

**Auswirkungen von Glukose, Ölsäure und  
inflammatorischen Zytokinen auf Glutaredoxin 5 und  
den Eisenstoffwechsel von MIN6 Zellen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.)

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Hanno Kreimer

aus Geseke, Deutschland

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Medizinische Klinik und Poliklinik III

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Linn

Gutachter: Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter

Tag der Disputation: 17.10.2024

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	1
1.1 Insulin .....	1
1.2 Diabetes mellitus Typ 2 .....	2
1.2.1 Definition .....	2
1.2.2 Epidemiologie .....	3
1.2.3 Symptome und Folgeerkrankungen .....	4
1.2.4 Pathophysiologie .....	4
1.2.4.1 Lipotoxizität .....	5
1.2.4.2 Glukotoxizität .....	8
1.2.4.3 Chronische Entzündung .....	10
1.2.4.4 Eisenhaushalt .....	12
1.2.5 Glutaredoxine .....	15
1.2.5.1 Glutaredoxin 5 .....	16
1.3 MIN6 Zellen .....	16
1.4 Ziele dieser Arbeit .....	17
2 Material und Methoden .....	19
2.1 Material .....	19
2.1.1 Zellen .....	19
2.1.2 Chemikalien .....	19
2.1.3 Lösungen .....	21
2.1.4 Primer Sequenzen für qRT-PCR .....	22
2.1.5 Kits .....	23
2.1.6 Laborequipment .....	24

2.2 Methoden .....	26
2.2.1 Zellkultur.....	26
2.2.1.1 Kultivierung .....	26
2.2.1.2 Passagierung.....	27
2.2.1.3 Aussäen .....	27
2.2.1.4 Langzeitlagerung.....	28
2.2.2 Versuche .....	29
2.2.2.1 Herstellung der Glukoselösung .....	29
2.2.2.2 Herstellung der Fettsäurelösung.....	29
2.2.2.3 Vorbereitung der Zytokine .....	30
2.2.2.4 Versuchsablauf: Versuchsteil Ölsäure, Glukose, Zytokine.....	30
2.2.4 MTT-Assay .....	31
2.2.5 Proteinanalyse .....	33
2.2.5.1 Herstellung der Proben.....	33
2.2.5.2 Insulin ELISA .....	34
2.2.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford.....	35
2.2.5.4 Glutaredoxin 5 ELISA .....	35
2.2.6 Quantitative real-time PCR.....	36
2.2.6.1 Probenherstellung.....	36
2.2.6.2 RNA-Isolation .....	37
2.2.6.3 cDNA-Herstellung .....	37
2.2.6.4 Verifizierung der Primereffizienzen.....	38
2.2.6.5 Quantitative Real-time PCR.....	39
2.2.6.6 Auswertung der Real Time PCR.....	39
2.2.7 Statistik .....	40

3 Ergebnisse .....	41
3.1 MTT.....	41
3.1.1 Ölsäure senkte die Viabilität der MIN6 Zellen.....	41
3.1.2 Glukose steigerte die metabolische Aktivität .....	43
3.1.3 Zytokine zeigten keinen Einfluss auf die Viabilität der MIN6 Zellen.....	45
3.2 PCR.....	47
3.2.1 Ins1 .....	47
3.2.1.1 Ölsäure senkte die Expression von Ins1 .....	47
3.2.1.2 Glukose zeigte keinen Einfluss auf die Ins1 Expression.....	49
3.2.1.3 Der Zytokinmix senkte die Expression von Ins1 .....	51
3.2.2 Ins2.....	53
3.2.2.1 Ölsäure senkte die Expression von Ins2.....	53
3.2.2.2 Glukose senkte die Ins2 Expression unter Zytokineinfluss .....	55
3.2.2.3 Der Zytokinmix verringerte die Expression von Ins2 .....	57
3.2.3 Glrx5 .....	59
3.2.3.1 Ölsäure senkte die Expression von Glrx5 tendenziell.....	59
3.2.3.2 Glukose zeigte keinen Einfluss auf die Expression von Glrx5 .....	61
3.2.3.3 Zytokine zeigten keinen Einfluss auf die Expression von Glrx5 .....	63
3.2.4 FTL .....	65
3.2.4.1 Ölsäure, Glukose und Zytokine zeigten keinen Einfluss auf die Expression von FTL.....	65
3.2.5 IRP1 .....	67
3.2.5.1 Hohe Konzentrationen von Ölsäure und Glukose erhöhten die Expression von IRP1.....	67

3.2.5.2	Glukose steigerte bei hohen Ölsäurekonzentrationen die IRP1 Expression	69
3.2.5.3	Zytokine zeigten keinen Einfluss auf die Expression von IRP1	71
3.2.6	TfR1	73
3.2.6.1	Ölsäure zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von TfR1	73
3.2.6.2	Glukose und Zytokine zeigten keinen Einfluss auf die Expression von TfR1	75
3.3	Proteinanalyse	76
3.3.1	Insulin im Lysat	76
3.3.1.1	Ölsäure verminderte die intrazelluläre Insulinkonzentration	76
3.3.1.2	Glukose senkte die intrazelluläre Insulinkonzentration tendenziell	79
3.3.1.3	Der Zytokinmix senkte die intrazelluläre Insulinkonzentration tendenziell	80
3.3.2	Insulin im Medium	81
3.3.2.1	Ölsäure senkte die extrazelluläre Insulinkonzentration	82
3.3.2.2	Glukose zeigte keinen Einfluss auf die extrazelluläre Insulinkonzentration	84
3.3.2.3	Zytokine senkten die extrazelluläre Insulinkonzentration tendenziell	86
3.3.3	Glutaredoxin 5	87
3.3.3.1	Ölsäure senkte die intrazelluläre Glutaredoxin 5 Konzentration tendenziell	88
3.3.3.2	Glukose hatte keine Auswirkungen auf die Glutaredoxin 5-Konzentration	90
3.3.3.3	Der Zytokinmix zeigte keinen Einfluss auf die Glutaredoxin 5 Konzentration	92
4	Diskussion	94

4.1 Zusammenfassung der zentralen Ergebnisse .....	94
4.1.1 Einfluss von Ölsäure .....	94
4.1.2 Einfluss von Glukose .....	96
4.1.3 Einfluss des Zytokinmixes .....	97
4.1.4 Auswirkungen auf den Eisenstoffwechsel .....	99
4.2 Interpretation .....	99
4.2.1 Die Effekte von Ölsäure auf den Stoffwechsel der MIN6 Zelle.....	99
4.2.2 Die Effekte von Glukose auf den Stoffwechsel der MIN6 Zelle.....	105
4.2.3 Die Effekte der Zytokine auf den Stoffwechsel der MIN6 Zelle.....	109
4.2.4 Klinische Aspekte .....	110
4.4 Limitationen und Vorschläge zur Verbesserung .....	113
4.5 Zukunftsperspektiven .....	114
5 Zusammenfassung .....	116
6 Summary .....	117
7 Publikationsverzeichnis.....	118
8 Tabellenverzeichnis.....	119
9 Abbildungsverzeichnis .....	120
10 Abkürzungsverzeichnis .....	120
11 Literaturverzeichnis.....	134
12 Erklärung zur Dissertation .....	157
13 Danksagung.....	158
14 Anhang .....	159
14.1 Schmelzkurven der Primer .....	159
15 Lebenslauf .....	163

# 1 Einleitung

## 1.1 Insulin

Insulin ist ein wichtiges körpereigenes Peptidhormon. Durch seine einzigartige Funktion, den Blutzuckerspiegel im menschlichen Körper zu senken, kommt ihm eine zentrale Rolle in der Glukosehämostase zu. Systemische Effekte von Insulin sind in diesem Kontext zum Beispiel die Hemmung der hepatischen Glukoneogenese und Förderung der Synthese und Speicherung von Glykogen in den Muskeln und der Leber (DeFronzo et al. 2015).

Insulin wird in den sogenannten Langerhansinseln produziert. Diese sind im Pankreas lokalisiert und bilden seinen endokrinen Anteil. Sie bestehen aus verschiedenen Zellarten, den Alpha-, Beta-, Delta-, Gamma- und Epsilonzellen. Jede von ihnen produziert ihre eigenen Hormone, welche im Körper dann verschiedenste Aufgaben erfüllen können. Die Betazellen, welche für die Produktion und Sekretion von Insulin verantwortlich sind, machen im menschlichen Pankreas mit einem Anteil von circa 60 % den Großteil der Inselzellen aus (DeFronzo et al. 2015; Jones und Persaud 2017).

Das Gen, welches die Aminosäuresequenz des Insulins gespeichert hat, liegt beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosom 11 (Harper et al. 1981). Es besteht aus drei Exons und zwei Introns. Durch Transkription und Splicing entsteht dann die Messenger RNA, welche die Basis der Insulinsynthese bildet. Anschließend erfolgt die Translation, durch welche das sogenannte Präproinsulin entsteht. Dieses besteht aus der A-, B- und C- Kette, sowie einem Signalpeptid (DeFronzo et al. 2015). Das Signalpeptid steuert den Transport des Präproinsulins in das endoplasmatische Retikulum (ER). Ist das Präproinsulin im ER angekommen, wird das Signalpeptid proteolytisch abgetrennt. Es verbleiben noch die A-, B- und C-Kette, die dann gemeinsam Proinsulin genannt werden. Im ER bilden sich drei Disulfidbrücken, zwei zwischen der A- und B-Kette und eine innerhalb der A-Kette. Im Anschluss wird das Proinsulin zum Golgi Apparat transportiert und hier in sekretorischen Granula gespeichert (DeFronzo et al. 2015; Galicia-Garcia et al. 2020). Ein steigender Glukosespiegel sorgt dafür, dass das C-Peptid durch Proteasen abgespalten und aktives Insulin zusammen mit dem C-Peptid in die Blutbahn abgegeben wird. Das hormonell aktive Insulin besteht aus einer A-Kette (21 Aminosäuren) und einer

B-Kette (30 Aminosäuren), die sich über drei Disulfidbrücken stabilisieren (DeFronzo et al. 2015).

Bei hohen Blutglukosekonzentration nimmt die Betazelle über ihren insulinunabhängigen Glukosetransporter 2 (GLUT2) Transporter vermehrt Glukose in die Zelle auf. Intrazellulär wird die Glukose dann weiter verstoffwechselt, wodurch aus Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat Adenosintriphosphat (ATP) als Endprodukt entsteht. Der Anstieg des ATP/ADP Verhältnisses vermindert die Kaliumpermeabilität der Betazelle durch den Verschluss ATP-sensitiver Kaliumkanäle (DeFronzo et al. 2015). Dies führt zu einer Depolarisation der Zelle. Über die Öffnung spannungsabhängiger Calcium Kanäle erhöht sich dann die intrazelluläre Calciumkonzentration, was dann als Trigger für die Sekretion des gespeicherten Insulins dient. Die Vesikel, in denen Insulin gespeichert ist, verschmelzen dann mit der Plasmamembran der Betazelle und aktives Insulin wird zusammen mit dem abgespaltenen C-Peptid in den Blutkreislauf abgegeben (DeFronzo et al. 2015). Das sekretierte C-Peptid lässt sich diagnostisch als Messparameter für die endogene Insulinproduktion nutzen (Vejrazkova et al. 2020).

Die Insulinproduktion und -sekretion wird über verschiedene Mechanismen reguliert. Glukose stellt den wichtigsten Einflussfaktor auf die Transkription von Insulin dar. Es gibt zwei zentrale Transkriptionsfaktoren, über die anhand des Glukosespiegels die Expression von Insulin reguliert wird. Die pancreatic/duodenal homeobox-1 (PDX-1) und die mammalian homologue of avian (MafA). Glukose sorgt jedoch auch auf anderen Ebenen für eine Regulation der Insulinproduktion (DeFronzo et al. 2015). Auf die genauen Mechanismen, durch die die Insulinexpression und -sekretion im Verlauf des Diabetes mellitus geschädigt wird, wird in späteren Kapiteln eingegangen.

## 1.2 Diabetes mellitus Typ 2

### 1.2.1 Definition

Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die sich anhand der Pathophysiologie in verschiedene Typen unterteilen lässt. Sie haben alle gemeinsam, dass sie mit einer Hyperglykämie als Leitbefund einhergehen. Alle Subtypen sind über eine geminderte Insulinproduktion und/oder -wirkung charakterisiert. Die zwei Gruppen mit

der höchsten Prävalenz sind der Diabetes Typ 1 und Typ 2 (World Health Organisation 2019).

Diabetes mellitus Typ 1 ist primär durch eine autoimmune Zerstörung von Betazellen gekennzeichnet. Als Folge entwickelt sich daraus ein absoluter Mangel von Insulin im Körper. Diabetes mellitus Typ 2 besitzt eine multifaktorielle Pathogenese. Kennzeichnend ist hier eine geringere Insulinsensitivität der Zielgewebe und ein Funktionsverlust der Betazellen mit begleitender Apoptose. Im Gegensatz zum Typ 1 Diabetes ist beim Typ 2 Diabetes ein schleichender Verlauf typisch (DeFronzo et al. 2015). Eine Sonderform ist der sogenannte Gestationsdiabetes. Hier entwickelt sich während der Schwangerschaft eine Glukosestoffwechselstörung (American Diabetes Association 2003).

Aufgrund der Thematik der vorliegenden Promotion beschränkt sich die detaillierte Darstellung im Verlauf auf Diabetes mellitus Typ 2.

### 1.2.2 Epidemiologie

Diabetes mellitus ist durch seine hohe Prävalenz und hohen Gesundheitskosten weltweit für Gesellschaften und Gesundheitssysteme problematisch. Die Anzahl Erwachsener zwischen 20 und 79 Jahren, die an Diabetes erkrankt sind, belief sich 2021 auf circa 536,6 Millionen Menschen (Sun et al. 2022). Im Vergleich dazu waren 1980 nur circa 108 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt. Parallel zur Gesamtzahl stieg ebenso die Prävalenz der Erkrankung von 1980 4,7 % auf heute 10,5 % (World Health Organization 2016; Sun et al. 2022). Da Diabetes mellitus Typ 2 einen schleichenden Verlauf aufweist, könnte die Dunkelziffer sogar noch deutlich höher sein. Im Jahr 2012 gab es laut World Health Organisation (WHO) circa 1,5 Millionen Tote, deren Todesursache auf Diabetes mellitus zurückgeführt werden konnte (World Health Organization 2016). Die weltweiten Kosten, die Diabetes mellitus direkt und indirekt erzeugt, beliefen sich 2010 auf schätzungsweise 500 Milliarden US-Dollar. 2030 werden die Kosten schätzungsweise auf 745 Milliarden US-Dollar ansteigen (Bloom et al. 2011). Diese Zahlen lassen erkennen, dass Diabetes mellitus eine Erkrankung ist, die immer signifikantere Auswirkungen auf moderne Gesellschaften hat.

### 1.2.3 Symptome und Folgeerkrankungen

Diabetes mellitus kann sowohl akute Symptome auslösen, als auch langfristige Folgen für verschiedene Organsysteme haben.

Akute Symptome einer Hyperglykämie sind zum Beispiel Polyurie, Polydipsie, Wadenkrämpfe, Juckreiz und Sehstörungen. Bei einem absoluten Insulinmangel liegt häufig ein vermindertes Körpergewicht vor, welches unter anderem aufgrund der katabolen Stoffwechsellage entsteht. In Extremfällen kann eine Hyperglykämie eine lebensgefährliche Stoffwechselentgleisung mit Ketoazidose und diabetischem Koma auslösen.

Langfristig hat eine chronische Hyperglykämie vor allem Einfluss auf das Gefäßsystem. Es entstehen Makro- und Mikroangiopathien, die dann Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben (World Health Organization 2016). Durch eine diabetische Makroangiopathie steigt generell die Inzidenz von kardialen, zerebralen und vaskulären Erkrankungen (Sarwar et al. 2010). Dies äußert sich dann durch ein erhöhtes Risiko für Schlaganfälle oder Herzinfarkte (Sarwar et al. 2010). Eine Mikroangiopathie resultiert unter anderem in einer Retinopathie, Nephropathie, Neuropathie und begünstigt die Entstehung eines diabetischen Fußsyndroms. Außerdem kann die Wundheilung von Patienten mit Diabetes mellitus gestört sein. Sie verlieren somit im Vergleich zur Normalbevölkerung häufiger ihre Sehkraft, erleiden Nierenversagen, entwickeln häufiger chronische Ulcera, erleiden Amputationen und leiden häufiger an erektiler Dysfunktion (American Diabetes Association 2003; World Health Organization 2016).

### 1.2.4 Pathophysiologie

An der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 sind verschiedene genetische, metabolische und umweltbedingte Faktoren beteiligt. Zentrale Bestandteile der Pathophysiologie des Diabetes Typ 2 sind auf der einen Seite eine geringere Sensitivität des Zielgewebes auf Insulin, was den Bedarf an Insulin erhöht, und auf der anderen Seite ein progredienter Funktionsverlust der Betazellen, der unter anderem zu einer gestörten Insulinsekretion führt (DeFronzo et al. 2015).

Die fehlende Insulinsensitivität des Zielgewebes führt besonders in frühen Stadien der Erkrankung zu einem relativen Mangel von Insulin. Muskel- und Fettzellen sind besonders von der Desensibilisierung betroffen. Dies hat für den Glukosestoffwechsel zur Folge, dass immer höhere Konzentrationen von Insulin zur Senkung des Blutzuckers benötigt werden. In der Anfangsphase des Diabetes mellitus kann dieser Mangel zu einer kompensatorischen Erhöhung der Insulinsekretion führen. Diese Kompensation halten die Betazellen jedoch im Verlauf der Erkrankung nicht dauerhaft aufrecht, was wiederum in einer chronischen Hyperglykämie resultiert (DeFronzo et al. 2015).

Im weiteren Verlauf des Diabetes mellitus Typ 2 lässt sich dann eine Verminderung der Insulinsekretion und ein Untergang der Betazellen beobachten. Hierdurch entsteht im Laufe der Erkrankung ein absoluter Mangel an Insulin (DeFronzo et al. 2015).

Eine Kombination beider Effekte sorgt für ein Fortschreiten der Erkrankung. Beginnend mit einem normalen Glukosestoffwechsel über eine gestörte Glukosetoleranz, bis hin zum Vollbild des Typ 2 Diabetes (DeFronzo et al. 2015). Da sich die Experimente dieser Arbeit mit den Stoffwechselwegen der Betazelle beschäftigen, werden diese in den nächsten Kapiteln besprochen.

#### 1.2.4.1 Lipotoxizität

Fettsäuren sind zentrale Bestandteile des Energiestoffwechsels des Menschen. Die häufigsten Fettsäuren im menschlichen Körper sind Ölsäure, Palmsäure, Stearinsäure, Linolsäure und Palmitoleinsäure. Sie bilden circa 90 % der Fettsäuren im Blutplasma (Quehenberger et al. 2010). Auf der einen Seite werden Fettsäuren physiologischerweise durch die Betaoxidation der Mitochondrien zu ATP verstoffwechselt und sind deshalb wichtige Energielieferanten der Betazelle. Auf der anderen Seite sind sie auch regulatorisch im Insulinstoffwechsel wirksam. Hohe intrazelluläre Glukosekonzentrationen hemmen durch erhöhte Konzentrationen von Malonyl-CoA die Fettsäureoxidation. Die daraus resultierende Konzentrationserhöhung von langkettigen Acyl-CoA stimuliert wiederum die Insulinsekretion (DeFronzo 2015).

Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 liegt häufig eine begleitende Hyperlipidämie vor (Salgin et al. 2012). Ein Insulinmangel begünstigt durch Enthemmung der Lipolyse eine dauerhaft hohe Konzentration von Fettsäuren im Blut. Dies wiederum fördert die

Insulinresistenz, stimuliert die Gluconeogenese, behindert die Insulinsekretion und führt zur Apoptose der Betazellen. Diese Effekte werden allgemein auch als Lipotoxizität bezeichnet (DeFronzo 2015). Der daraus resultierende gesteigerte Fettstoffwechsel in den Betazellen erzeugt, besonders bei gleichzeitig vorliegender Hyperglykämie, toxische Metabolite, oxidativen Stress, dysreguliert Signalwege und behindert die Energieproduktion der Zelle. Diese Effekte werden über verschiedene molekulare Mechanismen vermittelt.

Ein Mechanismus könnte die verringerte Produktion von Eisen-Schwefel-Proteinen über die Verminderung der Glutaredoxin 5-Konzentration sein. Eisen-Schwefel-Proteine bilden zentrale Bestandteile der Atmungskette und des Citratzyklus (Albracht 1980; Ding et al. 1992; Flemming et al. 2003). Ein Mangel dieser Bestandteile könnte eine verminderte Produktion von ATP zur Folge haben, was zu einer Inhibierung der glukosestimulierten Insulinsekretion führen könnte. Dies würde dann die Funktion der Betazelle behindern (Petry et al. 2022). Durch eine zusätzliche Dysregulation des Eisenstoffwechsels konnte eine unkontrollierte Aufnahme von Eisen in die Mitochondrien beobachtet werden (Robbins und Stout 1989; Petry et al. 2018; Petry et al. 2022). In Kombination mit einer erhöhten Konzentration von Sauerstoffradikalen induziert dies die Synthese von Lipidperoxiden, welche zu Ferroptose, einem nicht apoptotischen Zelltod, führt (Dixon et al. 2012; Hansen et al. 2018).

Sauerstoffradikale entstehen unter anderem im Energiestoffwechsel der Zelle. Durch die Verstoffwechslung von Fettsäuren im Citratzyklus werden Elektronen frei, welche dann über die fünf Komplexe der Atmungskette das energiearme ADP+P zum energiereichen ATP umwandeln. Durch diesen Prozess entstehen im Komplex 1-3 auf physiologische Weise reaktive Sauerstoffspezies (Schönfeld und Wojtczak 2008), die von der Zelle verarbeitet werden müssen. Ein chronisch gesteigerter Energiestoffwechsel durch hohe Konzentrationen von Fettsäuren führt somit zu einer erhöhten Belastung der Zelle mit reaktiven Sauerstoffspezies (Lenzen 2008). Dies resultiert dann in vermehrtem oxidativem Stress und begünstigt das Auftreten von Ferroptose (Römer et al. 2021).

Der zweite Weg über den Fettsäuren verstoffwechselt werden ist die Betaoxidation in den Peroxisomen. Die Reaktionen und Enzyme im Peroxisom und im Mitochondrium sind grundsätzlich ähnlich, mit dem Unterschied, dass die freien Elektronen im Peroxisom im

Gegensatz zum Mitochondrium nicht über die Atmungskette verstoffwechselt werden, sondern Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) bilden (Osumi und Hashimoto 1978). Wasserstoffperoxid ist permeabel für Zellmembranen und kann der Zelle als oxidativer Stress unter anderem durch die Inhibierung der Insulinsekretion schaden. Es wird vermutet, dass langkettige Fettsäuren, die den Großteil der Fettsäuren im Blutplasma bilden, in hohen Konzentrationen über den peroxisomalen Stoffwechselweg besonders effektiv oxidativen Stress erzeugen können (Gehrmann et al. 2010; Elsner et al. 2011). Es gibt Hinweise darauf, dass die Betazelle über eine geringere antioxidative Kapazität im Vergleich zu anderen Zelltypen verfügt und deshalb besonders anfällig für oxidativen Stress ist (Lenzen et al. 1996).

Als Reaktion auf Belastung mit oxidativem Stress wurde eine Erhöhung der Expression von uncoupling protein 2 (UCP2) in der Betazelle beobachtet. UCP2 ist ein Protonenkanal, welcher das mitochondriale Membranpotential, das vom Komplex 5 der Atmungskette zur Produktion von ATP genutzt wird, abbauen und somit die Aktivität der Atmungskette drosseln kann (Klingenberg und Winkler 1985). Auf diesem Weg führt die Expression von UCP2 zu einer Verminderung des oxidativen Stresses (Klingenberg und Winkler 1985). Außerdem ist eine direkte Inhibition der Atmungskette durch freie Fettsäuren beschrieben (Köhnke et al. 2007). Das mitochondriale Membranpotenzial, welches durch diese Prozesse verringert wird, könnte jedoch auch für einen ATP-Mangel verantwortlich sein, eine mitochondriale Dysfunktion verstärken und an der Apoptose der Betazelle beteiligt sein (Amo et al. 2011). Durch den ATP-Mangel werden die Synthese und die Sekretion von Insulin inhibiert (Grubelnik et al. 2020).

Die erhöhte Verfügbarkeit von Fettsäuren führt außerdem zu einer vermehrten Synthese von Ceramiden (Mathias et al. 1998; Maedler et al. 2001). Diese reduzieren die Expression von Insulin durch die Inhibierung von PDX1 (Maris et al. 2013) und inhibieren die Funktion der Atmungskette (Wehinger et al. 2015). Außerdem führen sie zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses durch Aktivierung der iNOS (Higa et al. 1999; Syed et al. 2012). Dies ist ein Faktor, der zur Aktivierung der Apoptose von Betazellen führen kann (Zhu et al. 2020).

Zusammengefasst spielen Fettsäuren in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 eine zentrale Rolle. Sie wirken über verschiedene Stoffwechselwege und inhibieren in hohen

Konzentrationen die Produktion und Sekretion von Insulin und schädigen die Betazellfunktion bis hin zur Apoptose.

#### 1.2.4.2 Glukotoxizität

Glukose dient dem Körper sowohl als Signalmolekül, Strukturmolekül, als auch als Energieträger. Auf die Betazellen des Pankreas hat Glukose, je nach Konzentration und Dauer der Exposition, verschiedene Effekte. Kurzfristige Erhöhungen der Blutglukose stimulieren reaktiv die Insulinsekretion der Betazellen (DeFronzo et al. 2015). Das Insulin wird in den Betazellen in diesem Fall größtenteils aus der Translation bereits bestehender Insulin mRNA synthetisiert (Greenman et al. 2005). Erst bei einem längerfristig erhöhtem Insulinbedarf (>12 Stunden) wird die Genexpression von Insulin verstärkt (Bensellam et al. 2012).

Chronisch erhöhte Blutglukosespiegel führen hingegen aufgrund verschiedener Effekte zu einer Verminderung der Insulinsekretion (DeFronzo et al. 2015). Eine wichtige Eigenschaft der Betazellen ist die insulinunabhängige Glukoseaufnahme über den GLUT2 Transporter. Dies bedeutet jedoch auch, dass eine hohe Blutglukosekonzentration zu einer hohen intrazellulären Glukosekonzentration führt (DeFronzo et al. 2015). Das hat signifikante Einflüsse auf die Insulinexpression, -synthese und -sekretion.

Eine Folge hoher Glukosekonzentrationen ist die Entstehung von oxidativem Stress. Reaktive Sauerstoffspezies entstehen physiologisch im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung (Turrens 2003) (Siehe Kapitel 1.2.4.1), werden jedoch in der Regel durch die natürliche antioxidative Abwehr der Betazelle neutralisiert (DeFronzo et al. 2015). Da durch die hohen Glukosekonzentrationen nun auch mehr Substrat zur Verfügung steht, beschleunigt dies die Aktivität der Atmungskette. Hierdurch entstehen hohe Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies, welche dann zum Beispiel durch eine Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials für eine verringerte ATP Produktion sorgen (Krippeit-Drews et al. 1999) (Siehe Kapitel 1.2.4.1). Da ATP ein zentraler Trigger für die Exozytose von Insulin ist, verringert so die Glukoseexposition die Insulinsekretion (DeFronzo et al. 2015).

Ein weiterer Mechanismus ist der gesteigerte Insulinbedarf durch hohe Glukosekonzentrationen (Siehe Kapitel 1.1). Dieser hohe Insulinbedarf führt zur metabolischen Belastung des ERs. Durch die begrenzte Synthesekapazität lagern sich im ER ungefaltete Proteine ab (Bensellam et al. 2012). Diese abgelagerten Proteine resultieren in der Aktivierung der unfolded-protein-reaction, durch welche die metabolische Belastung des ERs reduziert und die Hämostase wiederhergestellt werden soll (Bensellam et al. 2012). Sollte dieser Stoffwechselweg die Belastung des ERs nicht reduzieren können, so führt dies zur Aktivierung der Apoptose (Oyadomari und Mori 2004).

Eine weitere wichtige Folge hoher intrazellulärer Glukosekonzentrationen ist die vermehrte Glykierung von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren (Huebschmann et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation dieser glykierten Produkte zu einer Dysfunktion der glukosestimulierten Insulinsekretion führt. Dieser Effekt wird durch eine NO bedingte Inhibierung von Cytochrome C und eine Verringerung der ATP Produktion vermittelt (Zhao et al. 2009). In einer Studie konnte durch die Exposition von Zellen mit glykierten Produkten eine Verstärkung der Apoptose beobachtet werden (Zhu et al. 2011).

Außerdem konnte ein Einfluss von Glukose auf die Genexpression von Insulin beobachtet werden. So sank die Expression von PDX1 unter Einfluss von hohen Glukosekonzentrationen (Chen et al. 2016). PDX1 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der sich bei einem Mangel inhibitorisch auf die Genexpression von Insulin auswirkt (Harmon et al. 2005) (siehe Kap 1.1 Insulin).

Zusammengefasst hat eine chronische Hyperglykämie sowohl Einfluss auf die Expression, Synthese und Sekretion von Insulin als auch die Apoptose von Betazellen.

Hohe Glukosekonzentrationen in Kombination mit hohen Konzentrationen von freien Fettsäuren verstärken ihre negativen Auswirkungen. Ein Effekt ist unter anderem, dass hohe Glukosekonzentrationen den Fettsäuremetabolismus behindern. Als Folge sammeln sich intrazellulär langkettige Acyl-CoA-Moleküle an, die den Funktionsverlust und die Sekretionsminderung des Insulins weiter verstärken können (Robertson 2004) (Siehe Kapitel 1.2.4.1). Das mitochondriale Membranpotenzial wird sowohl durch das

Überangebot an Glukose als auch an Fettsäuren erhöht und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies steigt somit durch die hohe Verfügbarkeit beider Substrate an (Lowell und Shulman 2005). Aufgrund der daraus resultierenden Entkopplung der Atmungskette durch vermehrte Expression von UCP2 sinkt die ATP-Synthese (Siehe 1.2.4.1). Dies reduziert wiederum die glukosestimulierte Insulinsekretion. Die Kombination beider Zustände sorgt außerdem für eine metabolische Überforderung des ER mit der Folge einer erhöhten ROS Produktion, verminderten ATP Produktion bis hin zur Apoptose der Betazelle (Fu et al. 2013).

### 1.2.4.3 Chronische Entzündung

In der Pathophysiologie des Diabetes Typ 2 spielt eine chronische Entzündung der Langerhans-Inseln eine wichtige Rolle. Die akute Reaktion des Körpers auf Pathogene startet mit einer Extravasation von Plasma und Leukozyten und wird im Anschluss typischerweise durch Granulozyten vermittelt (Böni-Schnetzler und Meier 2019). Die chronische Entzündungsreaktion hingegen wird in allen Phasen größtenteils durch Makrophagen vermittelt. In Untersuchungen wurden in Langerhans-Inseln vermehrt proinflammatorisch polarisierte Makrophagen gefunden. Diese Entzündungsreaktion kann zum Beispiel durch eine Exposition mit gesättigten Fettsäuren oder Hyperglykämie ausgelöst werden (Böni-Schnetzler et al. 2009).

Ein zentrales Zytokin dieser chronischen Entzündung ist Interleukin-1-Beta (IL-1-B). Durch seine regulatorische Rolle bei der Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Zytokine und Stimulation seiner eigenen Ausschüttung kann IL-1-B einen Teufelskreis mit verlängerter Entzündungsreaktion bedingen (Böni-Schnetzler et al. 2008; Dinarello 2009). Eine Inhibition von IL-1-B sorgte in Experimenten dafür, dass die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel des Tumor Nekrose Faktors (TNF), nahezu vollständig verhindert werden konnte. Zwei klinische Studien haben gezeigt, dass die Gabe eines IL-1-B Antagonisten zu einer Verbesserung der Insulinsekretion und zu besseren Blutglukosespiegeln führt (Larsen et al. 2007; Herder et al. 2015). Zwischen der TNF-Expression und der Betazellfunktion konnte in Studien eine Korrelation festgestellt werden (Butcher et al. 2014).

In einer Studie, in welcher INS-1E Zellen, eine Zelllinie aus einem Ratteninsulinom, mit einem Zytokinmix behandelt wurden, konnte eine verminderte glukosestimulierte Insulinsekretion unter einer Inkubation von 24 Stunden beobachtet werden (Barlow et al. 2018). Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Exposition gegenüber Zytokinen ER-Stress auslöst und zu hohen intrazellulären Konzentrationen von NO führt. Dies kann zu Schäden der DNA und zu Apoptose führen (Kharroubi et al. 2004; Cnop et al. 2005).

Der Mechanismus, durch welchen Zytokine die Betazelle schädigen, ist noch nicht vollständig untersucht. Es wird vermutet, dass die Schädigung der Betazelle durch die Aktivierung von NFκB vermittelt wird (Cnop et al. 2005). Die Inhibierung von NFκB zeigte sich in einem Experiment an „Mouse Insulinoma 6“ (MIN6) Zellen zytoprotektiv (Baker et al. 2003). NFκB aktiviert unter anderem die NO-Synthetase und erhöht dadurch den intrazellulären NO-Spiegel (Corbett et al. 1991; Corbett et al. 1993). Dies sorgt dafür, dass Enzyme der Atmungskette und die Aktivität der Aconitasen inhibiert werden, was wiederum die Oxidation von Glukose in der Zelle vermindert (Welsh et al. 1991; Welsh und Sandler 1992). Denselben Effekt hat die Hemmung der Glukokinase durch NO (Beggs et al. 1990). Außerdem inhibiert NO die Genexpression von Proteinen, die für die Funktion der Betazelle elementar sind, zum Beispiel PDX1 oder GLUT2 (Sachdeva et al. 2009).

Die Rolle von NO in MIN6 Zellen ist noch nicht abschließend geklärt. Es gibt verschiedene Arbeiten, die keinen positiven Effekt einer Hemmung der NO-Synthetase nach Zytokinexposition auf die Insulinsekretion (Wu et al. 2001) oder den ER Stress (Chan et al. 2011) beobachteten. Dies lässt an einer zentralen Rolle von NO in der MIN6 Zelle zweifeln. Brozzi et al. konnten zwischen Inselzellen verschiedener Spezies unterschiedliche Anfälligkeiten gegenüber NO vermitteltem zytokin-induziertem ER-Stress finden. Gerade Inselzellen von Ratten zeigten sich anfällig gegenüber NO. In isolierten Langerhansinseln von Mäusen und Menschen zeigte sich kein Effekt von NO auf das ER (Brozzi et al. 2015). Die Versuche geben Hinweise darauf, dass die NO-Synthetase nicht der zentrale Stoffwechselweg des Effekts von inflammatorischen Zytokinen auf die MIN6 Zellen ist. Dies ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

#### 1.2.4.4 Eisenhaushalt

Eisen erfüllt unter anderem in Eisen-Schwefel-Clustern oder als Bestandteil anderer Enzyme zum Elektronentransfer zentrale Aufgaben des zellulären Stoffwechsels. Enzyme des Eisen-Schwefel-Clusters sind zum Beispiel die Komplexe 1 (Flemming et al. 2003), 2 (Albracht 1980), und 3 (Ding et al. 1992) der Atmungskette. Durch die Atmungskette wird die Produktion von ATP ermöglicht, welches wiederum als Trigger für die Insulinsekretion dient und somit zentral für den regulären Stoffwechsel der Betazelle ist (DeFronzo 2015) (Siehe Kapitel 1.1). Dies lässt vermuten, dass sowohl ein Mangel an Eisen, als auch eine Eisenüberladung negative Effekte haben können. Bei Patienten, die an Diabetes Typ 2 oder dem metabolischen Syndrom leiden, zeigten sich gehäuft erhöhte Ferritinwerte im Blut (Rajpathak et al. 2009). Es besteht der Verdacht, dass dies Ausdruck einer möglichen Eisenüberladung sein könnte (Marku et al. 2021). Außerdem wurde eine intrazelluläre Akkumulation von Eisen als Risikofaktor für die Entstehung einer Insulinitis identifiziert (Simcox und McClain 2013).

Die physiologische Eisenaufnahme erfolgt im Darm. Der Transport des resorbierten Eisens erfolgt an Transferrin gebunden über die Blutbahn (Chifman et al. 2014). Eisen kann jedoch auch ungebunden ohne Beteiligung von Transferrin transportiert werden (Hentze et al. 2010). Ungebundenes Eisen konnte bereits bei Transferrinsättigungen unter 60 Prozent beobachtet werden (Lee et al. 2006).

Die Betazelle besitzt zwei verschiedene Aufnahmewege von Eisen. Der erste Aufnahmeweg wird durch Transferrin vermittelt. Das Transferrin bindet hierbei zunächst an den von der Zelle exprimierten Transferrinrezeptor-1 (TfR1) (Kawabata 2019). Der Gesamtkomplex aus Rezeptor, Eisen und Transferrin wird anschließend durch Endozytose in ein intrazelluläres Vesikel transportiert (Kawabata 2019). Hier wird das Eisen aus dem Komplex gelöst und durch den divalent metal ion transporter 1 (DMT1) ins Zytosol transportiert (Fleming et al. 1998; Sheftel et al. 2012). Sollte in der Zelle ein Eisenmangel vorliegen, wird die Eisenaufnahme durch eine vermehrte Expression des TfR1 reguliert (Gammella et al. 2017).

Der zweite Transportweg erfolgt als ungebundenes Eisen ohne die Beteiligung von Transferrin. Es konnte beobachtet werden, dass der zinkhaltige ZIP-14-Rezeptor in

isolierten primären menschlichen Langerhansinseln ungebundenes Eisen ohne Beteiligung von Transferrin in die Zelle transportiert (Maxel et al. 2019). Es gibt außerdem Hinweise, dass unter dem Einfluss von chronischer Hyperglykämie die Expression des ZIP-14-Rezeptors gefördert wird (Maxel et al. 2019).

Die Eisenionen beider Aufnahmewege werden zunächst Teil des sogenannten zytoplasmatischen labilen Eisen Pools (Philpott et al. 2020). Der labile Eisen Pool beschreibt ungeschütztes Eisen, welches frei im Zytoplasma vorliegt. Von hier aus kann das Eisen gespeichert, in Zellorganellen transportiert oder zur Synthese von Proteinen genutzt werden (Philpott et al. 2020). Hohe intrazelluläre Konzentrationen von freiem Eisen verstärken den Effekt von oxidativem Stress (Merkofer et al. 2006). Niedrigpotente, prooxidative Metabolite, wie zum Beispiel  $H_2O_2$ , die regelhaft durch den aeroben Stoffwechsel der Zelle entstehen, werden durch Reaktion mit freiem Eisen zu hochreaktiven Metaboliten, wie zum Beispiel OH, umgewandelt (Merkofer et al. 2006). Diese hochreaktiven Metabolite können dann die DNA schädigen und zu Ferroptose führen (Barbouti et al. 2007; Mantzaris et al. 2016). Ferroptose ist eine Form des nicht-apoptotischen Zelltods. Ferroptotische Zellen zeigten vorwiegend mitochondriale Dysfunktionen (Vanden Berghe et al. 2014).

Im physiologischen Stoffwechsel liegt der Großteil des Eisens in den aktiven Zentren von Enzymen (Galaris et al. 2019) oder gespeichert in verschiedenen Isoformen von Ferritin vor (Arosio et al. 2015). In Mäusen besteht Ferritin aus einer leichten Kette (FTL) und einer schweren Kette (FTH) (Rucker et al. 1996). Die Regulation von Ferritin erfolgt vor allem über die translationale Regulation von FTL und FTH (MacDonald et al. 1994). Es ließ sich beobachten, dass durch ein vermehrtes Eisenangebot auch die Synthese von Ferritin verstärkt wird (MacDonald et al. 1994). Während FTH eine Rolle im kurzfristigen Eisentransport spielt, scheint FTL an der langfristigen Eisenlagerung mitzuwirken (Rucker et al. 1996).

Das Eisen wird bei Bedarf zu den jeweiligen Zellorganellen transportiert. Es gibt erste Erkenntnisse, dass das Eisen, welches im Mitochondrium benötigt wird, durch die äußere Membran mithilfe von DMT1 und dann durch die innere mitochondriale Membran mithilfe von Mitoferrin 1 und 2 transportiert wird (Paradkar et al. 2009). Hier kann es dann für die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern oder die Häm Synthese verwendet

werden (Marku et al. 2021). Bereits durch die Aufnahme ins Mitochondrium kann Eisen schädigende Effekte haben. Durch den Transport wird die mitochondriale Membran depolarisiert, was zu einer verminderten ATP Synthese führt und die Insulinsekretion inhibiert (Gerencser 2018; Nam et al. 2018). Außerdem kann der Kontakt von freiem Eisen zu Fettsäuren zu einer Fenton-ähnlichen Reaktion führen und infolge dessen in starkem oxidativem Stress resultieren (Cooksey et al. 2004). Dieser kann dann wiederum PDX1 und MafA inhibieren, was wiederum die Insulinsynthese vermindert (Cnop et al. 2014; Mao et al. 2017; Shu et al. 2019).

Durch die Lysosomen erfolgt das Recycling von Eisen. Hier werden eisenhaltige Enzyme abgebaut und das freie Eisen der Zelle wieder zur Verfügung gestellt (Gatica et al. 2018).

Die Regulation der zellulären Eisenaufnahme erfolgt über ein System bestehend aus iron responsive elements (IRE) und iron responsive proteins (IRP). Die Proteine IRP1 und IRP2 gehören zu den Eisen-Schwefel-Cluster Enzymen (Robbins und Stout 1989). IRP1 kann seine Funktion je nach Eisenstatus ändern. In Phasen des Eisenmangels erfüllt das Enzym eine Signalfunktion im Eisenstoffwechsel (Walden et al. 2006). In Phasen ohne Eisenmangel erhält IRP1 ein [4Fe-4S] Cluster und erfüllt dann als zytosolische Aconitase eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel (Walden et al. 2006; Sanchez et al. 2011; Galaris et al. 2019).

Die Expression von IRP1 und IRP2 wird vor allem posttranskriptionell durch die intrazelluläre Eisenkonzentration (Rouault 2006), aber auch durch Hypoxie reguliert (Luo et al. 2016). Ein möglicher Auslöser von Hypoxie kann eine metabolische Belastung, wie zum Beispiel eine chronische Hyperglykämie, sein (Sato et al. 2011). Diese sorgt durch den erhöhten Sauerstoffverbrauch für eine Hypoxie (Sato et al. 2011). Es konnte gezeigt werden, dass eine 24-stündige intrazelluläre Hypoxie zu einer erhöhten intrazellulären IRP1 mRNA-Konzentration führt (Luo et al. 2016). Außerdem konnte ein Anstieg der intrazellulären Proteinkonzentration von IRP1 ab einer vierstündigen hypoxischen Exposition beobachtet werden (Luo et al. 2016).

Der Effekt einer vermehrten Expression von IRP1 und IRP2 ist eine vermehrte Bindung an IREs. Dies sind untranslatierte Regionen auf der mRNA von verschiedenen Proteinen, die für den Eisenstoffwechsel relevant sind (Galaris et al. 2019). Die Bindung von IRP

und IRE sorgt zum Beispiel für eine Stabilisierung der mRNA des TfR1 und DMT1 (Galaris et al. 2019). Infolgedessen wird die Translation dieser mRNA gesteigert und die Zelle nimmt durch eine vermehrte Anzahl von Transferrinrezeptoren mehr Eisen auf (Gammella et al. 2017). Zusätzlich inhibiert die Bindung von IRP über sterische Mechanismen die Translation des Speicherproteins Ferritin (Muckenthaler et al. 1998; Gammella et al. 2017). Intrazellulär wird also infolge des Eisenmangels durch IRP1 sowohl die Aufnahme von Eisen erhöht, als auch die Speicherung von Eisen reduziert.

Der Transferrinrezeptor spielt eine zentrale Rolle in der Eisenhämostase. Neben der Regulation durch IRP1 wird die Expression des TfR1 durch Hypoxie reguliert. Diese kann die Transskription von TfR1 steigern (Tacchini et al. 1999). Da die Eisenaufnahme durch die Anzahl der TfR1 Rezeptoren auf der Oberfläche bestimmt wird, kann eine Verminderung des TfR1 vor einer Eisenüberladung schützen (Gammella et al. 2017).

Infolge einer Dysregulation des TfR1 konnten deutliche Veränderungen in der Genexpression von Zellen beobachtet werden (Huang et al. 2020). Eine Dysregulation des Rezeptors ist zum Beispiel mit einer Anämie (Li et al. 2017) assoziiert. Ob dieser Effekt durch TfR1, welches direkt RNA binden kann (Sebestyén et al. 2016), oder indirekt durch die Aufnahme von Eisen vermittelt ist, welches ebenfalls Gene regulieren kann (Kautz et al. 2008), ist noch nicht abschließend geklärt.

### 1.2.5 Glutaredoxine

Glutaredoxine sind eine heterogene Untergruppe der Thioredoxinfamilie. Sie lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen. Eine Gruppe sind die Dithiole mit einer Cys-Pro-Tyr-Cys Sequenz im aktiven Zentrum. Diese Enzyme haben vor allem die Funktion Glutathion Elektronen zu übertragen und Thiol-Disulfid Reaktionen zu katalysieren. Hierdurch haben sie einen wichtigen Einfluss auf intrazelluläre Redox-Reaktionen. Monothiole hingegen haben eine Cys-Gly-Phe-Ser Sequenz in ihrem aktiven Zentrum. Ihre Aufgaben liegen vor allem im Eisenmetabolismus (Berndt und Lillig 2017). Die Glutaredoxine 1,2,3 und 5 sind im Menschen beschrieben (Ogata et al. 2021). Da in dieser Arbeit ausschließlich Glutaredoxin 5 untersucht wurde, wird im Weiteren auch nur auf dieses näher eingegangen.

### 1.2.5.1 Glutaredoxin 5

Das Monothiol Glutaredoxin 5 ist ein Protein, welches in vielen Eukaryoten und Prokaryoten gefunden wurde und sich zwischen verschiedenen Spezies wenig in seinem Aufbau unterscheidet. Glutaredoxin 5 ist wichtig für die Produktion von Proteinen des Eisen-Schwefel-Clusters (Ohba et al. 2013). Glutaredoxin 5 kann mit seinem aktiven Zentrum, bestehend aus Cys-Gly-Phe-Ser, Eisen-Schwefel-Cluster binden und diese auf Apoproteine übertragen (Bellí et al. 2002). Diese Eisen-Schwefel-Cluster werden dann für verschiedene Reaktionen benötigt, wie zum Beispiel als Co-Substrat für Reaktionen oder zum Elektronentransfer. Wichtige Enzyme mit Eisen-Schwefel-Clustern sind die Komplexe 1-3 der Atmungskette, die zytosolische Aconitase und die mitochondriale Ferrochelatase (Braymer und Lill 2017). Diese Enzyme sind zentrale Bestandteile des Energiestoffwechsels der Zelle.

Studien haben gezeigt, dass die Abwesenheit von Glutaredoxin 5 schwere Auswirkungen auf den Stoffwechsel der Zellen hat. In Hefe führte ein Glutaredoxin 5 Mangel zum Beispiel zu schweren oxidativen Schäden, zellulärer Eisenansammlung und Inaktivierung von Eisen-Schwefel-Cluster Enzymen (Rodríguez-Manzaneque et al. 2002). Ähnliche Effekte wurden bei Studien mit Zebrafischen und Menschen beobachtet (Wingert et al. 2005). Ein Patient, der an einem angeborenen Mangel an Glutaredoxin 5 litt, zeigte Symptome einer sideroblastischen Anämie, welche mit einer Eisenüberladung des Mitochondriums assoziiert ist. Außerdem litt der Patient unter einem Diabetes mellitus (Camaschella et al. 2007). In Zellversuchen mit MIN6 Zellen konnte eine Reduktion der intrazellulären Konzentration von Glutaredoxin 5 unter Einfluss von Ölsäure beobachtet werden (Petry et al. 2018; Petry et al. 2022).

## 1.3 MIN6 Zellen

Die in den Versuchen verwendete Zelllinie ist die „Mouse Insulinoma 6“ (MIN6). Hierbei handelt es sich um eine immortalisierte, murine Betazelllinie. Sie stammt aus transgenen C57BL/6 Mäusen. Zur Isolation dieser Zelllinie wurde zunächst Eizellen von Mäusen ein humaner Insulin-Promotor, gekoppelt an ein Simian Virus-40-T-Antigen, injiziert. Diese Mäuse entwickelten dann in ihrem späteren Leben vermehrt Insulinome. Aus einem dieser Insulinome wurde dann die MIN6 Zelllinie isoliert (Ishihara et al. 1993).

Relevante Eigenschaften der MIN6 Zellen sind zum Beispiel die Expression des GLUT2 Transporters, der Glukokinase und von Insulin. Außerdem zeigen sie auf Stimulation mit Glukose eine deutlich gesteigerte Insulinsekretion. Diese Eigenschaften ähneln denen von primären Betazellen sehr, was sie zu einem geeigneten Zellmodell zur Untersuchung des Insulinstoffwechsels macht (Miyazaki et al. 1990; Ishihara et al. 1993).

Ein typisches Merkmal von Mäusen ist, dass diese, im Gegensatz zum Menschen zwei verschiedene Gene für Insulin, Ins1 und Ins2, besitzen. Die zwei verschiedenen Gene sind strukturell bis auf wenige Unterschiede identisch (Clark und Steiner 1969; Wentworth et al. 1986). Beide Gene bilden in niedrigen Passagen funktionales Insulin in ungefähr gleicher Menge (Cordell et al. 1982; Wentworth et al. 1986; Koranyi et al. 1989). Die Expression von Ins1 lässt jedoch bei höherer Passagezahl nach (Roderigo-Milne et al. 2002). Ins1 hat sich in verschiedenen Experimenten als reaktiver gegenüber Glukosestimulation erwiesen (Kakita et al. 1982; Ling et al. 1998; Roderigo-Milne et al. 2002). So zeigte es unter Exposition gegenüber hohen Glukosekonzentrationen auch eine gesteigerte Genexpression (Wentworth et al. 1992). Die Expression von Ins2 bleibt in höheren Passagen relativ stabil. Im Gegensatz dazu sinkt die Expression von Ins1 im Verhältnis zu Ins2 in hohen Passagen (Passage 64) deutlich ab (Roderigo-Milne et al. 2002). Deswegen lässt sich vermuten, dass die gemessene Genexpression von Insulin in niedrigen Passagen größtenteils durch Ins1 bestimmt wird, während sie in hohen Passagen eher durch Ins2 vermittelt wird (Lund et al. 1993). In einer Studie an RIN-5F Zellen konnte beobachtet werden, dass eine PDX1 Überexpression nur Einfluss auf Ins1, aber nicht auf Ins2 hat (Kiba 2022). Dies könnte eine mögliche Erklärung für eine höhere Glukosesensitivität von Ins1 sein. Die genauen Regulationsmechanismen der einzelnen Gene sind jedoch noch nicht geklärt.

## 1.4 Ziele dieser Arbeit

Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die aufgrund ihrer hohen Prävalenz und ihrer ausgeprägten, vielfältigen Folgeerkrankungen gesundheitliche, gesellschaftliche und wirtschaftliche Relevanz besitzt. Die Schädigung und der Funktionsverlust der Betazelle spielen in der Pathophysiologie zusammen mit der Insulinresistenz eine große Rolle. Es gibt viele Hinweise darauf, dass Hyperglykämie und

Hyperlipidämie zusammen mit einer chronischen Entzündungsreaktion wichtige Auslöser der geschädigten Betazellfunktion sein können. In aktuellen Studien verdichten sich die Hinweise, dass Glutaredoxin 5 als Cofaktor zur Produktion von wichtigen, stoffwechselrelevanten Enzymen einen Einfluss auf die Pathogenese des Diabetes mellitus haben könnte. In Studien mit Zellen, die einen Glutaredoxin 5 Mangel aufwiesen, wurde ebenso eine Eisenüberladung mit daraus folgender Ferroptose beobachtet. Die Relevanz dieser Beobachtungen ist im Zusammenhang mit Diabetes mellitus noch nicht geklärt. Deswegen ist das Ziel dieser Arbeit weitere Hinweise auf die Zusammenhänge der stoffwechselbedingten Glutaredoxin 5 Regulation und der assoziierten Eisenüberladung zu erlangen. Zentrale Fragestellungen sind:

- Welchen Einfluss hat Ölsäure auf die glukosestimulierte Insulinsekretion, die Insulinsynthese, -expression und den Zusammenhang zu Glutaredoxin 5 und Expression von Genen des Eisenstoffwechsels?
- Welchen Einfluss hat Glukose auf die glukosestimulierte Insulinsekretion, die Insulinsynthese, -expression und den Zusammenhang zu Glutaredoxin 5 und Expression von Genen des Eisenstoffwechsels?
- Welchen Einfluss haben inflammatorische Zytokine auf die glukosestimulierte Insulinsekretion, die Insulinsynthese, -expression und den Zusammenhang zu Glutaredoxin 5 und Expression von Genen des Eisenstoffwechsels?
- Gibt es einen additiven Effekt der verschiedenen Stressoren auf die glukosestimulierte Insulinsekretion, die Insulinsynthese, -expression und den Zusammenhang zu Glutaredoxin 5 und Expression von Genen des Eisenstoffwechsels?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellen

Die MIN6-Zellen sind transgene Insulinomzellen der Maus. Die Erstbeschreibung erfolgte durch Dr. Miyazaki (Institut für Medizinische Genetik, Kumamoto Universität Medizinische Hochschule, Japan) (Miyazaki et al. 1990). Sie wurden dem Labor durch Dr. Sigurd Lenzen (Institute für klinische Biochemie, Hannover, Germany) bereitgestellt.

#### 2.1.2 Chemikalien

Bezeichnung	Firma (Sitz)
0,05 % Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Albumin from bovine serum, protein standard, liquid, 2 mg protein/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
Alkoholisches Schnelldesinfektionsmittel, FREKA-NOL AF	Dr. Schumacher GmbH (Malsfeld, Deutschland)
Aqua	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
$\beta$ -Mercaptoethanol (50 mM)	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
$\beta$ -Mercaptoethanol > 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
Bovine Serum Albumin, Fatty Acids Free Lyophilised	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO), $\geq 99,5$ %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose, pyruvate	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) No glucose, no pyruvate, with L-Glutamine	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), without Calcium or Magnesium	Lonza (Walkersville, MD, USA)
Ethanol, 99,8 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
FBS, South America Origin	Biowest (Nuaille, Frankreich)
D(+)-Glukose, anhydrous	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland)
Interferon $\gamma$ (human)	PeptoTech, Inc. (Rocky Hill, New Jersey, USA)
Interleukin 1 $\beta$ (recombinant, human)	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH (Hercules, California, USA)
Natriumchlorid > 99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Nonidet – P40	US Biological (Salem, USA)
Oleic acid	Enzo Life Sciences, Inc. (Farmingdale, New York, USA)
Oligo d(T) <sub>16</sub> , 50 $\mu$ M	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories GmbH (Hercules, California, USA)
RNaseZap	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Salzsäure (HCL)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

Sodium deoxycholate monohydrate > 99,9 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Sodium dodecyl sulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Sodium Hydroxide Solution 1 mol/l	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Puder	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
TNF- $\alpha$ (human)	Bachem Holdig AG (Bubendorf, Schweiz)
Trizma Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Trypan Blue, Powder	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

### 2.1.3 Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Master Mix; cDNA-Synthese	4 $\mu$ l 5X First strand buffer, 2 $\mu$ l 0,1 M DTT, 1 $\mu$ l mM dNTPs, 1 $\mu$ g $\mu$ l <sup>-1</sup> Oligo d(t), 1 $\mu$ l SuperScript III Reverse Transcriptase
Master Mix; qRT-PCR	10 $\mu$ l Power SYBRgreen PCR Master Mix, 6,4 $\mu$ l RNase- freies Wasser, 0,6 $\mu$ l Primer (fwd, rev Primer 1:1, 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt)
Zellkultur Medium	500 ml DMEM, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 605 $\mu$ l $\beta$ -Mercaptoethanol, 100 ml fetales Rinderserum
Reduziertes Zellkultur Medium	500 ml glukosefreies, pyruvatfreies DMEM, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml Natrium-pyruvat, 560 $\mu$ l $\beta$ -Mercaptoethanol, 50 ml fetales Rinderserum
TRIS Puffer 50 mM, pH = 8	606 mg Trisbase in 100 ml Aqua dest, mit HCL und NaOH auf einen pH von 8 ausgeglichen

TRIS Puffer 3 mM pH = 8	0,5 ml TRIS Puffer 50 mM, pH 8 in 7,833 ml Aqua dest
TRIS Puffer 10 mM pH = 8,2	12,114 mg Trisbase in Aqua Dest lösen und auf ein Gesamtvolumen von 10 ml verdünnen. Dann mit HCL und NaOH auf einen ph von 8,2 ausgleichen
Natriumphosphat Puffer 10 mM pH = 7,2	14,2 mg Natrium Phosphat in Aqua dest lösen, auf einen pH von 7,2 mit HCL und NaOH einstellen und auf 10 ml mit Aqua dest auffüllen
RIPA Lysepuffer	876 mg Natriumchlorid, 500 mg Natriumdeoxycholat, 100 mg Natriumdodecylsulfat in 80 ml 50 mM TRIS pH 8 gelöst, 1 ml NP-40 hinzugefügt und auf 100 ml mit 50 mM TRIS pH 8 aufgefüllt

#### 2.1.4 Primer Sequenzen für qRT-PCR

Bezeichnung	Sequenz	Firma (Sitz)
Glx5 fwd	GAAGAAGGACAAGGTGGTGGTCTTC	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Glx5 rev	GCATCTGCAGAAGAATGTCACAGC	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Ins1 fwd	TATAAAGCTGGTGGGCATCC	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Ins1 rev	GGGACCACAAAGATGCTGTT	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Ins2 fwd	GGCTTCTTCTACACACCCATGT	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Ins2 rev	AAGGTCTGAAGGTCACCTGCTC	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)

RPL32 fwd	GGAGAAGGTTCAAGGGCCAG	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
RPL32 rev	GCGTTGGGATTGGTGACTCT	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
FTL fwd	GTCCCGTGGATCTGTGTCT	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
FTL rev	AGGAGCTAACCGCGAAGAGA	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
IRP1 fwd	GAGGCCTAACACCACGAGAG	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
IRP1 rev	AGTCTGAGGTGCCTGCTTGT	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
TfR1 fwd	TTGGGTAGTTGGAGATTGCC	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
TfR1 rev	TGAGGTCTTTGGCTTCTGGT	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)

## 2.1.5 Kits

Bezeichnung	Firma (Sitz)
cDNA-Synthese Kit, SuperScript III Reverse Transcriptase	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Deoxyribonuclease I, Amplification Grade	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
ELISA Kit; Mouse Glutaredoxin-related protein 5, mitochondrial	CUSABIO TECHNOLOGY LLC (Houston, TX, USA)
Insulin (Mouse) ELISA	DRG Instruments GmbH

	(Marburg, Deutschland)
RNeasy Micro Kit (50)	QIAGEN (Hilden, Deutschland)

## 2.1.6 Laborequipment

Bezeichnung	Firma (Sitz)
CO2-Inkubator HERAcell	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Elektronische Präzisionswaage, M-prove	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Gefrierschrank, -20 °C	Liebherr-International Deutschland GmbH (Biberach an der Riß, Deutschland)
Inverses Mikroskop, AE31	Motic Deutschland GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Kühlschrank	Bosch (Gerlingen, Deutschland)
Mikroplattenleser, Mithras LB 940	BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH & Co. KG (Bad Wildbad, Deutschland)
Mikrotiterschüttler, MTS 2	IKA-Werke GmbH & CO. KG (Staufen, Deutschland)
Mikrozentrifuge für PCR-Platten, PerfectSpin P	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Real-Time PCR System, StepOnePlus	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Spectrophotometer, NanoDrop ND-1000 UV-Vis	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA)
Thermocycler	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Tiefkühlschrank, HeraFreeze (bis -86 °C)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland)

Werkbank der Klasse II, HERAsafe KS12	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Universal 32R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Tuttlingen, Deutschland)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Kultivierung

Die Experimente wurden an MIN6 Zellen durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit 1 % Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml), 20 % fetalem Rinderserum (FBS) und 0,1 % 50 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Das verwendete FBS wurde vor Applikation 30 Minuten bei 56 °C Hitzeinaktiviert und danach aliquotiert in 50 ml Tubes bei -20 °C gelagert. Hierdurch wurde sichergestellt, dass sich im FBS weder Antikörper noch Bestandteile des Komplementsystems befinden. Das Zellkulturmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Im Zuge des Medienwechsels erfolgte auch immer eine mikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie.



Abbildung 1: MIN6 Zellen in Kultur, Passage 53

### 2.2.1.2 Passagierung

Ab einer Konfluenz von 70-80 % wurden die Zellen auf mehrere Kulturflaschen aufgeteilt. Hierzu wurde zunächst das Medium aus den Kulturflaschen entfernt und die Zellen dann mit Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) (ohne  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ ) gewaschen. Hierdurch wurde eine Hemmung der Wirkung von Trypsin durch das FBS vermieden und abgestorbene Zellen aus der Kulturflasche entfernt. Die Zellen wurden zum Ablösen von der Wachstumsfläche mit 0,05 % Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (Trypsin-EDTA) für 3 Minuten bei 37 °C und 5 %  $CO_2$  inkubiert. Zur Unterstützung der Wirkung des Trypsins wurden die Zellen nach der Inkubation auf den Tisch geklopft. Um Schäden an den Zellen durch eine lange Inkubation mit Trypsin zu vermeiden, wurde der Zell-Trypsin Suspension Zellkulturmedium hinzugefügt. Danach wurde die Zelllösung bei 1200 Umdrehungen pro Minute für 4 Minuten zentrifugiert. Zunächst wurde der Überstand entfernt. Anschließend wurde das Pallet durch leichtes Klopfen von der Wand gelöst und die Zellen mit Zellkulturmedium resuspendiert. Danach wurden sie auf neue Kulturflaschen aufgeteilt. Zellen, die für Lysate und PCR-Proben benötigt wurden, wurden in Flaschen mit 175  $cm^2$  kultiviert. Zellen, die für den MTT benötigt wurden, wurden in 75  $cm^2$  kultiviert.

Die Zellen in Kultur befanden sich zwischen Passage 48 und 58. Experimente wurden mit Zellen der Passage 51 bis 53 durchgeführt.

### 2.2.1.3 Aussäen

Die Zellen wurden für Analysen der mRNA (PCR) und Proteinanalysen (Lysate) in 6 Well Platten ausgesät. Die Zellen für den MTT wurden in eine 96 Well Platte gesät.

Um konstante Zellzahlen während der Experimente sicherzustellen, wurden die Zellen vor dem Aussäen ausgezählt. Hierzu wurden die Schritte der Passagierung (siehe Kapitel 2.2.1.2) bis zum Schritt der Resuspension mit dem Kulturmedium durchgeführt. Zum Zählen der Zellen wurde das Pallet mit 10 ml Kulturmedium vermischt und anschließend aus 10  $\mu l$  der entstandenen Zellsuspension und 90  $\mu l$  Trypanblau eine Analyselösung hergestellt. Diese Lösung wurde zunächst für 10 Sekunden in einem Vortexmischer vermischt und anschließend auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen. Da sich Trypanblau vermehrt in abgestorbenen Zellen anreichert, hatten diese Zellen im

Lichtmikroskop eine deutlich bläulichere Farbe als die lebendigen Zellen. Auf diese Weise ließen sich lebendige von toten Zellen unterscheiden. Alle lebendigen Zellen in den vier 4x4 Feldern der Neubauer Zählkammer wurden ausgezählt und die Zellzahl in der verbleibenden Zellsuspension dann wie folgt berechnet:

$$\text{Gesamtzahl} = \frac{\text{Gezählte Zellen}}{4} \times \text{Verdünnung Analyselösung} \\ \times \text{Volumen Resuspensionsmedium (ml)} \times 10^4$$

#### 2.2.1.4 Langzeitlagerung

Die langfristige Lagerung der MIN6 Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zur Lagerung der Zellen wurde zunächst eine Lösung aus dem Zellkulturmedium und Dimethylsulfoxid (DMSO) im Verhältnis 1:5 angefertigt. Danach wurden dieselben Schritte wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, inklusive der Resuspension, durchgeführt. Nach der Resuspension des Zellpellets mit Zellkulturmedium wurde 1 ml der Zelllösung in ein Kryoröhrchen gefüllt. Zusätzlich wurden dann 750 µl der vorbereiteten Lösung aus DMSO und Zellkulturmedium hinzugefügt und durch Schwenken des Kryoröhrchens vermischt. Das DMSO sollte schädlicher Kristallbildung in den Zellen vorbeugen.

Da sich die MIN6 Zellen empfindlich gegenüber starken Temperaturänderungen erwiesen haben, wurden die Zellen zunächst 15 Minuten bei 4 °C auf Eis, dann 2,5 Stunden bei -20 °C gelagert und nach einer Nacht bei -80 °C am nächsten Tag in den flüssigen Stickstoff transferiert.

Bei Bedarf wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und wieder aufgetaut. Hierzu wurden die gefrorenen Zellen in den Kryoröhrchen in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die flüssige Zellsuspension wurde mit 10 ml Zellkulturmedium vermischt und bei 1200 Umdrehungen pro Minute für 4 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und das Pallet mit Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden dann in eine Zellkulturflasche überführt. Um mögliche DMSO-Reste zu entfernen, wurde am nächsten Tag das Medium gewechselt. DMSO hat sich in hohen Konzentrationen als schädlich für die Zellen erwiesen. Danach wurde das Medium im normalen Rhythmus alle 2-3 Tage gewechselt.

## 2.2.2 Versuche

### 2.2.2.1 Herstellung der Glukoselösung

Für die Versuche wurde eine 2,4 M Glukoselösung benutzt. Diese wurde zunächst durch einen 0,22 µm Filter mit geringer Proteinbindung filtriert und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde sie mit Zellkulturmedium auf 16 mM, 3 mM und 1 mM verdünnt.

### 2.2.2.2 Herstellung der Fettsäurelösung

Die Fettsäuren wurden vor Applikation in Zellkulturmedium gelöst. Für die verschiedenen Glukose Konzentrationen wurde aus der 2,4 M Glukose Stammlösung und aus dem reduzierten Medium zunächst eine 3 mM und 16 mM Glukose Lösung hergestellt. Die hergestellten Medien wurden dann mit 12,5 % Rinder Serum Albumin (BSA) versetzt. Die Ölsäure wurde in 100 % Ethanol gelöst und Basislösungen mit den Konzentrationen 600 mM und 1,2 M hergestellt. Die Konzentrationen dieser Stammlösungen wurden anhand der erforderlichen Endkonzentrationen berechnet. Ziel der Stammlösungen war es den Gehalt an BSA und Ethanol über alle Versuchskonditionen konstant zu halten. Zusätzlich wurde deswegen eine Kontrolle mit 100 %-igem Ethanol, ohne Ölsäuren hergestellt. Im Folgenden 0 mM genannt.

Es wurden Lösungen mit jeweils 3 mM und 16 mM Glukose in Kombination mit 0 mM, 15 mM und 30 mM Ölsäure hergestellt. Die Lösungen wurden dann zum Schutz vor Oxidation und der Verbesserung der Löslichkeit mit gasförmigem Stickstoff bedeckt und über Nacht auf einer Schüttelplatte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Hierdurch sollte eine vollständige Lösung der Fettsäuren sichergestellt werden. Am nächsten Tag wurden die Fettsäurelösungen dann in 15 ml Tubes umgefüllt und bei -20 °C gelagert. Bei Bedarf wurden diese dann für die Experimente aufgetaut und 1:10 auf 0 mM, 1,5 mM und 3 mM Ölsäure verdünnt. Der Ethanolgehalt betrug nach allen Verdünnungen während des Experiments 0,25 %. Der BSA-Gehalt betrug in den finalen Konzentrationen 1,22 %.

### 2.2.2.3 Vorbereitung der Zytokine

Für den Versuch wurden Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$  genutzt. Die Zytokine mussten vor der Applikation rekonstruiert und verdünnt werden. Zur Rekonstruktion wurde destilliertes Wasser hinzugefügt und alle Zytokine auf eine Stocklösung mit der Konzentration 100  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt. Anschließend wurden die Zytokine mit destilliertem Wasser auf ihre Zielkonzentration verdünnt. Um unnötiges Auftauen und Einfrieren zu verhindern, wurden die Zytokine im Verdünnungsschritt passend für die einzelnen Versuchsdurchläufe separat eingefroren. Folgenden Konzentrationen waren die Zellen in den Versuchen ausgesetzt: 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 100 ng/ml INF- $\gamma$  und 5 ng/ml IL-1 $\beta$ .

### 2.2.2.4 Versuchsablauf: Versuchsteil Ölsäure, Glukose, Zytokine

Für alle Versuchsteile wurde derselbe, im Folgenden erläuterte Versuchsablauf durchgeführt. Zunächst wurden 0,5 Millionen Zellen pro Well in eine 6 Well Platte gesät. Die Zellen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn ausgesät, um zu gewährleisten, dass sie an den Wachstumsflächen haften. Die Messung der metabolischen Aktivität erfolgte in einer 96 Well Platte mit 4000 Zellen pro Well.

Der Versuch begann mit einer 2-stündigen Hungerphase der Zellen. Hierzu wurde das Kulturmedium aus allen Wells entfernt und anschließend 2 ml des vorbereiteten Hungermediums mit einer Glukosekonzentration von 1 mM hinzugegeben. In der Zwischenzeit wurden die Chemikalien für die verschiedenen Zustände vorbereitet. Die Zytokine wurden aufgetaut, gevortext, zentrifugiert und miteinander vermischt. Die Fettsäuren wurden aufgetaut und steril durch einen 0,22  $\mu\text{m}$  Filter mit geringer Proteinbindung gefiltert. Die Medien mit den verschiedenen Glukosekonzentrationen wurden auf 37 °C erwärmt.

Nach der 2-stündigen Hungerphase wurde dann das Medium aus den Wells abgesaugt und die jeweiligen Zustände nach Pipettierschema hinzugefügt. In einer 6 Well Platte befanden sich immer 2 Wells mit demselben Zustand. Die Zellen wurden dann für 24 Stunden in den jeweiligen Versuchskonditionen inkubiert und anschließend für die jeweiligen Analysen weiterverwendet (zum Vorgehen siehe Kapitel 2.2.4; 2.2.5.1; 2.2.6.1). Die Kombinationen der jeweiligen Stressoren sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab 1: Kombination der verschiedenen Stressoren:

	3 mM Glukose	16 mM Glukose
0 mM Ölsäure	Mit Zytokinmix/ Ohne Zytokinmix	Mit Zytokinmix/ Ohne Zytokinmix
1,5 mM Ölsäure	Mit Zytokinmix/ Ohne Zytokinmix	Mit Zytokinmix/ Ohne Zytokinmix
3 mM Ölsäure	Mit Zytokinmix/ Ohne Zytokinmix	Mit Zytokinmix/ Ohne Zytokinmix

Insgesamt wurden nach diesem Protokoll 3 Experimente für die Proteinanalyse und 3 Experimente für die Genexpressionsanalyse durchgeführt. Innerhalb der einzelnen Experimente wurden immer Zellen derselben Passage verwendet.

#### 2.2.4 MTT-Assay

Die metabolische Aktivität wurde mithilfe eines MTT-Assays bestimmt. Das Prinzip des MTT-Assays basiert auf der Verstoffwechslung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in den Mitochondrien und Enzymen des ERs der MIN6 Zellen. Durch die Reduktion des MTTs in Formazan wird eine farbliche Veränderung messbar. Je nach metabolischer Aktivität der Zellen fällt diese stärker oder schwächer aus. Dies lässt dann auch Rückschlüsse auf die Viabilität der Zellen zu.

Zu Beginn des Testprotokolls wurde MTT in DPBS (ohne Magnesium und Calcium) in einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst. Danach wurden 50 µl des Zellkulturmediums durch die angefertigte MTT-Lösung substituiert, sodass das verbleibende Zellkulturmedium eine MTT-Konzentration von 0,5 mg/ml besaß. Nach 3,5 Stunden lichtgeschützter Inkubation bei 37 °C bei 5 % CO<sub>2</sub> wurde das Medium entfernt und 200 µl DMSO hinzugefügt. Nach weiterer Inkubation auf der Schüttelplatte für 1 Stunde bei 400 Umdrehungen pro Minute wurde die MTT-Reduktion anhand der Absorption bei 570 nm kolorimetrisch gemessen. Als Referenz wurden die Werte des Filters der Wellenlänge 620 nm von den Messwerten abgezogen.

Zur Auswertung wurde zunächst die Leerkontrolle von den Messwerten abgezogen. Als Leerkontrolle wurde ein Well verwendet, welches alle Stufen der Behandlung durchlaufen hat, jedoch keine Zellen beinhaltet. Zur Vergleichbarkeit wurde die metabolische Aktivität von MIN6 Zellen ohne Behandlung bei jedem Versuchsdurchlauf mitbestimmt. Die Messwerte der verschiedenen Experimente wurden dann ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt, welche aus MIN6 Zellen bestand, die ebenfalls gezählt und ausgesät, dann aber mit normalem Kulturmedium weiterkultiviert und folglich nicht mit Ölsäure, Zytokinen oder unterschiedlichen Glukosekonzentrationen behandelt wurden.

Fünf unplausible Werte, die eine negative metabolische Aktivität aufwiesen, wurden vor der Auswertung aus dem Datensatz entfernt. Die Ausreißer der jeweiligen Datensätze sind in Tabelle 2 und 3 dargestellt.

Tab 2: Ausreißer Datensatz MTT:

Probe	Glukose	3 mM	3 mM	3 mM	3 mM	3 mM	3 mM
	Ölsäure	0 mM	1,5 mM	3 mM	0 mM	1,5 mM	3 mM
	Zytokine	-	-	-	+	+	+
Anzahl Durchläufe (N)		3	3	3	3	3	3
Anzahl Gesamtwerte (n)		48	24	22	48	24	24
Anzahl Ausreißer		0	0	2	0	0	0

Tab 3: Ausreißer Datensatz MTT:

Probe	Glukose	16 mM	16 mM	16 mM	16 mM	16 mM	16 mM
	Ölsäure	0 mM	1,5 mM	3 mM	0 mM	1,5 mM	3 mM
	Zytokine	-	-	-	+	+	+
Anzahl Durchläufe (N)		3	3	3	3	3	3
Anzahl Gesamtwerte (n)		24	24	21	24	24	24
Anzahl Ausreißer		0	0	3	0	0	0

Eine negative metabolische Aktivität ist im Rahmen des Versuches unplausibel, da dies bedeutet, dass Wells ohne Zellen eine höhere metabolische Aktivität aufweisen als Wells mit Zellen. Da die negativen Werte vorwiegend in Wells mit einer hohen Ölsäurekonzentration und einer ohnehin verminderten metabolischen Aktivität auftraten, ist zu vermuten, dass diese Zustände so ausgeprägte zellschädigende Effekte auf die MIN6 Zellen haben, dass sie zum kompletten Verlust der Zellaktivität führen.

Eine mögliche Erklärung für die schwankende metabolische Aktivität innerhalb der jeweiligen Zustände könnte ungleich gelöste Ölsäure sein. Diese könnte in hohen Konzentrationen in manchen Wells einen stärkeren Effekt, als in anderen hervorrufen.

## 2.2.5 Proteinanalyse

### 2.2.5.1 Herstellung der Proben

Nach der Behandlung wurden die Proteine der Zelllysate und des Mediums analysiert. Zu Beginn wurden alle Platten gleichzeitig aus dem Inkubator genommen und zeitgleich auf Eis gestellt. Dies sollte den Stoffwechsel der Zellen während der Probenherstellung verlangsamen. Als Lysepuffer diente eine Mischung aus RIPA-Puffer und Proteinase-Phosphatase Inhibitoren.

Zu Beginn wurde Medium zur weiteren Analyse abpipettiert, für 4 Minuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute bei 4 °C zentrifugiert und der verbleibende Überstand anschließend bei -20 °C gelagert.

Die in den Wells verbliebenen Zellen wurden zunächst zweifach mit DPBS gewaschen und dann mit dem Lysepuffer lysiert. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zelltrümmer gesammelt, mit einem Vortexmixer homogenisiert und anschließend auf Eis inkubiert. Nach erneuter Homogenisierung mit dem Vortexmixer und anschließender Zentrifugation bei 13000 Umdrehungen pro Minute bei 4 °C wurde der verbleibende Überstand bei -20 °C gelagert. Sobald der Insulin ELISA abgeschlossen war, wurden die Proben bei -80 °C eingefroren. Insulin hatte sich bei -80 °C im Gegensatz zu den restlichen Proteinen als nicht stabil gezeigt.

Diese Proben wurden dann sowohl für den Insulin ELISA (siehe Kap. 2.2.5.2), Glrx5 ELISA (siehe Kap. 2.2.5.4) und für die Proteinbestimmung nach Bradford (siehe Kap. 2.2.5.3) genutzt.

### 2.2.5.2 Insulin ELISA

Die Insulinkonzentration innerhalb der Zellen und des Mediums wurde separat mit Hilfe des Mouse Insulin ELISA Kits (DRG Instruments GmbH) gemessen.

Das Prinzip hinter der Insulinmessung ist die des sogenannten Sandwich ELISAs (Abkürzung für enzyme-linked immunosorbent assay). Hier wird das Insulin von spezifischen Antikörpern, mit denen eine 96-Well Platte beschichtet ist, gebunden. Ein zweiter Antikörper wird hinzugegeben und bindet das Insulin dann an einer anderen Stelle. Danach wird die Platte gewaschen, um freie Antikörper zu entfernen und anschließend 3-3',5-5'-tetramethylbenzidine (TMB) hinzugegeben, welches dann durch die Peroxidase des zweiten Antikörpers verstoffwechselt wird. Durch die Zugabe von Schwefelsäure wird dieser Prozess gestoppt und die Farbintensität dann kolorimetrisch bei 450 nm gemessen. Der zweite Antikörper wird im Folgenden als Enzymkonjugat beschrieben.

Die zu analysierenden Proben wurden aufgetaut, für 10 Sekunden gevortext und für 30 Sekunden bei 4 °C bei 600 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Danach wurden die Lysate 1:3000 und die Überstände 1:150 verdünnt. Zur Verdünnung wurde destilliertes Wasser verwendet. Die Verdünnungsfaktoren wurden in Vorversuchen festgelegt. Als Standard wurden 6 Standards aus dem Kit genutzt. Standard 0 enthielt kein Insulin. Je 10 µl der Proben und des Standards wurden dann in die Wells gefüllt. Jeder Standard wurde stets in Dupletten gemessen. Eine Duplette bestand bei den Proben aus zwei biologischen Kontrollen. Dies waren zwei Proben, die zuvor dieselbe Behandlung mit Ölsäure, Glukose und Zytokinen erhalten hatten. Anschließend wurde das Enzymkonjugat hinzugefügt und die 96-Well Platte auf einem Schüttler für 2 Stunden inkubiert. Vor der Inkubation mit dem TMB-Substrat wurde die Platte sechsfach mit dem bereitgestellten Waschpuffer gewaschen. Die Reaktion des TMBs wurde anschließend mit 0,5 M Schwefelsäure gestoppt und die Intensität des Farbumschlags bei 450 nm kolorimetrisch bestimmt (DRG Instruments GmbH, 2016).

Die Auswertung der Messwerte erfolgte mit Hilfe des Standards. Die jeweiligen Messwerte wurden ihren Konzentrationen zugeordnet und auf eine Standardkurve aufgetragen. Anhand der Funktion, die die Standardkurve ergibt, wurden dann die Konzentrationen der einzelnen Messwerte bestimmt. Die Insulinkonzentrationen wurden dann mit Hilfe des Gesamtproteins (siehe Kapitel 2.2.5.3.) normalisiert.

### 2.2.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur genaueren Bewertung der Insulin- und Glutaredoxin 5-Konzentrationen wurden die Messwerte ins Verhältnis mit der jeweiligen Proteinkonzentration gesetzt. Die Methode zur Proteinbestimmung war die Bradford Methode. Hierbei werden die Proben mit Coomassie-Brilliant-Blau G-250 versetzt. Der Farbstoff reagiert mit den Proteinen in der Probe und bildet farbige Komplexe. Diese lassen sich dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm messen.

Der Ablauf der Proteinbestimmung begann damit, dass die Proben aufgetaut, mit einem Vortexmischer homogenisiert und anschließend zentrifugiert wurden. Die Proben der Lysate wurden für die Proteinbestimmung 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Der Proteinstandard wurde mit RIPA-Puffer und destilliertem Wasser auf die benötigten Konzentrationen verdünnt. Die pipettierten Standards und Proben wurden dann mit Coomassie-Brilliant-Blau vermischt. Danach wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Alle Proben und Standards wurden bei diesem Test doppelt bestimmt.

### 2.2.5.4 Glutaredoxin 5 ELISA

Die Glutaredoxin 5-Konzentrationen im Lysat wurden mit Hilfe des Glutaredoxin 5 ELISA Kits (Cusabio Technology LLC) gemessen.

Der ELISA funktioniert ebenfalls nach dem Prinzip eines Sandwich ELISAs. Die Proben wurden, wie bei dem Insulin-ELISA (Siehe Kapitel 2.2.5.2.), auf eine mit Antikörpern beschichteten 96 Mikrotiter Platte aufgetragen. Die Antikörper auf der Oberfläche waren spezifisch für Glutaredoxin 5. Ein zweiter Antikörper, welcher spezifisch für einen anderen Abschnitt am Glutaredoxin 5 war, wurde dann im zweiten Schritt hinzugefügt. Dieser Antikörper hatte Biotin gebunden, an welches dann im weiteren Verlauf Avidin mit einer Meerrettichperoxidase (HRP-Avidin) gebunden hat. Diese Peroxidase hat dann

TMB verstoffwechselt und somit einen Farbumschlag erzeugt. Zum Stoppen der Reaktion wurde Schwefelsäure genutzt. Die Messung erfolgte bei 450 nm.

Der bereitgestellte Standard wurde mit der bereitgestellten Verdünnungslösung nach Herstellerangaben hergestellt und auf die Zielkonzentrationen verdünnt. Die Lysate wurden aufgetaut, mit dem Vortexmixer homogenisiert, zentrifugiert und anschließend mit destilliertem Wasser verdünnt. Für jedes Experiment wurde ein individueller Vorversuch durchgeführt, durch den die benötigte Verdünnung festgestellt wurde.

Die verdünnten Lysate wurden dann in die mit Antikörpern beschichtete 96-Well Platte pipettiert und die Platte bei 37 °C inkubiert. Danach wurde ein Biotin konjugierter Antikörper hinzugefügt und die Proben erneut bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit dem bereitgestellten Waschpuffer wurde HRP-Avidin hinzugefügt und die Platte erneut bei 37°C inkubiert. Nach fünfmaligem Spülen wurde dann das TMB-Substrat inkubiert. Diese Reaktion wurde dann abschließend mit der bereitgestellten Stop-Lösung beendet und die Intensität des Farbumschlags bei 450 nm gemessen.

Die Auswertung erfolgte dann analog zu der Auswertung der Insulin Konzentrationen (Siehe Kapitel 2.2.5.1.). Aus den Readerwerten und den vorbekannten Konzentrationen des Standards wurde eine Standardkurve erstellt. Durch die zugehörige Funktion dieser Standardkurve wurden dann die Konzentrationen der Messwerte errechnet. Die Ergebnisse wurden abschließend mit Hilfe des Gesamtproteins normalisiert.

## 2.2.6 Quantitative real-time PCR

### 2.2.6.1 Probenherstellung

Zur Vorbereitung wurde der Lysepuffer aus  $\beta$ -Mercaptoethanol und RLT-Puffer aus dem Qiagen Rneasy Mini Kit hergestellt. Alle Arbeiten zur Isolation der RNA wurden auf Eis durchgeführt. Zur Isolation der RNA wurde zunächst das Zellkulturmedium entfernt. Danach wurden die Zellen mit Hilfe des RLT-Lysepuffers lysiert. Die Probe wurde mit einem Zellschaber gesammelt, mit einem Vortexmixer homogenisiert und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.6.2 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit dem Quiagen Rneasy Mini Kit durchgeführt. Das Kit stellt Säulen bereit, welche spezifisch RNA binden. Nachdem die RNA hinzugefügt wurde und sie an der Säule gebunden hat, folgen drei Waschschrirte, durch die Reste anderer Chemikalien und DNA-Reste entfernt werden. Anschließend wird die RNA dann mit Rnase freiem Wasser aus der Säule eluiert.

Zu Beginn wurde die Probe homogenisiert, mit 70% Ethanol vermischt und auf die Rneasy MinElute Säule pipettiert. Diese wurde dann bei 13000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und anschließend einmal mit RW1-Puffer und zweimal mit RPE-Puffer gereinigt. Nach Zugabe der Pufferlösungen wurde die Säule stets zentrifugiert und der Überstand verworfen. Mit Hilfe von Rnase freiem Wasser wurde dann die RNA aus der Säule eluiert.

Die RNA-Konzentration und ihre Qualität wurde mithilfe des Nanodrop Spectrophotometers (ND-1000) bestimmt. Vor jeder Messung wurde durch kurzes Vortexen die homogene Verteilung der RNA sichergestellt. Um eine höhere Präzision der Messung zu gewährleisten, wurden die Proben jeweils doppelt bestimmt. Die Lagerung erfolgte danach bei -80 °C.

### 2.2.6.3 cDNA-Herstellung

Bei der cDNA-Herstellung wurde die aus den Proben gewonnene RNA in die stabilere cDNA umgeschrieben. Die gesamte cDNA-Herstellung erfolgte auf Eis. Anhand der zuvor gemessenen RNA-Konzentrationen (Siehe Kapitel 2.2.6.2) wurden die Proben mit Rnase freiem Wasser auf ein Volumen von 8 µl mit einem RNA-Gehalt von 300 ng bis 1 µg verdünnt. Je nach vorhandener minimaler RNA-Konzentration einer Versuchsserie wurde die Verdünnung auf einen maximalen RNA-Gehalt bei einem Maximalvolumen von 8 µl angepasst. Ziel war ein RNA-Gehalt von 1 µg.

Zur Entfernung von DNA-Hintergrund wurde zunächst ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurde der Probe eine DNase hinzugefügt. Nach kurzem Zentrifugieren wurden die Proben dann im Thermocycler (VWR) bei 37 °C für 15 Minuten mit 110 °C Deckeltemperatur inkubiert. Der DNase-Verdau wurde mit 25 mM EDTA pro Probe

gestoppt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Proben für 15 Minuten bei 65 °C für 5 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Hinzufügen des vorbereiteten Mastermixes für die reverse Transkription wurden die Proben zentrifugiert und zunächst bei 50 °C für 50 Minuten, dann bei 72 °C für 15 Minuten und abschließend bei 4 °C bis zur Probenentnahme inkubiert. Danach wurden die Proben im Verhältnis 1:10 mit RNase freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.6.4 Verifizierung der Primereffizienzen

Die Effizienzen der bereits im Labor etablierten Primer RPL32, Glrx5, Ins1 und Ins2 wurden in der Arbeitsgruppe bereits verifiziert und für diese Arbeit deshalb nicht erneut geprüft (Sun 2021). Die Vorergebnisse aus der Arbeitsgruppe sind mit in der Tabelle 2 aufgeführt.

Die Effizienzen der neu verwendeten Primer (IRP1, FTL, TfR1) wurden mithilfe einer Verdünnungsreihe getestet. Eine cDNA-Probe wurde jeweils im Verhältnis 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:40, 1:100 und 1:200 mit RNase- und DNase-freiem Wasser verdünnt. Anschließend wurde eine qPCR nach Standardschema durchgeführt (siehe 2.2.6.5). Dann wurden die CT-Werte der Probe auf die log<sub>10</sub>-transformierte RNA-Menge der Probe in einen Graphen übertragen. Aus der Steigung der Ausgleichsgraden ließen sich dann mithilfe folgender Formeln die Effizienzen berechnen.

$$\text{Effizienz} = 10^{-\frac{1}{\text{Steigung}}}$$

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

Tab 4: Effizienzermittlung der PCR Primer:

<b>Gen</b>	RPL32	GlrX5	Ins1	Ins2	IRP1	FTL	TfR1
<b>Effizienz</b>	1,7	2,6	2,0	1,9	2,1	2,1	2,2
<b>Effizienz (%)</b>	73	167	103	98	112	111	115

### 2.2.6.5 Quantitative Real-time PCR

Zur Messung der Genexpression wurde die cDNA mit der sogenannten quantitativen PCR amplifiziert. Die cDNA wird hierbei in 40 Zyklen mithilfe spezifischer Primer amplifiziert und nach jedem Zyklus die Intensität der Fluoreszenz gemessen. In dem Mastermix für die qPCR ist ein Fluoreszenzfarbstoff enthalten, welcher sich in doppelsträngiger DNA einlagert und nach Einlagerung ein Fluoreszenzsignal ausstößt. Dieses korreliert dann mit der Menge an mRNA, die in den behandelten Zellen enthalten war.

Die cDNA wird hierfür verdünnt mit dem qPCR Mastermix in eine vorbereitete 96-Well Platte pipettiert. Anschließend erfolgt die Amplifizierung der cDNA. Eine frühe exponentielle Amplifikation der cDNA, also ein niedriger CT-Wert, bei einem spezifischen Primer, bedeutet eine höhere Konzentration der Gensequenz innerhalb der Probe. Als Referenzgen wurde bei jedem Durchgang RPL 32 untersucht. Pro Durchlauf wurden die Ct-Werte aller untersuchten Proben doppelt bestimmt. Pro Primer und untersuchter Probe wurde dann aus den beiden individuellen Messwerten der Mittelwert gebildet.

Die Messung wurde mit dem Real-Time PCR System StepOnePlus (Applied Biosystems) durchgeführt. Nach 10-minütiger Aktivierung des Enzyms bei 95 °C wurden 40 Zyklen aus Denaturierung und Annealing durchlaufen.

Da das benutzte SYBRgreen eine hohe Sensitivität bei niedriger Spezifität besitzt, wurde im Anschluss jeder Messung eine Schmelzkurve erstellt (Siehe Anhang 8.1). Durch diese konnte die Aktivität, Funktion und Güte der Primer beurteilt werden.

### 2.2.6.6 Auswertung der Real Time PCR

Zur Auswertung der Daten der PCR wurde eine relative Quantifizierung angewendet. Dies bedeutet, dass keine absoluten Konzentrationen, sondern die Unterschiede zwischen RPL32, dem hier verwendeten Referenzgen, und dem jeweiligen Zielgen bestimmt wurden. RPL32 zeigte in den Versuchen eine konstante Expression mit geringer Varianz sowohl über die biologischen, als auch die technischen Replikate hinweg. Außerdem zeigte es sich weder durch die Ölsäure-, Glukose- oder Zytokinbehandlung in seiner

Expression beeinflusst. Aus diesem Grund wurde RPL32 als Referenzgen gewählt. In unserer Arbeitsgruppe zeigte sich RPL32 auch bereits in anderen Arbeiten als suffizientes Referenzgen (Sun 2021).

Da sich in der Effizienzbestimmung Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Genen zeigten, erfolgte die Auswertung der PCR mithilfe der Pfaffl Methode (Pfaffl 2001). Für diese wurde zunächst der Abstand der erhobenen Messwerte eines Gens zum Mittelwert der Kontrolle bestimmt. Hierfür wurde die Probe, die mit 16 mM Glukose, 0 mM Ölsäure und ohne den Zytokinmix behandelt wurde, verwendet. Diese Probe ähnelte am ehesten den normalen Konditionen während der Zellkultur. Durch Hinzunahme der Effizienzen (E) konnte dann mithilfe der folgenden Formel der Expressionsunterschied zwischen Referenzgen und Zielgen berechnet werden:

$$\text{Ratio} = \frac{E_{\text{Zielgen}}^{Ct_{\text{Kontrolle}} - Ct_{\text{Behandlung}}}}{E_{\text{Referenzgen}}^{Ct_{\text{Kontrolle}} - Ct_{\text{Behandlung}}}}$$

Zwei Werte wurden mithilfe der ROUT - Methode von GraphPad Prism 5 aus dem TfR1 Datensatz entfernt (Motulsky und Brown 2006).

Tab 5: Ausreißer Datensatz PCR:

Gen	INS1	INS2	GRX5	TfR1	FTL	IRP1
<b>Versuchsdurchläufe</b>	3	3	3	3	3	3
<b>Gesamtwerte</b>	72	72	72	70	72	72
<b>Ausreißer</b>	0	0	0	2	0	0

## 2.2.7 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mithilfe von GraphPad Prism 5 durchgeführt. Mittels Shapiro-Wilk Test wurden die Daten auf ihre Normalverteilung als Basis für die weitere statistische Auswertung geprüft. Die Analysen erfolgten dann mittels der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und anschließend als Post-Hoc Test der Tukey-, Sidak- oder Dunnetts-Test verwendet. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Die jeweiligen Signifikanzstufen werden als \*: p <0,05, \*\*: p <0,01, \*\*\*: p <0,001, \*\*\*\*: p <0,0001 angegeben.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 MTT

#### 3.1.1 Ölsäure senkte die Viabilität der MIN6 Zellen

Durch die Behandlung mit 3 mM Ölsäurekonzentration verringerte sich unter Einfluss von 3 mM Glukose die metabolische Aktivität der MIN6 Zellen im Vergleich zu 0 mM Ölsäure ( $p < 0,0001$ ). Derselbe Effekt ließ sich auch bei zusätzlicher Exposition gegenüber des Zytokinmixes ( $p = 0,0002$ ) beobachten. Außerdem ließ sich eine tendenzielle Verringerung der metabolischen Aktivität durch 1,5 mM Ölsäure ohne Zytokinmix ( $p = 0,1995$ ) und eine signifikante Verringerung bei zusätzlicher Exposition mit dem Zytokinmix beobachten ( $p = 0,0432$ ). Die Ergebnisse unter Exposition von 3 mM Glukose sind in Abbildung 2 dargestellt.

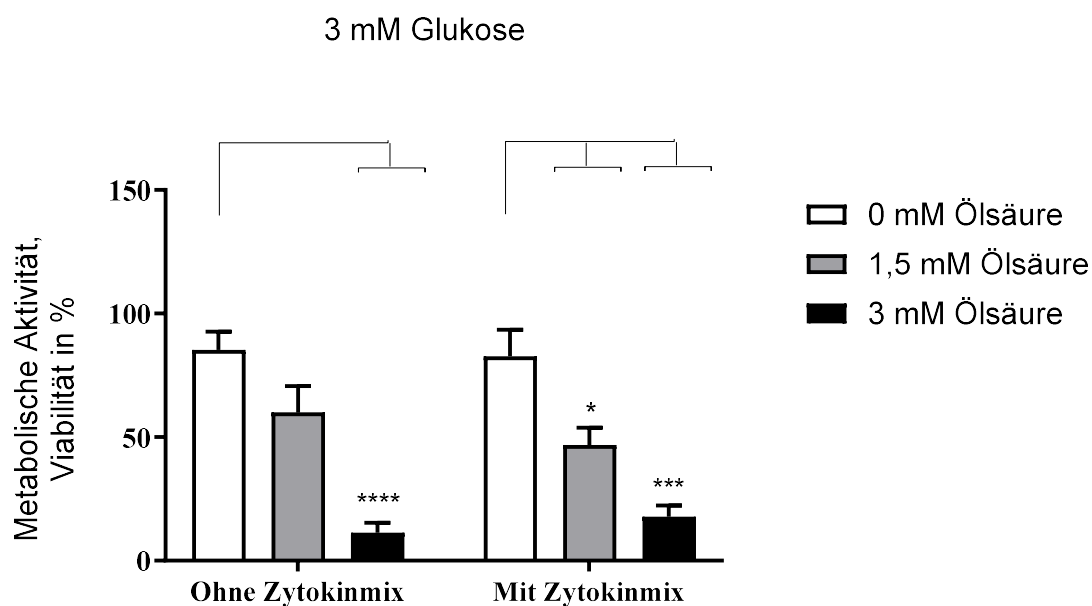


Abbildung 2: Metabolische Aktivität der MIN6 Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Die metabolische Aktivität verringert sich durch Ölsäure konzentrationsabhängig sowohl mit, als auch ohne Zytokinmix. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der metabolischen Aktivität eines nicht mit Stressoren behandelten Standards gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.4). N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Tukey's multiple comparisons test)

Durch Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure verringerte sich unter Einfluss von 16 mM Glukose die metabolische Aktivität signifikant ( $p= 0,0012$ ). Derselbe Effekt ließ sich auch bei zusätzlicher Exposition gegenüber des Zytokinmixes ( $p= 0,0015$ ) beobachten. Außerdem ließ sich unter Einfluss des Zytokinmixes eine Verringerung der metabolischen Aktivität bei einer Konzentration von 1,5 mM Ölsäure beobachten ( $p= 0,1087$ ). Ohne Zytokinmix ließ sich bei 1,5 mM Ölsäure ebenfalls eine tendenzielle Verringerung beobachten ( $p= 0,5691$ ). Die Ergebnisse unter Exposition von 16 mM Glukose sind in Abbildung 3 dargestellt.

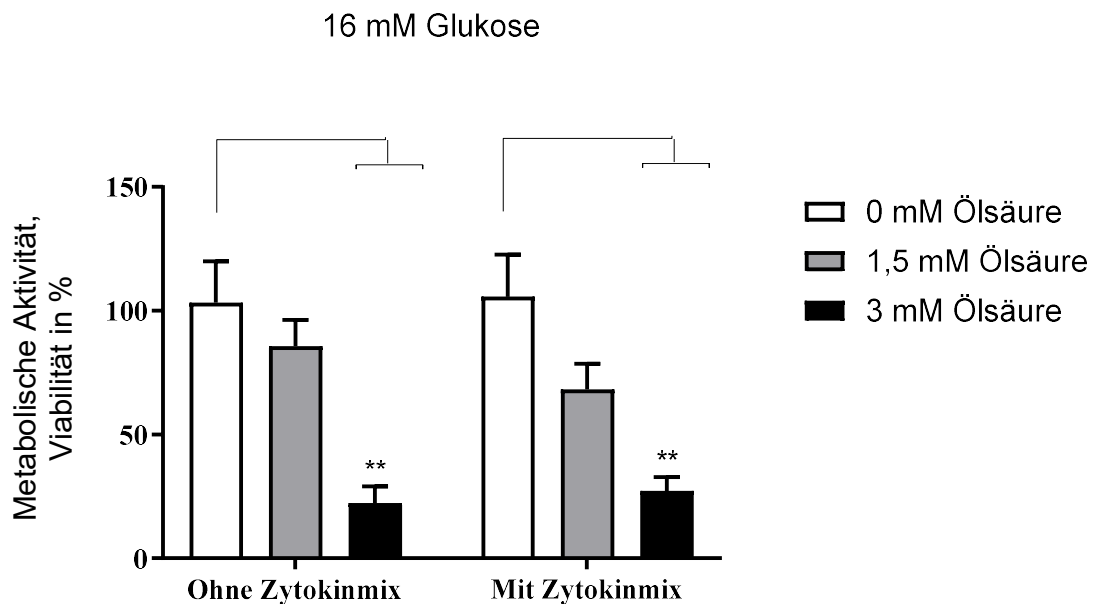


Abbildung 3: Metabolische Aktivität der MIN6 Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es lässt sich eine konzentrationsabhängige Verringerung der metabolischen Aktivität durch Ölsäure erkennen. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der metabolischen Aktivität eines nicht mit Stressoren behandelten Standards gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.4). N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Tukey's multiple comparisons test)

### 3.1.2 Glukose steigerte die metabolische Aktivität

Unter Exposition gegenüber 16 mM Glukose stieg die metabolische Aktivität der MIN6 Zellen nicht-signifikant sowohl bei 0 mM Ölsäure von 85,35 % ( $\pm$  2,595 % Standardfehler) auf 103,3 % ( $\pm$  5,884 % Standardfehler) ( $p= 0,4590$ ) als auch bei 1,5 mM Ölsäure von 59,94 % ( $\pm$  3,804 Standardfehler) auf 85,74 % ( $\pm$  3,732 % Standardfehler) ( $p= 0,2816$ ) (Siehe Abbildung 4).

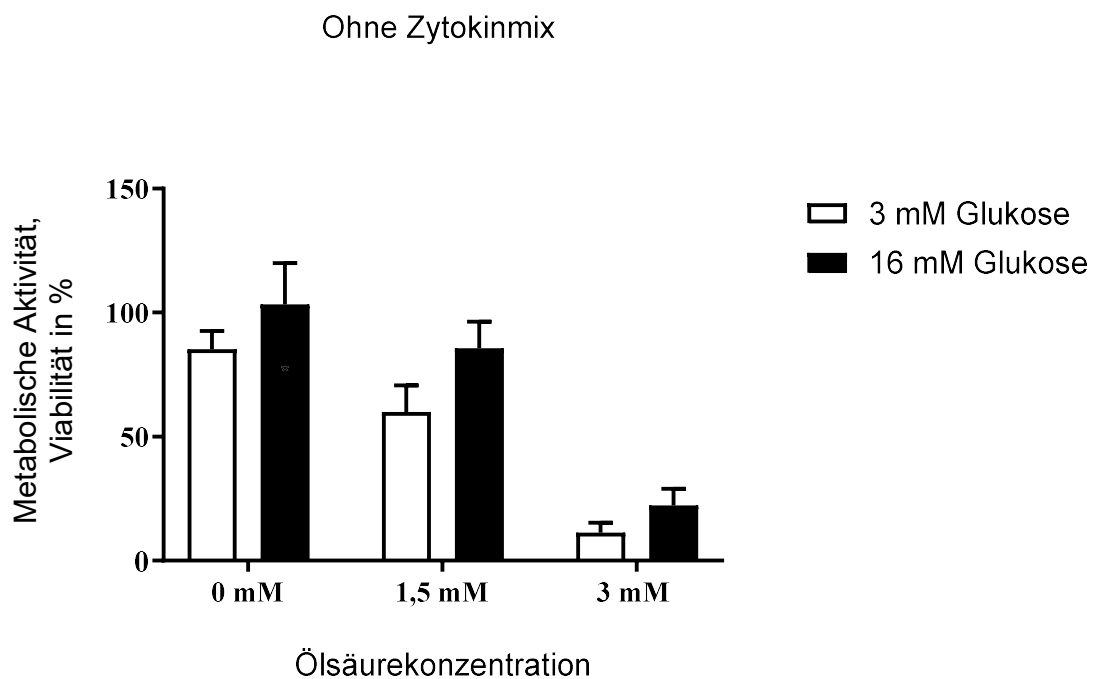


Abbildung 4: Metabolischen Aktivität der MIN6 Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM).

Es lässt sich erkennen, dass Glukose in allen beobachteten Zuständen einen nicht-signifikanten steigernden Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen hat. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der metabolischen Aktivität eines nicht mit Stressoren behandelten Standards gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.4).  $N= 3$ ; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

Unter Zugabe des Zytokinmixes erhöhten höhere Glukosekonzentrationen die metabolische Aktivität tendenziell. Unter Exposition von 0 mM Ölsäure und des Zytokinmixes wurde eine tendenzielle Steigerung der metabolischen Aktivität von 82,65 % ( $\pm 3,829$  % Standardfehler) bei 3 mM Glukose im Vergleich zu 105,7 % ( $\pm 5,99$  % Standardfehler) bei 16 mM Glukose beobachtet ( $p=0,2106$ ). Unter zusätzlichem Einfluss von 1,5 mM Ölsäure zum Zytokinmix zeigte sich ebenfalls eine tendenzielle Steigerung der metabolischen Aktivität von 46,81 % ( $\pm 2,469$  % Standardfehler) bei 3 mM Glukose im Vergleich zu 68,17 % ( $\pm 3,669$  % Standardfehler) bei 16 mM Glukose ( $p=0,4566$ ) (Siehe Abbildung 5). Glukose zeigte in den Experimenten also in jedem beobachteten Zustand einen steigernden Einfluss auf die metabolische Aktivität der MIN6 Zellen (Siehe Abbildung 4,5).

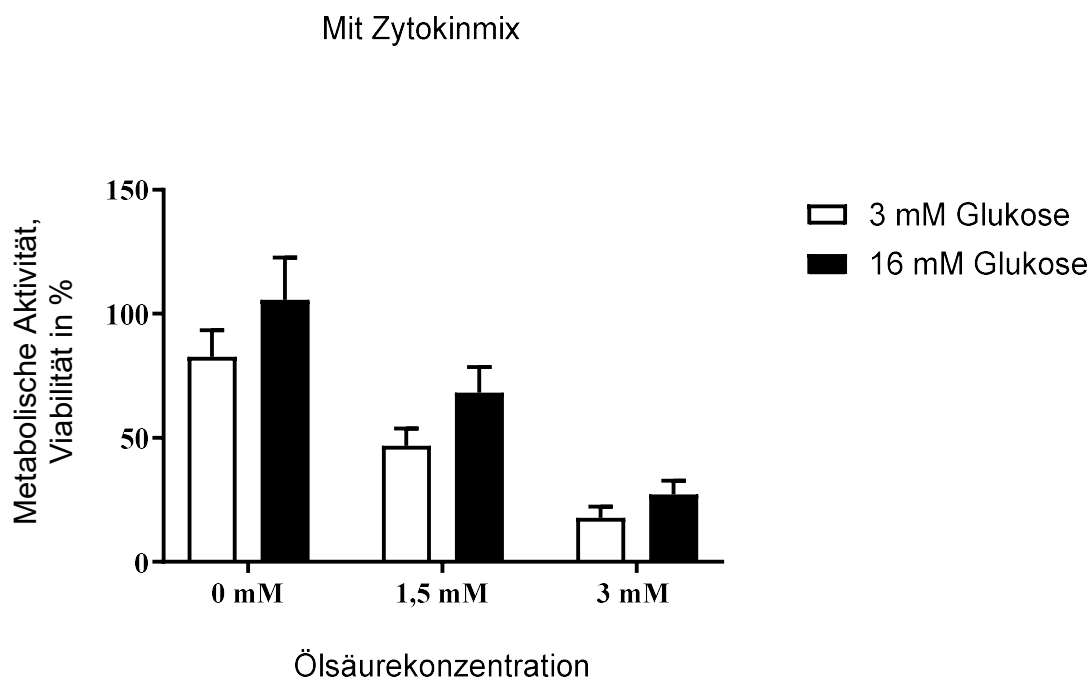


Abbildung 5: Metabolische Aktivität der MIN6 Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit einem Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ), Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM).

Es lässt sich erkennen, dass Glukose in allen beobachteten Zuständen einen nicht-signifikanten steigernden Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen hat. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der metabolischen Aktivität eines nicht mit Stressoren behandelten Standards gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.4). N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### 3.1.3 Zytokine zeigten keinen Einfluss auf die Viabilität der MIN6 Zellen

Die Exposition von MIN6 Zellen gegenüber dem Zytokinmix zeigte in keinem der Zustände eine signifikante Veränderung. Es lässt sich eine tendenzielle Verringerung der metabolischen Aktivität durch Zytokine bei 3 mM Glukose und 1,5 mM Ölsäure erkennen ( $p= 0,07868$ ) (Siehe Abbildung 6) und bei 16 mM Glukose und 1,5 mM Ölsäure ( $p= 0,6857$ ) (Siehe Abbildung 7).

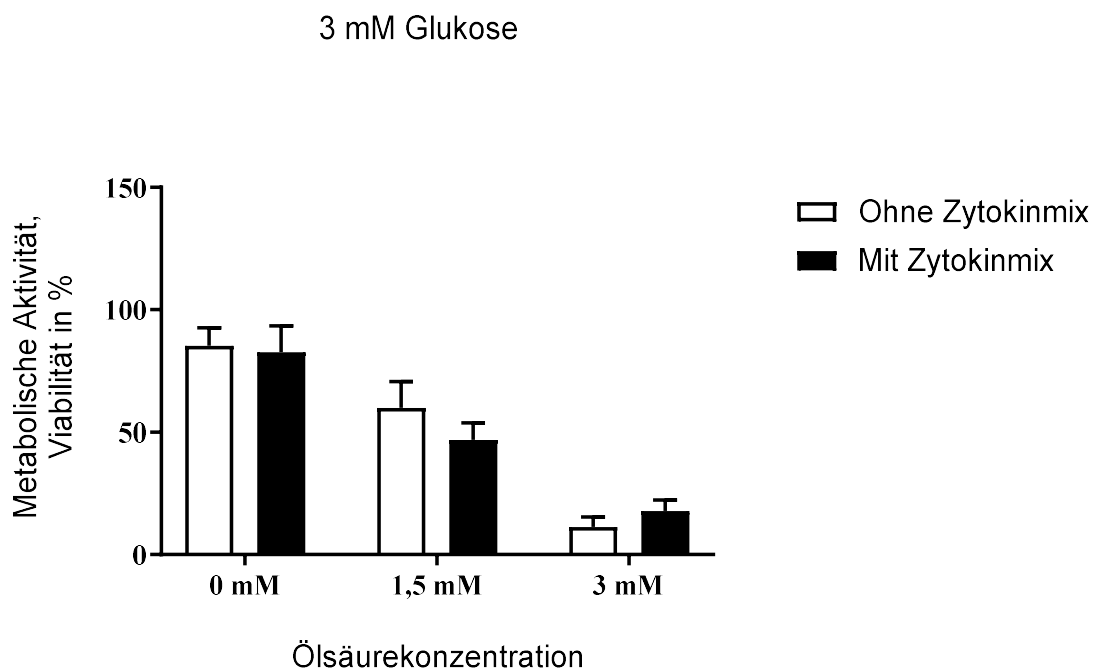


Abbildung 6: Metabolische Aktivität der MIN6 Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Lediglich bei Exposition mit 1,5 mM Ölsäure lässt sich eine tendenzielle Verringerung der metabolischen Aktivität durch den Zytokinmix beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der metabolischen Aktivität eines nicht mit Stressoren behandelten Standards gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.4). N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### 16 mM Glukose

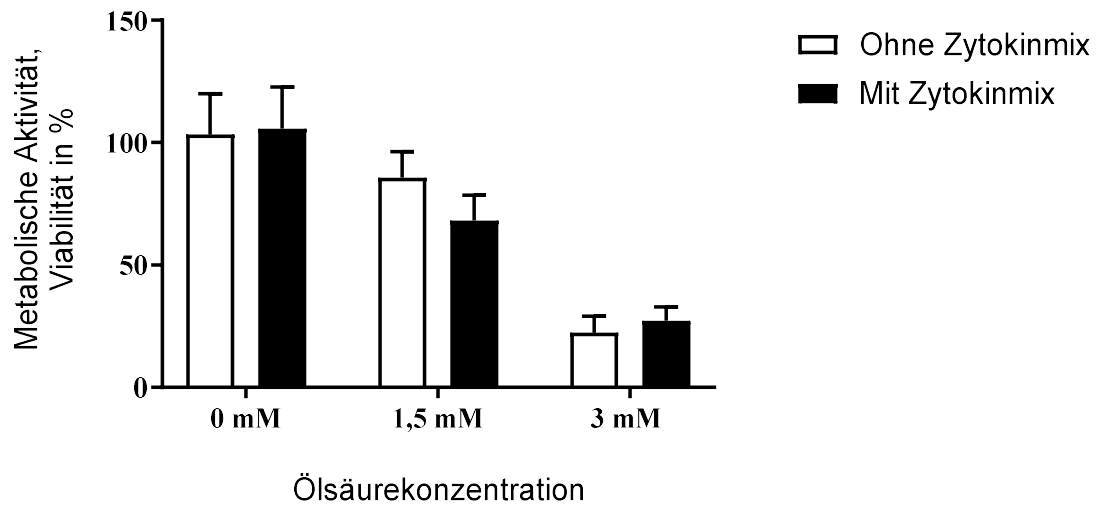


Abbildung 7: Metabolische Aktivität der MIN6 Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Es erfolgte eine Behandlung der Zellen mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Lediglich bei Exposition mit 1,5 mM Ölsäure lässt sich eine tendenzielle Verringerung der metabolischen Aktivität durch den Zytokinmix beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der metabolischen Aktivität eines nicht mit Stressoren behandelten Standards gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.4). N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

## 3.2 PCR

### 3.2.1 Ins1

#### 3.2.1.1 Ölsäure senkte die Expression von Ins1

Die Exposition der MIN6 Zellen gegenüber 3 mM Ölsäure senkte bei 3 mM Glukose die Expression des Ins1 Gens sowohl ohne Einfluss des Zytokinmixes ( $p < 0,0001$ ), als auch mit Einfluss des Zytokinmixes ( $p < 0,0001$ ). Die Konzentration von Ins1 mRNA verminderte sich unter Einfluss von 3 mM Ölsäure auf circa 35 % der ursprünglichen Expression (0 mM Ölsäure: 1,027; 3 mM Ölsäure: 0,359). Die Ergebnisse für die Exposition gegenüber 3 mM Glukose sind in Abbildung 8 dargestellt.

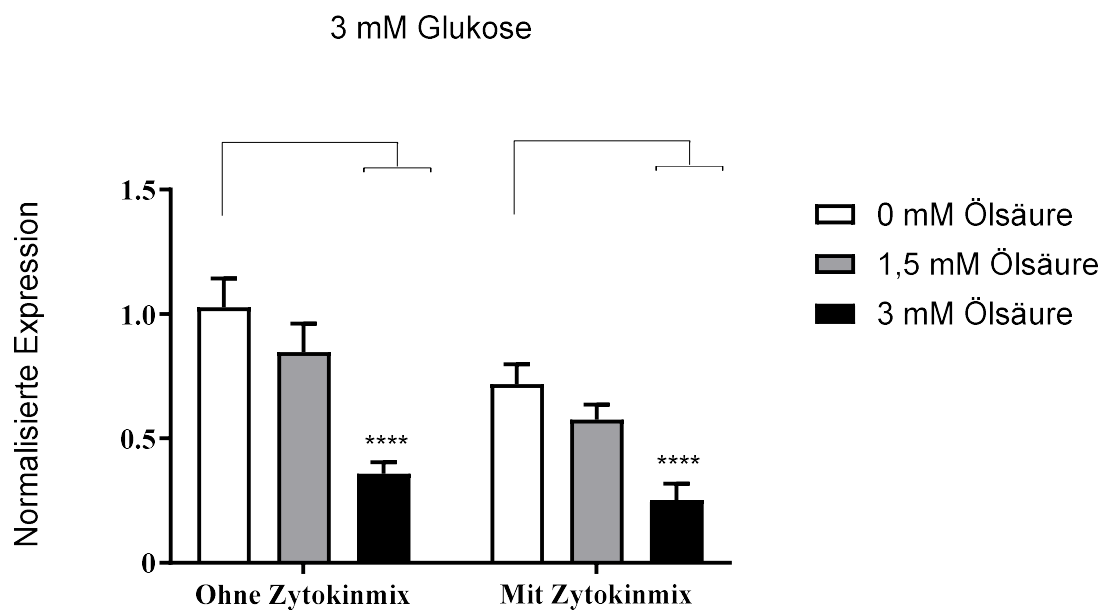


Abbildung 8: Expressionsunterschied von Ins1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Es lässt sich erkennen, dass Ölsäure die Expression von Ins1 konzentrationsabhängig reduziert. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Tukey's multiple comparisons test)

Unter Exposition von 16 mM Glukose zeigte sich durch 3 mM Ölsäure eine Verringerung der Expression von Ins1. Sowohl ohne zusätzliche Exposition mit dem Zytokinmix ( $p < 0,0001$ ), als auch mit Zytokinmix ( $p < 0,0001$ ). Eine Konzentration von 1,5 mM Ölsäure zeigte bei 16 mM Glukose in Kombination mit dem Zytokinmix ebenfalls einen signifikanten Abfall ( $p = 0,0038$ ). Die Ergebnisse unter Exposition von 16 mM Glukose sind in Abbildung 9 dargestellt.



Abbildung 9: Expressionsunterschied von Ins1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Es lässt sich erkennen, dass Ölsäure die Expression von Ins1 konzentrationsabhängig reduziert. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Tukey's multiple comparisons test)

### 3.2.1.2 Glukose zeigt keinen Einfluss auf die Ins1 Expression

Unter keiner der untersuchten Konditionen konnte ein signifikanter Einfluss von Glukose auf die Expression von Ins1 gemessen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 und 11 graphisch dargestellt.

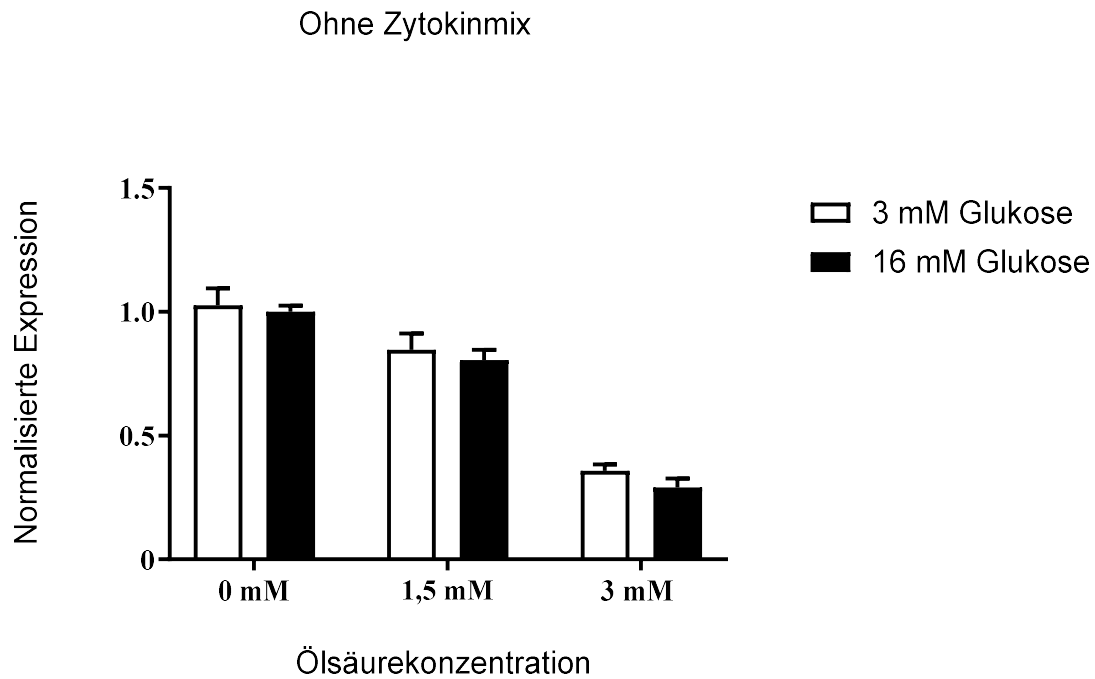


Abbildung 10: Expressionsunterschied von Ins1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM).

Glukose zeigt keinen Einfluss auf die Expression von Ins1. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### Mit Zytokinmix

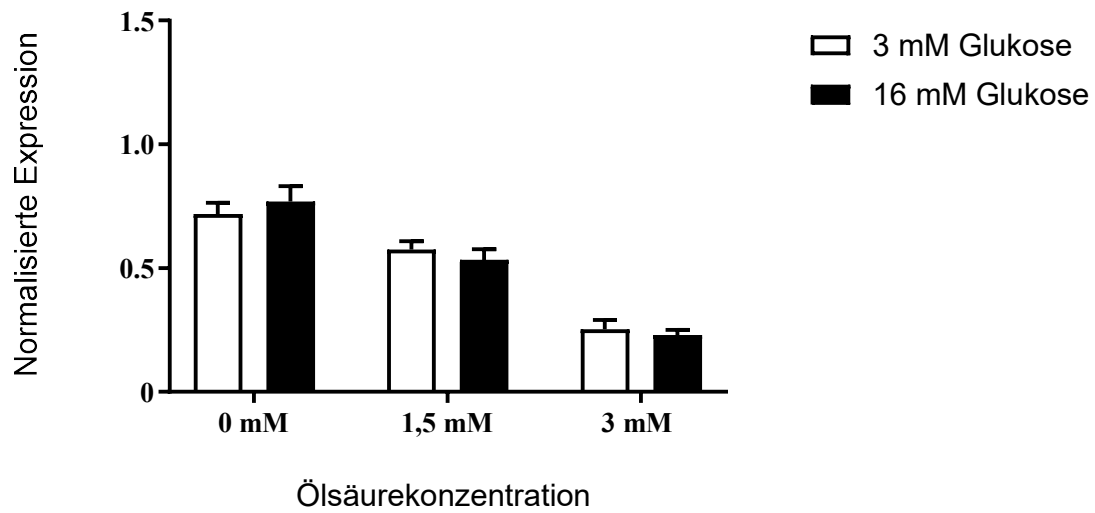


Abbildung 11: Expressionsunterschied von Ins1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit dem Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ) und verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Glukose zeigt keinen Einfluss auf die Expression von Ins1. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### 3.2.1.3 Der Zytokinmix senkte die Expression von Ins1

Der Zytokinmix verminderte bei einer Konzentration von 3 mM Glukose die Expression von Ins1 signifikant ( $p= 0,0023$ ). Unter Exposition mit 3 mM Glukose und 1,5 mM Ölsäure ließ sich eine signifikante Verminderung von Ins1 unter Einfluss des Zytokinmixes feststellen ( $p= 0,0062$ ). Bei hohen Ölsäurekonzentrationen schwächte sich der Effekt des Zytokinmixes ab und es ließ sich nur noch eine tendenzielle Verringerung von Ins1 erkennen ( $p= 0,3925$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 graphisch dargestellt.

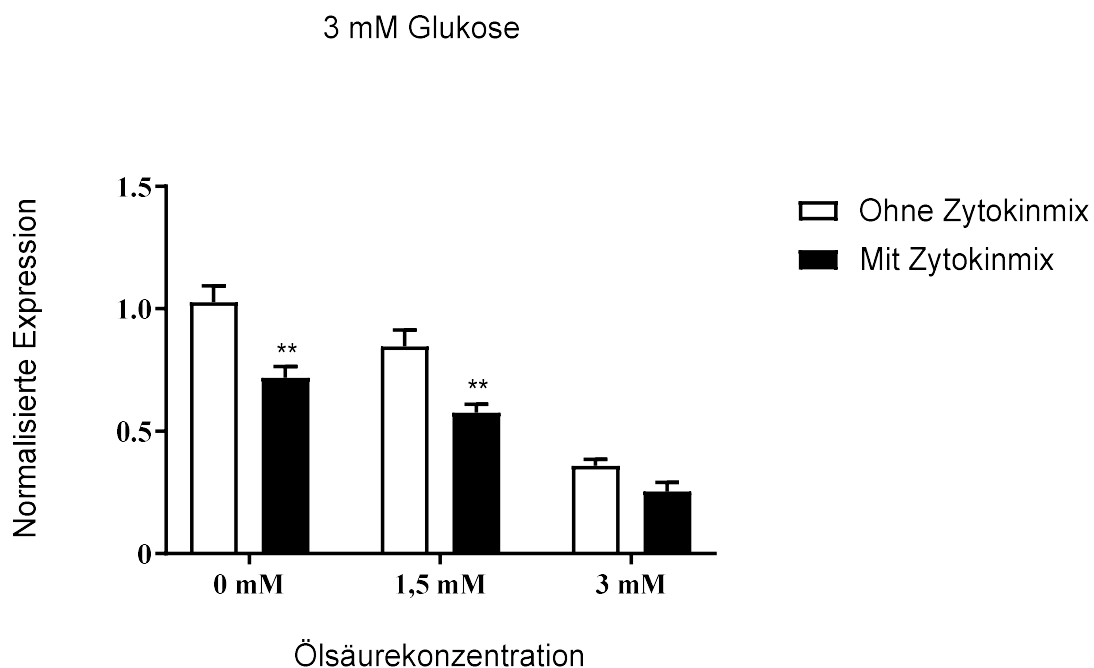


Abbildung 12: Expressionsunterschied von Ins1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Verminderung der Ins1 Expression durch den Zytokinmix bei Exposition gegenüber 0 mM und 1,5 mM Ölsäure. Abschwächung des Effekts bei hohen Ölsäurekonzentrationen. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

Auch bei Exposition gegenüber 16 mM Glukose zeigte sich durch den Zytokinmix eine signifikant verminderte Ins1 Expression. Sowohl bei 0 mM Ölsäure ( $p= 0,048$ ) als auch bei 1,5 mM Ölsäure ( $p= 0,0014$ ). Unter Einfluss von 3 mM Ölsäure schwächte sich der Effekt der Zytokine bei ohnehin bereits niedriger Expression von Ins1 ab, und es ließ sich lediglich eine tendenzielle Verringerung erkennen ( $p= 0,6623$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 graphisch dargestellt.

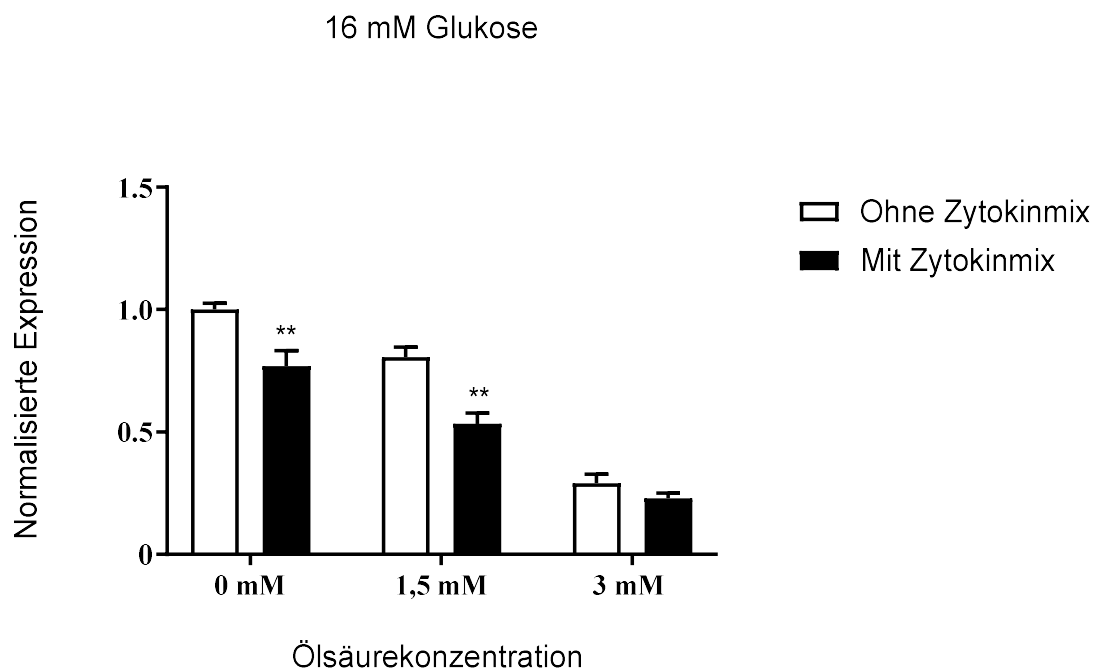


Abbildung 13: Expressionsunterschied von Ins1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Verminderung der Ins1 Expression durch den Zytokinmix bei Exposition gegenüber 0 mM und 1,5 mM Ölsäure. Abschwächung des Effekts bei hohen Ölsäurekonzentrationen. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

## 3.2.2 Ins2

### 3.2.2.1 Ölsäure senkte die Expression von Ins2

Die Exposition der MIN6 Zellen gegenüber 3 mM Ölsäure senkte bei 3 mM Glukose die Genexpression von Ins2. Dieser Effekt zeigte sich sowohl ohne Einfluss des Zytokinmixes ( $p < 0,0001$ ) als auch mit Einfluss des Zytokinmixes ( $p < 0,0001$ ). Die Konzentration der Ins2 mRNA verminderte sich unter Einfluss von 3 mM Ölsäure deutlich, unter Einfluss von 3 mM Glukose ohne Zytokinexposition zum Beispiel auf circa 5 % der ursprünglichen Expression. Die Exposition der MIN6 Zellen gegenüber 1,5 mM Ölsäure zeigte eine tendenzielle Verminderung der Expression (Ohne Zytokinmix:  $p = 0,1039$ ; Mit Zytokinmix:  $p = 0,3128$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

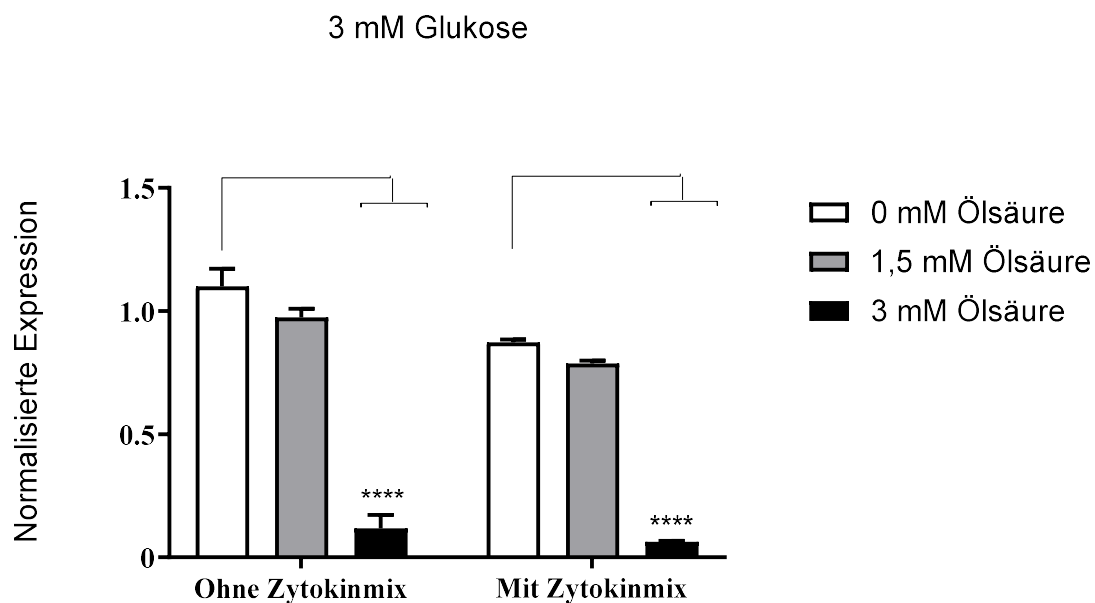


Abbildung 14: Expressionsunterschied von Ins2 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Es lässt sich eine konzentrationsabhängige Verminderung der Exposition von Ins2 durch Ölsäure beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Tukey's multiple comparisons test)

Unter Einfluss von 16 mM Glukose ließ sich erneut eine signifikante Verringerung der Expression von Ins2 durch hohe Ölsäurekonzentrationen (3 mM) feststellen. Dieser Effekt zeigte sich sowohl ohne zusätzliche Exposition mit dem Zytokinmix ( $p < 0,0001$ ), als auch mit Zytokinmix ( $p < 0,0001$ ). Eine Konzentration von 1,5 mM Ölsäure zeigte bei 16 mM Glukose mit Zytokinmix einen signifikanten Abfall ( $p = 0,0014$ ) und ohne Zytokinmix einen tendenziellen Abfall ( $p = 0,5489$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

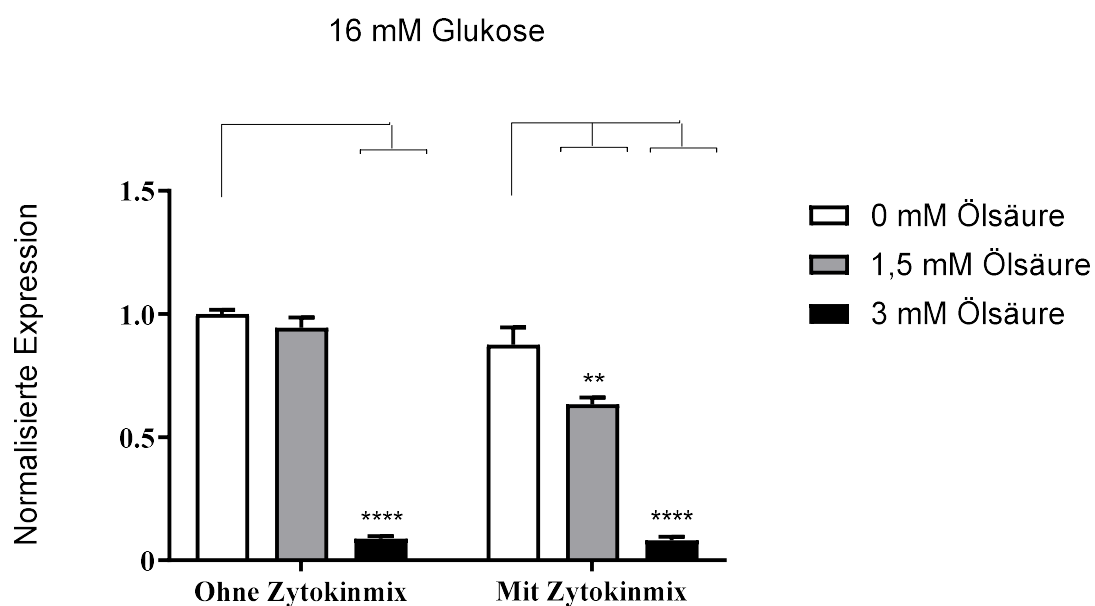


Abbildung 15: Expressionsunterschied von Ins2 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Es lässt sich eine konzentrationsabhängige Verminderung durch Ölsäure auf die Exposition von Ins2 beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Tukey's multiple comparisons test)

### 3.2.2.2 Glukose senkte die Ins2 Expression unter Zytokineinfluss

Ein eindeutiger Einfluss von Glukose auf die Expression von Ins2 ließ sich nicht beobachten. Es ließen sich Zustände beobachten, in denen Glukose die Ins2 Expression verringerte und andere Zustände, in denen sich kein Effekt durch Glukose zeigte.

Unter Einfluss von 0 mM Ölsäure zeigte sich eine tendenzielle Verringerung der Ins2 Expression durch 16 mM Glukose ( $p=0,3354$ ) (Siehe Abbildung 16). Außerdem zeigte sich unter Einfluss von 1,5 mM Ölsäure und des Zytokinmixes eine Verringerung der Expression von INS1 durch 16 mM Glukose ( $p=0,0165$ ) (Siehe Abbildung 17). In den restlichen Zuständen ließen sich keine signifikanten Veränderungen durch unterschiedliche Glukoseexposition feststellen.

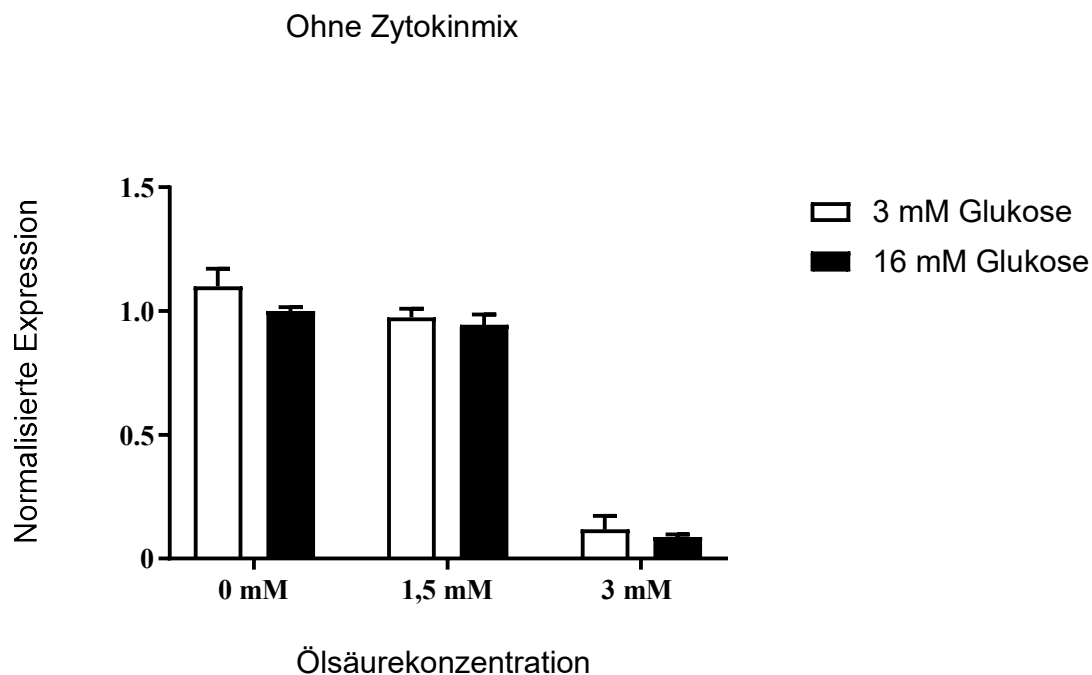


Abbildung 16: Expressionsunterschied von Ins2 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM).

Es zeigt sich eine tendenzielle Verringerung der Ins2 Expression durch 16 mM Glukose. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### Mit Zytokinmix

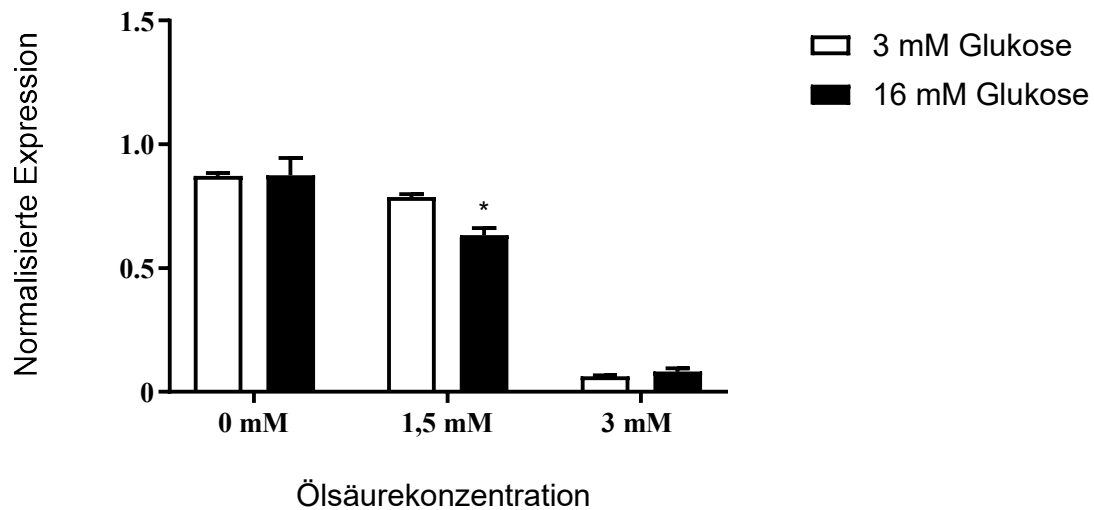


Abbildung 17: Expressionsunterschied von Ins2 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit dem Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ) und verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Es zeigt sich eine signifikante Verringerung der Exposition von Ins2 durch Glukose bei zusätzlicher Exposition gegenüber 1,5 mM Ölsäure. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### 3.2.2.3 Der Zytokinmix verringerte die Expression von Ins2

Der Zytokinmix verminderte bei einer Konzentration von 3 mM Glukose die Expression von Ins2 signifikant. Dieser Effekt ließ sich sowohl bei zusätzlicher Exposition mit 0 mM Ölsäure ( $p = 0,0048$ ) als auch mit 1,5 mM Ölsäure ( $p = 0,0176$ ) beobachten. Bei einer Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure schwächte sich der Effekt des Zytokinmixes ab, und es ließ sich nur noch eine nicht-signifikante Verringerung der Genexpression von Ins2 beobachten ( $p = 0,7146$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.

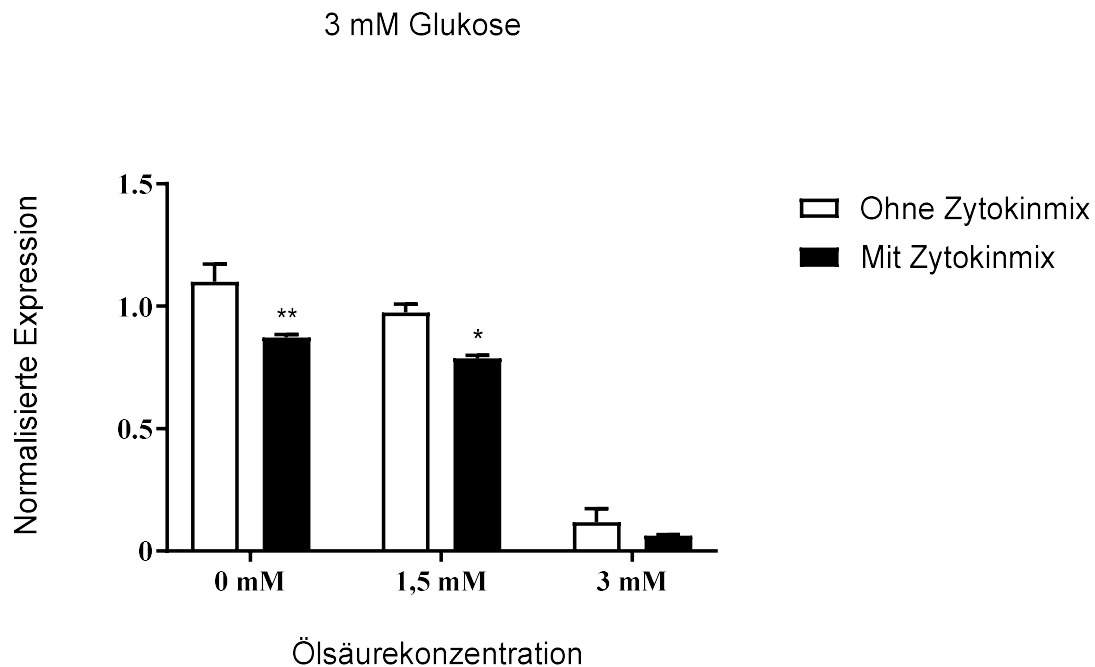


Abbildung 18: Expressionsunterschied von Ins2 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Es lässt sich eine signifikante Verringerung der Expression von Ins2 durch den Zytokinmix beobachten. Dieser Effekt schwächt sich bei zusätzlicher Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure ab. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

Auch bei Exposition gegenüber 16 mM Glukose verringerte der Zytokinmix die Expression von Ins2. Bei Exposition gegenüber 0 mM Ölsäure zeigte sich eine tendenzielle Verringerung durch den Zytokinmix ( $p=0,0999$ ). Unter Exposition von 1,5 mM Ölsäure zeigte sich ebenfalls eine signifikante Verringerung der Ins2 Expression ( $p=0,0002$ ). Bei einer Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure schwächte sich der Effekt ab, und es ließ sich kein signifikanter Effekt des Zytokinmixes mehr beobachten ( $p=0,9990$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

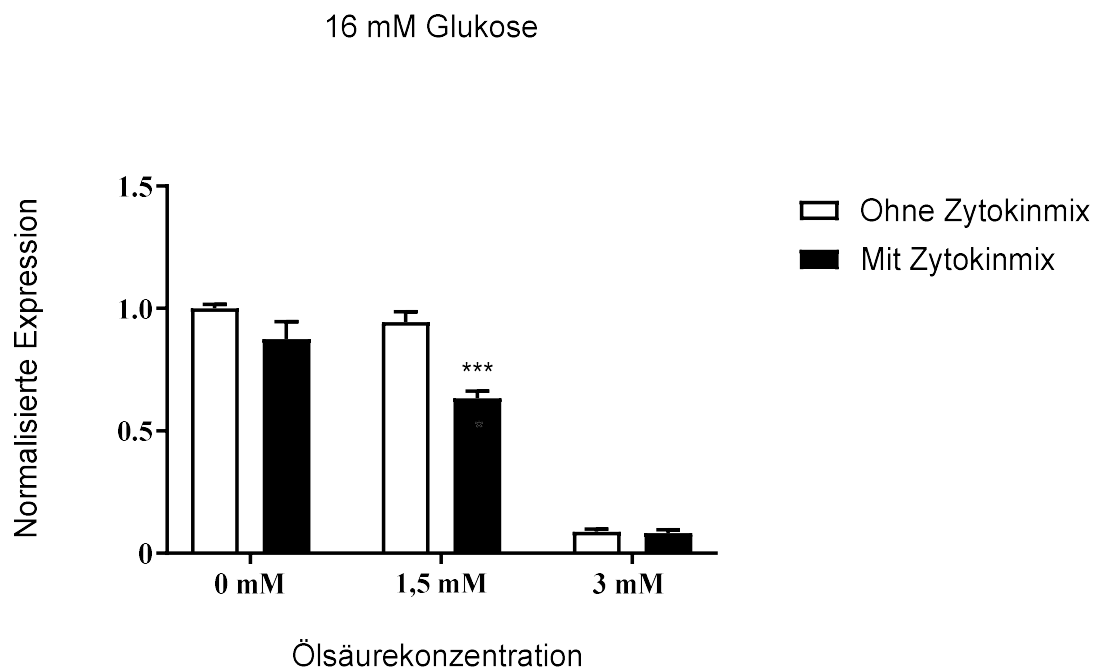


Abbildung 19: Expressionsunterschied von Ins2 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Die Expression von Ins2 zeigt sich durch den Zytokinmix bei 0 mM Ölsäure tendenziell und bei 1,5 mM Ölsäure signifikant erniedrigt. Bei zusätzlicher Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure lässt sich der Effekt des Zytokinmixes nicht mehr beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### 3.2.3 Glrx5

#### 3.2.3.1 Ölsäure senkte die Expression von Glrx5 tendenziell

Ohne Einfluss des Zytokinmixes lässt sich eine nicht-signifikante konzentrationsabhängige Regulation der Genexpression von Glrx5 beobachten. Durch Exposition gegenüber 1,5 mM Ölsäure lässt sich eine nicht-signifikante Verringerung der Genexpression von Glrx5 beobachten ( $p= 0,6790$ ). Dieser nicht-signifikante Effekt nimmt bei Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure zu ( $p= 0,1282$ ). Unter Einfluss des Zytokinmixes lässt sich keine eindeutige Wirkung der Ölsäure mehr beobachten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

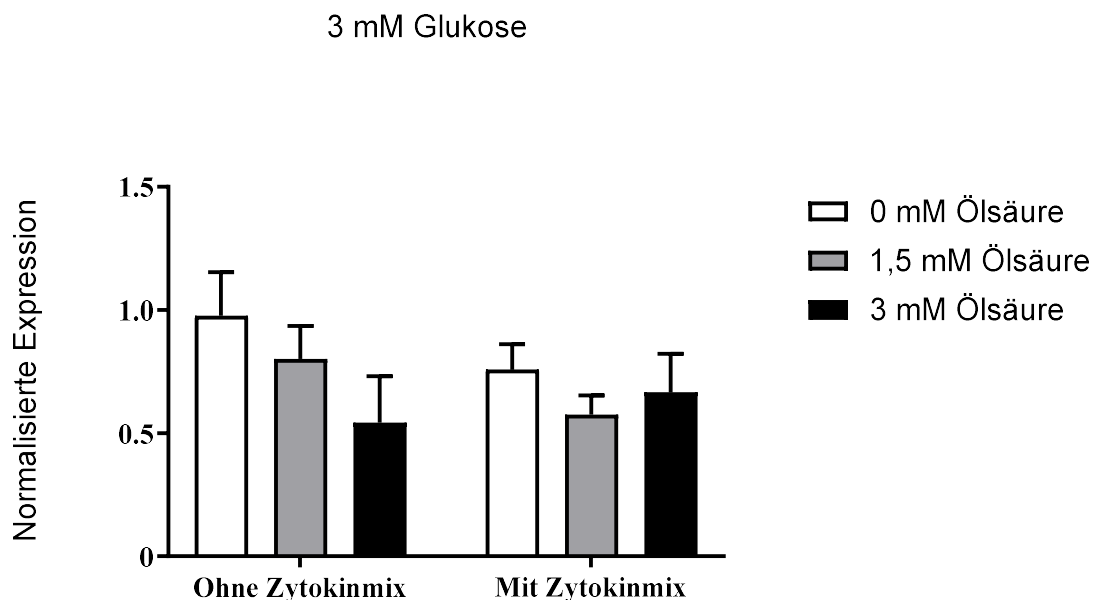


Abbildung 20: Expressionsunterschied von Glrx5 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Es zeigt sich eine tendenzielle, konzentrationsabhängige Reduktion der Glrx5 Konzentration ohne Exposition mit dem Zytokinmix. Bei zusätzlicher Exposition mit dem Zytokinmix lässt sich kein konzentrationsabhängiger Effekt von Ölsäure beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N=3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Tukey's multiple comparisons test)

Bei erhöhten Glukosekonzentrationen (16 mM) zeigte sich ebenfalls eine Verringerung der Genexpression von Glrx5 durch Ölsäure. Bei Exposition gegenüber 1,5 mM Ölsäure zeigte sich eine tendenzielle Verringerung der Expression von Glrx5 ( $p= 0,3015$ ). Bei Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure zeigte sich ebenfalls eine tendenzielle Verringerung der Glrx5 Expression ( $p= 0,3278$ ). Unter Einfluss des Zytokinmixes lässt sich keine eindeutige Wirkung der Ölsäure mehr beobachten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

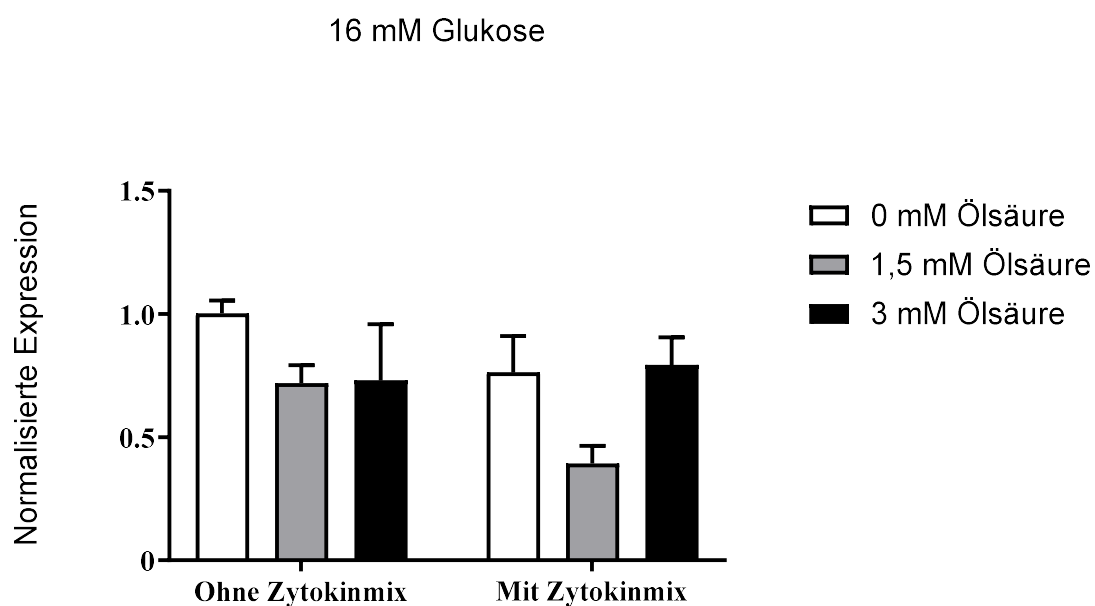


Abbildung 21: Expressionsunterschied von Glrx5 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Es zeigt sich eine tendenzielle Reduktion der Expression von Glrx5 durch 1,5 mM Ölsäure ohne Exposition mit dem Zytokinmix. Bei zusätzlicher Exposition mit dem Zytokinmix lässt sich kein eindeutiger Effekt von Ölsäure beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Tukey's multiple comparisons test)

### 3.2.3.2 Glukose zeigte keinen Einfluss auf die Expression von Glrx5

Die Expression von Glrx5 unterschied sich im Experiment während der Exposition gegenüber 3 mM oder 16 mM Glukose nicht signifikant. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 und 23 dargestellt.

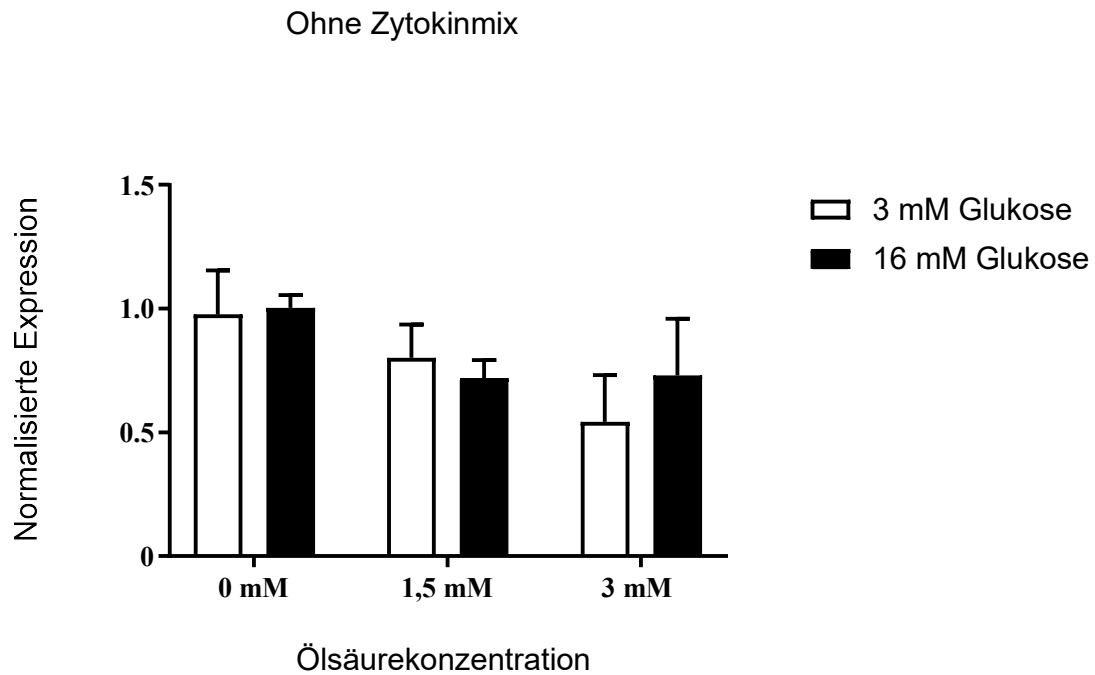


Abbildung 22: Expressionsunterschied von Glrx5 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM).

Es zeigt sich kein Einfluss von Glukose auf die Expression von Glrx5. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### Mit Zytokinmix

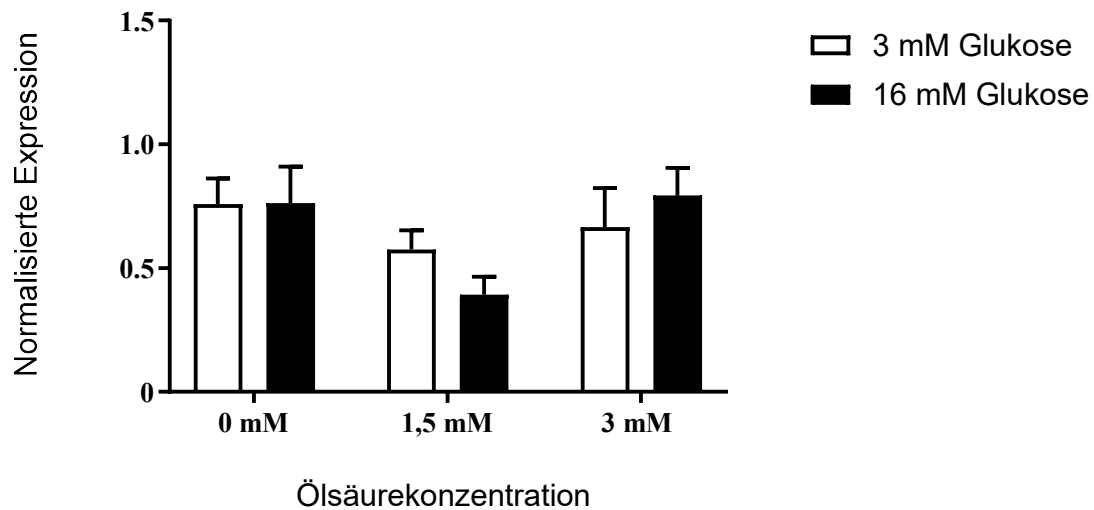


Abbildung 23: Expressionsunterschied von Glrx5 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit dem Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ) und verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Es zeigt sich kein Einfluss von Glukose auf die Expression von Glrx5. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### 3.2.3.3 Zytokine zeigten keinen Einfluss auf die Expression von Glrx5

Der Zytokinmix hatte im Experiment keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Glrx5. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 und 25 dargestellt.

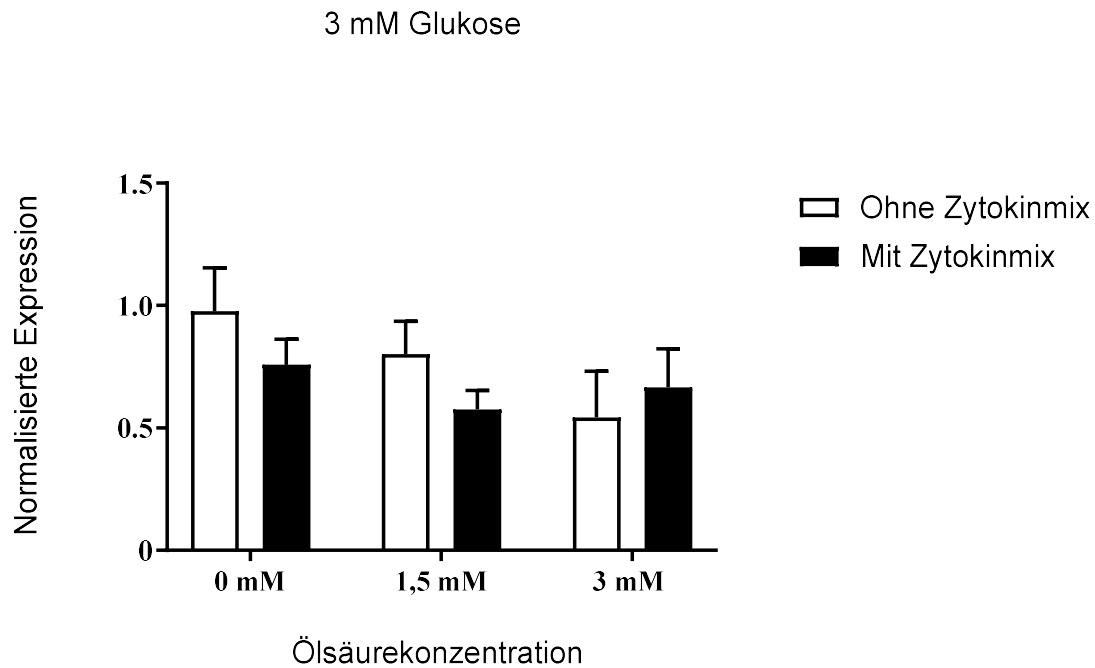


Abbildung 24: Expressionsunterschied von Glrx5 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss des Zytokinmixes auf die Expression von Glrx5. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

16 mM Glukose

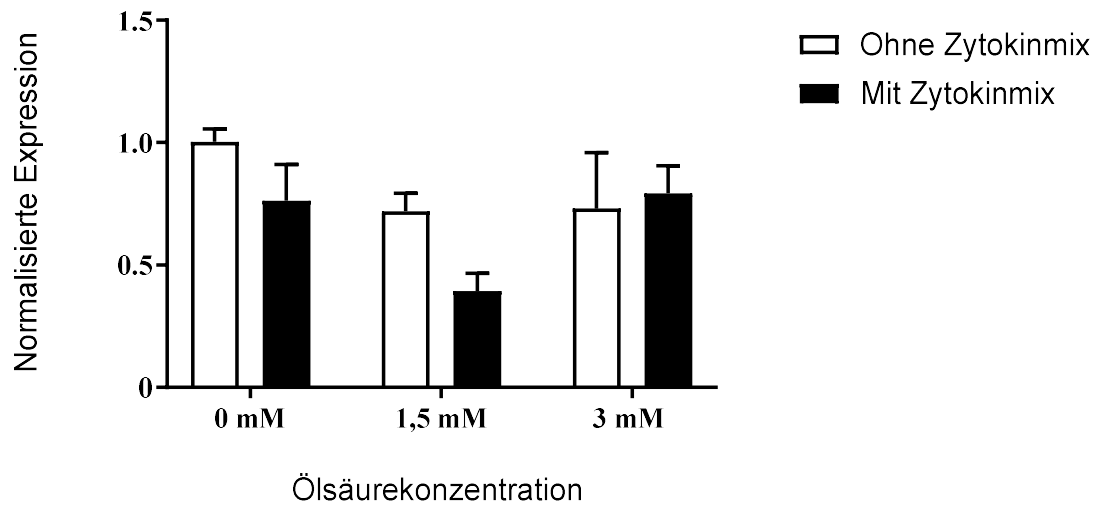


Abbildung 25: Expressionsunterschied von Glrx5 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss des Zytokinmixes auf die Expression von Glrx5. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### 3.2.4 FTL

#### 3.2.4.1 Ölsäure, Glukose und Zytokine zeigten keinen Einfluss auf die Expression von FTL

Verschiedene Konzentrationen von Ölsäure, Glukose und Zytokinen hatten im Experiment keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von FTL. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 und 27 dargestellt.

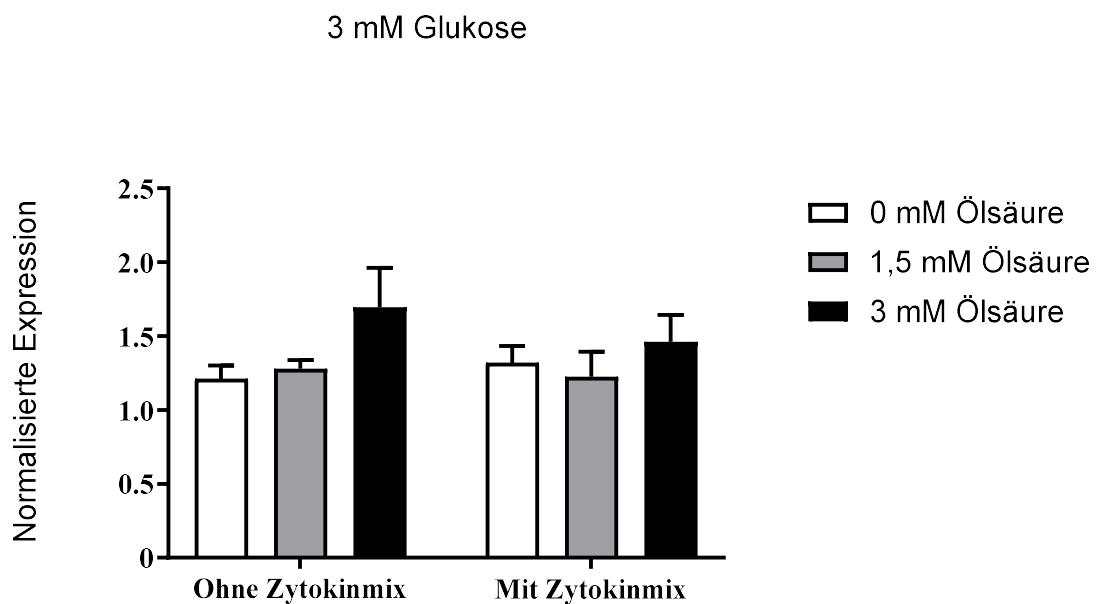


Abbildung 26: Expressionsunterschied von FTL im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Ölsäure, Glukose und Zytokine zeigen keinen Einfluss auf die Expression von FTL. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Tukey's multiple comparisons test)

16 mM Glukose

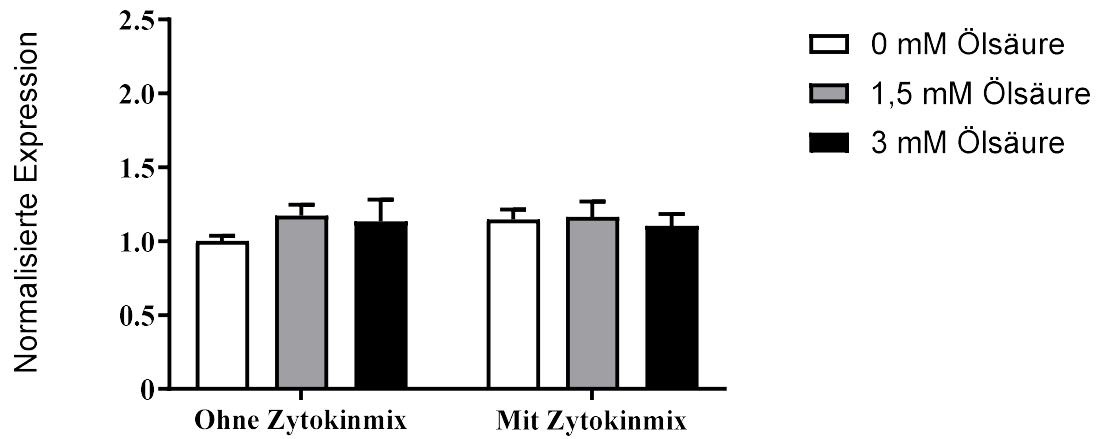


Abbildung 27: Expressionsunterschied von FTL im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Ölsäure, Glukose und Zytokine zeigen keinen Einfluss auf die Expression von FTL. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Tukey's multiple comparisons test)

### 3.2.5 IRP1

#### 3.2.5.1 Hohe Konzentrationen von Ölsäure und Glukose erhöhten die Expression von IRP1

Bei einer Glukosekonzentration von 3 mM zeigte sich durch Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure und dem Zytokinmix eine tendenzielle Erhöhung der IRP1 Expression ( $p=0,2760$ ). Ohne Exposition gegenüber des Zytokinmixes zeigte sich ein schwächerer Effekt (3 mM Ölsäure:  $p=0,6934$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt.

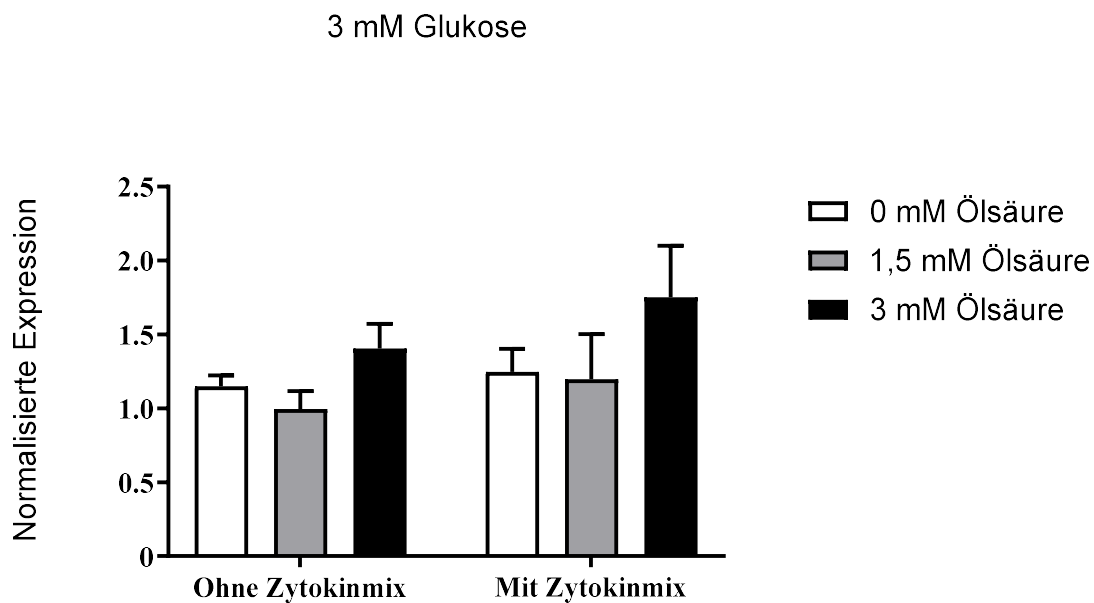


Abbildung 28: Expressionsunterschied von IRP1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Unter Exposition von 3 mM Ölsäure zeigt sich sowohl unter zusätzlicher Gabe des Zytokinmixes, als auch ohne eine tendenzielle Erhöhung der IRP1 Expression. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Tukey's multiple comparisons test)

Eine Konzentration von 3 mM Ölsäure bei 16 mM Glukose zeigte im Experiment eine erhöhte Expression von IRP1 im Vergleich zu 0 mM Ölsäure und 16 mM Glukose, sowohl ohne Zugabe des Zytokinmixes ( $p=0,001$ ) als auch mit Zugabe des Zytokinmixes ( $p=0,0133$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt.

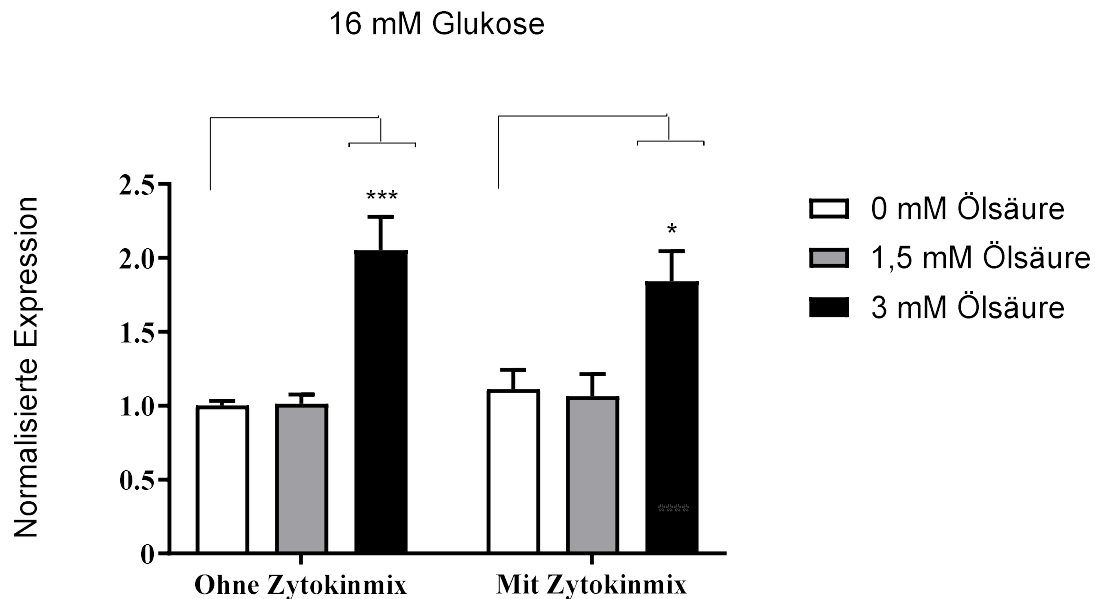


Abbildung 29: Expressionsunterschied von IRP1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Unter Exposition mit 16 mM Glukose und 3 mM Ölsäure zeigt sich sowohl unter Einfluss von Zytokinen oder ohne Zytokine eine signifikante Erhöhung der Expression von IRP1. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Tukey's multiple comparisons test)

### 3.2.5.2 Glukose steigerte bei hohen Ölsäurekonzentrationen die IRP1 Expression

Unter hohen Ölsäurekonzentrationen (3 mM) und Einfluss des Zytokinmixes steigerte die Exposition gegenüber 16 mM Glukose die Expression von IRP1 signifikant ( $p=0,0139$ ) (Siehe Abbildung 30). Bei Zugabe des Zytokinmixes schwächte sich dieser Effekt ab und es ließ sich keine signifikante Veränderung mehr beobachten (Siehe Abbildung 31).

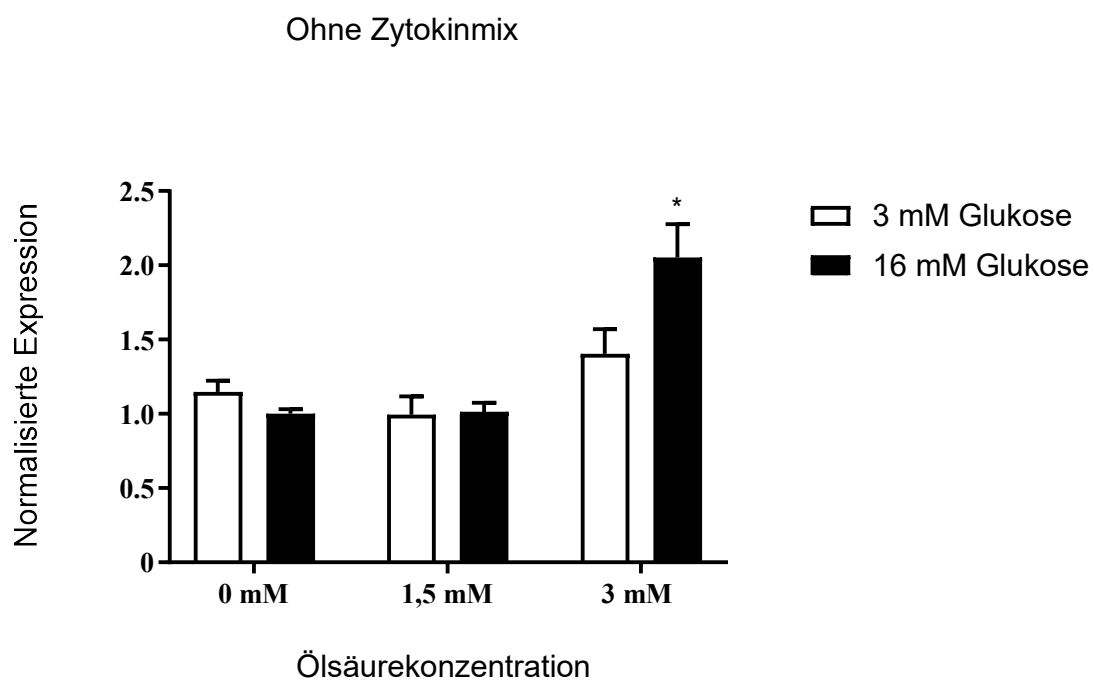


Abbildung 30: Expressionsunterschied von IRP 1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM).

Deutliche Erhöhung der Expression von IRP1 durch Glukose bei zusätzlicher Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### Mit Zytokinmix

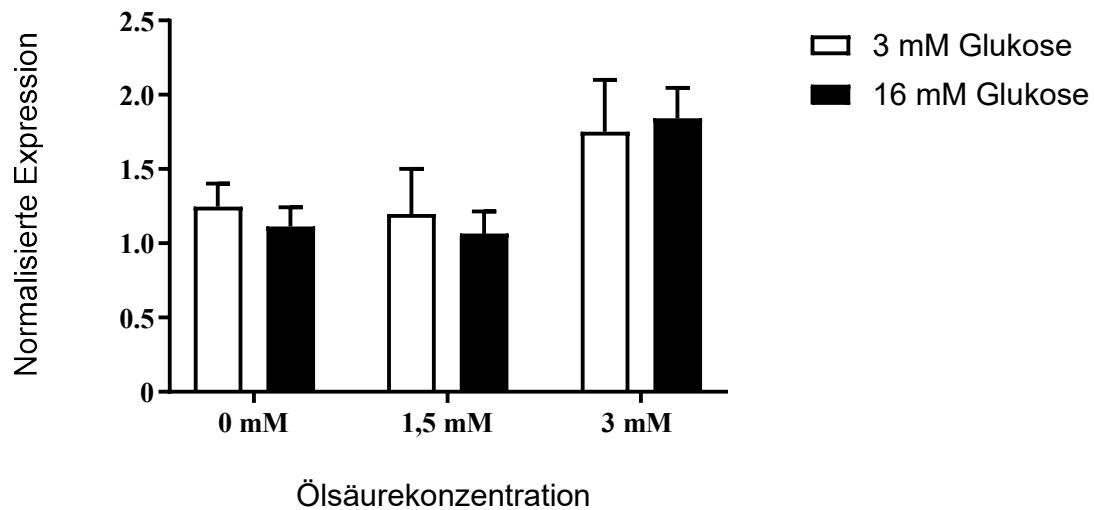


Abbildung 31: Expressionsunterschied von IRP 1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit dem Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ) und verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Kein signifikanter Einfluss von Glukose auf die Expression von IRP1 bei zusätzlicher Zytokinexposition. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### 3.2.5.3 Zytokine zeigten keinen Einfluss auf die Expression von IRP1

Durch die Zugabe des Zytokinmixes ließ sich keine Veränderung der Expression von IRP1 beobachten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 und 33 dargestellt.

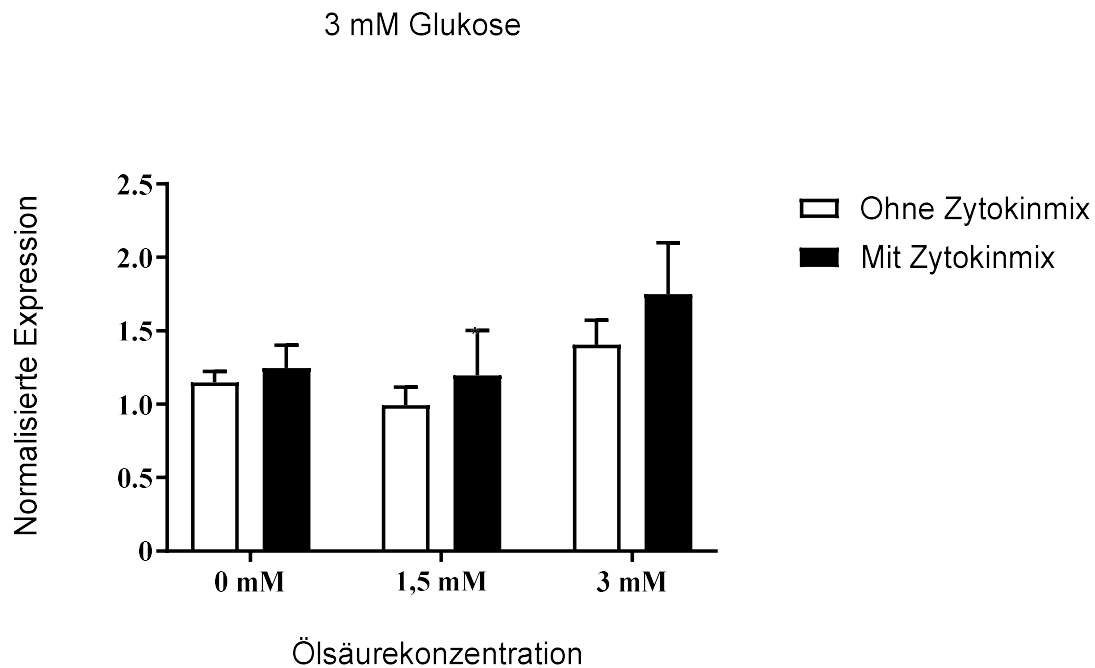


Abbildung 32: Expressionsunterschied von IRP1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Kein Einfluss von Zytokinen auf die Expression von IRP1. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

16 mM Glukose

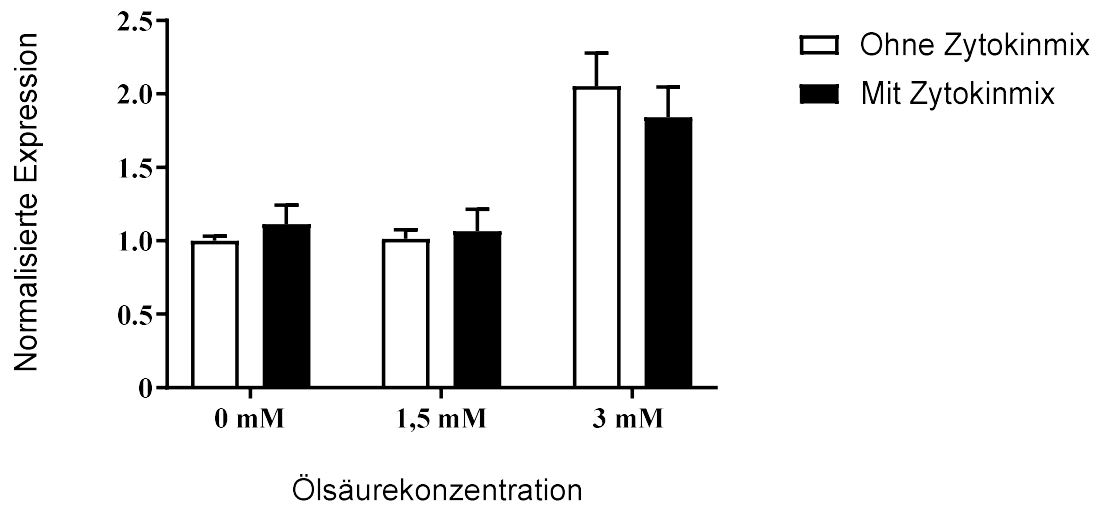


Abbildung 33: Expressionsunterschied von IRP1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es lässt sich kein Einfluss von Zytokinen auf die Expression von IRP1 beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### 3.2.6 TfR1

#### 3.2.6.1 Ölsäure zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von TfR1

Die Exposition der MIN6 Zellen gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure zeigte keine signifikante Veränderung der TfR1 Expression. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 und 35 dargestellt.

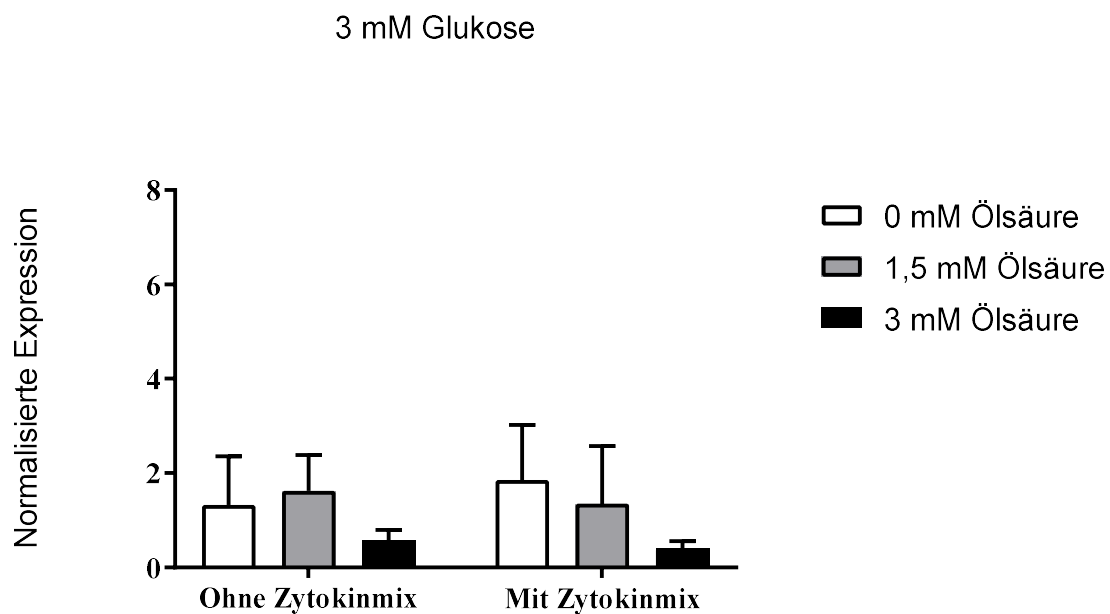


Abbildung 34: Expressionsunterschied von TfR1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss von Ölsäure auf die Expression von TfR1. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Tukey's multiple comparisons test)

16 mM Glukose

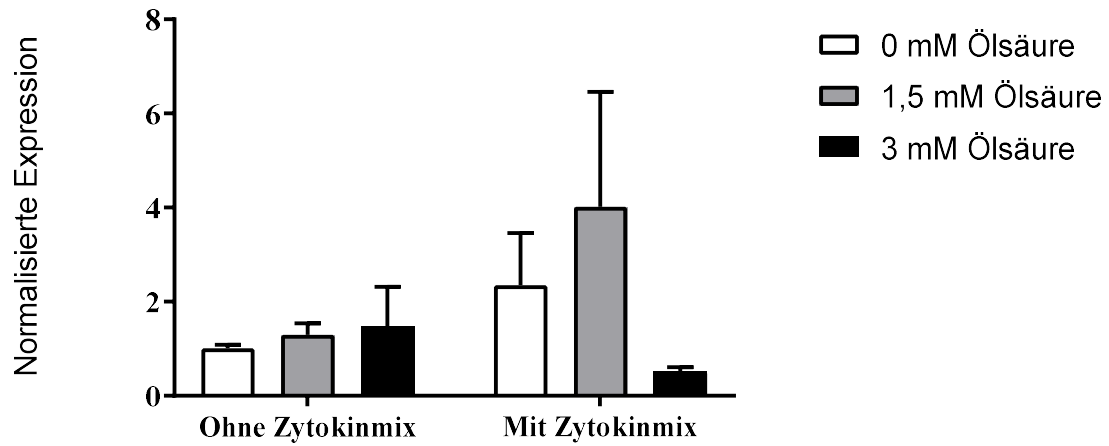


Abbildung 35: Expressionsunterschied von TFR1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss von Ölsäure auf die Expression von Tfr1. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Tukey's multiple comparisons test)

### 3.2.6.2 Glukose und Zytokine zeigten keinen Einfluss auf die Expression von TfR1

Die Expression von TfR1 zeigte sich in den Versuchen nicht signifikant durch verschiedene Glukosekonzentrationen oder die Exposition gegenüber dem Zytokinmix verändert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 36 und 37 abgebildet.

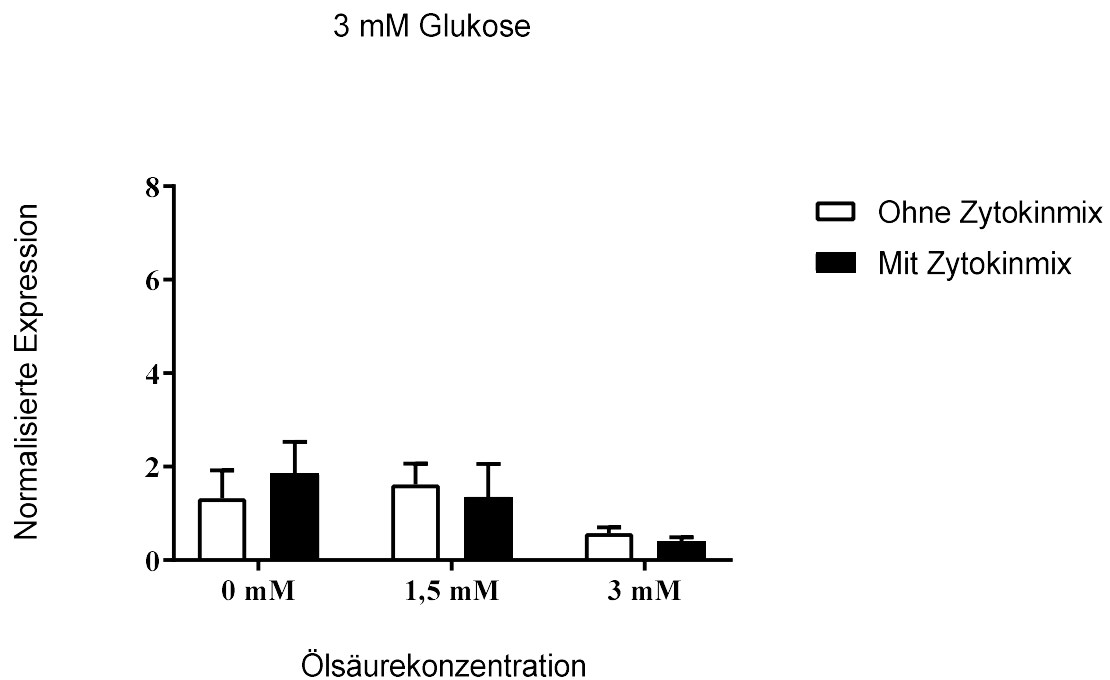


Abbildung 36: Expressionsunterschied von TfR1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Glukose und Zytokine zeigen keinen Einfluss auf die Expression von TfR1. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

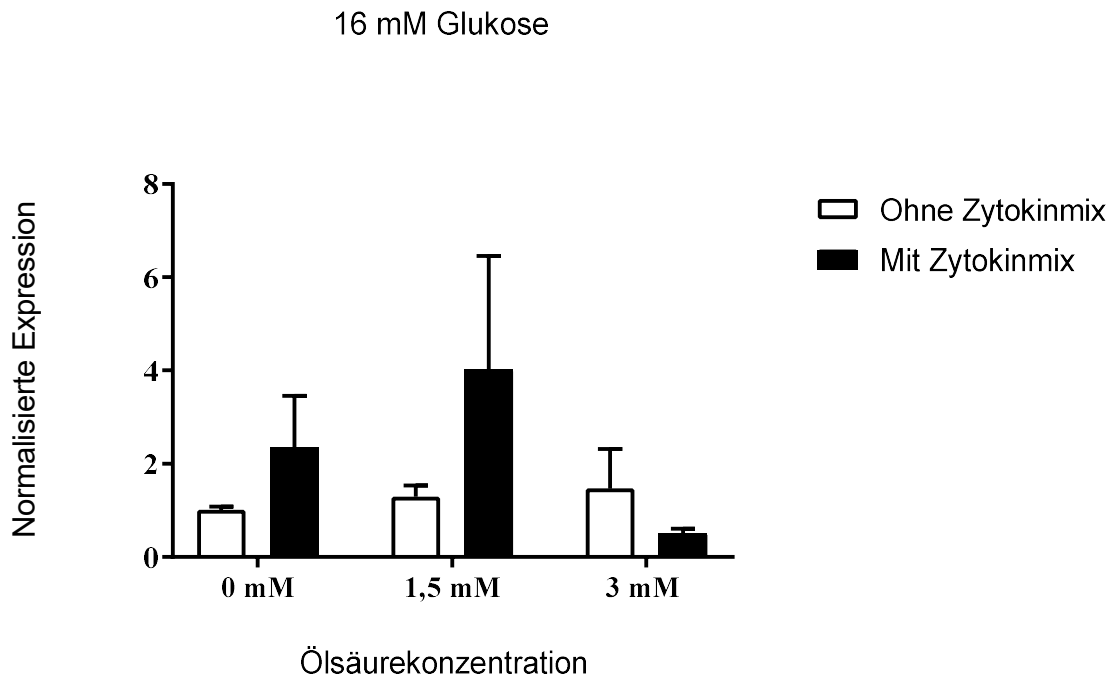


Abbildung 37: Expressionsunterschied von TFR1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Glukose und Zytokine zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Tfr1. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### 3.3 Proteinanalyse

#### 3.3.1 Insulin im Lysat

##### 3.3.1.1 Ölsäure verminderte die intrazelluläre Insulinkonzentration

In allen Versuchsdurchläufen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verringerung der intrazellulären Insulinkonzentration durch Ölsäure. Bei Exposition der MIN6 Zellen gegenüber 1,5 mM Ölsäure und 3 mM Glukose war die Konzentration von Insulin im Lysat mit 1,679  $\mu\text{g}$  Insulin/mg Protein ( $\pm$  0,1595  $\mu\text{g}$  Insulin/mg Protein Standardfehler) im Vergleich zu 0 mM Ölsäure mit 3,455  $\mu\text{g}$  Insulin/mg Protein ( $\pm$  0,5702  $\mu\text{g}$  Insulin/mg Protein Standardfehler) signifikant geringer ( $p= 0,0030$ ). Eine Exposition der MIN6 Zellen mit 3 mM Ölsäure sorgte für eine weitere Verminderung der Insulinkonzentration auf 0,666  $\mu\text{g}$  Insulin/mg Protein ( $\pm$  0,2064  $\mu\text{g}$  Insulin/mg Protein Standardfehler) ( $p=$

0,0001). Unter Zugabe des Zytokinmixes zeigte sich derselbe Effekt. Unter 1,5 mM Ölsäure betrug die Konzentration 1,119  $\mu\text{g}$  Insulin/mg Protein ( $\pm$  0,1023  $\mu\text{g}$  Insulin/mg Protein Standardfehler) statt 2,672  $\mu\text{g}$  Insulin/mg Protein ( $\pm$  0,3215  $\mu\text{g}$  Insulin/mg Protein Standardfehler) bei 0 mM Ölsäure ( $p=$  0,0074). Bei einer Exposition von 3 mM Ölsäure war die Konzentration mit 1,049  $\mu\text{g}$  Insulin/mg Protein ( $\pm$  0,2562  $\mu\text{g}$  Insulin/mg Protein Standardfehler) ebenfalls niedriger als bei 0 mM Ölsäure ( $p=$  0,0055). Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 dargestellt.

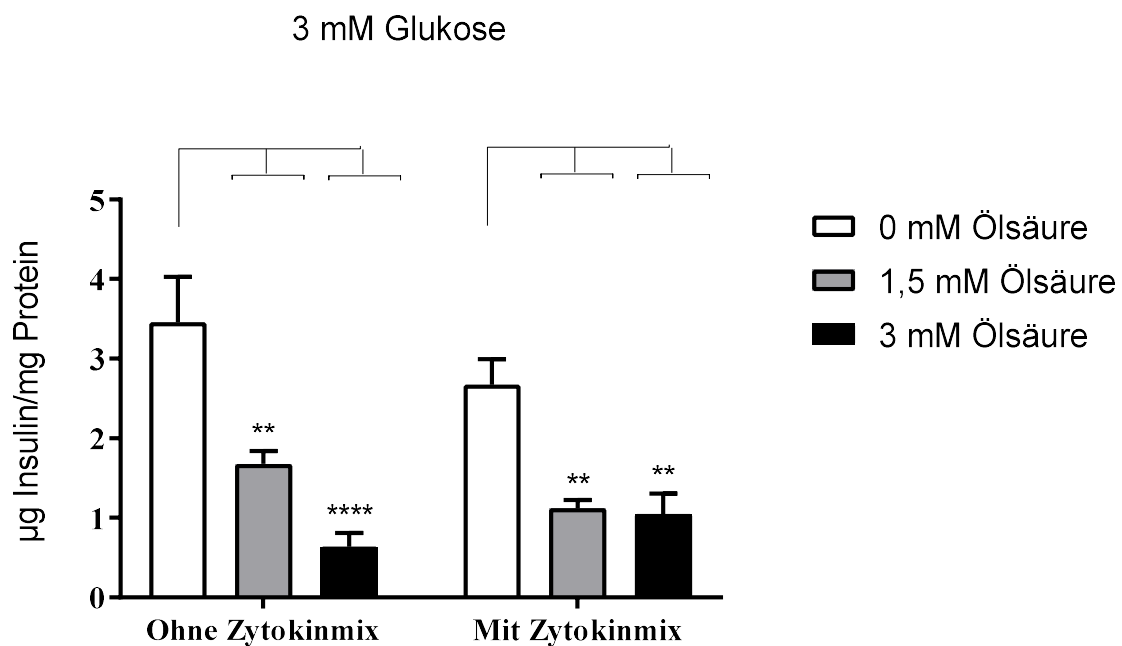


Abbildung 38: Konzentration von Insulin im Zelllysat im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Es lässt sich ein signifikanter, konzentrationsabhängiger Einfluss von Ölsäure auf die intrazelluläre Konzentration von Insulin erkennen. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Dunnett's multiple comparisons test; 0 mM Ölsäure ohne Zytokinmix wurde als Kontrolle mit 1,5 mM und 3 mM Ölsäure jeweils ohne Zytokinmix verglichen; 0 mM Ölsäure mit Zytokinmix wurde als Kontrolle mit 1,5 mM und 3 mM Ölsäure jeweils mit Zytokinmix verglichen)

Bei 16 mM Glukose zeigten sich ebenfalls niedrigere Konzentrationen von Insulin im Lysat bei 1,5 mM Ölsäure ( $p= 0,0603$ ) und 3 mM Ölsäure ( $p= 0,0032$ ) im Vergleich zu 0 mM Ölsäure. Auch unter Zugabe des Zytokinmixes ließen sich signifikant niedrigere Konzentrationen bei 1,5 mM Ölsäure ( $p= 0,0170$ ) und 3 mM Ölsäure ( $p= 0,0331$ ) im Vergleich zu 0 mM Ölsäure beobachten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt.

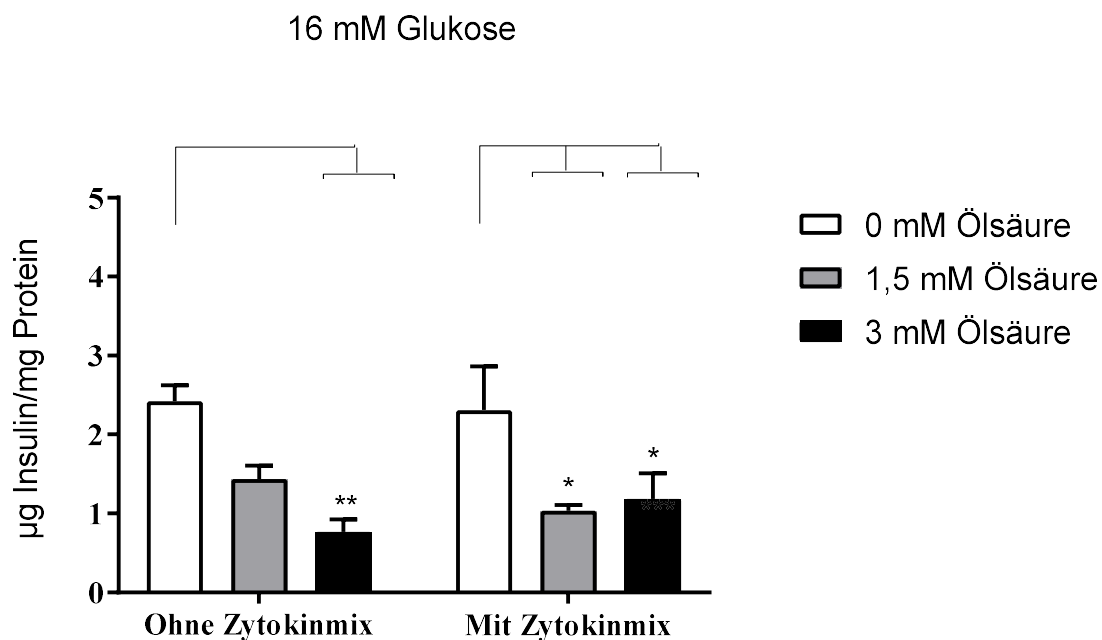


Abbildung 39: Dargestellt ist die Konzentration von Insulin im Zellysat im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Es lässt sich ein signifikanter, konzentrationsabhängiger Effekt von Ölsäure auf die intrazelluläre Konzentration von Insulin erkennen. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Dunnett's multiple comparisons test; 0 mM Ölsäure ohne Zytokinmix wurde als Kontrolle mit 1,5 mM und 3 mM Ölsäure jeweils ohne Zytokinmix verglichen; 0 mM Ölsäure mit Zytokinmix wurde als Kontrolle mit 1,5 mM und 3 mM Ölsäure jeweils mit Zytokinmix verglichen)

### 3.3.1.2 Glukose senkte die intrazelluläre Insulinkonzentration tendenziell

Unter Exposition von 16 mM Glukose war die Konzentration von Insulin mit 2,424  $\mu\text{g}$  Insulin/mg Protein ( $\pm 0,1994$   $\mu\text{g}$  Insulin/mg Protein Standardfehler) niedriger als bei der Exposition mit 3 mM Glukose. Hier lag die Konzentration bei 3,455  $\mu\text{g}$  Insulin/mg Protein ( $\pm 0,5702$   $\mu\text{g}$  Insulin/mg Protein Standardfehler) ( $p= 0,0734$ ). Dieser Effekt war bei zusätzlicher Exposition gegenüber 1,5 mM Ölsäure ( $p= 0,9135$ ) und 3 mM Ölsäure ( $p= 0,9926$ ) nicht mehr zu beobachten (Siehe Abbildung 40). Bei zusätzlicher Exposition gegenüber dem Zytokinmix ließ sich kein signifikanter Einfluss von Glukose beobachten.

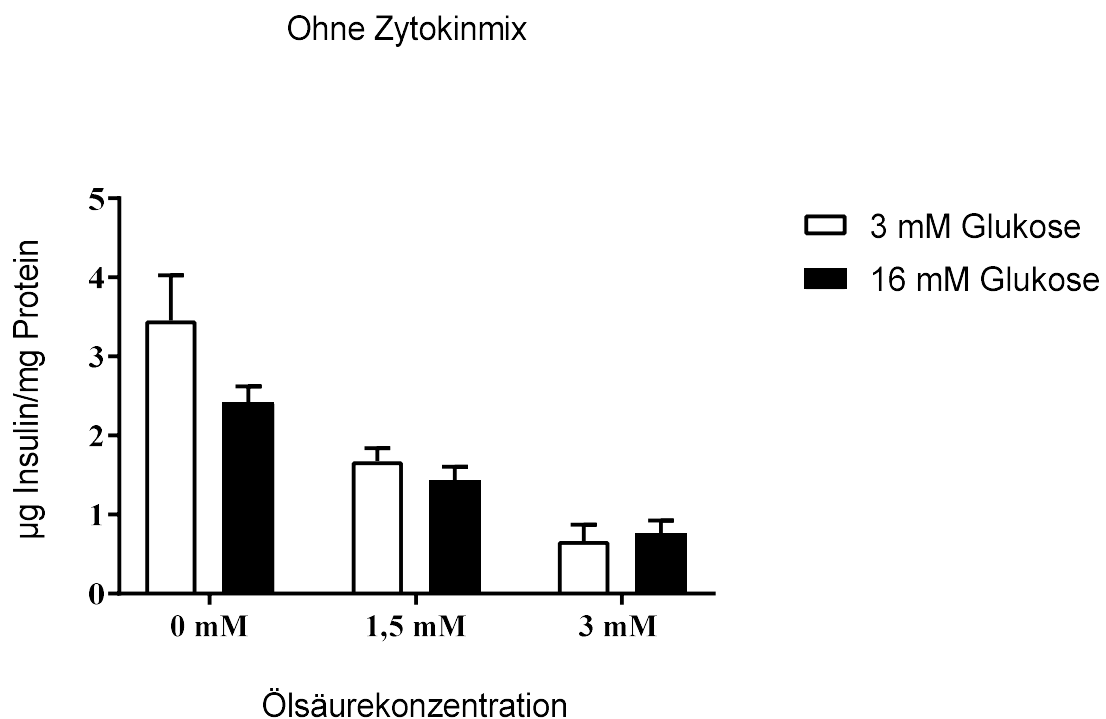


Abbildung 40: Dargestellt ist die Konzentration von Insulin im Zellysat im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Es lässt sich eine tendenzielle Verringerung der Insulinkonzentration im Zellysat durch 16 mM Glukose bei 0 mM Ölsäure erkennen. Bei Exposition gegenüber höheren Ölsäure-konzentrationen nimmt der Effekt ab. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### 3.3.1.3 Der Zytokinmix senkte die intrazelluläre Insulinkonzentration tendenziell

Die Exposition von MIN6 Zellen gegenüber dem Zytokinmix verringerte die intrazelluläre Insulinkonzentration bei gleichzeitiger Exposition gegenüber 3 mM Glukose in Kombination mit 0 mM Ölsäure oder 1,5 mM Ölsäure tendenziell (0 mM Ölsäure:  $p=0,2669$ ; 1,5 mM Ölsäure  $p=0,5329$ ) (Siehe Abbildung 41). Bei Exposition gegenüber 16 mM Glukose zeigten sich keine Veränderungen (Siehe Abbildung 42).

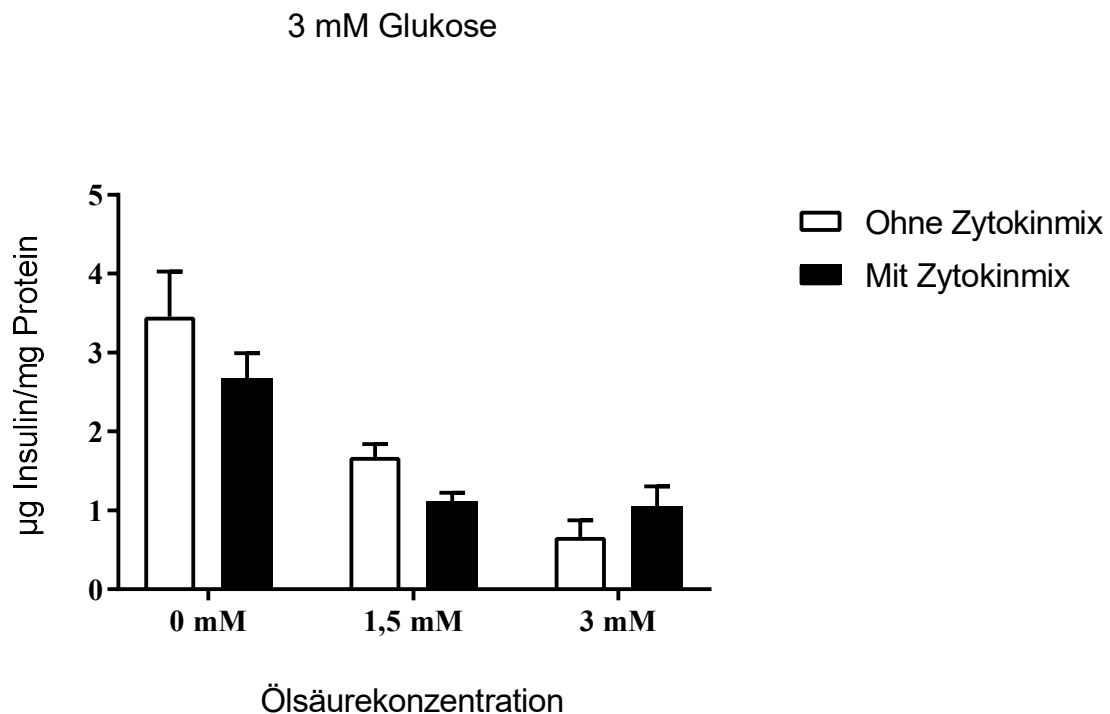


Abbildung 41: Konzentration von Insulin im Zelllysate im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Bei Exposition gegenüber 0 mM Ölsäure und 1,5 mM Ölsäure lässt sich eine tendenzielle Verringerung der intrazellulären Insulinkonzentration beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

16 mM Glukose

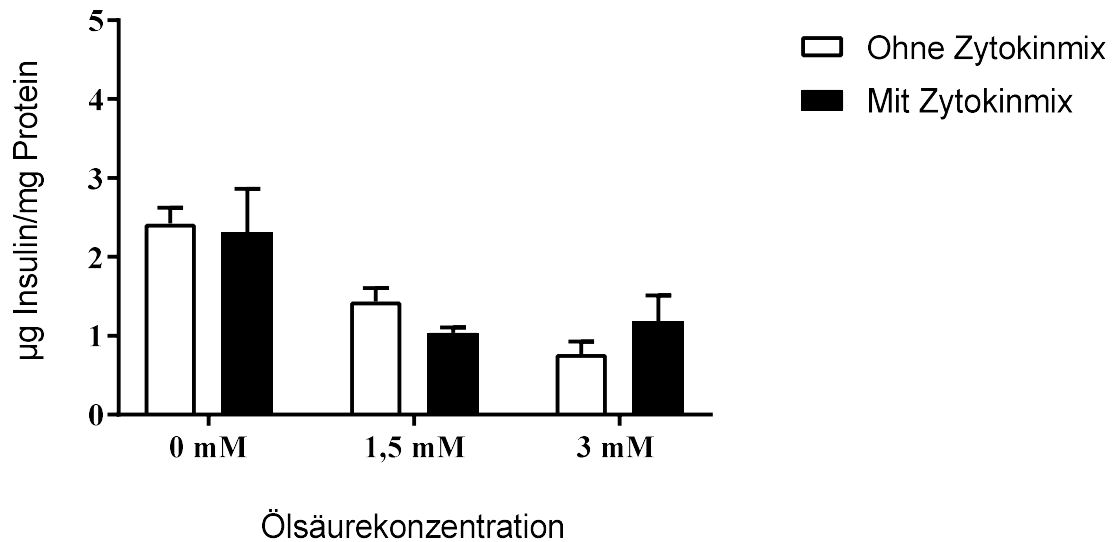


Abbildung 42: Konzentration von Insulin im Zelllysat im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Unter Exposition gegenüber 16 mM Glukose lässt sich kein signifikanter Effekt des Zytokinmixes beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### 3.3.2 Insulin im Medium

Da die absoluten Insulinkonzentrationen im Medium zwischen den Durchläufen stark schwankten, die Veränderungen innerhalb der jeweiligen Durchgänge jedoch dieselben Tendenzen zeigten, wurden die absoluten Werte im Verhältnis zur Kontrolle des jeweiligen Durchganges genommen. Diese bestanden, wie in Kap 2.2.2.4 beschrieben, aus Zellen die ebenfalls gezählt und ausgesät, dann aber mit normalem Kulturmedium weiterkultiviert und folglich nicht mit Ölsäure, Zytokinen oder unterschiedlichen Glukosekonzentrationen behandelt wurden.

### 3.3.2.1 Ölsäure senkte die extrazelluläre Insulinkonzentration

Die Exposition mit 3 mM Ölsäure führte im Vergleich zu 0 mM Ölsäure sowohl bei 3 mM Glukose ( $p=0,0016$ ) (Siehe Abbildung 43), als auch bei 16 mM Glukose ( $p=0,002$ ) (Siehe Abbildung 46) zu einer niedrigeren extrazellulären Insulinkonzentration. Denselben Effekt konnte man bei zusätzlicher Zugabe des Zytokinmixes sowohl bei 3 mM Glukose ( $p=0,0463$ ) (Siehe Abbildung 43), als auch tendenziell bei 16 mM Glukose ( $p=0,3001$ ) (Siehe Abbildung 44) beobachten.

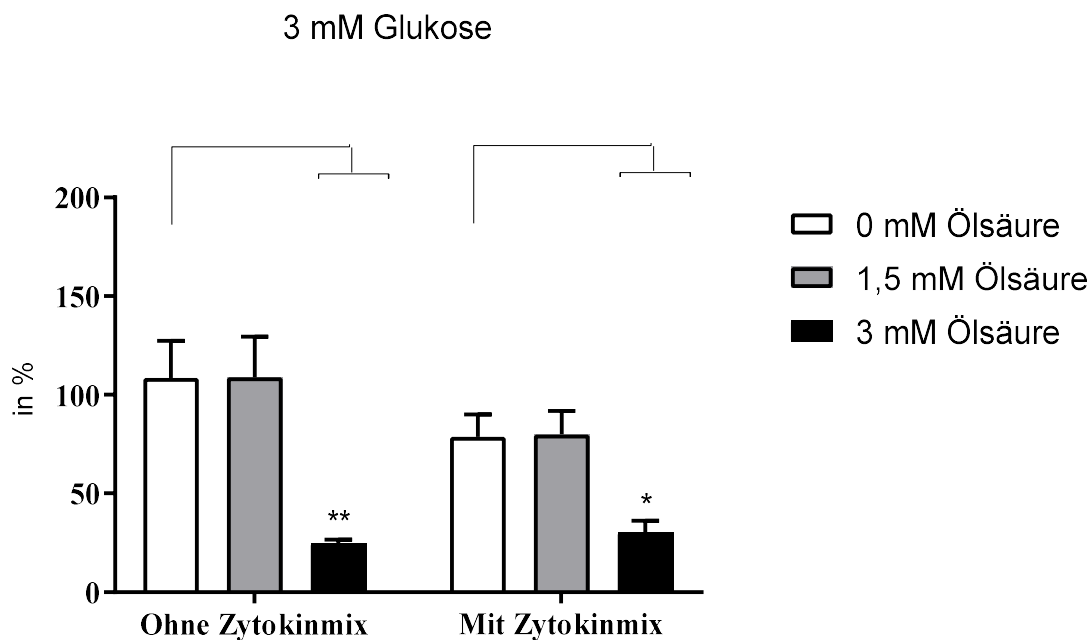


Abbildung 43: Dargestellt sind die Insulinkonzentrationen im Medium im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). 3 mM Ölsäure senkt bei Exposition mit 3 mM Glukose sowohl unter Einfluss des Zytokinmixes, als auch ohne Einfluss des Zytokinmixes die extrazelluläre Insulinkonzentration signifikant. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der extrazellulären Insulinkonzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Dunnett's multiple comparisons test; 0 mM Ölsäure ohne Zytokinmix wurde als Kontrolle mit 1,5 mM und 3 mM Ölsäure jeweils ohne Zytokinmix verglichen; 0 mM Ölsäure mit Zytokinmix wurde als Kontrolle mit 1,5 mM und 3 mM Ölsäure jeweils mit Zytokinmix verglichen)

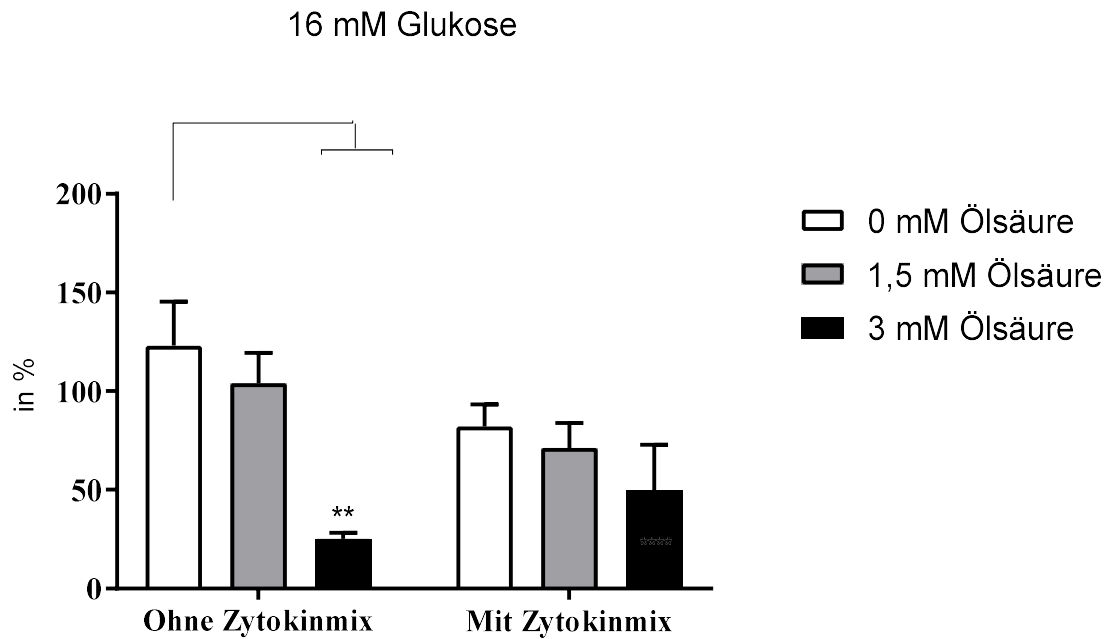


Abbildung 44: Dargestellt sind die Insulinkonzentrationen im Medium im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Es zeigt sich eine konzentrationsabhängige Verringerung der extrazellulären Insulinkonzentration durch Ölsäure. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der extrazellulären Insulinkonzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Dunnett's multiple comparisons test; 0 mM Ölsäure ohne Zytokinmix wurde als Kontrolle mit 1,5 mM und 3 mM Ölsäure jeweils ohne Zytokinmix verglichen; 0 mM Ölsäure mit Zytokinmix wurde als Kontrolle mit 1,5 mM und 3 mM Ölsäure jeweils mit Zytokinmix verglichen)

### 3.3.2.2 Glukose zeigte keinen Einfluss auf die extrazelluläre Insulinkonzentration

Ein Vergleich zwischen der Exposition gegenüber 3 mM Glukose oder 16 mM Glukose lieferte keine signifikante Veränderung der extrazellulären Insulinkonzentration. Die Ergebnisse sind in Abbildung 45 und 46 dargestellt.

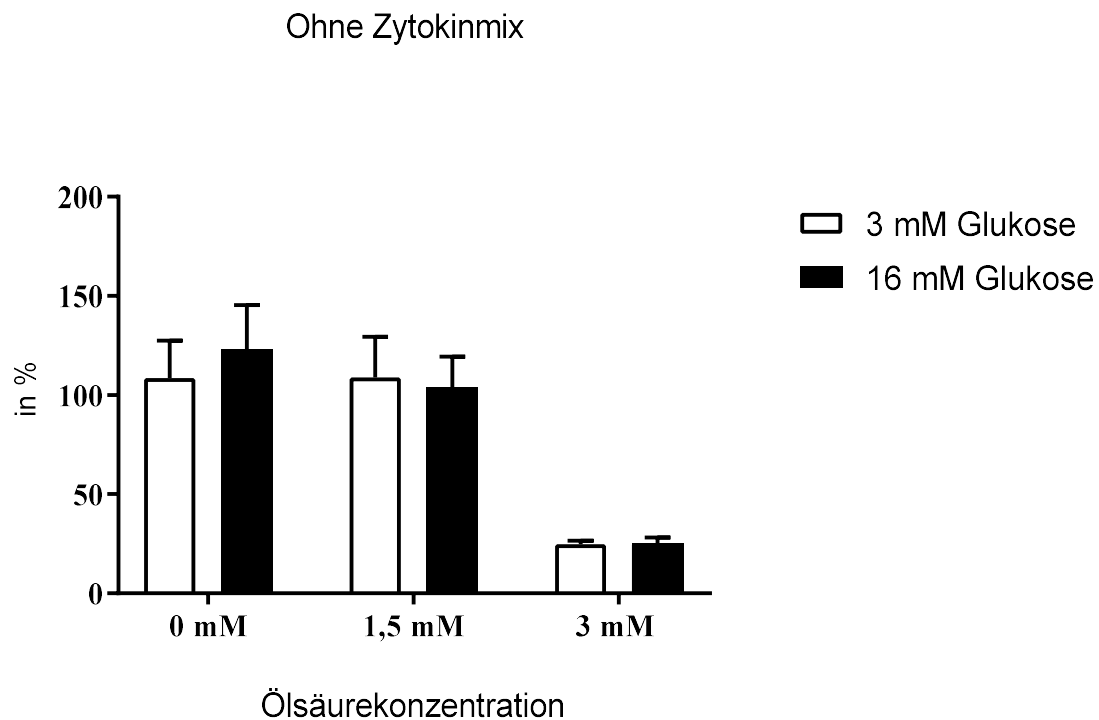


Abbildung 45: Dargestellt sind die Insulinkonzentrationen im Medium im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Es lässt sich kein signifikanter Einfluss von Glukose auf die extrazelluläre Insulinsekretion erkennen. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der extrazellulären Insulinkonzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### Mit Zytokinmix

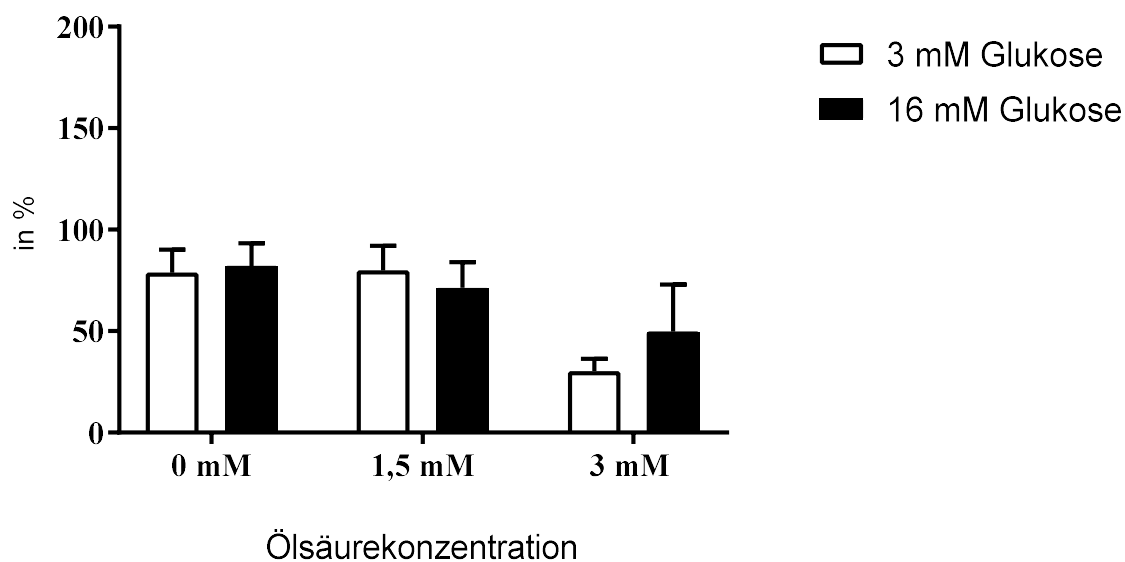


Abbildung 46: Dargestellt sind die Insulinkonzentrationen im Medium im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit dem Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ) und verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM).

Es lässt sich kein signifikanter Effekt von Glukose auf die extrazelluläre Insulinkonzentrationen erkennen. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der extrazellulären Insulinkonzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### 3.3.2.3 Zytokine senkten die extrazelluläre Insulinkonzentration tendenziell

Die Exposition der MIN6 Zellen gegenüber dem Zytokinmix zeigte bei 3 mM Glukose eine tendenzielle Verringerung der Insulinsekretion. Dieser Effekt zeigte sich sowohl bei zusätzlicher Exposition gegenüber 0 mM Ölsäure ( $p= 0,3721$ ) als auch gegenüber 1,5 mM Ölsäure ( $p= 0,3950$ ). Bei Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure zeigte sich kein Effekt mehr ( $p= 0,9893$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 47 dargestellt.

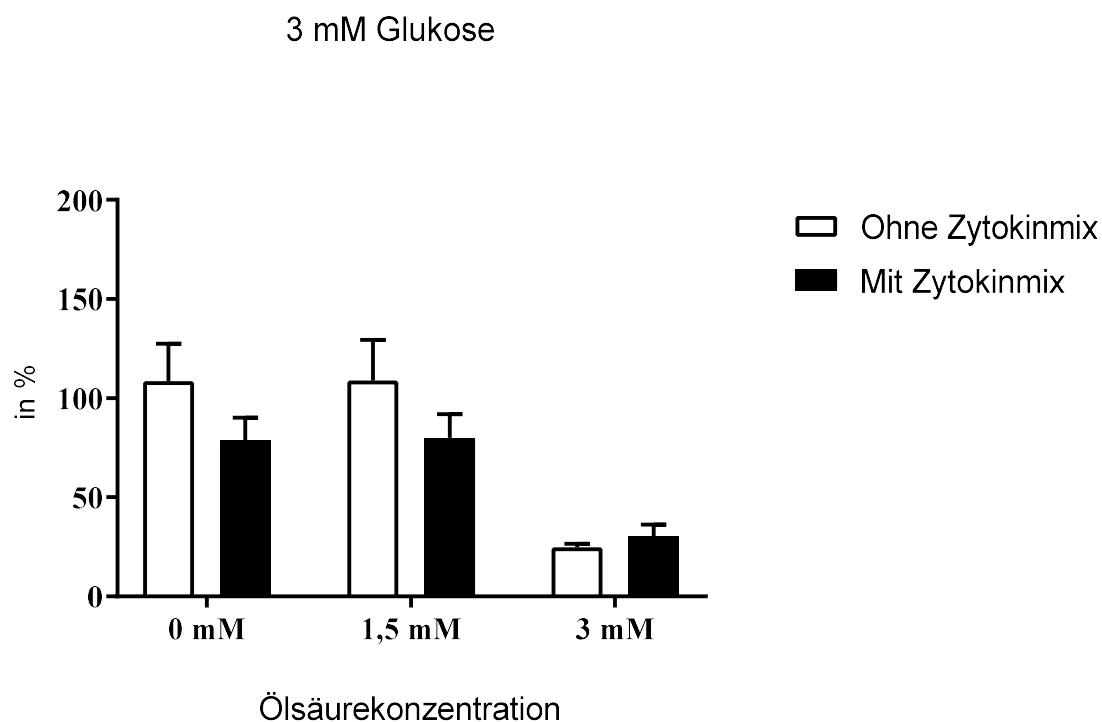


Abbildung 47: Dargestellt sind die Insulinkonzentrationen im Medium im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es zeigt sich eine tendenzielle Verringerung der extrazellulären Insulinkonzentration durch den Zytokinmix. Bei zusätzlicher Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure lässt sich dieser Effekt nicht mehr beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der extrazellulären Insulinkonzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

Bei Exposition gegenüber 16 mM Glukose zeigte sich ebenfalls eine tendenzielle Verringerung der Konzentration des extrazellulären Insulins durch den Zytokinmix. Dieser Effekt zeigte sich bei 0 mM Ölsäure ( $p=0,2649$ ) und 1,5 mM Ölsäure ( $p=0,4389$ ). Bei Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure zeigte sich hier kein Effekt mehr ( $p=0,6583$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 48 dargestellt.

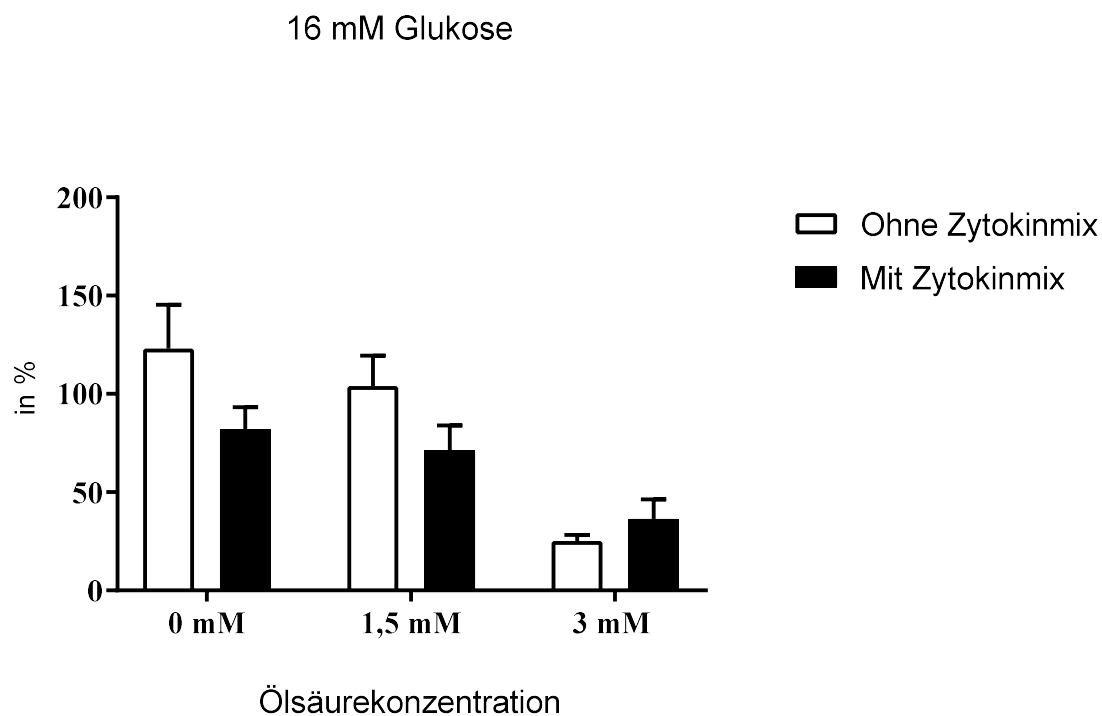


Abbildung 48: Dargestellt sind die Insulinkonzentrationen im Medium im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es zeigt sich eine tendenzielle Verringerung der extrazellulären Insulinkonzentration durch den Zytokinmix. Bei Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure zeigt sich kein Effekt mehr. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der extrazellulären Insulinkonzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### 3.3.3 Glutaredoxin 5

Da die absoluten Konzentrationen zwischen den Durchläufen stark schwankten, die Veränderungen innerhalb der jeweiligen Durchgänge jedoch eine ähnliche Tendenz zeigten, wurden die absoluten Werte im Verhältnis zur Kontrolle des jeweiligen

Durchganges berechnet. Diese bestanden, wie in Kap 2.2.2.4 beschrieben aus MIN6 Zellen, die ebenfalls gezählt und ausgesät, dann aber mit normalem Kulturmedium weiterkultiviert und folglich nicht mit Glukose, Ölsäure oder Zytokinen behandelt wurden.

### 3.3.3.1 Ölsäure senkte die intrazelluläre Glutaredoxin 5 Konzentration tendenziell

Die Exposition mit 3 mM Ölsäure sorgte sowohl bei 3 mM Glukose ( $p= 0,15$ ) (Siehe Abbildung 49), als auch bei 16 mM Glukose ( $p= 0,29$ ) (Siehe Abbildung 50) für eine tendenziell verringerte Konzentration von Glutaredoxin 5 im Lysat.

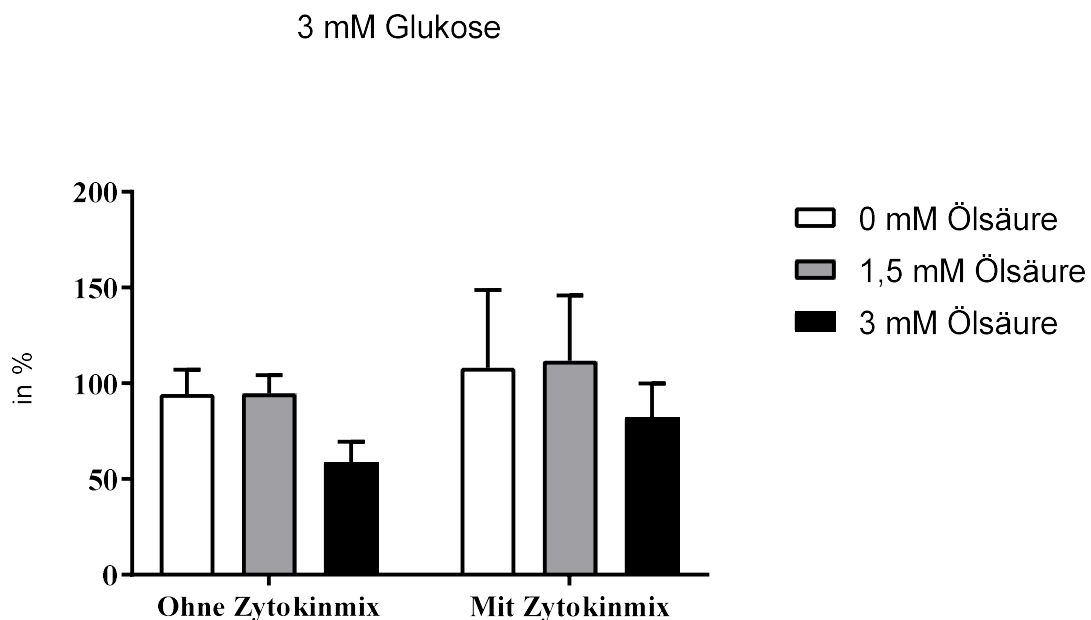


Abbildung 49: Dargestellt sind die Glutaredoxin 5-Konzentrationen im Lysat im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es zeigt sich eine Verringerung des Glutaredoxin 5 Gehaltes bei 3 mM Ölsäure. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der intrazelluläre Glutaredoxin 5-Konzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Dunnett's multiple comparisons test; 0 mM Ölsäure ohne Zytokinmix wurde als Kontrolle mit 1,5 mM und 3 mM Ölsäure jeweils ohne Zytokinmix verglichen; 0 mM Ölsäure mit Zytokinmix wurde als Kontrolle mit 1,5 mM und 3 mM Ölsäure jeweils mit Zytokinmix verglichen)

## 16 mM Glukose

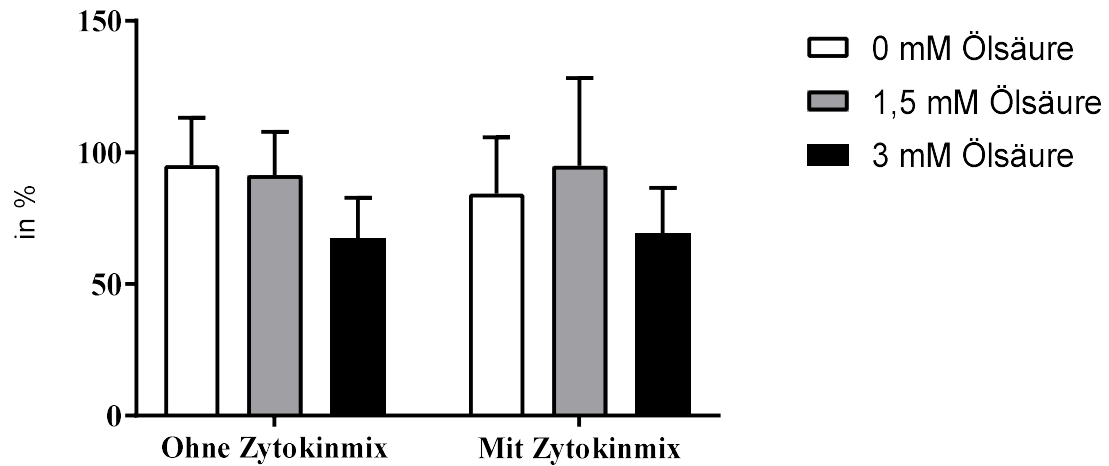


Abbildung 50: Dargestellt sind die Glutaredoxin 5-Konzentrationen im Lysat im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ).

Es zeigt sich eine tendenzielle Verringerung der Glutaredoxin 5 Konzentration bei Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der intrazelluläre Glutaredoxin-5 Konzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Dunnett's multiple comparisons test; 0 mM Ölsäure ohne Zytokinmix wurde als Kontrolle mit 1,5 mM und 3 mM Ölsäure jeweils ohne Zytokinmix verglichen; 0 mM Ölsäure mit Zytokinmix wurde als Kontrolle mit 1,5 mM und 3 mM Ölsäure jeweils mit Zytokinmix verglichen)

### 3.3.3.2 Glukose hatte keine Auswirkungen auf die Glutaredoxin 5-Konzentration

Ein Vergleich zwischen der Exposition gegenüber 3 mM Glukose oder 16 mM Glukose lieferte keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Konzentration von Glutaredoxin 5 im Lysat. Die Ergebnisse sind in Abbildung 51 und 52 dargestellt.

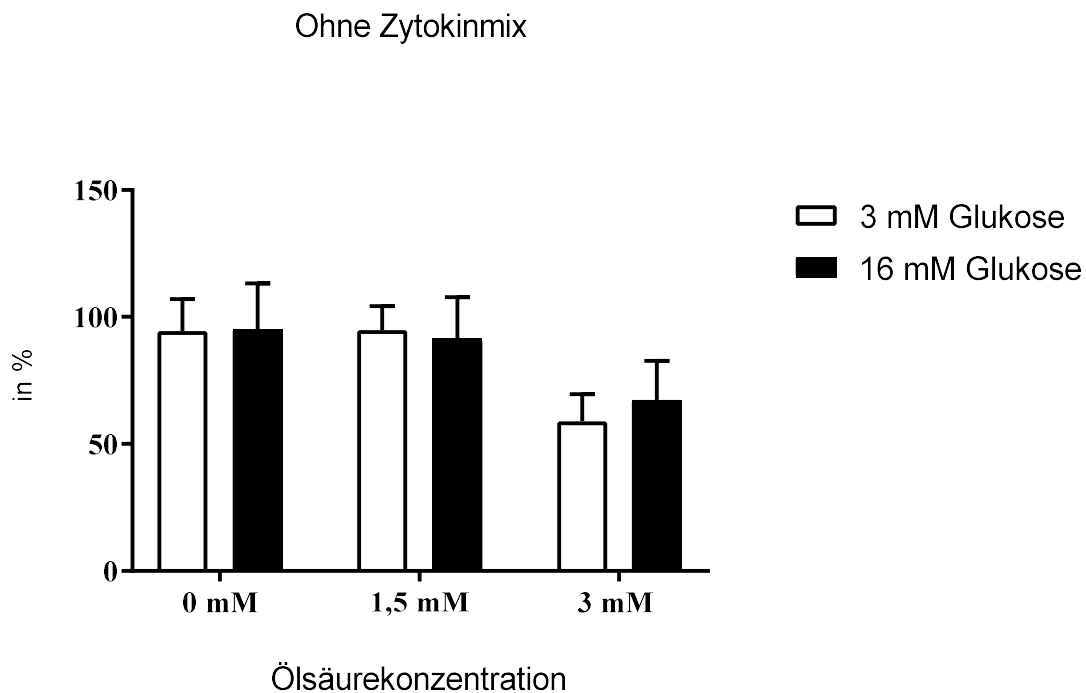


Abbildung 51: Dargestellt sind die Glutaredoxin 5-Konzentrationen im Lysat im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Es zeigt sich kein Einfluss von Glukose auf die Glutaredoxin 5-Konzentration. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der intrazelluläre Glutaredoxin-5 Konzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N=3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### Mit Zytokinmix

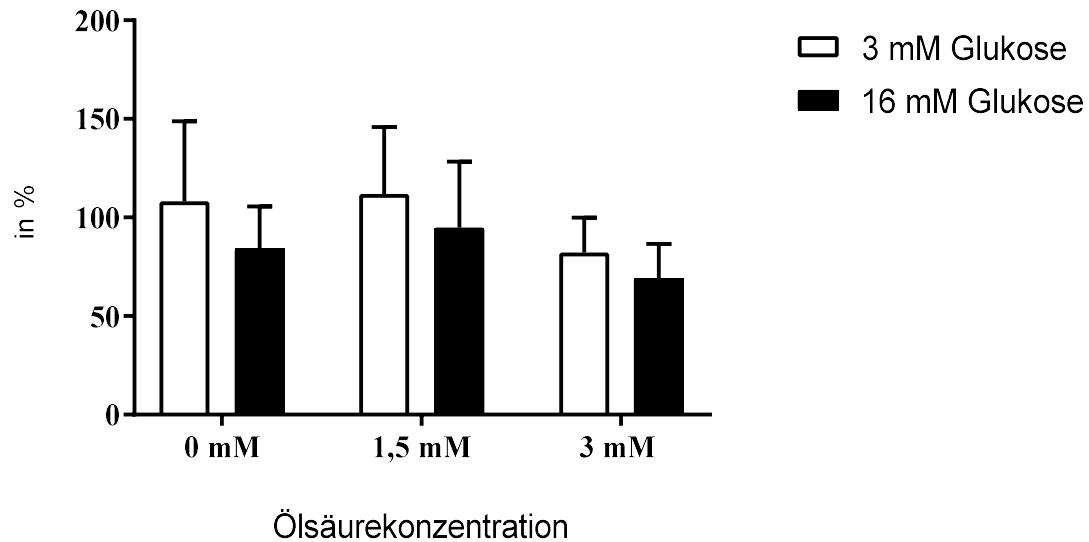


Abbildung 52: Dargestellt sind die Glutaredoxin 5-Konzentrationen im Lysat im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit dem Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ) und verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM).

Es zeigt sich kein Einfluss von Glukose auf die intrazelluläre Konzentration von Glutaredoxin 5. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der intrazelluläre Glutaredoxin 5-Konzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### 3.3.3.3 Der Zytokinmix zeigte keinen Einfluss auf die Glutaredoxin 5 Konzentration

Ein Vergleich zwischen der Konzentration von Glutaredoxin 5 im Lysat von MIN6 Zellen unter der Exposition des Zytokinmixes im Vergleich zur Konzentration ohne Exposition des Zytokinmixes zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse sind in Abbildung 53 und 54 dargestellt.

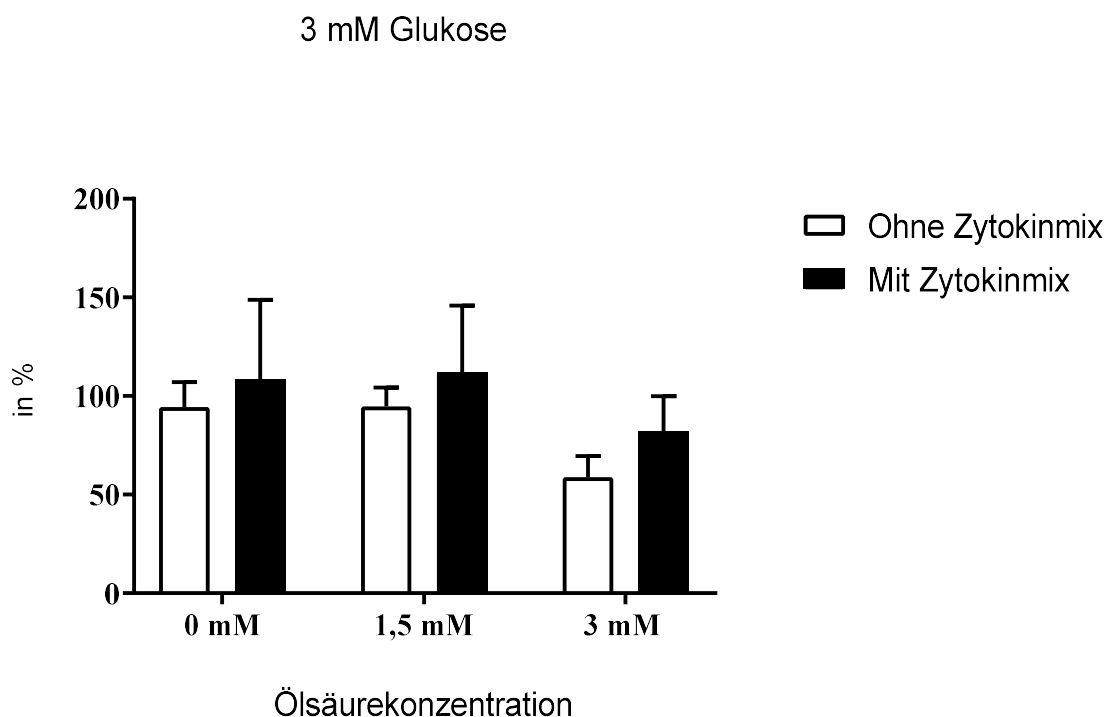


Abbildung 53: Dargestellt sind die Glutaredoxin 5-Konzentrationen im Lysat im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss des Zytokinmixes auf die intrazelluläre Glutaredoxin 5-Konzentration. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der intrazelluläre Glutaredoxin 5-Konzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N= 3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

### 16 mM Glukose

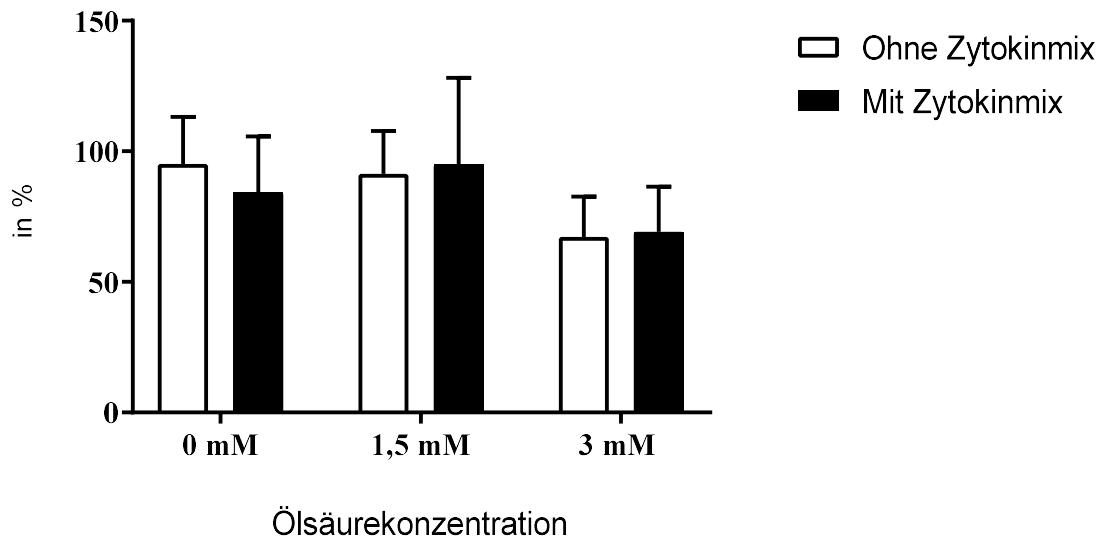


Abbildung 54: Dargestellt sind die Glutaredoxin 5-Konzentrationen im Lysat im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es zeigt sich kein Einfluss des Zytokinmixes auf die intrazelluläre Glutaredoxin 5-Konzentration. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der intrazelluläre Glutaredoxin 5-Konzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N=3; Statistische Auswertung: Two-Way Anova (Post Hoc: Sidak's multiple comparisons test)

## 4 Diskussion

Die Rolle von Glutaredoxin 5 im Kontext der Pathophysiologie von Diabetes Typ 2 wird seit einigen Jahren vermehrt erforscht. Sowohl die genaue Rolle von Glutaredoxin 5 im Stoffwechsel der Betazelle, als auch seine Regulation sind aktuell unklar. Deshalb wurden in dieser Arbeit MIN6 Zellen mit Ölsäure, Glukose und inflammatorischen Zytokinen behandelt, um den Zusammenhang zwischen metabolischer Aktivität, Insulin-, Glutaredoxin 5- und Eisenstoffwechsel zu untersuchen. Die Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass Ölsäure, Glukose und Zytokine zwar teils deutliche Einflüsse auf den Stoffwechsel der MIN6 Zelle haben, eine Regulation von Glutaredoxin 5 jedoch am wahrscheinlichsten durch Ölsäure vermittelt wird.

### 4.1 Zusammenfassung der zentralen Ergebnisse

Tab 6: Legende:

-	Keine Veränderung	↓	Abnahme	↑	Zunahme	*, **, ***, ****	Signifikanzen
---	-------------------	---	---------	---	---------	------------------	---------------

#### 4.1.1 Einfluss von Ölsäure

In den erhobenen Daten lässt sich erkennen, dass Ölsäure auf verschiedenen Ebenen einen funktionseinschränkenden und zellschädigenden Effekt hat. Sowohl eine konzentrationsabhängige Reduktion der metabolischen Aktivität (Siehe Abbildung 2, 3), als auch eine deutliche, konzentrationsabhängige Reduktion der Expression (Siehe Abbildung 8, 9, 14, 15) und Sekretion von Insulin (Siehe Abbildung 38, 39, 43, 44) ließen sich beobachten. Außerdem ließ sich eine tendenziell verminderte, konzentrationsabhängige Expression (Siehe Abbildung 20, 21) und intrazelluläre Konzentration von Glutaredoxin 5 (siehe Abbildung 49, 50) unter steigenden Ölsäurekonzentrationen beobachten. Zusammengefasst reduzierte die Ölsäureexposition sowohl die Viabilität, als auch die endokrine Funktion der Betazelle (Siehe Tabelle 7, 8). Die begleitende tendenzielle Verringerung von Glutaredoxin 5 lässt vermuten, dass entweder ein erhöhter Verbrauch, eine niedrigere Synthese, oder eine Mischung aus Beidem vorliegt. Die tendenzielle Verminderung der Glutaredoxin 5-mRNA unter steigenden Ölsäurekonzentrationen könnte ein Hinweis auf eine verminderte Genexpression als Ursache der intrazellulären Verringerung der Proteinkonzentration sein.

Tab 7: Ergebnisse der Ölsäureexposition ohne Zytokinmix:

	Ölsäure	3 mM Glukose		16 mM Glukose	
		1,5 mM	3 mM	1,5 mM	3 mM
MTT	Metabolische Aktivität	Trend ↓	↓ ****	Trend ↓	↓ **
PCR	Ins1	Trend ↓	↓ ****	Trend ↓	↓ ****
	Ins2	Trend ↓	↓ ****	Trend ↓	↓ ****
	Glx5	Trend ↓	Trend ↓	Trend ↓	Trend ↓
	IRP1	-	Trend ↑	-	↑ ***
ELISA	Insulinkonzentration	↓ **	↓ ****	Trend ↓	↓ **
	Insulinsekretion	-	↓ **	Trend ↓	↓ ****
	Glutaredoxin 5	-	Trend ↓	-	Trend ↓

Tab 8: Ergebnisse der Ölsäureexposition mit Zytokinmix:

	Ölsäure	3 mM Glukose		16 mM Glukose	
		1,5 mM	3 mM	1,5 mM	3 mM
MTT	Metabolische Aktivität	↓ *	↓ ***	Trend ↓	↓ **
PCR	Ins1	Trend ↓	↓ ****	↓ **	↓ ****
	Ins2	Trend ↓	↓ ****	↓ **	↓ ****
	Glx5	-	-	-	-
	IRP1	-	Trend ↑	-	↑ *
ELISA	Insulinkonzentration	↓ **	↓ **	↓ *	↓ *
	Insulinsekretion	-	↓ *	-	Trend ↓
	Glutaredoxin 5	-	-	-	-

## 4.1.2 Einfluss von Glukose

Unter Einfluss von Glukose ließ sich eine tendenziell verstärkte metabolische Aktivität im MTT beobachten (Siehe Abbildung 4,5). Bei der MIN6 Zelle handelt es sich um eine Zelllinie, die aus einem Insulinom isoliert wurde. Die erhöhte Viabilität könnte also Ausdruck des tumorösen Glukosestoffwechsels sein. Im Kontext der Glukotoxizität wäre durch eine Erhöhung der Glukosekonzentration ansonsten eine Verminderung der metabolischen Aktivität zu erwarten. Die intrazelluläre Insulinkonzentration sank durch die Exposition gegenüber hohen Glukosekonzentrationen tendenziell ab (Siehe Abbildung 40). Dies kann als Zeichen einer erhaltenen endokrinen Funktion mit erhaltener glukosestimulierter Insulinsekretion der untersuchten MIN6 Zellen interpretiert werden. Dieser Effekt verringerte sich bei höheren Ölsäurekonzentrationen, was durch den hemmenden Effekt der Ölsäure auf die Insulinexpression und -sekretion begründet sein könnte. Als Korrelat würde man jedoch dann eine signifikante Erhöhung der extrazellulären Insulinkonzentration erwarten. Diese ließ sich jedoch nicht beobachten (Siehe Abbildung 45, 46). Die Begründung hierfür könnten die hohen Schwankungen zwischen den Versuchsdurchläufen sein, die die Ausprägung des Effekts vermindern. Außerdem sammelte sich zusätzlich zum sekretierten Insulin auch Insulin aus den abgestorbenen MIN6 Zellen im Medium. Dies könnte die Unterschiede im Sekretionsverhalten der MIN6 ebenfalls verschleiern. Effekte von Glukose auf die Expression oder intrazelluläre Konzentration von Glutaredoxin 5 ließen sich nicht finden (Siehe Abbildung 22, 23, 51, 52).

Zusammengefasst zeigte Glukose im Experiment eine tendenzielle Verstärkung der metabolischen Aktivität und sorgte im Versuch für eine tendenziell verringerte intrazelluläre Insulinkonzentration. Eine regulatorische Wirkung von Glukose auf Glutaredoxin 5 konnte nicht beobachtet werden (Siehe Tabelle 9, 10).

Tab 9: Glukoseexposition ohne Exposition gegenüber dem Zytokinmix:

	Ölsäure	0 mM	1,5 mM	3 mM
	Glukose	3 mM - 16 mM	3 mM - 16 mM	3 mM - 16 mM
MTT	Metabolische Aktivität	Trend ↑	Trend ↑	Trend ↑
	Ins2	Trend ↓	-	-
	IRP1	-	-	↑ *
ELISA	Insulinkonzentration	Trend ↓	Trend ↓	-
	Insulinsekretion	-	-	-

Tab 10: Glukoseexposition mit Exposition gegenüber dem Zytokinmix:

	Ölsäure	0 mM	1,5 mM	3 mM
	Glukose	3 mM - 16 mM	3 mM - 16 mM	3 mM - 16 mM
MTT	Metabolische Aktivität	Trend ↑	Trend ↑	Trend ↑
	Ins2	-	↓ *	-

### 4.1.3 Einfluss des Zytokinmixes

Die Exposition der MIN6 Zellen gegenüber dem Zytokinmix zeigte keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität (Siehe Abbildung 6, 7). Die Zytokine verminderten sowohl tendenziell die intrazelluläre Insulinkonzentration (Siehe Abbildung 41, 42), als auch die Insulinexpression (Siehe Abbildung 12, 13, 18, 19). Außerdem sank die extrazelluläre Insulinkonzentration tendenziell (Siehe Abbildung 47, 48). Trotz negativer Effekte auf den Insulinstoffwechsel und die exokrine Funktion der Zelle ließ sich keine Regulation des Glutaredoxin 5-Stoffwechsels beobachten (Siehe Abbildung 53, 54). Dies lässt vermuten, dass die Einflüsse der Zytokine auf den Stoffwechsel nicht durch Glutaredoxin 5 vermittelt werden (Siehe Tabelle 11, 12).

Tab 11: Einfluss des Zytokinmixes bei einer Glukosekonzentration von 3 mM:

	Ölsäure	0 mM	1,5 mM	3 mM
	Zytokine	-/+	-/+	-/+
MTT	Metabolische Aktivität	-	Trend ↓	-
PCR	Ins1	↓ **	↓ **	Trend ↓
	Ins2	↓ **	↓ *	-
	Glr5	-	-	-
ELISA	Insulinkonzentration	Trend ↓	Trend ↓	-
	Insulinsekretion	Trend ↓	Trend ↓	-
	Glutaredoxin 5	-	-	-

Tab 12: Einfluss des Zytokinmixes bei einer Glukosekonzentration von 16 mM:

	Ölsäure	0 mM	1,5 mM	3 mM
	Zytokine	-/+	-/+	-/+
MTT	Metabolische Aktivität	-	Trend ↓	-
PCR	Ins1	↓ **	↓ **	Trend ↓
	Ins2	Trend ↓	↓ ***	-
	Glr5	-	-	-
	Insulinsekretion	Trend ↓	Trend ↓	-
	Glutaredoxin 5	-	-	-

#### 4.1.4 Auswirkungen auf den Eisenstoffwechsel

Eine Wirkung auf die mRNA-Expression von Enzymen des Eisenstoffwechsels ließ sich nur durch die Kombination verschiedener Stressoren finden. Die Expression von IRP1 stieg durch die Kombination von hohen Ölsäure- und Glukosekonzentrationen deutlich an (Siehe Abbildung 28, 29). Dies könnte entweder Ausdruck eines verstärkten Substratumsatzes mit erhöhtem Bedarf der zytosolischen Aconitase sein, Zeichen einer Hypoxie, die durch das hohe Substratangebot entsteht, oder Zeichen einer Dysregulation des Eisenstoffwechsels mit kompensatorischer Gegenregulation durch IRP1.

### 4.2 Interpretation

#### 4.2.1 Die Effekte von Ölsäure auf den Stoffwechsel der MIN6 Zelle

Die verwendeten Ölsäurekonzentrationen wurden in dieser Arbeit mit 0 mM, 1,5 mM und 3 mM so gewählt, dass die MIN6 Zellen unter den höchsten Konzentrationen sehr starkem metabolischem Stress ausgesetzt waren. Diese Ölsäurekonzentrationen wurden auch bereits in anderen Studien zur Untersuchung der Lipotoxizität genutzt (Petry et al. 2018; Petry et al. 2022). In den durchgeführten Versuchen kann man an der deutlich verminderten metabolischen Aktivität im MTT unter den steigenden Ölsäurekonzentrationen ein Anzeichen für den negativen Effekt der Lipotoxizität auf die Viabilität der Zellen sehen (Siehe Abbildung 2, 3). Diese Beobachtung deckt sich mit anderen Studienergebnissen, bei denen eine Exposition von MIN6 Zellen gegenüber Ölsäure für 24 Stunden die Viabilität und den Energiestoffwechsel der Zelle deutlich senkte (Petry et al. 2022). Ein Effekt hoher Fettsäurekonzentrationen ist eine intrazelluläre Akkumulation von Fettsäuren, welche zu einer Aktivierung von Caspasen führt und somit die Apoptose einleitet (Hirota et al. 2006).

Die Effekte von Fettsäuren auf den Insulinstoffwechsel sind in der Literatur je nach Konzentration und Expositionszeit unterschiedlich. In anderen Experimenten zeigte eine Exposition von isolierten Inselzellen aus Mäusen gegenüber Ölsäure für eine Stunde eine Erhöhung der Insulinsekretion (Ferdaoussi et al. 2012). Eine andere Arbeitsgruppe konnte durch die Inkubation von INS-1 Zellen mit einer Mischung aus Linol-, Öl- und

Palmitinsäure für 30 Minuten, eine Verbesserung der Insulinsekretion beobachten (Kim et al. 2013). In Versuchen mit längeren Inkubationszeiten wurde jedoch größtenteils ein negativer Effekt auf die Insulinsekretion beobachtet. Zum Beispiel beobachteten Petry et al. nach Inkubation von MIN6 Zellen mit Ölsäure für 24 Stunden eine Reduktion der Insulinsekretion (Petry et al. 2018). Eine Untersuchung an Ratten, die für 48 Stunden einer Lipidinfusion ausgesetzt waren, die zum größten Teil aus Linolsäure, Ölsäure und Palmsäure bestand, zeigte, dass diese nach der Belastung mit Fetten eine verminderte glukosestimulierte Insulinsekretion aufwiesen (Sako und Grill 1990). Die Ergebnisse der hier durchgeführten Experimente zeigten nach einer Inkubation mit Ölsäure für 24 Stunden eine Reduktion der Insulinsekretion (Siehe Abbildung 43, 44). Es lässt sich also mit zusätzlichem Blick auf die oben erwähnten Studien feststellen, dass längere Inkubationszeiten einen negativen Einfluss auf den Insulinstoffwechsel haben, während kürzere Inkubationszeiten eher positive Einflüsse haben.

Es gibt verschiedene Pathomechanismen, die diesen Effekt vermitteln. Während der Betaoxidation von Fettsäuren werden in den Komplexen 1 und 3 der Atmungskette Superoxid Radikale freigesetzt (Schönfeld und Wojtczak 2008), die durch Bildung von toxischem Wasserstoffperoxid zu vermehrtem oxidativem Stress führen können (Lenzen 2008). Ein Effekt der anfallenden Sauerstoffradikale ist die Öffnung der ATP sensitiven Kaliumkanäle, die so die glukosestimulierte Insulinsekretion vermindern (Nakazaki et al. 1995). Die Effekte des oxidativen Stresses könnten für die Betazelle im Vergleich zu anderen Geweben besonders schädigend sein, da sie im Vergleich zu anderen Geweben wenig antioxidative Enzyme besitzt, die die anfallenden Sauerstoffradikale neutralisieren können (Lenzen et al. 1996). Auf der anderen Seite zeigten INS1 Zellen nach 30-minütiger Exposition gegenüber Wasserstoffperoxid eine Steigerung der glukosestimulierten Insulinsekretion (Pi et al. 2007). Das könnte bedeuten, dass die geringere Ausstattung der Betazellen mit antioxidativen Enzymen auf der einen Seite die Rolle von Sauerstoffradikalen als Trigger für die Insulinfreisetzung ermöglicht, die zytotoxische Wirkung einer langfristigen Exposition auf der anderen Seite jedoch verstärkt.

Ein weiterer Effekt des vermehrt anfallenden oxidativen Stresses ist die vermehrte Expression des Kanalproteins UCP2 (Klingenberg und Winkler 1985). Dies sorgt zwar über eine Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials für eine Verminderung

des anfallenden oxidativen Stresses. Ein weiterer Effekt ist aber auch ein ATP Mangel, der die Sekretion und Synthese von Insulin inhibiert (Grubelnik et al. 2020). Außerdem verhindert eine begleitende Akkumulation von Acyl-CoA den Schluss von ATP-sensitiven Kaliumkanälen und somit auch, dass diese die Exozytose von Insulin initiieren (Larsson et al. 1996). Die Effekte dieser Mechanismen ließen sich ebenfalls in dieser Arbeit beobachten. Ölsäure sorgte langfristig ( $> 24$  Stunden) für eine konzentrationsabhängige Verminderung der Insulinsynthese (Siehe Abbildung 38, 39) und eine Verminderung der Insulinsekretion (Siehe Abbildung 43,44).

In der Literatur wird Ölsäure auch ein protektiver Effekt auf die Betazelle zugeschrieben. Nemezc et al. inkubierten die humane Betazelllinie 1.1B4 für 24 Stunden mit jeweils 250  $\mu$ M Palmsäure oder 250  $\mu$ M Ölsäure oder einer Kombination aus Beidem. Sie beobachteten eine Verringerung der metabolischen Aktivität der Zellen durch die Zugabe von Palmsäure und eine Steigerung der metabolischen Aktivität durch Ölsäure. Ebenso amortisierte Ölsäure den negativen Effekt von Palmsäure auf die 1.1B4 Zellen. Ölsäure steigerte außerdem die Insulinsekretion der Zellen (Nemezc et al. 2018). Liu et al. beobachteten in ihren Experimenten, dass INS-1E nach 24-stündiger Inkubation mit 0,2 mM Ölsäure eine Verbesserung der metabolischen Aktivität aufwies. Außerdem verhinderte eine Ölsäureexposition die negativen Effekte von Palmsäure auf die Insulinsekretion (Liu et al. 2019). Beide Arbeiten zeigen einen positiven Effekt von Ölsäure auf den Stoffwechsel der Betazelle. Beide Arbeiten verwendeten jedoch Dosierungen, welche deutlich niedriger (250  $\mu$ M, 0,2 mM Ölsäure) im Vergleich zu den in dieser Arbeit verwendeten 1,5 mM und 3 mM Ölsäure waren. Es lässt sich also zusätzlich zum zeitlichen Effekt, auch ein konzentrationsabhängiger Effekt vermuten. Die Daten geben also einen Hinweis, dass eine niedrige Dosierung von Ölsäure zu einer Verbesserung der metabolischen Aktivität und Insulinsekretion führt (Nemezc et al. 2018), während eine höhere Dosierung der Ölsäure das genaue Gegenteil bewirkt (siehe Tabelle 7,8).

Da hohe Glukosekonzentrationen durch die Metabolisierung in der Atmungskette natürlicherweise oxidativen Stress erzeugen (Sakai et al. 2003), wäre eine additive Wirkung von Glukose zur verminderten metabolischen Aktivität durch Ölsäure zu erwarten. Diese blieb jedoch in den durchgeführten Experimenten aus (Siehe Tabelle

9,10). Auch in anderen Experimenten zeigten Fettsäuren und Glukose keine additive Wirkung auf MIN6 Zellen. So ließ sich die Apoptoserate von MIN6 Zellen und humanen Inselzellen, im Gegensatz zu INS1 Zellen, nach 24- und 48-stündiger Inkubation von 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM Palmsäure durch Erhöhung der Glukosekonzentration von 5,5 mM auf 25 mM Glukose nicht weiter steigern (Sargsyan und Bergsten 2011). Außerdem sank die Aktivität der Acetyl-CoA Carboxylase in MIN6 Zellen und humanen Inselzellen unter der hohen Glukosekonzentration nur in geringerem Ausmaß. Es verringerte sich auch die Produktion des lipotoxischen Malonyl-CoA (Sargsyan und Bergsten 2011). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die genetische Enzymausstattung die Anfälligkeit von Betazellen gegenüber Glukolipotoxizität bestimmen könnte.

Glutaredoxin 5 fungiert als Überträger der katalytischen Fe/S Gruppe auf Enzyme des Eisen-Schwefel-Clusters und ist damit zentraler Bestandteil ihrer Synthese (Lill et al. 2012). In den durchgeführten Experimenten konnte eine tendenzielle Verminderung der intrazellulären Proteinkonzentration (Siehe Abbildung 49) und eine tendenzielle Verminderung der Expression von Glutaredoxin 5 (Siehe Abbildung 20, 21) unter steigenden Ölsäurekonzentrationen beobachtet werden. Da Eisen-Schwefel-Cluster Bestandteile von zentralen Stoffwechsellzymen, wie zum Beispiel dem Komplex 1 (Flemming et al. 2003), 2 (Albracht 1980) und 3 (Ding et al. 1992) der Atmungskette, sind, führt eine Dysfunktion zu einer schwerwiegenden Schädigung des Energiestoffwechsels. So konnte in einer 24-stündigen Inkubation von MIN6 Zellen mit Ölsäure ein verminderter ATP Gehalt in Kombination mit einem verminderten O<sub>2</sub> Fluss der Komplexe 1 und 2 der Atmungskette festgestellt werden (Petry et al. 2022). In derselben Studie erniedrigte sich zusätzlich die intrazelluläre Glutaredoxin 5-Konzentration von MIN6 Zellen konzentrationsabhängig durch 24-stündige Inkubation mit 0,75 mM, 1,5 mM und 3 mM Ölsäure. In vivo wurde eine Verminderung der Glutaredoxin 5-Expression durch fettreiche Ernährung von C57BL/6J Mäusen beobachtet (Petry et al. 2022). Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Eine tendenzielle Verminderung der Glutaredoxin 5-Konzentration war in den durchgeführten Experimenten mit einer erniedrigten Insulinsekretion assoziiert (Siehe Tabelle 7,8). Da ATP als Trigger für die Insulinsekretion dient, könnte die verminderte Insulinsekretion als Ausdruck eines ATP-Mangels interpretiert werden. Eine

Verringerung der Glutaredoxin 5-Konzentration könnte auf der einen Seite für einen Verbrauch dieses Enzyms durch den vermehrten Bedarf von Eisen-Schwefel-Cluster Enzymen sprechen, die erhobenen Daten zeigen jedoch auf der anderen Seite eine tendenziell verminderte Expression (Siehe Tabelle 7,8). Dies spricht eher für eine Regulation der Genexpression durch Ölsäure. Die genauen regulatorischen Mechanismen lassen sich jedoch auf Basis der hier erhobenen Daten nicht klären.

Eine andere wichtige Aufgabe der Proteine des Eisen-Schwefel-Clusters ist die Regulation der intrazellulären Eisenhämostase. Ein interessantes Enzym ist in diesem Kontext die Aconitase, welche durch die Anwesenheit oder Abwesenheit von Eisen-Schwefel-Clustern unterschiedliche Aufgaben erfüllen kann (Haile et al. 1992; Hentze und Kühn 1996). Ist die cytosolische Aconitase mit einem Eisen-Schwefel-Cluster beladen, nimmt sie durch die Umwandlung von Citrat bzw. Isocitrat in Aconitat eine zentrale Rolle im Citratzyklus und somit im Energiestoffwechsel der Zelle ein. Wenn der cytosolischen Aconitase das Eisen-Schwefel-Cluster fehlt, dann reguliert die Aconitase über die Rolle als IRP1 die Eisenhämostase der Zelle. Durch vermehrte Bindung von IRP1 an IRE wird dann die Transkription von Ferritin inhibiert und die mRNA des Transferrinrezeptors stabilisiert (Hentze und Kühn 1996). Unter hohen Konzentrationen von Ölsäure und Glukose ließ sich in dieser Arbeit eine vermehrte Expression von IRP1 beobachten (Siehe Abbildung 28, 29). Da unter denselben Zuständen auch erniedrigte Glutaredoxin 5-Konzentrationen beobachtet wurden, könnte dies Ausdruck der Schädigung der Eisen-Schwefel-Cluster Synthese sein. Derselbe Effekt zeigte sich bereits in anderen Studien, in welchen die Eisen-Schwefel-Cluster Synthese geschädigt war (Wingert et al. 2005; Pondarré et al. 2006).

Untersuchungen an Hefe geben Hinweise darauf, dass die Eisenaufnahme der Zelle stärker durch die Eisen-Schwefel-Cluster Synthese, als durch die absolute intrazelluläre Eisenkonzentration bestimmt wird (Chen et al. 2004). Außerdem zeigte sich bei geschädigter Eisen-Schwefel-Cluster Synthese eine Eisenüberladung des Mitochondriums (Chen et al. 2004). In dieser Arbeit konnte ein Mangel an Glutaredoxin 5 in Zuständen starker metabolischer Belastung durch hohe Glukose- und Ölsäurekonzentrationen tendenziell beobachtet werden (Siehe Abbildung 49, 50). In diesen Zuständen zeigte sich auch die Expression von IRP1 erhöht. Die verminderte

Synthese von Eisen-Schwefel-Cluster Enzymen, eventuell Folge eines Glutaredoxin 5 Mangels, dient dann als intrazelluläres Signal für einen Eisenmangel, infolgedessen sich die Konzentration von IRP1 erhöht. Eine Untersuchung an einem Patienten, der durch einen Gendefekt unter einem hereditären Mangel an Glutaredoxin 5 litt, zeigte ebenfalls eine vermehrte IRP1 Bindung mit einer verminderten Aconitase Aktivität in Kombination mit einer insuffizienten Produktion der Eisen-Schwefel-Cluster Enzyme. In derselben Studie wurden ebenfalls erhöhte TfR1-Konzentrationen gefunden (Camaschella et al. 2007). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Untersuchungen mit isolierten Zellen dieser Person (Ye et al. 2010) und an Zebrafischen, die einen Glutaredoxin 5 Mangel aufwiesen, festgestellt (Wingert et al. 2005). Verminderte Aconitaseaktivität kann Ausdruck einer verminderten Produktion in Kombination mit einem vermehrten Verbrauch dieses Enzyms sein. Da IRP1 für die Funktion als Aconitase Fe/S Cluster benötigt wird, ist ein Zusammenhang mit dem Glutaredoxin 5-Defizit möglich.

Hohe Glukosekonzentrationen können in der Zelle durch den hohen Sauerstoffbedarf des Glukosestoffwechsels hypoxie-ähnliche Zustände erzeugen (Sato et al. 2011). Da die Expression von IRP1 auch durch Hypoxie reguliert wird (Luo et al. 2016), könnte dies eine Erklärung für den stimulierenden Einfluss von hohen Glukosekonzentrationen und Ölsäurekonzentrationen sein. Es konnte gezeigt werden, dass eine 24-stündige intrazelluläre Hypoxie zu einer erhöhten intrazellulären IRP1 mRNA-Konzentration führt (Luo et al. 2016). Außerdem konnte ein Anstieg der intrazellulären Proteinkonzentration von IRP1 ab einer vierstündigen hypoxischen Exposition beobachtet werden. (Luo et al. 2016).

Eine erhöhte Konzentration von IRP1 führt zu einer vermehrten Bindung an IRE. Dieser Komplex kann dann die Stabilität der mRNA des TfR1 über die Bindung an das 3'-Ende verbessern und somit die Expression des Transferrinrezeptors erhöhen (Owen und Kühn 1987). Als Folge dessen wird die Expression des Transferrinrezeptors erhöht und somit die Eisenaufnahme in die Zelle gesteigert. Da die mRNA-Konzentration von IRP1 gesteigert ist, wäre zu erwarten, dass die mRNA-Konzentration von TfR1 aufgrund der Stabilisierung durch IRP1/IRE erhöht ist. In den durchgeführten Experimenten konnten jedoch unter erhöhten Konzentrationen von IRP1 mRNA keine signifikanten Veränderungen der TfR1 mRNA beobachtet werden (Siehe Abbildung 28, 29, 34, 35).

## 4.2.2 Die Effekte von Glukose auf den Stoffwechsel der MIN6 Zelle

Für die Simulation von verschiedenen Glukosekonzentrationen wurden 3 mM und 16 mM Glukose genutzt. Ähnliche Konzentrationen wurden bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe und anderen Studien zur Untersuchung zur Glukotoxizität verwendet (Hotamisligil et al. 1993; Zhou et al. 2019; Petry et al. 2022). Unter hohen Glukosekonzentrationen konnte in den durchgeführten Experimenten eine tendenzielle Erhöhung der metabolischen Aktivität beobachtet werden (Siehe Abbildung 4, 5). Im Sinne des Konzeptes der Glukotoxizität wäre zu erwarten, dass die metabolische Aktivität unter hohen Glukosekonzentrationen eher absinkt. In einer Studie mit einer anderen pankreatischen Tumorzelllinie BxPc-3 hatte Glukose sowohl nach einer Inkubation von 24, 48, als auch 72 Stunden im MTT einen deutlich steigernden Effekt auf die metabolische Aktivität (Zhou et al. 2019). Ge et al. konnten in einem Experiment mit MIN6 Zellen keine signifikanten Veränderungen der Zellviabilität nach 24 Stunden Inkubation für eine Glukoseexposition von unter 50 mM beobachten. Niedrigere Glukosekonzentrationen (12,5 mM, 25 mM) zeigten erst nach 48 stündiger Inkubation eine Verringerung der metabolischen Aktivität (Ge et al. 2010). Aus der Literatur ergeben sich also zwei Erklärungsansätze. Auf der einen Seite könnte die Inkubationszeit von 24 Stunden zu kurz sein, auf der anderen Seite könnte die gesteigerte metabolische Aktivität auch Ausdruck eines erhöhten Glukoseumsatzes mit einer daraus folgenden gesteigerten metabolischen Aktivität der MIN6 Zellen sein. Durch hohe Glukosespiegel zeigte sich nicht nur die metabolische Aktivität der MIN6 Zellen beeinflusst, sondern in unterschiedlichem Ausmaß auch die Genexpression, die Synthese und Sekretion von Insulin.

Die Genexpression von Insulin zeigte sich durch Glukose nur sehr gering verändert (Siehe Abbildung 10, 11, 16, 17). Für die Regulation des Insulin Gens ist vor allem die Aktivität der Promotoren PDX1 und MafA von zentraler Bedeutung (DeFronzo et al. 2015). Diese beiden Promotoren sorgen durch ihre Interaktion mit der Bindungsregion des Insulins für eine Verstärkung der Insulintranskription und somit zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Insulin mRNA (DeFronzo et al. 2015). Ein zentraler Faktor in der

Regulierung der Genexpression von Insulin ist Glukose. Glukose sorgt unter anderem durch die Phosphorylierung von PDX1 zu einer Steigerung der Aktivität der Promotorregion (DeFronzo et al. 2015). Dies resultiert dann in einer vermehrten Transkription von Insulin.

Die Regulation der Genexpression von Insulin ist unter anderem von der Dauer der Glukoseexposition abhängig. Ein kurzfristiger Anstieg der Blutglukose von unter 3 Stunden zeigt keinen Einfluss auf die Konzentration der Insulin-mRNA (Itoh und Okamoto 1980). Der gesteigerte Bedarf der Betazelle kann kurzfristig durch eine Verbesserung der mRNA Stabilität und Translation erreicht werden (Itoh und Okamoto 1980).

Bei längerer Inkubation mit Glukose scheint dieser Mechanismus jedoch nicht mehr zu genügen und es lässt sich zusätzlich eine Steigerung der Genexpression von Insulin beobachten (Nielsen et al. 1985). Es hat sich gezeigt, dass eine chronische Exposition gegenüber hohen Glukosekonzentrationen eine Verringerung der PDX1 Aktivität zur Folge hat und damit zu einer Verringerung der Genexpression von Insulin führt (Chen et al. 2016). Zum Beispiel untersuchten Mao et al. den mRNA-Gehalt von Ins1 und Ins2 nach einer Inkubationszeit mit 5,5 mmol/L oder 33,3 mmol/L Glukose für 24, 48 und 72 Stunden. Hier zeigte sich nach 48 Stunden eine Verringerung der Expression von Ins1 und Ins2 (Mao et al. 2017). Die Ergebnisse der hier durchgeführten Experimente zeigten nur vereinzelt eine Verminderung der Ins2 Expression durch Glukose (Siehe Abbildung 16, 17). Die Expression von Ins1 zeigte sich durch Glukose nicht reguliert (Siehe Abbildung 10, 11). Die tendenzielle Verringerung der Expression von Ins2 unter Kombination von Ölsäure und Glukose könnte Ausdruck der glukolipotoxischen Verringerung der PDX1 Expression sein.

Ein weiterer Aspekt in Bezug auf die fehlende Regulation der Genexpression von Insulin ist, dass sich sowohl die Insulinsekretion, als auch der intrazelluläre Insulingehalt durch Glukosestimulation nicht-signifikant verändert haben (Siehe Abbildung 40, 45, 46). Vor diesem Hintergrund muss man hinterfragen, ob eine kompensatorische Erhöhung der Genexpression von Insulin überhaupt zu erwarten ist, oder ob hier kurzfristige Kompensationsmechanismen, wie zum Beispiel eine Steigerung der mRNA-Stabilität

von Insulin (Itoh und Okamoto 1980) ausreichen um den Insulinbedarf der Betazelle ausreichend zu decken.

Die intrazelluläre Insulinkonzentration zeigte sich als Reaktion auf hohe Glukosespiegel tendenziell vermindert (Siehe Abbildung 40). Dies könnte entweder für eine Verringerung der Insulinsynthese, oder für eine Sekretion von Insulin sprechen. Da sich in den Versuchen nur eine nicht signifikante Erhöhung der extrazellulären Insulinkonzentration und keine eindeutige Regulation der Insulingenexpression durch Glukose findet (Siehe Tabelle 9,10), lässt sich keine der beiden Möglichkeiten sicher bestätigen oder ausschließen. Eine Verringerung der Insulinsynthese könnte sich durch das Anfallen von oxidativem Stress im Rahmen der Glukosebelastung erklären (Krippeit-Drews et al. 1999). Dieser führt zu einer Dysfunktion metabolischer Prozesse und damit auch zu einer Verringerung der Synthese von Insulin. Außerdem könnte eine vermehrte Glykierung von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren zu einer durch NO bedingten Inhibierung der ATP Produktion führen, die dann wiederum zu einer Dysfunktion der Insulinsekretion führt (Zhao et al. 2009).

Zu bedenken ist die hohe Varianz des Datensatzes der extrazellulären Insulinkonzentration. Die Daten wurden zur Auswertung mithilfe einer Kontrolle normalisiert, da die erhobenen Messwerte der drei Versuchsreihen teils deutlich voneinander abwichen (Siehe Kapitel 3.3.2). Innerhalb der Versuchsreihen zeigten sie jedoch stets ähnliche Tendenzen.

Es wäre zu erwarten gewesen, dass die verwendeten MIN6 Zellen (Passage 51 bis 53) unter denselben Bedingungen eine vergleichbare Menge an Insulin sekretieren. Hätte sich die Passage deutlich unterschieden, so wäre das hier erhobene Ergebnis plausibler gewesen. Grundsätzlich wurde beobachtet, dass MIN6 Zellen in höheren Passagen weniger Insulin sekretieren (Cheng et al. 2012).

Eine Erklärung für die deutlichen Unterschiede könnte die teils deutlich erniedrigte metabolische Aktivität unter den jeweiligen Versuchsbedingungen sein (Siehe Abbildung 2, 3, 4, 5). Da dies unter anderem auch ein Marker für die Viabilität der Betazellen ist, könnte intrazelluläres Insulin aus den apoptotischen Zellen in unterschiedlichem Maße in das Zellmedium gelangt sein und dies einen möglichen Effekt auf die Insulinsekretion

verschleiert haben. Eine andere mögliche Erklärung liegt in der Durchführung der Versuche. Da die Mittelwerte von zwei der drei Durchläufe einen geringeren Abstand zueinander hatten als zum dritten Durchlauf, könnte auch ein Aktivitätsverlust der Chemikalien des Insulin ELISAs eine Erklärung sein. Die ELISAs wurden an unterschiedlichen Tagen durchgeführt und für alle Durchläufe wurden vorbereitete Chemikalien aus einem vorherigen Kit benutzt. Diese wurden bereits auf Raumtemperatur erwärmt und wieder gekühlt.

Die Glukosesensitivität der Insulinausschüttung ist eine zentrale Eigenschaft der MIN6 Zelle, die sie bereits seit Isolation aufweist (Ishihara et al. 1993). Gerade bei MIN6 Zellen hoher Passagen konnte jedoch eine verminderte Sensibilität gegenüber Glukose beobachtet werden (Cheng et al. 2012). In einer Studie wurden MIN6 Zellen nach einer einstündigen Präinkubation mit 3,3 mmol/L Glukose für eine Stunde mit 3,3 mmol/L oder 16 mmol/L Glukose inkubiert. Anschließend wurden die Auswirkungen von 5 mmol/L oder 33,3 mmol/L Glukose auf die Insulinsekretion und -expression nach 24, 48 und 72 Stunden beobachtet. Unter einer Glukosekonzentration von 33 mmol/L konnte nach 48 und 72 Stunden eine deutliche Verminderung der Insulinsekretion festgestellt werden (Mao et al. 2017). Dies zeigt in Zusammenschau mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten, dass eine kurzfristige Exposition gegenüber Glukose eine stimulierende oder neutrale Wirkung hat, diese aber bei längerer Inkubation toxische Effekte auf die Zelle ausübt. Der Effekt der Glukosestimulation auf die intrazelluläre Insulinkonzentration schwächte sich bei höheren Konzentrationen von Ölsäure ab (Siehe Abbildung 40). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass Ölsäure die Sekretion von Insulin verhindern könnte. Diese Beobachtungen decken sich mit den Beobachtungen aus anderen Studien. In der Literatur gibt es bereits Hinweise darauf, dass eine Exposition gegenüber Fettsäuren die glukosestimulierte Insulinsekretion inhibiert (Sako und Grill 1990; Paolisso et al. 1995).

Eine Auswirkung der verschiedenen Glukosekonzentrationen auf die Glutaredoxin 5-Expression (Siehe Abbildung 22, 23) und Konzentration (Siehe Abbildung 51, 52) konnte in den hier durchgeführten Experimenten nicht festgestellt werden. Der Glutaredoxin 5-Stoffwechsel wird also vermutlich nicht durch Glukose reguliert. Dies ließ sich ebenfalls in einer anderen Studien beobachten (Petry et al. 2022).

### 4.2.3 Die Effekte der Zytokine auf den Stoffwechsel der MIN6 Zelle

Die chronische Inflammation ist zusammen mit Glukotoxizität und Lipotoxizität ein wichtiger Faktor der Pathophysiologie des Diabetes mellitus. In dieser Arbeit wurde die chronische Inflammation durch eine Mischung verschiedener proinflammatorischer Zytokine, bestehend aus 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 100 ng/ml INF- $\gamma$  und 5 ng/ml IL-1 $\beta$ , simuliert. Diese Mischung wurde bereits in verschiedenen anderen Studien zur Simulation einer chronischen Entzündung genutzt (Damame et al. 2020; Hanschmann et al. 2020).

In den durchgeführten Experimenten zeigte die Exposition der MIN6 Zellen gegenüber des Zytokinmixes keinen signifikanten Einfluss auf die metabolische Aktivität der MIN6 Zellen (Siehe Abbildung 6, 7). Es ließ sich lediglich eine nicht signifikante Verringerung in einzelnen Zuständen beobachten. Eine Exposition gegenüber proinflammatorischen Zytokinen führte sowohl in einem Experiment mit RINr1046-38 Zellen, als auch in einem Experiment mit MIN6 Zellen über die Aktivierung von Caspasen und die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu erhöhten Apoptoseraten (Ishizuka et al. 1999; Parkash et al. 2005). In einem anderen Experiment konnte beobachtet werden, dass die Inkubation von MIN6 Zellen mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  und 100 ng/ml INF- $\gamma$ , sowohl alleine, als auch in Kombination, einen negativen Effekt auf die metabolische Aktivität im MTT hatte (Cao et al. 2013). Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die metabolische Aktivität der MIN6 bei einer Inkubation mit den inflammatorischen Zytokinen über einen längeren Zeitraum als 24 Stunden deutlich gesunken ist (Cao et al. 2013). Hieraus lässt sich vermuten, dass eine längere Inkubation eine eindeutigere Absenkung der metabolischen Aktivität zeigen könnte.

In den erhobenen Daten ließ sich eine tendenzielle Verminderung der Insulinproduktion (Siehe Abbildung 41, 42) und -sekretion (Siehe Abbildung 47, 48) feststellen. Derselbe Effekt ließ sich bereits in einer anderen Studie an INS-1E Zellen beobachten. Eine Exposition gegenüber inflammatorischen Zytokinen für 24 Stunden führte hier zu einer verminderten glukosestimulierten Insulinsekretion (Barlow et al. 2018). Dieselben Effekte von Zytokinen auf die Insulinsekretion wurden auch bei humanen 1.1B4 Betazellen gefunden (Vasu et al. 2014). Über die Aktivierung von NF $\kappa$ B (Cnop et al.

2005) sorgen inflammatorische Zytokine für eine Aktivierung der NO-Synthetase und erhöhen dadurch den intrazellulären NO-Spiegel (Corbett et al. 1991; Corbett et al. 1993). Dieser hemmt die Aktivität der Atmungskette (Welsh et al. 1991; Welsh und Sandler 1992) und erhöht den oxidativen Stress (Cnop et al. 2005). Dies resultiert in einer verminderten Insulinsekretion.

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zeigten eine durch inflammatorische Zytokine reduzierte Expression von Ins1 und Ins2 (Siehe Tabelle 11,12). Aus Experimenten an INS1 Zellen mit Zytokinen gibt es bereits Hinweise, dass die Expression von Insulin durch eine verminderte Expression von PDX1 reguliert wird (Kutlu 2003; Moor 2011). Außerdem ließ sich in einem Experiment mit humanen 1.1B4 Betazellen nach 18-stündiger Inkubation mit IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  eine Reduktion der INS Genexpression zeigen (Vasu et al. 2014).

Ein negativer Effekt auf die Glutaredoxin 5-Konzentration und Expression ließ sich in keinem der Experimente feststellen. Dies wurde auch bereits von Petry et al. nach 24 stündiger Inkubation von MIN6 Zellen mit einem Zytokinmix aus IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  beobachtet (Petry et al. 2022).

#### 4.2.4 Klinische Aspekte

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen wichtige Aspekte, die auch bereits in die aktuellen Strategien zur Prävention und Therapie von Diabetes Typ 2 einfließen. Diabetes Typ 2 entwickelt sich typischerweise progredient aus einer sogenannten impaired glucose tolerance (IGT) und/oder einer impaired fasting glucose (IFG) (Tabák et al. 2012). Die IGT beschreibt eine pathologische, unzureichende Reaktion des Körpers auf einen Anstieg der Blutglukose und kann in der Klinik durch einen sogenannten oralen Glukose Toleranztest bestimmt werden (DeFronzo 2015). Hier wird eine einheitliche Menge Glukose verabreicht und der Blutzuckerspiegel nach 2 Stunden bestimmt. Ist dieser erhöht, aber noch nicht oberhalb des Grenzwertes für Diabetes mellitus, spricht das für eine pathologische Reaktion auf Blutzuckererhöhungen (Tabák et al. 2012). Die IFG beschreibt einen erhöhten Nüchternblutzucker. Man misst diese durch Erhebung des Nüchternblutzuckers. Ist diese erhöht, aber noch nicht oberhalb der Definition des Diabetes mellitus, spricht man von einer IFG (DeFronzo 2015). Liegen sowohl IFG, als

auch IGT bei einem Patienten vor liegt die Wahrscheinlichkeit einen Diabetes mellitus Typ 2 zu entwickeln bei circa 20 % pro Jahr (Santaguida et al. 2005). Durch eine Lebensstilintervention lässt sich dieses Risiko um 30-60 % reduzieren (Yamaoka und Tango 2005; Gillies et al. 2007). Einer der zentralen Bausteine dieser Lebensstilintervention ist die Umstellung der Ernährung mit Kalorienrestriktion und der Aufnahme von mehr Ballaststoffen (Steyn et al. 2004). Eine Kalorienrestriktion geht auch mit einer verminderten Zufuhr von Energieträgern, wie Glukose und Fettsäuren einher. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit, die vor allem einen zellschädigenden Effekt durch die Exposition gegenüber hohen Konzentrationen von Fettsäuren zeigen (Siehe Tabelle 7, 8), lässt sich ein Aspekt der Effektivität dieses Vorgehens erklären.

Die Therapie von Übergewicht ist ebenfalls zentraler Bestandteil der Therapie eines Prädiabetes oder eines manifesten Diabetes mellitus. Ein hoher Anteil von hormonell aktiven Adipozyten kann zu einer Verstärkung der Insulinresistenz und zu einer systemischen Inflammation führen (Tataranni und Ortega 2005). Außerdem zeigte sich ein gesteigerter Umsatz freier Fettsäuren (Tataranni und Ortega 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass dies besonders im Kontext der Lipotoxizität ein Risikofaktor für den Progress von Diabetes mellitus ist (Siehe Tabelle 7,8). Ebenso zeigten sich die schädlichen Effekte von inflammatorischen Zytokinen durch tendenzielle Verringerung der Viabilität (Siehe Tabelle 11,12) und zusätzliche Reduktion der Insulinexpression und -sekretion (Siehe Tabelle 11,12). Bevor sich ein positiver Effekt durch die Reduktion des Körpergewichtes aufgrund einer energierestriktiven Diät einstellte, ließen sich bereits positive Veränderungen des Stoffwechsels durch die Änderung der Ernährungsgewohnheit beobachten (Lim et al. 2011). Ein Aspekt dieses Effektes ist mit den Ergebnissen dieser Arbeit gut erklärbar. Durch die verringerte Exposition der Betazellen gegenüber hohen Konzentrationen an vor allem Glukose und Fettsäuren, die hohe Mengen an Energie beinhalten, ist der metabolische Stress, der auf die Betazellen ausgeübt wird, deutlich reduziert. Die negativen Effekte dieses metabolischen Stresses (siehe Tabelle 7,8), wie die Verringerung der metabolischen Aktivität oder die Hemmung der Insulingenexpression, -synthese und -sekretion sind somit reduziert und eine Erholung der Stoffwechsellage durch ein Beenden der Exposition erscheint plausibel.

Ebenso lässt sich der positive Effekt eines der zentralen Medikamente zur antidiabetischen Therapie erklären, dem Metformin. Metformin ist nach der Lebensstilintervention die erste Wahl zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 (Arzneimittelkommission Der Deutschen Apotheker (AMK) et al. 2021). Metformin sorgt im Körper für eine verringerte Synthese und Oxidation von freien Fettsäuren im Körper (Kirpichnikov et al. 2002) und wirkt somit protektiv im Hinblick auf ihren lipotoxischen Effekt (Siehe Tabelle 7,8). Ein anderer Effekt ist die Erhöhung der peripheren Glukoseaufnahme und die Reduktion der hepatischen Gluconeogenese (Kirpichnikov et al. 2002). Dies führt durch Verringerung der Blutglukosespiegel zu einer Verringerung der Glukotoxizität. Über diese Effekte reduziert Metformin das Risiko für die Entwicklung eines manifesten Diabetes mellitus um circa 40 % (Salpeter et al. 2008). In den Ergebnissen dieser Arbeit ließ sich der Effekt der Glukotoxizität nicht sinnvoll nachvollziehen. Dies wurde bereits in Kapitel 4.2.2 diskutiert.

In der Behandlung des manifesten Diabetes mellitus Typ 2 kommt es jedoch auch regelhaft vor, dass in regelmäßigen Abständen die ursprüngliche suffiziente Therapie aufgrund eines Progresses des Diabetes mellitus Typ 2 nicht mehr ausreicht (Turner 1998). Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen Hinweis darauf, dass hohe Fettsäurekonzentrationen einen zentralen, zellschädigenden Effekt auf die Betazelle haben, welcher bei langfristiger Exposition am Betazelluntergang beteiligt ist. Bereits nach 24-stündiger Inkubation mit Ölsäure ließ sich eine deutliche Einschränkung der metabolischen Aktivität (Siehe Tabelle 7,8) und ebenso eine Verringerung der Expression und Sekretion von Insulin (Siehe Tabelle 7,8) beobachten. Da sich die Progredienz des Diabetes mellitus jedoch eher über Jahre bis Jahrzehnte abspielt und sich dieser Zeitraum durch eine 24-stündige Inkubation in einem Experiment nicht adäquat darstellen lässt, kann die zentrale Bedeutung der Fettsäureexposition durch chronische Hyperlipidämien nur erahnt werden.

## 4.4 Limitationen und Vorschläge zur Verbesserung

Aus dem Versuchsdesign und den Laborbedingungen ergeben sich Limitationen in Bezug auf die Interpretation.

Alle Versuche wurden an der immortalisierten, murinen MIN6 Zelllinie durchgeführt. Diese Zelllinie wurde durch Isolation von Gewebe aus einem Insulinom einer genmanipulierten Maus gewonnen. Sowohl der zelluläre Stoffwechsel der Maus als auch der Tumorstoffwechsel unterscheiden sich deutlich vom menschlichen Stoffwechsel. Die MIN6 hat sich jedoch in vielen Experimenten trotzdem als suffizientes Modell zur Untersuchung der sekretorischen Funktion und des Stoffwechsels der menschlichen Betazelle erwiesen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Physiologie der MIN6 Zellen abhängig von ihrer Passage verändert. So nimmt in den hohen Passagen die glukosestimulierte Insulinsekretion ab, die Aktivität antioxidativer Enzyme ist reduziert und die Expression von Enzymen des Lipidstoffwechsels sinkt (Cheng et al. 2012).

Aus den durchgeführten Versuchen ergeben sich durch die angewandte Methodik ebenfalls Limitationen. Ein Beobachtungszeitraum von 24 Stunden ist für die Untersuchung chronischer Erkrankungen wie Diabetes mellitus, welche sich zum Teil über Jahrzehnte entwickeln, sehr kurz.

Eine Verbesserung für die fehlende Glukosesensitivität könnte eine Veränderung der Kultivierung sein. Eine Kultivierung als Pseudoinseln könnte die Insulinsekretion der MIN6 Zellen verstärken (Roderigo-Milne et al. 2002). Es wird vermutet, dass die Zell-Zell Kontakte zwischen den MIN6 Zellen die Insulinsekretion verstärken (Roderigo-Milne et al. 2002).

Die Interpretation der Genexpression über eine qPCR liefert relative Ergebnisse und keine absoluten Expressionsraten. Außerdem zeigten sich teils deutliche Unterschiede zwischen den Effizienzen der verschiedenen Primer. Bereits kleine Abweichungen können zu einer Veränderung des Ergebnisses führen und somit die Aussagekraft der betroffenen Datensätze deutlich einschränken (Pfaffl 2001). Aus diesem Grund wurde versucht diese Unterschiede durch die Auswertung mithilfe eines effizienz-korrigierten

Quantifizierungsmodells zu kompensieren (Pfaffl 2001). Da eine exakte Verdopplung der cDNA die Aussagekraft der Daten deutlich verbessern würde, könnte es lohnenswert sein das PCR-Protokoll zu modifizieren. Eine Möglichkeit wäre es, geringere Konzentrationen der Primer für die qPCR zu benutzen. Hierdurch wäre die Wahrscheinlichkeit verringert, dass diese sich gegenseitig binden. Es kann somit zu einer verminderten Effizienz der qPCR führen. Außerdem könnte man versuchen, andere Primer für die Detektion der Gene zu designen.

Ebenso wurde aufgrund der hohen Varianzen in der Insulinsekretion und dem intrazellulären Glutaredoxin 5-Gehalt ebenfalls eine Relativierung durchgeführt. So war es uns möglich Tendenzen innerhalb der einzelnen Durchläufe miteinander zu vergleichen.

Eine Erhöhung der Stichprobenzahl wäre sinnvoll, um die Schwankungen zwischen den Durchgängen weiter zu evaluieren. Bei gleichbleibendem Mittelwert und konstanter Varianz, wären zum Beispiel ab zehn Wiederholungen die Verminderung der intrazellulären Glutaredoxin 5 Konzentration für 3 mM im Vergleich zu 0 mM ohne Zytokineinfluss signifikant. Außerdem wäre nach zwei zusätzlichen Durchgängen bei gleichbleibendem Mittelwert und konstanter Varianz der Einfluss von 3 mM Ölsäure im Vergleich zu 0 mM Ölsäure auf die Glutaredoxin 5 Expression signifikant.

## 4.5 Zukunftsperspektiven

Die vorliegenden Versuchsergebnisse und die Ergebnisse anderer Studien legen nahe, dass die weitere Erforschung des Zusammenhangs von Glutaredoxin 5 und Eisenüberladung in Verbindung mit Diabetes mellitus erfolgsversprechend sein könnte. Es bieten sich verschiedene Ansatzpunkte an.

Zellexperimente mit Zelllinien, die eine Über- oder Unterexpression von Glutaredoxinen bieten, könnten weitere Hinweise auf die Rolle von Glutaredoxin 5 liefern. So könnten zum Beispiel Hinweise auf einen möglichen regulatorischen Mechanismus zwischen Glutaredoxin 5 und der glukosestimulierten Insulinsekretion aufgezeigt werden.

Neben den hier beschriebenen Genen wäre noch die Expression weiterer Gene des Eisenstoffwechsels, wie zum Beispiel Hepcidin, IRP2, oder Ferroptosemarker

interessant. Die Ergänzung dieser Messung durch Konzentrationsbestimmung der Proteine wäre ebenfalls interessant. Außerdem könnte man versuchen die Aktivität einzelner zentraler Eisen-Schwefel-Cluster Enzyme im vorliegenden Versuchsprotokoll zu untersuchen, um somit weitere Evidenz für den Effekt eines Glutaredoxin 5-Mangels zu finden.

Des Weiteren wäre eine klinische Studie mit Diabetes mellitus Patienten sinnvoll, um die weitere klinische Relevanz eines Glutaredoxin 5-Mangels und einer möglicherweise assoziierten Ferroptose zu evaluieren. Glutaredoxin 5 ist ein Protein, welches von den Inselzellen nicht sekretiert wird (Sun 2021), sondern ausschließlich intrazellulär vorkommt. Es wäre also interessant, Gewebeprobe aus dem Pankreas von Patienten mit Diabetes mellitus auf ihren Eisenstatus und die Glutaredoxin 5-Konzentration zu untersuchen. Dies gestaltet sich aufgrund der Invasivität jedoch schwierig. Interessant wäre ebenfalls, ob die periphere Glutaredoxin 5-Konzentration in Leukozyten von Patienten mit Diabetes mellitus mit der funktionalen  $\beta$ -Zellmasse im Pankreas und der Insulinsekretion korreliert. Hierdurch könnte das Potenzial von Glutaredoxin 5 als Marker für die Betazellfunktion untersucht werden.

Im Kontext der Glukotoxizität gibt es Hinweise, dass Hepcidin eine Rolle in der Eisenüberladung der Betazelle spielen könnte (Shu et al. 2019). Ergänzend wäre also eine Untersuchung der Expression und intrazellulären Konzentration von Hepcidin interessant. Weitere Versuche an anderen Zelllinien sind ebenfalls zur weiteren Verifizierung der Ergebnisse vonnöten.

## 5 Zusammenfassung

Diabetes mellitus Typ 2 ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die aufgrund ihrer hohen Prävalenz und schweren Folgeerkrankungen gesundheitliche, gesellschaftliche und wirtschaftliche Relevanz besitzt. Die Schädigung und der Funktionsverlust der Betazelle spielen in der Pathophysiologie zusammen mit der peripheren Insulinresistenz eine zentrale Rolle. Es gibt viele Hinweise darauf, dass Hyperglykämie, Hyperlipidämie und eine chronische Entzündungsreaktion zentrale Faktoren der Betazell dysfunction sind. Es gibt vereinzelt Hinweise darauf, dass Glutaredoxin 5, als Kofaktor für die Produktion zentraler Stoffwechsellzyme, eine größere Rolle in der Pathophysiologie des Diabetes mellitus zukommen könnte. Ebenso wurde im Kontext eines Glutaredoxin 5 Mangels eine Eisenüberladung beobachtet. Ungeklärt sind bisher sowohl die Regulation von Glutaredoxin 5, als auch die Faktoren, die zu einer Dysregulation des Eisenstoffwechsels führen. Zur Untersuchung dieser Sachverhalte wurden MIN6 Zellen diabetischen Stoffwechseleinflüssen durch die Exposition mit Ölsäure, Glukose und inflammatorischen Zytokinen ausgesetzt. Anschließend wurde mittels MTT, qPCR und ELISA die Viabilität, intrazelluläre Insulin- und Glutaredoxin 5-Konzentration, Insulinsekretion und -produktion, sowie Marker des Eisenstoffwechsels untersucht. Es ließ sich die Hemmung der Insulinsynthese und -sekretion durch Zytokine und Ölsäure beobachten. Ein additiver Effekt der einzelnen Stressoren auf den Insulinstoffwechsel zeigte sich nicht. Die Expression und intrazelluläre Konzentration von Glutaredoxin 5 wurde nur durch Ölsäure tendenziell reguliert. Die Regulation des Eisenstoffwechsels zeigte vor allem eine vermehrte IRP1 Expression bei hoher metabolischer Belastung der MIN6 Zellen. Hohe Konzentrationen von Ölsäure erhöhten die Konzentration von IRP1, möglicherweise als Reaktion auf eine abnehmende Aktivität der zytosolischen Aconitase infolge eines Glutaredoxin 5-Mangels. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben weitere Hinweise darauf, dass die Dysregulation des Glutaredoxin 5-Stoffwechsels Einfluss auf die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 haben könnte. Die Regulation des Glutaredoxin 5-Stoffwechsels erfolgt in MIN6 Zellen in Zusammenschau der Ergebnisse der drei verwendeten Stressoren am ehesten abhängig von Ölsäure. Die Stoffwechselwege, die die Effekte eines Glutaredoxin 5-Mangels induzieren und ihre Relevanz in der Pathophysiologie müssen jedoch weiter untersucht werden.

## 6 Summary

Type 2 diabetes mellitus is a chronic metabolic disease that has health, social and economic relevance due to its high prevalence and its severe secondary diseases. The damage and loss of function of the beta cell play a central role in the pathophysiology together with insulin resistance. There is much evidence that hyperglycemia and hyperlipidemia, together with a chronic inflammation, are important triggers of beta cell dysfunction and cell death. There is evidence that glutaredoxin 5 may play a major role in the pathophysiology of diabetes mellitus. Glutaredoxin 5 is an important protein that serves as a cofactor in the production of iron-sulfur cluster enzymes. The iron-sulfur cluster enzymes form enzymes in central metabolic pathways, such as the citrate cycle and the respiratory chain. In addition, other experiments have shown that cells suffer from iron overload in the context of glutaredoxin 5 deficiency. The regulation of glutaredoxin 5 as well as the factors that lead to a dysregulation of iron metabolism are still unclear. To investigate these issues, MIN6 cells were subjected to diabetic metabolic influences through exposure to oleic acid, glucose and inflammatory cytokines. Subsequently, the cells were analyzed by MTT, qPCR and ELISA for viability, intracellular insulin and glutaredoxin 5 concentration, insulin secretion and production, and markers of iron metabolism. The inhibition of insulin synthesis and secretion by cytokines and oleic acid was observed. There was no additive effect of the individual stressors on insulin metabolism. The expression and intracellular concentration of glutaredoxin 5 tended to be regulated only by oleic acid exposure. Cytokines and glucose had no effect on glutaredoxin 5 metabolism. The regulation of gene expression of proteins of iron metabolism mainly showed an increased IRP1 expression at high metabolic stress of MIN6 cells. High concentrations of oleic acid increased the concentration of IRP1, possibly in response to a decrease in cytosolic aconitase activity due to glutaredoxin 5 deficiency. The results of this study provide further evidence that the dysregulation of glutaredoxin 5 metabolism could have an influence on the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. The regulation of glutaredoxin 5 metabolism in MIN6 cells is most likely dependent on oleic acid. However, the metabolic pathways that induce the effects of glutaredoxin 5 deficiency and their relevance in pathophysiology of diabetes mellitus require further investigation.

## 7 Publikationsverzeichnis

Posterpräsentation auf dem Science Day 2022 (11.11.2022) des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen:

„Wirkung diabetischer Stoffwechsellagen auf Glutaredoxin 5 und den Eisenstoffwechsel in MIN-6 Zellen“

## 8 Tabellenverzeichnis

Tab 1: Kombination der verschiedenen Stressoren:.....	31
Tab 2: Ausreißer Datensatz MTT: .....	32
Tab 3: Ausreißer Datensatz MTT: .....	32
Tab 4: Effizienzermittlung der PCR Primer:.....	38
Tab 5: Ausreißer Datensatz PCR: .....	40
Tab 6: Legende:.....	94
Tab 7: Ergebnisse der Ölsäureexposition ohne Zytokinmix: .....	95
Tab 8: Ergebnisse der Ölsäureexposition mit Zytokinmix: .....	95
Tab 9: Glukoseexposition ohne Exposition gegenüber des Zytokinmixes: .....	97
Tab 10: Glukoseexposition mit Exposition gegenüber des Zytokinmixes:.....	97
Tab 11: Einfluss des Zytokinmixes bei einer Glukosekonzentration von 3 mM: .....	98
Tab 12: Einfluss des Zytokinmixes bei einer Glukosekonzentration von 16 mM: .....	98

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MIN6 Zellen in Kultur, Passage 53 .....	26
Abbildung 2: Metabolische Aktivität der MIN6 Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Die metabolische Aktivität verringert sich durch Ölsäure konzentrationsabhängig sowohl mit, als auch ohne Zytokinmix. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der metabolischen Aktivität eines nicht mit Stressoren behandelten Standards gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.4). N= 3.....	41
Abbildung 3: Metabolische Aktivität der MIN6 Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es lässt sich eine konzentrationsabhängige Verringerung der metabolischen Aktivität durch Ölsäure erkennen. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der metabolischen Aktivität eines nicht mit Stressoren behandelten Standards gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.4). N= 3.....	42
Abbildung 4: Metabolischen Aktivität der MIN6 Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Es lässt sich erkennen, dass Glukose in allen beobachteten Zuständen einen nicht-signifikanten steigernden Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen hat. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der metabolischen Aktivität eines nicht mit Stressoren behandelten Standards gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.4). N= 3..	43
Abbildung 5: Metabolische Aktivität der MIN6 Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit einem Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ), Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Es lässt sich erkennen, dass Glukose in allen beobachteten Zuständen einen nicht-signifikanten steigernden Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen hat. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der metabolischen Aktivität eines nicht mit Stressoren behandelten Standards gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.4). N= 3..	44

Abbildung 6: Metabolische Aktivität der MIN6 Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Lediglich bei Exposition mit 1,5 mM Ölsäure lässt sich eine tendenzielle Verringerung der metabolischen Aktivität durch den Zytokinmix beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der metabolischen Aktivität eines nicht mit Stressoren behandelten Standards gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.4). N= 3.....45

Abbildung 7: Metabolische Aktivität der MIN6 Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Es erfolgte eine Behandlung der Zellen mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Lediglich bei Exposition mit 1,5 mM Ölsäure lässt sich eine tendenzielle Verringerung der metabolischen Aktivität durch den Zytokinmix beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der metabolischen Aktivität eines nicht mit Stressoren behandelten Standards gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.4). N= 3 ..46

Abbildung 8: Expressionsunterschied von Ins1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es lässt sich erkennen, dass Ölsäure die Expression von Ins1 konzentrationsabhängig reduziert. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....47

Abbildung 9: Expressionsunterschied von Ins1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es lässt sich erkennen, dass Ölsäure die Expression von Ins1 konzentrationsabhängig reduziert. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....48

Abbildung 10: Expressionsunterschied von Ins1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Glukose zeigt keinen Einfluss auf die Expression von Ins1. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....49

Abbildung 11: Expressionsunterschied von Ins1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit dem Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ) und verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Glukose zeigt keinen Einfluss auf die Expression von Ins1. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....50

Abbildung 12: Expressionsunterschied von Ins1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Verminderung der Ins1 Expression durch den Zytokinmix bei Exposition gegenüber 0 mM und 1,5 mM Ölsäure. Abschwächung des Effekts bei hohen Ölsäurekonzentrationen. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....51

Abbildung 13: Expressionsunterschied von Ins1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Verminderung der Ins1 Expression durch den Zytokinmix bei Exposition gegenüber 0 mM und 1,5 mM Ölsäure. Abschwächung des Effekts bei hohen Ölsäurekonzentrationen. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....52

Abbildung 14: Expressionsunterschied von Ins2 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es lässt sich eine konzentrationsabhängige Verminderung der Exposition von Ins2 durch Ölsäure beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....53

Abbildung 15: Expressionsunterschied von Ins2 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es lässt sich eine konzentrationsabhängige Verminderung durch Ölsäure auf die Exposition von Ins2 beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....54

Abbildung 16: Expressionsunterschied von Ins2 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von

Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Es zeigt sich eine tendenzielle Verringerung der Ins2 Expression durch 16 mM Glukose. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....55

Abbildung 17: Expressionsunterschied von Ins2 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit dem Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ) und verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Es zeigt sich eine signifikante Verringerung der Exposition von Ins2 durch Glukose bei zusätzlicher Exposition gegenüber 1,5 mM Ölsäure. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....56

Abbildung 18: Expressionsunterschied von Ins2 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es lässt sich eine signifikante Verringerung der Expression von Ins2 durch den Zytokinmix beobachten. Dieser Effekt schwächt sich bei zusätzlicher Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure ab. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3.....57

Abbildung 19: Expressionsunterschied von Ins2 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Die Expression von Ins2 zeigt sich durch den Zytokinmix bei 0 mM Ölsäure tendenziell und bei 1,5 mM Ölsäure signifikant erniedrigt. Bei zusätzlicher Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure lässt sich der Effekt des Zytokinmixes nicht mehr beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3.....58

Abbildung 20: Expressionsunterschied von Glrx5 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es zeigt sich eine tendenzielle, konzentrationsabhängige Reduktion der Glrx5 Konzentration ohne Exposition mit dem Zytokinmix. Bei zusätzlicher Exposition mit dem Zytokinmix lässt sich kein konzentrationsabhängiger Effekt von Ölsäure beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....59

Abbildung 21: Expressionsunterschied von Glrx5 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es zeigt sich eine tendenzielle Reduktion der Expression von Glrx5 durch 1,5 mM Ölsäure ohne Exposition mit dem Zytokinmix. Bei zusätzlicher Exposition mit dem Zytokinmix lässt sich kein eindeutiger Effekt von Ölsäure beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3.....60

Abbildung 22: Expressionsunterschied von Glrx5 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Es zeigt sich kein Einfluss von Glukose auf die Expression von Glrx5. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3.....61

Abbildung 23: Expressionsunterschied von Glrx5 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit dem Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ) und verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Es zeigt sich kein Einfluss von Glukose auf die Expression von Glrx5. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3.....62

Abbildung 24: Expressionsunterschied von Glrx5 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss des Zytokinmixes auf die Expression von Glrx5. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....63

Abbildung 25: Expressionsunterschied von Glrx5 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss des Zytokinmixes auf die Expression von Glrx5. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....64

Abbildung 26: Expressionsunterschied von FTL im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3

mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Ölsäure, Glukose und Zytokine zeigen keinen Einfluss auf die Expression von FTL. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....65

Abbildung 27: Expressionsunterschied von FTL im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Ölsäure, Glukose und Zytokine zeigen keinen Einfluss auf die Expression von FTL. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....66

Abbildung 28: Expressionsunterschied von IRP1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Unter Exposition von 3 mM Ölsäure zeigt sich sowohl unter zusätzlicher Gabe des Zytokinmixes, als auch ohne eine tendenzielle Erhöhung der IRP1 Expression. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....67

Abbildung 29: Expressionsunterschied von IRP1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Unter Exposition mit 16 mM Glukose und 3 mM Ölsäure zeigt sich sowohl unter Einfluss von Zytokinen oder ohne Zytokine eine signifikante Erhöhung der Expression von IRP1. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....68

Abbildung 30: Expressionsunterschied von IRP 1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Deutliche Erhöhung der Expression von IRP1 durch Glukose bei zusätzlicher Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....69

Abbildung 31: Expressionsunterschied von IRP 1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit dem Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ) und verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Kein

signifikanter Einfluss von Glukose auf die Expression von IRP1 bei zusätzlicher Zytokinexposition. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 ....70

Abbildung 32: Expressionsunterschied von IRP1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Kein Einfluss von Zytokinen auf die Expression von IRP1. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....71

Abbildung 33: Expressionsunterschied von IRP1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es lässt sich kein Einfluss von Zytokinen auf die Expression von IRP1 beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....72

Abbildung 34: Expressionsunterschied von TFR1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss von Ölsäure auf die Expression von Tfr1. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....73

Abbildung 35: Expressionsunterschied von TFR1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss von Ölsäure auf die Expression von Tfr1. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....74

Abbildung 36: Expressionsunterschied von TFR1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Glukose und Zytokine zeigen keinen Einfluss auf die Expression von Tfr1. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....75

Abbildung 37: Expressionsunterschied von TFR1 im Verhältnis zu RPL32 nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Glukose und Zytokine zeigen

keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Tfr1. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3.....76

Abbildung 38: Konzentration von Insulin im Zelllysate im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es lässt sich ein signifikanter, konzentrationsabhängiger Einfluss von Ölsäure auf die intrazelluläre Konzentration von Insulin erkennen. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3.....77

Abbildung 39: Dargestellt ist die Konzentration von Insulin im Zelllysate im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es lässt sich ein signifikanter, konzentrationsabhängiger Effekt von Ölsäure auf die intrazelluläre Konzentration von Insulin erkennen. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3.....78

Abbildung 40: Dargestellt ist die Konzentration von Insulin im Zelllysate im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Es lässt sich eine tendenzielle Verringerung der Insulinkonzentration im Zelllysate durch 16 mM Glukose bei 0 mM Ölsäure erkennen. Bei Exposition gegenüber höheren Ölsäure-konzentrationen nimmt der Effekt ab. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....79

Abbildung 41: Konzentration von Insulin im Zelllysate im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Bei Exposition gegenüber 0 mM Ölsäure und 1,5 mM Ölsäure lässt sich eine tendenzielle Verringerung der intrazellulären Insulinkonzentration beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3.....80

Abbildung 42: Konzentration von Insulin im Zelllysate im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF-

$\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Unter Exposition gegenüber 16 mM Glukose lässt sich kein signifikanter Effekt des Zytokinmixes beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. N= 3 .....81

Abbildung 43: Dargestellt sind die Insulinkonzentrationen im Medium im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). 3 mM Ölsäure senkt bei Exposition mit 3 mM Glukose sowohl unter Einfluss des Zytokinmixes, als auch ohne Einfluss des Zytokinmixes die extrazelluläre Insulinkonzentration signifikant. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der extrazellulären Insulinkonzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N= 3 .....82

Abbildung 44: Dargestellt sind die Insulinkonzentrationen im Medium im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es zeigt sich eine konzentrationsabhängige Verringerung der extrazellulären Insulinkonzentration durch Ölsäure. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der extrazellulären Insulinkonzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N= 3 .....83

Abbildung 45: Dargestellt sind die Insulinkonzentrationen im Medium im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Es lässt sich kein signifikanter Einfluss von Glukose auf die extrazelluläre Insulinsekretion erkennen. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der extrazellulären Insulinkonzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N= 3 .....84

Abbildung 46: Dargestellt sind die Insulinkonzentrationen im Medium im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung der Zellen mit dem Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ) und verschiedenen Konzentrationen von Ölsäure (0

mM, 1,5 mM oder 3 mM) und Glukose (3 mM oder 16 mM). Es lässt sich kein signifikanter Effekt von Glukose auf die extrazelluläre Insulinkonzentrationen erkennen. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der extrazellulären Insulinkonzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N= 3 .....85

Abbildung 47: Dargestellt sind die Insulinkonzentrationen im Medium im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es zeigt sich eine tendenzielle Verringerung der extrazellulären Insulinkonzentration durch den Zytokinmix. Bei zusätzlicher Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure lässt sich dieser Effekt nicht mehr beobachten. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der extrazellulären Insulinkonzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N= 3. ....86

Abbildung 48: Dargestellt sind die Insulinkonzentrationen im Medium im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es zeigt sich eine tendenzielle Verringerung der extrazellulären Insulinkonzentration durch den Zytokinmix. Bei Exposition gegenüber 3 mM Ölsäure zeigt sich kein Effekt mehr. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der extrazellulären Insulinkonzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N= 3.....87

Abbildung 49: Dargestellt sind die Glutaredoxin 5-Konzentrationen im Lysat im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 3 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es zeigt sich eine Verringerung des Glutaredoxin 5 Gehaltes bei 3 mM Ölsäure. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der intrazelluläre Glutaredoxin 5-Konzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N= 3 .....88

Abbildung 50: Dargestellt sind die Glutaredoxin 5-Konzentrationen im Lysat im Verhältnis zur Proteinkonzentration nach 24-stündiger Inkubation. Behandlung mit 16



Zellen mit 16 mM Glukose, Ölsäure (0 mM, 1,5 mM oder 3 mM) und mit oder ohne Zytokinmix (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL- $\beta$ ). Es zeigt sich kein Einfluss des Zytokinmixes auf die intrazelluläre Glutaredoxin 5-Konzentration. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der intrazelluläre Glutaredoxin 5-Konzentration von nicht mit Stressoren behandelten Zellen gesetzt (Siehe Kapitel 2.2.2.4). N= 3 .....93

## 10 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine serum albumine
cDNA	Complementary desoxyribonucleicacid
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT1	Divalent Metal Transporter 1
DNA	Desoxyribonucleicacid
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fetal bovine serum
FTH	Ferritin heavy chain
FTL	Ferritin light chain
GLUT2	Glukosetransporter 2
HRP	Horseradish peroxidase
IRE	Iron responsive element
IRP 1,2	Iron responsive protein 1, 2
MIN6	Mouse insolinoma cells 6. Subclone
mRNA	Messenger ribonucleicacid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

qPCR	Real Time Quantitative PCR
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonucleicacid
RPL32	Ribosomal Protein L32
TfR1	Transferrinrezeptor 1
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
WHO	World Health Organisation

# 11 Literaturverzeichnis

Albracht, S.P.J. (1980): The prosthetic groups in succinate dehydrogenase Number and stoichiometry. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 612 (1), S. 11–28. DOI: 10.1016/0005-2744(80)90274-0.

American Diabetes Association (2003): Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. In: *Diabetes care* 26 Suppl 1, S5-20. DOI: 10.2337/diacare.26.2007.s5.

Amo, Taku; Sato, Shigeto; Saiki, Shinji; Wolf, Alexander M.; Toyomizu, Masaaki; Gautier, Clement A. et al. (2011): Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects. In: *Neurobiology of disease* 41 (1), S. 111–118. DOI: 10.1016/j.nbd.2010.08.027.

Arosio, Paolo; Carmona, Fernando; Gozzelino, Raffaella; Maccarinelli, Federica; Poli, Maura (2015): The importance of eukaryotic ferritins in iron handling and cytoprotection. In: *The Biochemical journal* 472 (1), S. 1–15. DOI: 10.1042/BJ20150787.

Arzneimittelkommission Der Deutschen Apotheker (AMK); Arzneimittelkommission Der Deutschen Ärzteschaft (AkdÄ); Deutsche Dermatologische Gesellschaft E. V. (DDG); Deutsche Diabetes Gesellschaft E. V. (DDG); Deutsche Gesellschaft Der Plastischen, Rekonstruktiven Und Ästhetischen Chirurgen E. V.; Deutsche Gesellschaft Für Allgemeinmedizin Und Familienmedizin E. V. (DEGAM) et al. (2021): NVL Typ-2-Diabetes – Teilpublikation der Langfassung, 2. Auflage: Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF).

Baker, Marshall S.; Chen, Xiaojuan; Rotramel, Alizah; Nelson, Jeffrey; Kaufman, Dixon B. (2003): Proinflammatory cytokines induce NF-kappaB-dependent/NO-independent chemokine gene expression in MIN6 beta cells. In: *Journal of Surgical Research* 110 (1), S. 295–303. DOI: 10.1016/S0022-4804(03)00027-1.

Barbouti, Alexandra; Amorgianiotis, Christos; Kolettas, Evangelos; Kanavaros, Panagiotis; Galaris, Dimitrios (2007): Hydrogen peroxide inhibits caspase-dependent apoptosis by inactivating procaspase-9 in an iron-dependent manner. In: *Free Radical*

*Biology and Medicine* 43 (10), S. 1377–1387. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.020.

Barlow, Jonathan; Solomon, Thomas P. J.; Affourtit, Charles (2018): Pro-inflammatory cytokines attenuate glucose-stimulated insulin secretion from INS-1E insulinoma cells by restricting mitochondrial pyruvate oxidation capacity - Novel mechanistic insight from real-time analysis of oxidative phosphorylation. In: *PloS one* 13 (6), e0199505. DOI: 10.1371/journal.pone.0199505.

Beggs, Mark; Beresford, Guy; Clarke, Jennifer; Mertz, Robert; Espinal, Joseph; Hammonds, Peter (1990): Interleukin-1 $\beta$  inhibits glucokinase activity in clonal HIT-T15  $\beta$ -cells. In: *FEBS Letters* 267 (2), S. 217–220. DOI: 10.1016/0014-5793(90)80928-C.

Bellí, Gemma; Polaina, Julio; Tamarit, Jordi; La Torre, María Angeles de; Rodríguez-Manzanaque, María Teresa; Ros, Joaquim; Herrero, Enrique (2002): Structure-function analysis of yeast Grx5 monothiol glutaredoxin defines essential amino acids for the function of the protein. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (40), S. 37590–37596. DOI: 10.1074/jbc.M201688200.

Bensellam, Mohammed; Laybutt, D. Ross; Jonas, Jean-Christophe (2012): The molecular mechanisms of pancreatic  $\beta$ -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 364 (1-2), S. 1–27. DOI: 10.1016/j.mce.2012.08.003.

Berndt, Carsten; Lillig, Christopher Horst (2017): Glutathione, Glutaredoxins, and Iron. In: *Antioxidants & redox signaling* 27 (15), S. 1235–1251. DOI: 10.1089/ars.2017.7132.

Biden, Trevor J.; Boslem, Ebru; Chu, Kwan Yi; Sue, Nancy (2014): Lipotoxic endoplasmic reticulum stress,  $\beta$  cell failure, and type 2 diabetes mellitus. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 25 (8), S. 389–398. DOI: 10.1016/j.tem.2014.02.003.

Bloom, David; Cafiero-Fonseca, Elizabeth; Jane Llopis, Eva; Abrahams-Gessel, Shafika; Bloom, Lakshmi; Fathima, Sana et al. (2011): The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases.

Böni-Schnetzler, Marianne; Boller, Simone; Debray, Sarah; Bouzakri, Karim; Meier, Daniel T.; Prazak, Richard et al. (2009): Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. In: *Endocrinology* 150 (12), S. 5218–5229. DOI: 10.1210/en.2009-0543.

Böni-Schnetzler, Marianne; Meier, Daniel T. (2019): Islet inflammation in type 2 diabetes. In: *Seminars in immunopathology* 41 (4), S. 501–513. DOI: 10.1007/s00281-019-00745-4.

Böni-Schnetzler, Marianne; Thorne, Jeffrey; Parnaud, Géraldine; Marselli, Lorella; Ehses, Jan A.; Kerr-Conte, Julie et al. (2008): Increased interleukin (IL)-1beta messenger ribonucleic acid expression in beta -cells of individuals with type 2 diabetes and regulation of IL-1beta in human islets by glucose and autostimulation. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93 (10), S. 4065–4074. DOI: 10.1210/jc.2008-0396.

Braymer, Joseph J.; Lill, Roland (2017): Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. In: *The Journal of biological chemistry* 292 (31), S. 12754–12763. DOI: 10.1074/jbc.R117.787101.

Brozzi, Flora; Nardelli, Tarliza R.; Lopes, Miguel; Millard, Isabelle; Barthson, Jenny; Igoillo-Esteve, Mariana et al. (2015): Cytokines induce endoplasmic reticulum stress in human, rat and mouse beta cells via different mechanisms. In: *Diabetologia* 58 (10), S. 2307–2316. DOI: 10.1007/s00125-015-3669-6.

Butcher, Matthew J.; Hallinger, Daniel; Garcia, Eden; Machida, Yui; Chakrabarti, Swarup; Nadler, Jerry et al. (2014): Association of proinflammatory cytokines and islet resident leucocytes with islet dysfunction in type 2 diabetes. In: *Diabetologia* 57 (3), S. 491–501. DOI: 10.1007/s00125-013-3116-5.

Camaschella, Clara; Campanella, Alessandro; Falco, Luigia de; Boschetto, Loredana; Merlini, Roberta; Silvestri, Laura et al. (2007): The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. In: *Blood* 110 (4), S. 1353–1358. DOI: 10.1182/blood-2007-02-072520.

Cao, Zhao-hui; Yin, Wei-dong; Zheng, Quan-you; Feng, Shao-long; Xu, Gui-lian; Zhang, Ke-qin (2013): Caspase-3 is involved in IFN- $\gamma$ - and TNF- $\alpha$ -mediated MIN6 cells

apoptosis via NF- $\kappa$ B/Bcl-2 pathway. In: *Cell biochemistry and biophysics* 67 (3), S. 1239–1248. DOI: 10.1007/s12013-013-9642-4.

Cardozo, Alessandra K.; Ortis, Fernanda; Storling, Joachim; Feng, Ying-Mei; Rasschaert, Joanne; Tonnesen, Morten et al. (2005): Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca<sup>2+</sup> ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>, leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. In: *Diabetes* 54 (2), S. 452–461. DOI: 10.2337/diabetes.54.2.452.

Chan, J. Y.; Cooney, G. J.; Biden, T. J.; Laybutt, D. R. (2011): Differential regulation of adaptive and apoptotic unfolded protein response signalling by cytokine-induced nitric oxide production in mouse pancreatic beta cells. In: *Diabetologia* 54 (7), S. 1766–1776. DOI: 10.1007/s00125-011-2139-z.

Chen, Fang; Sha, Min; Wang, Yanyang; Wu, Tijun; Shan, Wei; Liu, Jia et al. (2016): Transcription factor Ets-1 links glucotoxicity to pancreatic beta cell dysfunction through inhibiting PDX-1 expression in rodent models. In: *Diabetologia* 59 (2), S. 316–324. DOI: 10.1007/s00125-015-3805-3.

Chen, Opal S.; Crisp, Robert J.; Valachovic, Martin; Bard, Martin; Winge, Dennis R.; Kaplan, Jerry (2004): Transcription of the yeast iron regulon does not respond directly to iron but rather to iron-sulfur cluster biosynthesis. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (28), S. 29513–29518. DOI: 10.1074/jbc.M403209200.

Cheng, Kim; Delghingaro-Augusto, Viviane; Nolan, Christopher J.; Turner, Nigel; Hallahan, Nicole; Andrikopoulos, Sofianos; Gunton, Jenny E. (2012): High passage MIN6 cells have impaired insulin secretion with impaired glucose and lipid oxidation. In: *PloS one* 7 (7), e40868. DOI: 10.1371/journal.pone.0040868.

Chifman, Julia; Laubenbacher, Reinhard; Torti, Suzy V. (2014): A systems biology approach to iron metabolism. In: *Advances in experimental medicine and biology* 844, S. 201–225. DOI: 10.1007/978-1-4939-2095-2\_10.

Clark, J. L.; Steiner, D. F. (1969): Insulin biosynthesis in the rat: demonstration of two proinsulins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 62 (1), S. 278–285. DOI: 10.1073/pnas.62.1.278.

Cnop, Miriam; Abdulkarim, Baroj; Bottu, Guy; Cunha, Daniel A.; Igoillo-Esteve, Mariana; Masini, Matilde et al. (2014): RNA sequencing identifies dysregulation of the human pancreatic islet transcriptome by the saturated fatty acid palmitate. In: *Diabetes* 63 (6), S. 1978–1993. DOI: 10.2337/db13-1383.

Cnop, Miriam; Welsh, Nils; Jonas, Jean-Christophe; Jörns, Anne; Lenzen, Sigurd; Eizirik, Decio L. (2005): Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. In: *Diabetes* 54 Suppl 2, S97-107. DOI: 10.2337/diabetes.54.suppl\_2.s97.

Cooksey, Robert C.; Jouihan, Hani A.; Ajioka, Richard S.; Hazel, Mark W.; Jones, Deborah L.; Kushner, James P.; McClain, Donald A. (2004): Oxidative Stress,  $\beta$ -Cell Apoptosis, and Decreased Insulin Secretory Capacity in Mouse Models of Hemochromatosis. In: *Endocrinology* 145 (11), S. 5305–5312. DOI: 10.1210/en.2004-0392.

Corbett, J. A.; Lancaster, J. R.; Sweetland, M. A.; McDaniel, M. L. (1991): Interleukin-1 beta-induced formation of EPR-detectable iron-nitrosyl complexes in islets of Langerhans. Role of nitric oxide in interleukin-1 beta-induced inhibition of insulin secretion. In: *Journal of Biological Chemistry* 266 (32), S. 21351–21354. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)54642-1.

Corbett, J. A.; Sweetland, M. A.; Wang, J. L.; Lancaster, J. R.; McDaniel, M. L. (1993): Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (5), S. 1731–1735. DOI: 10.1073/pnas.90.5.1731.

Cordell, B.; Diamond, D.; Smith, S.; Pünter, J.; Schöne, H. H.; Goodman, H. M. (1982): Disproportionate expression of the two nonallelic rat insulin genes in a pancreatic tumor is due to translational control. In: *Cell* 31 (3 Pt 2), S. 531–542. DOI: 10.1016/0092-8674(82)90309-9.

Damame, Hemangee H.; Rooge, Sheetalnath B.; Patil, Rahul S.; Arvindekar, Akalpita U. (2020): In vitro model using cytokine cocktail to evaluate apoptosis in Min6 pancreatic beta cells. In: *Journal of pharmacological and toxicological methods* 106, S. 106914. DOI: 10.1016/j.vascn.2020.106914.

DeFronzo, Ralph A. (2015): Pathogenesis of diabetes Mellitus 2015.

DeFronzo, Ralph A.; Ferrannini, Eleuterio; Alberti, Kurt G. M. M.; Zimmet, Paul (Hg.) (2015): International textbook of diabetes mellitus. 4th edition. Chichester, West Sussex, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc. Online verfügbar unter <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9781118387658>.

Dinarello, Charles A. (2009): Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. In: *Annual review of immunology* 27, S. 519–550. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612.

Ding, H.; Robertson, D. E.; Daldal, F.; Dutton, P. L. (1992): Cytochrome bc<sub>1</sub> complex 2Fe-2S cluster and its interaction with ubiquinone and ubihydroquinone at the Q<sub>o</sub> site: a double-occupancy Q<sub>o</sub> site model. In: *Biochemistry* 31 (12), S. 3144–3158. DOI: 10.1021/bi00127a015.

Dixon, Scott J.; Lemberg, Kathryn M.; Lamprecht, Michael R.; Skouta, Rachid; Zaitsev, Eleina M.; Gleason, Caroline E. et al. (2012): Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. In: *Cell* 149 (5), S. 1060–1072. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.

Elsner, Matthias; Gehrman, Wiebke; Lenzen, Sigurd (2011): Peroxisome-generated hydrogen peroxide as important mediator of lipotoxicity in insulin-producing cells. In: *Diabetes* 60 (1), S. 200–208. DOI: 10.2337/db09-1401.

Ferdaoussi, M.; Bergeron, V.; Zarrouki, B.; Kolic, J.; Cantley, J.; Fielitz, J. et al. (2012): G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1. In: *Diabetologia* 55 (10), S. 2682–2692. DOI: 10.1007/s00125-012-2650-x.

Fleming, M. D.; Romano, M. A.; Su, M. A.; Garrick, L. M.; Garrick, M. D.; Andrews, N. C. (1998): Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (3), S. 1148–1153. DOI: 10.1073/pnas.95.3.1148.

Flemming, Dirk; Schlitt, Angela; Spehr, Volker; Bischof, Tobias; Friedrich, Thorsten (2003): Iron-sulfur cluster N<sub>2</sub> of the Escherichia coli NADH:ubiquinone oxidoreductase

(complex I) is located on subunit NuoB. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (48), S. 47602–47609. DOI: 10.1074/jbc.M308967200.

Fu, Zhuo; Gilbert, Elizabeth R.; Liu, Dongmin (2013): Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. In: *Current diabetes reviews* 9 (1), S. 25–53.

Galaris, Dimitrios; Barbouti, Alexandra; Pantopoulos, Kostas (2019): Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1866 (12), S. 118535. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2019.118535.

Galicia-Garcia, Unai; Benito-Vicente, Asier; Jebari, Shifa; Larrea-Sebal, Asier; Siddiqi, Haziq; Uribe, Kepa B. et al. (2020): Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. In: *International journal of molecular sciences* 21 (17). DOI: 10.3390/ijms21176275.

Gammella, Elena; Buratti, Paolo; Cairo, Gaetano; Recalcati, Stefania (2017): The transferrin receptor: the cellular iron gate. In: *Metallomics : integrated biometal science* 9 (10), S. 1367–1375. DOI: 10.1039/c7mt00143f.

Gatica, Damián; Lahiri, Vikramjit; Klionsky, Daniel J. (2018): Cargo recognition and degradation by selective autophagy. In: *Nature cell biology* 20 (3), S. 233–242. DOI: 10.1038/s41556-018-0037-z.

Ge, Q-M; Dong, Y; Su, Q (2010): Effects of Glucose and advanced glycation end products on oxidative stress in MIN6 cells. In: *Cellular and Molecular Biology*.

Gehrmann, W.; Elsner, M.; Lenzen, S. (2010): Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic  $\beta$ -cells. In: *Diabetes, obesity & metabolism* 12 Suppl 2, S. 149–158. DOI: 10.1111/j.1463-1326.2010.01265.x.

Gerencser, Akos A. (2018): Metabolic activation-driven mitochondrial hyperpolarization predicts insulin secretion in human pancreatic beta-cells. In: *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics* 1859 (9), S. 817–828. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2018.06.006.

Gillies, Clare L.; Abrams, Keith R.; Lambert, Paul C.; Cooper, Nicola J.; Sutton, Alex J.; Hsu, Ron T.; Khunti, Kamlesh (2007): Pharmacological and lifestyle interventions to prevent or delay type 2 diabetes in people with impaired glucose tolerance: systematic

review and meta-analysis. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 334 (7588), S. 299. DOI: 10.1136/bmj.39063.689375.55.

Greenman, Isabel C.; Gomez, Edith; Moore, Claire E. J.; Herbert, Terence P. (2005): The selective recruitment of mRNA to the ER and an increase in initiation are important for glucose-stimulated proinsulin synthesis in pancreatic beta-cells. In: *The Biochemical journal* 391 (Pt 2), S. 291–300. DOI: 10.1042/BJ20050468.

Grubelnik, Vladimir; Zmazek, Jan; Markovič, Rene; Gosak, Marko; Marhl, Marko (2020): Modelling of energy-driven switch for glucagon and insulin secretion. In: *Journal of theoretical biology* 493, S. 110213. DOI: 10.1016/j.jtbi.2020.110213.

Haile, D. J.; Rouault, T. A.; Harford, J. B.; Kennedy, M. C.; Blondin, G. A.; Beinert, H.; Klausner, R. D. (1992): Cellular regulation of the iron-responsive element binding protein: disassembly of the cubane iron-sulfur cluster results in high-affinity RNA binding. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (24), S. 11735–11739. DOI: 10.1073/pnas.89.24.11735.

Hanschmann, Eva-Maria; Petry, Sebastian Friedrich; Eitner, Susanne; Maresch, Constanze Christin; Lingwal, Neelam; Lillig, Christopher Horst; Linn, Thomas (2020): Paracrine regulation and improvement of  $\beta$ -cell function by thioredoxin. In: *Redox biology* 34, S. 101570. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101570.

Hansen, Jakob Bondo; Dos Santos, Laila Romagueira Bichara; Liu, Ying; Prentice, Kacey J.; Teudt, Frederik; Tonnesen, Morten et al. (2018): Glucolipotoxic conditions induce  $\beta$ -cell iron import, cytosolic ROS formation and apoptosis. In: *Journal of molecular endocrinology* 61 (2), S. 69–77. DOI: 10.1530/JME-17-0262.

Harmon, Jamie S.; Stein, Roland; Robertson, R. Paul (2005): Oxidative stress-mediated, post-translational loss of MafA protein as a contributing mechanism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (12), S. 11107–11113. DOI: 10.1074/jbc.M410345200.

Harper, M. E.; Ullrich, A.; Saunders, G. F. (1981): Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (7), S. 4458–4460. DOI: 10.1073/pnas.78.7.4458.

Hentze, M. W.; Kühn, L. C. (1996): Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (16), S. 8175–8182. DOI: 10.1073/pnas.93.16.8175.

Hentze, Matthias W.; Muckenthaler, Martina U.; Galy, Bruno; Camaschella, Clara (2010): Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. In: *Cell* 142 (1), S. 24–38. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.028.

Herder, Christian; Dalmas, Elise; Böni-Schnetzler, Marianne; Donath, Marc Y. (2015): The IL-1 Pathway in Type 2 Diabetes and Cardiovascular Complications. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 26 (10), S. 551–563. DOI: 10.1016/j.tem.2015.08.001.

Higa, M.; Zhou, Y. T.; Ravazzola, M.; Baetens, D.; Orci, L.; Unger, R. H. (1999): Troglitazone prevents mitochondrial alterations, beta cell destruction, and diabetes in obese prediabetic rats. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (20), S. 11513–11518. DOI: 10.1073/pnas.96.20.11513.

Hirota, Naotoshi; Otabe, Shuichi; Nakayama, Hitomi; Yuan, Xiaohong; Yamada, Kentaro (2006): Sequential activation of caspases and synergistic beta-cell cytotoxicity by palmitate and anti-Fas antibodies. In: *Life Sciences* 79 (13), S. 1312–1316. DOI: 10.1016/j.lfs.2006.03.048.

Hotamisligil, G. S.; Shargill, N. S.; Spiegelman, B. M. (1993): Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. In: *Science (New York, N.Y.)* 259 (5091), S. 87–91. DOI: 10.1126/science.7678183.

Huang, Nan; Zhan, Lei-Lei; Cheng, Yi; Wang, Xiao-Long; Wei, Ya-Xun; Wang, Qi; Li, Wen-Jing (2020): TfR1 Extensively Regulates the Expression of Genes Associated with Ion Transport and Immunity. In: *Current medical science* 40 (3), S. 493–501. DOI: 10.1007/s11596-020-2208-y.

Huebschmann, Amy G.; Regensteiner, Judith G.; Vlassara, Helen; Reusch, Jane E. B. (2006): Diabetes and advanced glycoxidation end products. In: *Diabetes care* 29 (6), S. 1420–1432. DOI: 10.2337/dc05-2096.

Ishihara, H.; Asano, T.; Tsukuda, K.; Katagiri, H.; Inukai, K.; Anai, M. et al. (1993): Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. In: *Diabetologia* 36 (11), S. 1139–1145. DOI: 10.1007/BF00401058.

Ishizuka, Nobuko; Yagui, Kazuo; Tokuyama, Yoshiharu; Yamada, Katsumi; Suzuki, Yoshifumi; Miyazaki, Jun-ichi et al. (1999): Tumor necrosis factor alpha signaling pathway and apoptosis in pancreatic  $\beta$  cells. In: *Metabolism* 48 (12), S. 1485–1492. DOI: 10.1016/S0026-0495(99)90234-2.

Itoh, N.; Okamoto, H. (1980): Translational control of proinsulin synthesis by glucose. In: *Nature* 283 (5742), S. 100–102. DOI: 10.1038/283100a0.

Jones, Peter M; Persaud, Shanta J. (2017): Islet Function and Insulin Secretion. In: Richard I. G. Holt, Clive S. Cockram, Allan Flyvbjerg und Barry J. Goldstein (Hg.): *Textbook of Diabetes*: Wiley, S. 87–102.

Kakita, K.; O'Connell, K.; Permutt, M. A. (1982): Pancreatic content of insulins I and II in laboratory rodents. Analysis by immunoelectrophoresis. In: *Diabetes* 31 (10), S. 841–845. DOI: 10.2337/diab.31.10.841.

Kautz, Léon; Meynard, Delphine; Monnier, Annabelle; Darnaud, Valérie; Bouvet, Régis; Wang, Rui-Hong et al. (2008): Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. In: *Blood* 112 (4), S. 1503–1509. DOI: 10.1182/blood-2008-03-143354.

Kawabata, Hiroshi (2019): Transferrin and transferrin receptors update. In: *Free radical biology & medicine* 133, S. 46–54. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.037.

Kharroubi, Ilham; Ladrière, Laurence; Cardozo, Alessandra K.; Dogusan, Zeynep; Cnop, Miriam; Eizirik, Décio L. (2004): Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. In: *Endocrinology* 145 (11), S. 5087–5096. DOI: 10.1210/en.2004-0478.

Kiba, T. (2022): Overexpression of PDX-1 gene increases INS1 gene mRNA expression, not INS2 gene mRNA expression in insulinoma cell line RIN-5F. In: *Acta*

*endocrinologica (Bucharest, Romania : 2005)* 18 (2), S. 164–167. DOI: 10.4183/aeb.2022.164.

Kim, Hyo-Sup; Hwang, You-Cheol; Koo, Seung-Hoi; Park, Kyong Soo; Lee, Myung-Shik; Kim, Kwang-Won; Lee, Moon-Kyu (2013): PPAR- $\gamma$  activation increases insulin secretion through the up-regulation of the free fatty acid receptor GPR40 in pancreatic  $\beta$ -cells. In: *PloS one* 8 (1), e50128. DOI: 10.1371/journal.pone.0050128.

Kirpichnikov, Dmitri; McFarlane, Samy I.; Sowers, James R. (2002): Metformin: an update. In: *Annals of internal medicine* 137 (1), S. 25–33. DOI: 10.7326/0003-4819-137-1-200207020-00009.

Klingenberg, M.; Winkler, E. (1985): The reconstituted isolated uncoupling protein is a membrane potential driven H<sup>+</sup> translocator. In: *The EMBO journal* 4 (12), S. 3087–3092. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1985.tb04049.x.

Köhnke, Rickard; Mei, Jie; Park, Miejung; York, David A.; Erlanson-Albertsson, Charlotte (2007): Fatty acids and glucose in high concentration down-regulates ATP synthase beta-subunit protein expression in INS-1 cells. In: *Nutritional neuroscience* 10 (5-6), S. 273–278. DOI: 10.1080/10284150701745910.

Koranyi, L.; Permutt, M. A.; Chirgwin, J. M.; Giddings, S. J. (1989): Proinsulin I and II gene expression in inbred mouse strains. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 3 (11), S. 1895–1902. DOI: 10.1210/mend-3-11-1895.

Krippeit-Drews, P.; Kramer, C.; Welker, S.; Lang, F.; Ammon, H. P.; Drews, G. (1999): Interference of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. In: *The Journal of physiology* 514 (Pt 2) (Pt 2), S. 471–481. DOI: 10.1111/j.1469-7793.1999.471ae.x.

Larsen, Claus M.; Faulenbach, Mirjam; Vaag, Allan; Vølund, Aage; Ehses, Jan A.; Seifert, Burkhardt et al. (2007): Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. In: *The New England journal of medicine* 356 (15), S. 1517–1526. DOI: 10.1056/NEJMoa065213.

Larsson, O.; Deeney, J. T.; Bränström, R.; Berggren, P. O.; Corkey, B. E. (1996): Activation of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel by long chain acyl-CoA. A role in

modulation of pancreatic beta-cell glucose sensitivity. In: *Journal of Biological Chemistry* 271 (18), S. 10623–10626. DOI: 10.1074/jbc.271.18.10623.

Lenzen, Sigurd (2008): Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. In: *Biochemical Society transactions* 36 (Pt 3), S. 343–347. DOI: 10.1042/BST0360343.

Lenzen, Sigurd; Drinkgern, Jens; Tiedge, Markus (1996): Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. In: *Free Radical Biology and Medicine* 20 (3), S. 463–466. DOI: 10.1016/0891-5849(96)02051-5.

Li, Huihui; Choesang, Tenzin; Bao, Weili; Chen, Huiyong; Feola, Maria; Garcia-Santos, Daniel et al. (2017): Decreasing TfR1 expression reverses anemia and hepcidin suppression in  $\beta$ -thalassemic mice. In: *Blood* 129 (11), S. 1514–1526. DOI: 10.1182/blood-2016-09-742387.

Lill, Roland; Hoffmann, Bastian; Molik, Sabine; Pierik, Antonio J.; Rietzschel, Nicole; Stehling, Oliver et al. (2012): The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. In: *Biochimica et biophysica acta* 1823 (9), S. 1491–1508. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.05.009.

Lim, E. L.; Hollingsworth, K. G.; Aribisala, B. S.; Chen, M. J.; Mathers, J. C.; Taylor, R. (2011): Reversal of type 2 diabetes: normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol. In: *Diabetologia* 54 (10), S. 2506–2514. DOI: 10.1007/s00125-011-2204-7.

Ling, Z.; Heimberg, H.; Foriers, A.; Schuit, F.; Pipeleers, D. (1998): Differential expression of rat insulin I and II messenger ribonucleic acid after prolonged exposure of islet beta-cells to elevated glucose levels. In: *Endocrinology* 139 (2), S. 491–495. DOI: 10.1210/endo.139.2.5749.

Liu, Xiaohong; Zeng, Xin; Chen, Xuanming; Luo, Ruixi; Li, Linzhao; Wang, Chengshi et al. (2019): Oleic acid protects insulin-secreting INS-1E cells against palmitic acid-induced lipotoxicity along with an amelioration of ER stress. In: *Endocrine* 64 (3), S. 512–524. DOI: 10.1007/s12020-019-01867-3.

Lowell, Bradford B.; Shulman, Gerald I. (2005): Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. In: *Science (New York, N.Y.)* 307 (5708), S. 384–387. DOI: 10.1126/science.1104343.

Lund, K.; Blume, N.; Michelsen, B. K.; Bucchini, D.; Madsen, O. D. (1993): Differential expression of non-allelic insulin genes in rodent islet tumour cells. In: *Journal of molecular endocrinology* 11 (3), S. 305–318. DOI: 10.1677/jme.0.0110305.

Luo, Qian-Qian; Qian, Zhong-Ming; Zhou, Yu-Fu; Zhang, Meng-Wan; Wang, Dang; Zhu, Li; Ke, Ya (2016): Expression of Iron Regulatory Protein 1 Is Regulated not only by HIF-1 but also pCREB under Hypoxia. In: *International Journal of Biological Sciences* 12 (10), S. 1191–1202. DOI: 10.7150/ijbs.16437.

Ly, Luong Dai; Ly, Dat Da; Nguyen, Nhung Thi; Kim, Ji-Hee; Yoo, Heesuk; Chung, Jongkyeong et al. (2020): Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uptake Relieves Palmitate-Induced Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Overload in MIN6 Cells. In: *Molecules and cells* 43 (1), S. 66–75. DOI: 10.14348/molcells.2019.0223.

MacDonald, Michael J.; Cook, James D.; Epstein, Miles L.; Flowers, Carol H. (1994): Large amount of (Apo)ferritin in the pancreatic insulin cell and its stimulation by glucose. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 8 (10), S. 777–781. DOI: 10.1096/fasebj.8.10.8050678.

Maedler, K.; Spinas, G. A.; Dyntar, D.; Moritz, W.; Kaiser, N.; Donath, M. Y. (2001): Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. In: *Diabetes* 50 (1), S. 69–76. DOI: 10.2337/diabetes.50.1.69.

Mantzaris, M. D.; Bellou, S.; Skiada, V.; Kitsati, N.; Fotsis, T.; Galaris, D. (2016): Intracellular labile iron determines H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptotic signaling via sustained activation of ASK1/JNK-p38 axis. In: *Free radical biology & medicine* 97, S. 454–465. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.002.

Mao, Xuhua; Chen, Hucheng; Tang, Junmin; Wang, Liangliang; Shu, Tingting (2017): Hepcidin links gluco-toxicity to pancreatic beta cell dysfunction by inhibiting Pdx-1 expression. In: *Endocrine Connections* 6 (3), S. 121–128. DOI: 10.1530/EC-16-0115.

Maris, Michael; Robert, Sofie; Waelkens, Etienne; Derua, Rita; Hernangomez, Miriam H.; D'Hertog, Wannes et al. (2013): Role of the saturated nonesterified fatty acid palmitate in beta cell dysfunction. In: *Journal of proteome research* 12 (1), S. 347–362. DOI: 10.1021/pr300596g.

Marku, Algerta; Galli, Alessandra; Marciani, Paola; Dule, Nevia; Perego, Carla; Castagna, Michela (2021): Iron Metabolism in Pancreatic Beta-Cell Function and Dysfunction. In: *Cells* 10 (11). DOI: 10.3390/cells10112841.

Mathias, S.; Peña, L. A.; Kolesnick, R. N. (1998): Signal transduction of stress via ceramide. In: *The Biochemical journal* 335 (Pt 3) (Pt 3), S. 465–480. DOI: 10.1042/bj3350465.

Maxel, Trine; Smidt, Kamille; Petersen, Charlotte C.; Honoré, Bent; Christensen, Anne K.; Jeppesen, Per B. et al. (2019): The zinc transporter Zip14 (SLC39a14) affects Beta-cell Function: Proteomics, Gene expression, and Insulin secretion studies in INS-1E cells. In: *Scientific Reports* 9 (1). DOI: 10.1038/s41598-019-44954-1.

Merkofer, Martin; Kissner, Reinhard; Hider, Robert C.; Brunk, Ulf T.; Koppenol, Willem H. (2006): Fenton chemistry and iron chelation under physiologically relevant conditions: Electrochemistry and kinetics. In: *Chemical research in toxicology* 19 (10), S. 1263–1269. DOI: 10.1021/tx060101w.

Miyazaki, J.; Araki, K.; Yamato, E.; Ikegami, H.; Asano, T.; Shibasaki, Y. et al. (1990): Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. In: *Endocrinology* 127 (1), S. 126–132. DOI: 10.1210/endo-127-1-126.

Motulsky, Harvey J.; Brown, Ronald E. (2006): Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. In: *BMC bioinformatics* 7, S. 123. DOI: 10.1186/1471-2105-7-123.

Muckenthaler, Martina; Gray, Nicola K.; Hentze, Matthias W. (1998): IRP-1 Binding to Ferritin mRNA Prevents the Recruitment of the Small Ribosomal Subunit by the Cap-Binding Complex eIF4F. In: *Molecular Cell* 2 (3), S. 383–388. DOI: 10.1016/S1097-2765(00)80282-8.

Nakazaki, M.; Kakei, M.; Koriyama, N.; Tanaka, H. (1995): Involvement of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in free radical-mediated inhibition of insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. In: *Diabetes* 44 (8), S. 878–883. DOI: 10.2337/diab.44.8.878.

Nam, Eunju; Han, Jiyeon; Suh, Jong-Min; Yi, Yelim; Lim, Mi Hee (2018): Link of impaired metal ion homeostasis to mitochondrial dysfunction in neurons. In: *Current Opinion in Chemical Biology* 43, S. 8–14. DOI: 10.1016/j.cbpa.2017.09.009.

Nemecz, Miruna; Constantin, Alina; Dumitrescu, Madalina; Alexandru, Nicoleta; Filippi, Alexandru; Tanko, Gabriela; Georgescu, Adriana (2018): The Distinct Effects of Palmitic and Oleic Acid on Pancreatic Beta Cell Function: The Elucidation of Associated Mechanisms and Effector Molecules. In: *Frontiers in pharmacology* 9, S. 1554. DOI: 10.3389/fphar.2018.01554.

Nielsen, D. A.; Welsh, M.; Casadaban, M. J.; Steiner, D. F. (1985): Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. I. Effects of glucose and cyclic AMP on the transcription of insulin mRNA. In: *Journal of Biological Chemistry* 260 (25), S. 13585–13589.

Nolan, Christopher J.; Madiraju, Murthy S. R.; Delghingaro-Augusto, Viviane; Peyot, Marie-Line; Prentki, Marc (2006): Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. In: *Diabetes* 55 Suppl 2 (Supplement\_2), S16-23. DOI: 10.2337/db06-S003.

Ogata, Fernando T.; Branco, Vasco; Vale, Filipa F.; Coppo, Lucia (2021): Glutaredoxin: Discovery, redox defense and much more. In: *Redox biology* 43, S. 101975. DOI: 10.1016/j.redox.2021.101975.

Ohba, Rie; Furuyama, Kazumichi; Yoshida, Kenichi; Fujiwara, Tohru; Fukuhara, Noriko; Onishi, Yasushi et al. (2013): Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS). In: *Annals of hematology* 92 (1), S. 1–9. DOI: 10.1007/s00277-012-1564-5.

Okamura, Daryl M.; Pennathur, Subramaniam; Pasichnyk, Katie; López-Guisa, Jesús M.; Collins, Sarah; Febbraio, Maria et al. (2009): CD36 regulates oxidative stress and inflammation in hypercholesterolemic CKD. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 20 (3), S. 495–505. DOI: 10.1681/ASN.2008010009.

Osumi, Takashi; Hashimoto, Takashi (1978): Acyl-CoA oxidase of rat liver: A new enzyme for fatty acid oxidation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 83 (2), S. 479–485. DOI: 10.1016/0006-291X(78)91015-X.

Owen, D.; Kühn, L. C. (1987): Noncoding 3' sequences of the transferrin receptor gene are required for mRNA regulation by iron. In: *The EMBO journal* 6 (5), S. 1287–1293. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1987.tb02366.x.

Oyadomari, S.; Mori, M. (2004): Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. In: *Cell death and differentiation* 11 (4), S. 381–389. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401373.

Paolisso, G.; Gambardella, A.; Amato, L.; Tortoriello, R.; D'Amore, A.; Varricchio, M.; D'Onofrio, F. (1995): Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects. In: *Diabetologia* 38 (11), S. 1295–1299. DOI: 10.1007/BF00401761.

Paradkar, Prasad N.; Zumbrennen, Kimberley B.; Paw, Barry H.; Ward, Diane M.; Kaplan, Jerry (2009): Regulation of Mitochondrial Iron Import through Differential Turnover of Mitoferrin 1 and Mitoferrin 2. In: *Molecular and cellular biology* 29 (4), S. 1007–1016. DOI: 10.1128/MCB.01685-08.

Parkash, Jai; Chaudhry, Muhammad A.; Rhoten, William B. (2005): Tumor necrosis factor-alpha-induced changes in insulin-producing beta-cells. In: *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 286 (2), S. 982–993. DOI: 10.1002/ar.a.20229.

Petry, Sebastian Friedrich; Römer, Axel; Rawat, Divya; Brunner, Lara; Lerch, Nina; Zhou, Mengmeng et al. (2022): Loss and Recovery of Glutaredoxin 5 Is Inducible by Diet in a Murine Model of Diabetes and Mediated by Free Fatty Acids In Vitro. In: *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 11 (4). DOI: 10.3390/antiox11040788.

Petry, Sebastian Friedrich; Sun, Lia Mingzhe; Knapp, Anna; Reinl, Sabrina; Linn, Thomas (2018): Distinct Shift in Beta-Cell Glutaredoxin 5 Expression Is Mediated by Hypoxia and Lipotoxicity Both In Vivo and In Vitro. In: *Frontiers in endocrinology* 9, S. 84. DOI: 10.3389/fendo.2018.00084.

Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic Acids Research* 29 (9), e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.

Philpott, Caroline C.; Patel, Sarju J.; Protchenko, Olga (2020): Management versus miscues in the cytosolic labile iron pool: The varied functions of iron chaperones. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1867 (11), S. 118830. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2020.118830.

Pi, Jingbo; Bai, Yushi; Zhang, Qiang; Wong, Victoria; Floering, Lisa M.; Daniel, Kiefer et al. (2007): Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. In: *Diabetes* 56 (7), S. 1783–1791. DOI: 10.2337/db06-1601.

Pondarré, Corinne; Antiochos, Brendan B.; Campagna, Dean R.; Clarke, Stephen L.; Greer, Eric L.; Deck, Kathryn M. et al. (2006): The mitochondrial ATP-binding cassette transporter *Abcb7* is essential in mice and participates in cytosolic iron-sulfur cluster biogenesis. In: *Human molecular genetics* 15 (6), S. 953–964. DOI: 10.1093/hmg/ddl012.

Quehenberger, Oswald; Armando, Aaron M.; Brown, Alex H.; Milne, Stephen B.; Myers, David S.; Merrill, Alfred H. et al. (2010): Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. In: *Journal of lipid research* 51 (11), S. 3299–3305. DOI: 10.1194/jlr.M009449.

Rajpathak, Swapnil N.; Crandall, Jill P.; Wylie-Rosett, Judith; Kabat, Geoffrey C.; Rohan, Thomas E.; Hu, Frank B. (2009): The role of iron in type 2 diabetes in humans. In: *Biochimica et biophysica acta* 1790 (7), S. 671–681. DOI: 10.1016/j.bbagen.2008.04.005.

Robbins, A. H.; Stout, C. D. (1989): Structure of activated aconitase: formation of the 4Fe-4S cluster in the crystal. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (10), S. 3639–3643. DOI: 10.1073/pnas.86.10.3639.

Robertson, R. Paul (2004): Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (41), S. 42351–42354. DOI: 10.1074/jbc.R400019200.

Roderigo-Milne, Helen; Hauge-Evans, Astrid C.; Persaud, Shanta J.; Jones, Peter M. (2002): Differential expression of insulin genes 1 and 2 in MIN6 cells and pseudoislets.

In: *Biochemical and biophysical research communications* 296 (3), S. 589–595. DOI: 10.1016/s0006-291x(02)00913-0.

Rodríguez-Manzaneque, María Teresa; Tamarit, Jordi; Bellí, Gemma; Ros, Joaquim; Herrero, Enrique (2002): Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. In: *Molecular biology of the cell* 13 (4), S. 1109–1121. DOI: 10.1091/mbc.01-10-0517.

Römer, Axel; Linn, Thomas; Petry, Sebastian F. (2021): Lipotoxic Impairment of Mitochondrial Function in  $\beta$ -Cells: A Review. In: *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10 (2). DOI: 10.3390/antiox10020293.

Rouault, Tracey A. (2006): The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. In: *Nature chemical biology* 2 (8), S. 406–414. DOI: 10.1038/nchembio807.

Rucker, P.; Torti, F. M.; Torti, S. V. (1996): Role of H and L subunits in mouse ferritin. In: *Journal of Biological Chemistry* 271 (52), S. 33352–33357. DOI: 10.1074/jbc.271.52.33352.

Sachdeva, Mira M.; Claiborn, Kathryn C.; Khoo, Cynthia; Yang, Juxiang; Groff, David N.; Mirmira, Raghavendra G.; Stoffers, Doris A. (2009): Pdx1 (MODY4) regulates pancreatic beta cell susceptibility to ER stress. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (45), S. 19090–19095. DOI: 10.1073/pnas.0904849106.

Sakai, Koji; Matsumoto, Kazuya; Nishikawa, Takeshi; Suefuji, Mihoshi; Nakamaru, Kazuhiko; Hirashima, Yoshiaki et al. (2003): Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 300 (1), S. 216–222. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)02832-2.

Sako, Y.; 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. In: *Endocrinology* 127 (4), S. 1580–1589. DOI: 10.1210/endo-127-4-1580.

Salgin, Burak; Ong, Ken K.; Thankamony, Ajay; Emmett, Pauline; Wareham, Nick J.; Dunger, David B. (2012): Higher fasting plasma free fatty acid levels are associated with lower insulin secretion in children and adults and a higher incidence of type 2 diabetes. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97 (9), S. 3302–3309. DOI: 10.1210/jc.2012-1428.

Salpeter, Shelley R.; Buckley, Nicholas S.; Kahn, Justin A.; Salpeter, Edwin E. (2008): Meta-analysis: metformin treatment in persons at risk for diabetes mellitus. In: *The American journal of medicine* 121 (2), 149-157.e2. DOI: 10.1016/j.amjmed.2007.09.016.

Sanchez, Mayka; Galy, Bruno; Schwanhaeusser, Bjoern; Blake, Jonathon; Bähr-Ivacevic, Tomi; Benes, Vladimir et al. (2011): Iron regulatory protein-1 and -2: transcriptome-wide definition of binding mRNAs and shaping of the cellular proteome by iron regulatory proteins. In: *Blood* 118 (22), e168-79. DOI: 10.1182/blood-2011-04-343541.

Santaguida, P. L.; Balion, C.; Hunt, D.; Morrison, K.; Gerstein, H.; Raina, P. et al. (2005): Diagnosis, prognosis, and treatment of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. In: *Evidence report/technology assessment (Summary)* (128), S. 1–11.

Sargsyan, Ernest; Bergsten, Peter (2011): Lipotoxicity is glucose-dependent in INS-1E cells but not in human islets and MIN6 cells. In: *Lipids in health and disease* 10, S. 115. DOI: 10.1186/1476-511X-10-115.

Sarwar, N; Di Angelantonio; Gao P; Gobin R; Kaptoge S; Seshasai SR, (2010): Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. In: *The Lancet* 375 (9733), S. 2215–2222. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60484-9.

Sato, Yoshifumi; Endo, Hiroko; Okuyama, Hiroaki; Takeda, Takaaki; Iwahashi, Hiromi; Imagawa, Akihisa et al. (2011): Cellular hypoxia of pancreatic beta-cells due to high levels of oxygen consumption for insulin secretion in vitro. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (14), S. 12524–12532. DOI: 10.1074/jbc.M110.194738.

Schönfeld, Peter; Wojtczak, Lech (2008): Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. In: *Free Radical Biology and Medicine* 45 (3), S. 231–241. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.029.

Sebestyén, Endre; Singh, Babita; Miñana, Belén; Pagès, Amadís; Mateo, Francesca; Pujana, Miguel Angel et al. (2016): Large-scale analysis of genome and transcriptome alterations in multiple tumors unveils novel cancer-relevant splicing networks. In: *Genome research* 26 (6), S. 732–744. DOI: 10.1101/gr.199935.115.

Sheftel, Alex D.; Mason, Anne B.; Ponka, Prem (2012): The long history of iron in the Universe and in health and disease. In: *Biochimica et biophysica acta* 1820 (3), S. 161–187. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.08.002.

Shu, Tingting; Lv, Zhigang; Xie, Yuchun; Tang, Junming; Mao, Xuhua (2019): Hepcidin as a key iron regulator mediates glucotoxicity-induced pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction. In: *Endocrine Connections* 8 (3), S. 150–161. DOI: 10.1530/EC-18-0516.

Simcox, Judith A.; McClain, Donald A. (2013): Iron and diabetes risk. In: *Cell metabolism* 17 (3), S. 329–341. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.02.007.

Steyn, N. P.; Mann, J.; Bennett, P. H.; Temple, N.; Zimmet, P.; Tuomilehto, J. et al. (2004): Diet, nutrition and the prevention of type 2 diabetes. In: *Public health nutrition* 7 (1A), S. 147–165. DOI: 10.1079/phn2003586.

Sun, Hong; Saeedi, Pouya; Karuranga, Suvi; Pinkepank, Moritz; Ogurtsova, Katherine; Duncan, Bruce B. et al. (2022): IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. In: *Diabetes research and clinical practice* 183, S. 109119. DOI: 10.1016/j.diabres.2021.109119.

Sun, Lia Mingzhe (2021): Einfluss von Hypoxie und Fettsäuren auf Glrx 1 und Glrx 5 in MIN6-Zellen.

Syed, Ismail; Szulc, Zdzislaw M.; Ogretmen, Besim; Kowluru, Anjaneyulu (2012): L-threo -C6-pyridinium-ceramide bromide, a novel cationic ceramide, induces NADPH oxidase activation, mitochondrial dysfunction and loss in cell viability in INS 832/13  $\beta$ -cells. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 30 (4), S. 1051–1058. DOI: 10.1159/000341481.

- Tabák, Adam G.; Herder, Christian; Rathmann, Wolfgang; Brunner, Eric J.; Kivimäki, Mika (2012): Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. In: *Lancet (London, England)* 379 (9833), S. 2279–2290. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60283-9.
- Tacchini, L.; Bianchi, L.; Bernelli-Zazzera, A.; Cairo, G. (1999): Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (34), S. 24142–24146. DOI: 10.1074/jbc.274.34.24142.
- Tataranni, Pietro A.; Ortega, Emilio (2005): A burning question: does an adipokine-induced activation of the immune system mediate the effect of overnutrition on type 2 diabetes? In: *Diabetes* 54 (4), S. 917–927. DOI: 10.2337/diabetes.54.4.917.
- Turner, R. C. (1998): The U.K. Prospective Diabetes Study. A review. In: *Diabetes care* 21 Suppl 3, C35-8. DOI: 10.2337/diacare.21.3.c35.
- Turrens, Julio F. (2003): Mitochondrial formation of reactive oxygen species. In: *The Journal of physiology* 552 (Pt 2), S. 335–344. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.049478.
- Vanden Berghe, Tom; Linkermann, Andreas; Jouan-Lanhouet, Sandrine; Walczak, Henning; Vandenabeele, Peter (2014): Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 15 (2), S. 135–147. DOI: 10.1038/nrm3737.
- Vasu, Srividya; McClenaghan, Neville H.; McCluskey, Jane T.; Flatt, Peter R. (2014): Mechanisms of toxicity by proinflammatory cytokines in a novel human pancreatic beta cell line, 1.1B4. In: *Biochimica et biophysica acta* 1840 (1), S. 136–145. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.08.022.
- Vejrazkova, D.; Vankova, M.; Lukasova, P.; Vcelak, J.; Bendlova, B. (2020): Insights into the physiology of C-peptide. In: *Physiological research* 69 (Suppl 2), S237-S243. DOI: 10.33549/physiolres.934519.
- Walden, William E.; Selezneva, Anna I.; Dupuy, Jérôme; Volbeda, Anne; Fontecilla-Camps, Juan C.; Theil, Elizabeth C.; Volz, Karl (2006): Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. In: *Science (New York, N.Y.)* 314 (5807), S. 1903–1908. DOI: 10.1126/science.1133116.

Wehinger, Sergio; Ortiz, Rina; Díaz, María Inés; Aguirre, Adam; Valenzuela, Manuel; Llanos, Paola et al. (2015): Phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine-14 induced by ROS enhances palmitate-induced death of beta-pancreatic cells. In: *Biochimica et biophysica acta* 1852 (5), S. 693–708. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.12.021.

Welsh, N.; Eizirik, D. L.; Bendtzen, K.; Sandler, S. (1991): Interleukin-1 beta-induced nitric oxide production in isolated rat pancreatic islets requires gene transcription and may lead to inhibition of the Krebs cycle enzyme aconitase. In: *Endocrinology* 129 (6), S. 3167–3173. DOI: 10.1210/endo-129-6-3167.

Welsh, Nils; Sandler, Stellan (1992): Interleukin-1 $\beta$  induces nitric oxide production and inhibits the activity of aconitase without decreasing glucose oxidation rates in isolated mouse pancreatic islets. In: *Biochemical and biophysical research communications* 182 (1), S. 333–340. DOI: 10.1016/S0006-291X(05)80149-4.

Wentworth, B. M.; Rhodes, C.; Schnetzler, B.; Gross, D. J.; Halban, P. A.; Villa-Komaroff, L. (1992): The ratio of mouse insulin I:insulin II does not reflect that of the corresponding preproinsulin mRNAs. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 86 (3), S. 177–186. DOI: 10.1016/0303-7207(92)90142-s.

Wentworth, B. M.; Schaefer, I. M.; Villa-Komaroff, L.; Chirgwin, J. M. (1986): Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin. In: *Journal of molecular evolution* 23 (4), S. 305–312. DOI: 10.1007/BF02100639.

Wingert, Rebecca A.; Galloway, Jenna L.; Barut, Bruce; Foott, Helen; Fraenkel, Paula; Axe, Jennifer L. et al. (2005): Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. In: *Nature* 436 (7053), S. 1035–1039. DOI: 10.1038/nature03887.

World Health Organisation (2019): Classification of Diabetes Mellitus.

World Health Organization (2016): Global Report on Diabetes 2016.

Wu, J. J.; Chen, X.; Cao, X. C.; Baker, M. S.; Kaufman, D. B. (2001): Cytokine-induced metabolic dysfunction of MIN6 beta cells is nitric oxide independent. In: *The Journal of surgical research* 101 (2), S. 190–195. DOI: 10.1006/jsre.2001.6285.

Yamaoka, Kazue; Tango, Toshiro (2005): Efficacy of lifestyle education to prevent type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. In: *Diabetes care* 28 (11), S. 2780–2786. DOI: 10.2337/diacare.28.11.2780.

Ye, Hong; Jeong, Suh Young; Ghosh, Manik C.; Kovtunovych, Gennadiy; Silvestri, Laura; Ortillo, Danilo et al. (2010): Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts. In: *The Journal of clinical investigation* 120 (5), S. 1749–1761. DOI: 10.1172/JCI40372.

Yu, Chunli; Chen, Yan; Cline, Gary W.; Zhang, Dongyan; Zong, Haihong; Wang, Yanlin et al. (2002): Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (52), S. 50230–50236. DOI: 10.1074/jbc.M200958200.

Zhao, Zhengshan; Zhao, Chunying; Zhang, Xu Hannah; Zheng, Feng; Cai, Weijing; Vlassara, Helen; Ma, Zhongmin Alex (2009): Advanced glycation end products inhibit glucose-stimulated insulin secretion through nitric oxide-dependent inhibition of cytochrome c oxidase and adenosine triphosphate synthesis. In: *Endocrinology* 150 (6), S. 2569–2576. DOI: 10.1210/en.2008-1342.

Zhou, Cancan; Qian, Weikun; Li, Jie; Ma, Jiguang; Chen, Xin; Jiang, Zhengdong et al. (2019): High glucose microenvironment accelerates tumor growth via SREBP1-autophagy axis in pancreatic cancer. In: *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 38 (1), S. 302. DOI: 10.1186/s13046-019-1288-7.

Zhu, Yunxia; Ren, Chenxi; Zhang, Mingliang; Zhong, Yuan (2020): Perilipin 5 Reduces Oxidative Damage Associated With Lipotoxicity by Activating the PI3K/ERK-Mediated Nrf2-ARE Signaling Pathway in INS-1 Pancreatic  $\beta$ -Cells. In: *Frontiers in endocrinology* 11, S. 166. DOI: 10.3389/fendo.2020.00166.

Zhu, Yunxia; Shu, Tingting; Lin, Yan; Wang, Hongdong; Yang, Junwei; Shi, Yuguang; Han, Xiao (2011): Inhibition of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) protects pancreatic  $\beta$ -cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 404 (1), S. 159–165. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.11.085.

## 12 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 Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die 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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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

## 13 Danksagung

Zuallererst möchte ich Professor Dr. med. Thomas Linn und Dr. med. Sebastian Petry dafür danken, dass sie mir die Arbeit an diesem interessanten Thema ermöglicht haben. Die vielen Kommentare und Hilfestellungen zum Design der Experimente und Verfassen der Arbeit haben mir immer sehr geholfen.

Danke auch an Doris Erb, Gundula Hertl und Birte Hußmann für die gute Betreuung im Labor. Ihr hattet für alle meine Probleme immer ein offenes Ohr.

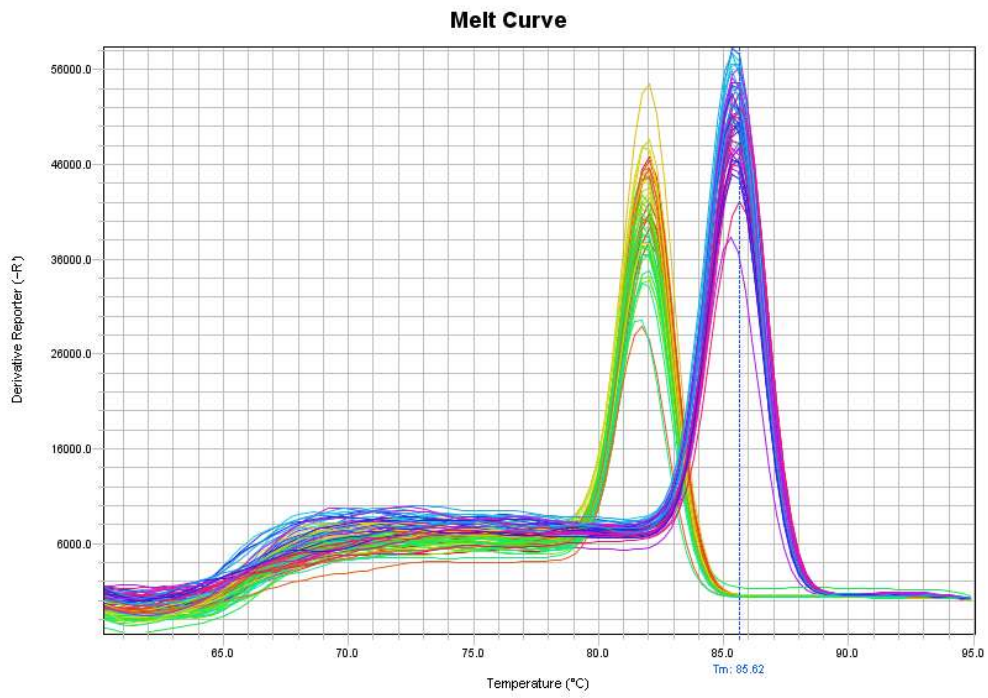
Außerdem möchte ich explizit Axel Römer für seine Unterstützung danken. Wenn ich Fragen hatte oder eine zweite, kritische Meinung gebraucht habe, hast du mir in sehr vielen Punkten neue Ansätze gegeben.

Außerdem danke an alle weiteren Doktoranden und Masteranden, die parallel mit mir im Labor waren.

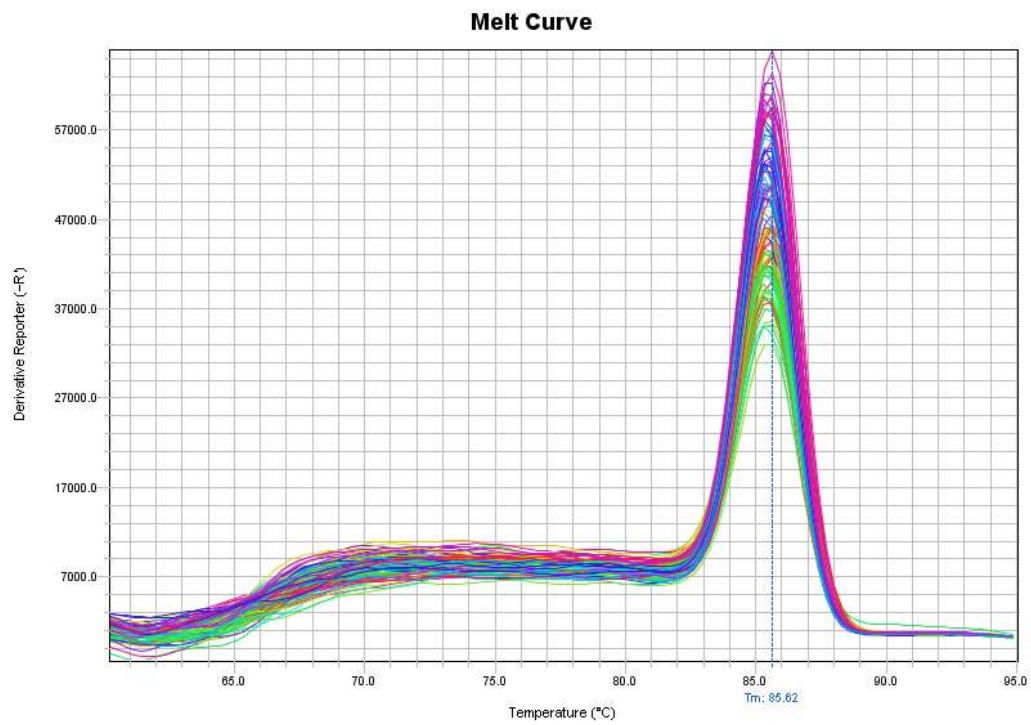
Zu guter Letzt möchte ich noch meinen Eltern Birgit Kreimer und Dr. med. Manfred Kreimer danken. Ihr habt mir mein Studium und das Freisemester für die Laborarbeit ermöglicht und seid mir in allen Stresssituationen immer eine Stütze gewesen.

# 14 Anhang

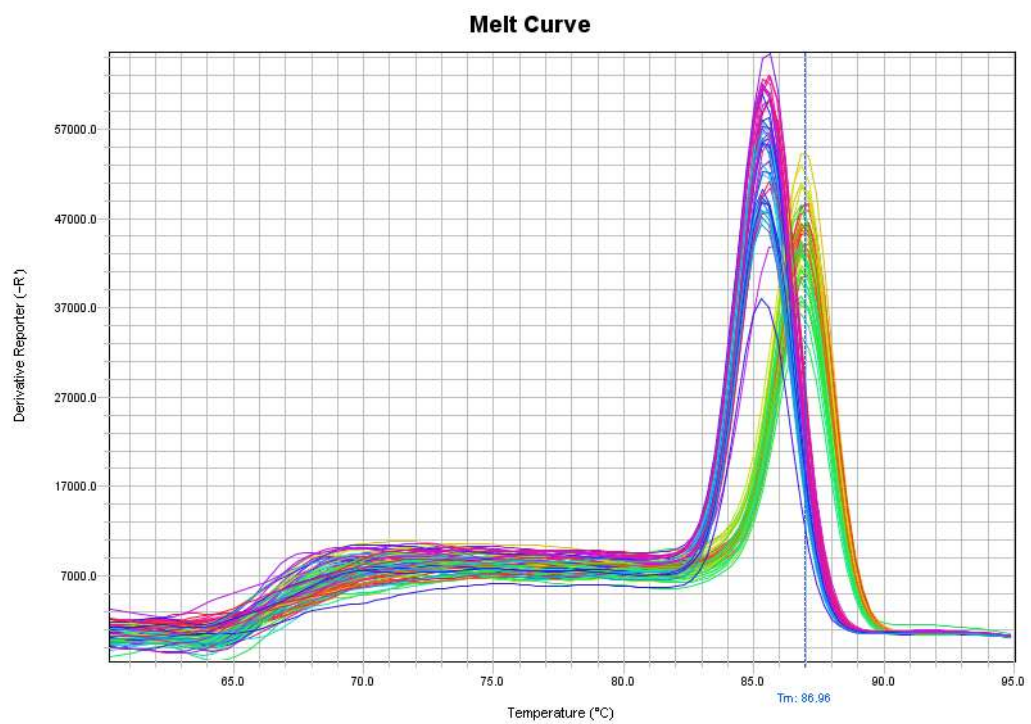
## 14.1 Schmelzkurven der Primer



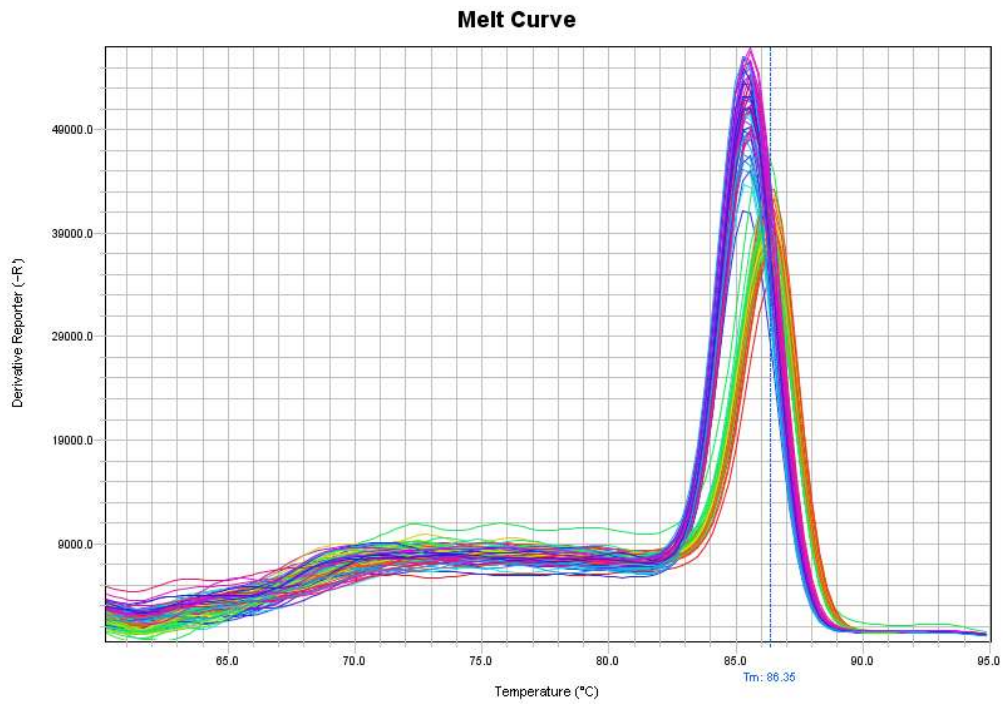
Anhang 1: Schmelzkurven von TfR1 (Grün) und RPL32 (Blau).



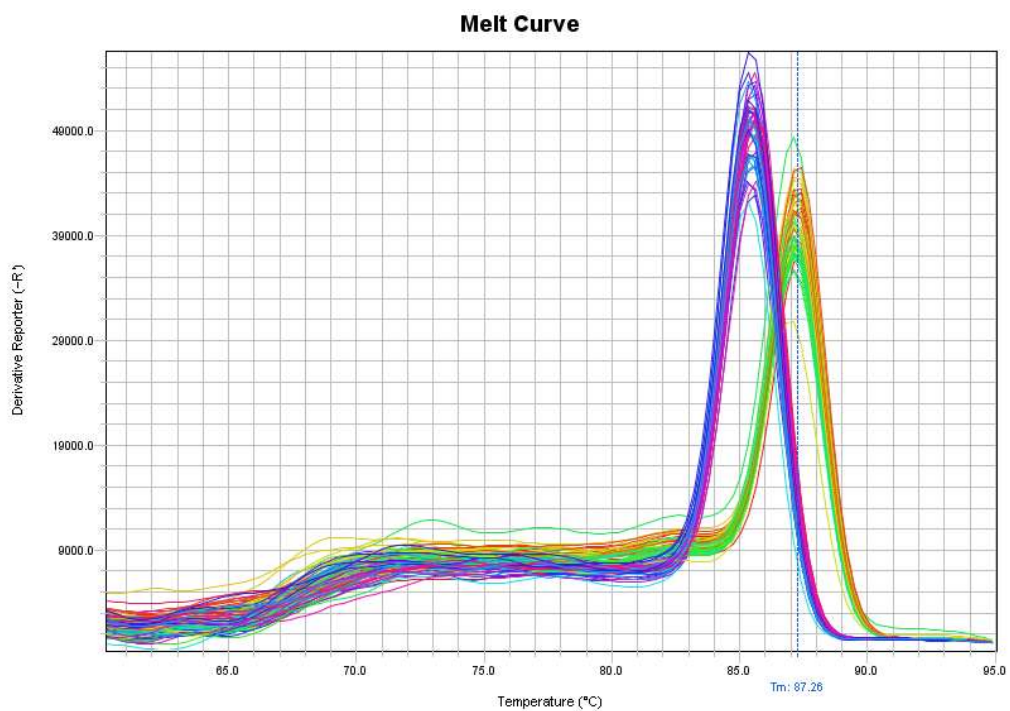
Anhang 2: Schmelzkurve von IRP1 (Grün) und RPL32 (Blau).



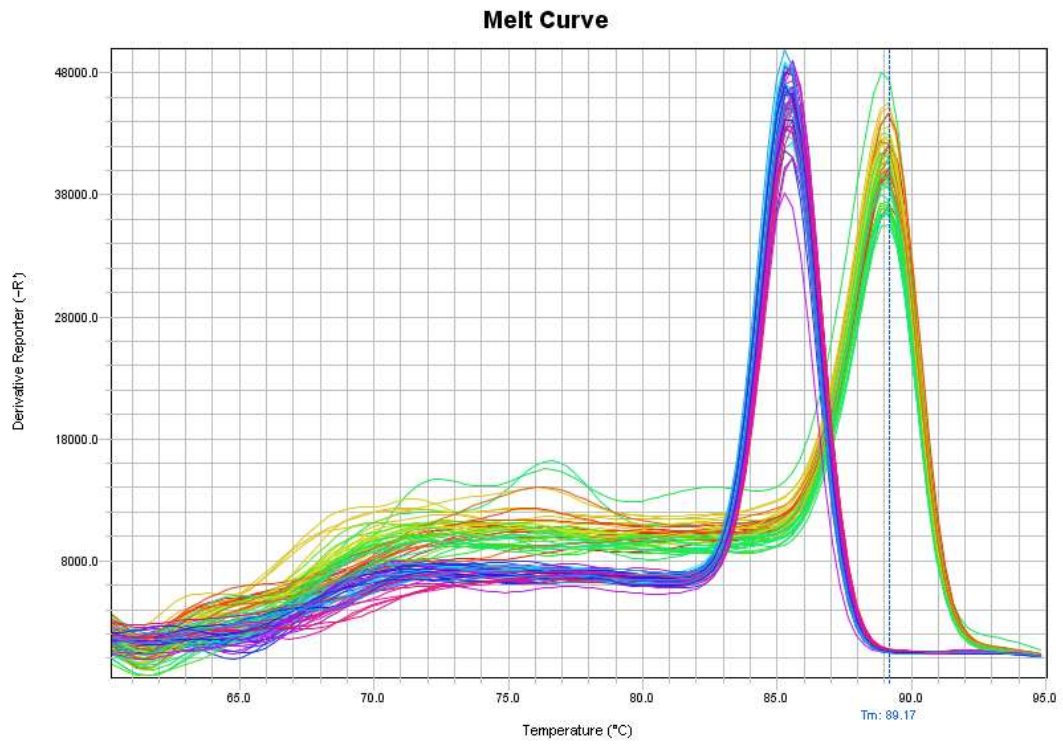
Anhang 3: Schmelzkurve von FTL (Grün) und RPL32 (Blau).



Anhang 4: Schmelzkurve von INS1 (Grün) und RPL32 (Blau).



Anhang 5: Schmelzkurve von INS2 (Grün) und RPL32 (Blau).



Anhang 6: Schmelzkurve von Grx5 (Grün) und RPL32 (Blau).

# 15 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus den Druckexemplaren entfernt.