren Passagen verringert sich die Ins 1-Genexpression jedoch zusehends (Roderigo-Milne *et al.*, 2002).

1.6 Ziele der Arbeit

Typ 2 Diabetes mellitus hat einschließlich seiner Begleit- und Folgeerkrankungen eine enorme medizinische und wirtschaftliche Relevanz. Im Zentrum der Pathophysiologie steht hierbei die beta-Zelle. In zahlreichen Studien wurde bereits nachgewiesen, dass freie Fettsäuren und oxidativer Stress eine wesentliche Rolle zum Verlust funktionaler beta-Zellmasse darstellen und Daten der Grundlagenforschung weisen auch darauf hin, dass zelluläre Hypoxie mitursächlich ist. Es gibt zudem Andeutungen darauf, dass Glutaredoxine eine protektive Rolle in dieser destruktiven Umgebung für die beta-Zelle einnehmen. Die exakte Funktion, Regulation und Zielproteine sind jedoch noch weitestgehend unerforscht. In der vorliegenden Arbeit sollten nun weitere Erkenntnisse über die Glutaredoxine, insbesondere über ihre Regulation unter Stressbedingungen, gewonnen werden.

Die Ziele der Studie waren im Einzelnen:

- geeignete Fettsäurekonzentrationen von Palmitin- und Ölsäure anhand der Viabilität der MIN6-Zellen zu ermitteln.
- die Messung der Protein- und Genexpression von Insulin im Stressmodell unter Fettsäuren, Hypoxie und der Kombination beider Stressoren als Hauptanzeige der MIN6-Zellfunktion.
- die Messung der Protein- und Genexpression von Glrx 1 im Stressmodell unter Fettsäuren und Hypoxie.
- die Messung der Protein- und Genexpression von Glrx 5 im Stressmodell unter Fettsäuren, Hypoxie und der Kombination beider Stressoren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinie

Bei den durchgeführten Experimenten wurde eine beta-Zelllinie von transgenen Mäusen, die sogenannte mouse insulinoma cells 6th subclone (MIN6)-Zelllinie, verwendet. Diese wurde von Dr. Sigurd Lenzen, Institut für klinische Biochemie, Universität Hannover, Deutschland, zur Verfügung gestellt und stammt ursprünglich von Dr. Miyazaki, Institut für medizinische Genetik, Kumamoto Universität, Japan.

2.1.2 Geräte

Tabel	le 3:	Geräte

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsfirma
Abzug	Köttermann (Uetze/Hänigsen,Deutschland)
ELISA reader Mithras LB 940	Berthold Technologies (Bad Wildbad,
	Deutschland)
Gefrierschrank	Bosch (Stuttgart, Deutschland)
Hypoxiekammer	Keutz Keutz (Reichskirchen, Deutschland)
Inkubator für Hypoxiekammer B	Heraeus (Hanau, Deutschland)
5028	
Inkubator Hera cell 150	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Kühlschrank	Bosch (Stuttgart, Deutschland)
Lichtmikroskop Labovert FS	Leitz (Wetzlar, Deutschland)
Mehrkanalpipette	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Multipette	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,100	Brand (Wertheim, Deutschland)
mm; 0.0025 mm ²)	
Pipette pipetus-forty	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt,
	Deutschland)
Pipetten	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Plattenschüttler	IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Plattenzentrifuge	peqlab (Erlangen, Deutschland)
Präzisionswaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)

RT-PCR Gerät StepOnePlus	Applied Biosystems (Waltham, Massachusetts,
	USA)
Spektrophotometer NanoDrop ND	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts,
1000	USA)
Sicherheitswerkbank Hera safe KS	Heraeus (Hanau, Deutschland)
12	
Thermal Cycler	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Wasserbad WBS-8	Fried Electric (Haifa, Israel)
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland).

2.1.3 Gebrauchsartikel

Tabelle 4: Gebrauchsartikel

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsfirma
96-well qRT-PCR-Platten	Applied Biosystems (Waltham,
	Massachusetts, USA),
96-well Zellkulturplatte (steril)	Thermo Scientific (Waltham,
	Massachusetts, USA),
Cellstar serological pipette (5 ml, 10 ml, 25	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen,
ml)	Deutschland)
Cellstar tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen,
	Deutschland)
Cellstar Zellkulturflaschen (steril)	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen,
	Deutschland)
Cellstar Zellkulturschalen (60 mm, 96 mm)	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen,
	Deutschland)
Einmalspritze (15 ml)	Braun (Melsungen, Deutschland)
Microtubes (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Millex Syringe-driven filter unit $(0,22 \ \mu m)$	Merck Millipore Ltd. Darmstadt,
	Deutschland)
Multipettenspitzen	MBT Brand (Gießen, Deutschland)
PCR-Tubes (0,2 ml, 0,5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
RNase freie Pipettensitzen (10 µl, 20 µl,	Axygen Scientific (Kaiserslautern,
100 µl, 1000 µl)	Deutschland)
Zellschaber	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen,
	Deutschland)

2.1.4 Chemikalien

Tabelle 5: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsfirma
0,1 M DTT	Invitrogen (Waltham, Massachusetts, USA)
0,5 µg/µl Oligo d(T)	Invitrogen (Waltham, Massachusetts, USA)
10x DNase Reaction buffer	Invitrogen (Waltham, Massachusetts, USA)
25 mM EDTA	Invitrogen (Waltham, Massachusetts, USA)
5x First Strand Buffer	Invitrogen (Waltham, Massachusetts, USA)
DMEM (high glucose)	Gibco (Waltham, Massachusetts, USA)
DNase I amplification grade	Invitrogen (Waltham, Massachusetts, USA)
Dulbeccos PBS (1x)	PAA (Cölbe, Deutschland),
Ethanol (100% ig)	Sigma (München, Deutschland)
Ethanol (70% ig)	SAV-Liquid Production GmbH (Flintsbach
	am Inn, Deutschland)
FCS	biowest (Nuaillé, Frankreich)
Fettsäurefreies bovines Serumalbumin	PAA (Cölbe, Deutschland),
	biowest (Nuaillé, Frankreich)
Glycerol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Hypoxiegas (2 % Sauerstoff)	Praxair (Düsseldorf, Deutschland)
iQ [™] SYBR [®] Green Supermix	Bio-Rad (Hercules, Kalifornien, USA)
10mM dNTP Mix	Invitrogen (Waltham, Massachusetts, USA)
NaCl	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NaOH	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NP-40	US-Biological (Salem, Massachusetts, USA)
Ölsäure	Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland)
Palmitinsäure	Sigma (München, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Gibco (Waltham, Massachusetts, USA)
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma (München, Deutschland)
Protease Inhibitor Cocktail (25x)	Roche (Mannheim, Deutschland)
Proteinassay	Bio-Rad (Hercules, Kalifornien, USA)
Proteinstandard (2 mg/ml)	Sigma (München, Deutschland)
RLT-Puffer	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RNase freies Wasser	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Steriles Wasser	Braun (Melsungen, Deutschland)
SuperScript® III reverse Transkriptase	Invitrogen (Waltham, Massachusetts, USA)
Tris-HCl	Sigma (München, Deutschland)
Tritriplex III	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Trypanblau	Lonza (Walkersville, MD, USA)
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco (Waltham, Massachusetts, USA)
β-Mercaptoethanol	Gibco (Waltham, Massachusetts, USA)
	Sigma (München, Deutschland)

2.1.5 Puffer, Lösungen und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Mastermix (cDNA-Synthese)	4 µl 5x First Strand Buffer
	2 μl 0,1M DTT
	1 µl 10 mM dNTP Mix
	1 μl 0,5 μg/μl Oligo d(T)
	1 µl SuperScript® III reverse Transkriptase
Mastermix (qRT-PCR)	5 μl iQ™ SYBR [®] Green Supermix
	3,2 µl RNase freies Wasser
	0,3 µl Primer (vorwärts + rückwärts 1:1, dann
	1:10 Verdünnung mit RNase freiem Wasser)
MIN6 Kulturmedium	500 ml DMEM (high glucose)
	5 ml Penicillin/Streptomycin
	100 ml FCS
	600 μl β-Mercaptoethanol
NP-40 Puffer nach abcam	0,8 g NaCl
	10 ml Glycerol
	1 ml NP-40
	2 ml EDTA (0,93 g Tritriplex III in 25 ml a.d.
	lösen)
	ad 100 ml mit Tris-HCl (pH 8)
Zelllysispuffer pro Zellkulturschale	237,5 µl NP-40 Puffer nach abcam
(Proteinbestimmung)	10 µl Protease Inhibitor Cocktail (25x)
	2,5 µl Phosphatase Inhibitor 3
Zelllysispuffer pro Zellkulturschale	346,5 µl RLT-Puffer
(qRT-PCR)	3,5 μl β-Mercaptoethanol

Tabelle 6: Puffer, Lösungen und Medien

2.1.6 Kits

Tabelle /: K

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsfirma		
Glrx1 (mouse) ELISA	Wuhan EIAab Science (Wuhan, China)		
Glrx5 (mouse) ELISA	CUSABIO Biotech Co., LTD (Wuhan, China)		
Insulin (mouse) ELISA	DRG Instruments GmbH (Marburg, Deutschland)		
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)		
Vybrant MTT Cell Proliferation	Molecular Probes, Inc (Waltham/Massachusetts,		
Assay Kit	USA)		

2.1.7 Primersequenzen für die qRT-PCR

Ziel	Sequenz (5' zu 3')
rpl32 fwd	GGA GAA GGT TCA AGG GCC AG
rpl32 rev	GCG TTG GGA TTG GTG ACT CT
Ins-1 fwd	TAT AAA GCT GGT GGG CAT CC
Ins-1 rev	GGG ACC ACA AAG ATG CTG TT
Ins-2 fwd	GGC TTC TTC TAC ACA CCC ATG T
Ins-2 rev	AAG GTC TGA AGG TCA CCT GCT C
Glrx-1 fwd	GAG CAG TTG GAC GCG CTG G
Glrx-1 rev	CTC GCC ATT GAG GTA CAC TTG C
Glrx-5 fwd	GAA GAA GGA CAA GGT GGT GGT CTT C
Glrx-5 rev	GCA TCT GCA GAA GAA TGT CAC AGC

Tabelle 8: Primersequenzen

2.1.8 Software

Tabelle	9:	Software
---------	----	----------

Software	Bezeichnung/Version
Elisa Reader (Spektrophotometer)	Microwinn 2000
Graphpad Prism	Version 8.0c
Microsoft	Office Excel (2015)
Nano Drop ND 1000	Software V3.8.1
StepOne (qRT-PCR)	V2.3

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Arbeit mit den Zellen erfolgte an einer Sicherheitswerkbank ("Sterilbank") mit sterilen Produkten, welche desinfiziert oder autoklaviert wurden. In Ruhezeiten wurde die Sterilbank durch UV-Licht sterilisiert.

Die MIN6-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank in Kulturmedium (Tabelle 6) kultiviert und per Trypsinierung gesplittet.

2.2.1.1 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden in Kryoröhrchen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Röhrchen direkt aus dem Stickstoff in ein 37 °C warmes Wasserbad gegeben und leicht geschwenkt, bis sich die Zellsuspension von der Wandung gelöst hat. Anschließend wurden die Zellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wurden erst 2 ml 37 °C warmes Medium tröpfchenweise hinzugegeben und das Röhrchen anschließend mit MIN6-Kulturmedium auf 8 ml (Tabelle 6) aufgefüllt. Nach 4-minütiger Zentrifugation bei 21 °C und 1200 rpm wurde das Medium schnellstmöglich entfernt und das Pellet durch leichtes Aufklopfen des Röhrchens gelockert. Die gelösten Zellen wurden in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium resuspendiert, in eine T75-Zellkulturflasche gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel um das restliche, für die Zellen toxische DMSO, welches sich im Einfriermedium befand, zu entfernen.

2.2.1.2 Passagieren von Zellen

Zum Passagieren der zu 70-80 % konfluent gewachsenen Zellen wurde zuerst das alte Kulturmedium abgesaugt. Anschließend erfolgte eine einmalige Waschung mit 1-fach PBS. Daraufhin wurde 0,05 % iges Trypsin-EDTA auf die Zellen gegeben und für 3 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach mikroskopischer Überprüfung der Zellablösung wurde etwas warmes Medium hinzugegeben, um das Trypsin-EDTA zu inaktivieren. Die Zellsuspension wurde hiernach in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt und bei 21 °C und 1200 rpm 4 Minuten lang zentrifugiert. Danach wurde das Medium über dem Zellpellet abgesaugt und durch leichtes Aufklopfen des Röhrchens das Zellpellet gelöst. Die gelösten Zellen wurden in frisches, vorgewärmtes Kulturmedium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Nach Ablösen der Zellen durch Trypsinierung und anschließender Zentrifugation wurde das alte Medium verworfen, das Pellet durch Aufklopfen gelockert und in 1 ml frischem, warmen Kulturmedium resuspendiert. Daraufhin wurde eine 1:50 und eine 1:100 Verdünnung mit Trypanblau angefertigt. Die Neubauer-Kammer wurde leicht angehaucht und das Deckgläschen fest angedrückt, bis die Newton'schen Interferenzlinien zu sehen waren. Die Verdünnungen wurden daraufhin in die Zählkammer einpipettiert. Hierbei wurde die Pipettenspitze an der Kante des Deckgläschens angesetzt und die Suspension durch die wirkenden Kapillarkräfte angesaugt. Unter dem Mikroskop wurden die vier großen, äußeren Quadrate, welche in sechszehn kleine Quadrate unterteilt sind, gezählt. Dabei wurden jeweils die Zellen, die auf den linken und unteren Maßlinien lagen, mitgezählt, die Zellen auf den oberen und rechten Linien nicht. Die Zellzahl ließ sich dann nach folgender Formel berechnen:

Zellzahl/ml = # der ausgezählten Zellen x 1000 x 2,5 x Verdünnung

2.2.2 Herstellung der Fettsäure-Medien

Für beide Fettsäuren, Palmitinsäure und Ölsäure, wurden Endkonzentrationen von 0 μ M, 500 μ M und 750 μ M benötigt.

Als Erstes wurden zwei Stocklösungen (200 mM und 300 mM) hergestellt. Für die 200 mM Stocklösungen wurden jeweils 51,28 mg Palmitinsäure bzw. 56 mg Ölsäure in jeweils 1 ml 100 % igem Ethanol gelöst. Für die 300 mM Stocklösungen wurden wiederum 76,92 mg Palmitinsäure und 84,75 mg Ölsäure abgewogen und ebenfalls wie oben gelöst. Daraufhin wurde zur Herstellung von 100 ml fettsäurefreiem BSA-Medium 12,5 g fettsäurefreies BSA in 100 ml Kulturmedium gelöst. Anschließend wurde zur Herstellung von jeweils 30 ml Fettsäure-Medium in den verschiedenen Konzentrationen das in Tabelle 10 gezeigte Pipettierschema verwendet.

Fettsäure-	fettsäurefreies	100%iges	Fettsäure-	Fettsäure-
Konzentration	BSA-Medium	Ethanol (ml)	Stock	Stock
(mM)	(ml)		(200mM) (ml)	(300mM) (ml)
0	29,25	0,75	-	-
5	29,25	-	0,75	-
7,5	29,25	-	-	0,75

Tabelle 10: Pipettierschema der Fettsäure-Medien

Daraufhin wurde das Fettsäure-Medium in verschiedene Röhrchen überführt und mit Stickstoff überschichtet. Zum sorgfältigen Lösen des Mediums wurden die Röhrchen über Nacht bei 37 °C geschüttelt und anschließend zur Aufbewahrung zur späteren Verwendung bei -20 °C stehend eingefroren.

Zur Herstellung des Fettsäure-Endmediums musste die entsprechende Fettsäure nochmals 1:10 mit Kulturmedium verdünnt werden. Dies erfolgte erst kurz vor Ansetzen jedes Versuches. Hiernach wurden dann die gewünschten Endkonzentrationen 0 μ M, 500 μ M und 750 μ M erreicht.

2.2.3 Aufbereitung der Proben

Es wurden jeweils Proben für die Proteinanalyse (s. 2.2.3.2) und qRT-PCR (s. 2.2.3.1) entnommen.

Am ersten Tag erfolgte das Aussäen der Zellen in die Zellkulturschalen. Hierbei wurden unterschiedlich große Zellkulturschalen verwendet. Die Zellen für die qRT-PCR wurden in Schalen mit 60 mm Durchmesser und die Zellen für die Proteinanalyse in Schalen mit 96 mm Durchmesser ausgesät. Die Arbeitsschritte entsprachen denen des Passagierens (s. 2.2.1.2). Mithilfe einer Multipette wurden die Zellen gleichmäßig auf die vorbereiteten, mit frischem Kulturmedium überdeckten Zellkulturplatten ausgesät und für 24 h in den Brutschrank (37 °C und 5 % CO₂) gestellt.

Am zweiten Tag wurden die nun an den Zellkulturplatten adhärent gewachsenen Zellen mit dem jeweiligen Fettsäure-Medium behandelt. Zuerst wurde das Fettsäure-Endmedium mithilfe einer 15 ml Einmalspritze und eines 0,22 µm Filters mit geringer Proteinbindung steril filtriert und in der Verdünnung 1:10 mit Kulturmedium vermischt. Anschließend wurde das alte Medium abgesaugt. Danach wurde auf die Schalen mit 96 mm Durchmesser je 6 ml und auf die Schalen mit 60 mm Durchmesser je 5 ml Fettsäure-Endmedium gegeben. Die eine Hälfte der Platten jeder Fettsäurekonzentration wurde bei Normoxie in den Inkubator (37 °C und 5 % CO₂) gestellt und die andere Hälfte in die Hypoxiekammer (37 °C und 2 % O₂). Vom Zeitpunkt des Einstellens an startete die 24 h bzw. 48 h Inkubation.

Am dritten Tag erfolgte erneut die sterile Filtration des Fettsäure-Endmediums und ein Mediumwechsel bei den Schalen mit 48 h Inkubationszeit. Eine kurzzeitige Reoxygenierung der Hypoxie-Platten musste hierbei in Kauf genommen werden. Anschließend wurden die Proben mit 24 h Inkubationszeit nach den in Kapiteln 2.2.3.1 und 2.2.3.2 beschriebenen Protokollen gesammelt.

Am vierten Tag des laufenden Versuches wurden abschließend die Proben mit 48 h Inkubationszeit gesammelt. Die Bearbeitung der Proben erfolgte nach den gleichen Protokollen wie die der 24 h Proben (s. 2.2.3.1 und 2.2.3.2).

2.2.3.1 Herstellung der Proben für die qRT-PCR

Zuerst wurde der Überstand verworfen und im Anschluss die Platte zwei Mal mit 1-fach PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 350 µl Zelllysispuffer (Tabelle 6) lysiert und mit einem sterilen Zellschaber zusammengeschabt. Die Zellsuspension wurde dann in ein Röhrchen überführt, welches DNA-, DNase- / RNase und PCR-Inhibitoren-frei ist, und zur Aufbewahrung bei -20 °C eingefroren.

2.2.3.2 Herstellung der Proben für die Proteinanalyse

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Als Erstes wurde 1 ml Überstand entnommen, welcher zur Aufbewahrung bei -80 °C gelagert wurde. Daraufhin wurde der restliche Überstand verworfen und die Platte zwei Mal mit eiskaltem 1-fach PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 200 µl Zelllysispuffer (Tabelle 6) versetzt und mit einem Zellschaber zusammengeschabt. Nach Überführung in ein geeignetes Reagiergefäß wurde die Zellsuspension erst 10 Sekunden gevortext und anschließend 20 Minuten lang auf Eis inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde erneut 10 Sekunden gevortext, dann bei 4 °C und 12000 rpm 20 Minuten lang zentrifugiert. Zum Schluss wurde der Überstand in ein frisches Röhrchen pipettiert und ebenfalls bei -80 °C gelagert. Das Zellpellet wurde verworfen.

2.2.4 MTT- Test

Zur Ermittlung der Zellviabilitätwurde der Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit (Katalognr.: V-13154) durchgeführt. Alle Proben wurden in Triplikaten pipettiert. Zuerst wurden 0,1x10⁶ MIN6-Zellen/Well in 96-well-Platten ausgesät und bei 37 °C für 24 h

inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Kulturmedium entfernt und mit 200 μ l des jeweiligen Behandlungsmediums (Palmitinsäure bzw. Ölsäure) ersetzt. Die Konzentrationen waren hierbei für beide Fettsäuren 0 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M, 750 μ M, 1000 μ M, 2000 μ M, 5000 μ M und 10000 μ M. Im Anschluss wurden die Zellen erneut bei 37 °C für 24 h in den Inkubator gestellt. Am dritten Tag wurde das alte Behandlungsmedium entfernt und mit 100 μ l neuem Behandlungsmedium ersetzt. Anschließend wurde eine 12 mM MTT Stocklösung hergestellt, von welcher 10 μ l in jedes Well pipettiert wurde. Es wurde auch eine Negativ-Kontrolle nur aus Kulturmedium bestehend eingeschlossen, welcher später bei der Berechnung als Blank diente. Die Proben wurden nun für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100 μ l SDS-HCl in jedes Well hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation bei 37 °C für 4 h. Die abschließende Messung erfolgte bei 570 nm im Spektrophotometer. Die Daten wurden weiterhin anhand folgender Formel ausgewertet:

Zellproliferation (%)

$$= \left(\frac{Absorption_{behandelte\ Probe} - Absorption_{Blank}}{Absorption_{unbehandelte\ Probe} - Absorption_{Blank}}\right) \times 100$$

2.3 Proteinanalyse

2.3.1 ELISA

2.3.1.1 Insulin ELISA

Es wurde der Maus-Insulin ELISA von DRG (Katalognr.: EIA-3439) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das Enzym-Konjugat und der Waschpuffer angesetzt. Die Lysate wurden 1:8000 und die Überstände 1:500 verdünnt. Anschließend wurden jeweils 10 µl Kalibrator und Probe nach Protokoll in die dazugehörigen Wells pipettiert. Darauf wurden jeweils 100 µl Enzym-Konjugat in jedes Well gegeben. Nach einer 2-stündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler wurde die Platte sechs Mal mit Waschpuffer gewaschen und sorgfältig auf Papier trocken geklopft. Daraufhin wurden 200 µl TMB-Substrat in jedes Well pipettiert und 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss
wurde 50 µl Stopp-Lösung in jedes Well gegeben und die Messung bei 450 nm im ELISA-Reader durchgeführt.

2.3.1.2 Glrx 1 und Glrx 5 ELISA

Die Glrx 1 und Glrx 5 ELISAs wurden nach Herstellerprotokoll von Wuhan EIAab Science (Katalognr.: E12990m) bzw. Cusabio (Katalognr.: CSB-EL009524MO) durchgeführt. Die Lysate beim Glrx5 Elisa wurden 1:10 verdünnt und die restlichen Proben wurden unverdünnt gemessen. Anschließend wurden jeweils 100 µl Standard und Probe in die dazugehörigen Wells pipettiert. Nach einer 2-stündigen Inkubationszeit bei 37 °C wurde die Platte ausgekippt, jedoch nicht gewaschen. Daraufhin wurden 100 µl Biotin-Antikörper in jedes Well pipettiert und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Platte drei Mal gewaschen und sorgfältig trocken geklopft. Im Anschluss wurden 100 µl HRP-Avidin in jedes Well gegeben und wieder 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Platte nun fünf Mal gewaschen und daraufhin 90 µl TMB-Substrat in jedes Well pipettiert. Nach einer 15-30-minütigen Inkubation bei 37 °C im Dunkeln wurden 50 µl Stopp-Lösung in jedes Well gegeben und die Messung bei 450 nm im ELISA-Reader durchgeführt.

2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zuerst wurden die Proteinstandards (2 mg/ml) nach Anleitung verdünnt und anschließend kurz gevortext. Daraufhin wurden auch die Proben 1:10 mit aqua dest. verdünnt und ebenfalls gevortext. In jedes Well wurden 10 μ l Standard bzw. Probe in Doppelbestimmung pipettiert. Daraufhin wurde die Proteinassaylösung mit aqua dest. 1:5 verdünnt und 200 μ l in jedes Well gegeben. Die anschließende Messung erfolgte bei 600 nm im ELISA-Reader.

2.4 Genexpressionsanalyse

2.4.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit (Katalognr.: 74104 und 74106). Die Proben wurden auf Eis langsam aufgetaut und anschließend gevortext. Jede Probe wurde 1:1 in 70 %igem Ethanol gelöst und in eine RNeasy Minisäule gegeben. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Inhalt des unteren Kompartimentes verworfen. In jede Minisäule wurde nun 700 µl RW1 Puffer pipettiert. Im Anschluss wurde eine weitere Zentrifugation nach obiger Beschreibung durchgeführt und der Inhalt des unteren Kompartimentes verworfen. Nun wurden 500 µl RPE Puffer in die Minisäulen pipettiert, wieder wie beschrieben zentrifugiert und der Inhalt des unteren Kompartimentes verworfen. Dieser Arbeitsschritt wird im Folgenden ein Mal wiederholt. Im nächsten Schritt werden die Minisäulen noch ein Mal wie beschrieben zentrifugiert und im Anschluss auf bereits beschriftete RNase, DNase freie Safelock Tubes gesetzt. Daraufhin wurden 20 µl RNase freies Wasser direkt auf die Membran der Minisäule pipettiert und anschließend 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt eluiert die RNA aus der Säulenmembran. Zum Schluss wurden die Proben auf Eis gelagert und der RNA-Gehalt mittels Spektrophotometer (NanoDrop1000) gemessen.

2.4.2 cDNA-Synthese

Zuerst erfolgte die Berechnung der benötigten RNA-Menge in μ l zum Umschreiben von 1 μ g RNA nach Messung des RNA-Gehaltes. War der RNA-Gehalt niedrig, so wurde statt 1 μ g RNA beispielsweise 0,125 μ g RNA umgeschrieben, um das benötigte Volumen von 8 μ l nicht zu überschreiten. Die Probe wurde nach Ablauf der cDNA-Synthese entsprechend verdünnt, um in allen Proben die gleiche Endkonzentration zu erhalten. Die anschließenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. In beschriftete 0,2 ml PCR-Röhrchen wurden die jeweiligen berechneten Mengen an Proben pipettiert und jeweils auf 8 μ l mit RNAse, DNase freiem Wasser aufgefüllt. Zu jeder Probe wurde daraufhin 1 μ l DNase I amplification grade und 1 μ l 10x DNase Reaction buffer hinzugegeben, die Probe herunterzentrifugiert und im Thermo-Cycler (Programm 1) inkubiert. Im Folgenden wurde 1 μ l EDTA (25 mM) zu jeder Probe hinzupipettiert und wieder in den Thermo-Cycler (Programm 2) gegeben. Zu jeder Probe wurde nun 9 μ l Mastermix (Tabelle 6) hinzugegeben und zum Abschluss wieder in den Thermo-Cycler (Programm 3) gestellt. Die genauen Konditionen der genannten cDNA-Synthese Programme sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Thermo-Cycler Programme für die cDNA-Synthese

	Programm 1	Programm2	Programm 3
1.	15 Minuten bei 37°C	15 Minuten bei 65°C	50 Minuten bei 50°C
2.	-	5 Minuten bei 4°C	15 Minuten bei 72°C
3.	-	-	bis Entnahme bei 4°C

2.4.3 Quantitative Real-Time-PCR

2.4.3.1 Effizienzermittlung der PCR-Primer

Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Forward- und Reverse-Primer wurden 1:1 gemischt und das Primergemisch anschließend 1:10 mit RNase- und DNase-freiem Wasser verdünnt.

Die verwendeten Primer (*rpl32, Ins1, Ins2, Glrx1, Glrx5*) wurden jeweils auf cDNA von MIN6-Zellen getestet. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe nach Tabelle 12 mit RNaseund DNase-freiem Wasser hergestellt. Als Negativkontrolle wurde statt cDNA nur RNase- und DNase-freies Wasser aufgetragen.

Tabelle 12: cDNA Verdünnungsreihe für die Primerverifizierung

MIN6	1:1	1:5	1:10	1:15	1:20	1:40	1:100	1:200

Zu 1,5 µl cDNA-Verdünnung bzw. 1,5 µl Negativ-Kontrolle wurden 8,5 µl Mastermix (Tabelle 6) gegeben. Alle Proben und Negativ-Kontrollen wurden in Triplikaten pipettiert. Nach Abdeckung und kurzer Herunterzentrifugation der Proben wurden sie in einem StepOnePlus System gemessen. Die Amplifikation begann hierbei mit der Aktivierung der Enzyme bei 95°C. Anschließend folgten abwechselnd Denaturierung und Elongation für 40 Wiederholungen. Zum Abschluss der PCR schloss sich eine Schmelzkurvenbestimmung an. Eine genaue Darstellung des Ablaufes der qRT-PCR ist in Tabelle 13 gegeben.

	Reaktionsschritt	Wiederholungen	Temperatur	Dauer
Amplifikation	Aktivierung	1	95°C	10 min
	Denaturierung	40	95°C	10 s
	Primeranlagerung		60°C	1 min
	und Elongation			
Schmelzkurve	Denaturierung	1	95°C	15 s
	Schmelzen	40	60°C	1 min

Tabelle 13: Ablauf der qRT-PCR mit anschließender Schmelzkurzvenbestimmung

Um die Primereffizienz zu errechnen wurden die gemessenen Ct-Mittelwerte gegen die Log10-transformierten RNA-Mengen in einer Kurve aufgetragen. Anschließend wurde eine Standardgerade durch diese gelegt und unter Ermittlung der Steigung konnte die Effizienz nach folgenden Formeln berechnet werden:

$$Effizienz = 10^{-\frac{1}{Steigung}}$$
$$Effizienz (\%) = ((10^{-\frac{1}{Steigung}}) - 1) * 100$$

Somit konnte für den rpl32-Primer mit einer Steigung von -4,218 eine Effizienz von 1,7 errechnet werden. Für die Glrx 1- und Glrx 5-Primer wurden jeweils Steigungen von - 2,817 und -2,341 ermittelt und somit Effizienzen von 2,2 und 2,6 erzielt. Die Effizienz des Ins 1-Primers war mit einer Steigung von -3,243 bei 2,0 und der Ins 2-Primers wies mit einer Steigung von -3,381 eine Effizienz von 1,9 auf (Tabelle 14).

Tabelle 14: Effizienzermittlung der PCR-Primer

Gen	Effizienz	Effizienz (%)
rpl32	1,7	73
Glrx 1	2,2	126
Glrx 5	2,6	167
Ins 1	2,0	103
Ins 2	1,9	98

2.4.3.2 Durchführung der qRT-PCR

Die Arbeitsschritte der qRT-PCR entsprachen denen der Effizienzermittlung (s. 2.4.3.1). Der einzige Unterschied bestand in der Verdünnung der cDNA, da bei der eigentlichen qRT-PCR keine Verdünnungsreihe hergestellt wurde. Die cDNA wurde entsprechend verdünnt, sodass in allen Proben die gleiche Endkonzentration gegeben war. Zur Berechnung der relativen Genexpression wurde mithilfe nachfolgender Formel gegen das Referenzgen rpl32 normalisiert:

Ratio (Referenzgen/Zielgen) = $2^{C_T(Referenzgen)-C_T(Zielgen)}$

2.5 Statistik

Die Statistik wurde mittels GraphPad Prism 8 (Graph Pad Software, San Diego, USA) unter Verwendung des parametrischen T-Testes und der Zwei-Wege ANOVA verwendet. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte \pm SEM, und ein p-Wert von 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Die Signifikanzstufen wurden wie folgt markiert: *: p < 0,05, **: p < 0,005, ***: p < 0,0001.

3 Ergebnisse

3.1 Gute Viabilität der MIN6-Zellen unter Fettsäurebehandlung

Um den Effekt einer Behandlung mit Palmitin- und Ölsäure auf die MIN6-Zelle abschätzen zu können, wurde zunächt eine entsprechende Behandlung mit unterschiedlichen Fettsäurekonzentrationen von 100 bis 10000 µM durchgeführt. Die Stoffwechselaktivität der Zellen wurde mittels MTT-Tests evaluiert, um so geeignete Fettsäurekonzentrationen für den anschließenden Zellversuch zu ermitteln. Die Viabilität der Zelle korreliert hierbei mit ihrer Stoffwechselaktivität.

Unter Behandlung mit Palmitinsäure (Abbildung 6) kam es ab einer Konzentration von 5000 μ M zu einem Abfall der Zellviabilität unter 75 % und erst ab einer Konzentration von 10000 μ M zu einem Abfall unter 50 %.



Abbildung 6: MTT Test zur Überprüfung der Zellviabilität bei verschiedenen Palmitinsäurekonzentrationen. Abfall der Zellviabilität bei 5000 μ M unter 75% und bei 10000 μ M unter 50%.

(n = 3 Experimente pro Palmitinsäurekonzentration)

Unter Ölsäure (Abbildung 7) kam es auch ab einer Konzentration von 10000 μ M zu einem Abfall der Zellviabilität unter 50 %, jedoch verblieb sie bei 5000 μ M noch knapp über 75 %.

Die Konzentrationen 500 μ M und 750 μ M wurden letztendlich für den Zellversuch gewählt, da die MIN6-Zellen hierbei unter Behandlung mit beiden Fettsäuren eine nahezu unbeeinträchtigte Zellviabilität aufwiesen (Tabelle 15).



Abbildung 7: MTT Test zur Überprüfung der Zellviabilität bei verschiedenen Ölsäurekonzentrartionen. Abfall der Zellviabilität bei 10000 μ M unter 50%. (n = 3 Experimente pro Ölsäurekonzentration)

Konzentration [µM]	Zellviabilität [%]
Palmitinsäure	
500 μΜ	93,50 %
750 μΜ	87,96 %
Ölsäure	
500 μΜ	95,16 %
750 μΜ	92,77 %

Tabelle 15: Zellproliferation bei gewählten Fettsäurekonzentrationen

Die Zellen wurden daher im Rahmen der folgenden Versuche mit 500 bzw. 750 µM der entsprechenden Fettsäure unter Normoxie bzw. Hypoxie (2 % O₂) kultiviert.

3.2 Einfluss von Fettsäuren

3.2.1 Einfluss von Fettsäuren auf Insulin

3.2.1.1 Signifikante Erniedrigung des Insulingehaltes unter Palmitinsäurebehandlung und tendenzielle Erniedrigung der Insulinsekretion und der Insulingenexpression

Die ermittelten Konzentrationen aus den ELISAs wurden mit der Gesamtproteinkonzentration der jeweiligen Probe aus der Proteinbestimmung nach Bradford ins Verhältnis gesetzt. Sowohl die Lysate als auch die Proteinkonzentrationen im Medium wurden untersucht. Die Messungen in den Lysaten repräsentierten hierbei den Insulingehalt der MIN6-Zelle, und jene im Medium wurden als Marker für das sezernierte Insulin verwendet. Zur Bestimmung der Genexpression der Proteine wurde jeweils die mRNA-Expression gemessen.

Die Insulinsekretion erniedrigte sich nach 48 h Kultivierungszeit unter Normoxie tendenziell mit Erhöhung der Palmitinsäurekonzentration (Abbildung 8). Nach 24 h Kultivierungszeit war jedoch noch keine wesentliche Veränderung zu sehen (Abbildung 8).

Palmitinsäure erniedrigte den Insulingehalt signifikant bei Behandlung mit 500 μ M (p < 0,005) und auch bei 750 μ M (p < 0,005) Palmitinsäure nach 24 h Kultivierungszeit unter Normoxie (Abbildung 9). Es ließ sich jedoch keine weitere Erniedrigung des Insulingehaltes bei Zunahme der Palmitinsäurekonzentration von 500 μ M auf 750 μ M messen. Auch nach 48 h sank der Insulingehalt bei Behandlung mit 750 μ M Palmitinsäure signifikant (p < 0,05) (Abbildung 9).

Die Genexpression von Ins 1 erniedrigte sich tendenziell leicht unter beiden Palminsäurekonzentrationen nach 24 h und bei 750 μ M Palmitinsäure nach 48 h (Abbildung 10). Auch die Ins 2-Genexpression war sowohl nach 24 h als auch nach 48 h unter 750 μ M Palmitinsäure vermindert (Abbildung 11).



Abbildung 8: Insulinsekretion unter Palmitinsäurebehandlung und Normoxie.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Keine Veränderung.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Tendenzielle Abnahme der Insulinsekretion bei Zunahme der Palmitinsäurekonzentration.
- (n = 3 Experimente pro Palmitinsäurekonzentration)



Abbildung 9: Insulingehalt unter Palmitinsäurebehandlung und Normoxie.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Signifikante Abnahme des Insulingehaltes nach 24 h bei 500 μ M (p < 0,005) und 750 μ M (p < 0,005) Palmitinsäure.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Signifikante Erniedrigung auch nach 48 h bei 750 μ M (p < 0,05) Palmitinsäure.
- (n = 3 Experimente pro Palmitinsäurekonzentration)



Abbildung 10: Ins 1-Genexpression unter Palmitinsäurebehandlung und Normoxie.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Leichte tendenzielle Abnahme der Ins 1-Genexpression unter beiden Palmitinsäurekonzentrationen.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Leichte tendenzielle Abnahme unter 750 μ M Palmitinsäure.

(relative Ins 1-Expression normalisiert mit rpl32, n = 3 Experimente pro Palmitinsäurekonzentration)



Abbildung 11: Ins 2-Genexpression unter Palmitinsäurebehandlung und Normoxie.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Leichte tendenzielle Abnahme der Ins 2-Genexpression unter 750 μ M Palmitinsäure.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Ebenfalls leichte tendenzielle Abnahme der Ins 2-Genexpression unter 750 μ M Palmitinsäure.

(relative Ins 2-Expression normalisiert mit rpl32, n = 3 Experimente pro Palmitinsäurekonzentration)

3.2.1.2 Signifikante Erniedrigung der Insulinsekretion unter Ölsäurebehandlung und tendenzielle Erniedrigung des Insulingehaltes und der Insulingenexpression

Die Insulinkonzentration im Medium, und somit die Insulinsekretion, erniedrigte sich signifikant (p < 0,05) bereits nach 24 h bei Behandlung der MIN6-Zellen mit 750 μ M Ölsäure unter Normoxie (Abbildung 12). Nach 48 h war der Effekt tendenziell auch noch zu sehen (Abbildung 12).

Die Behandlung mit Ölsäure senkte den Insulingehalt tendenziell nach 24 h unter 750 µM Ölsäurebehandlung und nach 48 h bei beiden Ölsäurekonzentrationen (Abbildung 13). Eine tendenzielle Erniedrigung der Genexpression von Ins 1 konnte nach 24 h unter beiden Ölsäurekonzentrationen (Abbildung 14) gemessen werden. Die Ins 2-Genexpression war ebenfalls unter beiden Ölsäurekonzentrationen nach 24 und 48 h tendenziell vermindert (Abbildung 15).



Abbildung 12: Insulinsekretion unter Ölsäurebehandlung und Normoxie.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Signifikante Abnahme der Insulinsekretion nach 24 h bei 750 μ M (p < 0,05) Ölsäure.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Eine ähnliche Tendenz ist auch nach 48 h bei beiden Ölsäurekonzentrationen ersichtlich.
- (n = 3 Experimente pro Ölsäurekonzentration)



Abbildung 13: Insulingehalt unter Ölsäurebehandlung und Normoxie.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Tendenzielle Abnahme des Insulingehaltes nach 24 h unter 750 μM Ölsäurebehandlung.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Ebenfalls tendenzielle Abnahme unter beiden Ölsäurekonzentrationen nach 48 h.

(n = 3 Experimente pro Ölsäurekonzentration)



Abbildung 14: Ins 1-Genexpression unter Ölsäurebehandlung und Normoxie.

(A) 24 h Kultivierungszeit: Tendenzielle Erniedrigung der Ins 1-Genexpression unter beiden Ölsäurekonzentrationen

(B) 48 h Kultivierungszeit: Keine Veränderung

(relative Ins 1-Expression normalisiert mit rpl32, n = 3 Experimente pro Ölsäurekonzentration)



Abbildung 15: Ins 2-Genexpression unter Ölsäurebehandlung und Normoxie.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Leichte tendenzielle Abnahme der Ins 2-Genexpression unter beiden Ölsäurekonzentrationen.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Ebenfalls leichte tendenzielle Abnahme der Ins 2-Genexpression unter beiden Ölsäurekonzentrationen.

(relative Ins 2-Expression normalisiert mit rpl32, n = 3 Experimente pro Ölsäurekonzentration)

3.2.2 Einfluss von Fettsäuren auf Glrx 1

3.2.2.1 Trend zur Erniedrigung des Glrx 1-Gehaltes und der Genexpression unter Palmitinsäurebehandlung

In den Experimenten wurden jeweils sowohl die Glutaredoxinkonzentrationen im Lysat, repräsentierend für den Glutaredoxingehalt, als auch im Medium, repräsentierend für die Glutaredoxinsekretion, gemessen. Es konnte bei Behandlung mit beiden Palmitinsäurekonzentrationen kein Glrx 1 im Medium detektiert werden (nicht abgebildet).

Der Glrx1-Gehalt sank tendenziell leicht unter Behandlung mit 750 μ M Palmitinsäure und unter Normoxie (Abbildung 16).

Die Genexpression von Glrx 1 zeigte einen leichten Trend zur Reduktion unter 500 μ M nach 24 h, aber unter 750 μ M Palmitinsäure blieb sie weitgehend unverändert (Abbildung 17). Es zeigte sich auch eine leichte tendenzielle Erhöhung nach 48 h unter 500 μ M Palmitinsäure (Abbildung 17).



Abbildung 16: Glrx 1-Gehalt unter Palmitinsäure und Normoxie.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Leichte tendenzielle Abnahme des Glrx 1-Gehaltes unter 750 µM Palmitinsäure.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Keine Veränderung.

(n = 3 Experimente pro Palmitinsäurekonzentration)



Abbildung 17: Glrx 1-Genexpression unter Palmitinsäure und Normoxie.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Leichte tendenzielle Abnahme der Glrx 1-Genexpression unter 500 μ M Palmitinsäure.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Leichte tendenzielle Zunahme der Glrx 1-Genexpression unter 500 μ M Palmitinsäure.

(relative Glrx 1-Expression normalisiert mit rpl32, n = 3 Experimente pro Palmitinsäurekonzentration)

3.2.2.2 Ölsäurebehandlung erniedrigt den Glrx 1 Gehalt signifikant

Auch bei beiden Ölsäurekonzentrationen konnte kein Glrx 1 im Medium gemessen werden (nicht abgebildet).

Es konnte jedoch eine signifikante Verminderung (p < 0,05) des Glrx 1-Gehaltes bei Behandlung mit 750 μ M Ölsäure nach 24 h Kultivierungszeit bei Normoxie festgestellt werden (Abbildung 18). Eine ähnliche Tendenz zur Erniedrigung konnte auch nach 48 h beobachtet werden (Abbildung 18).

Die Glrx 1-Genexpression war nach 24 h Kultivierungszeit nahezu unverändert, jedoch konnte eine leichte tendenzielle Erhöhung nach 48 h unter 750 μ M Ölsäure beobachtet werden (Abbildung 19).



Abbildung 18: Glrx 1-Gehalt unter Ölsäure und Normoxie.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Signifikante Abnahme des Glrx 1-Gehaltes unter 750 μ M Ölsäurekonzentration (p < 0,05).
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Ähnliche Tendenz einer Abnahme auch nach 48 h ersichtlich.
- (n = 3 Experimente pro Ölsäurekonzentration)



Abbildung 19: Glrx1-Genexpression unter Ölsäure und Normoxie.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Keine Veränderung.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Leichte tendenzielle Erhöhung der Glrx 1-Genexpression unter 750 μ M Ölsäure.

(relative Glrx 1-Expression normalisiert mit rpl32, n = 3 Experimente pro Ölsäurekonzentration)

3.2.3 Einfluss von Fettsäuren auf Glrx 5

3.2.3.1 Signifikante Verminderung des Glrx 5-Gehaltes durch Palmitinsäurebehandlung

Auch bei dieser Versuchsreihe wurden wieder die Glutaredoxinkonzentrationen im Lysat und auch im Medium gemessen.

Es konnte bei beiden Palmitinsäurekonzentrationen wiederum kein Glrx 5 im Medium detektiert werden (nicht abgebildet).

Eine signifikante Verminderung (p < 0,05) des Glrx 5-Gehaltes unter der Palmitinsäurebehandlung mit 750 μ M konnte jedoch nach 24 h festgestellt werden (Abbildung 20). Nach 48 h Kultivierungszeit war eine ähnliche Tendenz weiterhin ersichtlich (Abbildung 20).

Eine wesentliche Veränderung der Glrx 5-Genexpression konnte nach 24 h nicht beobachtet werden, jedoch erhöhte sich nach 48 h die Glrx 5-Genexpression unter 500 μ M Palmitinsäure leicht und unter 750 μ M erniedrigte sie sich tendenziell (Abbildung 21).



Abbildung 20: Glrx 5 Gehalt unter Palmitinsäurebehandlung und Normoxie.

(A) 24 h Kultivierungszeit: Signifikante Abnahme des Glrx 5 Gehaltes nach 24 h unter 750 μ M Palmitinsäure (p < 0,05).

(B) 48 h Kultivierungszeit: Ähnliche Tendenz der Abnahme auch nach 48 h sichtbar. (n = 3 Experimente pro Palmitinsäurekonzentration)



Abbildung 21: Glrx 5 Genexpression unter Palmitinsäurebehandlung und Normoxie.

(A) 24 h Kultivierungszeit: Keine Veränderung.

(B) 48 h Kultivierungszeit: Leichte Erhöhung unter 500 μ M und tendenzielle Erniedrigung unter 750 μ M Palmitinsäure.

(realtive Glrx 5 Expression normalisiert mit rpl32, n = 3 Experimente pro Palmitinsäurekonzentration)

3.2.3.2 Ölsäurebehandlung erniedrigt den Glrx 5-Gehalt signifikant und die Glrx5- Genexpression tendenziell

Wie bereits in den vorherigen Experimenten konnte auch in diesen kein Glrx 5 im Medium gemessen werden (nicht abgebildet).

Durch die Ölsäurebehandlung mit 750 μ M wurde der Glrx 5-Gehalt jedoch nach 24 h signifikant erniedrigt (p < 0,005). Auch durch die Behandlung mit 500 μ M Ölsäure ist eine tendenzielle Erniedrigung zu sehen (Abbildung 22). Eine ähnliche Tendenz ist zudem nach 48 h weiterhin zu beobachten. (Abbildung 22).

Die Glrx 5-Genexpression konnte tendenziell nach 24 h bei Behandlung mit 750 μ M Ölsäure und nach 48 h unter beiden Ölsäurekonzentrationen erniedrigt werden (Abbildung 23).



Abbildung 22: Glrx 5-Gehalt unter Ölsäurebehandlung und Normoxie.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Signifikante Abnahme des Glrx 5-Gehaltes nach 24 h unter 750 μ M Ölsäure (p < 0,005).
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Ähnliche Tendenz auch nach 48 h bei beiden Ölsäurekonzentrationen ersichtlich.
- (n = 3 Experimente pro Ölsäurekonzentration)



Abbildung 23: Glrx 5-Genexpression unter Ölsäurebehandlung und Normoxie.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Tendenzielle Erniedrigung der Glrx 5-Genexpression unter 750 μ M Ölsäure.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Tendenzielle Erniedrigung unter beiden Ölsäurekonzentrationen.

(relative Glrx 5-Expression normalisiert mit rpl32, n = 3 Experimente pro Ölsäurekonzentration)

3.3 Einfluss von Hypoxie

3.3.1 Einfluss von Hypoxie auf Insulin

3.3.1.1 Hypoxie verminderte die Insulinsekretion und steigerte gleichzeitig den Insulingehalt

Unter Behandlung mit Hypoxie konnte nach 24 h und auch nach 48 h eine signifikante Erniedrigung (p < 0,001) der Insulinsekretion beobachtet werden (Abbildung 24). Gleichzeitig erhöhte sich der Insulingehalt in den MIN6-Zellen unter Hypoxie signifikant (p < 0,005) ebenfalls schon nach 24 h Kultivierungszeit (Abbildung 25). Auch nach 48 h Kultivierungszeit ist eine ähnliche Tendenz zu sehen (Abbildung 25).



Abbildung 24: Insulinsekretion unter Hypoxiebehandlung.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Signifikante Erniedrigung der Insulinsekretion nach 24 h (p < 0,0001).
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Auch nach 48 h nahm die Insulinsekretion signifikant ab (p < 0,0001).
- (n = 3 Experimente pro Sauerstoffgehalt)



Abbildung 25: Insulingehalt unter Hypoxiebehandlung.

(A) 24 h Kultivierungszeit: Signifikante Erhöhung des Insulingehaltes nach 24 h (p $<0,\!005)$

- (B) 48 h Kultivierungszeit: Gleichartige Tendenz auch nach 48 h erkennbar.
- (n = 3 Experimente pro Sauerstoffgehalt)

3.3.1.2 Hypoxie erniedrigte die Genexpression von Insulin

Eine Abnahme der Ins 1-Genexpression konnte nach 24 h und 48 h (Abbildung 26) beobachtet werden. Diese war nicht signifikant, jedoch tendenziell gut ersichtlich. Die Genexpression von Ins 2 wurde durch Hypoxie nach 24 h Kultivierungszeit signifikant (p < 0,0001) und nach 48 h tendenziell vermindert (Abbildung 27).



Abbildung 26: Ins 1-Genexpression unter Hypoxiebehandlung.

(A) 24 h Kultivierungszeit: Tendenzielle Abnahme der Ins 1-Genexpression nach 24 h.

(B) 48 h Kultivierungszeit: Ähnliche tendenzielle Abnahme auch nach 48 h.

(relative Ins 1-Expression normalisiert mit rpl32, n = 3 Experimente pro Sauerstoffgehalt)



Abbildung 27: Ins 2-Genexpression unter Hypoxiebehandlung.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Signifikante Abnahme der Ins 2-Genexpression nach 24 h (p < 0,0001).
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Ähnliche tendenzielle Abnahme auch nach 48 h erkennbar.

(relative Ins 2-Expression normalisiert mit rpl32, n = 3 Experimente pro Sauerstoffgehalt)

3.3.2 Einfluss von Hypoxie auf Glutaredoxine 1 und 5

3.3.2.1 Durch Hypoxie nahm der Glrx 1-Gehalt signifikant und die Glrx 1-Genexpression tendenziell ab

Es konnte unter Behandlung mit Hypoxie kein Glrx 1 im Medium festgestellt werden (nicht abgebildet).

Unter Hypoxie konnte jedoch eine signifikante Abnahme des Glrx 1-Gehaltes nach 24 h (p < 0,0001) und auch nach 48 h (p < 0,005) detektiert werden (Abbildung 28).

Ebenfalls konnte eine tendenzielle Verminderung der Glrx 1-Genexpression unter Hypoxie festgestellt werden. Dies war sowohl nach 24 h als auch nach 48 h Kultivierungszeit ersichtlich (Abbildung 29).



Abbildung 28: Glrx 1-Gehalt unter Hypoxiebehandlung.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Signifikante Abnahme des Glrx 1 Gehaltes nach 24 h (p < 0,0001).
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Auch nach 48 h war eine signifikante Abnahme erkennbar (p < 0,005).
- (n = 3 Experimente pro Sauerstoffgehalt)



Abbildung 29: Glrx 1-Genexpression unter Hypoxiebehandlung.

(A) 24 h Kultivierungszeit: Tendenzielle Erniedrigung der Glrx 1-Genexpression nach 24 h.

(B) 48 h Kultivierungszeit: Gleichartige tendenzielle Erniedrigung auch nach 48 h. (realtive Glrx 1-Expression normalisiert mit rpl32, n = 3 Experimente pro Sauerstoffgehalt)

3.3.2.2 Hypoxie verminderte sowohl den Glrx 5-Gehalt als auch die Glrx 5-Genexpression

Unter der Hypoxiebehandlung konnte erneut kein Glrx 5 im Medium gemessen werden (nicht abgebildet).

Nach 24 h Kultivierungszeit konnte hingegen eine signifikante Abnahme (p < 0,005) des Glrx 5-Gehaltes unter Hypoxie festgestellt werden (Abbildung 30). Nach 48 h konnte ebenfalls eine tendenzielle Verminderung des Glrx 5-Gehaltes festgestellt werden (Abbildung 30).

Auch die Genexpression von Glrx 5 zeigte unter Hypoxie sowohl nach 24 h als auch nach 48 h Kultivierungszeit eine sehr starke Tendenz zur Abnahme (Abbildung 31).



Abbildung 30: Glrx 5-Gehalt unter Hypoxiebehandlung.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Signifikante Abnahme des Glrx 5-Gehaltes nach 24 h (p < 0,005).
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Tendenz zur Abnahme auch nach 48 h.
- (n = 3 Experimente pro Sauerstoffgehalt)



Abbildung 31: Glrx 5-Genexpression unter Hypoxiebehandlung.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Tendenzielle Erniedrigung der Glrx 5-Genexpression nach 24 h.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Gleichartige Tendenz auch nach 48 h.

(relative Glrx 5-Expression normalisiert mit rpl32, n = 3 Experimente pro Sauerstoffgehalt)

3.4 Einfluss beider Behandlungen zum gleichen Zeitpunkt

Die MIN6-Zellen wurden in den Experimenten auch beiden Behandlungen gleichzeitig ausgesetzt. Hierbei wurden die Parameter für Insulin und Glrx 5 bestimmt, da die Effekte bei diesem Glutaredoxin in den vorangehenden Experimenten prominenter waren. Die Zellen wurden wieder sowohl hypoxisch als auch mit einer der beiden Fettsäuren, Palmitinsäure oder Ölsäure, in den Konzentrationen 500 µM oder 750 µM, behandelt. Die Kultivierungszeiten waren hierbei ebenfalls jeweils 24 h und 48 h.

3.4.1 Signifikante Erniedrigung der Insulinsekretion, des Insulingehaltes und Insulingenexpression unter kombinierter Behandlung mit Hypoxie und Palmitinsäure

Unter kombinierter Behandlung konnte eine Erniedrigung der Insulinseketion nach 24 h festgestellt werden. Diese war sowohl bei 0 μ M (p < 0,005), 500 μ M (p < 0,005) als auch bei 750 μ M (p < 0,05) Palmitinsäure signifikant. Auch nach 48 h verminderte die

Behandlung mit 0 μ M Palmitinsäure und Hypoxie die Insulinsekretion signifikant (p < 0,05).

Einen zusätzlichen Effekt durch die Steigerung der Palmitinsäurekonzentration konnte jedoch nicht gemessen werden. (Abbildung 32)



Abbildung 32: Insulinsekretion unter kombinierter Behandlung mit Palmitinsäure und Hypoxie.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Signifikante Erniedrigung der Insulinsekretion unter Hypoxie und Behandlung mit 0 μ M (p < 0,005), 500 μ M (p < 0,005) und 750 μ M (p < 0,05) Palmitinsäure.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Ebenfalls signifikante (p < 0,05) Erniedrigung unter Hypoxie.
- (n = 3 Experimente pro Palmitinsäurekonzentration und pro Sauerstoffgehalt)

Die Behandlung mit Hypoxie sowie 0 μ M Palmitinsäure erhöhte den Insulingehalt nach 24 h signifikant (p < 0,005) und nach 48 h tendenziell. Eine zusätzliche Palmitinsäurebehandlung mit 500 μ M sowie 750 μ M verminderte sowohl nach 24 h als auch nach 48 h den Insulingehalt. Mit erhöhter Palmitinsäurekonzentration nahm somit der Insulingehalt bei kombinierter Behandlung mit Hypoxie ab. (Abbildung 33)



Abbildung 33: Insulingehalt unter kombinierter Behandlung mit Palmitinsäure und Hypoxie.

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Signifikante Erhöhung des Insulingehaltes unter Hypoxie und 0 μ M (p < 0,005) Palmitinsäure. Gleichzeitig signifikante Erniedrigung unter zusätzlicher Behandlung mit 500 μ M (p < 0,005) oder 750 μ M (p < 0,0001) Palmitinsäure.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Gleichartige Tendenz der Erhöhung des Insulingehaltes unter Hypoxie und 0 μ M Palmitinsäure und signifikante Erniedrigung unter zusätzlicher Behandlung mit 500 μ M (p < 0,005) oder 750 μ M (p < 0,0001) Palmitinsäure.
- (n = 3 Experimente pro Palmitinsäurekonzentration und pro Sauerstoffgehalt)

Die Ins 1-Genexpression zeigte bei kombinierter Behandlung keine signifikanten Veränderungen nach 24 h Kultivierungszeit. Nach 48 h war eine leichte Tendenz zur Erhöhung unter Hypoxie zu beobachten. (Abbildung 34)

Unter Hypoxie erniedrigte sich dagegen die Ins 2-Genexpression signifikant bei Kombination mit $0 \mu M$, 500 μM und 750 μM Palmitinsäure nach 24 h. Eine gleichartige Tendenz war auch nach 48 h zu beobachten. (Abbildung 35)

Auch bei diesen Experimenten war ein zusätzlicher Effekt durch die Erhöhung der Palmitinsäurekonzentration jedoch nicht zu sehen.



Abbildung 34: Ins 1-Genexpression unter kombinierter Behandlung mit Palmitinsäure und Hypoxie

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Keine Veränderung.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Leichte Tendenz zu Erhöhung der Ins 1-Genexpression unter Hypoxie.

(relative Ins 1-Expression normalisiert mit rpl32, n = 3 Experimente pro Palmitinsäurekonzentration und pro Sauerstoffgehalt)



Abbildung 35: Ins 2-Genexpression unter kombinierter Behandlung mit Palmitinsäure und Hypoxie

(A) 24 h Kultivierungszeit: Signifikante Verminderung der Ins 2-Genexpression bei kombinierter Behandlung mit Hypoxie und 0 μ M (p < 0,0001), 500 μ M (p < 0,001), sowie 750 μ M (p < 0,05), Palmitinsäure.

(B) 48 h Kultivierungszeit: Gleichartige Tendenz auch nach 48 h erkennbar.

(relative Ins 2-Expression normalisiert mit rpl32, n = 3 Experimente pro Palmitinsäurekonzentration und pro Sauerstoffgehalt)

3.4.2 Einfluss von Hypoxie und Palmitinsäure auf Glrx 5

3.4.2.1 Signifikante Erniedrigung des Glrx 5-Gehaltes bei Kombination von Hypoxie und Palmitinsäure und tendenzielle Verminderung der Glrx 5-Genexpression

Eine Sekretion von Glrx 5 ins Medium konnte bei diesen Experimenten ebenfalls nicht nachgewiesen werden (nicht abgebildet).

Durch die Kombination von Hypoxie und $0 \ \mu M \ (p < 0,005)$ und $500 \ \mu M \ (p < 0,05)$ wurde der Glrx 5-Gehalt signifikant nach 24 h vermindert. Nach 48 h war ebenfalls eine Verminderung bei der Kombination von Hypoxie und Palmitinsäure zu beobachten. Dies war jedoch nur bei 500 \ \mu M Palmitinsäure signifikant (p < 0,05). (Abbildung 36) Die Glrx 5-Genexpression wurde unter Hypoxie nach 24 h und 48 h ebenfalls tendenziell

erniedrigt. (Abbildung 37)

Eine Steigerung der Palmitinsäurekonzentration hatte wiederum keine zusätzlichen Effekte in dieser Versuchsreihe.



Abbildung 36: Glrx 5-Gehalt unter kombinierter Behandlung mit Palmitinsäure und Hypoxie

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Signifikante Erniedrigung bei der Kombination von Hypoxie und 0 μ M (p < 0,005) sowie 500 μ M (p < 0,05) Palmitinsäure. Tendenzielle Erniedrigung auch bei der Konzentration von 750 μ M.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Ebenfalls signifikante Erniedrigung bei Kombination von Hypoxie und 500 µM Palmitinsäure. Gleichartige Tendenz auch bei den anderen Palmitinsäurekonzentrationen erkennbar.
- (n = 3 Experimente pro Palmitinsäurekonzentration und pro Sauerstoffgehalt)



Abbildung 37: Glrx 5-Genexpression unter kombinierter Behandlung mit Palmitinsäure und Hypoxie

(A) 24 h Kultivierungszeit: Tendenzielle Verminderung der Glrx 5-Genexpression unter allen Palmitinsäurekonzentrationen.

(B) 48 h Kultivierungszeit: Eine gleichartige Tendenz ist auch nach 48 h ersichtlich. (relative Glrx 5-Expression normalisiert mit rpl32, n = 3 Experimente pro Palmitinsäurekonzentration und pro Sauerstoffgehalt)

3.4.3 Kombinierte Behandlung von Hypoxie und Ölsäure senkte die Insulinsekretion und die Insulingenexpression signifikant

Die kombinierte Behandlung von Hypoxie und Ölsäure erniedrigte die Insulinsekretion signifikant nach 24 h und 48 h Kultivierungszeit. Dies war nach 24 h bei 0 μ M (p < 0,0001) und 500 μ M (p < 0,05) Ölsäure sowie nach 48 h bei 0 μ M (p < 0,0001), 500 μ M (p < 0,05) und 750 μ M (p < 0,005) Ölsäure ersichtlich. Eine gleichartige Tendenz ist nach 24 h Kultivierungszeit bei der Behandlung mit 750 μ M Ölsäure ebenfalls zu sehen. (Abbildung 38)

Eine Tendenz zur Zunahme des Insulingehaltes war bei Kombination der Behandlungen nach 24 h und 48 h bei allen Ölsäurekonzentrationen erkennbar. (Abbildung 39) Eine Summation der Effekte durch Erhöhung der Ölsäurekonzentration war jedoch nicht zu beobachten.



Abbildung 38: Insulinsekretion unter kombinierter Behandlung mit Ölsäure und Hypoxie

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Signifikante Erniedrigung der Insulinsekretion bei Kombination von Hypoxie und 0 μ M (p < 0,0001) sowie 500 μ M (p < 0,005) Ölsäure.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Auch nach 48 h Kultivierungszeit war eine signifikante Verminderung bei 0 μ M (p < 0,0001), 500 μ M (p < 0,05) und 750 μ M (p < 0,005) Ölsäure ersichtlich.



(n = 3 Experimente pro Ölsäurekonzentration und pro Sauerstoffgehalt)

Abbildung 39: Insulingehalt unter kombinierter Behandlung mit Ölsäure und Hypoxie

- (A)24 h Kultivierungszeit: Tendenz der Erhöhung des Insulingehaltes unter Kombination beider Behandlungen bei allen Ölsäurekonzentrationen.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Gleichartige tendenzielle Erhöhung auch nach 48 h Kultivierungszeit.
- (n = 3 Experimente pro Ölsäurekonzentration und pro Sauerstoffgehalt)

Die Ins 1-Genexpression zeigte bei diesen Experimenten keine wesentlichen Veränderungen. (Abbildung 40)

Die Ins 2-Genexpression erniedrigte sich nach 24 h Kultivierungszeit jedoch signifikant (p < 0,005). Eine gleichartige Tendenz ist auch nach 48 h zu beobachten. (Abbildung 41)



Abbildung 40: Ins 1-Genexpression unter kombinierter Behandlung mit Ölsäure und Hypoxie

(A) 24 h Kultivierungszeit: Keine Veränderung.

(B) 48 h Kultivierungszeit: Keine Veränderung.

(relative Ins 1-Expression normalisiert mit rpl32, n = 3 Experimente pro Ölsäurekonzentration und pro Sauerstoffgehalt)



Abbildung 41: Ins 2-Genexpression unter kombinierter Behandlung mit Ölsäure und Hypoxie

(A) 24 h Kultivierungszeit: Signifikante Verminderung (p < 0,005) der Ins 2-Genexpression unter 0 μ M Ölsäurebehandlung und Hypoxie. Ähnliche Tendenz auch bei Kombination von 500 μ M sowie 750 μ M Ölsäure und Hypoxie ersichtlich.

(B) 48 h Kultivierungszeit: Gleichartige Tendenz auch nach 48 h zu erkennen. (relative Ins 2-Expression normalisiert mit rpl32, n = 3 Experimente pro Ölsäurekonzentration und pro Sauerstoffgehalt)

3.4.4 Einfluss von Hypoxie und Ölsäure auf Glrx 5

3.4.4.1 Kombination der Behandlungen mit Ölsäure und Hypoxie erniedrigte den Glrx 5-Gehalt signifikant und die Glrx 5 -Genexpression tendenziell

Wie bei den vorangegangenen Experimentan auch, konnte abermals kein Glrx 5 im Medium gemessen werden (nicht abgebildet).

Der Glrx 5-Gehalt wurde bei Kombination von Hypoxie und 0 μ M Ölsäure nach 24 h signifikant (p < 0,005) erniedrigt. Dies war als Tendenz auch nach 48 h Kultivierungszeit zu beobachten. (Abbildung 42)

Die Genexpression von Glrx 5 wurde bei kombinierter Behandlung nach 24 h und 48 h tendenziell erniedrigt. Dies war bei allen Ölsäurekonzentrationen erkennbar. (Abbildung 43)

Eine Verstärkung der Effekte durch Erhöhung der Ölsäurekonzentration war auch hier nicht zu beobachten.



Abbildung 42: Glrx 5-Gehalt unter kombinierter Behandlung mit Ölsäure und Hypoxie

(A) 24 h Kultivierungszeit: Signifikante Verminderung (p < 0,005) des Glrx 5-Gehaltes bei Kombination von Hypoxie und 0 μ M Ölsäure.

(B) 48 h Kultivierungszeit: Ähnliche Tendenz auch nach 48 h zu beobachten.

(n = 3 Experimente pro Ölsäurekonzentration und pro Sauerstoffgehalt)



Abbildung 43: Glrx 5-Genexpression unter kombinierter Behandlung mit Ölsäure und Hypoxie

- (A) 24 h Kultivierungszeit: Tendenzielle Erniedrigung der Glrx 5-Genexpression bei Kombination aller Ölsäurekonzentrationen und Hypoxie.
- (B) 48 h Kultivierungszeit: Gleichartige Tendenz auch nach 48 h Kultivierungszeit zu erkennen.

(relative Glrx 5-Expression normalisiert mit rpl32, n = 3 Experimente pro Ölsäurekonzentration und pro Sauerstoffgehalt)

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

I aov	ene 10. Legende zur Zusun	mien	lassung der Ergeomsse		
-	Keine Veränderung	\downarrow	Abnahme	*, **,	Signifikanzstufen
Ø	Nicht messbar	1	Zunahme	***	

Taballa 16	Laganda zur	Zucommonfoccung	r dar	Frachnicco
	Legende Zui	Lusainnemassun	2 uci	Ligeomsse

Tabelle 17	: Einfluss von	Palmitinsäure	auf MIN6-Zeller
Tabelle 17	: Einfluss von	Palmitinsäure	auf MIN6-Zelle

	24	h h	48	3 h				
Palmitinsäure	500 µM	750 µM	500 µM	750 μM				
	Proteinkonzentration							
Insulinsekretion	-	-	Trend ↓	Trend ↓				
Insulingehalt	** ↓	** ↓	Trend ↓	*↓				
Glrx 1-Sekretion	Ø	Ø	Ø	Ø				
Glrx 1-Gehalt	-	Trend ↓	-	-				
Glrx 5-Sekretion	Ø	Ø	Ø	Ø				
Glrx 5-Gehalt	Trend ↓	* ↓	Trend ↓	Trend ↓				
	(Genexpression						
Ins 1	Trend ↓	Trend ↓	-	Trend ↓				
Ins 2	-	Trend ↓	-	Trend ↓				
Glrx 1	Trend ↓	-	Trend ↑	-				
Glrx 5	-	-	Trend ↑	Trend ↓				

Tabelle 18: Einfluss von Ölsäure auf MIN6-Zellen

	24	h	4	8 h				
Olsäure	500 µM	750 µM	500 µM	750 µM				
	Proteinkonzentration							
Insulinsekretion	Trend ↓	* ↓	Trend ↓	Trend ↓				
Insulingehalt	-	Trend ↓	Trend ↓	Trend ↓				
Glrx 1-Sekretion	Ø	Ø	Ø	Ø				
Glrx 1-Gehalt	Trend ↓	*↓	Trend ↓	Trend ↓				
Glrx 5-Sekretion	Ø	Ø	Ø	Ø				
Glrx 5-Gehalt	Trend ↓	**↓	Trend ↓	Trend ↓				
Genexpression								
Ins 1	Trend ↓	Trend ↓	-	-				
Ins 2	Trend ↓	Trend ↓	Trend ↓	Trend ↓				
Glrx 1	-	-	-	Trend ↑				
Glrx 5	_	Trend ↓	Trend ↓	Trend ↓				

Vergleich Normoxie vs. Hypoxie				
Proteinkonzentration	24 h	48 h		
Insulinsekretion	***↓ unter Hypoxie	***↓ unter Hypoxie		
Insulingehalt	** ↑ unter Hypoxie	Trend ↑ unter Hypoxie		
Glrx 1-Sekretion	Ø	Ø		
Glrx 1-Gehalt	***↓ unter Hypoxie	**↓ unter Hypoxie		
Glrx 5-Sekretion	Ø	Ø		
Glrx 5-Gehalt	**↓unter Hypoxie	Trend↓ unter Hypoxie		
Genexpression	24 h	48 h		
Ins 1	Trend↓ unter Hypoxie	Trend↓ unter Hypoxie		
Ins 2	***↓ unter Hypoxie	Trend↓ unter Hypoxie		
Glrx 1	Trend ↓ unter Hypoxie	Trend ↓ unter Hypoxie		
Glrx 5	Trend↓ unter Hypoxie	Trend↓ unter Hypoxie		

Tabelle 19: Einfluss von Hypoxie (2 % O₂) auf MIN6-Zellen

Tabelle 20: Kombination der Behandlungen mit Palmitinsäure	und Hypoxie (2 % O ₂)
--	-----------------------------------

Proteinkonzentration	24 h	48 h
Insulinsekretion	Signifikant↓ unter Hypoxie	Signifikant↓ unter
		Hypoxie
Insulingehalt	Signifikant ↑ unter Hypoxie	Trend ↑ unter Hypoxie
	Signifikant \downarrow unter	Signifikant↓ unter
	Palmitinsäure	Palmitinsäure
Glrx 5-Sekretion	Ø	Ø
Glrx 5-Gehalt	Signifikant↓ unter Hypoxie	Signifikant↓ unter
		Hypoxie
Genexpression	24 h	48 h
Ins 1	-	Trend ↑ unter Hypoxie
Ins 2	Signifikant↓unter Hypoxie	Trend↓ unter Hypoxie
Glrx 5	Trend ↓ unter Hypoxie	Trend↓ unter Hypoxie

Tabelle 21: Kombination der Behandlungen mit	Ölsäure und Hypoxie (2 % O ₂)
--	---

Proteinkonzentration	24 h	48 h
Insulinsekretion	Signifikant↓unter Hypoxie	Signifikant↓ unter
		Hypoxie
Insulingehalt	Trend ↑ unter Hypoxie	Trend ↑ unter Hypoxie
Glrx 5-Sekretion	Ø	Ø
Glrx 5-Gehalt	Signifikant↓unter Hypoxie	Trend↓ unter Hypoxie
Genexpression	24 h	48 h
Ins 1	-	-
Ins 2	Signifikant↓unter Hypoxie	Trend↓ unter Hypoxie
Glrx 5	Trend↓ unter Hypoxie	Trend ↓ unter Hypoxie
4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der zentralen Ergebnisse

Glutaredoxine haben über die letzten Jahrzehnte vermehrt an Bedeutung gewonnen. Auch eine mögliche Rolle in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes mellitus hat sich angedeutet. Dies könnte wiederum zu neuen Behandlungsmethoden oder zur Früherkennung der Erkrankung führen. Die Regulation und Effekte der Glutaredoxine in der pankreatischen beta-Zelle sind jedoch noch größtenteils unerforscht. In Vorarbeiten aus unserer Forschungsgruppe konnten erniedrigte Konzentrationen und Genexpressionen von Glutaredoxinen in Inselzellen diabetischer db/db-Mäuse im Vergleich zu ihren heterozygoten db/+ Gegenstücken gemessen werden (Petry *et al.*, 2017). Die Unterschiede waren für Glrx 1 und Glrx 5 besonders ausgeprägt, sodass in der vorliegenden Studie diese beiden Glutaredoxine untersucht wurden. Ziel dieser Arbeit war es, Fettsäuren und Hypoxie als mögliche Regulatoren zu überprüfen. Hierbei wurde sowohl der Einfluss der einzelnen Stressoren als auch die Kombination beider getestet.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl Fettsäuren als auch Hypoxie einen regulatorischen Einfluss auf Glrx 1 und Glrx 5 haben. Dies spiegelte sich sowohl in der Proteinregulation als auch teilweise in der Genexpression wider. Hierbei verhielten sich die MIN6-Zellen unterschiedlich, je nachdem, ob sie nur einer Behandlung oder die Kombination beider Stressorenbehandlungen unterzogen wurden.

Eine weitere konstante Beobachtung war, dass bei keinem der Experimente eine Sekretion von Glutaredoxinen detektiert werden konnte.

4.2 Interpretation

Die Auswahl der Fettsäurekonzentrationen wurde aufgrund des MTT-Testes und bestehender Literatur gewählt. Die MIN6-Zellen zeigten unter beiden Fettsäuren bei 500 μ M und 750 μ M eine gute Viabilität, welche Voraussetzung für die anschließenden Experimente war. Gleichzeitig waren ähnliche Konzentrationen auch in Patienten mit Diabetes mellitus zu beobachten (Reaven *et al.*, 1988) und sind daher auch häufig in vergangenen Experimenten verwendet worden (Cnop *et al.*, 2001; Kharroubi *et al.*, 2004; Karaskov *et al.*, 2006).

Einfach ungesättigten Fettsäuren wie der Ölsäure werden je nach Studienlage verschiedene Effekte auf beta-Zellen zugeschrieben. Auf der einen Seite wurde beschrieben, dass sie einen positiven Effekt auf die sekretorische Funktion der beta-Zellen haben und gegen Palmitinsäure-induzierte Apoptose schützen konnten (Maedler et al., 2003). Auf der anderen Seite wurden in einer Studie drei verschiedene Zelllinien mit Palmitinsäure (500 µM), Ölsäure (500 µM) und einer Mischung beider Fettsäuren (jeweils 500 µM) über einen Inkubationszeitraum von zwei Tagen kultiviert. Die Toxizität wurde anschließend über drei verschiedene Apoptose-Assays bestimmt. Hierbei wurde festgestellt, dass Ölsäure in diesem Fall mindestens die gleiche Toxizität wie Palmitinsäure aufwies. Auch das Mischen beider Fettsäuren hatte keinen Vorteil welches zeigte, dass Ölsäure nicht imstande war, die durch Palmitinsäure verursachten Schäden zu neutralisieren (Plötz et al. 2017). In einer anderen Studie wurde auch gezeigt, dass eine Kultivierung mit Palmitin- und Ölsäure über 48 Stunden zytostatische und proapoptotische Wirkungen auf humane beta-Zellen hatte (Lupi et al., 2002). Meine Experimente zeigten unter Ölsäure ähnliche Ergebnisse. Unter den gewählten Fettsäurekonzentrationen war grundsätzlich eine gute Viabilität der Zellen zu beobachten, jedoch war die sekretorische Leistung und der Insulingehalt durch die Fettsäurebehandlungen beeinträchtigt.

Patienten mit Insulinresistenz haben höhere Konzentrationen an freien Fettsäuren im Blut (Sobczak, Blindauer and Stewart, 2019). Es wird angenommen, dass die dauerhafte Erhöhung von freien Fettsäuren, welche zur Erhöhung der ROS-Produktion und Ceramidbildung in den beta-Zellen führt, zur Entstehung von Typ 2 Diabetes beiträgt (Shimabukuro *et al.*, 1998; Lupi *et al.*, 2002; Gerber and Rutter, 2017).

Die Insulinsekretion ist direkt abhängig von der mitochondrialen Funktion (Maechler and Wollheim, 2001). In meinen Experimenten konnte durch die Messung der Insulinkonzentration im Medium konsekutiv auf die Insulinsekretion geschlossen werden. Diese verminderte sich unter Behandlung mit Palmitin- bzw. Ölsäure. Dies wurde bereits in mehreren Studien gezeigt (Lupi *et al.*, 2002; Poitout *et al.*, 2006). Es existieren auch Studien, in der die Behandlung mit Fettsäuren zu einer erhöhten Insulinsekretion führten. Dies war jedoch auf kurzzeitige Fettsäureexposition von weniger als sechs Stunden bezogen. Eine längere Behandlung mit Fettsäuren führte wiederum zu einer Inhibiton dieser (Sako and Grill, 1990; Yaney and Corkey, 2003).

Auch auf Genebene ist eine Erniedrigung der Insulingenexpression durch erhöhte Fettsäurekonzentrationen in meinen Experimenten zu beobachten. Dies passt zur Erkenntnis, dass Palmitinsäure durch verminderte Bindungsaktivität von PDX-1 und MafA die Insulingenexpression herabsetzt (Hagman *et al.*, 2005).

Übermäßig hohe Konzentrationen freier Fettsäuren erzeugen zudem ER-Stress und führen zu mitochondrialer Dysfunktion, vor allem in der beta-Zelle (Biden *et al.*, 2014). Mitochondrien haben per se eine gute Abwehrlage, sind aber dennoch anfällig gegenüber oxidativem Stress. Dies ist mitunter dem geschuldet, dass die oxidative Phosphorylierung, welche in den Mitochondrien stattfindet, ohnehin sehr viel Sauerstoff bedarf und auch ROS generiert. Zudem ist die mitochondriale DNA äußerst vulnerabel gegenüber ROS (Yakes and Van Houten, 1997). Somit sind Mitochondrien gleichzeitig die größte Quelle als auch primärer Angriffspunkt von reaktiven Spezies (Li, Frigerio and Maechler, 2008).

Der Sauerstoffhaushalt ist bei Säugetieren durch den Blutkreislauf und durch den zellulären Verbrauch reguliert. Hierbei ist auf zellulärer Ebene vor allem die oxidative Phosphorylierung zur Gewinnung von ATP in den Mitochondrien ausschlaggebend. Die beta-Zelle gehört ohnehin zu den Gewebearten, die metabolisch sehr aktiv sind (Gerber and Rutter, 2017). Unter starker metabolischer Aktivität wie beim diabetischen Stoffwechsel leiden die Zellen unter Hypoxie-ähnlichen Zuständen. Dadurch werden durch HIF Stressreaktionen aktiviert, NFkappaB hochreguliert und ROS generiert (Sato *et al.*, 2011).

Die Insulinsekretion wird unter Hypoxie beeinträchtigt (Garcia-Contreras *et al.*, 2017). Grund hierfür ist wiederum der ernorme Sauerstoffbedarf, welcher für die Sekretion von Insulin notwendig ist. Durch die hypoxischen Versuchsbedingungen konnte beobachtet werden, dass die Insulinsekretion signifikant sank. Vermutlich konnte der beträchtliche Sauerstoffbedarf nicht mehr aufrechterhalten werden (Sato *et al.*, 2011). Gleichzeitig erhöhte sich der Insulingehalt in den MIN6-Zellen signifikant. Dies könnte dem geschuldet sein, dass mit der geringeren Insulinsekretion nun vermehrt Insulin in den Zellen zurückblieb. Auch die Insulingenexpression wurde unter Hypoxie vermindert.

Durch vorangehende Studien aus unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass insbesondere Glrx 1 und Glrx 5 in diabetischen Mäusen vermindert war (Petry *et al.*, 2017).

Fettsäuren wie Palmitin- bzw. Ölsäure und Hypoxie konnten nun als mögliche Regulatoren eruiert werden.

Eine Behandlung mit Ölsäure senkte den Glrx 1-Gehalt signifikant und unter hypoxischen Bedingungen verringerte sich der Glrx 1-Gehalt ebenfalls signifikant. Es erfolgte auch eine tendenzielle Erniedrigung der Glrx1-Genexpression unter Hypoxie.

Glrx 1 hat über die Regulation von NADPH nachweislich einen positiven Einfluss auf die Insulinsekretion (Ivarsson *et al.*, 2005; Reinbothe *et al.*, 2009). Bei Verminderung dieser ist eine gleichzeitige Erniedrigung der Insulinsekretion plausibel (Reinbothe *et al.*, 2009).

Die Veränderung der Glutaredoxinkonzentration bzw. -expression könnte als Schutzmechanismus der Zelle gegen die veränderten Bedingungen innerhalb der beta-Zelle unter Fettsäuren bzw. Hypoxie fungieren. Es wurde bereits nachgewiesen, dass eine Überexpression von Glrx 1 in Mäusemyokard und Koronararterien diese vor Apoptose und Inflammation schützen konnten. Dies geschah durch die Steigerung von Signalwegen, die für das Überleben förderlich waren und Verminderung derer, die proapoptotisch agierten (Lekli *et al.*, 2010; Shuyan *et al.*, 2014).

In einer anderen Studie wurde festgestellt, dass bei Glrx 1 Knockout-Mäusen unter normaler Ernährungsweise dennoch der hepatische Lipidgehalt stieg und sie eine Hyperlipidämie entwickelten. Grund hierfür war eine Hochregulation der de novo Fettsäure- und Cholesterolsynthese (Shao *et al.*, 2017). Dies eröffnet den Glutaredoxinen eine neue Rolle in der Lipidhomöostase und das nicht ausschließlich in der Leber. Möglicherweise haben Glutaredoxine durch die Regulation via Thiolmodifikationen auch metabolische Effekte in anderen Geweben, wie etwa in pankreatischen beta-Zellen.

Glrx 1 hat zudem einen Einfluss auf die Regulation von HIF-1alpha. HIFs sind entscheidend für die Zellreaktion auf Hypoxie durch einen Wechsel von mitochondrialer oxidativer Phosphorylierung zur anaerobern Glykolyse unter Hypoxie. Dies bewirkt einen verminderten Sauerstoffverbrauch und auch eine erniedrigte ROS-Produktion in den Mitochondrien. HIFs beeinflussen auch den Fettstoffwechsel in der Leber, indem sie dort die de novo Fettsäuresynthese inhibiert und die beta-Oxidation verringert. Somit wird auch der ATP- und Sauerstoffverbrauch gesenkt (Goda and Kanai, 2012).

In einer Studie verursachte die Erniedrigung von Glrx 1 in ischämischem Gewebe die Stabilisierung von HIF-1alpha via Thiolmodifikationen. Dies führte wiederum aufgrund der Wirkung von HIF-1alpha zu einer Verbesserung der Revaskularisierung (Watanabe *et al.*, 2016). Auch in meiner Versuchsreihe erniedrigte sich die Konzentration und Genexpression von Glrx 1. Möglicherweise kann Glrx 1 auch in beta-Zellen durch eine Verminderung die Stabilisierung von HIF-1alpha bewirken.

Sowohl Palmitinsäure als auch Ölsäure senkten den Glrx 5-Gehalt in MIN6-Zellen signifikant und eine Behandlung mit Ölsäure senkte die Glrx 5-Genexpression tendenziell. Unter hypoxischer Behandlung erniedrigte sich ebenfalls der Glrx 5-Gehalt signifikant und die Glrx 5-Genexpression verminderte sich tendenziell.

Glrx 5 ist in den Mitochondrien lokalisiert (Rodriguez-Manzaneque, 2002), somit haben der durch die Fettsäuren erzeugte ER-Stress und die anschließende mitochondriale Dysfunktion vermutlich direkten Einfluss auf Glrx 5.

Die Mitochondrien haben neben der Produktion von ATP und beta-Oxidation von Fettsäuren auch eine entscheidene Rolle in der Eisenhomöostase. Eisen beeinflusst als essenzielles Spurenelement sämtliche Stoffwechselprozesse und kann bei Dysregulation zu schweren Zellschäden führen, unter anderem über die Bildung von ROS. Das Eisen wird auf verschiedenen Wegen in den Mitochondrien weiterverwertet. Es wird zur Häm-Synthese verwendet, in den Mitochondrien gespeichert oder Eisen-Schwefel-Cluster gebildet. Diese Cluster sind je nach Konfiguration vielseitig verwertbar (Braymer and Lill, 2017; Paul *et al.*, 2017). Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass Glrx 5 eine entscheidene Funktion bei der Herstellung von Eisen-Schwefel-Clustern einnimmt und das auch in humanen Zellen (Ye *et al.*, 2010). Eine Erniedrigung von Glrx 5 hat somit weitreichende Auswirkungen auf den Eisenmetabolismus innerhalb der Mitochondrien. Ein Knockout von Glrx 5 führte zu einer hohen Sensitivität gegenüber oxidativem Stress und Wachstumsstörungen (Rodriguez-Manzaneque, 2002; Banci *et al.*, 2014).

Glutaredoxine vermitteln ihre anti-apoptotische Aktivität mitunter auch durch die Regulation von NFkappaB. NFkappaB reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression von diversen Genen, welche für Immunantwort, Stress, Inflammation und die Inhibition von Apoptose verantwortlich sind. Dies geschieht bei adäquaten Stimuli, wie erhöhten ROS, durch die Bindung von NFkappaB an DNA-Sequenzen und die darauffolgende Transkription spezifischer Zielgene. Diese Bindungsaktivität wird unter anderem durch Glutaredoxine über Redox-Modifikationen reguliert (Hirota *et al.*, 2000; Daily *et al.*, 2001).

4.2.1 Veränderung der Effekte bei Kombination der Behandlungen

Auch die Kombination der Behandlungen führte zu interessanten Ergebnissen.

Hypoxie potenzierte in vergangenen Studien bei verschiedenen Zelltypen zytotoxische Eigenschaften. Hierzu zählte die NO-vermittelte Apoptose in Endothelzellen, Fibroblasten und Neuronen und die ROS-vermittele Apoptose und Nekroptose in neuroendokrinen Tumoren (Brown and Bal-Price, 2003; Walford *et al.*, 2004; Bullova *et al.*, 2016).

Auch in einer Studie mit humanen Pankreaszellen wurde der Einfluss von Hypoxie auf Fettsäuren und auf die Zellviabiliät untersucht. Hierbei wurde eine gesättigte (Stearinsäure) wie auch eine ungesättigte Fettsäure (Ölsäure) und moderate (4% O₂) als auch starke (1% O₂) Hypoxie untersucht. Nach 48 Stunden Kultivierungszeit hat auch hierbei Hypoxie die pro-apoptotischen Eigenschaften der Fettsäuren potenzieren können (Šrámek *et al.*, 2019).

In meinen Experimenten änderte der Einfluss von Hypoxie bei Kombination der Behandlungen sich unwesentlich im Vergleich zur Einzelbehandlung bei allen untersuchten Proteinen und Genexpressionen. Erstaunlicherweise veränderte sich jedoch der Einfluss von Palmitinsäure und Ölsäure signifikant. Die Fettsäuren hatten unter gleichzeitiger Behandlung mit Hypoxie fast keinen Einfluss mehr auf Insulin und Glrx 5. Die Ergebnisse unterschieden sich stark von den alleinigen Behandlungen durch die Fettsäuren ohne zusätzliche Hypoxie. Dies könnte durch den Faktor bedingt sein, dass MIN6-Zellen immortalisierte Tumorzellen sind und mit potenziellen Zellatypien von Tumoren einhergehen (Nakashima *et al.*, 2009; Skelin, Rupnik and Cencic, 2010). Möglicherweise wurden hierbei aufgrund des Tumormetabolismuses eine Aufhebung der Fettsäureeffekte durch die zusätzliche Hypoxiebehandlung bedingt.

In humanen beta-Zellen konnte nur eine starke Hypoxie von 1 % Sauerstoffgehalt einen signifikanten Effekt auf das Zellwachstum zeigen (Šrámek *et al.*, 2019). Interessanterweise sind murine Zelllinien wie MIN6 oder INS-1 empfindlicher gegenüber Hypoxie (Zheng *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2014; Qiao *et al.*, 2015). Möglicherweise ist der hypoxische Einfluss auf die MIN6-Zellen hierbei so gravierend, dass eine zusätzliche Behandlung mit Fettsäuren keine weiteren Effekte mehr auslösen können.

In einer weiteren Studie wurde entdeckt, dass in Mäusemyokardzellen bestimmte Fettsäuretransporter vom intrazellulären Pool zur Plasmamembran umverteilt werden und mehr Fettsäuren in die Myokardzellen aufgenommen worden sind und dort akkumulierten (Chabowski *et al.*, 2006). Die gleichen Fettsäuretransporter wurden auch in beta-Zellen gefunden, jedoch zeigte eine andere Studie mit humanen beta-Zellen, dass eine solche Umverteilung der Transporter nicht in den beta-Zellen erfolgte und somit eine Akkumulation über diesen Weg in den beta-Zellen nicht bestätigt werden konnte (Šrámek *et al.*, 2019).

4.2.2 Sekretion von Glutaredoxinen

Die Sekretion der Glutaredoxine wurde, wie bei der Insulinsekretion auch, durch die Messung der Glutaredoxin-Konzentration im Medium festgestellt. Nakamura et al. haben 1998 erstmalig Glrx 1 im Plasma detektieren können (Nakamura *et al.*, 1998). Seither wurden in zahlreichen Säugetierzellen Glrx 1 nachgewiesen und prinzipiell könnte jede davon Glrx 1 ins Plasma sezernieren, jedoch ist bisher nicht bekannt, welche dazu auch fähig sind (Du *et al.*, 2014). In unstimulierten peripheren mononuklearen Immunzellen (PBMC) wurde eine Sekretion von Glrx 1 nachgewiesen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Glrx 1 auch eine extrazelluläre Funktion hat (Lundberg *et al.*, 2004).

In meiner Studie war jedoch auffallend, dass in keinem der Experimente eine Glrx 1- oder Glrx 5-Sekretion detektiert wurde. Dies könnte einerseits damit zusammenhängen, dass die Messschwelle unterschritten wurde, andererseits induzieren freie Fettsäuren und Hypoxie in MIN6-Zellen wohlmöglich auch einfach keine Sekretion der untersuchten Glutaredoxine. Vermutlich gehören die MIN6-Zellen also zu denen, die Glrx 1 und Glrx 5 exprimieren, jedoch nicht sezernieren. Glrx 5 ist ohnehin ein mitochondriales Protein (Lillig, Berndt and Holmgren, 2008) und eine Sekretion wäre somit nicht zu erwarten gewesen. Zudem kann das Fehlen von Glutaredoxinen im Medium auch als Ausdruck guter Viabilität der Zellen interpretiert werden, da bei erheblichem Zelluntergang massenhaft Proteine, wie die Glutaredoxine, im Medium vorzufinden wären.

4.3 Konsequenz

Aus früheren Studien ist bekannt, dass insbesondere Glrx 1 und Glrx 5 in diabetischen Mäusen vermindert sind. Ich habe in meiner Studie beobachten können, dass sowohl Fettsäuren wie Palmitin- und Ölsäure als auch Hypoxie womöglich dazu beitragen, dass diese Glutaredoxine in MIN6-Zellen erniedrigt sind. Freie Fettsäuren sind in Patienten mit Diabetes mellitus stark erhöht und eine erhöhte metabolische Aktivität führt vermutlich bei diesen Patienten zu einer Hypoxie-ähnlichen Stoffwechsellage. Glutaredoxine sollen protektive Einflüsse auf beta-Zellen haben, aber ihre Regulation und konkreten Effekte sind noch nicht ausreichend erforscht. In dieser Studie konnten erstmalig Palmitin- bzw. Ölsäure und Hypoxie als mögliche Effektoren bzw. Regulatoren von Glrx 1 und Glrx 5 identifiziert werden.

In einer Studie waren bei Patienten mit gestörter Glukosetoleranz oder beginnendem Diabetes die Glutaredoxin-Aktivität und ihre antioxidative Kapazität im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht. Die Aktivität wurde hierbei mithilfe eines Glutaredoxin-Aktivitäts-Assays gemessen. Nach einem oralen Glukosetoleranztest stiegen die Aktivität und die antioxidative Kapazität bei Gesunden stärker an als bei der Patientengruppe. Die bereits hohen Glutaredoxinparameter konnten somit in der Patientengruppe nicht weiter gesteigert werden und erlitten eher eine Absenkung (Du *et al.*, 2014). Dies legt einen Verbrauch der Glutaredoxine nahe und gleichzeitig sind die Patienten nicht in der Lage noch weitere Glutaredoxine zu produzieren bzw. zu sezernieren. Vielleicht trägt also der Verbrauch oder Erniedrigung der Glutaredoxine zum Schutz zur Regulation der Stressantwort gegen Lipotoxizität und Hypoxie bei. Umgekehrt könnte eine Dysregulation der Glutaredoxinspiegel zur Pathogenese von Typ 2 Diabetes beitragen.

4.4 Limitationen

Wie bei jeder Studie sind auch in diesen Experimenten Limitationen zu beachten. MIN6-Zellen eignen sich prinzipiell sehr gut für Experimente in der diabetischen Grundlagenforschung, dennoch kann nicht direkt auf das menschliche Pankreas geschlossen werden. Die MIN6-Zelllienie ist eine immortalisierte Tumorzellienie mit tumorspezifischen Atypien und Metabolismen. Es wurde gezeigt, dass MIN6-Zellen in höheren Passagen eine geminderte Glukose-stimulierte Insulinsekretion aufweisen (Miyazaki *et al.*, 1990; Dowling *et al.*, 2006; O'Driscoll *et al.*, 2006). Außerdem war auch die Expression von Proteinen gemindert, welche für den Lipidstoffwechsel und welche die für die korrekte Proteinfaltung von antioxidativen Enzymen benötigt werden (Dowling *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2012). Zudem bedingt die kleine Stichprobenanzahl von n = 3 mit Schwankungen der Einzelwerte teilweise größere Varianzen in den Experimenten.

4.5 Zukunftsperspektiven

Ein weiterer Versuchsansatz wäre, die Zellen mit beiden Fettsäuren zeitgleich zu behandeln und mögliche Effekte zu identifizieren. Zudem könnten mehr und/oder höhere Konzentrationen eingesetzt werden und auch die Inkubationszeit verlängert werden. Es sollten auch noch weitere diabetesassoziierte Stressoren neben Fettsäuren und Hypoxie verwendet werden. Zellexperimente mit einer Über- oder Unterexpression von Glutaredoxinen könnten weitere Eigenschaften dieser aufzeigen. Im Rahmen dessen wäre es auch möglich eine konkrete Verbindung zwischen Glutaredoxin-Defizienz und Verminderung der Insulinsekretion herzustellen. Neben Proteinanalysen und Genexpressionsanalysen wäre es auch interessant zu sehen, wie der Zellzyklus durch Fettsäuren und Hypoxie beeinflusst wird. Dafür könnten via FACS Apoptose- und Nekroseparameter bestimmt werden. Die genauen Zusammenhänge von Glutaredoxinen und HIF-1 könnten künftig zudem erforscht werden. Eine Studie in vivo und letztendlich Humanstudien würden die Signifikanz von Glutaredoxinen im Menschen bestätigen.

5 Zusammenfassung

Diabetes mellitus gehört inzwischen zu den vier bedeutsamsten nichtübertragbaren Erkrankungen. Seine Begleit- und Folgeerkrankungen sind wichtige Ursachen vorzeitiger Todesfälle und Behinderungen. Eine Zunahme an Übergewicht in der Bevölkerung ist hierfür, insbesondere für den Typ 2 Diabetes mellitus, mitunter verantwortlich. Pathophysiologisch steht die fortschreitende Zerstörung der beta-Zellen im Vordergrund. Diese Destruktion erfolgt wiederum multifaktoriell und eine Verlangsamung dieser ist ein wichtiger Ansatz in der Behandlungsstrategie des Diabetes mellitus. Entzündungsreaktionen, oxidativer Stress und erhöhte freie Fettsäuren sind eng mit Diabetes assoziiert. Die Regulation dieser Prozesse ist bisher nicht vollends erforscht. Bedeutsam sind jedoch die Regulation über Redox-regulierte Signalwege, welche als Schalter posttranslationale reversible Modifikationen an Proteinen vornehmen können. In diesem Zusammenhang sind in den letzten Jahrzehnten die Glutaredoxine, welche zur Familie der Thioredoxine gehören, in den Vordergrund gerückt. Ihnen werden protektive Eigenschaften für die beta-Zelle zugesprochen, aber auch hier sind die genauen Effekte und Regulationen noch nicht vollständig erforscht. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von freien Fettsäuren und hypoxischen Kultivierungsbedingungen auf Glutaredoxine 1 und 5 in MIN6-Zellen untersucht. Hierbei konnte beobachtet werden, dass sowohl freie Fettsäuren in unterschiedlichen Konzentrationen als auch Hypoxie einen Einfluss auf die Protein- und Genexpression genannter Glutaredoxine haben. Es zeigte sich überwiegend eine Verminderung der genannten Expressionen. Weiterhin wurden auch Experimente mit Kombination beider Behandlungen durchgeführt. Auch bei diesen Versuchen waren Veränderungen der Glutaredoxinkonzentration und -expression zu erkennen.

In dieser Studie konnten somit die freien Fettsäuren Palmitin- und Ölsäure, als auch Hypoxie als mögliche regulatorische Faktoren der Protein- und Genexpression von Glutaredoxin 1 und Glutaredoxin 5 in MIN6-Zellen ermittelt werden.

6 Summary

Diabetes is one of the four most common noncommunicable diseases that comes with many accompanying illnesses. It is also a main cause of disabilities and premature death. An increase of obesity takes a pivotal role in this development. The destruction of beta-cells has a great impact in the pathology of diabetes. Inflammation, oxidative stress and elevated free fatty acids are associated with diabetes. The exact regulation of those processes is not yet fully understood. The regulation via redox-regulated pathways, which serve as a switch during posttranslational modification, plays a significant role in those processes. Regarding this glutaredoxines, proteins of the thioredoxin-family, came into the center of attention a few decades ago. They supposedly have protective properties in terms of preventing diabetes associated betacell-death, but again the exact pathways are not entirely clear. The study presented in this thesis was designed to gather further information about the regulation and effects of free fatty acids and hypoxia on Glrx 1 and Glrx 5 in MIN6-cells. It was shown that free fatty acids as well as hypoxia significantly decrease the concentration and gene expression of Glrx 1 and Glrx 5. The combination of both treatments also changed glutaredoxine levels.

Hence palmitic and oleic acid and hypoxia could be detected as possible regulating factors in the expression of protein and gene levels in glutaredoxine 1 and glutaredoxine 5 in MIN-6 cells.

7 Abkürzungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis

7.1 Abkürzungsverzeichnis

·NO	Stickstoffmonoxid
-SO ₂ H	Sulfinsäure
-SO ₃ H	Sulfonsäure
-SOH	Reaktive Sulfensäure
AGE	Advanced-Glycation-Endproducts
aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BOT	Basalunterstützte orale Therapie
BSA	Bovines Serumalbumin
COX	Cyclooxygenasen
СТ	Konventionelle Insulintherapie
Cys	Cystein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazelluläre-signalregulierte Kinase
FFS	Freie Fettsäure
Glrx	Glutaredoxin
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIF-1	Hypoxie-induzierten Faktor 1

HRE	Hypoxia-response element
HRP	Horseradish peroxidase
ICT	Intensivierte Insulintherapie
IFG	Impaired fasting glucose
IGT	Impaired glucose tolerance
INS	Insulin
ISCA	Iron-sulfur cluster assembly protein
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
L	Lysat
MafA	MAF bZIP transcription factor A
МАРК	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MIN6	Mouse Insulinoma, 6. Subklon
mRNA	Messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NfkappaB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO ⁺	Nitrosylkation
NO ⁻	Nitrosylanion
NOD-Mäuse	Non-Obese-Diabetic-Mouse
NOS	NO-Synthasen
NOX	NADPH-Oxidase
O2-	Superoxidanion
OH·	Hydroxylradikale
ONOO ⁻	Peroxinitrit
OxyR	Oxidative stress regulator
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDX-1	Pancreatic and duodenal homebox 1
qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase-chain-reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RNR	Ribonukleotid-Reduktase
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species

rpl32	Ribosomal Protein L32
rpm	Revolutions per minute
SAPK	Stressaktivierte Proteinkinase
Ser	Serin
SIT	Supplementäre Insulintherapie
SN	Supernatant
SOD	Superoxiddismutase
SV 40	Simian-Virus 40
ТМВ	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Konzentrationsschwankungen oxidativer Spezies unter verschieder	nen
Bedingungen (Dröge, 2002).	10
Abbildung 2: Oxidativer Stress als pathophysiologisch relevanter Faktor in	der
Entstehung degenerativer Erkrankungen (Pham-Huy, He and Pham-Huy, 2008).	11
Abbildung 3: Folgen bei chronischer Erhöhung von freien Fettsäuren (Evans et al., 200	02).
	13
Abbildung 4: Dithiol- und Monothiol-Mechanismus von Glrx (Lillig, Berndt	and
Holmgren, 2008).	15
Abbildung 5: Thioredoxin Proteinfaltstruktur bestehend aus drei alpha-Helices und	vier
beta-Faltblättern (Martin, 1995).	18
Abbildung 6: MTT Test zur Überprüfung der Zellviabilität bei verschien	den
Palmitinsäurekonzentrationen. Abfall der Zellviabilität bei 5000 μ M unter 75% und	bei
10000 μM unter 50%.	36
Abbildung 7: MTT Test zur Überprüfung der Zellviabilität bei verschiede	nen
Ölsäurekonzentrartionen. Abfall der Zellviabilität bei 10000 μ M unter 50%.	37
Abbildung 8: Insulinsekretion unter Palmitinsäurebehandlung und Normoxie.	39
Abbildung 9: Insulingehalt unter Palmitinsäurebehandlung und Normoxie.	39
Abbildung 10: Ins 1-Genexpression unter Palmitinsäurebehandlung und Normoxie.	40
Abbildung 11: Ins 2-Genexpression unter Palmitinsäurebehandlung und Normoxie.	40
Abbildung 12: Insulinsekretion unter Ölsäurebehandlung und Normoxie.	41
Abbildung 13: Insulingehalt unter Ölsäurebehandlung und Normoxie.	42
Abbildung 14: Ins 1-Genexpression unter Ölsäurebehandlung und Normoxie.	42
Abbildung 15: Ins 2-Genexpression unter Ölsäurebehandlung und Normoxie.	43
Abbildung 16: Glrx 1-Gehalt unter Palmitinsäure und Normoxie.	44
Abbildung 17: Glrx 1-Genexpression unter Palmitinsäure und Normoxie.	44
Abbildung 18: Glrx 1-Gehalt unter Ölsäure und Normoxie.	45
Abbildung 19: Glrx1-Genexpression unter Ölsäure und Normoxie.	46
Abbildung 20: Glrx 5 Gehalt unter Palmitinsäurebehandlung und Normoxie.	47
Abbildung 21: Glrx 5 Genexpression unter Palmitinsäurebehandlung und Normoxie.	47
Abbildung 22: Glrx 5-Gehalt unter Ölsäurebehandlung und Normoxie.	48
Abbildung 23: Glrx 5-Genexpression unter Ölsäurebehandlung und Normoxie.	49

Abbildung 24: Insulingehalt unter Hypoxiebehandlung.	50
Abbildung 25: Insulinsekretion unter Hypoxiebehandlung.	50
Abbildung 26: Ins 1-Genexpression unter Hypoxiebehandlung.	51
Abbildung 27: Ins 2-Genexpression unter Hypoxiebehandlung.	52
Abbildung 28: Glrx 1-Gehalt unter Hypoxiebehandlung.	53
Abbildung 29: Glrx 1-Genexpression unter Hypoxiebehandlung.	53
Abbildung 30: Glrx 5-Gehalt unter Hypoxiebehandlung.	54
Abbildung 31: Glrx 5-Genexpression unter Hypoxiebehandlung.	55
Abbildung 32: Insulinsekretion unter kombinierter Behandlung mit Palmitinsäu	re und
Hypoxie.	56
Abbildung 33: Insulingehalt unter kombinierter Behandlung mit Palmitinsäur	re und
Hypoxie.	57
Abbildung 34: Ins 1-Genexpression unter kombinierter Behandlung mit Palmiti	nsäure
und Hypoxie	58
Abbildung 35: Ins 2-Genexpression unter kombinierter Behandlung mit Palmiti	nsäure
und Hypoxie	58
Abbildung 38: Glrx 5-Gehalt unter kombinierter Behandlung mit Palmitinsäur	re und
Hypoxie	59
Abbildung 39: Glrx 5-Genexpression unter kombinierter Behandlung mit Palmiti	nsäure
und Hypoxie	60
Abbildung 40: Insulinsekretion unter kombinierter Behandlung mit Ölsäure und H	ypoxie
	61
Abbildung 41: Insulingehalt unter kombinierter Behandlung mit Ölsäure und H	ypoxie
	61
Abbildung 42: Ins 1-Genexpression unter kombinierter Behandlung mit Ölsäu	re und
Hypoxie	62
Abbildung 43: Ins 2-Genexpression unter kombinierter Behandlung mit Ölsäu	re und
Hypoxie	63
Abbildung 46: Glrx 5-Gehalt unter kombinierter Behandlung mit Ölsäure und H	ypoxie
	64
Abbildung 47: Glrx 5-Genexpression unter kombinierter Behandlung mit Ölsäu	re und
Hypoxie	64

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stufenmodell zur Behandlung des Typ 2 Diabetes mellitus (Nation	ale	
Versorgungsleitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes, 2014)		
Tabelle 2: Andere spezifische Diabetes-Typen (Nationale Versorgungsleitlinie Thera	pie	
des Typ-2-Diabetes, 2014)	6	
Tabelle 3: Geräte	21	
Tabelle 4: Gebrauchsartikel	22	
Tabelle 5: Chemikalien	23	
Tabelle 6: Puffer, Lösungen und Medien	24	
Tabelle 7: Kits	24	
Tabelle 8: Primersequenzen	25	
Tabelle 9: Software	25	
Tabelle 10: Pipettierschema der Fettsäure-Medien	27	
Tabelle 11: Thermo-Cycler Programme für die cDNA-Synthese	33	
Tabelle 12: cDNA Verdünnungsreihe für die Primerverifizierung	33	
Tabelle 13: Ablauf der qRT-PCR mit anschließender Schmelzkurzvenbestimmung	34	
Tabelle 14: Effizienzermittlung der PCR-Primer	34	
Tabelle 15: Zellproliferation bei gewählten Fettsäurekonzentrationen	37	
Tabelle 16: Legende zur Zusammenfassung der Ergebnisse	65	
Tabelle 17: Einfluss von Palmitinsäure auf MIN6-Zellen	65	
Tabelle 18: Einfluss von Ölsäure auf MIN6-Zellen	65	
Tabelle 19: Einfluss von Hypoxie (2 % O ₂) auf MIN6-Zellen	66	
Tabelle 20: Kombination der Behandlungen mit Palmitinsäure und Hypoxie (2 % O ₂)	66	
Tabelle 21: Kombination der Behandlungen mit Ölsäure und Hypoxie (2 % O2)	66	

8 Literaturverzeichnis

American Diabetes Association (2019) '2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetesd2019', *Diabetes Care*, 42(January), pp. S13–S28. doi: 10.2337/dc19-S002.

Ashcroft, F. M. and Rorsman, P. (2012) 'Diabetes mellitus and the β cell: The last ten years', *Cell*. Europe PMC Funders, pp. 1160–1171. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.010.

Åslund, F. and Beckwith, J. (1999) 'Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation', *Cell*. Cell Press, 96(6), pp. 751–753. doi: S0092-8674(00)80584-X [pii].

Asmat, U., Abad, K. and Ismail, K. (2016) 'Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review', *Saudi Pharmaceutical Journal*. Elsevier, pp. 547–553. doi: 10.1016/j.jsps.2015.03.013.

Banci, L. *et al.* (2014) '[2Fe-2S] cluster transfer in iron-sulfur protein biogenesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 111(17), pp. 6203–6208. doi: 10.1073/pnas.1400102111.

Basuli, D. *et al.* (2014) 'Epidemiological associations between iron and cardiovascular disease and diabetes', *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers, p. 117. doi: 10.3389/fphar.2014.00117.

Beinert, H. and Kiley, P. J. (1999) 'Fe-S proteins in sensing and regulatory functions', *Current Opinion in Chemical Biology*. Elsevier Current Trends, pp. 152–157. doi: 10.1016/S1367-5931(99)80027-1.

Bell, E. L. *et al.* (2007) 'The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production', *J Cell Biol.* The Rockefeller University Press, 177(6), pp. 1029–1036. doi: 10.1083/jcb.200609074.

Bellamy, L. *et al.* (2009) 'Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis', *The Lancet*, 373(9677), pp. 1773–1779. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60731-5.

Bensellam, M., Laybutt, D. R. and Jonas, J. C. (2012) 'The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: Recent findings and future research directions', *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier, pp. 1–27. doi: 10.1016/j.mce.2012.08.003.

Berndt, C., Lillig, C. H. and Holmgren, A. (2006) 'Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system', *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. American Physiological Society, 292(3), pp. H1227–H1236. doi: 10.1152/ajpheart.01162.2006.

Biden, T. J. *et al.* (2014) 'Lipotoxic endoplasmic reticulum stress, β cell failure, and type 2 diabetes mellitus.', *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. Elsevier Current Trends, 25(8), pp. 389–398. doi: 10.1016/j.tem.2014.02.003.

Bindoli, A. and Rigobello, M. P. (2013) 'Principles in Redox Signaling: From Chemistry to Functional Significance', *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(13), pp. 1557–1593. doi: 10.1089/ars.2012.4655.

Braymer, J. J. and Lill, R. (2017) 'Iron–sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., pp. 12754–12763. doi: 10.1074/jbc.R117.787101.

Briaud, I. *et al.* (2001) 'Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucosedependent esterification of fatty acids into neutral lipids', *Diabetes*. NIH Public Access, 50(2), pp. 315–321. doi: 10.2337/diabetes.50.2.315.

Brown, G. C. and Bal-Price, A. (2003) 'Inflammatory Neurodegeneration Mediated by Nitric Oxide, Glutamate, and Mitochondria', *Molecular Neurobiology*. Humana Press, pp. 325–355. doi: 10.1385/MN:27:3:325.

Bullova, P. *et al.* (2016) 'Hypoxia potentiates the cytotoxic effect of piperlongumine in pheochromocytoma models', *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 7(26), pp. 40531–40545. doi: 10.18632/oncotarget.9643.

Bünzli, H. F. *et al.* (1972) ' Amino Acid Sequence of the two Insulins from Mouse (Mus musculus) ', *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 353(1), pp. 451–458. doi: 10.1515/bchm2.1972.353.1.451.

Busch, A. K. *et al.* (2002) 'Expression profiling of palmitate- and oleate-regulated genes provides novel insights into the effects of chronic lipid exposure on pancreatic β -cell function', *Diabetes*, 51(4), pp. 977–987. doi: 10.2337/diabetes.51.4.977.

Bushweller, J. H. *et al.* (1992) 'Structural and functional characterization of the mutant Escherichia coli glutaredoxin (C14-S) and its mixed disulfide with glutathione.', *Biochemistry*, 31(38), pp. 9288–9293. doi: Doi 10.1021/Bi00153a023.

Butler, A. E. *et al.* (2002) 'Beta-cell deficit and increased beta-Cell apoptosis in humans with type 2 diabetes', *Diabetes*. American Diabetes Association, 52(January), pp. 102–10. doi: 10.2337/diabetes.52.9.2304.

Camaschella, C. *et al.* (2007) 'The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload', *Blood*. American Society of Hematology, 110(4), pp. 1353–1358. doi: 10.1182/blood-2007-02-072520.

Carlsson, C., Borg, L. A. H. and Welsh, N. (1999) 'Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro', *Endocrinology*, 140(8), pp. 3422–3428. doi: 10.1210/en.140.8.3422.

Cash, T. P., Pan, Y. and Simon, M. C. (2007) 'Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing.', *Free radical biology & medicine*. NIH Public Access, 43(9), pp. 1219–25. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.07.001.

Chabowski, A. et al. (2006) 'Hypoxia-induced fatty acid transporter translocation increases fatty acid transport and contributes to lipid accumulation in the heart', FEBS

Letters. John Wiley & Sons, Ltd, 580(15), pp. 3617–3623. doi: 10.1016/j.febslet.2006.05.045.

Chandel, N. S. *et al.* (1998) 'Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxiainduced transcription.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(20), pp. 11715–20. doi: 10.1073/pnas.95.20.11715.

Cheng, K. *et al.* (2012) 'High passage MIN6 cells have impaired insulin secretion with impaired glucose and lipid oxidation', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 7(7). doi: 10.1371/journal.pone.0040868.

Cheng, N.-H. *et al.* (2011) 'A mammalian monothiol glutaredoxin, Grx3, is critical for cell cycle progression during embryogenesis', *FEBS Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 278(14), pp. 2525–2539. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08178.x.

Cnop, M. *et al.* (2001) 'Inverse Relationship between Cytotoxicity of Free Fatty Acids in Pancreatic Islet Cells and Cellular Triglyceride Accumulation', *Diabetes*. American Diabetes Association Inc., 50(8), pp. 1771–1777. doi: 10.2337/diabetes.50.8.1771.

Couturier, J. *et al.* (2015) 'The roles of glutaredoxins ligating Fe-S clusters: Sensing, transfer or repair functions?', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier, pp. 1513–1527. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.09.018.

Daily, D. *et al.* (2001) 'Glutaredoxin protects cerebellar granule neurons from dopamineinduced apoptosis by activating NF-κB via Ref-1', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 276(2), pp. 1335–1344. doi: 10.1074/jbc.M008121200.

Dalle-Donne, I. *et al.* (2007) 'S-glutathionylation in protein redox regulation', *Free Radical Biology and Medicine*. Pergamon, pp. 883–898. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.014.

Deutsche Diabetes Gesellschaft (2011) 'Therapie des Typ-1-Diabetes', S3-Leitlinie Therapie des Typ-1-Diabetes.

87

Deutsche Diabetes Gesellschaft (2019) 'Praxisempfehlung der Deutschen Diabetes Gesellschaft', *Diabetologie und Stoffwechsel*, 13(1), p. 7. doi: 10.1055/s-0043-124608.

Dowling, P. *et al.* (2006) 'Proteomic screening of glucose-responsive and glucose nonresponsive MIN-6 beta cells reveals differential expression of proteins involved in protein folding, secretion and oxidative stress', *Proteomics*. John Wiley & Sons, Ltd, 6(24), pp. 6578–6587. doi: 10.1002/pmic.200600298.

Dröge, W. (2002) 'Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function', *Physiological Reviews*. American Physiological SocietyBethesda, MD, 82(1), pp. 47–95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.

Du, Y. *et al.* (2014) 'Plasma glutaredoxin activity in healthy subjects and patients with abnormal glucose levels or overt type 2 diabetes', *Acta Diabetologica*, 51(2), pp. 225–232. doi: 10.1007/s00592-013-0498-2.

Evans, J. L. *et al.* (2002) 'Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes', *Endocrine Reviews*, 23(5), pp. 599–622. doi: 10.1210/er.2001-0039.

Evans, J. L. *et al.* (2003) 'Are oxidative stress - Activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction?', *Diabetes*. American Diabetes Association, pp. 1–8. doi: 10.2337/diabetes.52.1.1.

Fernandes, A. P. and Holmgren, A. (2004) 'Glutaredoxins: Glutathione-Dependent Redox Enzymes with Functions Far Beyond a Simple Thioredoxin Backup System', *antioxidants & redox signaling*, 6(1), pp. 63–74.

Finkel, T. (2011) 'Signal transduction by reactive oxygen species.', *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 194(1), pp. 7–15. doi: 10.1083/jcb.201102095.

Fu, Z., R. Gilbert, E. and Liu, D. (2013) 'Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes', *Current Diabetes Reviews*. NIH Public Access, 9(1), pp. 25–53. doi: 10.2174/157339913804143225.

Garcia-Contreras, M. *et al.* (2017) 'Metabolomics Study of the Effects of Inflammation, Hypoxia, and High Glucose on Isolated Human Pancreatic Islets', *Journal of Proteome Research*, 16(6), pp. 2294–2306. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00160.

Gerber, P. A. and Rutter, G. A. (2017) 'The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus', *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert Inc., pp. 501–518. doi: 10.1089/ars.2016.6755.

Goda, N. and Kanai, M. (2012) 'Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism', *International Journal of Hematology*, 95(5), pp. 457–463. doi: 10.1007/s12185-012-1069-y.

Groitl, B. and Jakob, U. (2014) 'Thiol-based redox switches', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. Elsevier, 1844(8), pp. 1335–1343. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.03.007.

Guzy, R. D. *et al.* (2005) 'Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing', *Cell Metabolism*. Cell Press, 1(6), pp. 401–408. doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.001.

Hagman, D. K. *et al.* (2005) 'Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans', *Journal of Biological Chemistry.* NIH Public Access, 280(37), pp. 32413–32418. doi: 10.1074/jbc.M506000200.

Hanschmann, E.-M. *et al.* (2013) 'Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins-molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling.', *Antioxidants & redox signaling*, 19(13), pp. 1539–605. doi: 10.1089/ars.2012.4599.

Haunhorst, P. et al. (2013) 'Crucial function of vertebrate glutaredoxin 3 (PICOT) in iron homeostasis and hemoglobin maturation', *Molecular Biology of the Cell*. American

Society for Cell Biology, 24(12), pp. 1895–1903. doi: 10.1091/mbc.E12-09-0648.

Herrmann, J. M. and Dick, T. P. (2012) 'Redox Biology on the rise', in *Biological Chemistry*. Walter de Gruyter, pp. 999–1004. doi: 10.1515/hsz-2012-0111.

Hirosumi, J. *et al.* (2002) 'A central role for JNK in obesity and insulin resistance', *Nature*. Nature Publishing Group, 420(6913), pp. 333–336. doi: 10.1038/nature01137.

Hirota, K. *et al.* (2000) 'Nucleoredoxin, glutaredoxin, and thioredoxin differentially regulate NF-κB, AP-1, and CREB activation in HEK293 cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 274(1), pp. 177–182. doi: 10.1006/bbrc.2000.3106.

Holmgren, A. (1976) 'Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleosidediphosphate reductase dependent upon glutathione', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(7), pp. 2275–2279. doi: 10.1073/pnas.73.7.2275.

Holmgren, A. (1989) 'Thioredoxin and glutaredoxin systems. [Review]', *Journal of Biological Chemistry*, 264(24), pp. 13963–13966. Available at: http://www.jbc.org/content/264/24/13963.full.pdf (Accessed: 10 February 2018).

Holmgren, A. and Aslund, F. (1995) 'Glutaredoxin', *Methods in Enzymology*, 252(C), pp. 283–292. doi: 10.1016/0076-6879(95)52031-7.

Holmgren, A. and Sengupta, R. (2010) 'The use of thiols by ribonucleotide reductase', *Free Radical Biology and Medicine*, pp. 1617–1628. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.005.

International Diabetes Foundation (2019) *International Diabetes Federation - Facts & Figures, IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium.* Available at: https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/facts-figures.html (Accessed: 25 January 2020).

Ishihara, H. *et al.* (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), pp. 1139–1145. doi: 10.1007/BF00401058.

Ivarsson, R. *et al.* (2005) 'Redox control of exocytosis: Regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin', *Diabetes*. American Diabetes Association, 54(7), pp. 2132–2142. doi: 10.2337/diabetes.54.7.2132.

Jitrapakdee, S. *et al.* (2010) 'Regulation of insulin secretion: Role of mitochondrial signalling', *Diabetologia*. NIH Public Access, pp. 1019–1032. doi: 10.1007/s00125-010-1685-0.

Johansen, J. S. *et al.* (2005) 'Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical pratice', *Cardiovascular Diabetology*. BioMed Central, p. 5. doi: 10.1186/1475-2840-4-5.

Jones, D. P. (2006) 'Redefining Oxidative Stress', *Antioxidants & Redox Signaling*, 8, pp. 1865–1879. Available at: http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/ars.2006.8.1865 (Accessed: 16 February 2018).

Kahn, S. E., Cooper, M. E. and Del Prato, S. (2014) 'Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: Perspectives on the past, present, and future', *The Lancet*. NIH Public Access, 383(9922), pp. 1068–1083. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62154-6.

Karaskov, E. *et al.* (2006) 'Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic β -cell apoptosis', *Endocrinology*. Oxford Academic, 147(7), pp. 3398–3407. doi: 10.1210/en.2005-1494.

Kelpe, C. L. *et al.* (2003) 'Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 278(32), pp. 30015–30021. doi: 10.1074/jbc.M302548200.

Kharroubi, I. *et al.* (2004) 'Free fatty acids and cytokines induce pancreatic β -cell apoptosis by different mechanisms: Role of nuclear factor- κ B and endoplasmic reticulum stress', *Endocrinology*, 145(11), pp. 5087–5096. doi: 10.1210/en.2004-0478.

Kiley, P. J. and Beinert, H. (2003) 'The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria', *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Current Trends, pp. 181–185. doi: 10.1016/S1369-5274(03)00039-0.

Kleinwechter, H. (2012) 'Gestationsdiabetes mellitus', *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, pp. 999–1002. doi: 10.1055/s-0032-1304877.

Laurent, T. C. *et al.* (1964) 'Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. V. Purification and Properties of Thioredoxin reductase from Escherichia coli B.', *The Journal of biological chemistry*, 239(10), pp. 3445–3451. Available at: http://www.jbc.org/content/239/10/3436.full.pdf (Accessed: 26 April 2018).

Lekli, I. *et al.* (2010) 'Functional recovery of diabetic mouse hearts by glutaredoxin-1 gene therapy: Role of Akt-FoxO-signaling network', *Gene Therapy*, 17(4), pp. 478–485. doi: 10.1038/gt.2010.9.

Li, N., Frigerio, F. and Maechler, P. (2008) 'The sensitivity of pancreatic β-cells to mitochondrial injuries triggered by lipotoxicity and oxidative stress', *Biochemical Society Transactions*, 36(5), pp. 930–934. doi: 10.1042/BST0360930.

Lillig, C. H., Berndt, C. and Holmgren, A. (2008) 'Glutaredoxin systems', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1780(11), pp. 1304–1317. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.06.003.

Liu, X. *et al.* (2015) 'Glutaredoxin 1 (Grx1) protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative damage by preventing AKT glutathionylation', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 56(5), pp. 2821–2832. doi: 10.1167/iovs.14-15876.

Lundberg, M. et al. (2004) 'Cellular and plasma levels of human glutaredoxin 1 and 2

detected by sensitive ELISA systems', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 319(3), pp. 801–809. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.04.199.

Lupi, R. *et al.* (2002) 'Prolonged Exposure to Free Fatty Acids Has Cytostatic and Pro-Apoptotic Effects on Human Pancreatic Islets', *Diabetes*. American Diabetes Association, 51(5), pp. 1437–1442. doi: 10.2337/diabetes.51.5.1437.

Maechler, P. and Wollheim, C. B. (2001) 'Mitochondrial function in normal and diabetic β-cells', *Nature*, pp. 807–812. doi: 10.1038/414807a.

Maedler, K. *et al.* (2003) 'Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic β -cell turnover and function', *Diabetes*. American Diabetes Association, 52(3), pp. 726–733. doi: 10.2337/diabetes.52.3.726.

Mahadev, K. *et al.* (2001) 'Hydrogen Peroxide Generated during Cellular Insulin Stimulation Is Integral to Activation of the Distal Insulin Signaling Cascade in 3T3-L1 Adipocytes', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 276(52), pp. 48662–48669. doi: 10.1074/jbc.M105061200.

Markussen, J. (1970) 'Mouse Insulins - Separation and Structures', (4), pp. 149–155.

Martin, J. L. (1995) 'Thioredoxin -a fold for all reasons', *Structure*, 3(3), pp. 245–250. doi: 10.1016/S0969-2126(01)00154-X.

Mieyal, J. J. *et al.* (2008) 'Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation.', *Antioxidants & redox signaling*, 10(11), pp. 1941–1988. doi: 10.1089/ars.2008.2089.

Miles, J. M. *et al.* (2003) 'Nocturnal and postprandial free fatty acid kinetics in normal and type 2 diabetic subjects: Effects of insulin sensitization therapy', *Diabetes*. American Diabetes Association, 52(3), pp. 675–681. doi: 10.2337/diabetes.52.3.675.

Miyazaki, J. I. et al. (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), pp. 126–132. doi: 10.1210/endo-127-1-126.

Mühlenhoff, U. *et al.* (2003) 'Components involved in assembly and dislocation of ironsulfur clusters on the scaffold protein Isu1p', *EMBO Journal*, 22(18), pp. 4815–4825. doi: 10.1093/emboj/cdg446.

Nakamura, H. *et al.* (1998) 'Measurements of plasma glutaredoxin and thioredoxin in healthy volunteers and during open-heart surgery', *Free Radical Biology and Medicine*, 24(7–8), pp. 1176–1186. doi: 10.1016/S0891-5849(97)00429-2.

Nakashima, K. *et al.* (2009) 'MIN6 is not a pure beta cell line but a mixed cell line with other pancreatic endocrine hormones', *Endocrine Journal*. The Japan Endocrine Society, 56(1), pp. 45–53. doi: 10.1507/endocrj.K08E-172.

Nationale Versorgungsleitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes (2014) Nationale Versorgungsleitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes-Langfassung, 1. Auflage, Version 3, Internist. doi: 10.1007/s00108-015-0002-x.

Nguyen, M. T. A. *et al.* (2005) 'JNK and Tumor Necrosis Factor-α Mediate Free Fatty Acid-induced Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes', *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), pp. 35361–35371. doi: 10.1074/jbc.M504611200.

O'Driscoll, L. *et al.* (2006) 'Phenotypic and global gene expression profile changes between low passage and high passage MIN-6 cells', *Journal of Endocrinology*. J Endocrinol, 191(3), pp. 665–676. doi: 10.1677/joe.1.06894.

Obeid, L. M. *et al.* (1993) 'Programmed cell death induced by ceramide', *Science*. Academic Press, 259(5102), pp. 1769–1771. Available at: http://science.sciencemag.org/content/sci/259/5102/1769.full.pdf (Accessed: 21 April 2018).

Ojeda, L. *et al.* (2006) 'Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in Saccharomyces cerevisiae', *Journal of Biological*

Chemistry. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 281(26), pp. 17661–17669. doi: 10.1074/jbc.M602165200.

Palomer, X. *et al.* (2017) 'Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in
Type 2 Diabetes Mellitus', *Trends in Endocrinology & Metabolism*. doi: 10.1016/j.tem.2017.11.009.

Paul, B. T. *et al.* (2017) 'Mitochondria and Iron: current questions', *Expert Review of Hematology*, 10(1), pp. 65–79. doi: 10.1080/17474086.2016.1268047.

Petry, S. F. (2015) Thioredoxin family proteins in the db / db mouse.

Petry, S. F. *et al.* (2017) 'Differential expression of islet glutaredoxin 1 and 5 with high reactive oxygen species production in a mouse model of diabesity', *PLoS ONE*. Edited by M. Pietropaolo. Public Library of Science, 12(5), p. e0176267. doi: 10.1371/journal.pone.0176267.

Pham-Huy, L. A., He, H. and Pham-Huy, C. (2008) 'Free radicals, antioxidants in disease and health.', *International journal of biomedical science : IJBS*. Master Publishing Group, 4(2), pp. 89–96. doi: 10.1073/pnas.0804252105.

Poitout, V. *et al.* (2006) 'Regulation of the Insulin Gene by Glucose and Fatty Acids', *The Journal of Nutrition*, 136(4), pp. 873–876. doi: 10.1093/jn/136.4.873.

Poitout, V. and Robertson, R. P. (2008) 'Glucolipotoxicity: Fuel excess and beta-cell dysfunction', *Endocrine Reviews*, 29(3), pp. 351–366. doi: 10.1210/er.2007-0023.

Qiao, N. *et al.* (2015) 'Ets-1 as an early response gene against hypoxia-induced apoptosis in pancreatic β -cells', *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group, 6(2), pp. e1650–e1650. doi: 10.1038/cddis.2015.8.

Qu, Y. *et al.* (2011) 'Thioredoxin-like 2 regulates human cancer cell growth and metastasis via redox homeostasis and NF-κB signaling', *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 121(1), pp. 212–225. doi:

10.1172/JCI43144.

Rahier, J. (1988) 'The Diabetic Pancreas: A Pathologist's View', in *The Pathology of the Endocrine Pancreas in Diabetes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 17–40. doi: 10.1007/978-3-642-72691-0_2.

Ray, P. D., Huang, B. W. and Tsuji, Y. (2012) 'Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling', *Cellular Signalling*. NIH Public Access, pp. 981–990. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.

Reaven, G. M. *et al.* (1988) 'Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM', *Diabetes*, 37(8), pp. 1020–1024. doi: 10.2337/diab.37.8.1020.

Reinbothe, T. M. *et al.* (2009) 'Glutaredoxin-1 mediates NADPH-dependent stimulation of calcium-dependent insulin secretion', *Molecular Endocrinology*. The Endocrine Society, 23(6), pp. 893–900. doi: 10.1210/me.2008-0306.

Robertson, A. P. (2004) 'Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, pp. 42351–42354. doi: 10.1074/jbc.R400019200.

Robertson, R. P. *et al.* (2003) 'Glucose toxicity in β -cells: Type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection', *Diabetes*, pp. 581–587. doi: 10.2337/diabetes.52.3.581.

Robertson, R. P. *et al.* (2004) 'β-Cell Glucose Toxicity, Lipotoxicity, and Chronic Oxidative Stress in Type 2 Diabetes', in *Diabetes*, pp. S119–S124. doi: 10.2337/diabetes.53.2007.s119.

Rochette, L. *et al.* (2014) 'Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier, 1840(9), pp. 2709–2729. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.05.017.

96

Roderigo-Milne, H. *et al.* (2002) 'Differential expression of insulin genes 1 and 2.pdf', 296, pp. 589–595.

Rodriguez-Manzaneque, M. T. (2002) 'Grx5 Is a Mitochondrial Glutaredoxin Required for the Activity of Iron/Sulfur Enzymes', *Molecular Biology of the Cell*, 13(4), pp. 1109–1121. doi: 10.1091/mbc.01-10-0517.

Rodríguez-Manzaneque, M. T. *et al.* (1999) 'Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in Saccharomyces cerevisiae.', *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology, 19(12), pp. 8180–90. doi: 10.1128/MCB.19.12.8180.

Sako, Y. and Grill, V. E. (1990) 'A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and b cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation', *Endocrinology*, 127(4), pp. 1580–1589. doi: 10.1210/endo-127-4-1580.

Sato, Y. *et al.* (2011) 'Cellular hypoxia of pancreatic beta-cells due to high levels of oxygen consumption for insulin secretion in vitro', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 286(14), pp. 12524–12532. doi: 10.1074/jbc.M110.194738.

Sato, Y. *et al.* (2014) 'Moderate hypoxia induces β -cell dysfunction with HIF-1independent gene expression changes', *PLoS ONE*, 9(12), pp. 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0114868.

Schieber, M. and Chandel, N. S. (2014) 'ROS function in redox signaling and oxidative stress', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.

Schmitt, F. J. *et al.* (2014) 'Reactive oxygen species: Re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier, pp. 835–848. doi: 10.1016/j.bbabio.2014.02.005. Semenza, G. L. (2007) 'Life with oxygen', *Science*, 318(5847), pp. 62–64. doi: 10.1126/science.1147949.

Shao, D. *et al.* (2017) 'Glutaredoxin-1 Deficiency Causes Fatty Liver and Dyslipidemia by Inhibiting Sirtuin-1', *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert Inc., 27(6), pp. 313–327. doi: 10.1089/ars.2016.6716.

Shelton, M. D., Kern, T. S. and Mieyal, J. J. (2007) 'Glutaredoxin Regulates Nuclear Factor κ-B and Intercellular Adhesion Molecule in Müller Cells', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 282(17), pp. 12467–12474. doi: 10.1074/jbc.M610863200.

Shiao, M. S. *et al.* (2008) 'Adaptive evolution of the insulin two-gene system in mouse', *Genetics*. Genetics Society of America, 178(3), pp. 1683–1691. doi: 10.1534/genetics.108.087023.

Shimabukuro, M. *et al.* (1998) 'Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), pp. 2498–502. doi: 10.1073/pnas.95.5.2498.

Shuyan, L. *et al.* (2014) 'Protective effect and mechanism of glutaredoxin 1 on coronary arteries endothelial cells damage induced by high glucose', *Bio-Medical Materials and Engineering*, 24(6), pp. 3897–3903. doi: 10.3233/BME-141221.

Sies, H. and Jones, D. (2007) 'Oxidative Stress', *Encyclopedia of Stress*, pp. 45–48. doi: 10.1016/B978-012373947-6.00285-3.

Simcox, J. A. and McClain, D. A. (2013) 'Iron and diabetes risk', *Cell Metabolism*. NIH Public Access, pp. 329–341. doi: 10.1016/j.cmet.2013.02.007.

Skelin, M., Rupnik, M. and Cencic, A. (2010) 'Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research.', *ALTEX*, 27(2), pp. 105–113. doi: 20686743.

Sobczak, A. I. S., Blindauer, C. A. and Stewart, A. J. (2019) 'Changes in plasma free

fatty acids associated with type-2 diabetes', *Nutrients*. MDPI AG. doi: 10.3390/nu11092022.

Soejima, A. *et al.* (1996) 'Mitochondrial DNA is required for regulation of glucosestimulated insulin secretion in a mouse pancreatic beta cell line, MIN6.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 271(42), pp. 26194–9. doi: 10.1074/JBC.271.42.26194.

Srámek, J. *et al.* (2019) 'Hypoxia modulates effects of fatty acids on NES2Y human pancreatic β-cells', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, 20(14). doi: 10.3390/ijms20143441.

Stumvoll, M., Goldstein, B. J. and Van Haeften, T. W. (2005) 'Type 2 diabetes: Principles of pathogenesis and therapy', in *Lancet*. Elsevier, pp. 1333–1346. doi: 10.1016/S0140-6736(05)61032-X.

Tiedge, M. *et al.* (1997) 'Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells', *Diabetes*, 46(11), pp. 1733–1742. doi: 10.2337/diab.46.11.1733.

Unger, R. H. (2002) 'Lipotoxic Diseases', Diabetes, (1).

Vlamis-Gardikas, A. *et al.* (2002) 'Characterization of Escherichia coli null mutants for glutaredoxin 2', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 277(13), pp. 10861–10868. doi: 10.1074/jbc.M111024200.

Walford, G. A. *et al.* (2004) 'Hypoxia Potentiates Nitric Oxide-mediated Apoptosis in Endothelial Cells via Peroxynitrite-induced Activation of Mitochondria-dependent and - independent Pathways', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 279(6), pp. 4425–4432. doi: 10.1074/jbc.M310582200.

Watanabe, Y. *et al.* (2016) 'Glutathione adducts induced by ischemia and deletion of glutaredoxin-1 stabilize HIF-1a and improve limb revascularization', *Proceedings of the*

National Academy of Sciences. National Academy of Sciences, 113(21), pp. 6011–6016. doi: 10.1073/pnas.1524198113.

Wingert, R. A. *et al.* (2005) 'Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis', *Nature*. Nature Publishing Group, 436(7053), pp. 1035–1039. doi: 10.1038/nature03887.

Winterbourn, C. C. (1995) 'Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction', *Toxicology Letters*, 82–83(C), pp. 969–974. doi: 10.1016/0378-4274(95)03532-X.

World Health Organization (2016) *Global Report on Diabetes*. doi: ISBN 978 92 4 156525 7.

Yakes, F. M. and Van Houten, B. (1997) 'Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 94(2), pp. 514–519. doi: 10.1073/pnas.94.2.514.

Yaney, G. C. and Corkey, B. E. (2003) 'Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells', *Diabetologia*. Springer, pp. 1297–1312. doi: 10.1007/s00125-003-1207-4.

Yang, Y. *et al.* (1998) 'Reactivity of the human thioltransferase (glutaredoxin) C7S, C25S, C78S, C82S mutant and NMR solution structure of its glutathionyl mixed disulfide intermediate reflect catalytic specificity', *Biochemistry*, 37(49), pp. 17145–17156. doi: 10.1021/bi9806504.

Ye, H. *et al.* (2010) 'Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts', *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 120(5), pp. 1749–1761. doi: 10.1172/JCI40372.

Zhang, B. *et al.* (2013) 'Monothiol glutaredoxins can bind linear [Fe3S4] + and [Fe4S4]2+ clusters in addition to [Fe2S2]2+ clusters: Spectroscopic characterization and

functional implications', *Journal of the American Chemical Society*, 135(40), pp. 15153–15164. doi: 10.1021/ja407059n.

Zheng, X. *et al.* (2012) 'Acute hypoxia induces apoptosis of pancreatic β -cell by activation of the unfolded protein response and upregulation of CHOP', *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group, 3(6), p. e322. doi: 10.1038/cddis.2012.66.

Zimmet, P., Alberti, G. and Shaw, J. (2005) 'A new IDF worldwide definition of the metabolic syndrome: the rationale and the results', *Diabetes Voice*. Elsevier, 50(3), pp. 31–33. doi: 10.1016/S1885-5857(06)60742-1.

Zulueta, J. J. *et al.* (1995) 'Release of hydrogen peroxide in response to hypoxiareoxygenation: role of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in endothelial cell plasma membrane.', *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 12(1), pp. 41– 49. doi: 10.1165/ajrcmb.12.1.7529030.

9 Publikationsverzeichnis

Petry S. F., Sun L. M., Knapp A., Reinl S., Linn T. 'Distinct Shift in Beta-Cell Glutaredoxin 5 Expression Is Mediated by Hypoxia and Lipotoxicity Both *In Vivo* and *In Vitro*' frontiers in Endocrinology, 12 March 2018. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00084
10 Erklärung zur Dissertation

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der erwähnten Untersuchungen habe die Dissertation ich Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden."

Ort, Datum

Unterschrift

11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen Betreuern Prof. Dr. med. Thomas Linn und Dr. med. Sebastian Petry danken, die mir diese Arbeit überhaupt ermöglicht haben. Danke für die sehr gute und umfassende Betreuung während der gesamten Laborzeit und auch die vielen wegweisenden Kommentare im Anschluss beim Verfassen der Thesis.

Ebenfalls möchte ich mich bei unseren Labortechnikerinnen Doris Erb, Birte Hußmann und Gundula Hertl bedanken, für die Einweisungen in die labortechnischen Methoden, für die Ratschläge und Problembewältigung im Labor.

Weiterhin ein großes Dankeschön an meine Kollegen Conni, Divya, Rahul und Qingkui, die mir durch ihre sonnigen Gemüter und auch wissenschaftliche Unterstützung die tägliche Laborroutine besonders angenehm gemacht haben.

Abschliessend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium und auch diese Dissertation ermöglicht haben. Danke für eure Unterstützung und wertvollen Ratschlägen zu allen Lebenslagen.

12 Curriculum Vitae

Der Lebenslauf wurde aus den Druckexemplaren entfernt.