

**Pankreatische *beta*-Zellen unter dem Einfluss
von oxidativem und metabolischem Stress:**

**Untersuchungen zur protektiven Wirkung der
Sulfonylharnstoffe, SOD-Mimetika und Nrf2-Aktivatoren
auf die Insulinsekretion**

DISSERTATION

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Armin Edalat
aus Gummersbach

Tübingen 2014

Tag der mündlichen Qualifikation:

18.03.2014

Dekan:

Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Martina Düfer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Gisela Drews

Alle Dinge sind schwer, bevor sie leicht werden.

Persisches Sprichwort

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Bedeutung des Glucosestoffwechsels für den Organismus.....	1
1.2 Langerhans-Inseln	2
1.3 Insulin	3
1.3.1 Insulinbiosynthese.....	3
1.3.2 Insulinwirkung	3
1.4 Metabolische Regulation der Insulinsekretion in <i>beta</i> -Zellen	4
1.4.1 Primäre und sekundäre Stimuli.....	4
1.4.2 Stimulus-Sekretionskopplung	5
1.4.2.1 Glucosemetabolismus durch Glykolyse und Mitochondrien.....	6
1.4.2.2 Elektrische Aktivität und Insulinsekretion.....	7
1.4.2.3 Biphasischer Verlauf der Insulinsekretion	8
1.4.2.4 Oszillation des <i>beta</i> -Zellmetabolismus	10
1.4.2.5 ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle).....	11
1.5 Diabetes mellitus.....	13
1.5.1 Begleit- und Folgeerkrankungen	13
1.5.2 Typ 1 Diabetes mellitus	13
1.5.3 Typ 2 Diabetes mellitus	14
1.6 Oxidativer Stress als Ursache der <i>beta</i> -Zelldysfunktion	16
1.6.1 Bildung und Elimination von ROS und RNS.....	17
1.6.2 Mitochondrien als Ursprung und Target von oxidativem Stress	19
1.6.2.1 Ursprung von ROS unter physiologischen Bedingungen	19
1.6.2.2 ROS-Entstehung bei Komplex-II-Inhibition durch 3-NPA.....	20
1.6.2.3 Auswirkungen von oxidativem Stress auf Mitochondrien.....	22
1.6.3 Glucolipotoxizität	22
1.6.3.1 Glucotoxizität	24
1.6.3.2 Lipotoxizität.....	26
1.6.4 ROS als Signalfaktor der Insulinsekretion	29
1.6.5 Nrf2-vermittelte antioxidative Enzymexpression	30
1.6.6 K_{ATP} -Kanalinhibition und oxidativer Stress.....	33
1.7 Fragestellung	36

2	Material und Methoden.....	37
2.1	Präparation und Kultivierung von Inseln und Inselzellclustern	37
2.1.1	Material	37
2.1.1.1	Tiere.....	37
2.1.1.2	Geräte.....	37
2.1.1.3	Chemikalien	38
2.1.1.4	Lösungen	38
2.1.2	Methoden.....	39
2.1.2.1	Präparation von murinen Langerhans-Inseln.....	39
2.1.2.2	Kultivierung von Inseln.....	40
2.1.2.3	Gewinnung und Kultivierung von Inselzellclustern.....	40
2.2	Insulinsekretionsmessungen	41
2.2.1	Material	41
2.2.1.1	Geräte.....	41
2.2.1.2	Chemikalien	41
2.2.1.3	Lösungen	41
2.2.2	Methoden.....	42
2.2.2.1	Steady-state-Inkubationen.....	43
2.2.2.2	Variation der Steady-state-Inkubationen	43
2.2.2.3	Bestimmung des Insulingehalts.....	43
2.2.2.4	Bestimmung des Insulins mittels Radioimmunoassay	44
2.3	Fluoreszenzoptische Methoden.....	44
2.3.1	Material	44
2.3.1.1	Geräte.....	44
2.3.1.2	Chemikalien	45
2.3.1.3	Lösungen	45
2.3.2	Methoden.....	46
2.3.2.1	Messung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_c$	46
2.3.2.2	Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi$	49
2.3.2.3	Messung von FAD und NAD(P)H	49
2.3.2.4	Messung der intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies.....	50
2.4	Bestimmung der Inselfläche und -granularität	50
2.4.1	Material	50
2.4.1.1	Geräte.....	50
2.4.2	Methode.....	51

2.5	In-vivo-Studie: <i>beta</i> -Zellschutz durch Gliclazid vor 3-NPA und H ₂ O ₂	51
2.5.1	Material.....	51
2.5.1.1	Tiere.....	51
2.5.1.2	Geräte.....	52
2.5.1.3	Lösungen.....	52
2.5.2	Methoden.....	52
2.5.2.1	Versuchsdurchführung.....	52
2.6	In-vivo-Studie: <i>beta</i> -Zellschutz durch Gliclazid vor Hochfettdiät.....	53
2.6.1	Material.....	53
2.6.1.1	Tiere.....	53
2.6.1.2	Futter.....	53
2.6.1.3	Geräte.....	53
2.6.1.4	Chemikalien.....	53
2.6.1.5	Lösungen.....	53
2.6.2	Methoden.....	54
2.6.2.1	Zeitraum.....	54
2.6.2.2	Ermittlung von Körpergewicht, Futtermittelverbrauch und Trinkmenge.....	54
2.6.2.3	Messung der Blutglucosekonzentration.....	55
2.6.2.4	Intraperitonealer Glucosetoleranz- und Insulinsensitivitätstest.....	55
2.6.2.5	In-vitro-Experimente.....	56
2.7	Auswertung, Statistik und Darstellung der Ergebnisse.....	56
2.7.1	Auswertung der Insulinsekretionsmessungen.....	56
2.7.2	Auswertung der fluoreszenzoptischen Messungen.....	57
2.7.3	Auswertung der Inselgröße und -granularität.....	57
2.7.4	Auswertung der In-vivo-Studie.....	58
2.7.4.1	Glucosetoleranztests.....	58
2.7.4.2	Insulinsensitivitätstests.....	58
2.7.5	Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse.....	58
2.8	Testsubstanzen.....	60
3	Ergebnisse.....	63
3.1	Oxidativer Stress infolge eingeschränkter Mitochondrienaktivität.....	63
3.1.1	Effekt von 3-NPA auf FAD und NAD(P)H.....	63
3.1.2	Einfluss von 3-NPA auf $\Delta\Psi$	68
3.1.3	Auswirkung von 3-NPA auf die Insulinsekretion.....	72
3.1.4	Beeinflussung der intrazellulären ROS-Akkumulation durch 3-NPA.....	80

3.2	Untersuchung von Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress.....	83
3.2.1	Schutz der <i>beta</i> -Zellfunktion vor H ₂ O ₂	83
3.2.1.1	Effekt von H ₂ O ₂ und TEMPOL auf FAD und NAD(P)H.....	87
3.2.2	Schutz der Insulinsekretion vor SNOC.....	90
3.2.3	Glucolipotoxizität	92
3.2.3.1	Veränderung der Inselmorphologie durch Glucolipotoxizität	93
3.2.3.2	Einfluss von Glucolipotoxizität auf den Insulingehalt	96
3.2.3.3	Auswirkungen von Glucolipotoxizität auf die Insulinsekretion	97
3.2.3.4	Beeinflussung der metabolischen Reaktion von [Ca ²⁺] _c	100
3.2.3.5	Einfluss der Zellkultur auf die intrazelluläre ROS-Akkumulation	103
3.2.3.6	Einfluss von Glucolipotoxizität auf die ROS-Konzentrationen	105
3.3	Sulfonylharnstoffe und <i>beta</i> -Zellmetabolismus.....	107
3.3.1	Einfluss der Sulfonylharnstoffe auf die Insulinsekretion	107
3.3.2	Einfluss der Sulfonylharnstoffe auf ΔΨ	109
3.3.3	Einfluss der K _{ATP} -Kanalinhibition auf die ROS-Akkumulation.....	112
3.4	Schutzeffekt von Gliclazid vor HFD-induziertem <i>beta</i> -Zellschaden.....	119
3.4.1	Einfluss von HFD und Gliclazid auf den Gewichtsverlauf.....	120
3.4.2	Futtermverbrauch und Trinkmenge	121
3.4.3	Einfluss von HFD und Gliclazid auf die Blutglucosekonzentration.....	123
3.4.3.1	Ermittlung der Glucosetoleranz	125
3.4.3.2	Ermittlung der Insulinsensitivität	126
3.4.3.3	Weitere Glucosetoleranz- und Insulinsensitivitätstests	128
3.4.4	Labormedizinische Diagnostik.....	129
3.4.5	In-vitro-Experimente mit Inseln aus der In-vivo-Studie.....	131
3.4.5.1	Einfluss von HFD und Gliclazid auf die Insulinsekretion	131
3.4.5.2	Einfluss von HFD und Gliclazid auf die Inselgranularität.....	133
3.4.5.3	Auswirkungen von HFD und Gliclazid auf die ROS-Akkumulation	134
4	Diskussion.....	137
4.1	Ursachen von oxidativem und metabolischem Stress in <i>beta</i> -Zellen.....	138
4.1.1	Komplex-II-Inhibition durch 3-NPA	138
4.1.2	Einfluss von H ₂ O ₂ und SNOC auf den <i>beta</i> -Zellmetabolismus	142
4.1.3	Glucolipotoxizität und Hochfettdiät.....	147
4.1.3.1	Zellkultur unter glucolipotoxischen Bedingungen	147
4.1.3.2	<i>beta</i> -Zellfunktion unter Glucolipotoxizität.....	148
4.1.3.3	Beeinflussung der ROS-Akkumulation durch Glucolipotoxizität.....	153

4.1.3.4	HFD-Einfluss auf <i>beta</i> -Zellen	157
4.2	Regulation von antioxidativen Schutzmechanismen in der <i>beta</i> -Zelle.....	162
4.2.1	K _{ATP} -Kanalhemmung	162
4.2.2	Nrf2-Aktivierung	164
5	Zusammenfassung und Ausblick	167
6	Literaturverzeichnis.....	170
7	Danksagung	220
8	Lebenslauf	222
9	Veröffentlichungen	223
9.1	Wissenschaftliche Publikationen	223
9.2	Kongress- und Tagungsbeiträge	223
9.3	Universitätsinterne Vorträge	224
9.4	Universitätsexterne Vorträge.....	225

Abkürzungen

AMP, ADP, ATP	Adenosinmonophosphat, -diphosphat, -triphosphat
ARE	<i>antioxidative responsive element</i>
AUC	<i>area under curve</i> , Fläche unter der Kurve
$[Ca^{2+}]_c$	zytosolische Ca^{2+} -Konzentration
cAMP	cyclisches AMP
Cat	Katalase
CPT-1	<i>carnitine-palmitoyl transferase-1</i>
$\Delta\Psi$	mitochondriales Membranpotential
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FAD/FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid, ox./red. Form
G	Glucose
GIP	glucoseabhängiges insulinotropes Peptid
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
GLUT	Glucosetransporter
GPx, GSR	Glutathionperoxidase, Glutathion-Reduktase
GSSG, GSH	Glutathion, ox./red. Form
HFD	Hochfettdiät
K _{ATP} -Kanal	ATP-sensitiver K ⁺ -Kanal
Keap1	kelch-like ECH-associated protein 1
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
NAD ⁺ /NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, ox./red. Form
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2p45-related factor 2</i>
GTT, ITT	Glucosetoleranztest, Insulintoleranztest
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNS, ROS	reaktive Stickstoff- bzw. Sauerstoffspezies,
SD	Standarddiät
SOD	Superoxiddismutase
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor
T1DM, T2DM	Diabetes mellitus Typ 1, Typ 2
V _m	Membranpotential
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Bedeutung des Glucosestoffwechsels für den Organismus

Die überlebenswichtige Funktion des Gehirns, der Sauerstofftransport durch die Erythrozyten und die Aktivität aller Muskeln wird durch Glucose als bedeutendstem Energielieferanten im menschlichen Körper garantiert.

Über die Nahrung wird sie hauptsächlich in Form von Polysacchariden (Stärke) und Disacchariden (z.B. Saccharose) aufgenommen. Verschiedene Enzyme und Transportproteine von der Mundhöhle bis zum Darm sorgen für den Verdau und die enterale Resorption der Glucose in die Blutbahn. Wenn sie in den Körperzellen nicht direkt zur Energiegewinnung in Form von ATP umgesetzt wird, kann sie als Glykogen oder Fett vor allem in Leber-, Muskel- und Fettgewebe gespeichert werden. Darüber hinaus sind Leber und Nierenrinde in der Lage, Glucose aus Produkten des Aminosäure- bzw. Triglyceridabbaus *de novo* zu synthetisieren. Dem Glucosestoffwechsel der Leber kommt dabei eine große Bedeutung zu, da sie als einziges Organ in der Lage ist, bei Nahrungskarenz Glucose dem Blut bereitzustellen und somit die Versorgung von Gehirn, Erythrozyten und allen anderen Körperzellen zu sichern.

Naturgemäß schwanken die Glucoseaufnahme und der Energiebedarf der Zellen durch Mahlzeiten und körperliche Tätigkeiten und so müssen fein abgestimmte Regulationsmechanismen dafür sorgen, dass die Blutglucosekonzentration beim Menschen konstant zwischen 4,4 und 6,6 mM bzw. 80 und 120 mg/dl gehalten wird. Hormone wie Glucagon, Adrenalin und Somatotropin stimulieren die hepatische Gluconeogenese und Glykogenolyse und bewirken damit eine Steigerung der Blutglucosekonzentration. Cortisol verbessert die enterale Absorption und stimuliert ebenfalls die hepatische Neubildung von Glucose.

Insulin ist als einziges Hormon für eine effektive Senkung des Blutzuckers verantwortlich, da es die Aufnahme der Glucose in Muskel- und Fettgewebe gewährleistet und ihre Neubildung und Freisetzung aus Leberzellen hemmt. Außerdem ist es am Aufbau der Speicherformen von Aminosäuren und freien Fettsäuren beteiligt und hat darüber hinaus eine Bedeutung als Wachstumsfaktor.

Ein deutliches Unter- oder Überschreiten der normalen Blutglucosekonzentration führt zu typischen Symptomen und Krankheitsbildern: Während eine *Hypoglykämie* (< 40 mg/dl) bereits nach kurzer Zeit zu neurologischen Ausfallerscheinungen und zur Bewusstlosigkeit führen kann, ist die chronische Form der *Hyperglykämie* (nüchtern: ≥ 126 mg/dl) von Gefäß- und Nervenschädigungen geprägt, die im Syndrom Diabetes mellitus zusammengefasst sind.

1.2 Langerhans-Inseln

Die Bauchspeicheldrüse (med. *Pankreas*) stellt die wichtigste Verdauungsdrüse im menschlichen Körper dar. Über den *Ductus pancreaticus* werden abhängig von Menge und Zusammensetzung der Mahlzeit Verdauungsenzyme in den Dünndarm abgegeben.

Der endokrine Teil des Pankreas, der ungefähr 1-2 % der Gesamtmasse ausmacht, setzt sich aus Inselzellen zusammen, die von Paul Langerhans 1869 entdeckt und später nach ihm benannt wurden (Hedekov 1980). Ihre Aufgaben sind die Synthese und Sekretion von Hormonen zur Regulation der Nährstoffaufnahme und Mobilisierung von Reserven im Hungerstoffwechsel.

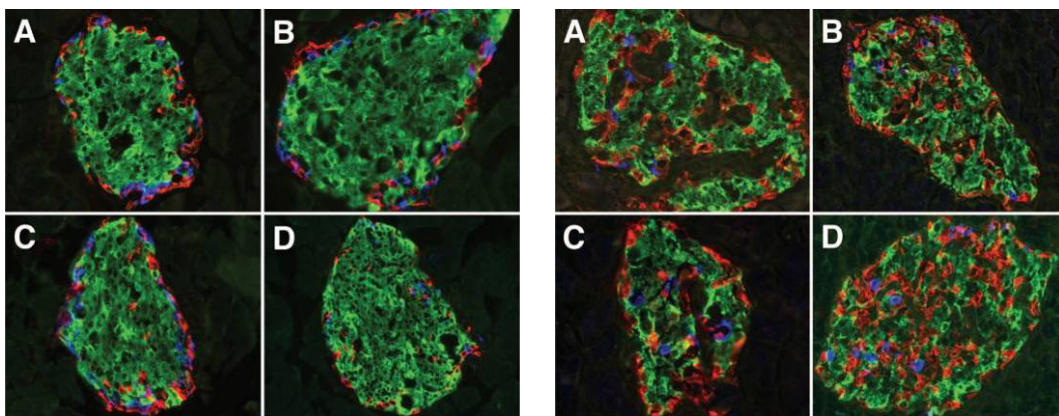


Abb. 1.01 - Vergleich von murinen (links) und humanen (rechts) Langerhans-Inseln – Immunfluoreszenzaufnahmen von Pankreasschnitten mit vier verschiedenen (A-D) Inseln – Insulin-positive *beta*-Zellen (grün), Glucagon-pos. *alpha*-Zellen (rot), Somatostatin-pos. *delta*-Zellen (blau) - (Brissova et al. 2005)

Die Langerhans-Inseln haben einen Durchmesser von etwa 300 μm , sind eingebettet im exokrinen Pankreas und bestehen jeweils aus einem Verband von mehreren tausend Zellen (Hellman 1969, Bonner-Weir et al. 1981). Die insulinproduzierenden *beta*-Zellen stellen dabei die größte Zahl (ca. 75 %), gefolgt von *alpha*- und *delta*-Zellen (ca. 20 %), die für die Glucagon- bzw. Somatostatinsynthese verantwortlich sind. Zu etwa 1 % liegen die PP-Zellen vor, die Pankreatisches Polypeptid sezernieren (Ashcroft et al. 1989). Jede Inselzelle steht in Kontakt mit einer Blutkapillare, über die Nährstoffe aufgenommen und Hormone abtransportiert werden (Goldstein et al. 1968). Die Architektur der Inseln unterscheidet sich je nach Spezies grundlegend voneinander (Abb. 1.01): Während Ratten- und Mäuseinseln eine so genannte Kern-Mantel-Architektur aufweisen, bei der sich die *beta*-Zellen im Zentrum und alle anderen Zellen ringförmig in der Peripherie befinden, können menschliche Inseln im Aufbau sehr variieren (Brissova et al. 2005, Cabrera et al. 2006, Heller 2010) und verfügen über keine Kollagenkapsel (Hughes et al. 2006).

1.3 Insulin

1.3.1 Insulinbiosynthese

Im endoplasmatischen Retikulum (ER) der *beta*-Zellen wird Proinsulin durch Abspaltung einer Signalsequenz aus Präproinsulin gebildet (Steiner et al. 1985). Das Proinsulin unterscheidet sich von Insulin durch das C-Peptid (*connecting peptide*, 31 Aminosäuren), welches die A-Kette (21 Aminosäuren) mit der B-Kette (30 Aminosäuren) verbindet. Beim Verpacken in die Vesikel wird das C-Peptid vom restlichen Molekül abgespalten. A- und B-Kette bleiben über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden und bilden ein Insulinmolekül, welches bis zur Freisetzung mit fünf weiteren Molekülen an Zink komplexiert ist (Abb. 1.02). Das C-Peptid befindet sich ebenfalls im Vesikel und wird bei der Exozytose sezerniert (Orci 1986). Während Insulin mit einer Halbwertszeit von 5-10 Minuten hauptsächlich über die Leber eliminiert wird, hat das C-Peptid eine zehnmal längere Halbwertszeit und ist daher für diagnostische Zwecke interessant (Rubenstein et al. 1972).

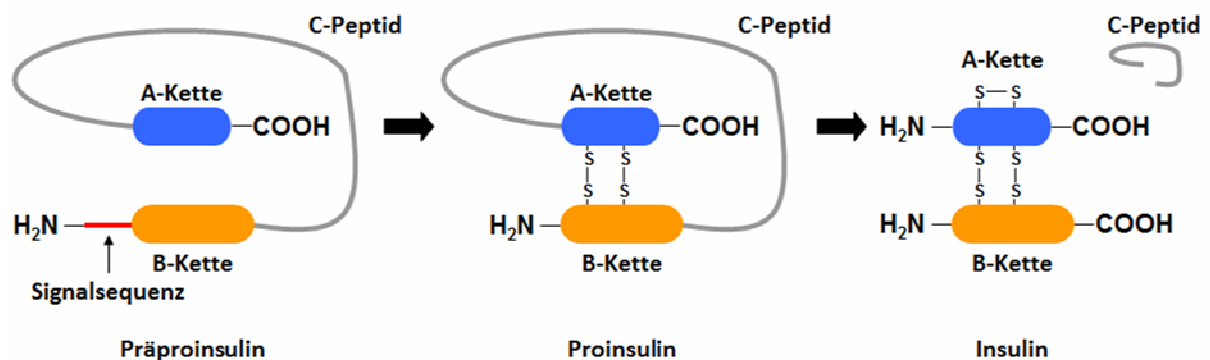


Abb. 1.02 - Bildung des Insulins aus seinen Vorläuferformen Präpro- und Proinsulin - Abspaltung der Signalsequenz und des C-Peptids im Endoplasmatischen Retikulum, Bildung von drei Disulfidbrücken, Verpackung in Vesikeln

1.3.2 Insulinwirkung

Nach der Exozytose zirkuliert Insulin in der Blutbahn und bindet an seine Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielgewebe. Insulinrezeptoren sind vor allem im Muskel- und Fettgewebe sowie auf Leberzellen exprimiert. Die hetero-tetrameren Transmembranrezeptoren verfügen über zwei extrazelluläre *alpha*-Ketten und zwei *beta*-Untereinheiten, die sich größtenteils in der Zellmembran befinden. Die *beta*-Untereinheiten verfügen über eine Tyrosinkinase-Aktivität, die zu einer Autophosphorylierung ihrer eigenen Tyrosin-Reste führt. Dies geschieht nach extrazellulärer Bindung des Insulins an die *alpha*-Untereinheit, da der Rezeptor hierdurch eine Konformationsänderung erfährt (Van Obberghen et al. 2001).

Die phosphorylierten Untereinheiten stellen nun Bindungsstellen für Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS) dar, die intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. So wird beispielsweise der Einbau von Glucosetransportern (GLUT-4) in die Zellmembran ermöglicht. GLUT-4-Moleküle liegen intrazellulär in Vesikeln vor und werden durch die Aktivierung von Phosphoinositid-3-Kinasen (PI-3-Kinasen) und Proteinkinase B (PKB) zur Membran transportiert (Lizcano et al. 2002). Durch diesen insulinabhängigen Mechanismus werden Glucose, aber auch andere Nährstoffe in Muskel- und Fettgewebe vermehrt aufgenommen. Der Aufbau der jeweiligen Speicherformen und die dafür notwendige Enzymexpression werden ebenfalls durch Insulin katalysiert. Außerdem werden in der Leber die Gluconeogenese und Glykogenolyse gehemmt (Saltiel et al. 2001). Die Blutglucosekonzentration wird damit signifikant gesenkt. Insulin besitzt darüber hinaus als Botenstoff für die Auslösung zellproliferierender Signalkaskaden eine äußerst wichtige Rolle beim Wachstum und der Vermehrung vieler Gewebe (Salter et al. 1953).

Die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden führt also zu kurzfristigen (Glucoseaufnahme) und längerfristigen (Aufbau von Speicherformen, Genexpression, Zellproliferation) anabolen Effekten im Zielgewebe. Diese Tatsache verdeutlicht, dass Insulin sowohl als Signalmolekül als auch in seiner Funktion als Wachstumsfaktor für den Organismus unverzichtbar ist.

1.4 Metabolische Regulation der Insulinsekretion in *beta*-Zellen

1.4.1 Primäre und sekundäre Stimuli

Die Insulinsekretion aus den pankreatischen *beta*-Zellen ist unter physiologischen Bedingungen an die jeweilige Nährstoffmenge im Blut, insbesondere an die aktuelle Glucosekonzentration gekoppelt. Als primäre Stimuli gelten daher eine Reihe von Monosacchariden wie Glucose, Fructose und Mannose, einige ihrer Abbauprodukte (Glycerinaldehyd) sowie verschiedene Aminosäuren und Fettsäuren (Henquin et al. 1981). Die Entdeckung des sogenannten Inkretin-Effekts in den 1960er Jahren zeigte, dass der Anstieg der Blutglucosekonzentration allein nicht für die maximale Insulinausschüttung verantwortlich ist, sondern einige Hormone (Inkretine) aus dem Gastrointestinaltrakt bei oral verabreichter Glucose zu einer gesteigerten Sekretion von Insulin führen (Ebert et al. 1987). Als wichtigste Vertreter der Inkretine gelten GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) und GIP (*glucoseabhängiges insulinotropes Peptid*), die aus spezialisierten Zellen der Darmschleimhaut bei der Nahrungsaufnahme in die Blutbahn abgegeben werden und in den *beta*-Zellen über eine Erhöhung der cAMP-Konzentration und die damit verbundene Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) eine Steigerung der Insulinsekretion herbeiführen (Dupre et al. 1973,

Schuit et al. 1985, Ammala et al. 1993, Thorens et al. 1993). Außerdem wird die Konzentration der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in den *beta*-Zellen erhöht (Britsch et al. 1995), was mit der vermehrten Phosphorylierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen erklärt werden kann. Da Inkretine die glucoseinduzierte Insulinsekretion lediglich potenzieren und nicht direkt insulinotrop wirken, werden sie in die Gruppe der sekundären Stimuli eingeordnet. Die parakrinen Effekte des Glucagons aus den *alpha*-Zellen der Langerhans-Inseln sind ähnlich. Über G_s -gekoppelte Rezeptoren kommt es zu einer Erhöhung von cAMP und $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Martin et al. 1995).

Zu den sekundären Stimuli zählt auch Acetylcholin, der Neurotransmitter des Parasympathikus, wohingegen die Neurotransmitter und Hormone des Sympathikus (Noradrenalin, Adrenalin) einen hemmenden Effekt auf die Insulinsekretion vermitteln. Acetylcholin moduliert durch die erhöhte Aktivität des Parasympathikus bei Nahrungsaufnahme bereits vor den resorbierten Nährstoffen den *beta*-Zellmetabolismus, indem es über M_3 -Rezeptoren die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) anregt und die intrazelluläre Konzentration der Spaltprodukte Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) erhöht. Dies führt zu einer Proteinkinase-C-vermittelten gesteigerten Ca^{2+} -Sensitivität des Exozytoseprozesses (Arkhammar et al. 1989), zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (Ashcroft et al. 1994) sowie zu einer vermehrten Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum durch die direkte Interaktion von IP_3 mit seinen Rezeptoren. Die durch primäre Stimuli ausgelöste Ca^{2+} -Signaltransduktion ist durch diese Mechanismen verstärkt (Mendonca et al. 1998, Gilon et al. 1999, Lemmens et al. 2001). Auf der anderen Seite vermitteln die Neurotransmitter und hormonellen Vertreter des Sympathikus (Noradrenalin, Adrenalin), sowie Somatostatin und Cortisol einen inhibitorischen Effekt auf die Insulinsekretion, indem sie die elektrische Aktivität und $[\text{Ca}^{2+}]_c$ senken (Pace 1980, Cook et al. 1982, Nilsson et al. 1988, Debuyser et al. 1991, Ullrich et al. 2005).

1.4.2 Stimulus-Sekretionskopplung

Die *beta*-Zellen sind in der Lage, ihre Insulinsekretion akut und präzise an die jeweilige Blutglucosekonzentration anzupassen, da ihr Glucosemetabolismus mit der elektrischen Aktivität gekoppelt ist (Weir et al. 1990, De Vos et al. 1995). Die glykolytische und mitochondriale Verstoffwechslung der Glucose führt zum Anstieg von ATP in der Nähe von ATP-sensitiven Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle), die daraufhin schließen und eine Membrandedepolarisation bewirken, da dann der Anteil eines oder mehrerer bisher unbekannter depolarisierender Ströme überwiegt (Drews et al. 2010a). Durch Öffnung von

spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen wird die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht, welche das Triggersignal für die Insulinexozytose darstellt (Abb. 1.03). In humanen *beta*-Zellen sind spannungsabhängige Na^+ -Kanäle an der Auslösung der Ca^{2+} -getragenen Aktionspotentiale beteiligt (Braun et al. 2008, Rorsman et al. 2013).

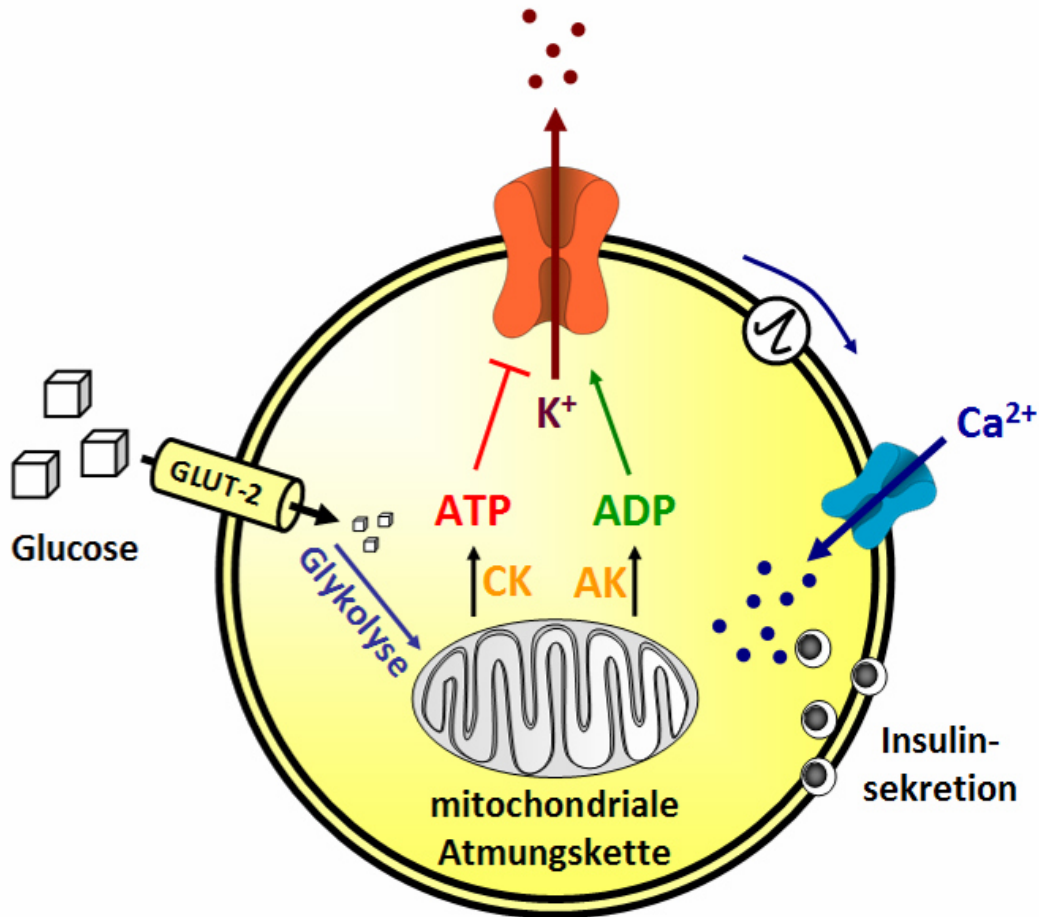


Abb. 1.03 - Stimulus-Sekretionskopplung pankreatischer *beta*-Zellen – CK: Creatinkinase, AK: Adenylatkinase

1.4.2.1 Glucosemetabolismus durch Glykolyse und Mitochondrien

Über insulinunabhängige Glucosetransporter (GLUT-2) wird Glucose aus dem Blut in die *beta*-Zellen aufgenommen und über die zytosolische Glykolyse verstoffwechselt. Dabei kommt dem ersten Enzym in dieser Kaskade, der Glucokinase, eine große Bedeutung zu, da über sie die Geschwindigkeit des Glucosesabbaus je nach Substratangebot reguliert wird (Matschinsky 1990). Nach der durch die Glucokinase katalysierten Phosphorylierung wird Glucose-6-phosphat weiter zu Pyruvat metabolisiert, welches dann im mitochondrialen Citratzyklus der ATP-Produktion dient. Die Reduktionsäquivalente NADH und FADH_2 , die durch den Glucoseabbau entstehen, werden durch die Atmungskettenkomplexe I und II in der Mitochondrienmembran oxidiert. Die hierdurch aktivierten Komplexe I, III und IV sorgen für das Pumpen von Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den Zwischenmembranraum

und bauen damit einen elektrochemischen Gradienten auf, der von der F_0F_1 -ATPase ausgenutzt wird, um ATP zu bilden. Das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi$ wird dadurch hyperpolarisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass Pyruvat selbst nicht die Insulinsekretion beeinflusst und die Stimulus-Sekretionskopplung sogar mit einem gehemmten Citratzyklus aktivierbar bleibt (Dukes et al. 1994). Das ATP dagegen, welches aus den Reduktionsäquivalenten der Glykolyse in den Atmungsketten der Mitochondrien gebildet wird, scheint für die elektrische Aktivität und Initiation der Insulinsekretion von elementarer Bedeutung zu sein. Der Citratzyklus ist dagegen für den Gesamtenergiebedarf der Zelle, wie beispielsweise für die Proteinbiosynthese, verantwortlich (Sener et al. 1978, Mertz et al. 1996, Düfer et al. 2002a). Die Differenzierung zwischen Stoffwechselprodukten aus der Glykolyse und dem Citratzyklus bewerkstelligen die *beta*-Zellen über Shuttlesysteme, die an bestimmte mitochondriale Atmungsketten gekoppelt sind. Bisher wurde das Glycerin-3-Phosphat- sowie Malat-Aspartat-Shuttle identifiziert und gezeigt, dass durch deren Hemmung die glucosestimulierte Insulinsekretion zum Erliegen gebracht wird (Dukes et al. 1994, Eto et al. 1999).

Ein weiteres System scheint für den gezielten Transport des ATPs aus den Atmungsketten zu den ATP-sensitiven Kaliumkanälen in der Zellmembran verantwortlich zu sein (Abb. 1.03). Eine in der Mitochondrienmembran verankerte Creatinkinase (CK) phosphoryliert ATP-abhängig Creatin (Gerbitz et al. 1996), welches in Zellmembrannähe wiederum seinen Phosphatrest auf ADP überträgt (Schulze et al. 2007). Auch die Aktivität der Adenylatkinase (AK) in Membrannähe beeinflusst das lokale ATP/ADP-Verhältnis an K_{ATP} -Kanälen (Schulze et al. 2007). Eine erhöhte Glucosekonzentration hemmt ihre Aktivität und damit den Abbau von ATP. Das Schließen der K_{ATP} -Kanäle wird hierdurch verstärkt (Olson et al. 1996).

1.4.2.2 Elektrische Aktivität und Insulinsekretion

Abhängig von der Anzahl der exprimierten K_{ATP} -Kanäle in der Zellmembran sind gewisse ATP-Konzentrationen und damit Glucosekonzentrationen erforderlich, um ausreichend viele Kanäle zu schließen und eine Membrandepolarisation herbeizuführen. Die jeweilige Glucosekonzentration wird als Schwelle bezeichnet und unterscheidet sich beispielsweise zwischen menschlichen (ca. 3 mM Glucose) und murinen (ca. 6 mM) Inseln (Rorsman et al. 2013).

Bei geringen Glucosekonzentrationen befindet sich die Zellmembran in einem hyperpolarisierten Zustand (ca. -70 mV), da die meisten K_{ATP} -Kanäle geöffnet sind und so einen K^+ -Ausstrom gewährleisten (Meissner et al. 1978, Ashcroft et al. 1989). Wird aufgrund eines erhöhten Glucoseangebotes mehr ATP bereitgestellt, kommt es zur Hemmung des K^+ -Ausstroms und damit zu einer allmählichen Depolarisation der Membran (Malaisse et al.

1987). Wird das Schwellenpotential von ca. -55 mV für spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle erreicht, öffnen diese und ein Ca^{2+} -Einstrom ins Zytosol bildet die depolarisierte Phase. Ca^{2+} vermittelt den ATP-abhängigen Transport der Insulinvesikel zur Membran (Henquin 1978, Meissner et al. 1978, Rorsman et al. 1985). Die Exozytose wird dabei über eine Interaktion von Ca^{2+} -sensitiven Proteinen in der Membran wie den Synaptotagminen mit den Vesikeln über einen SNARE-Komplex eingeleitet (Malaisse et al. 1971, Kiraly-Borri et al. 1996, Rorsman et al. 2003, Thurmond et al. 2003).

Das Aktionspotential wird durch das verzögerte Öffnen von spannungsabhängigen und Ca^{2+} -sensitiven Kaliumkanälen und dem repolarisierenden Ausstrom von K^+ beendet.

1.4.2.3 Biphasischer Verlauf der Insulinsekretion

Experimentell lässt sich die Insulinsekretion der *beta*-Zellen auf einen Glucosestimulus in sogenannten Perifusionsexperimenten verfolgen: Langerhans-Inseln befinden sich in einer Versuchskammer und werden mit Glucoselösungen unterschiedlicher Konzentrationen umströmt. Zu definierten Zeitintervallen sammelt man die aus der Perifusionskammer kommende Lösung und misst die von den Inseln sezernierte Menge an Insulin. Interessanterweise ist die Reaktion der *beta*-Zellen in einer Insel synchron, da sie über *gap junctions* untereinander elektrisch in Verbindung stehen. Die Insulinsekretion verläuft dabei nach einem typischen biphasischen Muster: Einem schnellen, hohen Anstieg als erste Phase folgt unmittelbar eine erhöhte, längere zweite Phase der Insulinsekretion (Abb. 1.04) (Curry et al. 1968).

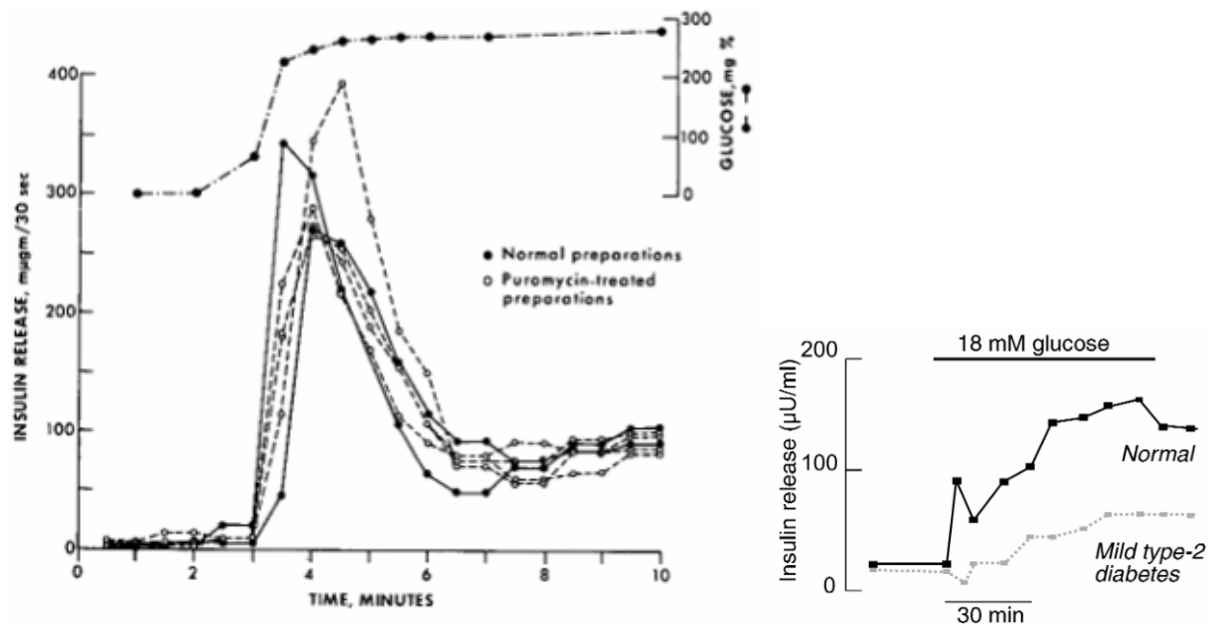


Abb. 1.04 - **Biphasischer Verlauf der Insulinsekretion von Langerhans-Inseln in Perfusionsexperimenten** - Glucoselösungen steigender Konzentrationen werden in einen isolierten Pankreas der Ratte perfundiert und stimulieren eine biphasische Insulinsekretion der Langerhans-Inseln (links). Die durch Puromycin gehemmte Insulinbiosynthese bewirkt lediglich eine leichte Hemmung der zweiten Phase. Bei menschlichen Spendern beobachtet man ebenfalls einen biphasischen Verlauf der Insulinsekretion, der bei Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 2 gestört sein kann (rechts). - (Curry et al. 1968, Rorsman et al. 2000)

Es konnte gezeigt werden, dass die erste Phase der Insulinsekretion vor allem den hepatischen Glucosestoffwechsel anspricht (Hemmung der Gluconeogenese und Glykogenolyse, Glucoseaufnahme und Glykogenabbau) und so die Blutglucosekonzentration effektiv reguliert. Die zweite, langfristige Phase ist für die Glucoseaufnahme ins periphere Gewebe verantwortlich und dauert bis zur Normalisierung der Blutzuckerwerte an (Rorsman et al. 2000, Kasai et al. 2010). Bei einer Glucosestoffwechselstörung wie dem Diabetes mellitus Typ 2 (s. Kap. 1.5.3) kann eine *beta*-Zelldysfunktion mit der beeinträchtigten oder fehlenden ersten und eventuell sogar zweiten Phase vorliegen (Polonsky et al. 1988, Rorsman et al. 2000). Kontrovers wird in der Literatur diskutiert, welche Insulinvesikel an den verschiedenen Phasen der Insulinsekretion beteiligt sind und ob es in den *beta*-Zellen überhaupt eine Kompartimentierung der Vesikel gibt. In diesem Zusammenhang wurde lange Zeit von einem so genannten *readily releasable pool* in Membrannähe gesprochen, der Vesikel für die erste Phase bereithält, während in der zweiten Phase Vesikel aus tiefer liegenden Bereichen zur Exozytose gelangen (Daniel et al. 1999). Neuere Erkenntnisse sind, dass unabhängig von ihrem Speicherort auch das Alter der Vesikel bei den verschiedenen Phasen der Exozytose eine Rolle spielt (Konstantinova et al. 2007, Michael et al. 2007).

1.4.2.4 Oszillation des *beta*-Zellmetabolismus

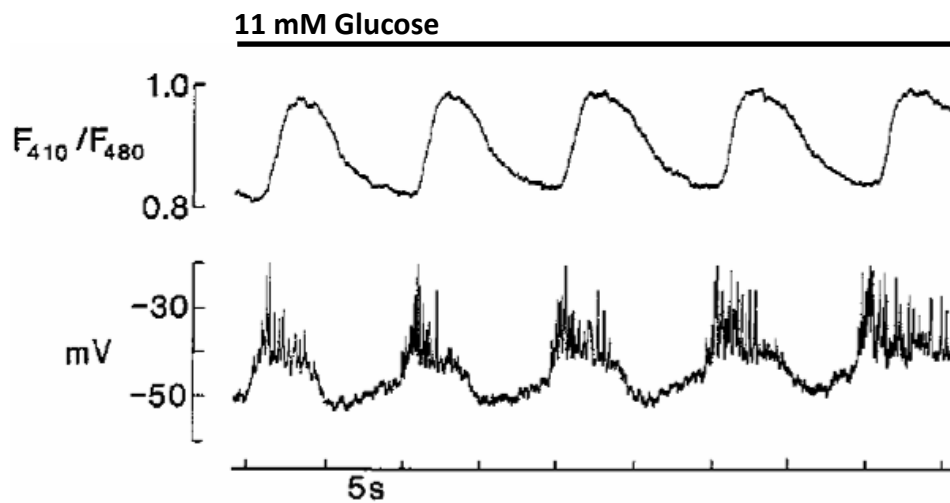


Abb. 1.05 - Paralleler oszillationsartiger Verlauf von intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (oben) und elektrischer Aktivität in *beta*-Zellen bei 11 mM Glucose (zweite Phase) - modifiziert nach (Santos et al. 1991)

Die Insulinsekretion stimulierter *beta*-Zellen verläuft pulsatil (Gilon et al. 1993). Gleichzeitige Messungen von $[\text{Ca}^{2+}]_c$ und dem Membranpotential V_m zeigen, dass nach einem Wechsel von niedrigen auf hohe Glucosekonzentrationen der ersten Phase mit kontinuierlichen Aktionspotentialen eine zweite Phase (Abb. 1.05) mit Intervallen elektrischer Aktivität und Inaktivität folgt. Dieses Oszillationsmuster lässt sich auch im Verlauf von $[\text{Ca}^{2+}]_c$ erkennen (Santos et al. 1991). Die Ursache für diese Beobachtung scheint eine oszillierende ATP-Bildung der Mitochondrien zu sein, wie Messungen des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi$ und der ATP-Konzentration belegen (Krippeit-Drews et al. 2000, Ainscow et al. 2002). Bei einer stimulierten *beta*-Zelle sind die Mitochondrien stark elektronegativ geladen und begünstigen somit den Ca^{2+} -Einstrom nach Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Hierdurch kommt es zu einer Depolarisation der Mitochondrienmembran und zu einer Verminderung des elektrischen Gradienten, der für die ATP-Synthese durch die F_0F_1 -ATPasen benötigt wird. Dementsprechend werden weniger K_{ATP} -Kanäle in der Zellmembran geschlossen, was zu einer Hyperpolarisation von V_m führt. Die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle schließen und der Einstrom von Ca^{2+} in die Mitochondrien wird verringert. Dadurch repolarisiert das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi$ und die ATP-Synthese kann wieder gesteigert werden (Krippeit-Drews et al. 2000, Drews et al. 2010a).

Eine pulsatile Insulinsekretion verursacht oszillationsartige Veränderungen der Insulinkonzentration im Blut (Goodner et al. 1977, Koerker et al. 1978). Dies trägt nachweislich zur Verbesserung der Empfindlichkeit der Zielgewebe im Vergleich zu einer konstant erhöhten Plasmainsulinkonzentration bei (Ward et al. 1990). Veränderungen im Oszillationsmuster

können bereits vor der Manifestation eines Typ 2 Diabetes mellitus auf eine Störung der Glucosehomöostase hindeuten (Lang et al. 1981, O'Meara et al. 1993).

1.4.2.5 ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle)

Die wichtigste Verbindung zwischen mitochondrialem Glucosemetabolismus und der elektrischen Aktivität der *beta*-Zelle stellen die K_{ATP} -Kanäle dar (Ashcroft et al. 1990). Pharmakologisch können sie durch die Sulfonylharnstoffe und Glinide gehemmt werden. Dadurch wird die Insulinsekretion unabhängig vom Glucoseangebot und mitochondrialen Metabolismus gesteigert (Mariot et al. 1998, Ashcroft et al. 1999). Durch den K_{ATP} -Kanalöffner Diazoxid wird hingegen eine Hemmung der Stimulus-Sekretionskopplung hervorgerufen, was therapeutisch gegen die übermäßig gesteigerte Hormonsekretion von Insulinomen genutzt wird (Ritzel et al. 2004).

Unter physiologischen Bedingungen dient das über den Glucosestoffwechsel gebildete ATP zur Schließung der Kanäle (Aguilar-Bryan et al. 1995). Die unter diesen Bedingungen gemessenen intrazelluläre ATP-Konzentrationen von 3-5 mM (Detimary et al. 1998, Tarasov et al. 2006) würden jedoch zu einer dauerhaften Hemmung der Kanäle führen, da für den halbmaximalen Effekt durch ATP an isolierten Kanälen bereits mikromolare Konzentrationen ausreichen (Cook et al. 1984). Die K_{ATP} -Kanäle sind jedoch auch in stimulierten *beta*-Zellen aktiv und leisten so den entscheidenden Beitrag zu Oszillationen von V_m , $[Ca^{2+}]_c$ sowie zur pulsatilen Insulinsekretion. Daher wird angenommen, dass die Kanäle von der zellulären Nukleotidkonzentration abgeschirmt sind. Diese Hypothese wird durch die nachweisliche Beteiligung der Adenylatkinase und Creatinkinase an der K_{ATP} -Kanalaktivität (s. Kap. 1.4.2.1) (Krippeit-Drews et al. 2003, Schulze et al. 2007) sowie durch Messungen der ATP-Menge direkt unterhalb der *beta*-Zellmembran getragen (Kennedy et al. 1999). Außerdem wird die ATP-Sensitivität der Kanäle durch intrazelluläre Aktivatoren wie Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP_2) (Baukrowitz et al. 1998) und langkettige Acyl-CoA-Ester (Larsson et al. 1996, Schulze et al. 2003) moduliert. Andere Hypothesen gehen davon aus, dass die ATP-Effekte am Kanal durch ADP antagonisiert werden (Ueda et al. 1997) oder eine erhöhte Na^+K^+ -ATPase-Aktivität in Kanalnähe die ATP-Konzentration senkt (Niki et al. 1989). In der Literatur findet man widersprüchliche Angaben zur hydrolytischen Aktivität der SUR1-Untereinheiten der K_{ATP} -Kanäle gegenüber ATP-Molekülen: Während in den Arbeiten von Zingman und Tarasov die Hypothese aufgestellt wird, dass hierdurch die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle reguliert werden kann (Zingman et al. 2001, Tarasov et al. 2004, Tarasov et al. 2006), kommen neuere Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass die ATP-Hydrolyse für die K_{ATP} -Kanalaktivität eine untergeordnete Bedeutung hat (Ortiz et al. 2013).

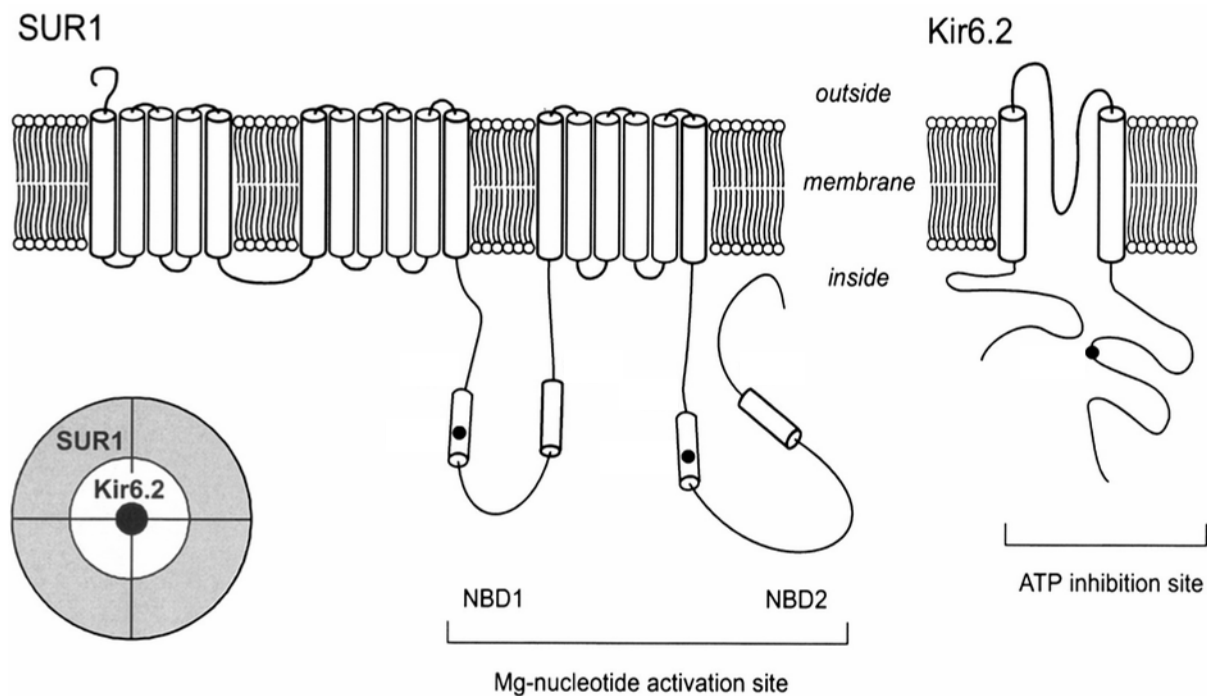


Abb. 1.06 - Aufbau der K_{ATP} -Kanäle in der Zellmembran bestehend aus der regulatorischen Untereinheit SUR1 mit den Nukleotid-Bindungsdomänen (NBD) und der Kaliumpore Kir6.2 - modifiziert nach (Tarasov et al. 2004)

Der heterooktamere K_{ATP} -Kanal in der *beta*-Zelle besteht aus den zwei Untereinheiten $K_{IR6.2}$ (*inward rectifier*) und SUR1 (*sulfonylurea receptor*) (Clement et al. 1997, Shyng et al. 1997). Vier $K_{IR6.2}$ -Untereinheiten bilden eine K^+ -leitende Pore, an der vier SUR1-Untereinheiten benachbart liegen. Die SUR1-Untereinheiten stellen dabei die regulatorische Untereinheit des Kanals dar und bestehen aus mehreren transmembranären Domänen (TMDs) sowie intrazellulären Nukleotid-Bindungsdomänen (NBDs) (Aguilar-Bryan et al. 1995). Sie führen über eine Interaktion mit Nukleotiden in Verbindung mit Mg^{2+} (ABC-Transporter, *ATP binding cassette*) zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit (Gribble et al. 1998, Matsuo et al. 2005). Der inhibitorische Effekt durch ATP wird vor allem über die Interaktion mit der $K_{IR6.2}$ -UE vermittelt (Tucker et al. 1997, Tanabe et al. 1999, Markworth et al. 2000).

Für die vollständige Funktionstüchtigkeit des K_{ATP} -Kanals müssen beide Untereinheiten vorhanden sein (Mikhailov et al. 2005). Dementsprechend führen Mutationen beim Menschen zu sehr seltenen aber schwerwiegenden Glucosestoffwechselstörungen, weil die Insulinsekretion unabhängig von der jeweiligen Blutglucosekonzentration verläuft (Shah et al. 2007). Bewirkt die Mutation einen permanenten Offenzustand der Kanäle, resultiert daraus eine verminderte Insulinsekretion und chronische Hyperglykämie (Flanagan et al. 2007). Eine hyperinsulinämische Hypoglykämie (HI) wird dagegen durch eine genetisch bedingte Aktivitätsminderung der Kanäle verursacht (Thomas et al. 1995, Dunne et al. 1997, Drews et al. 2010a). Versucht man diese Krankheitsbilder in Knockout-Mausmodelle zu

übertragen, zeigt sich jedoch, dass weder $K_{IR6.2}$ - noch SUR1-defiziente Tiere über die beim Menschen so stark ausgeprägte Symptomatik verfügen (Miki et al. 1998, Seghers et al. 2000). Bei diesen Tieren müssen also K_{ATP} -kanalunabhängige Kompensationsmechanismen zu einem Erhalt der Glucosetoleranz führen.

1.5 Diabetes mellitus

Eine unzureichende Insulinproduktion oder -wirkung im Körper führt zwangsläufig zu erhöhten Blutzuckerspiegeln und wird bei einem chronischen Verlauf als Diabetes mellitus bezeichnet. Namensgebend für diese Stoffwechselerkrankung ist ihr Hauptsymptom, die Ausscheidung der Glucose über den Urin - ein Vorgang, der unter physiologischen Bedingungen nicht eintritt.

Fast 350 Millionen Menschen weltweit sind von Diabetes mellitus betroffen. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird im Jahr 2030 jede siebte Todesursache auf Diabetes oder eine Folgeerkrankung zurückführbar sein.

Die Klassifikation nach den Leitlinien der Deutsche Diabetes-Gesellschaft von 2009 beinhaltet neben seltenen Ursachen der Erkrankung vor allem die allgemein bekannte Unterscheidung zwischen zwei Typen des Diabetes mellitus.

1.5.1 Begleit- und Folgeerkrankungen

Langfristig erhöhte Blutzuckerspiegel in Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom können zu schwerwiegenden Nerven- und Gefäßschädigungen führen. Dabei führen die Glykosylierung von Proteinen und die Veränderung von Gewebestrukturen zur funktionellen Einschränkung lebenswichtiger Organe. Abhängig von der Lokalisation und Größe des betroffenen Gefäßnetzes wird zwischen Mikro- und Makroangiopathie unterschieden. Netzhautschäden verursachen Erblindung, Durchblutungsstörungen des Gehirns fördern Demenz und arteriosklerotische Veränderungen können Nierenversagen, Schlaganfälle und Herzinfarkte auslösen. Das gleichzeitige Auftreten von Neuropathien begünstigt nekrotische Entwicklungen an Extremitäten (diabetisches Fußsyndrom) und bedingt Amputationen.

1.5.2 Typ 1 Diabetes mellitus

T1DM tritt vor allem im Kindes- und Jugendalter auf und wird durch eine Autoimmunreaktion gegen die insulinproduzierenden Zellen im Körper ausgelöst. Als Ursachen werden sowohl genetische (Sepe et al. 2009) als auch Umweltfaktoren, wie verschiedene Infektionen und Lebensmittel im Säuglingsalter, diskutiert. Die als Insulitis bezeichnete Entzündungsreaktion ist gegen spezifische Strukturen der *beta*-Zellen gerichtet

und führt zu ihrem allmählichen Untergang. Die hyperglykämischen Symptome treten meist erst auf, wenn ein Großteil der *beta*-Zellen bereits zerstört ist. Der absolute Insulinmangel bewirkt neben der verschlechterten Glucoseaufnahme in die Zielzellen auch eine ungebremste hepatische Glucoseneubildung und -freisetzung. Für die Patienten stellt die lebenslange Substitution von Insulin den einzigen Ausweg aus dieser gefährlichen Stoffwechsellage dar.

1.5.3 Typ 2 Diabetes mellitus

Mit über 90 % ist der T2DM unter Diabetikern am meisten verbreitet und vor allem an eine ungesunde Lebensweise wie Über- bzw. Fehlernährung und Bewegungsmangel, aber auch (epi-)genetische Prädisposition gekoppelt. Charakterisiert wird die Erkrankung sowohl durch eine gestörte Insulinsekretion als auch durch eine unzureichende Wirkung des Hormons im Zielgewebe. Eine Abnahme der Insulinempfindlichkeit und vor allem Defekte in den nachgeschalteten Signalkaskaden scheinen ursächlich für die zunehmenden „Insulinresistenz“ zu sein, die zur vermehrten Zirkulation von Glucose und Insulin im Blut führt. Die kompensatorische Sekretionssteigerung der *beta*-Zellen sowie der permanente Einfluss von erhöhten Nährstoffkonzentrationen (*Glucolipotoxizität*) führen zu schädigenden Einflüssen auf die *beta*-Zellfunktion (Kahn et al. 2009) und ihrem allmählichen Untergang durch apoptotische Prozesse (Rahier et al. 2008). Auch das Immunsystem scheint an der verschlechterten Stoffwechsellage beteiligt zu sein (Pickup et al. 1998, Matthaei et al. 2000). In dieser frühen Erkrankungsphase, die auch als Prädiabetes bezeichnet wird, ist das Auftreten von diabetestypischen Symptomen und Begleiterkrankungen eher selten oder gar nicht ausgeprägt. Der Nachweis von erhöhten Insulin- und Glucosekonzentrationen im Blut ist meist ein Zufallsbefund. Charakteristisch für diesen Zustand sind die milde Ausprägung der Beschwerden (Papanas et al. 2011) und die durch Lebensstilinterventionen häufig erreichte Reversibilität der abnorm veränderten Blutwerte (Moore et al. 2011, Perreault et al. 2012). Daher besteht ein großes wissenschaftliches und klinisches Interesse daran, weitere Parameter und Marker des Prädiabetes zu finden (Hollander et al. 2012) und das individuelle Diabetesrisiko bei Patienten so früh und genau wie möglich abschätzen zu können (Buysschaert et al. 2011, Moutzouri et al. 2011, Shaw 2011).

Die leitliniengerechte Therapie der Typ-2-Diabetiker (Matthaei et al. 2009) sieht zunächst eine deutliche Gewichtsreduktion durch Diäten, sportliche Betätigung oder in manchen Fällen sogar durch chirurgische Maßnahmen vor (Yip et al. 2013). Meist kann hierdurch eine deutliche Verbesserung des Krankheitsbildes und der Lebensqualität erreicht werden. Ferner stehen (orale) antidiabetische Arzneistoffe zur Verfügung, mit denen versucht wird, die

enterale Resorption (*alpha*-Glucosidase-Hemmer) und die hepatische Neubildung der Glucose zu unterdrücken (Metformin) (Walton et al. 1979, Zhou et al. 2001) sowie die Hormonsekretion der *beta*-Zellen zu steigern (Sulfonylharnstoffe, Glinide, Inkretinmimetika, Dipeptidyl-Peptidase-4-Hemmer) (Mariot et al. 1998, Gallwitz 2010) und die Glucoseaufnahme in das Zielgewebe zu verbessern (Glitazone) (LeBrasseur et al. 2006). Neuartige Wirkstoffe (SGLT2-Hemmer) hemmen die Glucoserückresorption über einen im proximalen Tubulus der Niere lokalisierten Na⁺-abhängigen Glucosetransporter (*Sodium-dependent glucose cotransporter 2*, SGLT-2) und erreichen die Blutzuckersenkung über die vermehrte renale Glucoseausscheidung (Meng et al. 2008).

Bis heute ist keine Therapiemaßnahme darauf ausgelegt, die *beta*-Zellen vor den schädigenden Einflüssen des Nährstoffmetabolismus, einer Immunreaktion oder anderer Noxen zu schützen. Sekretionssteigernde Therapiemaßnahmen scheinen sogar Erkrankungen des endo- und exokrinen Pankreas zu fördern: Während Sulfonylharnstoffe nach langjähriger Anwendung eine *beta*-Zelldysfunktion begünstigen können, stehen GLP-1-Analoga im Verdacht unter bestimmten Umständen Entzündungen oder Karzinome des Pankreasgewebes zu verursachen (Aston-Mourney et al. 2008, Garg et al. 2010, Singh et al. 2013). Für einige Sulfonylharnstoffe konnte darüber hinaus ein negativer Effekt auf die Gesamtmorbidität und Mortalität der Patienten nachgewiesen werden (Tzoulaki et al. 2009, Schramm et al. 2011). Daher kann die weitere Diabetesprogression in vielen Fällen zur Insulinpflichtigkeit und therapiebedingten Begleiterkrankungen der Patienten führen.

1.6 Oxidativer Stress als Ursache der *beta*-Zelldysfunktion

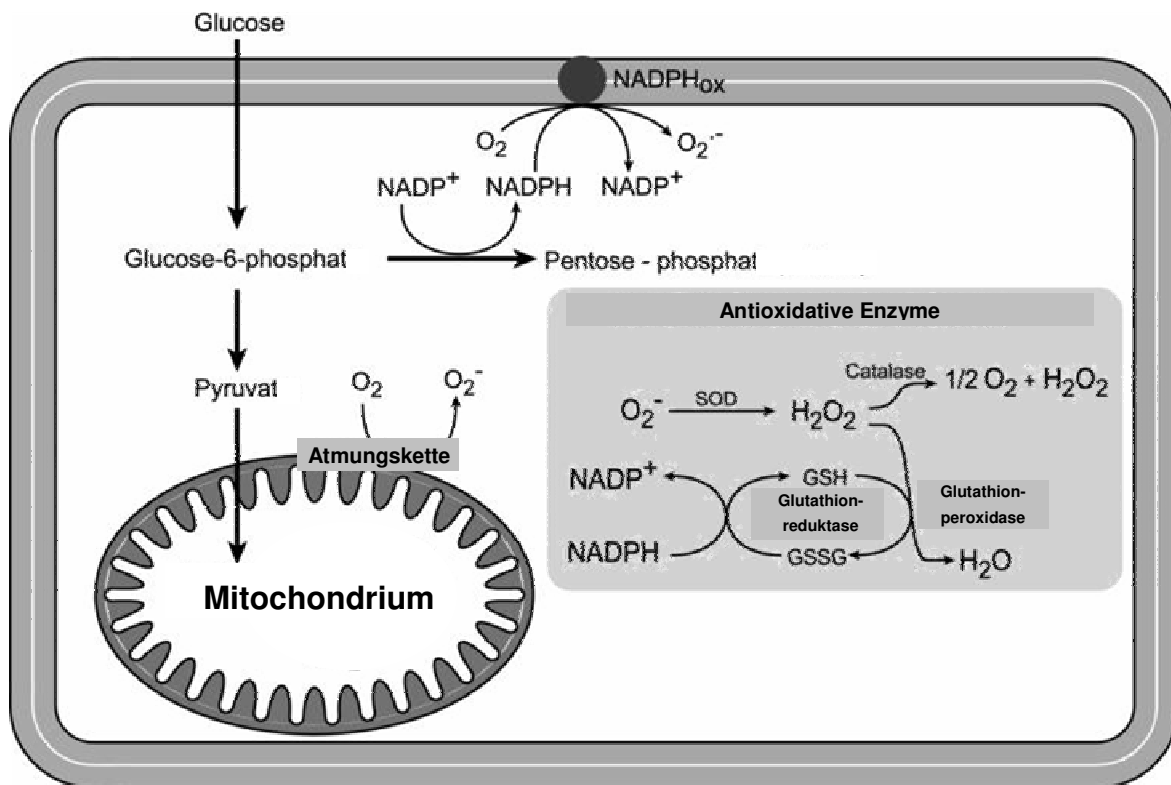


Abb. 1.07 - ROS-Entstehung und -Eliminierung in *beta*-Zellen - modifiziert nach (Newsholme et al. 2007)

Der aerobe zelluläre Energiemetabolismus sowie die unspezifische Immunabwehr führen permanent zur Bildung von niedermolekularen Sauerstoffverbindungen verschiedener Oxidationsstufen (Cheeseman et al. 1993), die in der Lage sind, mit zellulären Strukturen intensiv zu interagieren. Aufgrund ihrer Reaktivität und Zusammensetzung bezeichnet man sie als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder reaktive Stickstoffspezies (RNS). Je nach antioxidativer Kapazität ihrer Umgebung und der Dauer ihrer Existenz können sie durch Oxidation von (Membran-)Lipiden, Proteinen (Ionenkanäle, Enzyme) und Nukleinsäuren (DNA, RNA) zelluläre Schäden verursachen. Dieser Zustand wird als oxidativer Stress bezeichnet, der die Grundlage zahlreicher neurologischer, kardiovaskulärer sowie onkologischer Erkrankungen darstellt (Oberley et al. 1979, Piper 1989, Coyle et al. 1993). Auch im Hinblick auf die Funktion und Viabilität der *beta*-Zellen im Rahmen eines Diabetes mellitus rückt oxidativer Stress immer mehr in den Fokus der Grundlagenforschung und klinischen Forschung. So scheint der Einfluss von Immunzellen bei beiden Diabetestypen sowie der gesteigerte Nährstoffmetabolismus vor allem bei Typ 2 über eine Veränderung des oxidativen Status die insulinproduzierenden Zellen zu schädigen (Lupi et al. 2007, Newsholme et al. 2007, Robertson et al. 2007, Lenzen 2008).

Auch die Insulinsensitivität des Zielgewebes wird durch oxidativen Stress beeinflusst und kann dementsprechend durch die Gabe von Antioxidantien verbessert werden (Henriksen et al. 2011, Rains et al. 2011).

1.6.1 Bildung und Elimination von ROS und RNS

Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies sind meist ionischer, radikalischer Natur oder mit einer (an-)organischen Peroxidstruktur versehen. Ungepaarte Elektronen in den Valenzschalen lassen sie zu äußerst reaktionsfreudigen Molekülen werden. Vor allem die ungebremste Bildung weiterer Radikale in Form einer Kettenreaktion ist für ihre schädigende Wirkung verantwortlich.

Zu den ROS und RNS gehören u.a. das Superoxidanionradikal ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikal ($OH\cdot$), Nitrosylradikal ($NO\cdot$) sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und andere längerkettige Peroxide.

Bereits unter physiologischen Bedingungen wird durch die Übertragung von weniger als vier Elektronen auf Sauerstoff in den Atmungsketten der Mitochondrien eine gewisse Menge von ROS erzeugt. Das dabei entstehende $O_2^{\cdot-}$ kann sich spontan zu H_2O_2 umwandeln, was die Formation von Hydroxyl- und Peroxylradikalen im Sinne einer Fe^{2+} -abhängigen Fenton-Reaktion (Haber-Weiß-Reaktion) im weiteren Verlauf begünstigt. Die relativ kurze Halbwertszeit der Hydroxylradikale kann mit ihrer ausgesprochen hohen Reaktivität erklärt werden. Aufgrund der schlechten Diffusionsfähigkeit einiger ROS durch biologische Membrane akkumulieren sie bevorzugt intrazellulär (Liu et al. 1998a, Moller et al. 2007, Cordeiro 2013).

Die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) wird durch verschiedene Isoformen der NO-Synthase (NOS) katalysiert. Während die konstitutive NOS geringe Mengen von NO als endotheliales und neuronales Signalmolekül synthetisiert, werden größere Mengen vor allem durch die induzierbare Isoform zusammen mit anderen ROS von aktivierten Makrophagen produziert (Moncada et al. 1993, Rodeberg et al. 1995).

Phagozytierende Immunzellen wie Makrophagen und Granulozyten verfügen darüber hinaus über ROS-produzierende Enzyme zur antimikrobiellen Abwehr. Diese Enzyme werden NAD(P)H-Oxidasen (NOX) genannt, da sie durch einen Ein-Elektronen-Transfer von NAD(P)H zu molekularem Sauerstoff Superoxidanionradikale und teilweise auch H_2O_2 bilden. Bisher konnten vier Isoformen identifiziert werden, von denen drei zur klassischen NOX-Familie gehören und in vielen Geweben wie dem Gastrointestinaltrakt, Muskel- und Fettgewebe, Endothel- und embryonalen Stammzellen exprimiert sind.

Die genaue physiologische Funktion der NOX in Zellen außerhalb des Immunsystems ist bisher nicht geklärt (Newsholme et al. 2007). Oliveira und Kollegen konnten in *beta*-Zellen

der Ratte ebenfalls die Expression von NOX-Untereinheiten nachweisen (Oliveira et al. 2003) und weitere Untersuchungen von Imoto und Kollegen stellten die Bedeutung der NOX innerhalb der Stimulus-Sekretionskopplung heraus, da ihre Hemmung zu einer veränderten intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase führte und die glucosestimulierte Insulinsekretion beeinträchtigte (Imoto et al. 2008). Die Autoren machen die veränderten physiologischen ROS-Konzentrationen für die *beta*-Zelldysfunktion verantwortlich und tragen damit zum Konzept bei, welches geringe Konzentrationen bestimmter ROS als zelluläre Signalfaktoren ansieht (s. Kap. 1.6.4) (Pi et al. 2007, Morgan et al. 2009).

Die meisten Körperzellen verfügen über enzymatische und nichtenzymatische Systeme zur Abwehr von oxidativem Stress: So katalysiert die Superoxiddismutase (SOD) die Reaktion von O_2^- zu H_2O_2 und molekularem Sauerstoff. Es existieren in den verschiedenen Geweben Isoformen der SOD, die abhängig von ihrem jeweiligen Metallion (Kupfer, Zink, Mangan) charakterisiert werden. Neben zytosolischen und plasmatischen CuZn-abhängigen Isoformen (SOD1 und 3) ist die Mn-abhängige SOD2 in der Mitochondrienmembran lokalisiert. H_2O_2 wird letztendlich durch die Katalase (Cat) oder den Verbrauch von reduziertem Glutathion (GSH) zu molekularem Sauerstoff und H_2O umgesetzt. Der Cat dienen dabei ausschließlich kurzkettige aliphatische Alkohole als Elektronendonatoren.

Die Glutathion-Reduktase (GSR) sorgt unter physiologischen Bedingungen dafür, dass intrazellulär in ausreichendem Maße GSH bereitsteht, welches empfindliche Strukturen wie proteinogene Thiolgruppen vor ihrer Oxidation schützt. Als Coenzym wird NAD(P)H aus dem Pentosephosphatweg benötigt. Glutathion ist ein aus Glutamat, Glycin und Cystein aufgebautes Peptid, welches in Anwesenheit der Glutathionperoxidase (GPx) in seine oxidierte Disulfidform (GSSG) umgewandelt werden kann. Am verbreitetsten sind die Isoformen 1 und 4 der GPx, die vor allem H_2O_2 und Lipidperoxide spalten (Mates et al. 1999, Mates 2000). Verschiedene Vitamine mit Radikalfängereigenschaften wie Retinoide (Vitamin A), Ascorbinsäure (C), Cholecalciferol (D) und Tocopherole (E) dienen ähnlich wie GSH dem nichtenzymatischen Schutz von Proteinen und Zellkompartimenten vor Oxidation.

Die ausreichende Menge und Funktionstüchtigkeit der aufgeführten Schutzmechanismen ist entscheidend für die Abwehr von Erkrankungen, deren Pathogenese auf oxidativem Stress beruht (Robinson 1998). So sind Mutationen der SOD ursächlich für eine Reihe von neurodegenerativen Veränderungen (Maier et al. 2002).

In verschiedenen Arbeiten konnte der Nachweis erbracht werden, dass insulinproduzierende Zelllinien oder Inselzellen von Nagern im Gegensatz zu anderen Geweben über eine geringere Expression und Aktivität antioxidativer Enzyme verfügen und auch die GSH-Konzentrationen niedriger sind (Grankvist et al. 1981, Ammon et al. 1983, Lenzen et al. 1996,

Tiedge et al. 1997). Verschiedene Diabetesmodelle im Tier, wie durch die Gabe von Alloxan oder Streptozotocin ausgelöster Diabetes, vermitteln ihre schädigende Wirkung auf die *beta*-Zelle durch die übermäßige Generierung von ROS (Takasu et al. 1991). Konsequenterweise kann durch eine Überexpression oder Applikation von Cat ein Schutz erreicht werden (Tiedge et al. 1998, Xu et al. 1999, Gurgul et al. 2004). Darüber hinaus konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Zellen der unspezifischen Immunantwort, wie aktivierte Makrophagen, Inselzellen durch die Sekretion von ROS, RNS und Zytokinen zerstören (Hanenberg et al. 1989, Coppieters et al. 2012). Die zytokininduzierte Aktivierung verschiedener NO-Synthasen im Inselgewebe trägt zur übermäßigen Bildung von RNS bei (Southern et al. 1990, Corbett et al. 1992, Suschek et al. 1994, Vasu et al. 2014). Durch die Überexpression von SOD, Cat und GPx in humanen Inseln oder einer insulinproduzierenden Tumorzelllinie konnte in den Experimenten von Tiedge, Moriscot und Kollegen ein Schutz gegenüber RNS erreicht werden (Tiedge et al. 1999, Moriscot et al. 2000). Dies konnten Chen und Kollegen in einem transgenen Mausmodell mit überexprimierter SOD und Cat gegenüber durch Streptozotocin- und RNS-induziertem Zellschaden nachvollziehen, jedoch schützte die erhöhte Aktivität der antioxidativen Enzyme nicht gegen die unmittelbare *beta*-Zellschädigung durch Zytokine (Chen et al. 2005). Gurgul und Kollegen kommen zu ähnlichen Erkenntnissen (Gurgul et al. 2004). Die Autoren weisen auf weitere Signalwege hin, die durch Zytokine ROS-unabhängig aktiviert werden und zu grundlegenden Beeinträchtigungen der Funktion und Viabilität von *beta*-Zellen führen können. Somit kann lediglich die Erhöhung der antioxidativen Kapazität in Inselzellen kein allumfassendes Schutzkonzept gegen eine übermäßige Zytokinwirkung darstellen.

All diese Erkenntnisse bekräftigen die Hypothese der autoimmunvermittelten Zerstörung von *beta*-Zellen im Rahmen eines T1DM und tragen auch zum Verständnis der Pathogenese eines T2DM bei, da der Untergang von *beta*-Zellen auch im Verlauf dieser Erkrankung mit den bereits zu einem frühen Zeitpunkt signifikant erhöhten Entzündungsmarkern im Rahmen einer „*low grade inflammation*“ in Verbindung gebracht werden kann (Cruz et al. 2013, Lontchi-Yimagou et al. 2013, Wang et al. 2013b).

1.6.2 Mitochondrien als Ursprung und Target von oxidativem Stress

1.6.2.1 Ursprung von ROS unter physiologischen Bedingungen

Den Mitochondrien kommt bei der Entstehung und Wirkung von ROS eine große Bedeutung zu. Die der mitochondrialen ATP-Synthese zugrundeliegende Reaktion stellt die Übertragung von Protonen und Elektronen auf Sauerstoff dar, die allgemein bekannt als

„Knallgasreaktion“ stark exotherm abläuft. Die Reaktion wird durch die Umleitung der Elektronen über die Atmungskettenkomplexe und die Trennung der Reaktionspartner (Brennstoffzellenprinzip) „entschärft“. Die Komplexe I, III und IV nutzen dabei einen Teil der Energie zum aktiven Transport der Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum. Beim Rückfluss der Protonen über die F_0F_1 -ATPase wird im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung die Energie zur Synthese von ATP genutzt.

Werden bei der Nettoreaktion ($4 H^+ + O_2 + 4 e^- \rightarrow 2 H_2O$) weniger als vier Elektronen auf Sauerstoff übertragen, kann die Bildung von ROS begünstigt sein. Unter physiologischen Bedingungen beläuft sich der Anteil von ROS zu allen gebildeten Sauerstoffverbindungen auf ca. 3 % (Kirkinezos et al. 2001). Die Gefahr einer möglichen Kettenreaktion mit der Bildung weiterer ROS und RNS wird vor allem durch die Anwesenheit von antioxidativen Abwehrmechanismen verringert. So ist es auch nicht erstaunlich, dass *beta*-Zellen im Rahmen eines Überangebotes an Glucose, der sogenannten Glucotoxizität, mit ihrer geringen Ausstattung an antioxidativen Enzymen der vermehrten Bildung von ROS nicht mehr ausreichend begegnen können und sich in einem Zustand von oxidativem Stress befinden (Rolo et al. 2006, Newsholme et al. 2007, Poitout et al. 2008, Drews et al. 2010b).

1.6.2.2 ROS-Entstehung bei Komplex-II-Inhibition durch 3-NPA

Wie schon in Kapitel 1.4.2.1 erwähnt, bringen die Reduktionsäquivalente NADH und $FADH_2$ Elektronen über die Komplexe I und II in die Atmungskette. Dabei nimmt der Komplex II eine Sonderstellung ein, da er mit seiner Succinat-Dehydrogenaseaktivität als einziges membranständiges Enzym auch am Citratzyklus beteiligt ist. Ein aktivierter Zellmetabolismus führt durch Oxidation zur Umwandlung von Succinat zu Fumarat an diesem Enzym. Die Elektronen werden im Atmungskettenkomplex auf kovalent gebundenes FAD übertragen und bilden so $FADH_2$. Bei einer Autofluoreszenzmessung des FAD-Gehaltes in *beta*-Zellen registriert man bei der Erhöhung der Glucosekonzentration somit einen Fluoreszenzabfall (Van De Winkel et al. 1983). Die Elektronen des $FADH_2$ werden schließlich über Eisen-Schwefel-Cluster auf das Coenzym Q der Atmungskette übertragen (Yankovskaya et al. 2003). In verschiedenen Arbeiten wird die Hemmung des Komplex II mit einem Anstieg der Konzentrationen an ROS in Verbindung gebracht (Busija et al. 2005, Bacsi et al. 2006).

3-Nitropropionsäure (3-NPA) dient als falsches Substrat für die Succinat-Dehydrogenase und hemmt die Succinat-Bindungstasche irreversibel (Huang et al. 2006). 3-NPA, auch Hiptagensäure genannt, ist ein Toxin verschiedener Pflanzen und Pilze und wurde 1920 erstmals als Glucoseester, dem Hiptagin, aus der Wurzelrinde von *Hiptage madablota* isoliert und 1949 durch Hydrolyse als freie Carbonsäure erhalten (Carter et al. 1949). Die

Substanz wird vor allem zur Induktion und Erforschung von neurodegenerativen Erkrankungen, die durch oxidative Schädigungen entstehen (z.B. Chorea Huntington) im Tiermodell eingesetzt (Borlongan et al. 1997). Als Mechanismus wird sowohl der gehemmte Elektroneneintritt in die Atmungskette als auch der Rückfluss der Elektronen von Coenzym Q auf Succinat diskutiert, welcher die Entstehung von ROS unmittelbar zwischen Komplex I, II und Coenzym Q begünstigt (Abb. 1.08) (Bacsi et al. 2006, Moreno-Sanchez et al. 2013). Interessanterweise sind ROS selbst in der Lage, die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase zu hemmen und damit die Generierung weiterer ROS im Sinne einer positiven Rückkopplung zu fördern (Nulton-Persson et al. 2001, Moser et al. 2009).

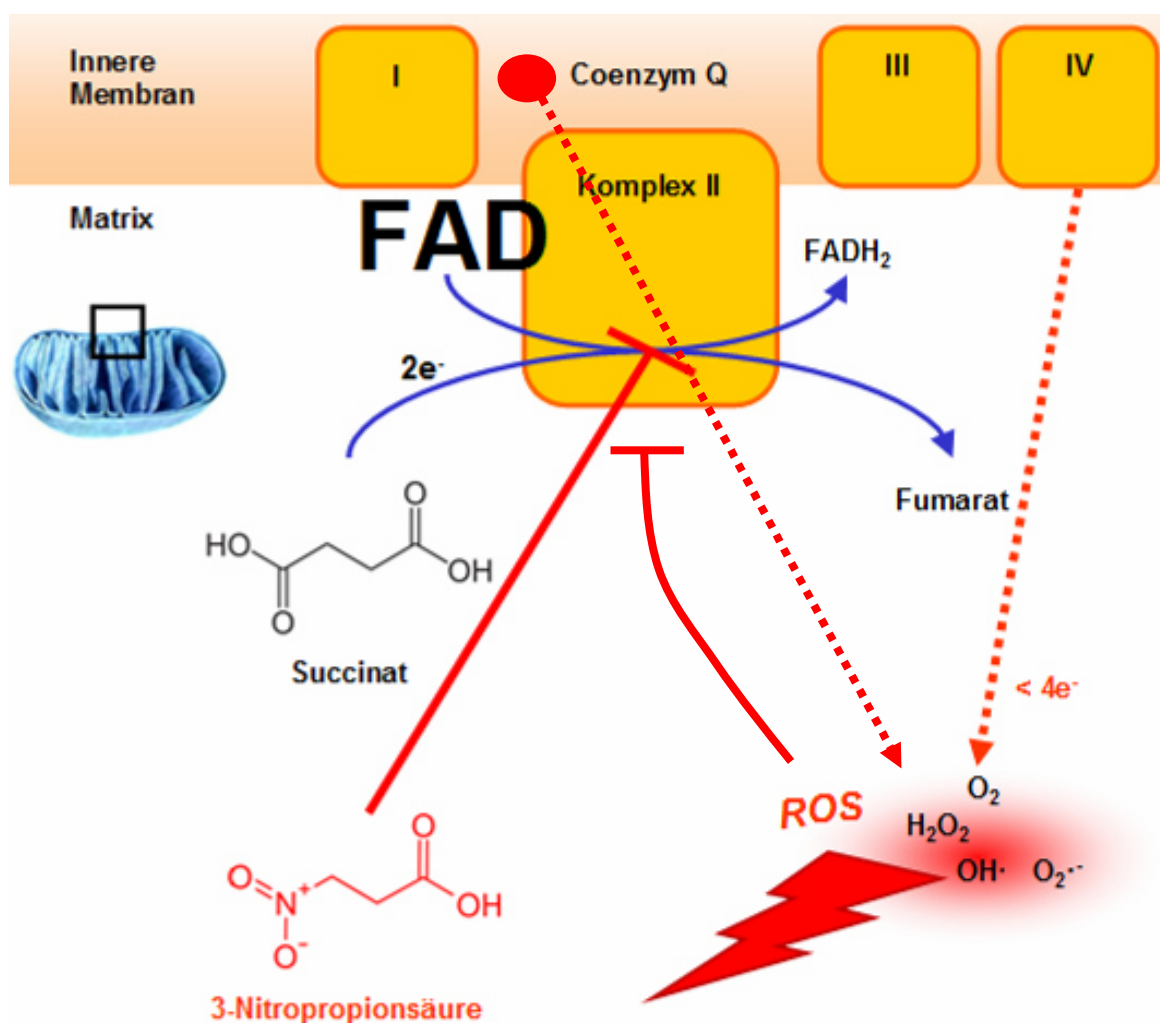


Abb. 1.08 - **Hypothese der mitochondrialen ROS-Entstehung durch Hemmung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität des Komplex II mit 3-NPA** - Als Ursachen der ROS-Entstehung werden die Übertragung von weniger als vier Elektronen auf Sauerstoff am Ende der Atmungskette sowie der verminderte Elektroneneintritt und Rückfluss unmittelbar zwischen Komplex I, II und Coenzym Q diskutiert. Erhöhte Konzentrationen von ROS sind selbst in der Lage, die Komplex-II-Aktivität zu hemmen.

1.6.2.3 Auswirkungen von oxidativem Stress auf Mitochondrien

Erhöhte Konzentrationen an ROS führen zu einer Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi$ sowie einer Ca^{2+} -Umverteilung vom endoplasmatischen Retikulum in die Mitochondrien, das letztendlich den Untergang der Mitochondrien bedingt (Swann et al. 1991, Krippeit-Drews et al. 1999, Drews et al. 2000a, Düfer et al. 2002b). Die Freisetzung von proapoptotischen Inhaltsstoffen ins Zytosol und die Fragmentierung von DNA führen schließlich zum Zelltod (Orrenius et al. 1989, Ichas et al. 1998).

Eine Pore in der inneren Mitochondrienmembran (PTP, *permeability transition pore*) scheint für den Mechanismus verantwortlich zu sein, da sie sowohl durch Ca^{2+} als auch durch ROS selbst in einen geöffneten Zustand mit großer Leitfähigkeit überführt wird (Brookes et al. 2004a). Dies bedingt den Zusammenbruch von $\Delta\Psi$ und der davon abhängigen ATP-Produktion (Brady et al. 2004). Der ungebremsste Ca^{2+} -Einstrom in den Intermembranraum zerstört die Mitochondrien (Duchen 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die oxidative Phosphorylierung durch die ROS-induzierte Expression einer weiteren Pore, des Thermogenins (UCP2, *Uncoupling Protein 2*), verringert wurde (Krauss et al. 2003, Li et al. 2008). UCP2 bewirkt ein Protonenleck in der inneren Mitochondrienmembran, das den Protonenrückstrom von der ATP-Synthese entkoppelt und in *beta*-Zellen zur Hemmung der Stimulus-Sekretionskopplung führt (Chan et al. 1999a, Zhang et al. 2001). Die intrazelluläre Verringerung von ATP führt letztendlich zum Zelltod (Richter et al. 1996).

1.6.3 Glucolipotoxizität

Setzt man insulinproduzierende Zellen akut und kurzfristig ihren primären Stimuli wie Glucose oder Fettsäuren aus, so beobachtet man in der Regel die erhöhte Insulinsekretion als physiologisch sinnvolle und wichtige Reaktion. Im Gesamtorganismus wird durch die Insulinwirkung der Nährstofftransport ins Zielgewebe gefördert und damit werden die jeweiligen Konzentrationen im Blut effektiv gesenkt. Hierdurch verkleinert sich der Stimulus auf die *beta*-Zellen, die ihre Sekretionsrate daraufhin wieder auf ein basales Niveau herabsetzen.

Ist die Insulinwirkung an den Zielzellen eingeschränkt oder werden dem Körper durch anhaltende Überernährung erhöhte Nährstoffmengen zugeführt, befindet sich die *beta*-Zelle in einer Art Dauerstimulation, die zu einer Einschränkung ihrer Funktion und letztendlich zu einem Untergang der endogenen Insulinproduktion führt - dies bedingt wiederum das Vorhandensein von erhöhten Nährstoffkonzentrationen im Blut. Diese Beobachtungen protokollierten Andersson und Kollegen bereits Anfang der 1970er Jahre, als sie verschiedene Inkubationsbedingungen für murine Langerhans-Inseln testeten und bei hohen

Glucosekonzentrationen über einen längeren Zeitraum eine eingeschränkte Insulinsekretion und einen Verlust des Insulingehaltes beobachteten (Andersson 1974). Während die akute Gabe von Palmitat zu einer Steigerung der glucosestimulierten Insulinsekretion führte (Warnotte et al. 1994), bewirkte die langfristige Inkubation von Inseln mit Palmitat eine eingeschränkte Insulinsekretion (Zhou et al. 1994). Diese kurz- und langfristigen Einflüsse von Lipiden auf die Insulinsekretion traten auch bei Probanden auf, die Infusionen verschiedener freier Fettsäuren erhielten (Paolisso et al. 1995, Carpentier et al. 1999). Neben einem Funktionsverlust der *beta*-Zellen wurden durch die langfristigen Inkubationen mit freien Fettsäuren auch apoptotische Prozesse ausgelöst (Shimabukuro et al. 1998, Lupi et al. 2002). Dass solche Veränderungen auch beim Menschen stattfinden, lässt sich anhand vieler klinischer Studien eindrucksvoll darlegen, in denen erhöhte Glucosekonzentrationen und Lipidwerte im Blut bereits vor der Manifestation eines T2DM vorliegen und die Patienten unabhängig von der jeweiligen Therapie nach einigen Jahren insulinpflichtig werden (U.K. Prospective Diabetes Study Group 1995, Tabak et al. 2009, Schellenberg et al. 2013).

Der Wandel physiologisch essentieller und lebensnotwendiger Nährstoffstimuli zu permanenten schädigenden Einwirkungen auf die *beta*-Zellen wurde erstmals von Unger und Kollegen in ihren Konzepten als Glucotoxizität für die chronisch erhöhten Blutglucosekonzentrationen und als Lipotoxizität bei Vorliegen von Hyperlipidämien beschrieben (Unger et al. 1985, Unger 1995).

1.6.3.1 Glucotoxizität

In Kapitel 1.6.2 wurde bereits dargestellt, dass dem mitochondrialen Glucosemetabolismus als Ursache der ROS-Entstehung eine große Bedeutung zukommt. Doch auch weitere Entstehungswege werden bei der langfristigen Einwirkung hoher Glucosekonzentrationen diskutiert. Paul Robertson stellt in seinem Übersichtsartikel sechs mögliche Wege vor, bei denen in *beta*-Zellen durch exzessiven Glucosemetabolismus oxidativer Stress entstehen kann (Abb. 1.09 1-6) (Robertson 2004).

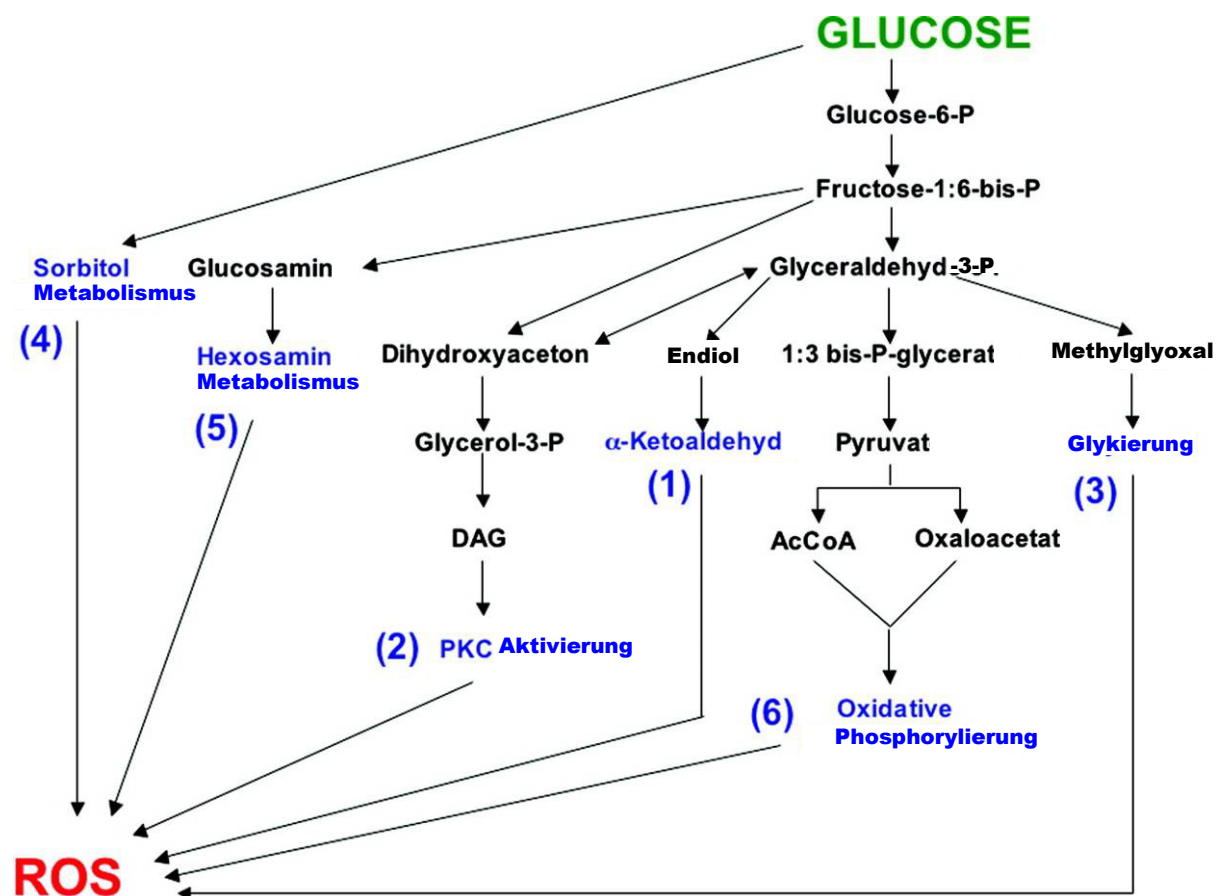


Abb. 1.09 - Ursachen der ROS-Entstehung durch Glucotoxizität - modifiziert nach (Robertson 2004)

Hierzu zählen die Autooxidation von phosphoryliertem Glycerinaldehyd zu α -Ketoaldehyd und H_2O_2 (1). Dieser Weg wird durch hohe Glucosekonzentrationen begünstigt, da sie die Aktivität der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) hemmen (Sakai et al. 2003) und damit die Akkumulation von Glycerinaldehyd fördern (Wolff et al. 1987). Ausgehend vom Dihydroxyaceton wird über Diacylglycerol die PKC aktiviert (2), die über die NAD(P)H-Oxidase die ROS-Konzentrationen der Zelle erhöhen kann. Durch die verminderte GAPDH-Aktivität kann außerdem die Bildung von Methylglyoxal aus Glycerinaldehyd und Dihydroxyaceton begünstigt sein (3), welches über eine Reaktion mit proteinogenen

Aminogruppen ROS entstehen lässt (Wells-Knecht et al. 1995, Thornalley et al. 1999). Darüber hinaus wird bei einer verminderten glykolytischen Aktivität Glucose vermehrt zu Sorbitol reduziert (4). Der intrazelluläre Sorbitolmetabolismus führt zu einer Erhöhung von NADH, welches ebenfalls die GAPDH hemmen kann und die Formation der bereits erwähnten Zwischenprodukte begünstigt. Außerdem werden hohe Konzentrationen von Fructose über die Glutamin-fructose-6-phosphat-Transaminase zu phosphoryliertem Glucosamin umgesetzt (5), das schließlich über die Bildung verschiedener Glykoproteine wie Entzündungsfaktoren die Glucosesensitivität der *beta*-Zellen herabsetzt und auch die Formation von H₂O₂ begünstigt (Monauni et al. 2000, Kaneto et al. 2001).

Daneben existiert der bereits in Kapitel 1.6.2 beschriebene mitochondriale Weg der ROS-Formation über die Atmungsketten und der oxidativen Phosphorylierung (6). Takahashi und Kollegen konnten zeigen, dass sowohl die zytosolische ROS-Formation über die Glykolyse als auch die mitochondriale Generierung zum gesamten oxidativen Status der *beta*-Zellen beitragen (Takahashi et al. 2004).

1.6.3.2 Lipotoxizität

Interessanterweise scheint die Lipotoxizität bzw. Hyperlipidämie häufig nur in Zusammenhang mit einem übermäßigen Glucosestimulus schädliche Effekte wie eine verminderte Insulinenexpression, Sekretionsrate oder erhöhte Apoptose auf die *beta*-Zelle zu haben (Jacqueminet et al. 2000, Briaud et al. 2001, Harmon et al. 2001, Briaud et al. 2002, El-Assaad et al. 2003), deshalb muss das Konzept korrekterweise als Glucolipotoxizität zusammengefasst werden.

Welcher biochemische Mechanismus dieser synergistischen Wirkung von Glucose und Fettsäuren zu Grunde liegen könnte, wurde bereits Mitte der 1990er Jahre von Prentki und Kollegen in ihrer Hypothese zusammengefasst (Abb. 1.10).

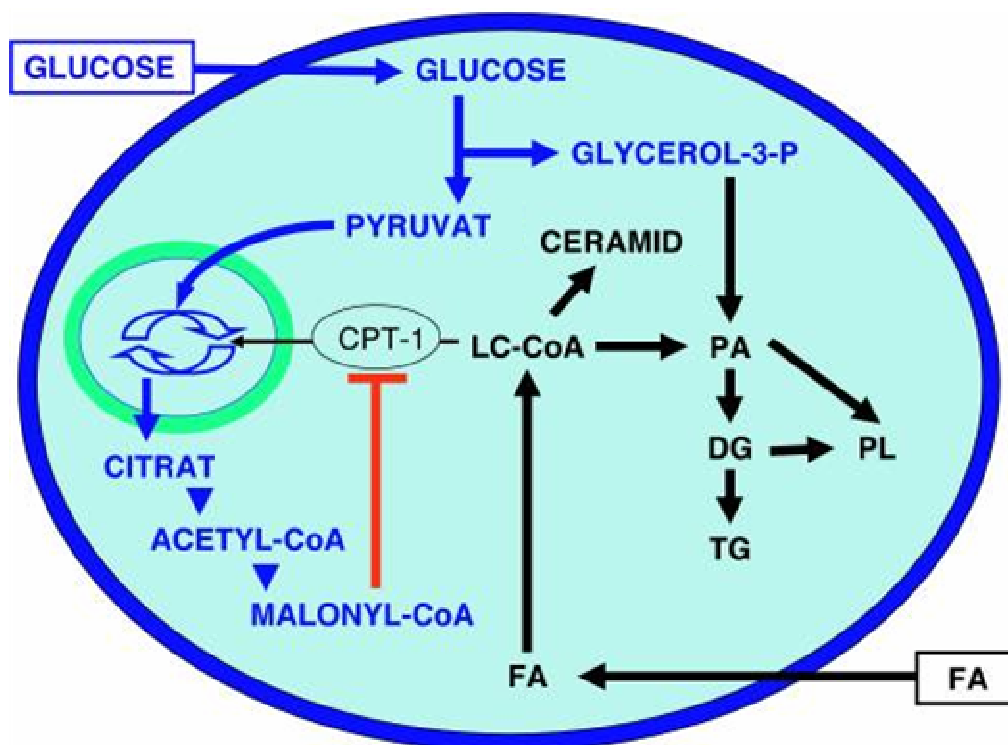


Abb. 1.10 - Hypothese der glucoseabhängigen Lipotoxizität im gemeinsamen Konzept von Glucolipotoxizität - CPT-1: Carnitin-Acyltransferase, LC-CoA: aktivierte langkettige Fettsäuren, PA: Phosphatidsäure - DG: Diglycerid - PL: Phospholipide - TG: Triglyceride - FA: Fettsäuren – modifiziert nach (Poitout et al. 2008)

Bei einem normalen Glucoseangebot werden Fettsäuren physiologischerweise über das Carnitin-Acyltransferase-System (CPT-1, *carnitine-palmitoyl transferase-1*) in die Mitochondrien geleitet, wo aus ihnen mittels *beta*-Oxidation Energie gewonnen wird. Erhöht sich die intrazelluläre Glucosekonzentration und damit die Menge an Stoffwechselprodukten wie Acetyl- und in weiteren Schritten Malonyl-CoA, wird die Aktivität der CPT-1 gehemmt

und dadurch die Akkumulation von langkettigen aktivierten Fettsäuren im Zytosol gefördert hat (Prentki et al. 1996). Diese Akkumulation begünstigt die Veresterung zu Triglyceriden über verschiedene Zwischenstufen (Prentki et al. 2006) und die Bildung weiterer Lipidarten wie Ceramiden, die nachweislich die *beta*-Zellfunktion einschränken (Kelpke et al. 2003, Lang et al. 2011) und die Apoptose fördern (Shimabukuro et al. 1998). Abhängig vom jeweiligen Gewebetyp spielt es eine Rolle, welche Fettsäuren für die Triglyceridbildung herangezogen werden (Li et al. 2010a): Während veresterte ungesättigte Fettsäuren keine schädlichen, sondern unter Umständen sogar protektive Eigenschaften gegenüber dem *beta*-Zellmetabolismus haben können, führt die hauptsächliche Speicherung von gesättigten Fettsäuren wie Palmitat zu lipotoxischen Veränderungen (Eitel et al. 2002, Listenberger et al. 2003, Maedler et al. 2003, Karaskov et al. 2006, Morgan et al. 2010). Der Einfluss der verschiedenen Fettsäuren scheint jedoch komplexer zu sein als hier dargestellt werden kann, da sie unabhängig von ihrer Metabolisierung über weitere extra- und intrazelluläre Wechselwirkungen Einfluss auf apoptotische Prozesse nehmen und funktionelle Einschränkungen auslösen können (Lameloise et al. 2001, Diakogiannaki et al. 2007, Maris et al. 2011). Collins und Kollegen konnten beispielsweise zeigen, dass Fettsäuren unabhängig von ihrer chemischen Kettenmodifikation die Glucagonsekretion in *alpha*-Zellen steigern und hierüber einen bedeutenden Beitrag zur chronischen Hyperglykämie im Rahmen eines Diabetes mellitus leisten können (Collins et al. 2008).

Außerdem wird die Lipogenese in *beta*-Zellen über eine palmitatvermittelte Aktivierung der AMPK (AMP-activated protein kinase) gesteuert (Wang et al. 2007). Erhöhte intrazelluläre Konzentrationen an LDL und Cholesterin führen ebenfalls zu einer verschlechterten *beta*-Zellfunktion (Abderrahmani et al. 2007, Brunham et al. 2007) und dem apoptotischen Zelltod (Cnop et al. 2002).

Mechanistisch konnte nachgewiesen werden, dass eine Hochfettdiät (HFD) im Tiermodell oder die Inkubation von Inseln mit Fettsäuren zu einer erhöhten Expression und dem Einbau von UCP-2 in die inneren Mitochondrienmembran führt (s. Kap. 1.6.2.3), was mit einer Einschränkung der ATP-Synthese und Insulinsekretion assoziiert ist (Lameloise et al. 2001, Chan et al. 2001a). Auch der Exozytoseapparat auf Ebene der Vesikelverschmelzung mit der Zellmembran scheint durch Palmitat gestört zu werden (Olofsson et al. 2007).

Die Tatsache, dass die genetische Ausschaltung einer Isoform der Proteinkinase C (PKC) zu einem Schutz vor glucolipotoxischen Einwirkungen auf die Insulinsekretion *in vivo* und *in vitro* führt, macht deutlich, dass die PKC für die schädigenden Effekte hoher Glucose- und Lipidkonzentrationen auf die *beta*-Zelle eine wichtige Rolle spielt (Schmitz-Peiffer et al. 2007). Die Aktivierung der PKC durch glucolipotoxische Bedingungen (Inoguchi et al. 2000)

verringert die Lipolyse in der *beta*-Zelle, wobei verschiedene Lipolyse-Produkte essentiell für eine physiologische Insulinsekretion sind (Cantley et al. 2009, Peyot et al. 2009). Außerdem werden über die PKC die ROS-bildenden NOX-Enzyme durch Phosphorylierung ihrer p47^{phox}-Untereinheiten aktiviert. Daraufhin findet eine Translokation dieser und weiterer Untereinheiten (p40- und p67^{phox}, Rac1 oder 2) vom Zytosol zu den bereits in der Membran befindlichen Proteinen gp91^{phox} und p22^{phox} statt, welche durch Assoziation den NOX-Komplex bilden (Newsholme et al. 2007). Durch spezifische Hemmung der PKC-Aktivität konnte die glucoseabhängige ROS-Bildung teilweise verhindert werden (Morgan et al. 2007). Eine zweitägige Infusion einer Lipidlösung führte in Ratten zu einer eingeschränkten *beta*-Zellfunktion, welche über eine gezielte Hemmung der NOX verhindert werden konnte (Koulajian et al. 2013). In Nierengewebe bei Ratten, die im Rahmen eines durch Streptozotocin induzierten Diabetes eine Nephropathie ausbildeten, wurde eine erhöhte Expression verschiedener NOX-Untereinheiten nachgewiesen (Etoh et al. 2003). Die gezielte pharmakologische Inhibition der NOX könnte daher ein potentielles Therapiekonzept darstellen, um beispielsweise diabetische Begleiterkrankungen zu behandeln (Lambeth et al. 2008, Gorin et al. 2013).

Neben der intrazellulären Aufnahme, Aktivierung und Metabolisierung von Fettsäuren und anderen Lipiden muss an dieser Stelle auch auf deren mögliche Funktion als Ligand an verschiedenen Rezeptoren in der Zellmembran eingegangen werden. Für die *beta*-Zellen konnten in den Arbeiten von Itoh und Kollegen hohe Expressionsraten des Fettsäurerezeptors 1 (*free fatty acid receptor 1*, FFAR1) nachgewiesen werden, bei dem es sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor handelt, der früher auch als GPR40 (*G-protein-coupled receptor 40*) bezeichnet wurde (Itoh et al. 2003a). Die Insulinsekretion wird durch Liganden an diesem Rezeptor glucoseabhängig gesteigert (Schmidt et al. 2011) und ist auch bei langfristiger Rezeptorstimulation erhöht (Tan et al. 2008). Darüber hinaus führt die spezifische Rezeptorstimulation zu keinen erhöhten Apoptoseraten (Wagner et al. 2013). Diese Erkenntnisse machen den Rezeptor zu einem interessanten Target für neuartige antidiabetische Wirkstoffe (Araki et al. 2012). Da jedoch dessen genetische Ausschaltung bei Mäusen die schädlichen Einflüsse einer HFD auf die Glucosehomöostase nicht abwenden konnte (Latour et al. 2007, Kebede et al. 2008, Cnop et al. 2008b), wird deutlich, dass die durch Palmitat und andere Fettsäuren vermittelte *beta*-Zelldysfunktion und erhöhte Apoptoseraten im Rahmen von Glucolipotoxizität unabhängig von der Aktivität dieses Fettsäurerezeptors verlaufen müssen.

1.6.4 ROS als Signalfaktor der Insulinsekretion

ROS in Form von Superoxidanion-Radikalen oder H_2O_2 treten durch den physiologischen Glucosemetabolismus permanent auf und sind als kleine, diffusionsfähige Moleküle praktisch überall in der Zelle vertreten. Aus heutiger wissenschaftlicher Sicht darf man sie daher nicht nur dem pathologischen Konzept des oxidativen Stresses zuordnen, sondern muss annehmen, dass sie zu einem gewissen Grad auch einen physiologischen Stellenwert haben (Finkel 1998, Buetler et al. 2004).

Eindrucksvoll konnte dies anhand großer Probandenstudien belegt werden, in denen die Gabe von Antioxidantien mit einer erhöhten Mortalität korrelierte (Bjelakovic et al. 2007). Andere Studien zeigen, dass gewisse ROS-Konzentrationen in Körperzellen vorhanden sein müssen, damit deren antioxidative Verteidigungsmechanismen in ausreichender Menge vorhanden sind und so beispielsweise Zielzellen insulinempfindlich sind (Ristow et al. 2009, Peternelj et al. 2011, Smith et al. 2013). Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass *beta*-Zellen unter dem Einfluss von oxidativem Stress entgegen älteren Untersuchungen (Tiedge et al. 1997, Tyrberg et al. 1999) durchaus in der Lage sein können, ihren antioxidativen Status gegenüber ROS zu verbessern (Lacraz et al. 2009, Pi et al. 2009). Auf der anderen Seite sind die meisten Körperzellen jedoch auf einen gewissen Speicher von Antioxidantien zur Abwehr von immunologischen, kardiovaskulären und onkologischen Erkrankungen angewiesen und haben dadurch keine eingeschränkte Funktion (Obrenovich et al. 2011).

Für die pankreatischen *beta*-Zellen konnte gezeigt werden, dass sie im Vergleich zu anderen Geweben über eine geringe antioxidative Enzymausstattung verfügen, die im Hinblick auf oxidativen Stress nachteilig, unter zellphysiologischer Sicht womöglich essentiell ist (Lenzen et al. 1996, Tiedge et al. 1997). In Versuchen mit geringen Konzentrationen von exogen zugeführtem H_2O_2 (bis $4 \mu\text{M}$) bei unstimulierten *beta*-Zellen kam es zu einer Erhöhung von intrazellulärem Ca^{2+} und der Insulinsekretion (Janjic et al. 1999, Maechler et al. 1999, Pi et al. 2007). Die Modulation der intrazellulären ROS durch Radikalfänger und Inhibitoren der Atmungsketten führten zur Einschränkung der *beta*-Zellfunktion (Kondo et al. 2000, Leloup et al. 2009). Kontrovers wird dagegen über den alleinigen Stellenwert von ROS in der Stimulus-Sekretionskopplung diskutiert: Während Leloup und Kollegen aufzeigten, dass in unstimulierten Ratteninseln allein durch die Hemmung der Atmungskette mit Rotenon oder Antimycin sowohl ROS als auch Insulinsekretion ansteigen und durch den Radikalfänger Trolox wieder sinken (Leloup et al. 2009), zeigten Pi und Kollegen, dass die Hemmung der Atmungskette ausnahmslos zu einer verschlechterten glucosestimulierten Insulinsekretion führt (Pi et al. 2010c). Auch wenn ROS unter bestimmten Bedingungen (z.B. geringe ROS-Konzentrationen bei unstimulierten *beta*-Zellen) die Insulinsekretion erhöhen kann, muss

der glucosestimulierten Insulinsekretion immer ausreichend ATP zur Verfügung stehen (Krippeit-Drews et al. 1999, Maechler et al. 1999, Wang et al. 2013a). Da jedoch die direkte schädigende Interaktion von H_2O_2 mit einer Vielzahl von zellulären Funktionsproteinen in der *beta*-Zelle nachgewiesen werden konnte, kann ROS keinesfalls als wichtigster Signalfaktor für die Insulinsekretion dargestellt werden (Pi et al. 2010c).

1.6.5 Nrf2-vermittelte antioxidative Enzymexpression

Abgesehen von der kontrovers diskutierten Bedeutung endogener ROS als Signalfaktor für die grundlegende Zellfunktionalität auf der einen Seite und als Ursache oxidativer Schädigungen mit der Folge eines gravierenden metabolischen Zellkollapses auf der anderen Seite, konnten durch die Untersuchungen von Talalay und Itoh zytosolische Proteine identifiziert werden, die sich als ROS-empfindliche Regulator-Transkriptionsfaktor-Komplexe für detoxifizierende und antioxidative Enzyme herausstellten (Talalay et al. 1988, Itoh et al. 1999). Dabei ist Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2p45 (NFE2)-related factor 2*) ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der zusammen mit dem kleinen Maf-Protein an die Promotorregion (ARE, *antioxidative responsive element*) der Gene dieser protektiven Enzyme bindet und so ihre Expression vermittelt. Neben elektrophilen Molekülen wie ROS sind auch chemische Substanzen mit einer Polyphenol-Struktur in der Lage, die Translokation von Nrf2 aus dem Zytosol in den Zellkern zu vermitteln (Nguyen et al. 2003). Als Regulationsmechanismus dient die Bindung von Nrf2 an das Keap1-Protein (*kelch-like ECH-associated protein 1*), welches an Aktinfilamente des Zytoskeletts assoziiert ist (Kang et al. 2004). So wird im inaktiven Zustand Nrf2 zytosolisch zurückgehalten und kann die Enzymexpression transkriptionell nicht mehr steuern (Giudice et al. 2006, Baird et al. 2011). Zwei Keap1-Proteine sind über ihre BTB/POZ-Domänen (*BR-C, ttk and bab/Pox virus and Zinc finger*) miteinander verbunden und stellen ein Homodimer dar. Über ihre DGR-Domänen (*double glycine repeat*) wechselwirken sie mit Nrf2 (Zipper et al. 2002, Kang et al. 2004) (Abb. 1.11). Zwischen der BTB/POZ- und DGR-Domäne befindet sich die intervenierende Region (IVR) des Keap1-Proteins, die durch zahlreiche Cysteinreste über ROS-sensible Thiolgruppen verfügt (Dinkova-Kostova et al. 2002). Durch oxidative bzw. elektrophile Reaktionen werden die Thiolgruppen zu intramoluklaren Disulfidbrücken umgewandelt, was eine Konformationsänderung der Keap1-Proteine bewirkt und Nrf2 aus seiner Bindung entlässt (Wakabayashi et al. 2004, Zhang 2006). Keap1 verstärkt die Nrf2-Wirkung zusätzlich über eine Verminderung der Ubiquitinierung und dem damit verbundenen proteasomalen Abbau des Transkriptionsfaktors (Kobayashi et al. 2006). Hierzu dissoziieren Ubiquitin-Ligasen (Cullin-E3-Ligase, Cul3) bei Konformationsänderung von den BTB-Domänen, die im inaktiven Zustand die

Ubiquitinierung des Nrf2 katalysieren und es so für das Proteasom markieren (Zhang 2006). Auch die Nrf2-Biosynthese selbst verstärkt die Wirkung, indem es zu einer erhöhten Kerntranslokation kommt (Itoh et al. 2003a, Kobayashi et al. 2006). Auch konnte gezeigt werden, dass durch eine direkte Phosphorylierung des Nrf2-Proteins im Keap1-Komplex eine Translokation ausgelöst werden kann (Giudice et al. 2006, Baird et al. 2011). Hierfür kommen neben der Proteinkinase C (PKC), der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) auch die Proteinkinase am endoplasmatischen Retikulum (*protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*, PERK) in Frage, die durch oxidativen Stress aktiviert werden können (Huang et al. 2002, Bloom et al. 2003, Cullinan et al. 2003, Zhang 2006).

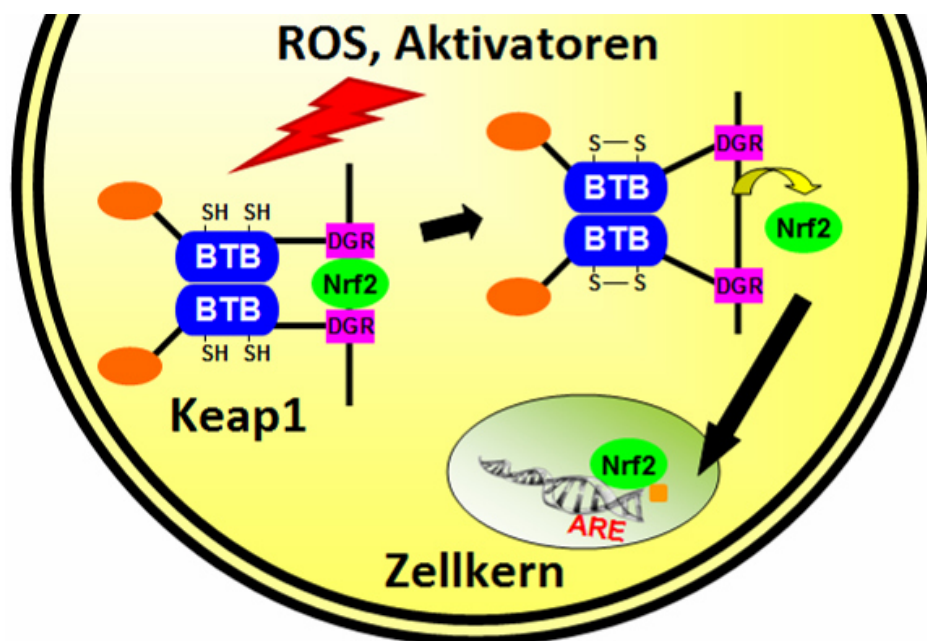


Abb. 1.11 - **Nrf2-Translokation in den Zellkern** - Anmerkungen im Text - nach (Wakabayashi et al. 2004)

Neben zellulären Signalkaskaden und erhöhten ROS-Konzentrationen sind auch eine Reihe von körperfremden Substanzen (Xenobiotika) in der Lage, das Keap1-Nrf2-System zu aktivieren (Nguyen et al. 2003). So können verschiedene Flavonoide und phenolische Antioxidantien sowie thiolhaltige Reagenzien, Schwermetalle und Hämkomplexe eine Expression ARE-positiver Gene induzieren. Allen gemeinsam sind eine ausgeprägte Elektrophilie und die bevorzugte Interaktion mit Thiolgruppen (Dinkova-Kostova et al. 2001). Als monofunktionelle Induktoren gelten dabei Substanzen, die direkt und ohne weitere Metabolisierung Nrf2 aktivieren und so die Expression ARE-positiver Gene bewirken. So reagiert tert-Butylhydrochinon (TBHQ) durch Autooxidation über eine Semichinon-Zwischenstufe zum entsprechenden Chinon. Die dabei entstehenden ROS interagieren mit dem Keap1-Nrf2-Komplex und führen zur Translokation von Nrf2 in den Zellkern (Rushmore

et al. 1991, Fei et al. 1996). TBHQ entsteht durch Demethylierung aus 3-Butylhydroxyanisol (3-BHA), das wiederum als bifunktionaler Induktor bezeichnet wird, da es zunächst seine eigene Metabolisierung einleiten muss, um anschließend als aktiver Metabolit mit Keap1-Nrf2-Komplexen interagieren zu können (Prochaska et al. 1985, Yu et al. 1997). Bifunktionelle Induktoren aktivieren zunächst Aryl-Hydrocarbon-Rezeptoren (AhR, Ah-Rezeptor) im Zytosol, die zur Expression von Phase-I-Enzymen führen, welche die Redoxreaktionen, Hydrolyse oder Demethylierung von Xenobiotika katalysieren. Danach sind deren aktive Metabolite als monofunktionelle Induktoren in der Lage, ARE-positive Gene, die für Phase-II-Enzyme kodieren, zu induzieren (Nguyen et al. 2003). Ein weiteres Beispiel für einen bifunktionellen Induktor stellt das Anthelminthikum Olitipraz dar, das nachweislich über die Expression von Phase-I-Enzymen (Buetler et al. 1995) seine Metabolisierung zum monofunktionellen Induktor fördert und hierüber zu einer verstärkten Nrf2-Translokation und der Genexpression von Phase-II-Enzymen führt (Primiano et al. 1995, Clapper 1998, Petzer et al. 2003, Choi et al. 2010).

Antioxidative Gene, die über ihre typische ARE-Promotorregion von Nrf2 erkannt und aktiviert werden, kodieren für Phase-II-Enzyme wie beispielsweise NADH-Dehydrogenase, Hämoxygenase, Katalase sowie Enzyme der Glutathionsynthese (Wasserman et al. 1997, Pi et al. 2010c). Zusammenfassend haben diese Enzyme die Aufgabe, alle Körperzellen vor chemischen und oxidativen Schädigungen zu schützen. Diese Tatsache macht das Keap1-Nrf2-System zu einem interessanten Target für die Therapie grundlegender (metabolischer) Erkrankungen wie T2DM (Sykiotis et al. 2011, Wang et al. 2011, Chartoumpakis et al. 2013, Xu et al. 2013)

In verschiedenen genetischen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Transkription der ARE-Gene mittels Nrf2 notwendig ist, um beispielsweise die Wirkung von toxischen Substanzen (Chan et al. 1999b, Chan et al. 2001b), die Progression entzündlicher Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis (Chan et al. 2001b) oder interessanterweise auch die neurotoxische Wirkung von 3-NPA abzumildern (Chan et al. 2001b). Weitere genetische Modelle brachten die Erkenntnis, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 die Zellen eines Organismus nicht nur akut vor toxischen und oxidativen Einwirkungen schützt, sondern auch seine Bedeutung für die Lebenszeit und für das natürliche Altern der Zellen hat (Sykiotis et al. 2008, Tullet et al. 2008). So scheint die Translokation von Nrf2 und die daraus resultierenden Expressionsmuster ARE-positiver Gene den essentiellen Stellenwert zu besitzen, langfristig die Funktionalität und Viabilität verschiedenster Gewebe zu beeinflussen (Lee et al. 2005a). Eine Reihe von metabolischen Studien kam zu dem interessanten Ergebnis, dass die genetische oder pharmakologische Modulation der Nrf2-Translokation

nicht nur die zellulären Abwehrmechanismen beeinflusst sondern auch den hepatischen Lipidmetabolismus kontrolliert (Sykiotis et al. 2011). Die Aktivität der Enzyme, die die Bildung von Fettsäuren und anderen Lipiden beispielsweise auf Ebene des Acetyl-CoA katalysieren, wird durch Nrf2 gehemmt. Somit beobachtete man bei Nrf2-KO-Mäusen auf HFD eine deutliche Akkumulation von Lipiden in der Leber und eine daraus resultierende Leberverfettung (Chowdhry et al. 2010, Kitteringham et al. 2010, Sugimoto et al. 2010, Zhang et al. 2010, Okada et al. 2013), während die pharmakologische Verstärkung des Nrf2-Signalweges vor diesen Veränderungen, aber auch der Zunahme von Fettgewebe, Körpergewicht und Plasmalipiden schützt (Tanaka et al. 2008, Shin et al. 2009, Zhang et al. 2010). Die konstitutive Expression von Nrf2 im Wildtyp ohne zusätzliche Aktivierung führt jedoch zu einer höheren Fettakkumulation als in KO-Tieren (Shin et al. 2009, Pi et al. 2010b). Nrf2 scheint außerdem einen wichtigen Einfluss auf die Glucosehomöostase sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch in Modellen des T1DM und T2DM zu haben. Aleksunes und Kollegen konnten zeigen, dass Nrf2-KO-Mäuse über verminderte Konzentration an Plasmainsulin verfügen und glucoseintolerant sind (Aleksunes et al. 2010). Diese und weitere Studien zeigten außerdem, dass die *beta*-Zellen der KO-Tiere empfindlicher gegenüber Streptozotocin sind und das Auftreten diabetischer Symptome wie die Nephropathie im Tiermodell und bei Typ-2-Diabetikern an oxidativen Stress und eine erhöhte Nrf2-Expression gekoppelt ist (Yoh et al. 2008, Aleksunes et al. 2010, Jiang et al. 2010). In einem weiteren Experiment konnten Aleksunes und Kollegen zeigen, dass der Blutzucker von Wildtyp-Mäusen nach der Streptozotocin-Injektion durch die Applikation des Nrf2-Aktivators Oltipraz gesenkt werden kann (Aleksunes et al. 2010).

In einem T2DM ähnlichen Modell konnten Yu und Kollegen zeigen, dass die Applikation von Oltipraz bei Mäusen auf HFD eine Vielzahl von Parameter nahezu auf Niveau der Standarddiät (SD) hält. So nahmen die Mäuse in der Oltipraz-Gruppe signifikant weniger an Körpergewicht zu, welches die Autoren mit dem verminderten Gesamtfettvolumen und dem differenzierteren Fettgewebe in Zusammenhang bringen. Außerdem verfügten die Mäuse über eine verbesserte Glucosetoleranz und Insulinsensitivität, da Oltipraz über eine Nrf2-vermittelte Hochregulation antioxidativer Enzyme die RNS-Konzentrationen senkte und so die Insulinrezeptorkaskade im Zielgewebe vor den Einflüssen schützte (Yu et al. 2011).

1.6.6 K_{ATP} -Kanalinhibition und oxidativer Stress

In verschiedenen Geweben konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des K_{ATP} -Kanals einen wesentlichen Einfluss auf die Zellviabilität hat. Jedoch lässt sich nicht eindeutig festlegen, ob das Öffnen oder Schließen der Kanäle die Apoptose fördert (Burg et al. 2006, Lang 2007). So

findet ein Schrumpfen und damit Sterben der Zellen statt, wenn die Elektrolyt- und Wasserhomöostase aufgrund von permanent geöffneten Ionenkanälen nicht mehr aufrecht erhalten werden kann (Burg et al. 2006). Die Fähigkeit der K_{ATP} -Kanäle, zu öffnen, scheint aber auch wesentlich für die Zellproliferation verantwortlich zu sein (Pardo 2004, Lang et al. 2005). Die pharmakologische Öffnung der K_{ATP} -Kanäle kann vor verschiedenen schädlichen Einflüssen wie Glucotoxizität, oxidativem Stress und dem Angriff durch Immunzellen schützen (Kullin et al. 2000, Kullin et al. 2003, Maedler et al. 2004, Yoshikawa et al. 2004). Eine Verringerung des K_{ATP} -Stroms durch metabolische (hohe Glucose- bzw. Nährstoffkonzentrationen) oder pharmakologische Effekte (Sulfonylharnstoffe, Glinide) bewirkt eine Membrandepolarisation und damit das Öffnen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen. Eine ständig gesteigerte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration kann apoptotische Prozesse in Gang setzen (Efanova et al. 1998, Rustenbeck et al. 2004, Brookes et al. 2004b, Maedler et al. 2005, Gier et al. 2009). Auch Mutationen oder das völlige Fehlen der SUR1-Untereinheit in Inseln der Maus führen zu einer übermäßigen Steigerung von $[Ca^{2+}]_c$ (Düfer et al. 2007) und damit zu einer deutlichen Einschränkung ihrer Zellviabilität (Gier et al. 2009). Zahlreiche klinische Studien weisen darauf hin, dass die Therapie des T2DM mit K_{ATP} -Kanalinhhibitoren zu einer beschleunigten Progression der *beta*-Zelldysfunktion führt und darüber hinaus an das Auftreten weiterer Begleiterkrankungen kardiovaskulären und onkologischen Ursprungs geknüpft ist (Bowker et al. 2006, Del Prato et al. 2006, Tzoulaki et al. 2009, Zeller et al. 2010, Schramm et al. 2011).

Unter Bedingungen von oxidativem Stress wurde jedoch auch gezeigt, dass die pharmakologische oder genetische Hemmung der K_{ATP} -Kanäle einen effektiven Schutz der Stimulus-Sekretionskopplung (V_m , $[Ca^{2+}]_c$ und Insulinsekretion) darstellt: Die sekretionshemmende Wirkung von H_2O_2 beruht in *beta*-Zellen auf einer Beeinträchtigung der mitochondrialen ATP-Produktion mit einer nachfolgenden Hyperpolarisation der Zellmembran, da die K_{ATP} -Kanäle nicht mehr geschlossen werden können (Krippeit-Drews et al. 1994, Krippeit-Drews et al. 1999). Bereits geringe Konzentrationen von H_2O_2 (10 - 100 μM) führten daher in Kontrollinseln zu einer signifikanten Abnahme der elektrischen Aktivität und Insulinsekretion, während die Inselzellen von Mäusen ohne funktionstüchtigen K_{ATP} -Kanal (SUR1-KO) diese Veränderungen erst bei höheren Konzentrationen (250 und 500 μM) aufwiesen. Auch die Zellviabilität war durch die genetische und pharmakologische Hemmung der K_{ATP} -Kanäle vor den Einflüssen von ROS und RNS geschützt und *in vivo* konnte nach einem durch Streptozotocin induziertem *beta*-Zellschaden ein deutlicher Überlebensvorteil von SUR1- und Kir6.2-KO-Mäusen gegenüber Wildtyp-Tieren beobachtet werden (Xu et al. 2008b, Gier et al. 2009). Die Autoren machen hierfür die erhöhte Aktivität

(Gier et al. 2009) und Expression (Marhfour et al. 2010) der drei wichtigsten antioxidativen Enzyme SOD, Cat und GPx verantwortlich.

Zahlreiche Studien an Zelllinien und Geweben kommen zu dem Schluss, dass Gliclazid in der Reihe der Sulfonylharnstoffe eine Sonderstellung einnimmt, da es als einziges nicht die Apoptose (Sawada et al. 2008, Gier et al. 2009) und den Funktionsverlust fördert, sondern sogar einen protektiven Effekt gegenüber oxidativen Schädigungen vermittelt (Kimoto et al. 2003, Del Guerra et al. 2007, Sawada et al. 2008, Sliwinska et al. 2012). Sawada und Kollegen konnten darüber hinaus nachweisen, dass Gliclazid im Vergleich zu anderen Sulfonylharnstoffen und Gliniden zu keiner ROS-Akkumulation in insulinproduzierenden Zellen führt (Sawada et al. 2008).

Scott und Kollegen untersuchten bereits Anfang der 1990er Jahre Gliclazid im Hinblick auf seine Eigenschaften als Radikalfänger und kamen zu dem Ergebnis, dass sich das Molekül im Gegensatz zu Glibenclamid eignet, unspezifisch ROS abzubauen (Scott et al. 1991). Diese Erkenntnisse konnten in Studien von Noda und Kollegen bestätigt werden, die dieselben Sulfonylharnstoffe hinsichtlich ihrer Radikalfängereigenschaften gegenüber Hydroxyl-, Superoxidanion- sowie Stickstoffmonoxidradikalen testeten (Noda et al. 1997). Aus einigen Patientenstudien lässt sich ebenfalls eine deutliche antioxidative Wirkung von Gliclazid erkennen: So zeigten die Plasmawerte, dass Gliclazid im Gegensatz zu anderen Sulfonylharnstoffen die Lipidperoxidation beispielsweise von LDL senkt und gleichzeitig für einen Anstieg der gesamten antioxidativen Kapazität des Plasmas (TRAP, *total radical-trapping antioxidant parameter*) sorgt. Außerdem verbesserte sich die Endothelfunktion der Patienten unter Gliclazid, da die NO-vermittelte Vasodilatation vor oxidativen Einflüssen geschützt war (O'Brien et al. 1997, O'Brien et al. 2000, De Mattia et al. 2003, Chen et al. 2011). Darüber hinaus führt Gliclazid im Gegensatz zu Glibenclamid zu einer positiv beeinflussten Diabetesprogression, da es das vollständige *beta*-Zellversagen und die damit einhergehende Insulinpflichtigkeit bei Typ-2-Diabetikern um durchschnittlich sechs Jahre hinauszögert (Sato et al. 2005).

Zusammenfassen lassen sich die bisherigen Erkenntnisse in zwei Patientenstudien von Jennings und Kollegen, die darstellen, dass Gliclazid neben seiner blutzuckersenkenden Wirkung über antioxidative Eigenschaften verfügt, die sowohl durch seine Funktion als Radikalfänger als auch durch die nachgewiesene Hochregulation der Plasma-SOD erklärt werden können (Jennings et al. 1992, Jennings et al. 2000).

1.7 Fragestellung

Bereits in der Phase eines Prädiabetes oder bei der Entstehung eines metabolischen Syndroms sind *beta*-Zellen schädigenden Einflüssen ausgesetzt, die ihre Ursachen meistens in der Fehl- bzw. Überernährung der Betroffenen haben. Die kontinuierliche Aufnahme kohlenhydrat- und fettreicher Nahrung führt zu erhöhter Zirkulation von Glucose und Lipiden im Blut. Da jede einzelne *beta*-Zelle durch feine Kapillaren an die Blutversorgung angeschlossen ist und ihre insulinunabhängigen Glucosetransporter permanent in der Zellmembran zur Verfügung stehen, ist es nachvollziehbar, dass sie unter diesen Umständen erhöhtem metabolischem Stress ausgesetzt ist.

Der Steigerung von ROS- und RNS-Konzentrationen durch den zellulären Metabolismus sowie aktivierte Immunzellen im Rahmen einer „*low grade inflammation*“ können die *beta*-Zellen mit ihrer geringen Ausstattung von antioxidativen Mechanismen nicht effektiv genug begegnen. Die Diabetesprogression und der damit verbundene Therapieaufwand intensivieren sich mit dem vollständigen Versagen der *beta*-Zellfunktion.

Vor diesem Hintergrund und den Erkenntnissen aus dem SUR1-KO-Modell, dass Mäuse, die aufgrund einer Gendeletion keine K_{ATP} -Kanäle mehr exprimieren, zwar nach wie vor glucosetolerant und lebensfähig sind (Seghers et al. 2000, Shiota et al. 2002), ihre *beta*-Zellen jedoch aufgrund erhöhter antioxidativer Enzymaktivität widerstandsfähiger gegenüber oxidativen Schädigungen sind (Gier et al. 2009), sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, welche Ursachen für oxidativen und metabolischen Stress in den *beta*-Zellen in Frage kommen und inwiefern die pharmakologische K_{ATP} -Kanalhemmung durch Gliclazid und andere antioxidative Strategien zu einem *beta*-Zellschutz beitragen können:

- Führt die gezielte Komplex-II-Hemmung der mitochondrialen Atmungskette zu einer funktionellen Einschränkung muriner *beta*-Zellen? Sind hierfür erhöhte ROS-Konzentrationen ursächlich und durch antioxidative Maßnahmen verhinderbar?
- Sind Wildtyp-Inseln, die mit Gliclazid oder anderen antioxidativen Wirkstoffen behandelt wurden, gegenüber ROS und RNS widerstandsfähiger? Welche Angriffspunkte von H_2O_2 in den Mitochondrien kommen in Frage?
- Bewirkt Gliclazid in einem Glucolipotoxizitätsmodell *in vitro* und während einer Hochfettdiät mit Mäusen *in vivo* einen *beta*-Zellschutz gegen oxidative Schäden?
- Welchen Einfluss hat die K_{ATP} -Kanalhemmung durch Sulfonylharnstoffe auf die ROS-Konzentrationen und den mitochondrialen Metabolismus der *beta*-Zellen?

2 Material und Methoden

2.1 Präparation und Kultivierung von Inseln und Inselzellclustern

2.1.1 Material

2.1.1.1 Tiere

Alle Experimente der vorliegenden Arbeit wurden an isolierten pankreatischen Langerhans-Inseln bzw. Inselzellclustern von Mäusen der Art *Mus musculus* durchgeführt. Dazu wurden sowohl Männchen als auch Weibchen des Stammes C57Bl/6N im Alter von 2 bis 6 Monaten aus Eigenzucht sowie von Charles River, Sulzfeld, D, oder Janvier, Saint-Berthevin, F, verwendet. Die Tierhaltung fand in institutseigenen Räumlichkeiten unter standardisierten Bedingungen statt: Die Raumtemperatur lag bei 22-24 °C, die relative Luftfeuchtigkeit betrug 50-55 %, die Tiere wurden in Polysulfonkäfigen gehalten und erfuhren einen Tag/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden. Sie erhielten Standardtrockenfutter 1314 TPF (Total Pathogen Free) von Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, D, und Trinkwasser *ad libitum*.

2.1.1.2 Geräte

Der Laborbedarf wurde mit den folgenden Ausnahmen über das Universitätslager bezogen.

Brutschrank	CO ₂ -Inkubator HERAcell®, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D
Deckgläser	Ø 0,3 cm, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, D
Kaltlichtquelle	Schott KL 1500 electronic, Schott AG, St. Gallen, CH
Kanülen	BD Microlance™ 3 27G (0,4 mm x 19 mm), Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
pH-Meter	EL20, Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, CH
Präparierbesteck	World Precision Instruments, Sarasota, USA
Sicherheitswerkbank	Laminar-Air-Flow HERAsafe®, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D
Stereomikroskop	Nikon, J
Trockenschrank	Heraeus® Function Line T6, Heraeus Holding GmbH, Hanau, D

Ultraschallbad	RK 31, Bandelin electronic, Berlin, D
Vortexmischer	Vortex-Genie, Scientific Industries, New York, USA
Waage	VWR-124 und -1502, Sartorius, D
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen, D
Zellkulturschalen	BD Falcon TM , Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Zentrifuge	Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, D

2.1.1.3 Chemikalien

Alle hier nicht explizit aufgeführten Chemikalien wurden in ihrer reinsten Qualität von Sigma-Aldrich, Schnelldorf/Taufkirchen, D, Roth, Karlsruhe, D, Merck, Darmstadt, D sowie Merck Biosciences, Schwalbach, D, bestellt.

Collagenase P aus <i>Cl. histolyticum</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Lösung aus Penicillin (10.000 IE/ml)	
und Streptomycin (10 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe, D
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, D
0,25 % Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.1.4 Lösungen

Wässrige (Bad-)Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser (*Aqua demin.*) aus dem institutseigenen Leitungsnetz hergestellt.

Präparierlösung A+AB

NaCl	135 mM
KCl	5,6 mM
MgCl ₂	1,2 mM
CaCl ₂	1,28 mM
Glucose	3 mM
HEPES	10 mM
Penicillin / Streptomycin (AB)	1 % (V/V)
BSA	0,1 % (m/m)

Mit NaOH wurde der pH-Wert der Präparierlösung vor der Zugabe von BSA auf 7,4 eingestellt und die fertige Lösung in Glasflaschen zu je 0,5 l bei -20 bzw. 2-8 °C aufbewahrt.

Collagenaselösung

Zu Beginn einer Präparation wurden 2 mg/ml Collagenase (1,9 U/mg) in Präparierlösung A+AB gelöst und in Einmalspritzen zu je 2-3 ml bis zur Verwendung auf Eis gekühlt.

Zellkulturmedium

FKS	10 % (V/V)
Penicillin / Streptomycin	1 % (V/V)
RPMI 1640	ad 100ml

Die aseptische Herstellung fand unter der Sicherheitswerkbank statt und die fertige Lösung wurde in Glasflaschen zu je 100 ml bei 2-8 °C aufbewahrt. Das Zellkulturmedium enthielt eine Glucosekonzentration von ca. 11 mM, für Langzeitinkubationen mit anderen Konzentrationen wurde RPMI 1640 ohne Glucose verwendet und die jeweilige Menge eingewogen.

2.1.2 Methoden

2.1.2.1 Präparation von murinen Langerhans-Inseln

Durch Einleiten von CO₂ in den Polysulfonkäfig wurde das jeweilige Versuchstier getötet. Anschließend wurde die Maus auf dem Rücken fixiert und mit Ethanol 70 % eingesprüht. Der Bauchraum wurde geöffnet, indem mit einer Schere und Pinzette zunächst das Fell und mit einer feineren Schere schließlich das Peritoneum aufgeschnitten wurde. Die inneren Organe wurden so zurechtgelegt, dass der *Ductus choledocus* zu erkennen war und das Pankreas nicht durch andere Organe verdeckt war. Mittels anatomischer Klemmen wurden lebernah der *Ductus choledocus* sowie der Dünndarm ober- und unterhalb der *Papilla duodeni vateri* verschlossen. Die Mündung des Ductus in den Dünndarm wird durch den *Musculus sphincter Oddi* verschlossen und kann als strichförmige weiße Struktur erkannt werden. Diese Stelle wurde mit einer dünnen Kanüle (0,4 mm x 19 mm) durchstoßen. Nachdem die Kanüle in den *Ductus pancreaticus* vorgeschoben war, wurden ca. 2,5 ml der Collagenase-Lösung in das Pankreas injiziert. Ein vollständiges Aufblähen und Glasigwerden des Organs zeigte, dass der Ductus richtig getroffen war und sich die Collagenase-Lösung gleichmäßig im gesamten Pankreas verteilte. Danach wurden die Klemmen entfernt und das Pankreas wurde vorsichtig vom Enddarm aus mittels einer feinen Schere und Pinzette von Darm, Magen und Milz abgetrennt und in ein steriles 15 ml Einmalzentrifugenröhrchen überführt und das Röhrchen anschließend verschlossen. Nach kurzem Aufschütteln mit einem Vortexmischer wurde die

Pankreasprobe im 37 ° C vorgeheizten Wasserbad unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Inkubationszeit richtete sich nach Aktivität der verwendeten Collagenase und betrug im Durchschnitt 6 min. Die Probe wurde während der Inkubation alle 2 min mit einem Vortexmischer durchmischt.

Der Gewebeverdau wurde durch Hinzufügen eiskalter Präparierlösung A+AB gestoppt. Nach kräftigem Schütteln wurde mit einer Tischzentrifuge die Gewebesuspension abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach zweimaligem Wiederholen des Vorgangs wurde das Pellet mit ca. 50 ml Präparierlösung resuspendiert und portionsweise in eine Petrischale mit schwarzem Boden überführt. Unter einem Stereomikroskop konnten mit Hilfe einer Pipette die Langerhans-Inseln (je nach Güte der Präparation 70-200 Stück) in eine zweite Petrischale umgelesen werden. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis kein übriges verdautes Gewebe mehr in der Suspension erkennbar war. Nach einheitlichen 2 Stunden Ruhezeit in der Präparierlösung konnten die Inseln weiterverarbeitet werden.

2.1.2.2 Kultivierung von Inseln

Für Experimente mit intakten Inseln (Insulinsekretionsmessungen) wurde die benötigte Anzahl von Inseln mit Hilfe einer Pipette in ein Reaktionsgefäß überführt und 2 min bei 2.000 U/min (22 °C) abzentrifugiert. Unter der Sicherheitswerkbank wurde der Überstand abgenommen und verworfen und das Pellet mit Zellkulturmedium (Vorinkubation im Brutschrank: 37 °C, 95 % O₂ / 5 % CO₂) resuspendiert. Die Suspension wurde aus dem Reaktionsgefäß in Zellkulturschälchen (Ø 0,35 cm) mit einem Endvolumen von 2 ml transferiert. Wenn die Inseln mit Substanzen über Nacht inkubiert werden sollten, dann wurden zu diesem Zeitpunkt Substanzinkubationen und Kontrollen angesetzt. Danach wurden die Schälchen mit Inseln im Brutschrank bis zum Folgetag kultiviert.

2.1.2.3 Gewinnung und Kultivierung von Inselzellclustern

Für Experimente mit Inselzellclustern (fluoreszenzoptische Messungen) wurden die Inseln in möglichst kleinem Volumen (ca. 10 µl) in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 2 ml Trypsin-Lösung (0,25 %) überführt und 2 min bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 3-4 mal schnell auf- und abpipettiert und mit 12 ml Zellkulturmedium verdünnt. Dadurch wurde der Inselverdau abgestoppt. Nach dem Zentrifugieren (5 min, 1.000 U/min, 4 °C) wurde das Pellet mit vorbehandeltem Zellkulturmedium resuspendiert (Volumen abhängig von Anzahl der Schälchen und der Tropfengröße) und zu Tropfen von jeweils 20-40 µl auf runde Deckgläser (Ø 0,3 cm) in Kulturschälchen ausgesät. Die Einzelzellen aggregierten auf den Deckgläsern im Brutschrank

(37 °C, 95 % O₂ / 5 % CO₂) zu Clustern. Nach 1,5-2 Stunden wurden die Schälchen mit jeweils 2 ml Zellkulturmedium aufgefüllt und bis zu ihrer Verwendung maximal 4 Tage lang im Brutschrank aufbewahrt.

2.2 Insulinsekretionsmessungen

2.2.1 Material

2.2.1.1 Geräte

Gammazähler	Packard Cobra Gamma Counter, GMI Inc., Minnesota, USA
Thermostat	Thermostat T Lauda, Lauda Dr. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D

2.2.1.2 Chemikalien

Meerschweinchen-Antikörper gegen Ratteninsulin	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, D
¹²⁵ Iod-Insulin, 740 kBq/2ml A-14	Sanofi-Aventis, Frankfurt, D
Ratteninsulin Standard-Set	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, D

2.2.1.3 Lösungen

Krebs-Ringer-HEPES Pufferlösung (KRH-Lösung)

NaCl	122 mM
KCl	4,7 mM
CaCl ₂	2,5 mM
MgCl ₂	1,1 mM
HEPES	10 mM

Mittels NaOH wurde der pH-Wert der Lösung auf 7,4 eingestellt und diese wurde bei 2-8 °C bis zur Verwendung gelagert. Am Versuchstag der Insulinsekretionsmessungen wurden der KRH-Lösung 0,5 % (m/V) BSA und Glucose in verschiedenen Konzentrationen zugegeben.

Saurer Ethanol

EtOH 100 %	75 ml
<i>Aqua demin.</i>	23,5 ml
HCl konz. (37%)	1,5 ml

RIA-Puffer

NaCl	9 g
Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O	12,35 g
KH ₂ PO ₄	0,65 g
EDTA	11,8 g
Thiomersal	0,1 g
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1.000 g

Die Lösung wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und vor der Verwendung mit 1 % BSA versetzt.

Meerschweinchen-Antikörper gegen Ratteninsulin

Meerschweinchen-Antikörper gegen Ratteninsulin wurde in 1 ml RIA-Puffer gelöst, aliquotiert und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

Ratteninsulinstandard

Die sieben gebrauchsfertigen Lösungen (je 1 ml) des Ratteninsulin Standard-Sets (0,1 – 10 ng/ml) wurden bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

Radioaktiv markiertes Ratteninsulin

¹²⁵Iod-Insulin wurde in 2 ml *Aqua bidest.* gelöst, zu 200 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Stammlösungen mit einer Aktivität von ca. 74 kBq wurden vor der Verwendung 1:80 verdünnt.

2.2.2 Methoden

Alle glucosestimulierten Insulinsekretionen dieser Arbeit wurden als einstündige Steady-state-Inkubationen durchgeführt. Die anschließende Bestimmung des sezernierten Insulins fand mittels Radioimmunoassays (RIA) gegen einen Standard mit Ratteninsulin statt.

2.2.2.1 Steady-state-Inkubationen

Die Inseln wurden am Tag nach der Präparation aus dem Brutschrank entnommen und für das Insulinsekretionsexperiment verwendet. In manchen Experimenten waren die Inseln zu diesem Zeitpunkt bereits seit 15-17 h mit verschiedenen Substanzen inkubiert. Durch mehrmaliges Umlesen der Inseln von Kulturschälchen in Schälchen mit KRH-Lösung verschiedener niedriger Glucosekonzentrationen (1 h bei 5,6 mM sowie 0,5 h bei 3 mM Glucose, Raumtemperatur) wurden die Inseln vom Kulturmedium befreit und auf ein einheitliches metabolisches Niveau gebracht. Bei Experimenten mit Übernacht-Inkubationen wurden die Testsubstanzen auch in dieser 1,5 stündigen Ruhephase zugegeben. Für die anschließende Steady-state-Inkubation wurden pro Versuchsbedingung drei Polystyrolröhrchen mit jeweils 990 µl KRH-Lösung verschiedener Glucosekonzentrationen und Substanzzugaben vorbereitet. Je fünf Inseln wurden in einem Volumen von 10 µl KRH-Lösung auf die Röhrchen verteilt. Danach fand eine Inkubation aller Röhrchen im Schüttelwasserbad für 1 h bei 37 °C statt. Durch das permanente Schütteln der Proben wurde gewährleistet, dass sich das freigesetzte Insulin gleichmäßig im Überstand verteilte. Nach einer Stunde wurden alle Röhrchen für einige Minuten in ein eisgekühltes Wasserbad überführt, um die Insulinsekretion abzustoppen. Auf dem Vortexmischer wurde jedes Röhrchen kurz aufgeschüttelt. Anschließend wurden 500 µl des Überstandes abpipettiert und bis zur Bestimmung mittels RIA in Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert

2.2.2.2 Variation der Steady-state-Inkubationen

Bei besonderen Langzeitkulturbedingungen (Glucolipotoxizität) sowie Versuchen mit Inseln aus In-vivo-Studien wurde die 1,5 stündige Inkubation in verschiedenen niedrigen Glucosekonzentrationen auf 0,5 h in 3 mM Glucose verkürzt. Inseln von Tieren aus In-vivo-Studien wurden unmittelbar nach der Präparation ohne Übernacht-Kultur dem Insulinsekretionsexperiment zugeführt. Diese Variation sollte Äquilibrierungseffekte durch Kultureinflüsse verhindern.

2.2.2.3 Bestimmung des Insulingehalts

Falls im Anschluss an das Sekretionsexperiment der Insulingehalt bestimmt werden sollte, wurden für die jeweiligen Bedingungen säurebeständige Kunststoffröhrchen verwendet. Nach Abpipettieren des Überstandes wurden die fünf Inseln vom Rest der Lösung befreit und mit 500 µl saurem Ethanol versetzt. Die Röhrchen wurden mit einem Stopfen verschlossen und für 1 h in ein Ultraschallbad gestellt. Dadurch wurden die Kapseln und Zellmembranen der Inseln zerstört und der gesamte Insulingehalt in die Lösung freigesetzt.

Anschließend wurden alle Röhrchen für jeweils 10 s mittels Vortex-Mischer aufgeschüttelt und bis zur Bestimmung bei -20 °C tiefgefroren.

2.2.2.4 Bestimmung des Insulins mittels Radioimmunoassay

Die Proben wurden je nach erwarteter Insulinmenge mit KRH-Lösung verdünnt (z.B. 1:4 bis 1:8 bei Proben unter Bedingungen mit 15 mM Glucose, unverdünnt bei 3 mM Glucose, 1:200 bei Gehaltsproben) und mittels Vortex-Mischer geschüttelt.

Dem Radioimmunoassay (RIA) liegt die Antigen-Antikörper-Reaktion zugrunde, die sich durch eine hohe Empfindlichkeit und Spezifität für den Nachweis und die Quantifizierung kleinster Substanzmengen eignet.

In Polystyrolröhrchen wurden zu 100 µl Standardinsulin bzw. (verdünnte) Probe 150 µl Assay-Puffer pipettiert. Als Antigene dienten das Standardinsulin bzw. sezerniertes Insulin der Probe sowie eine bestimmte Menge (100 µl einer 1:80 verdünnten Stammlösung) eines radioaktiv markierten Ratteninsulins (¹²⁵Iod-Insulin). Um die Bindungsstelle am Antikörper (50 µl einer frisch aufgetauten und verdünnten Stammlösung von Meerschweinchen-Antikörper gegen Ratteninsulin) konkurrieren beide Insuline bis zur Absättigung: Je mehr sezerniertes Insulin aus der Probe vorhanden ist, desto mehr radioaktives Insulin wird aus der Bindung verdrängt.

Nach Übernacht-Inkubation bei 2-8 °C wurde der Insulin-Antikörper-Komplex mittels Ethanol 96 % gefällt (4.000 U/min, 20 min, 4 °C) und gewaschen und die Radioaktivität des Präzipitats mit einem Gamma-Counter 2 min lang vermessen. Eine Standardinsulin-verdünnungsreihe (0,1 – 10 ng/ml) diente der Kalibrierung.

2.3 Fluoreszenzoptische Methoden

2.3.1 Material

2.3.1.1 Geräte

Mikroskop	Axiovert 100, Carl Zeiss GmbH, Jena, D
Monochromator	Polychrome II, IV und V, TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, D
Objektiv	PlanNeofluar 40x, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Schwingungsgedämpfter Tisch	Institutswerkstatt
Software	IgorPro 4.0.9.1, WaveMetrics, Inc., Portland, USA TILLvision v.4.0.1, TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, D

Wärmeschrank	hwl scientific instruments GmbH, Ammerbruch, D
Wasserbad	Institutswerkstatt

2.3.1.2 Chemikalien

Fura-5K	Invitrogen, Karlsruhe, D
Rhodamin 123	Invitrogen, Karlsruhe, D
DCDHF-DA	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.3.1.3 Lösungen

Badlösung (BBad1)

NaCl	140 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂	1,2 mM
CaCl ₂	2,5 mM
Glucose	0,5 mM
HEPES	10 mM

Der pH-Wert wurde mittels NaOH auf 7,4 eingestellt und je nach Messbedingung wurden verschiedene Glucosekonzentrationen eingewogen. Die Lösung wurde bei 2-8 °C gelagert.

Kalibrierlösung

Zur Kalibrierung der Xenonlampe im Monochromator wurde eine Lösung mit und ohne 10 mM CaCl₂ frisch hergestellt.

NaCl	10 mM
KCl	148 mM
MgCl ₂	3 mM
HEPES	10 mM
CaCl ₂	0 bzw. 10 mM
EGTA	10 bzw. 0 mM

Mit NaOH wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Fura-2-AM

Für eine 2,5 mM Stammlösung wurde 1 mg Fura-2-AM in 400 µl DMSO gelöst, aliquotiert und bis zu Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur Messung wurden Inselzellcluster mit 5 µM Fura-2-AM in Badlösung (15 mM Glucose) 35 min lang bei 37°C inkubiert.

Fura-5K

1 mg Fura-5K wurden in 400 µl HEPES zu einer Endkonzentration von 2,5 mM gelöst. Die Kalibrierung fand mit 5 µM Fura-5K in entsprechender Lösung statt.

Rhodamin 123

2,5 mg Rhodamin 123 wurden in 250 µl DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Inkubation der Inselzellcluster wurde mit einer Konzentration von 10 µg/ml Rhodamin 123 in Badlösung (0,5 mM Glucose) 15 min lang bei 37 °C durchgeführt.

2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (DCDHF-DA)

4,9 mg DCDHF-DA wurden in 500 µl DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. In Badlösungen mit verschiedenen Glucosekonzentrationen und Substanzen wurden Inselzellcluster mit 20 µM DCDHF-DA für 15 min bei 37°C inkubiert.

2.3.2 Methoden

2.3.2.1 Messung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration [Ca^{2+}]_c

Tsien und Kollegen entwickelten Anfang der 1980er Jahre den Ca^{2+} -Chelator Fura-2 und etablierten damit die gängigste Methode, intrazelluläre Konzentrationen von Ca^{2+} in lebenden Zellen messbar zu machen. Das Prinzip beruht auf der Ca^{2+} -induzierten Fluoreszenzänderung des Farbstoffes, wobei Ca^{2+} -gesättigtes Fura-2 bei 340 nm und freies Fura-2 bei 380 nm angeregt wird. Das Emissionsmaximum liegt für beide Anregungswellenlängen bei ca. 515 nm (Abb. 2.01) (Grynkiewicz et al. 1985).

Inselzellcluster wurden vor der Messung 35 min bei 37 °C in 15 mM glucosehaltiger Badlösung mit dem membrangängigen Acetoxymethylester-Derivat Fura-2-AM vorinkubiert. Während der Inkubation diffundiert das lipophile Derivat ins Zellinnere und wird durch endogene Esterasen zu Fura-2 gespalten. Die fünf Carboxylat-Reste machen das Molekül polar, sodass es die Plasmamembran nicht mehr durchdringen kann und im Zytosol akkumuliert.

Nach der Inkubation wurde das runde Deckglas mit den Inselzellclustern in eine abgedunkelte Durchströmungskammer eingelegt und mit einem Zu- und Ablauf versehen. Auf 37 °C temperierte Badlösungen mit verschiedenen Glucosekonzentrationen wurden über die Zellcluster geleitet. Die Kammer befand sich auf dem Objektträgertisch eines inversen Mikroskops, mittels dessen Zellcluster für die Messung ausgewählt wurden. In einem Monochromator wurden aus dem Licht einer Xenonlampe alle 3 s die Anregungswellenlängen 340 und 380 nm erzeugt (Belichtungszeit 20 ms) und über einen Lichtleiter ins Mikroskop geleitet. Ein dichroitischer Spiegel im Mikroskop leitete das Licht auf die Zellcluster und ließ das Emissionslicht der Probe wiederum durch einem Longpass-Emissionsfilter (>515 nm) in eine CCD-Kamera zur Ermittlung der Intensität passieren (Abb. 2.01). Die alle 3 s erhobenen Messwerte wurden per Software ausgewertet und visualisiert. Die Konzentration an Ca²⁺-Ionen im Zytosol wurde dabei indirekt über die Bildung des Quotienten (Ratio) der Emissionslichtstärken bestimmt. Anhand einer zuvor durchgeführten In-vitro-Kalibrierung des Messstandes mit einem Fura-2-Kaliumsalz (Fura-5K) in Lösungen ohne und mit einer definierten Menge an Ca²⁺ konnte mit Hilfe der Grynkiewicz-Formel dann die Ca²⁺-Konzentration in nM ermittelt werden:

$$[\text{Ca}^{2+}]_c = K_d \cdot \beta \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

- K_d** Dissoziationskonstante von Fura-2 für Ca²⁺ (224 nM)
- β** Quotient aus Fluoreszenzsignal bei 380 nm mit 0 mM Ca²⁺ und bei 380 nm mit 10 mM Ca²⁺
- R** Ratio (340 nm / 380 nm) zu beliebigem Zeitpunkt
- R_{min}** Ratio bei 0 mM Ca²⁺
- R_{max}** Ratio bei 10 mM Ca²⁺

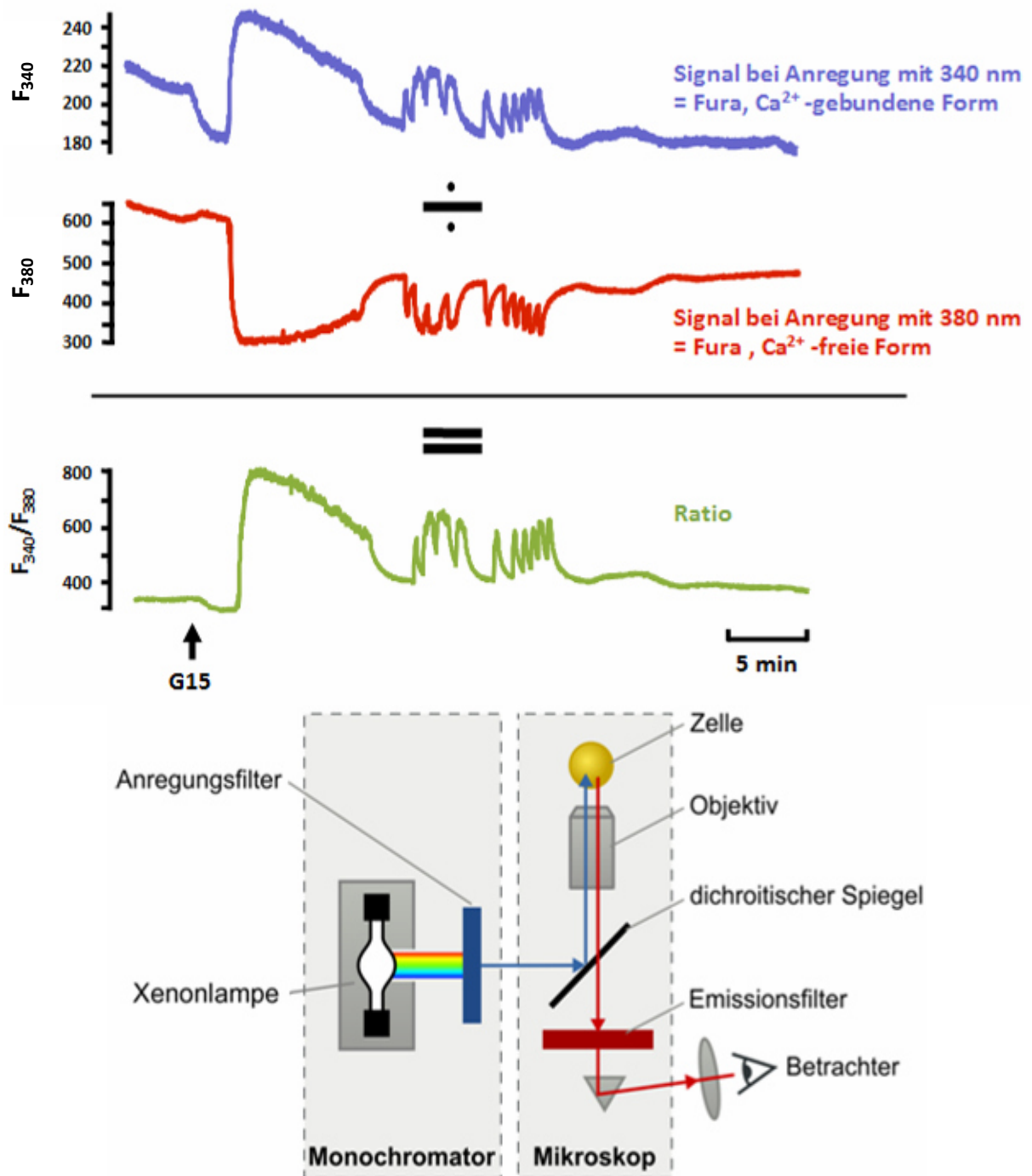


Abb. 2.01 - Messprinzip der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit Fura-2, Versuchsaufbau für fluoreszenz-optische Messungen - G15: 15 mM Glucose - übernommen aus den Dissertationen von K. Hörth (2011) und K. Noack (2010)

2.3.2.2 Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi$

Die metabolische Aktivität von *beta*-Zellen korreliert mit der ATP-Syntheseleistung ihrer Mitochondrien. Die Atmungsketten generieren einen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembranen, der zu einer Ladungsumverteilung führt und von der ATP-Synthase genutzt wird. Um die Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi$) zu verfolgen und quantitativ zu erfassen, wurden Inselzellcluster 15 min lang bei 37 °C in 0,5 mM glucosehaltiger Badlösung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 (Rh 123) beladen. Als lipophiles Kation reichert sich Rh 123 bevorzugt in negativen Zellorganellen an. Da die Mitochondrien auch unter Bedingungen geringer metabolischer Aktivität im Vergleich zum Zytosol ein negativeres Matrixpotential aufweisen, konzentriert sich Rh 123 bevorzugt in ihnen. Wird durch eine gesteigerte Aktivität der Atmungskette der Protonengradient vergrößert und somit die innere Mitochondrienmembran hyperpolarisiert, akkumuliert Rh 123 in den Mitochondrien und bildet Aggregate. Fluoreszenzoptisch führt der Wechsel von einer niedrigen zu einer hohen Glucosekonzentration aufgrund der Aggregatbildung zu einer Abnahme der Intensität des emittierten Lichts.

Die Messungen wurden analog den Messungen von $[Ca^{2+}]_c$ an einem inversen Mikroskop mit Monochromator durchgeführt, wobei die Anregungswellenlänge von Rh 123 bei 480 nm (Intervall 1 s, Belichtungszeit 20 ms) und das Emissionslicht oberhalb von 515 nm liegt.

2.3.2.3 Messung von FAD und NAD(P)H

Der *beta*-Zellmetabolismus führt durch die zytosolische Glykolyse und vor allem durch den mitochondrialen Citrazyklus zur Bildung der Reduktionsäquivalente NAD(P)H und FADH₂. Diese liefern den Atmungsketten die Protonen und Elektronen zur Ausbildung des Gradienten und zur Synthese von ATP. NAD(P)H und die oxidierte Form FAD weisen Autofluoreszenzeigenschaften auf, d.h. sie können durch Licht ohne Farbstoffzugabe angeregt werden und emittieren Licht im sichtbaren Bereich. In der *beta*-Zelle ist die Fluoreszenzintensität abhängig von der Glucoseverwertung sowie der Aktivität des mitochondrialen Metabolismus (Duchen et al. 1993, Patterson et al. 2000). NAD(P)H weist ein Absorptionsmaximum bei 360 nm auf und FAD bei 465 nm, beide Emissionswellenlängen können oberhalb von 515 nm erfasst werden und wurden daher ähnlich zu den Messungen von $\Delta\Psi$ und $[Ca^{2+}]_c$ aufgenommen (Intervall 1 s, bei paralleler Bestimmung 3 s, Belichtungszeit 250 ms).

2.3.2.4 Messung der intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies

Bei der Übertragung von Protonen und Elektronen auf Sauerstoff am Ende der mitochondrialen Atmungskette entstehen *in vivo* schätzungsweise 1-3 % reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) wie Superoxid-Anion, Hydroxylradikal oder Wasserstoffperoxid (Kirkinezos et al. 2001). Abhängig von der Glucoseverwertung und der Aktivität des mitochondrialen Metabolismus werden in der *beta*-Zelle verschiedene Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies erreicht, die fluoreszenzoptisch erfassbar sind. 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (DCDHF-DA) diffundiert passiv durch die Zellmembran, wird durch endogene Esterasen gespalten und verbleibt als polares Molekül intrazellulär. In Anwesenheit von zweiwertigen Eisen-Kationen wird es durch ROS im Rahmen einer Fenton-Reaktion zum 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert und kann mit einer Wellenlänge von 480 nm zur Fluoreszenz mit Wellenlängen über 515 nm angeregt werden. Nach einstündigen Inkubationen in Badlösungen verschiedener Glucose- und Substanzkonzentrationen wurden die Inselzellcluster für 15 min mit DCDHF-DA bei 37 °C unter denselben Bedingungen beladen. Anschließend wurden die Proben in derselben Versuchsanordnung wie für die Ermittlung von Autofluoreszenz, $\Delta\Psi$ und $[Ca^{2+}]_c$ vermessen. Es wurden pro Ansatz zwei verschiedene Bereiche mit Inselzellclustern ausgewählt und jede Region wurde dreimal mit 20 ms Belichtungszeit im Abstand von 100 ms aufgenommen.

2.4 Bestimmung der Inselfläche und -granularität

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine mikroskopische Methode entwickelt, mit der es möglich ist ohne Farbstoff oder Zellaufschluss die Inselfläche und -granularität muriner Langerhans-Inseln zu bestimmen. Letztere ist ein Maß für die „Durchleuchtbarkeit“ von Inseln und die damit in Kapitel 3.2.3.2 nachgewiesene Korrelation zwischen Helligkeit und Insulingehalt.

2.4.1 Material

2.4.1.1 Geräte

Mikroskop	Axiovert 200M, Carl Zeiss GmbH, Jena, D
Kamera	AxioCamMRC, Carl Zeiss GmbH, Jena, D
Software	AxioVs40, Version 4.8.2.0, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D
	ImageJ, Version 1.47n, Wayne Rasband, NIH, USA

2.4.2 Methode

Die Inseln wurden aus dem Kulturmedium in Schälchen mit KRH-Lösung (z.B. mit 3 mM Glucose) umgelesen und auf dem Objektträgertisch des Mikroskops platziert. Mit einer fünffachen Vergrößerung wurden die jeweiligen Bereiche, in denen sich Inseln befanden, ausgewählt. Die Einstellungen am Mikroskop waren:

- Objektivbezeichnung: LD A-Plan 5x/0,3 Ph1 Var1
- Objektivarbeitsabstand: 4300
- Halogenlampenspannung: ca. 4 V
- Leuchtfeldblende maximal, alle drei Filter im Strahlengang

Mit Hilfe der Mikroskopsoftware wurde der Strahlengang auf die mit dem Computer verbundene Kamera umgelenkt und die Vergrößerung auf 20fach verändert. Die Bildeinstellungen wurden so gewählt, dass die Inseln und die Unterschiede am besten darstellbar waren:

- 48 Bit RGB Farbe, Bit-Tiefe Aufnahme: 36, z.B. 1388 x 1040 Pixel
- Helligkeit: -0,35
- Kontrast: 4,00
- Farbwert: 1,00
- Belichtungszeit: 250 bzw. 500 ms
- Weißabgleich: Interaktiv, einmalig bei einer Schale für alle an diesem Tag angefertigten Aufnahmen

Alle Inseln in der Schale wurden aufgenommen und später computergestützt ausgewertet (s. Kap. 2.6.3). Die Inseln waren nach der Vermessung intakt und konnten z.B. Insulinsekretionsversuchen zugeführt werden.

2.5 In-vivo-Studie: *beta*-Zellschutz durch Gliclazid vor 3-NPA und H₂O₂

2.5.1 Material

2.5.1.1 Tiere

Für die In-vivo-Studie wurden Männchen des Mausstammes C57/Bl6N verwendet, die von Janvier, Saint-Berthevin, F, geliefert wurden und zu Beginn des Versuches ca. zwei Monate

alt waren und ein Körpergewicht von durchschnittlich $25 \pm 0,4$ g aufwiesen. Die Tierhaltung fand in Einzelkäfigen unter denselben Bedingungen wie in Kapitel 2.1.1.1 beschrieben statt.

2.5.1.2 Geräte

Schlundsonde	gebogen, 30 x 1,5 mm, ACUFIRM®, Ernst Kratz GmbH, Dreieich, D
Tuberkulinspritze	Injekt®-F, B. Braun AG, Melsungen, D
Waage	MS-400, G&G GmbH, Neuss, D

2.5.1.3 Lösungen

Vehikel-Lösung

Polyethylenglykol 400	87,6 %
<i>Aqua demin.</i>	7,8 %
Glycerol	4,6 %

Gliclazid-Lösung (3,3 mg bzw. 10 mg/kg KG pro Tag)

Die Stammlösung hatte eine Konzentration von 1 mg/ml Gliclazid in Vehikel-Lösung und wurde gleichzeitig als Tagesdosis 10 mg/kg KG im Experiment verwendet. Zur Herstellung der Tagesdosis von 3,3 mg/kg KG wurde ein Teil der Stammlösung mit der entsprechenden Menge an Vehikel-Lösung verdünnt. Die jeweiligen Lösungen wurden den Mäusen zwei Wochen lang über eine Tuberkulinspritze mit angeschlossener Schlundsonde einmal täglich oral appliziert. Die Applikationsmenge richtete sich nach dem zu Anfang und nach einer Woche ermitteltem Körpergewicht der jeweiligen Maus (0,1 ml entspricht 10 g KG).

2.5.2 Methoden

2.5.2.1 Versuchsdurchführung

Die einmal tägliche Applikation von Vehikel-Lösung alleine oder mit der entsprechenden Gliclazid-Konzentration wurde zwei Wochen lang an vier Tieren pro Gruppe durchgeführt. Im Anschluss wurden die Tiere den In-vitro-Experimenten zugeführt. Dazu wurden die Tiere durch Einleiten von CO₂ in den Polysulfonkäfig und anschließender Dekapitation getötet und wie in Kapitel 2.1.2.1 beschrieben präpariert. Die präparierten Inseln wurden gemäß Kapitel 2.2.2.2 direkt in den Insulinsekretionsmessungen verwendet.

2.6 In-vivo-Studie: *beta*-Zellschutz durch Gliclazid vor Hochfettdiät

2.6.1 Material

2.6.1.1 Tiere

Für die In-vivo-Studie wurden Männchen des Mausstammes C57/Bl6J verwendet, die von Janvier, Saint-Berthevin, F, mit einem Gewicht von 13 bzw. 19 ± 1 g geliefert wurden. Die Tierhaltung fand in Einzelkäfigen unter denselben Bedingungen wie in Kapitel 2.1.1.1 beschrieben statt.

2.6.1.2 Futter

Als Standard- bzw. Hochfettdiät (SD, HFD) diente Adipositas-induzierende Diät (*diet-induced obesity*, DIO) mit 10% bzw. 45% Energie aus Fett von Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, D. Das Futter wurde in der Originalverpackung bei -20 °C gelagert und portionsweise bei 2-8 °C für die unmittelbare Verwendung bereitgehalten.

2.6.1.3 Geräte

Blutzuckermessgerät	Lifescan OneTouch® Ultra®, Johnson & Johnson, Milpitas, USA
Insulinspritzen	Omnican® 40, B. Braun AG, Melsungen, D
Teststreifen	Lifescan OneTouch® Ultra®, Lifescan Europe, Zug, CH
Waage	MS-400, G&G GmbH, Neuss, D

2.6.1.4 Chemikalien

Actrapid® Penfill® 100 I.E./ml	Apotheke des Universitätsklinikums Tübingen
Gliclazid-Na-Salz	Servier, Paris, F
Glucosteril® 20 %	Apotheke des Universitätsklinikums Tübingen

2.6.1.5 Lösungen

Gliclazid-Trinklösung (2,5 mg bzw. 10 mg/kg KG pro Tag)

Durch die gemittelten Körpergewichte (KG) und Trinkmengen pro Gruppe und Kohorte konnte auf die einzuwiegende Gliclazid-Konzentration geschlossen werden. Dabei wurde eine Anpassung der Konzentration vorgenommen, wenn die jeweilige Gruppe im Mittel 20, 25 oder 30 g KG überschritten hatte. Außerdem wurde die durchschnittliche Trinkmenge der jeweiligen Gruppen ohne Nachkommastelle ermittelt und bei der Berechnung berücksichtigt.

In jede Trinkflasche wurden 150 ml Trinkwasser mit oder ohne der entsprechenden Gliclazid-Konzentration gefüllt. Dieses Prozedere wurde zweimal wöchentlich durchgeführt (s. Kap. 2.5.2.2).

Glucose-Lösung zur Injektion in der Maus (2 mg/kg KG)

Glucosteril 20 % wurde unverdünnt in einer 1-ml-Insulinspritze (unterteilt in 40 I.E.) entsprechend dem Mausegewicht (1 I.E. Glucosteril 20 % entspricht 2,5 g KG) aufgezogen.

Insulin-Lösung zur Injektion in der Maus (1 I.E./kg KG)

0,9 % NaCl wurden in *Aqua demin.* gelöst und über einen Membranfilter (Poren-Ø 0,22 µm) sterilfiltriert. In einem Reaktionsgefäß wurden mittels Insulinspritze 15 I.E. NaCl vorgelegt und 10 I.E. der Insulin-Lösung Actrapid® Penfill® (100 I.E./ml) hinzugegeben und damit auf 40 I.E./ml verdünnt. In einem 50 ml Einmalzentrifugenröhrchen wurden 40 ml NaCl-Lösung vorgelegt und 4 I.E. der verdünnten Insulin-Lösung gegeben, um eine Endkonzentration von 0,1 I.E./ml zu erreichen. Die Dosis (1 I.E./kg KG) wurde für jede Maus anhand des Injektionsvolumens eingestellt. Bei einer 1-ml-Insulinspritze (unterteilt in 40 I.E.) entspricht 1 I.E. 2,5g Körpergewicht einer Maus.

2.6.2 Methoden

2.6.2.1 Zeitraum

Für die In-vivo-Untersuchungen wurden jeweils zehn Mäuse in vier verschiedene Gruppen eingeschlossen: SD + Trinkwasser, HFD + Trinkwasser sowie mit 2,5 mg/kg KG Gliclazid bzw. mit 10 mg/kg KG Gliclazid pro Tag. Um eine bessere Kontrolle und Handhabung über 40 Mäuse zu erreichen, wurden zwei Kohorten mit jeweils fünf Mäusen pro Gruppe gebildet und um zwei Wochen versetzt in den Versuch gebracht.

Nach einem zweiwöchigen Vorlauf, in dem alle Tiere eine Woche lang SD und die Tiere der Hochfettgruppe anschließend eine Mischdiät (25 % HFD / 75 % SD) erhielten, schloss sich die zwölfwöchige Gabe von SD bzw. HFD an.

2.6.2.2 Ermittlung von Körpergewicht, Futterverbrauch und Trinkmenge

Jeden Freitag wurden das Körpergewicht, der Futterverbrauch und die Trinkmenge jeder Maus ermittelt. Dazu wurde die Maus auf einer Briefwaage gewogen und das Gewicht notiert. Das Futter wurde ebenfalls gewogen, das Restgewicht notiert, neues Futter

dazugegeben und auch dieses Gesamtgewicht notiert. So konnte der wöchentliche Futtermittelverbrauch pro Maus ermittelt werden.

Das Trinkwasser bzw. die Gliclazid-Lösungen wurden zweimal wöchentlich (dienstags und freitags) ausgetauscht. Mit einem Messzylinder wurden die Restmengen (von ursprünglich 150 ml) abgemessen und notiert.

2.6.2.3 Messung der Blutglucosekonzentration

Zur Ermittlung der Blutglucosekonzentration wurde den Mäusen mit einer vorher sterilisierten Schere ca. 1 mm Schwanzspitze abgeschnitten. Durch leichte Massage und vorsichtige Kompression des Schwanzes wurden Blutstropfen aus der Schwanzvene erzeugt, die auf die Teststreifen des Blutzuckermessgerätes aufgetragen wurden. Die ermittelten Werte wurden in der Einheit mmol/l notiert.

2.6.2.4 Intraperitonealer Glucosetoleranz- und Insulinsensitivitätstest

Die Testung der Glucosetoleranz und Insulinsensitivität fand alle vier Wochen statt. Dabei wurden die Tests in zwei aufeinanderfolgenden Wochen vorgenommen, um die Mäuse durch die Handhabung und die Injektionen nicht übermäßigem Stress auszusetzen.

Für die Glucosetoleranztests wurden die Mäuse am Vorabend für ca. 15 h nüchtern gesetzt. Dazu wurde das Futter entnommen und die Mäuse bekamen jeweils neue Käfige mit frischem Streu. Alle Gruppen erhielten über Nacht Trinkwasser *ad libitum*; damit sollte vermieden werden, dass die Mäuse über die Nüchternzeit dehydrieren und gestresst werden sowie durch die Anwesenheit des Sulfonylharnstoffes im Trinkwasser eventuell in eine Hypoglykämie geraten. Für die Insulinsensitivitätstests wurden die Mäuse nicht nüchtern gesetzt.

Am nächsten Tag wurden die Mäuse gewogen und die Schwanzspitzen für die Blutglucosemessungen abgeschnitten. Die Menge an Glucose- bzw. Insulinlösung wurde entsprechend der Dosis pro Maus in Insulinspritzen aufgezogen. Bei einem Insulinsensitivitätstest wurden die Mäuse ab diesem Zeitpunkt vom Futter getrennt und in neue Käfige mit frischem Streu gesetzt. Während der Tests wurde den Mäusen der Zugang zu Trinkwasser verwehrt, damit die Blutglucosewerte durch die Flüssigkeitsaufnahme nicht verfälscht wurden. Alle Tiere erfuhren nacheinander die gleiche Verfahrensweise: Für den ersten Messzeitpunkt wurde die Blutglucosekonzentration wie in Kapitel 2.5.2.3 beschrieben gemessen, notiert und unmittelbar danach die jeweilige Dosis an Glucose bzw. Insulin *intraperitoneal* (i.p.) gespritzt. Es folgten Messungen nach 15, 30, 60 min und bei

Glucosetoleranztests zusätzlich 120 min. Nach Beendigung der Tests bekamen die Tiere wieder ihr jeweiliges Futter und Trinkwasser (bzw. Gliclazid-Lösung) *ad libitum*.

2.6.2.5 In-vitro-Experimente

Nach zwölfwöchiger SD bzw. HFD (+ zwei Wochen Vorlauf) wurden die Tiere den In-vitro-Experimenten zugeführt. Dazu wurde an zwei Tagen in der Woche jeweils die Hälfte der Tiere einer Kohorte durch Einleiten von CO₂ in den Polysulfonkäfig und anschließende Dekapitation getötet und wie in Kapitel 2.1.2.1 beschrieben präpariert. Das durch die Dekapitation gewonnene Blut eines jeden Tieres wurde in Reaktionsgefäßen gesammelt und auf Eis gekühlt. Nach dem Zentrifugieren (8 min, 14.000 U/min, 4 °C) wurde mit einer Pipette das Blutplasma von den zellulären Bestandteilen abgetrennt und bis zur Vermessung bei -80 °C aufbewahrt. Die Ermittlung verschiedener Laborparameter (s. Kap. 3.4.4) aus dem murinen Plasma fand nach etablierten Methoden im Zentrallabor des Universitätsklinikum Tübingen in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Andreas Peter statt.

Die präparierten Inseln wurden gemäß Kapitel 2.2.2.2 direkt den Insulinsekretionsmessungen zugeführt und anschließend für die Bestimmung des Insulingehaltes (Kapitel 2.2.2.3) aufgeschlossen. Für die in Kapitel 2.4 beschriebene Bestimmung von Inselgröße und -granularität wurden einige Inseln in Zellkulturmedium überführt und am nächsten Tag abfotografiert. Außerdem wurden Inselzellcluster erzeugt (Kapitel 2.1.2.3), die für die Vermessung von intrazellulären ROS (Kapitel 2.3.2.4) verwendet wurden.

Die Pankreata von jeweils drei Mäusen pro Gruppe wurden in Paraffin-Blöcke für eine immunhistologische Auswertung eingebettet. Die histologische Betrachtung dient weiterführenden Untersuchungen und ist nicht mehr Bestandteil dieser Arbeit.

2.7 Auswertung, Statistik und Darstellung der Ergebnisse

2.7.1 Auswertung der Insulinsekretionsmessungen

Anhand der Kalibrierkurve konnte von der Strahlungsintensität der Probe (*counts per minute*, cpm) auf die sezernierte Insulinmenge (ng Insulin/(Insel*h)) geschlossen werden. Die Werte der jeweils drei Röhrchen pro Versuchsbedingung wurden gemittelt und für die statistische Auswertung herangezogen. Werte unter- und oberhalb des Idealbereichs der Kalibrierkurve wurden ausgeschlossen. Falls sich ein Wert um mindestens Faktor 3 von den anderen beiden unterschied, wurde er nicht zur Bildung des Mittelwertes der jeweiligen Versuchsbedingung herangezogen.

2.7.2 Auswertung der fluoreszenzoptischen Messungen

Für die qualitative und quantitative Auswertung der verschiedenen fluoreszenzoptischen Messungen wurden verschiedene (computergestützte) Verfahren angewendet:

- $[Ca^{2+}]_c$ wurde im Rahmen dieser Arbeit lediglich qualitativ betrachtet. Die Kriterien, ob Inselzellcluster unter verschiedenen Bedingungen metabolisch intakt waren, sind mit Beispielkurven im Ergebnisteil (s. Kap. 3.2.3.4) dargestellt.
- $\Delta\Psi$ wurde in Fluoreszenzeinheiten (*arbitrary units*, a.u.) als Mittelwert von zehn aufeinanderfolgenden Messwerten ausgewertet. Dabei wurden entweder die Umschaltzeitpunkte auf verschiedene Lösungen herangezogen oder markante Änderungen im Kurvenverlauf (z.B. tiefster Punkt bei der glucoseinduzierten Hyperpolarisation oder höchster Punkt bei FCCP-Depolarisation) manuell festgelegt und ausgewertet.
- Autofluoreszenzen wurden ebenfalls in a.u. zu verschiedenen Zeitpunkten oder zum Zeitpunkt markanter Veränderungen im Kurvenverlauf ermittelt und ausgewertet.
- Intrazelluläre ROS-Akkumulation wurden nach folgendem Prinzip ausgewertet: Drei gemessene Fluoreszenzwerte pro Inselzellcluster im Abstand von 100 ms wurden gemittelt und um den Mittelwert des Hintergrundes verringert. Die daraus resultierenden Werte wurden für die statistische Auswertung herangezogen.

2.7.3 Auswertung der Inselfläche und -granularität

Die Mikroskopaufnahmen im ZVI-Format wurden in die Software AxioVs40 (Version 4.8.2.0, Carl Zeiss MicroImaging GmbH) übertragen und dort mit Hilfe des Kontur-Werkzeuges ausgewertet. Die Umrechnung von Pixel auf μm lief automatisch, da in der jeweiligen Bildinformation die Werte für Vergrößerung und Einstellung des Mikroskops hinterlegt waren. Die so ermittelten Inselflächen in μm^2 wurden notiert.

Nach Konvertierung der Mikroskopaufnahmen in das TIF-Format wurde mit der Software ImageJ (Version 1.47n, Wayne Rasband, NIH) weitergearbeitet. Nach Freihandmarkierung der Inseln wurde ein Makro mit folgendem Ablauf ausgeführt: Löschen aller Elemente außerhalb der Markierung, Konvertieren des Ausschnitts in ein 8-bit-Bild, Ausführen des Auto-Thresholds „Moments white“ und Öffnen des Histogramm-Fensters. Die Pixelanzahl wurde aus dem Histogramm beim Wert „0“ (= schwarz) abgelesen und notiert. Der Quotient von schwarzer Pixelanzahl und Inselfläche wurde als Inselgranularität definiert (Abb 2.02).

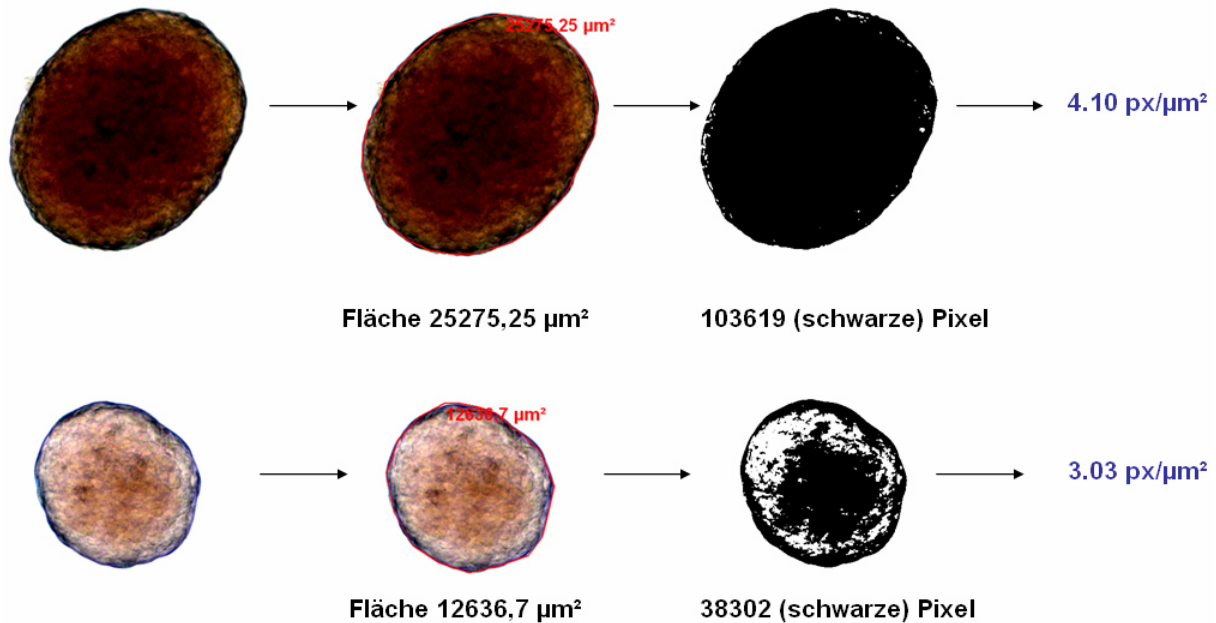


Abb. 2.02 - **Auswertung der Inselgröße und -granularität** - Gezeigt sind beispielhaft zwei Langerhans-Inseln unterschiedlicher Fläche und Granularität, die mit einer 20fachen Vergrößerung und im Durchlichtmodus aufgenommen wurden (links). Zunächst wurde die Fläche ausgewertet, dann folgte die Umwandlung in ein Schwarzweißbild und Ermittlung der Anzahl schwarzer Pixel (Mitte) und Bildung des Quotienten (rechts).

2.7.4 Auswertung der In-vivo-Studie

Eine Maus aus der S-Gruppe wurde ausgeschlossen, da sie ein extrem niedriges Gewicht sowie über eine deutlich vom Rest der Gruppe abweichende Insulinsensitivität verfügte.

2.7.4.1 Glucosetoleranztests

Die Injektion galt als erfolgreich, wenn der Messwert 15 min nach Injektion 15 mmol/l und mehr erreichte. Kam es 30 min nach der Injektion zu einem ungewöhnlich starken Abfall der Messwerte um mehr als die Hälfte, wurde die Maus aus dem Test ausgeschlossen.

2.7.4.2 Insulinsensitivitätstests

Die Injektion galt als erfolgreich, wenn der 30- oder 60minütige Blutglucosewert um die Hälfte und mehr unter den Startwert gefallen war. Trat bei einer Maus während des Tests schwere Hypoglykämien ($< 2 \text{ mmol/l}$) auf, bekam sie eine Glucose-Injektion und wurde aus dem Test ausgeschlossen.

2.7.5 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Alle Experimente basieren auf jeweils mindestens drei unabhängigen Präparationen (n). Bei Experimenten mit Inselzellclustern wurde als n die verwendete Zellzahl aus mindestens drei

Präparationen genommen. Für jede Versuchsreihe wurden die Mittelwerte \pm Standardfehler gebildet und in Form von Diagrammen, Tabellen oder im Text angegeben. In Balkendiagrammen stellt die Höhe der Balken den Mittelwert dar, die Größe der Fehlerbalken den Standardfehler sowie die Zahl im unteren Bereich die Anzahl (n) der Präparationen bzw. Inselzellcluster.

Die statistische Signifikanz zweier Datensätze wurde mittels Student's t-test bestimmt und aller Insulinsekretionsmessungen durch ANOVA mittels Student-Newman-Keuls-Test. Dabei wurde $p \leq 0,05$ als signifikant unterschiedlich betrachtet und mit * markiert. Desweiteren wurde $p \leq 0,01$ mit ** und $p \leq 0,001$ mit *** versehen. Unterschieden sich zwei Datensätze statistisch nicht voneinander wurde dies mit n.s. kenntlich gemacht.

2.8 Testsubstanzen

Bovines Serumalbumin, BSA

0,2 % BSA wurden in Badlösung mit entsprechender Glucosekonzentration gelöst.

Na-Diethyldithiocarbamat, Na-DETC (M: 225,31 g/mol)

0,0225 g wurden unmittelbar vor dem Versuch in 10 ml Badlösung mit entsprechender Glucosekonzentration gelöst und 1:1000 auf 10 µM verdünnt.

Dithioerythritol, DTE (M: 154,25 g/mol)

0,0771 g wurden unmittelbar vor dem Versuch in 100 ml Badlösung mit entsprechender Glucosekonzentration gelöst und somit wurde eine Konzentration von 5 mM erhalten.

FCCP (M: 254,17 g/mol)

0,01 g wurden in 190 µl DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert (Stammlösung). Unmittelbar vor dem Versuch wurde die Stammlösung 1:100 auf 1 mM mit DMSO verdünnt und anschließend 1:2000 auf 0,5 µM in Badlösung mit entsprechender Glucosekonzentration verdünnt.

Fetales Kälberserum, FKS (Invitrogen)

10 % FKS wurden in Badlösung mit entsprechender Glucosekonzentration gelöst.

Gallopamil, D600 (M: 484,63 g/mol)

0,0521 g wurden unmittelbar vor dem Versuch in 10 ml Badlösung mit entsprechender Glucosekonzentration gelöst und 1:200 auf 50 µM verdünnt.

Glibenclamid (M: 494 g/mol)

0,0049 g wurden in 1 ml DMSO gelöst (Stammlösung) und unmittelbar vor dem Versuch 1:10000 auf 1 µM in Badlösung mit entsprechender Glucosekonzentration verdünnt. Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Gliclazid (M: 323,4 g/mol)

0,0032 g wurden in 1 ml DMSO gelöst (Stammlösung) und unmittelbar vor dem Versuch 1:1000 auf 10 µM in Badlösung mit entsprechender Glucosekonzentration verdünnt. Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Glucolipotoxische Zellkultur (25 mM Glucose, 100 µM Palmitat, 0,056 % fettsäurefreies BSA)

0,0195 g Na-Palmitat wurden in 700 µl einer 70 °C warmen 0,1 N NaOH-Lösung gelöst und 1:10 mit 0,1 N NaOH-Lösung auf 10 mM verdünnt (Stammlösung). 0,0336 g fettsäurefreies BSA wurde in 5,4 ml 50 °C warmen *Aqua demin.* gelöst und 600 µl der Palmitat-Stammlösung hinzugegeben. 15,11 mM Glucose wurden in Zellkulturmedium gelöst und die Palmitat-BSA-Lösung 1:10 hinzugegeben, sodass eine Endkonzentration von 25 mM Glucose und 100 µM Palmitat gebunden an 0,056 % fettsäurefreies BSA erreicht wurde. Für eine Zellkultur unter Kontrollbedingungen wurden ins Zellkulturmedium 0,056 % BSA, 10 % *Aqua demin.* und 1 % 1 N NaOH-Lösung gegeben.

Mito-TEMPO (M: 528,1 g/mol)

0,005 g wurden in 94,5 µl Badlösung mit entsprechender Glucosekonzentration gelöst (Stammlösung) und unmittelbar vor dem Versuch 1:1000 auf 100 µM verdünnt oder 1:10000 auf 10 µM verdünnt. Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Nifedipin (M: 346,3 g/mol)

0,0035 g wurden in 1 ml DMSO gelöst (Stammlösung) und unmittelbar vor dem Versuch 1:2000 auf 5 µM in Badlösung mit entsprechender Glucosekonzentration verdünnt. Die Stammlösung wurde aliquotiert und lichtgeschützt bei -20 °C gelagert.

3-Nitropropionsäure, 3-NPA (M: 119,1 g/mol)

0,1191 g wurden in 1 ml Badlösung mit entsprechender Glucosekonzentration gelöst (Stammlösung) und unmittelbar vor dem Versuch 1:1000 auf 1 mM verdünnt. Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Oltipraz (M: 226,34 g/mol)

0,005 g wurden in 221 µl DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert (Stammlösung). Unmittelbar vor dem Versuch wurde die Stammlösung 1:10 auf 10 mM mit DMSO verdünnt und dann nochmals 1:1000 auf 10 µM in Badlösung mit entsprechender Glucosekonzentration verdünnt.

S-Nitrosocystein, SNOC (M: 150,16 g/mol)

0,431 g NaNO₂ wurden unmittelbar vor dem Versuch in 50 ml Wasser gelöst. 8,8 mg Cystein-HCl wurden in 400 µl der NaNO₂-Lösung gelöst und 2 Minuten lang mit 50 µl 1 N HCl-Lösung versetzt. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl 1 N NaOH-Lösung, sodass eine 100 mM

SNOC-Lösung entstand. Durch Verdünnung von 1:1000 in Badlösung mit entsprechender Glucosekonzentration wurde eine 100 μM SNOC-Konzentration erreicht, durch 1:400 eine 250 μM Lösung, durch 1:200 eine 500 μM Lösung und durch 1:100 eine 1mM Lösung.

4-Hydroxy-TEMPO, TEMPOL (M: 172,24 g/mol)

0,1722 g wurden unmittelbar vor dem Versuch in 1 ml Badlösung mit entsprechender Glucosekonzentration gelöst und 1:1000 auf 1 mM verdünnt.

tert-Butylhydrochinon, TBHQ (M: 166,22 g/mol)

0,005 g wurden in 1 ml DMSO gelöst (Stammlösung) und unmittelbar vor dem Versuch 1:1000 auf 30 μM in Badlösung mit entsprechender Glucosekonzentration verdünnt. Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Tolbutamid (M: 270,4 g/mol)

0,027 g wurden in 1 ml DMSO gelöst (Stammlösung) und unmittelbar vor dem Versuch 1:1000 auf 100 μM in Badlösung mit entsprechender Glucosekonzentration verdünnt. Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Wasserstoffperoxid, H_2O_2 (M: 34,01 g/mol, 30 %ige Lösung)

57 μl der Stammlösung wurden unmittelbar vor dem Versuch in 943 μl Badlösung mit entsprechender Glucosekonzentration verdünnt. Daraufhin wurde die Lösung 1:5 auf 100 mM und schließlich 1:1000 auf 100 μM verdünnt.

3 Ergebnisse

Um herauszufinden, ob die durch Gliclazid erhöhte Aktivität antioxidativer Enzyme in murinen Langerhans-Inseln (Gier et al. 2009) ein potentes Schutzkonzept gegen oxidativen Stress darstellt, sollten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene experimentelle Methoden angewendet werden, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies intrazellulär zu erzeugen und die *beta*-Zellfunktion unter diesen Bedingungen zu schützen. Dazu wurden neben Gliclazid auch Aktivatoren und Mimetika der antioxidativen Enzyme eingesetzt. Vor dem Hintergrund eines überernährungsbedingten T2DM wurde ein Schwerpunkt auf die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies bei Nährstoffüberangebot (Glucolipotoxizität) gelegt und durch Untersuchungen an Mäusen auf Hochfettdiät auch *in vivo* umgesetzt. Außerdem wurden akute und langfristige Effekte der K_{ATP} -Kanalinhibitoren auf die mitochondriale Funktion und die ROS-Akkumulation der *beta*-Zelle untersucht und in den Kontext mit einem möglichen Mechanismus gestellt, der hinter der Enzymhochregulation stehen könnte.

3.1 Oxidativer Stress infolge eingeschränkter Mitochondrienaktivität

Bei der endogenen Entstehung von reaktiver Sauerstoffspezies spielen die Mitochondrien eine große Rolle, da durch die Reduktion des von der Zelle verbrauchten Sauerstoffs in den Atmungsketten ein nicht unerheblicher Anteil zu reaktiven Produkten umgesetzt wird.

Da unter pathophysiologischen Bedingungen die Funktion der Atmungskettenkomplexe eingeschränkt sein kann, sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Hemmung des Komplexes II auf den *beta*-Zellmetabolismus hat. Dazu wurde der spezifische und irreversible Inhibitor 3-Nitropropionsäure (3-NPA) verwendet, welcher als falsches Substrat die Succinat-Bindungstasche der Succinat-Dehydrogenase blockiert und so die Umsetzung von FAD zu $FADH_2$ verhindert.

3.1.1 Effekt von 3-NPA auf FAD und NAD(P)H

Mit Hilfe der Autofluoreszenz wurde die Veränderung von FAD unter dem Einfluss von 3-NPA gemessen (Abb. 3.1). Bei Inselzellclustern, die mit 15 mM Glucose (G15) stimuliert waren, führte die akute Gabe von 1 mM 3-NPA zu einem steilen Fluoreszenzanstieg um $18,1 \pm 1,4$ a.u. (n=40). Es wurde ein Plateau erreicht, welches durch Wechsel auf 15 mM Glucose nicht mehr gesenkt werden konnte (Abb. 3.1 A). Um zu testen, ob die Änderung der Autofluoreszenz noch weiter steigerbar war, wurden in einer weiteren Versuchsreihe zusätzlich 10 mM 3-NPA eingesetzt (Tab. 3.1) und eine Fluoreszenzzunahme um $68,3 \pm 8,8$ a.u. (n=14) mit verschieden ausgeprägtem Plateau beobachtet, die jedoch durch Wechsel

auf Badlösung mit 15 mM Glucose nach drei Minuten wieder um durchschnittlich $56,5 \pm 5,8$ a.u. (n=14) auf das Niveau vor der Zugabe abnahm und somit einen unspezifischen, auswaschbaren Effekt darstellt (Abb. 3.1 B).

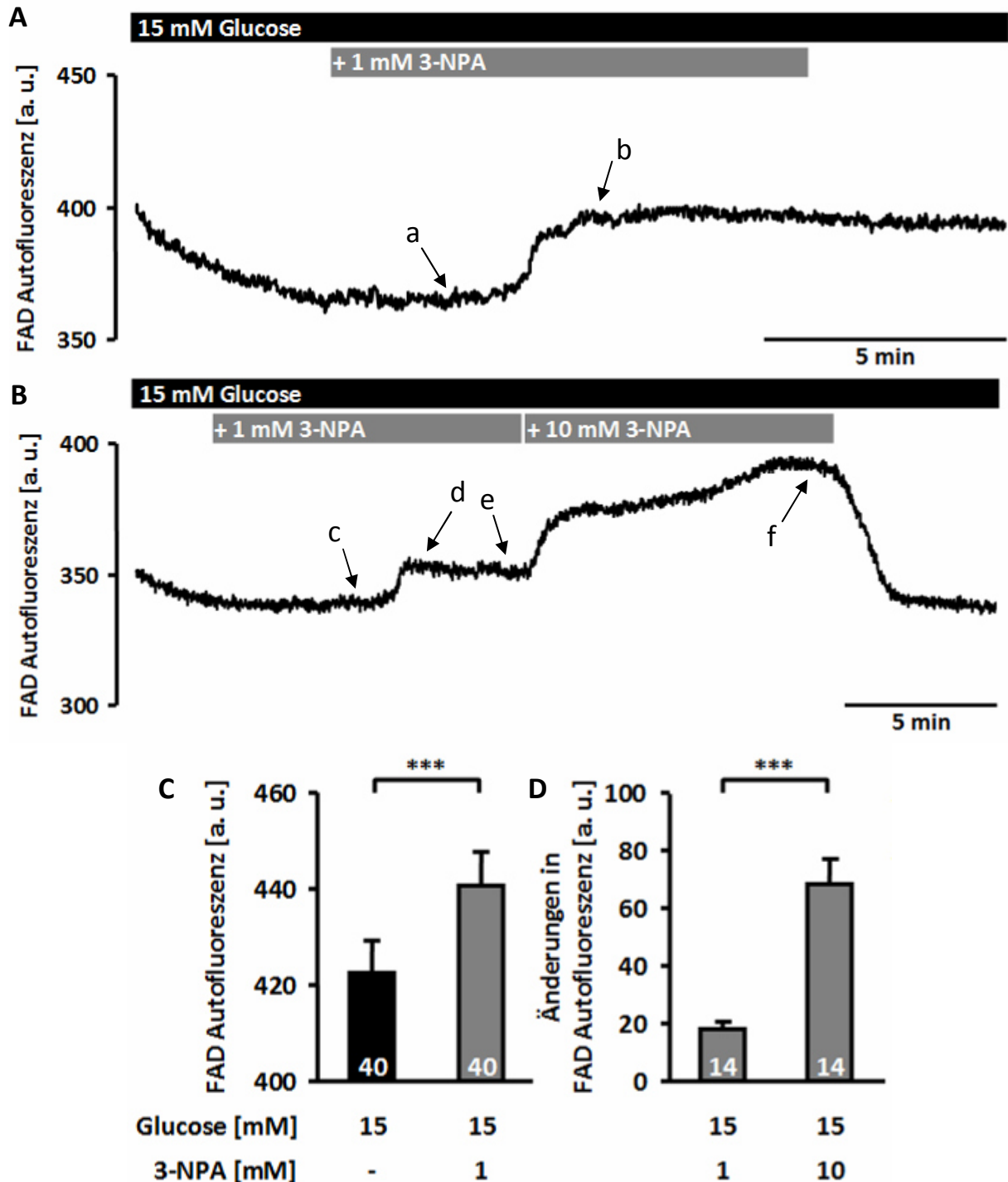


Abb. 3.1 - Akuter Effekt von 3-NPA (1 und 10 mM) auf die FAD-Autofluoreszenz - A+B: Repräsentative Aufnahmen - C: Darstellung der Autofluoreszenzniveaus vor (a in Teil A) und nach (b) dem sichtbaren Anstieg durch 1 mM 3-NPA – D: Fluoreszenzänderungen beim Wechsel auf 1 mM 3-NPA (c+d in Teil B) sowie 10 min nach Zugabe von 10 mM 3-NPA (e+f).

G15 [a. u.]	+ 1 mM 3-NPA [a. u.]	+ 10 mM 3-NPA [a. u.]	Diff. [a. u.]	n
a) 422,4 ± 6,8	b) 440,5 ± 7,3	-	18,1 ± 1,4	40
c) 313,6 ± 6,9	d) 331,7 ± 7,1	-	18,1 ± 2,3	14
-	e) 328,6 ± 7,0	f) 396,9 ± 13,0	68,3 ± 8,8	14

Tab. 3.1 - Autofluoreszenzen aus Abb. 3.1 A+B unmittelbar vor (a+c) und nach dem Anstieg durch 1 mM 3-NPA (b+d) sowie vor (e) und 10 min nach Zugabe von 10 mM 3-NPA (f) - Auswertung der jeweiligen Differenzen

Weiter wurde untersucht, inwieweit die Hemmung der Succinat-Dehydrogenase durch 3-NPA direkt die Akkumulation von FAD zur Folge hat oder ob dies indirekt durch oxidative Veränderungen innerhalb des Mitochondriums hervorgerufen wird. Dazu wurde das Reduktionsmittel Dithioerythritol (DTE) in einer weiteren Versuchsreihe kurz vor und während der Gabe von 3-NPA gegeben. 5 mM DTE selbst hatte keinen Effekt auf die FAD-Autofluoreszenz (Abb. 3.2) und konnte den Effekt durch 3-NPA auch nicht beeinflussen (Tab. 3.2). Die Fluoreszenzabnahme um durchschnittlich $11,1 \pm 1,1$ a.u. (n=26) bei Zugabe von 5 mM DTE in Badlösung mit 15 mM Glucose wurde durch das in allen Versuchen auftretende Ausbleichen der Autofluoreszenz bei Belichtung verursacht.

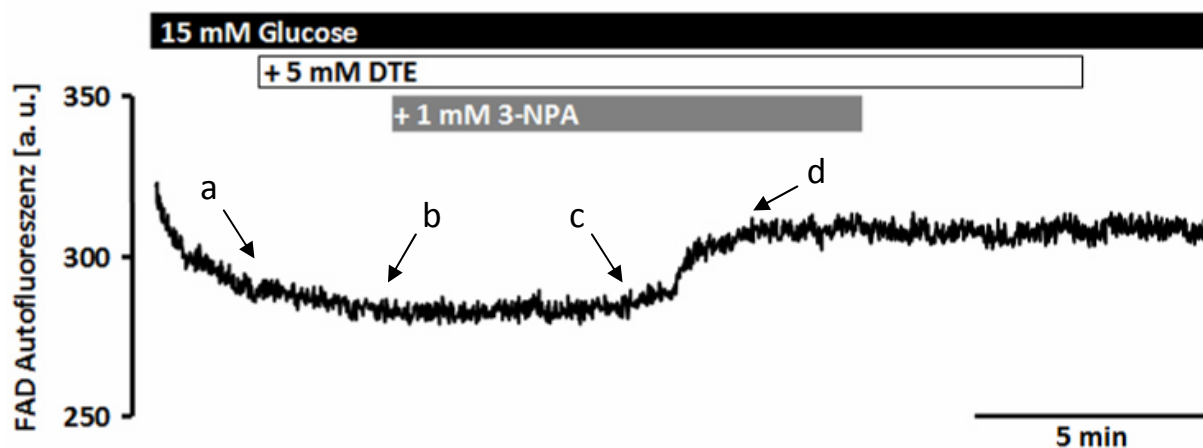


Abb. 3.2 - Akuter Effekt von 3-NPA (1 mM) auf die FAD-Autofluoreszenz in Anwesenheit von 5 mM DTE - Repräsentative Aufnahme - Ausgewertet wurden die Autofluoreszenzniveaus an den Umschaltpunkten auf DTE-haltige (a) bzw. DTE- und 3-NPA-haltige Lösung (b) sowie unmittelbar vor (c) und nach dem sichtbaren Anstieg durch 3-NPA (d).

G15 (5 mM DTE) [a. u.]	+ 1 mM 3-NPA (5 mM DTE) [a. u.]	Diff. [a. u.]		n
c) 297,5 ± 7,7	d) 315,5 ± 8,1	18,1 ± 1,2	p≤0,001	26

Tab. 3.2 - Änderung der Autofluoreszenzen durch 1 mM 3-NPA (Abb. 3.2 c+d) in Anwesenheit von 5 mM DTE

Als nächstes sollte bestätigt werden, dass 3-NPA hauptsächlich den Komplex II der Atmungskette hemmt und der Einfluss auf die Aktivität anderer Komplexe und Enzyme im mitochondrialen Metabolismus vernachlässigbar ist. Dazu wurde neben FAD zusätzlich die Autofluoreszenz des zweiten wichtigen Reduktionsäquivalents NAD(P)H erfasst. Es wurde die Fluoreszenzänderung beim Umschalten von einer Badlösung mit 0,5 mM Glucose auf eine mit 15 mM Glucose bei Inselzellclustern ermittelt, die entweder unbehandelt oder 1 h mit 1 mM 3-NPA im Zellkulturmedium vorinkubiert waren (Abb. 3.3).

Erwartungsgemäß verhielten sich die Änderungen der Autofluoreszenzen von FAD und NAD(P)H bei einem Wechsel von niedriger zu hoher Glucosekonzentration genau entgegengesetzt (Tab. 3.3): Durch die erhöhte Aktivität der Succinat-Dehydrogenase wurde FAD vermehrt zu FADH₂ umgesetzt, was zu einer Verminderung der Autofluoreszenz um $-16,4 \pm 1,4$ a.u. (n=36) führte (Abb. 3.3 A). Gleichzeitig erhöhte sich die Menge an NAD(P)H (und damit die Autofluoreszenz) durch die Bereitstellung aus Glykolyse und Citratzyklus um $10,1 \pm 1,1$ a.u. (n=36) (Abb 3.3 C).

	G0,5 [a. u.]	G15 [a. u.]	Diff. [a. u.]		n
FAD	333,2 ± 6,3	316,8 ± 5,5	-16,4 ± 1,4	p≤0,001	36
NAD(P)H	157,9 ± 3,2	167,9 ± 3,1	10,1 ± 1,1	p≤0,001	36

Tab. 3.3 - Änderung der Autofluoreszenzen und Auswertung der jeweiligen Differenzen nach Wechsel von einer Badlösung mit 0,5 mM Glucose auf eine mit 15 mM Glucose

Waren Inselzellcluster mit 3-NPA vorinkubiert, konnte durch den Wechsel von 0,5 auf 15 mM Glucoselösung zwar nach wie vor eine Autofluoreszenzänderung beobachtet werden (Abb. 3.3 B+D), die jedoch bei FAD signifikant kleiner war als bei unbehandelten Zellen (Abb. 3.3 E) (Tab. 3.4).

	G0,5 (1 mM 3-NPA) [a. u.]	G15 (1 mM 3-NPA) [a. u.]	Diff. [a. u.]		n
FAD	329,1 ± 6,3	317,8 ± 8,7	-11,3 ± 1,0	p≤0,001	25
NAD(P)H	150,4 ± 3,9	159,1 ± 4,9	8,7 ± 1,5	p≤0,001	25

Tab. 3.4 - Änderung der Autofluoreszenzen und Auswertung der jeweiligen Differenzen durch Wechsel von einer Badlösung mit 0,5 mM Glucose auf eine mit 15 mM Glucose nach 1 h Vorinkubation mit 1 mM 3-NPA

Stimulatorische Glucosekonzentrationen von 15 mM führten in Inselzellclustern zur vermehrten Bereitstellung von FADH₂ und NAD(P)H. Die Komplex-II-Hemmung durch 3-NPA reduzierte lediglich die FADH₂-Bildung und nicht die NAD(P)H-Konzentration.

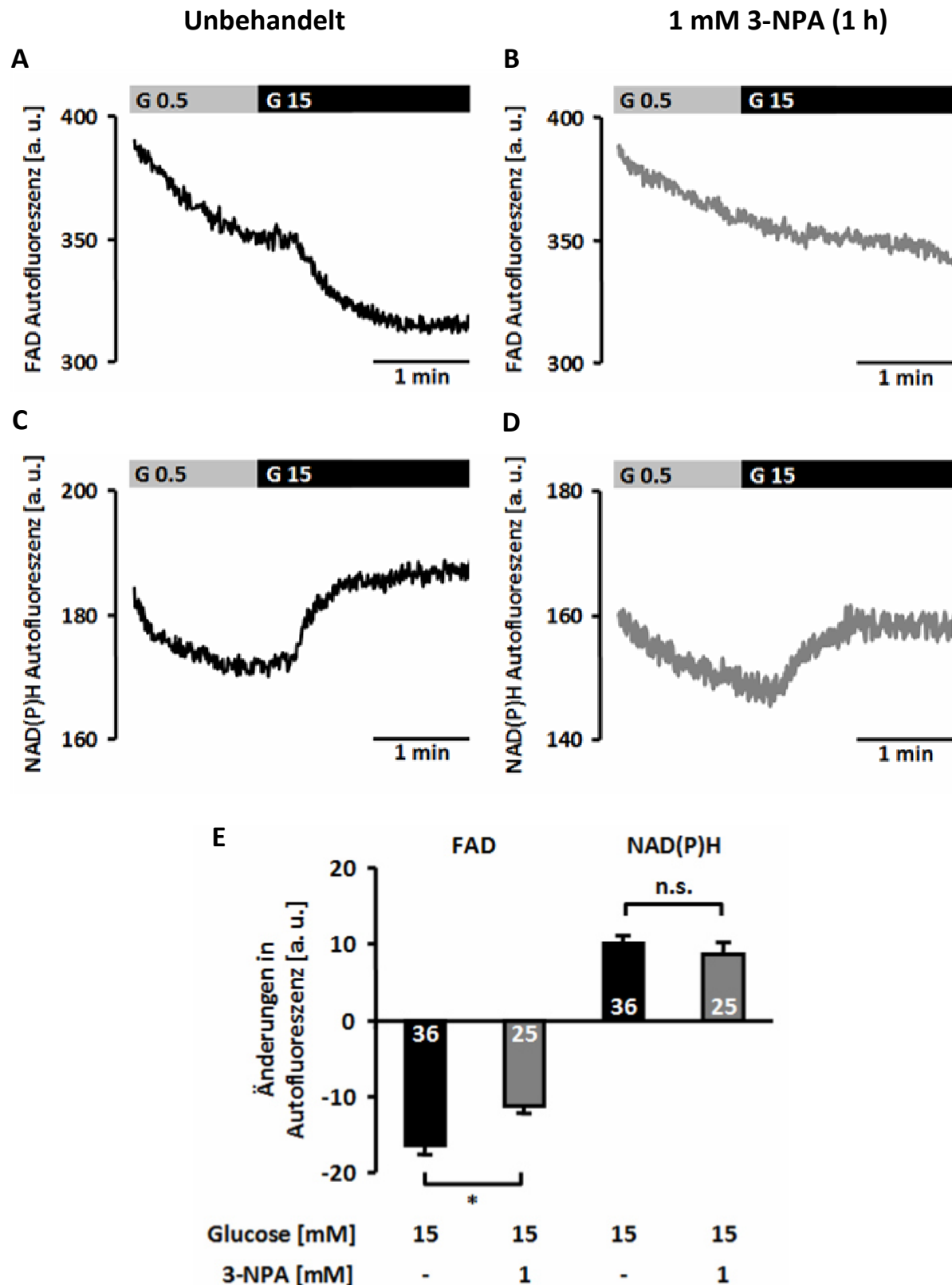


Abb. 3.3 - Effekt von 1 h Vorinkubation mit 1 mM 3-NPA auf die Änderungen der Autofluoreszenzen von FAD und NAD(P)H beim Wechsel von 0,5 auf 15 mM Glucoselösung - A-D: Repräsentative Aufnahmen - A+C: Autofluoreszenzänderungen unbehandelter Inselzellcluster nach Wechsel auf 15 mM Glucose - B+D: gleiche Versuchsbedingungen nach 1 h Vorinkubation mit 1 mM 3-NPA - E: Darstellung der jeweiligen Differenzen

3.1.2 Einfluss von 3-NPA auf $\Delta\Psi$

Über die Atmungskettenkomplexe einer metabolisch aktiven *beta*-Zelle werden Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum transportiert. Der dadurch entstehende elektrochemische Protonengradient hat Auswirkungen auf das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi$, da durch die Verschiebung der positiven Ladung die Matrix gegenüber dem Zytosol noch negativer wird. Wird der Protonentransport gehemmt, hat dies bekanntermaßen einen deutlichen Einfluss auf $\Delta\Psi$. Da Komplex II im Gegensatz zu I, III und IV nicht am Protonentransport beteiligt ist, sollte nun geklärt werden, ob und in welcher Weise die durch 3-NPA vermittelte Hemmung von Komplex II $\Delta\Psi$ beeinflusst wird.

Dazu wurde zunächst der akute Effekt von 1 mM 3-NPA auf $\Delta\Psi$ getestet. Unter dem Einfluss von 15 mM Glucose befinden sich *beta*-Zellen zwar in einem sehr aktiven metabolischen Zustand, doch der starke Ca^{2+} -Einstrom führt selbst zu einer partiellen Depolarisation von $\Delta\Psi$. Daher wurden die Versuche unter Anwesenheit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Blockers Nifedipin (5 μM) durchgeführt. Es zeigte sich, dass die zehnmündige Gabe von 1 mM 3-NPA zu einer Depolarisation von $\Delta\Psi$ um $35,3 \pm 6,4$ a.u. führt ($n=50$) (Tab. 3.5). Durch den Vergleich zu Kontrollmessungen (nur Nifedipin) ließ sich feststellen, dass 3-NPA $\Delta\Psi$ Ca^{2+} -unabhängig signifikant depolarisiert (Abb. 3.4).

	0 min [a. u.]	5 min [a. u.]	10 min [a. u.]	Diff. [a. u.]	n
5 μM Nifedipin	491,9 \pm 15,5	484,6 \pm 14,7	479,8 \pm 14,4	-12,1 \pm 3,5	27
1 mM 3-NPA + 5 μM Nif.	489,3 \pm 13,7	508,5 \pm 15,4	526,7 \pm 19,3	35,3 \pm 6,4	50

Tab. 3.5 - Änderung von $\Delta\Psi$ in einer Badlösung mit 15 mM Glucose und 5 μM Nifedipin nach 5 und 10 min mit und ohne 1 mM 3-NPA - Die Auswertung der jeweiligen Differenzen nach 10 min im Vergleich zum Ausgangswert ergibt jeweils einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,001$).

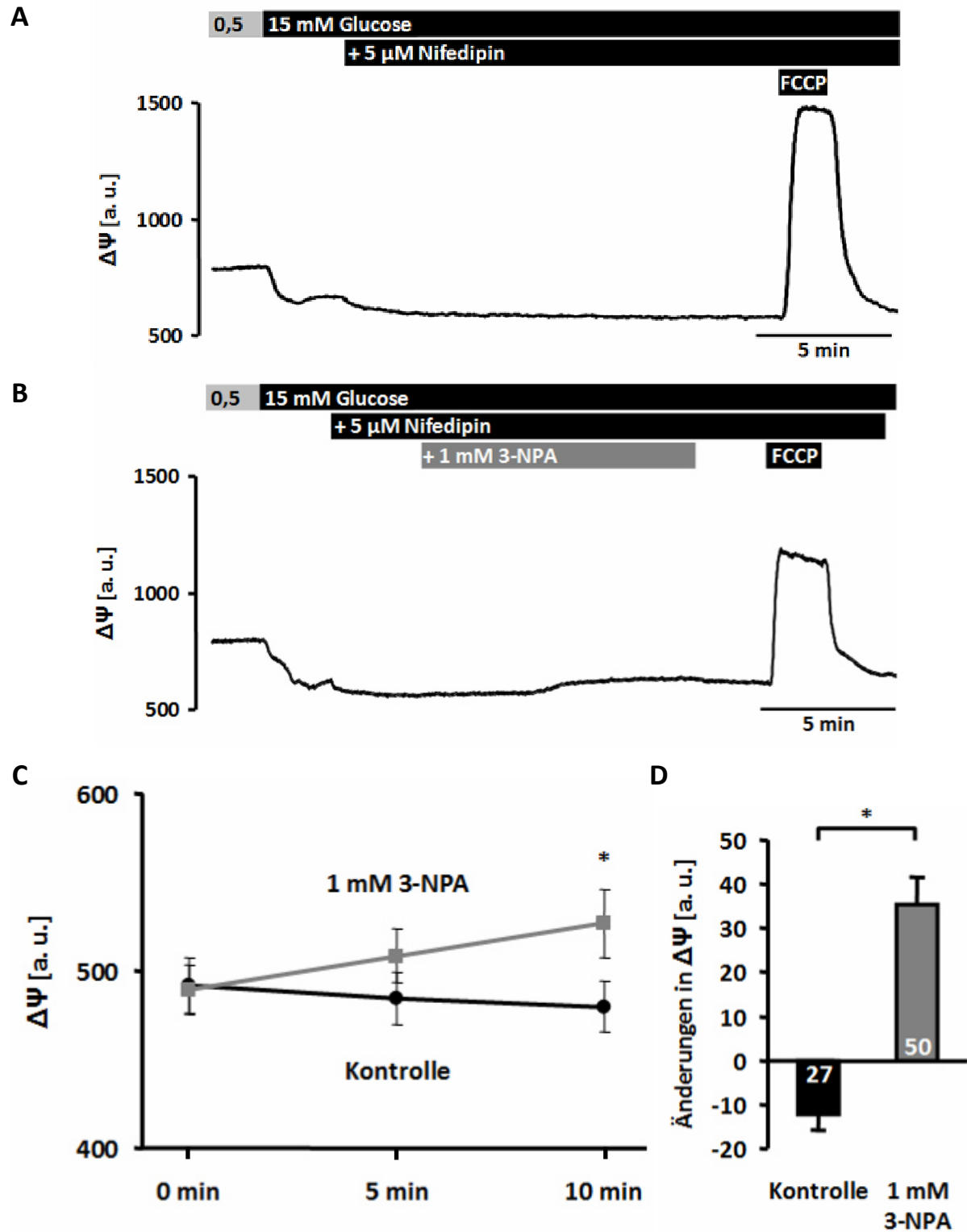


Abb. 3.4 - Akuter Einfluss von 1 mM 3-NPA auf $\Delta\Psi$ bei Anwesenheit von 15 mM Glucose und 5 μ M Nifedipin - A+B: Repräsentative Aufnahmen - Mit dem Protonophor FCCP (0,5 μ M) wurde zum Ende jedes Experiments zu Kontrollzwecken eine maximale Depolarisation von $\Delta\Psi$ ausgelöst. - C+D: 0, 5 und 10 min nach Zugabe von 1 mM 3-NPA wurden die Fluoreszenzniveaus ausgewertet und bei 10 min die jeweiligen Differenzen zum Ausgangswert gegenüber Kontrollbedingungen (ohne 1 mM 3-NPA) verglichen.

Diese Experimente zeigten, dass die akute Hemmung von Komplex II die mitochondriale Aktivität in Inselzellclustern reduzierte. Daher sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden, ob hierdurch auch die Reaktion gegenüber verschiedenen Glucosekonzentrationen beeinflusst wird. Ähnlich zu den Versuchen in Kapitel 3.1.1 wurden Inselzellcluster entweder unbehandelt oder 1 h mit 1 mM 3-NPA im Zellkulturmedium vorinkubiert. Anschließend wurde die Veränderung von $\Delta\Psi$ bei einem Wechsel von einer Badlösung mit 0,5 mM Glucose auf eine mit 15 mM Glucose getestet und die erhaltenen Messwerte wurden zur Standardisierung auf die maximale Depolarisation bezogen, die durch 0,5 μM FCCP hervorgerufen wird (Abb. 3.5). FCCP macht die innere Mitochondrienmembran für Protonen durchlässig und führt zum völligen Zusammenbrechen des elektrischen Gradienten.

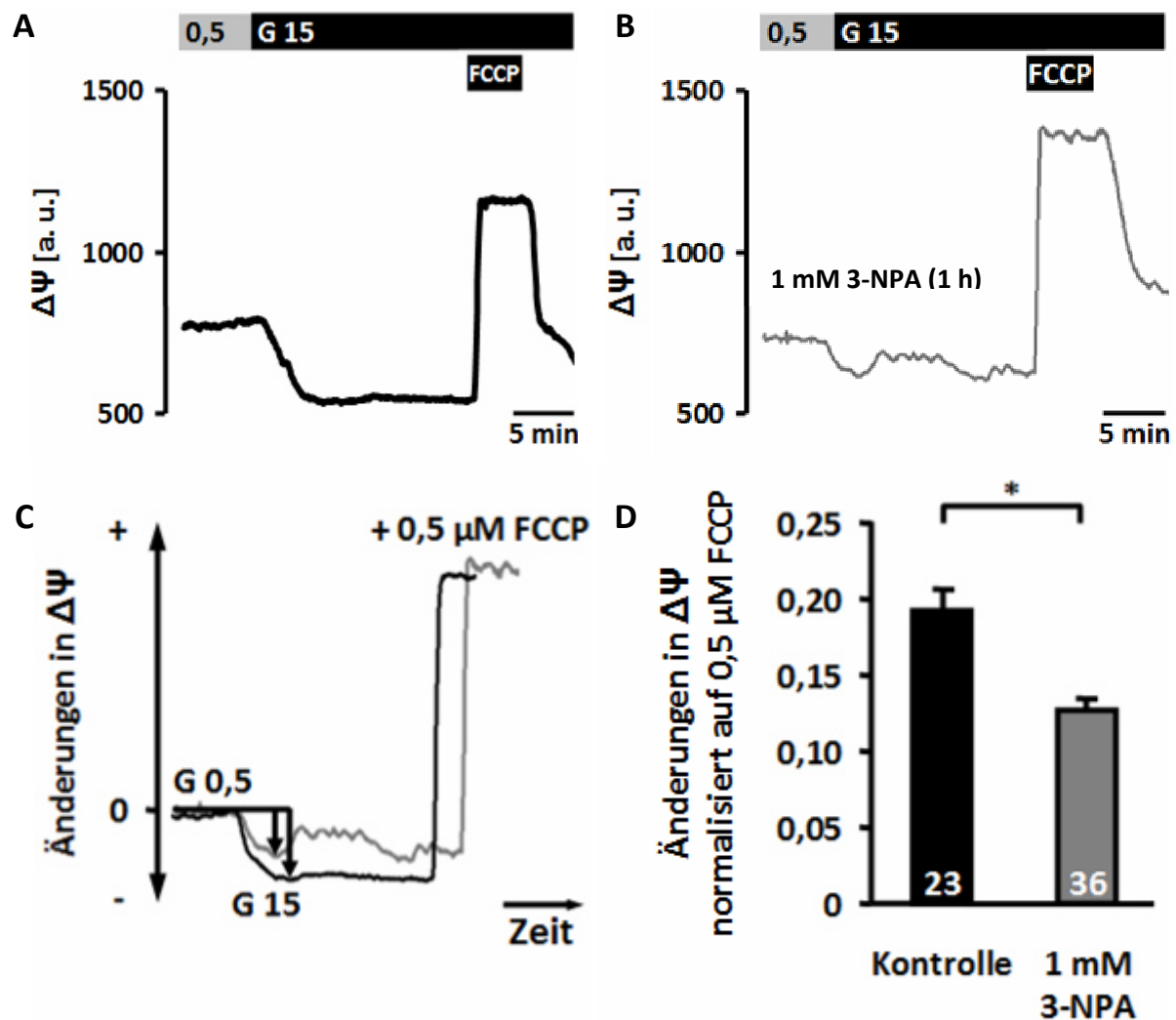


Abb. 3.5 - Effekt von 1 h Vorinkubation mit 1 mM 3-NPA auf die Hyperpolarisation von $\Delta\Psi$ beim Wechsel von einer Badlösung mit 0,5 mM Glucose auf eine mit 15 mM - A+B: Repräsentative Aufnahmen - Mit 0,5 μM FCCP wurde eine maximale Depolarisation von $\Delta\Psi$ ausgelöst. - C: Beispielhafte Auswertung der $\Delta\Psi$ -Differenz zwischen 0,5 und 15 mM Glucose - D: Darstellung der jeweiligen Differenzen bezogen auf das FCCP-Plateau

Die einstündige Inkubation mit 1 mM 3-NPA verminderte die Hyperpolarisation von $\Delta\Psi$ bei einem Glucosewechsel von 0,5 auf 15 mM, bezogen auf das FCCP-Niveau, im Gegensatz zu unbehandelten Inselzellclustern signifikant (Tab. 3.6).

	G0,5 [a. u.]	G15 [a. u.]	Diff. [a. u.]		+ 0,5 μM FCCP [a. u.]	n
Kontrolle	731,8 \pm 27,3	509,0 \pm 20,2	202,3 \pm 14,6	p \leq 0,001	1199,3 \pm 61,3	23
1 mM 3-NPA	589,3 \pm 20,4	460,8 \pm 15,3	100,5 \pm 9,7	p \leq 0,001	1071,3 \pm 64,4	36

Tab. 3.6 - Änderung von $\Delta\Psi$ bei einem Wechsel von einer Badlösung mit 0,5 mM Glucose zu einer mit 15 mM Glucose bei Inselzellclustern, die entweder unbehandelt oder 1 h mit 1 mM 3-NPA im Zellkulturmedium vorbehandelt waren - Abb. 3.5 (D) zeigt die jeweilige Normalisierung auf das FCCP-Plateau.

3.1.3 Auswirkung von 3-NPA auf die Insulinsekretion

Eine wichtige Voraussetzung für die glucosestimulierte Insulinsekretion der *beta*-Zelle ist die einwandfreie Mitochondrienfunktion, da mitochondriales ATP unter anderem für die Hemmung der K_{ATP} -Kanäle benötigt wird. Anhand von Steady-state-Inkubationen muriner Inseln sollte die Insulinsekretion unter dem Einfluss des Komplex-II-Inhibitors untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen und Inkubationsbedingungen getestet. Bei der akuten Zugabe von 3-NPA zu Inseln, die mit 15 mM Glucose stimuliert waren, stellte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Insulinsekretion heraus (Abb. 3.6). Als Kontrolle, dass die Inseln funktionsfähig waren, diente der Vergleich zwischen der Sekretion unter einer substimulatorischen Glucosekonzentration von 3 mM (G3) von $0,08 \pm 0,02$ ng Insulin/(Insel*h), die durch 15 mM Glucose (G15) auf $1,5 \pm 0,2$ ng Insulin/(Insel*h) gesteigert werden konnte ($n=4$, $p \leq 0,001$). Die Hemmung der Insulinsekretion durch 3-NPA war tendenziell bereits mit 0,1 mM zu beobachten ($1,0 \pm 0,2$ ng Insulin/(Insel*h), $n=4$, zu G15 n.s.) und mit 1 mM deutlich ausgeprägt ($0,5 \pm 0,1$ ng Insulin/(Insel*h), $n=4$, zu G15 $p \leq 0,01$).

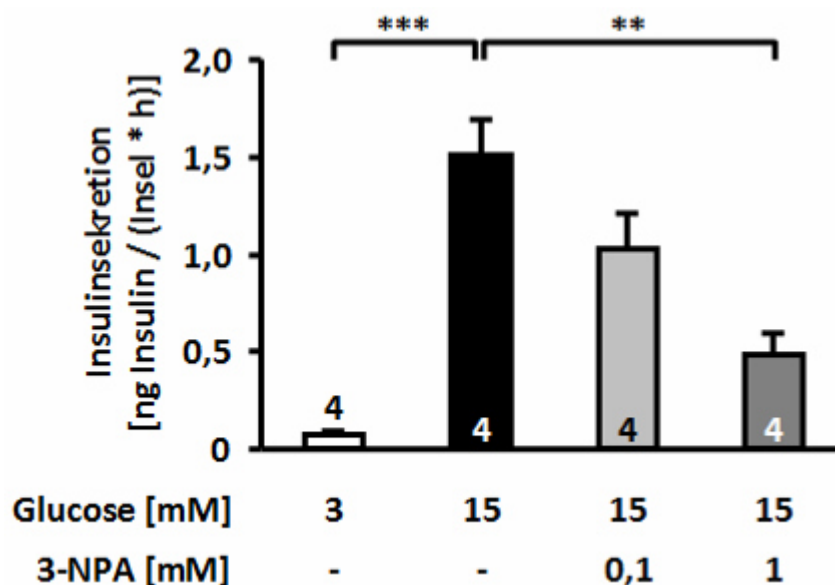


Abb. 3.6 - Einfluss von 3-NPA (0,1 und 1 mM) auf die Insulinsekretion nach 1 h Steady-state-Inkubation - Inseln wurden für 1 h mit 3 oder 15 mM Glucoselösung in An- und Abwesenheit von 3-NPA inkubiert.

Die sichtbare Hemmung mit 0,1 mM 3-NPA, die sich in dieser Versuchsreihe als statistisch nicht signifikant erwies, sollte unter dem Einfluss eines erhöhten Glucoseangebotes (25 mM) erneut getestet werden. Außerdem wurde in einer weiteren Versuchsreihe 1 mM 3-NPA als einstündige Inkubation unmittelbar vor der Steady-state-Inkubation zu den Inseln gegeben, ausgewaschen und schließlich die Stimulierbarkeit der Insulinsekretion durch 15 mM

Glucose kontrolliert (Abb. 3.7). Die Erhöhung des Substratangebotes hatte zur Folge, dass die Sekretionshemmung mit 0,1 mM 3-NPA statistisch signifikant wurde (G25: $1,7 \pm 0,1$; + 0,1 mM 3-NPA: $1,2 \pm 0,2$ ng Insulin/(Insel*h), $n=4$, $p \leq 0,05$). Die einstündige Vorinkubation mit 1 mM 3-NPA führte ähnlich zu den Akutinkubationen zu einer signifikant eingeschränkten Insulinsekretion durch 15 mM Glucose im Vergleich zu unbehandelten Inseln (G15: $3,3 \pm 0,5$; + 1 mM 3-NPA 1 h vorab: $1,3 \pm 0,4$ ng Insulin/(Insel*h), $n=4-8$, $p \leq 0,001$).

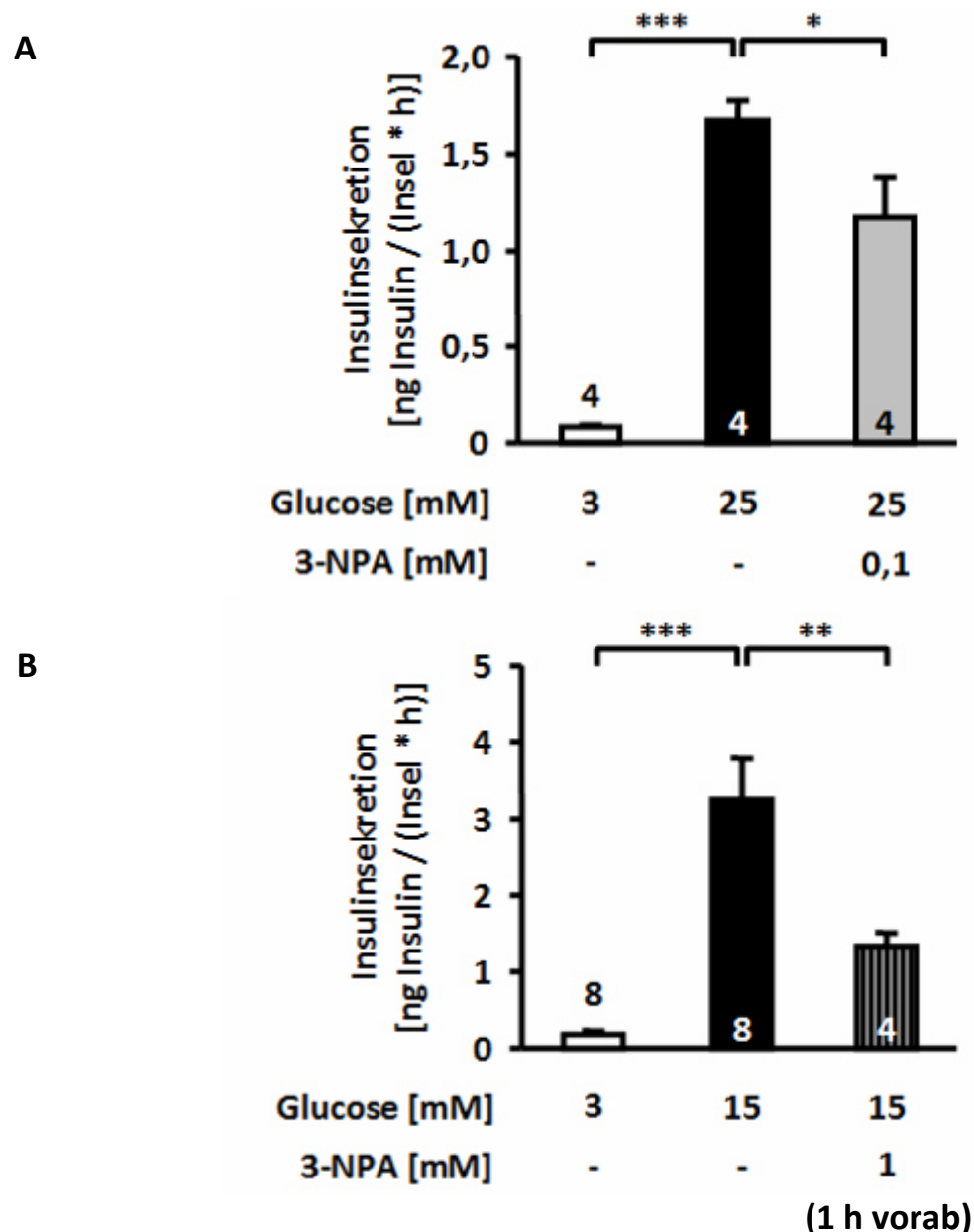


Abb. 3.7 - Einfluss von 3-NPA (0,1 bzw. 1 mM) auf die Insulinsekretion bei erhöhter Glucosekonzentration und nach einstündiger Vorinkubation (1 h Steady-state-Inkubationen) - A: Inseln wurden für 1 h mit 3 oder 25 mM Glucoselösung in An- und Abwesenheit von 3-NPA inkubiert. - B: Nach 1 h Vorinkubation mit 1 mM 3-NPA wurden Inseln mit 15 mM Glucoselösung stimuliert und ihre Insulinsekretion gegenüber unbehandelten Inseln verglichen.

Die bisher erhaltenen Daten zeigten, dass die Hemmung von Komplex II in der mitochondrialen Atmungskette zu einer deutlichen Einschränkung der grundlegenden *beta*-Zellfunktion führt. Wenn dabei oxidativer Stress für den Sekretionsschaden ursächlich ist, wäre eine Strategie die Aktivität antioxidativer Enzyme in der *beta*-Zelle zu erhöhen und somit einem Funktionsverlust entgegenzuwirken. In den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde eine Hochregulation antioxidativer Enzyme durch 10 μ M Gliclazid nach mehreren Stunden nachgewiesen. Da nicht bekannt ist, wie lange dieser Effekt nach Inkubation anhält, wurde Gliclazid nach verschiedenen Protokollen zu den Inseln gegeben (Abb. 3.8): sowohl vor (über Nacht) als auch während (Abb. 3.8 A), nur während (Abb. 3.8 B) oder nur vor (über Nacht) (Abb. 3.8 C) den einstündigen Steady-state-Inkubationen mit 1 mM 3-NPA. In Abb. 3.8 wurde auf die Darstellung der Kontrolle verzichtet, ob die Inseln in einer 15 mM Glucoselösung mehr Insulin sezernieren als in 3 mM Glucose, was für alle Experimente zutraf (Tab. 3.7). Eine weitere Voraussetzung war, dass eine signifikante Hemmung durch 1 mM 3-NPA in jedem Versuch erreicht wurde (Tab. 3.7). Die langfristige Inkubation mit 10 μ M Gliclazid wies keine sekretionssteigernden Effekte auf (s. Kap. 3.3.1).

Die Vor- und Akutinkubation (Abb. 3.8 A) mit 10 μ M Gliclazid führte zu einer signifikanten Verbesserung der Insulinsekretion unter dem Einfluss von 1 mM 3-NPA (G15 + 1 mM 3-NPA: $0,5 \pm 0,1$; + 10 μ M Gliclazid: $1,1 \pm 0,1$ ng Insulin/(Insel*h), n=4, $p \leq 0,05$). Als nächstes wurde getestet, ob die Akutinkubation mit 10 μ M Gliclazid (Abb. 3.8 B) alleine ausreicht, um vor der Sekretionshemmung durch 1 mM 3-NPA zu schützen. Auch unter diesen Bedingungen zeigte sich, dass die *beta*-Zellfunktion verbessert werden konnte (G15 + 1 mM 3-NPA: $0,7 \pm 0,2$; + 10 μ M Gliclazid: $1,7 \pm 0,1$ ng Insulin/(Insel*h), n=4, $p \leq 0,001$). Mit der alleinigen Gliclazid-Vorinkubation über Nacht bis 30 min vor der Steady-state-Inkubation (Abb. 3.8 C) konnte kein Schutz der Sekretion erreicht werden (G15 + 1 mM 3-NPA: $0,4 \pm 0,2$; + 10 μ M Gliclazid: $0,4 \pm 0,1$ ng Insulin/(Insel*h), n=4, n.s.).

G3 [ng Insulin/(Insel*h)]	G15 [ng Insulin/(Insel*h)]	+ 1 mM 3-NPA [ng Insulin/(Insel*h)]	+ 1 mM 3-NPA (10 μ M Gliclazid) [ng Insulin/(Insel*h)]	Gliclazid- Inkubation	n
$0,08 \pm 0,02$	$1,5 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	ü.N. + akut	4
$0,1 \pm 0,03$	$3,1 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,1$	akut	4
$0,1 \pm 0,02$	$2,7 \pm 0,6$	$0,4 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$	ü.N.	4

Tab. 3.7 - Insulinsekretionen von Inseln in einstündigen Steady-state-Inkubationen mit 3 und 15 mM Glucose mit und ohne 1 mM 3-NPA. Inseln waren entweder unbehandelt oder nach verschiedenen Protokollen mit Gliclazid inkubiert - Alle Versuche wiesen eine signifikante ($p \leq 0,001$) Stimulation der Insulinsekretion bei 15 mM Glucose im Vergleich zu 3 mM auf, die durch 1 mM 3-NPA signifikant ($p \leq 0,01$) gehemmt wurde.

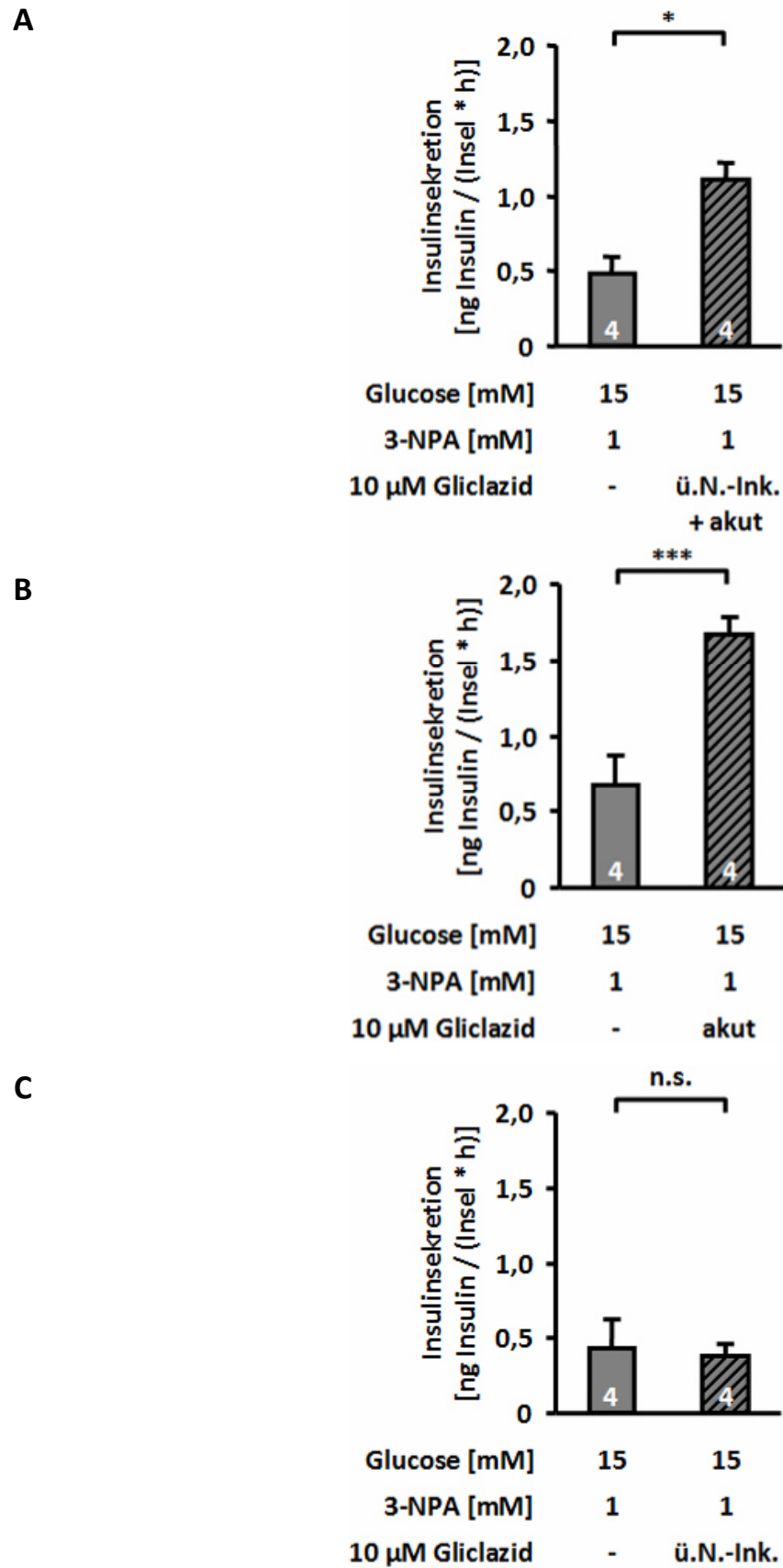


Abb. 3.8 - Einfluss von 1 mM 3-NPA (1 h) auf die Insulinsekretion bei Inseln, die entweder unbehandelt oder mit 10 μ M Gliclazid akut und über Nacht (A), nur akut (B) oder nur über Nacht (C) inkubiert waren

Um einen möglichen Schutzeffekt durch Gliclazid *in vivo* zu erreichen, wurde Mäusen zwei Wochen lang täglich eine Dosis von 3,3 bzw. 10 mg/kg KG Gliclazid oral appliziert. Nach dieser Phase wurden die Mäuse getötet, präpariert und ihre Inseln unmittelbar danach (s. Kapitel 2.2.2.2) in Insulinsekretionsmessungen getestet. Die Insulinsekretion war durch 15 mM stimulierbar und wurde durch 1 mM 3-NPA gehemmt. Keine Gliclazid-Dosis konnte diesen Effekt verhindern (Tab. 3.8).

G3 (Vehikel-Lsg.) [ng Insulin/(Insel*h)]	G15 (Vehikel-Lsg.) [ng Insulin/(Insel*h)]	+ 1 mM 3-NPA (Vehikel-Lsg.) [ng Insulin/(Insel*h)]	n
0,2 ± 0,03	3,3 ± 0,7	0,3 ± 0,1	4
G3 (3,3 mg/kg KG Gliclazid) [ng Insulin/(Insel*h)]	G15 (3,3 mg/kg KG Gliclazid) [ng Insulin/(Insel*h)]	+ 1 mM 3-NPA (3,3 mg/kg KG Gliclazid) [ng Insulin/(Insel*h)]	n
0,2 ± 0,04	3,0 ± 1,1	0,1 ± 0,03	3
G3 (10 mg/kg KG Gliclazid) [ng Insulin/(Insel*h)]	G15 (10 mg/kg KG Gliclazid) [ng Insulin/(Insel*h)]	+ 1 mM 3-NPA (10 mg/kg KG Gliclazid) [ng Insulin/(Insel*h)]	n
0,04 ± 0,01	2,7 ± 0,1	0,2 ± 0,02	2

Tab. 3.8- Alle Versuche wiesen nach einstündiger Steady-state-Inkubation eine signifikante ($p \leq 0,01$) Stimulation der Insulinsekretion bei 15 mM Glucose im Vergleich zu 3 mM auf. 1 mM 3-NPA führte in den Versuchen mit Inseln aus Mäusen, die zwei Wochen lang Vehikel-Lösung bzw. 10 mg/kg KG Gliclazid erhalten hatten, zu einer signifikanten ($p \leq 0,01$) Hemmung. Statistisch nicht sichern (n.s.) lässt sich der Effekt von 1 mM 3-NPA auf die Insulinsekretion von Inseln aus Mäusen, die 3,3 mg/kg KG Gliclazid erhalten hatten. Dies lässt sich auf die hohe Standardabweichung bei 15 mM Glucose zurückführen.

Die Insulinsekretionsexperimente mit Gliclazid deuten daraufhin, dass die Erhöhung der antioxidativen Kapazität nicht gegen den durch 3-NPA induzierten Schaden wirken kann. Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen, wurden im Folgenden Nrf2-Aktivatoren (Oltipraz, TBHQ) und Mimetika der Superoxiddismutase (TEMPOL, Mito-TEMPO) getestet. Wie aus Abb. 3.9 und Tab. 3.9 zu entnehmen ist, konnten weder 10 μ M Oltipraz noch 30 μ M TBHQ (die Substanzen waren über Nacht und während der einstündigen Sekretionsmessung anwesend) die Sekretionshemmung durch 1 mM 3-NPA verhindern. 30 μ M TBHQ führten sogar zur sichtbaren Beschädigung der Inselkapsel und senkten die Sekretion unter 3-NPA tendenziell noch weiter (Abb. 3.9 B).

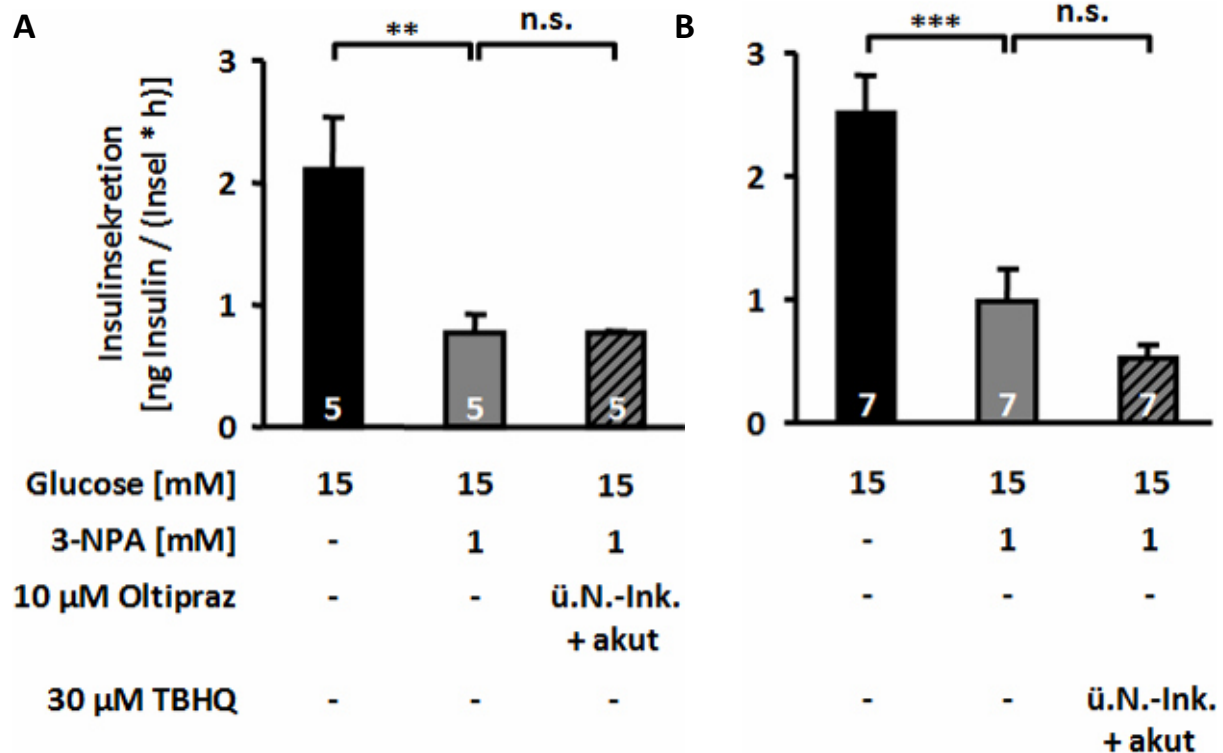


Abb. 3.9 - Einfluss der Nrf2-Aktivatoren 10 μ M Oltipraz und 30 μ M TBHQ, über Nacht und akut gegeben, auf die Insulinsekretion bei Anwesenheit von 1 mM 3-NPA - Während der einstündigen Steady-state-Inkubation von Inseln in 15 mM Glucoselösung führten 1 mM 3-NPA zu einer signifikanten Insulinsekretionshemmung, welche weder durch 10 μ M Oltipraz (A) noch durch 30 μ M TBHQ (B) verhindert werden konnte.

G3 [ng Insulin/(Insel*h)]	G15 [ng Insulin/(Insel*h)]	+ 1 mM 3-NPA [ng Insulin/(Insel*h)]	G15 (Olti. / TBHQ) [ng Insulin/(Insel*h)]	+ 1 mM 3-NPA (Olti. / TBHQ) [ng Insulin/(Insel*h)]	n
0,1 ± 0,03	2,1 ± 0,4	0,8 ± 0,2	2,4 ± 0,3 (Olti.)	0,8 ± 0,03 (Olti.)	5
0,1 ± 0,1	2,5 ± 0,3	1,0 ± 0,3	2,6 ± 0,2 (TBHQ)	0,5 ± 0,1 (TBHQ)	7

Tab. 3.9 - Alle Versuche wiesen eine signifikante ($p < 0,001$) Stimulation der Insulinsekretion bei 15 mM Glucose im Vergleich zu 3 mM auf. 10 μ M Oltipraz oder 30 μ M TBHQ hatten keinen Einfluss (n.s.) auf die Sekretion.

Das SOD-Mimetikum TEMPOL wurde in einer Konzentration von 1 mM unter zwei verschiedenen Inkubationsbedingungen eingesetzt. Bei der ersten Variante wurden die Inseln lediglich unmittelbar vor der Steady-state-Inkubation 15 min lang mit 1 mM TEMPOL versetzt. So konnte der Radikalfänger in den Inselzellen akkumulieren und extrazelluläre Effekte während der Inkubation mit 3-NPA wurden damit ausgeschlossen. Die zweite Variante sah die gleichzeitige Gabe von TEMPOL und 3-NPA während der Steady-state-Inkubation vor. In Abb. 3.10 und Tab. 3.10 ist dargestellt, dass keine der beiden Inkubationsvarianten den hemmenden Effekt von 1 mM 3-NPA auf die Insulinsekretion verhindern konnte.

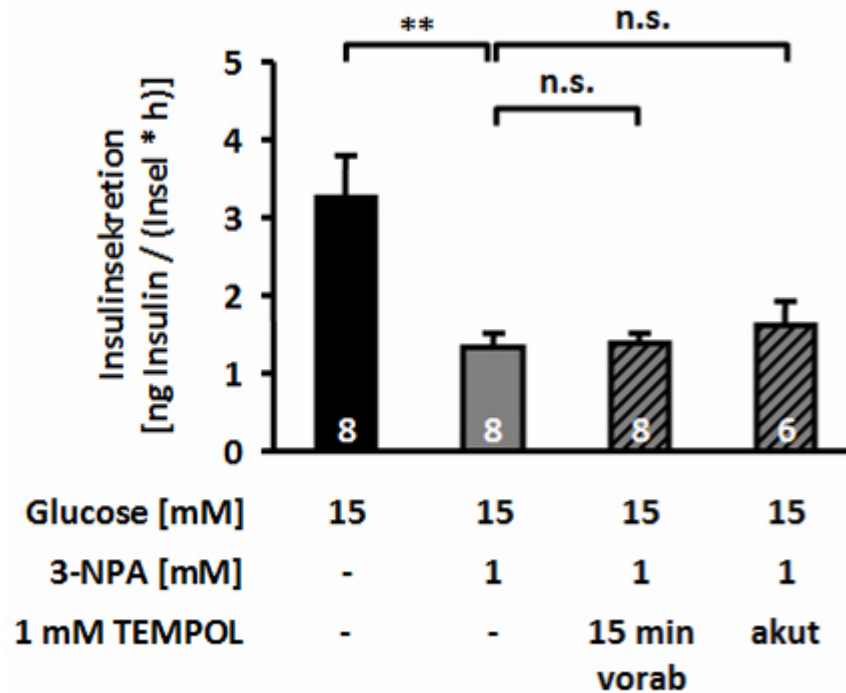


Abb. 3.10 - Einfluss von 1 mM TEMPOL (15 min vorab oder akut) auf die Insulinsekretion bei Anwesenheit von 15 mM Glucose mit und ohne 1 mM 3-NPA

G3	G15		G15 + 1 mM 3-NPA	
0,2 ± 0,04 n=8	3,2 ± 0,6 n=8		1,3 ± 0,2 n=8	
	+ 1 mM TEMPOL 15 min vorab	+ 1 mM TEMPOL akut	+ 1 mM TEMPOL 15 min vorab	+ 1 mM TEMPOL akut
	3,4 ± 0,9 n=7	3,7 ± 0,9 n=6	1,4 ± 0,1 n=8	1,6 ± 0,3 n=6

Tab 3.10 - [ng Insulin/(Insel*h)] - Die Insulinsekretion von Inseln, die in 15 mM Glucoselösung inkubiert wurden, war im Vergleich zu Inseln in 3 mM Glucoselösung signifikant ($p \leq 0,001$) erhöht. TEMPOL beeinflusste in keiner Inkubations-bedingung die Insulinsekretion signifikant (n.s.)

In einer weiteren experimentellen Serie wurde mit einem ähnlichen Derivat (Mito-TEMPO) versucht, erhöhte ROS-Konzentrationen in den Mitochondrien gezielt zu senken. Dazu wurden zwei verschiedene Konzentrationen von Mito-TEMPO getestet (10 und 100 μM) und akut zu Steady-state-Inkubationen mit 1 mM 3-NPA gegeben. Auch die Nachahmung der mitochondrialen Form der Superoxiddismutase konnte die Insulinsekretion in Anwesenheit der Komplex-II-Hemmung nicht verbessern, sondern verringerte in hoher Konzentration (100 μM) die Insulinsekretion sogar signifikant (Tab. 3.11).

G3	G15		G15 + 1 mM 3-NPA	
0,1 ± 0,03	1,5 ± 0,3		0,6 ± 0,1	
	+ 10 µM Mito-TEMPO	+ 100 µM Mito-TEMPO	+ 10 µM Mito-TEMPO	+ 100 µM Mito-TEMPO
	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,3	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,1

Tab. 3.11 - [ng Insulin/(Insel*h)] - n=7 - Die Versuche wiesen eine signifikante ($p \leq 0,001$) Stimulation der Insulinsekretion bei 15 mM Glucose im Vergleich zu 3 mM in einstündigen Steady-state-Inkubationen auf. 100 µM Mito-TEMPO verringerte die Insulinsekretion signifikant ($p \leq 0,05$). 1 mM 3-NPA in An- und Abwesenheit von 10 oder 100 µM Mito-TEMPO führten zu einer signifikanten Hemmung ($p \leq 0,001$) der Insulinsekretion

3.1.4 Beeinflussung der intrazellulären ROS-Akkumulation durch 3-NPA

Die oben aufgezeigten Ergebnisse legen dar, dass die Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmungsketten durch 3-NPA gravierende Einflüsse auf die Insulinsekretion hat. Nur die gleichzeitige Anwesenheit von Gliclazid und 3-NPA konnte die Sekretionshemmung in den Steady-state-Inkubationen verhindern. Da die Hemmung der Insulinsekretion auch durch Aktivatoren und Mimetika zellulärer Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress nicht verhindert werden konnte, scheint die Hypothese, dass die Komplex-II-Hemmung zur gesteigerten Bildung von ROS führt, für *beta*-Zellen nicht zuzutreffen.

Deshalb war der nächste Schritt, zu untersuchen, wie sich die Inkubation mit 1 mM 3-NPA auf die intrazellulären ROS-Konzentrationen von glucosestimulierten (15 mM) Inselzellclustern auswirkt. Dazu wurden ROS-Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCDHF-DA durchgeführt (s. Kap. 2.3.2.4). Zunächst wurden Kontrollexperimente durchgeführt, die zeigten, dass nach einer Stunde Inkubation in Lösung mit einer Glucosekonzentration von 15 mM im Gegensatz zu 0,5 mM Glucoselösung ein deutlicher Anstieg der intrazellulären ROS-Konzentration auftrat (G0,5: 198 ± 11 , n=71; G15: 483 ± 25 a.u., n=105, $p \leq 0,001$). Dieser Anstieg wurde durch das Reduktionsmittel Dithioerythritol (DTE) vollständig verhindert (G15 + 5 mM DTE: 126 ± 16 a.u., n=26, zu G15 $p \leq 0,001$) (Abb. 3.11).

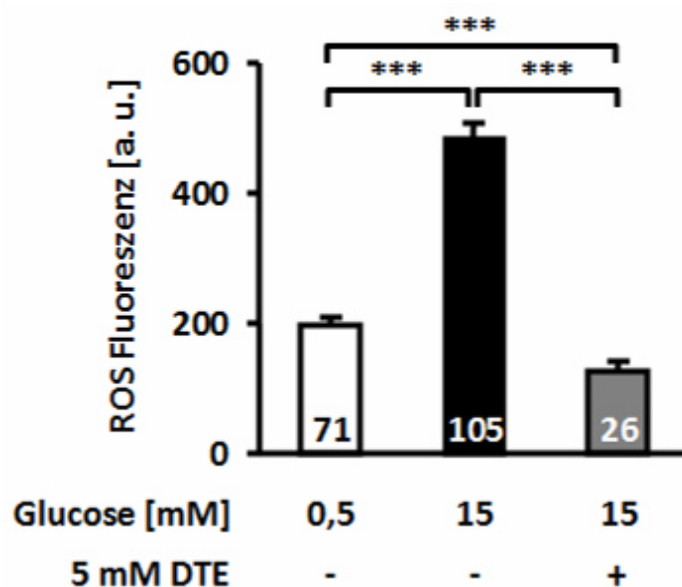


Abb. 3.11 - Einfluss von 0,5 und 15 mM Glucose sowie 5 mM DTE (1 h) auf die intrazelluläre ROS-Akkumulation - Das Diagramm zeigt die absoluten ROS-Fluoreszenzwerte in a.u. von Inselzellclustern, die 1 h vor der Messung mit 0,5 mM oder 15 mM mit und ohne 5 mM DTE inkubiert wurden.

Für die Versuche in denen die Beeinflussung der ROS-Bildung durch 3-NPA untersucht werden sollte, wurden neben einstündigen auch kurze Inkubationen (15 min gleichzeitig mit der DCDHF-DA-Inkubation) durchgeführt, um auch kurzfristige und vorübergehende Effekte auf die ROS-Konzentrationen erfassen zu können. Abb. 3.12 illustriert, dass 1 mM 3-NPA akut (15 min) zu keiner ROS-Akkumulation führt. Nach einer Stunde wurde die intrazelluläre ROS-Konzentration durch 3-NPA sogar signifikant gesenkt.

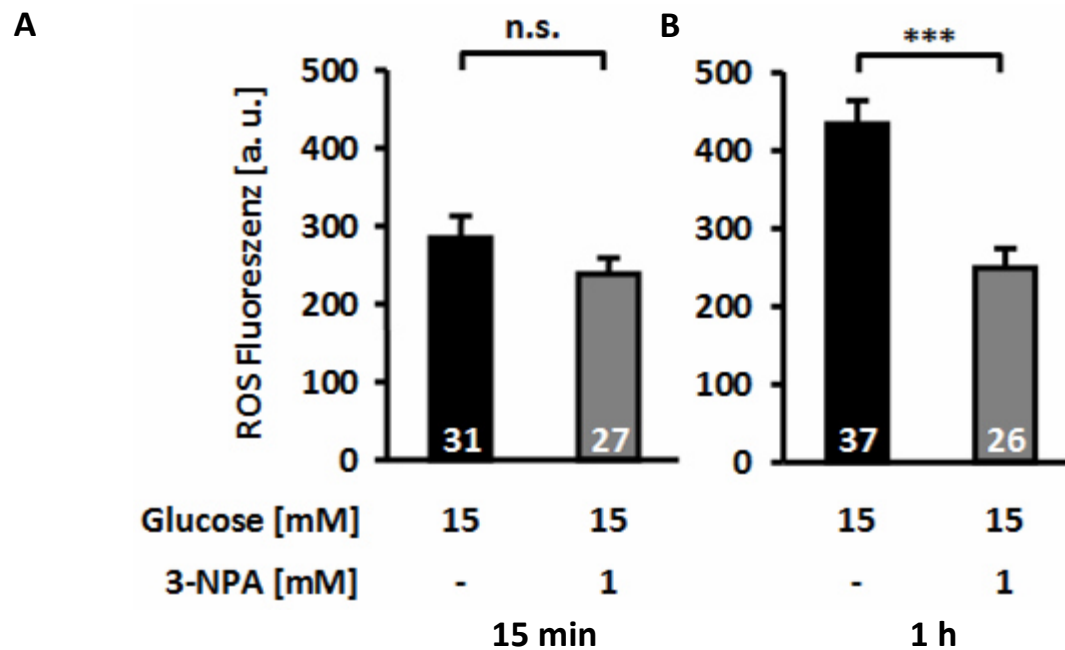


Abb. 3.12 - Beeinflussung der ROS-Konzentrationen nach kurzer Inkubation (15 min) (A) und einstündiger Inkubation (B) von Inselzellclustern in Badlösungen (15 mM Glucose) mit und ohne 1 mM 3-NPA - Inselzellcluster wurden für 1 h (B) in 15 mM Glucoselösungen mit und ohne 1 mM 3-NPA inkubiert und anschließend 15 min mit dem ROS-Fluoreszenzfarbstoff DCDHF-DA in den jeweiligen Badlösungen inkubiert. Bei den akuten Inkubationen (A) wurden Inselzellcluster für 15 min in 15 mM Glucoselösung gleichzeitig mit 1 mM 3-NPA und DCDHF-DA inkubiert.

G15 [a.u.] (15 min)	+ 1 mM 3-NPA [a.u.] (15 min)	G15 [a.u.] (1 h)	+ 1 mM 3-NPA [a.u.] (1 h)
285 ± 27 n=31	238 ± 21 n=27	434 ± 31 n=37	248 ± 26 n=26

Tab. 3.12 - Fluoreszenzwerte der ROS-Messungen, die in Abb. 3.12. dargestellt sind

Zusammenfassung

1 mM 3-NPA führte zu einer deutlichen Einschränkung der *beta*-Zellfunktion auf Ebene der Insulinsekretion. Die hier erhobenen Daten zeigten erstmals, dass antioxidative Schutzmechanismen wie die Vorinkubation mit Gliclazid oder die Nachahmung und Aktivierung der enzymatischen Abwehr von oxidativem Stress durch TEMPOL, Mito-TEMPO, Olitpraz und TBHQ nicht zum Sekretionserhalt führen.

In den Mitochondrien hemmte 3-NPA spezifisch und irreversibel die Succinat-Dehydrogenaseaktivität des Atmungskettenkomplex II und bewirkte damit eine Aufstauung von FAD, während die NAD(P)H-Menge bei diesen Versuchsbedingungen unverändert blieb. Die Verringerung von $\Delta\Psi$ bei akuter Gabe oder Vorinkubation mit 3-NPA konnte als Maß für die mitochondriale ATP-Syntheseleistung herangezogen werden, die durch eine Komplex-II-Hemmung vermindert war. 3-NPA führte in *beta*-Zellen zu keinem Anstieg intrazellulärer ROS, sondern hemmte sogar die glucoseinduzierte ROS-Akkumulation.

3.2 Untersuchung von Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress

Da *beta*-Zellen mit ihrer geringen antioxidativen Kapazität besonders empfindlich gegenüber vermehrten reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies sind, sollten im Folgenden verschiedene Schutzmechanismen untersucht werden. Hierfür wurde oxidativer Stress zum einen mit den klassischen ROS- und RNS-Donatoren Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und S-Nitrosocystein (SNOC) erzeugt und zum anderen eine Zellkultur unter glucolipotoxischen Bedingungen etabliert, die durch ein Nährstoffüberangebot den mitochondrialen Metabolismus der *beta*-Zellen überproportional steigert und damit beeinträchtigen soll.

3.2.1 Schutz der *beta*-Zellfunktion vor H_2O_2

H_2O_2 ist ein Bestandteil von endogen gebildeten ROS. Unsere Arbeitsgruppe hat im Hinblick auf Veränderungen des *beta*-Zellmetabolismus unter dem Einfluss von H_2O_2 eine große experimentelle Erfahrung. So konnten einige Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die genetische Ausschaltung des K_{ATP} -Kanals (*SUR1-KO*) in murinen *beta*-Zellen die Empfindlichkeit der Insulinsekretion gegenüber verschiedenen Konzentrationen von H_2O_2 herabsetzt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte getestet werden, ob die pharmakologische Inhibition des K_{ATP} -Kanals in *beta*-Zellen von Wildtypmäusen ähnliche protektive Effekte auf die Sekretionsleistung bewirkt.

Um die Aktivität der antioxidativen Enzyme zu erhöhen, wurden Inseln über Nacht mit 10 μM Gliclazid vorinkubiert und am nächsten Tag in einer einstündigen Steady-state-Inkubation 100 μM H_2O_2 ausgesetzt. Auch während der Steady-state-Inkubation wurde Gliclazid gegeben, um die Hochregulation der antioxidativen Enzyme aufrecht zu erhalten. Diese Inkubationsbedingung hatte per se keinen Einfluss auf die Insulinsekretion (s. Kap. 3.3.1). Unabhängig von der Gliclazid-Behandlung zeigte sich bei allen Inseln in 15 mM Glucoselösung, dass die einstündige Inkubation mit H_2O_2 zu einer signifikanten Hemmung der Insulinsekretion führte (Abb. 3.13).

Bei präparierten Inseln von Mäusen, die zwei Wochen lang täglich Gliclazid (3,3 bzw. 10 mg/kg KG) peroral erhalten hatten, konnten ebenso keine Vorteile im Hinblick auf die Hemmung der Insulinsekretion durch 100 μM H_2O_2 beobachtet werden (Tab. 3.14).

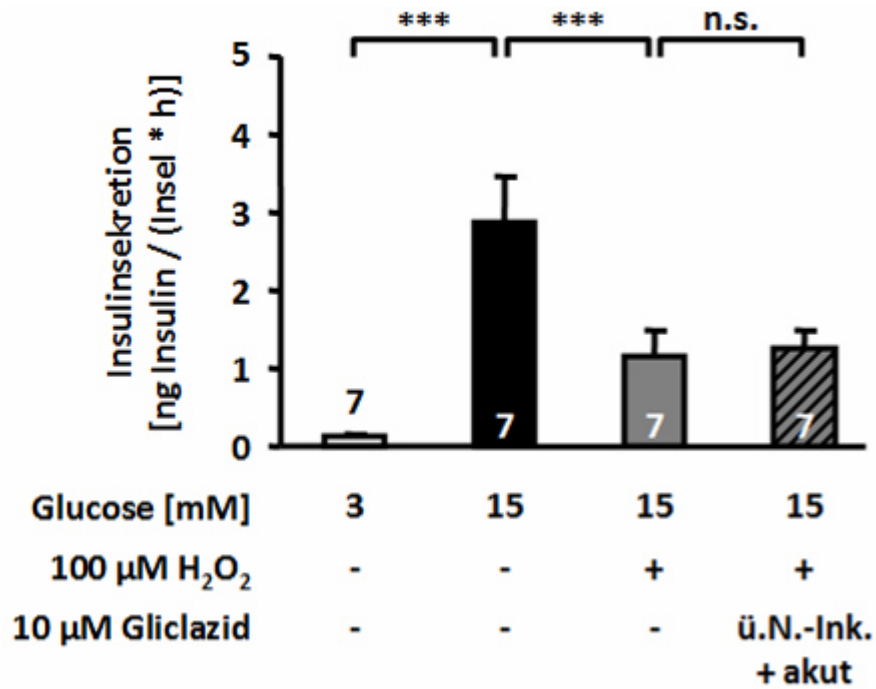


Abb. 3.13 - Einfluss von 100 μM H₂O₂ auf die Insulinsekretion unter Kontrollbedingungen (ohne Gliclazid) und bei Inseln, die mit 10 μM Gliclazid über Nacht und während der einstündigen Steady-state-Inkubation inkubiert wurden - Als Stimulationskontrolle diente der Vergleich der Insulinsekretionen von Inseln, die in einer Badlösung mit 15 mM Glucosekonzentration inkubiert waren, mit Inseln in einer 3 mM Glucoselösung.

G3 [ng Insulin/(Insel*h)]	G15 [ng Insulin/(Insel*h)]	+ 100 μM H ₂ O ₂ [ng Insulin/(Insel*h)]	+ 100 μM H ₂ O ₂ (10 μM Gliclazid) [ng Insulin/(Insel*h)]	Gliclazid- Inkubation	n
0,1 ± 0,02	2,9 ± 0,6	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,2	ü.N. + akut	7

Tab. 3.13 - Messwerte der Insulinsekretionsmessungen mit Inseln aus Zellkulturmedium, die entweder mit Gliclazid inkubiert oder unbehandelt waren, in Badlösungen verschiedener Glucosekonzentrationen (3 und 15 mM) und der An- und Abwesenheit von 100 μM H₂O₂. - Statistik in Abb. 3.13

G3 (Vehikel-Lsg.) [ng Insulin/(Insel*h)]	G15 (Vehikel-Lsg.) [ng Insulin/(Insel*h)]	+ 100 μM H₂O₂ (Vehikel-Lsg.) [ng Insulin/(Insel*h)]	n
0,2 \pm 0,03	3,3 \pm 0,7	0,8 \pm 0,3	4
G3 (3,3 mg/kg KG) [ng Insulin/(Insel*h)]	G15 (3,3 mg/kg KG) [ng Insulin/(Insel*h)]	+ 100 μM H₂O₂ (3,3 mg/kg KG) [ng Insulin/(Insel*h)]	n
0,2 \pm 0,04	3,0 \pm 1,1	0,5 \pm 0,1	3
G3 (10 mg/kg KG) [ng Insulin/(Insel*h)]	G15 (10 mg/kg KG) [ng Insulin/(Insel*h)]	+ 100 μM H₂O₂ (10 mg/kg KG) [ng Insulin/(Insel*h)]	n
0,04 \pm 0,01	2,7 \pm 0,1	0,4 \pm 0,2	2

Tab. 3.14 - Alle Versuche (außer diejenigen mit Inseln aus Mäusen mit zweiwöchiger Gliclazid-Gabe in einer Tagesdosis von 3,3 mg/kg KG) wiesen nach einstündiger Steady-state-Inkubation eine signifikante ($p \leq 0,01$) Stimulation der Insulinsekretion bei 15 mM Glucose im Vergleich zu 3 mM auf. 100 μ M H₂O₂ führte in den Versuchen mit Inseln aus Mäusen, die zwei Wochen lang Vehikel-Lösung bzw. 10 mg/kg KG Gliclazid erhalten hatten, zu einer signifikanten ($p \leq 0,01$) Hemmung. Statistisch nicht sichern (n.s.) ließ sich der Effekt von 1 mM 3-NPA auf die Insulinsekretion von Inseln aus Mäusen, die 3,3 mg/kg KG Gliclazid erhalten hatten. Dies lässt sich auf die hohe Standardabweichung bei 15 mM Glucose zurückführen.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Genaktivierung der antioxidativen Enzyme mit Oltipraz und TBHQ die Insulinsekretion vor dem Einfluss von H₂O₂ schützt. Hierzu wurden Inseln im Zellkulturmedium über Nacht und während der Steady-state-Inkubation am darauffolgenden Tag in An- und Abwesenheit eines Nrf2-Aktivators (10 μ M Oltipraz oder 30 μ M TBHQ) inkubiert. Es wurden Kontrollen angefertigt, um zu testen, ob die Inseln stimulierbar waren (Insulinsekretion bei 3 mM im Vergleich zu 15 mM Glucose) und ob die Nrf2-Aktivatoren keine Eigeneffekte verursachten (Tab. 3.15).

Wie Abb. 3.14 zeigt, waren die Inseln, die mit Oltipraz kultiviert wurden, vor der H₂O₂-induzierten Hemmung geschützt (Abb. 3.14 A), wohingegen die Inkubation mit TBHQ den Effekt von 100 μ M H₂O₂ nicht verhindern konnte (Abb. 3.14 B).

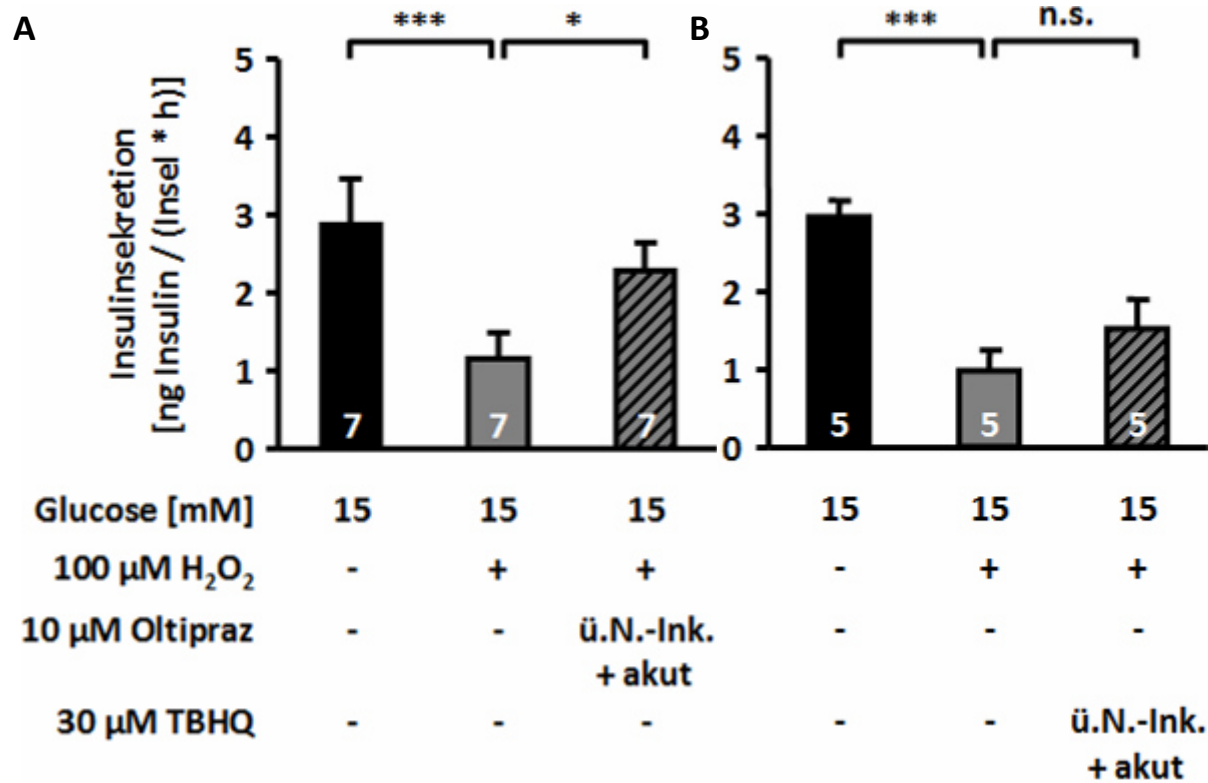


Abb. 3.14- Einfluss von 100 µM H₂O₂ auf die glucosestimulierte Insulinsekretion von Inseln in An- und Abwesenheit eines Nrf2-Aktivators (10 µM Oltipraz oder 30 µM TBHQ über Nacht und während der einstündigen H₂O₂-Gabe) - Die langfristige Inkubation mit Oltipraz führte zu einem Schutz der Insulinsekretion von Inseln gegenüber 100 µM H₂O₂ (A). 30 µM TBHQ hatten keinen protektiven Effekt auf die Sekretion unter denselben Bedingungen (B).

G3 [ng Insulin/(Insel*h)]	G15 [ng Insulin/(Insel*h)]	+ 100 µM H ₂ O ₂ [ng Insulin/(Insel*h)]	G15 (Olti. / TBHQ) [ng Insulin/(Insel*h)]	+ 100 µM H ₂ O ₂ (Olti. / TBHQ) [ng Insulin/(Insel*h)]	n
0,1 ± 0,02	2,9 ± 0,6	1,2 ± 0,3	2,9 ± 0,5 (Olti.)	2,3 ± 0,4 (Olti.)	7
0,2 ± 0,1	2,8 ± 0,2	0,9 ± 0,2	2,3 ± 0,3 (TBHQ)	1,4 ± 0,4 (TBHQ)	5

Tab. 3.15 - Insulinsekretionsmesswerte von Inseln, die sowohl über Nacht als auch während der einstündigen Steady-state-Inkubation mit bzw. ohne einen Nrf2-Aktivator (10 µM Oltipraz oder 30 µM TBHQ) inkubiert waren. Der Vergleich der Sekretion unter 3 mM Glucose oder 15 mM Glucose diente als Stimulationskontrolle, die in beiden Versuchsserien signifikant ausfiel ($p \leq 0,001$). Weder 10 µM Oltipraz noch 30 µM TBHQ hatten einen Einfluss auf die Insulinsekretion bei Inseln in Badlösung mit 15 mM Glucosekonzentration. - Weitere Statistik in Abb. 3.14

Da die Inkubation mit H₂O₂ die intrazelluläre Bildung weiterer teilweise aggressiverer ROS-Formen (z.B. Hydroxylradikale) verursachen kann, sollte untersucht werden, inwiefern ein SOD-Mimetikum die Sekretionsleistung unter diesen Bedingungen beeinflusst. Hierzu wurden die Inseln unmittelbar vor der Steady-state-Inkubation 15 min lang in Anwesenheit

von 1 mM TEMPOL vorinkubiert. Damit extrazelluläre Wechselwirkungen zwischen TEMPOL und H_2O_2 ausgeschlossen wurden, war während der daran anschließenden Sekretionsmessung in Gegenwart von 100 μM H_2O_2 TEMPOL nicht mehr anwesend. Es zeigte sich, dass die Vorinkubation mit TEMPOL die Hemmung der glucosestimulierten Insulinsekretion durch 100 μM H_2O_2 verhinderte (Abb. 3.15).

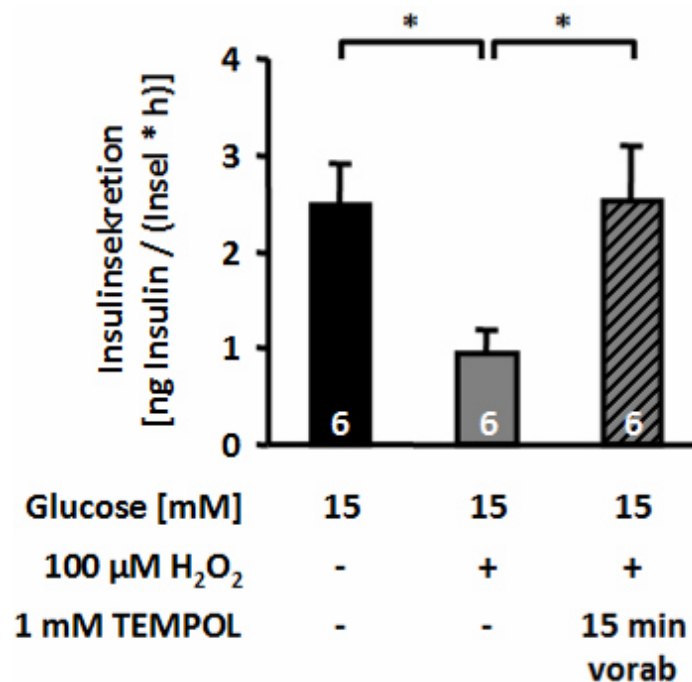


Abb. 3.15- Einfluss von 100 μM H_2O_2 auf die Insulinsekretion unter Kontrollbedingungen (15 mM Glucose) und bei Inseln, die mit 1 mM TEMPOL für 15 min vor der H_2O_2 -Gabe vorinkubiert wurden

G3 [ng Insulin/(Insel*h)]	G15 [ng Insulin/(Insel*h)]	+ 100 μM H_2O_2 [ng Insulin/(Insel*h)]	+ 100 μM H_2O_2 (1 mM TEMPOL) [ng Insulin/(Insel*h)]	TEMPOL- Inkubation	n
0,3 ± 0,1	2,5 ± 0,4	0,9 ± 0,3	2,5 ± 0,6	15 min vorab	6

Tab 3.16 - Messwerte der Insulinsekretionsexperimente zu Abb. 3.15 - Als Stimulationskontrolle diente der Vergleich der Sekretionswerte bei Inseln in einer Badlösung mit 3 mM Glucose mit denen von Inseln in einer 15 mM Glucoselösung, welcher sich als statistisch signifikant ($p \leq 0,01$) herausstellte.

3.2.1.1 Effekt von H_2O_2 und TEMPOL auf FAD und NAD(P)H

Weiterhin wurde untersucht, ob TEMPOL auch den mitochondrialen Metabolismus der *beta*-Zellen vor H_2O_2 schützt. Bei Messungen der Autofluoreszenzen von FAD bzw. NAD(P)H konnten nämlich akute Effekte von 100 μM H_2O_2 beobachtet werden (Abb 3.16). Bei jedem Experiment wurde durch einen Wechsel zwischen Badlösungen mit einer Glucosekonzentration von 0,5 und einer mit 15 mM getestet, ob die Inselzellcluster metabolisch

intakt waren. Eine erhöhte Glucosekonzentration (15 mM) führte zu einer Abnahme des FAD-Fluoreszenzsignals um $-96,2 \pm 7,1$ a.u. ($n=10$), da durch den gesteigerten Zellmetabolismus mehr FADH_2 gebildet wird. Die Menge an NAD(P)H nahm um $45,6 \pm 4,5$ a.u. ($n=10$) zu. $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ließen FAD ansteigen (Abb. 3.16 A und Tab. 3.17), das in Analogie zu den 3-NPA-Versuchen (s. Kap. 3.1.1) auf eine Hemmung des Komplex II hinweisen kann. Das NAD(P)H-Signal wurde durch $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ auf ein ähnliches Niveau wie unter dem Einfluss von $0,5$ mM Glucose gesenkt (Abb. 3.16 B und Tab. 3.17).

Die beobachteten H_2O_2 -Effekte im FAD- und NAD(P)H-Fluoreszenzsignal waren durch den Wechsel auf 15 mM Glucose vollständig reversibel. In allen Experimenten (repräsentative Aufnahmen in Abb. 3.16) ist der allmähliche Intensitätsverlust durch das Ausbleichen der Autofluoreszenz verursacht.

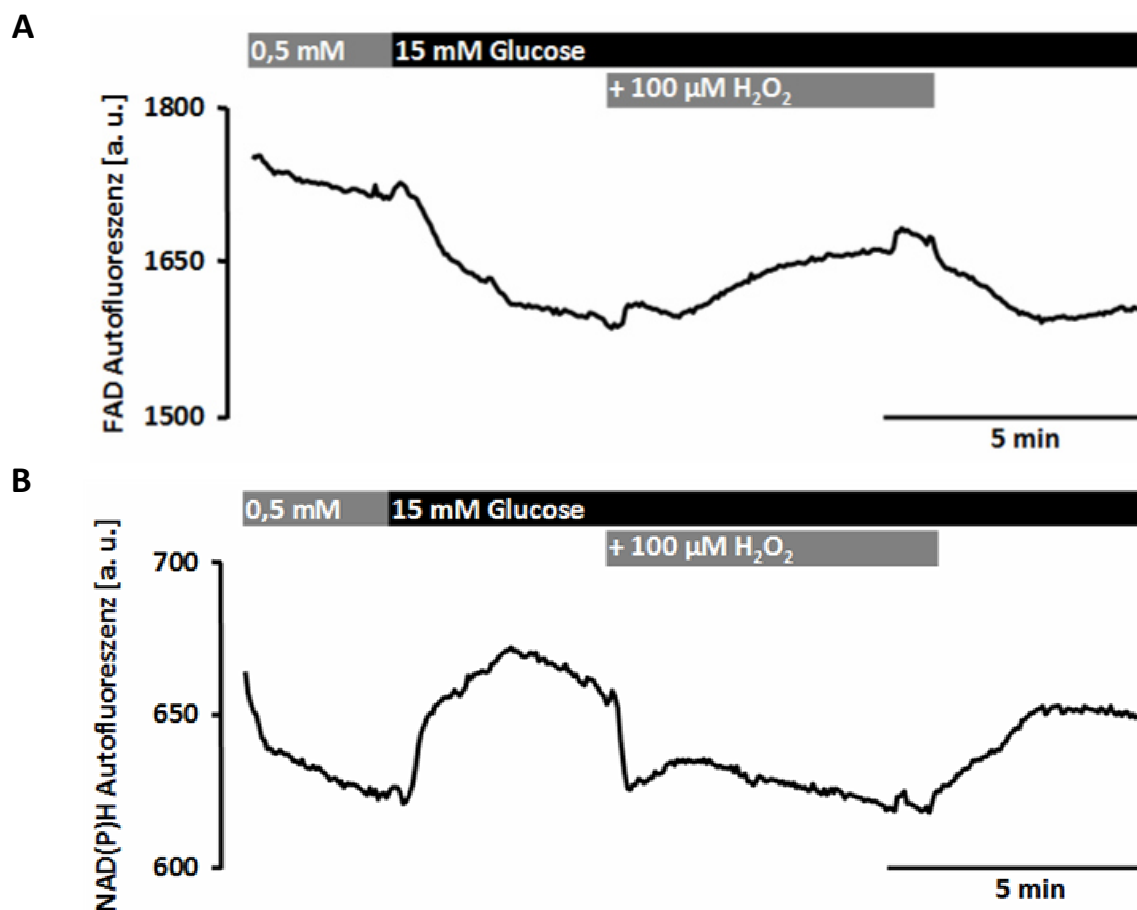


Abb. 3.16- Einfluss von Badlösungen mit $0,5$ und 15 mM Glucosekonzentration sowie $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ auf das Autofluoreszenzsignal von FAD (A) bzw. NAD(P)H (B) – Repräsentative Aufnahmen aus zehn Experimenten

In Analogie zu den Sekretionsversuchen sollte der Einfluss einer 15 minütigen Vorinkubation von 1 mM TEMPOL auf die H_2O_2 -induzierten Veränderungen des FAD- bzw. NAD(P)H-Signals untersucht werden. Der Anstieg des FAD-Signals durch $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ war auch nach der

TEMPOL-Vorinkubation gleich ausgeprägt. Die Abnahme der NAD(P)H-Konzentration durch H_2O_2 war hingegen signifikant vermindert (Abb. 3.17). Darüber hinaus zeigten diese Versuchsserien, dass TEMPOL den Einfluss von 15 mM Glucose auf FAD verändert: Die FAD-Fluoreszenzabnahme beim Wechsel von einer Badlösung mit 0,5 auf eine mit 15 mM Glucose war nach TEMPOL-Vorinkubation signifikant vermindert ($n=9$, $p \leq 0,001$) (Tab. 3.17).

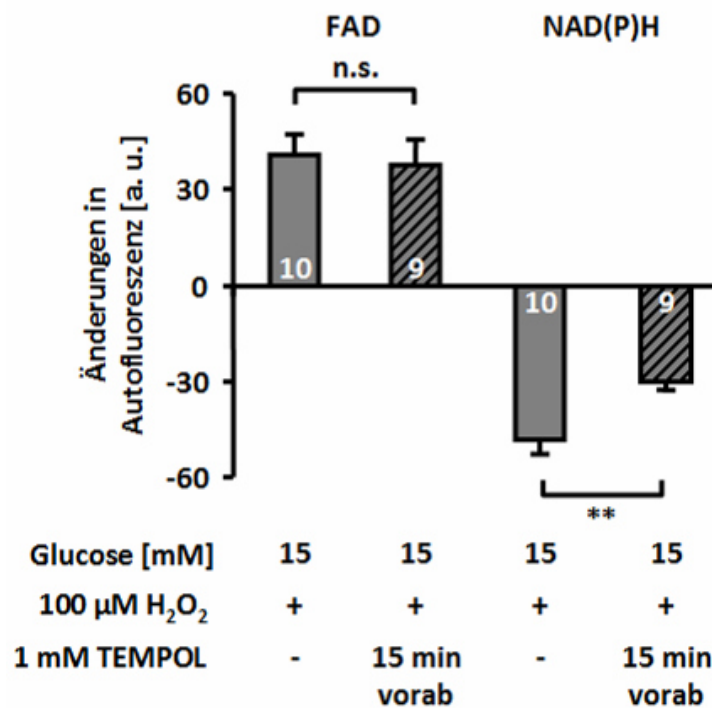


Abb. 3.17 - Einfluss von 100 μ M H_2O_2 auf die FAD- bzw. NAD(P)H-Autofluoreszenzsignale bei Inselzellclustern, die entweder unbehandelt oder mit 1 mM TEMPOL 15 min vorinkubiert waren - Dargestellt sind die Änderungen der Autofluoreszenz von FAD (links) und NADPH (rechts) bei unbehandelten (graue Balken) und mit TEMPOL vorinkubierte Inselzellclustern (grau-schwarz schraffierte Balken)

	G0,5 [a.u.]	G15 [a.u.]	+ 100 μ M H_2O_2 [a.u.]	H_2O_2 -Diff. [a.u.]	n
FAD	1530 \pm 49	1434 \pm 43	1474 \pm 47	41 \pm 7	10
NAD(P)H	550 \pm 21	595 \pm 23	547 \pm 21	-48 \pm 5	10
	G0,5 (1 mM TEMPOL) [a.u.]	G15 (1 mM TEMPOL) [a.u.]	+ 100 μ M H_2O_2 (1 mM TEMPOL) [a.u.]	H_2O_2 -Diff. (1 mM TEMPOL) [a.u.]	n
FAD	1463 \pm 34	1406 \pm 34	1444 \pm 34	38 \pm 8	9
NAD(P)H	561 \pm 20	599 \pm 23	569 \pm 22	-30 \pm 3	9

Tab. 3.17 – Die Messwerte der Autofluoreszenzsignale (Abb. 3.17) wiesen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,001$) beim Wechsel der Bedingungen auf. Es wurden die Signaländerungen (Diff.) 5 min nach H_2O_2 -Zugabe ermittelt.

3.2.2 Schutz der Insulinsekretion vor SNOC

Der schädliche Einfluss des aus S-Nitrosocystein (SNOC) freigesetzten Stickstoffmonoxid-Radikals ($\text{NO}\cdot$) auf die *beta*-Zelle wurde anhand des mitochondrialen Metabolismus, der ATP-Produktion und Apoptose bereits in verschiedenen Arbeiten experimentell nachgewiesen (Krippeit-Drews et al. 1995, Drews et al. 2000b, Gier et al. 2009). Die Apoptoserate von SUR1-KO-Inseldellen war unter 100 μM SNOC im Gegensatz zu WT-Inseldellen nicht erhöht (Gier et al. 2009). Ob die langfristige Inkubation mit Gliclazid auch in WT-Inseln zu einem Schutz der Insulinsekretion vor reaktiver Stickstoffspezies führt, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Sowohl bei unbehandelten als auch bei Inseln, die über Nacht und akut mit Gliclazid inkubiert waren, führte SNOC konzentrationsabhängig und ähnlich ausgeprägt zu einer Hemmung der Sekretion. In Abbildung 3.18 ist die Auswirkung von SNOC auf die Insulinsekretion von unbehandelten und mit Gliclazid-inkubierten Inseln in Form zweier Kurven dargestellt, die fast deckungsgleich verlaufen.

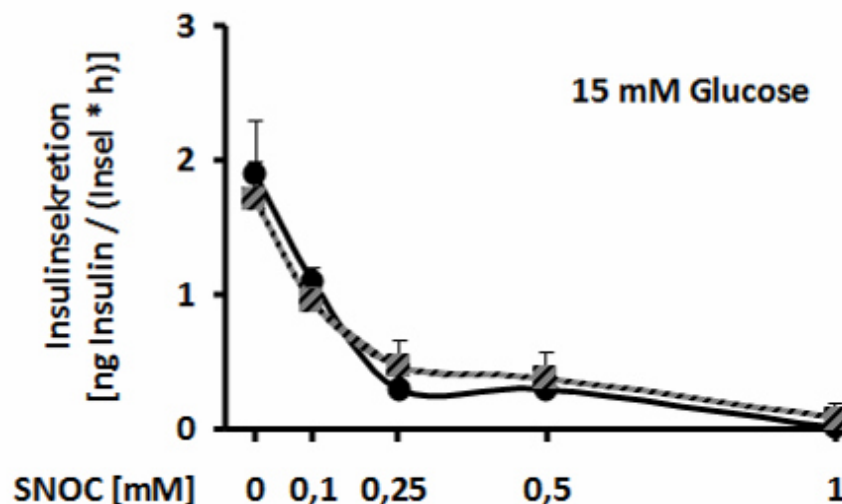


Abb. 3.18 - Einfluss verschiedener Konzentrationen von SNOC (0,1 - 1 mM, 1 h Steady-state-Inkubation in Badlösungen mit 15 mM Glucose) auf die Insulinsekretion von Inseln, die entweder unbehandelt (kreisförmige schwarze Datenpunkte) oder mit Gliclazid inkubiert waren (über Nacht und akut, rechteckige schwarz-grau schraffierte Datenpunkte) - n=3-10 - Die konzentrationsabhängigen Sekretionshemmungen durch SNOC sind als Kurven dargestellt und unterscheiden sich statistisch nicht voneinander. Die Messwerte wurden aus 3-10 unabhängigen Präparationen erhoben.

G3	G15			
0,1 ± 0,02 n=10	1,9 ± 0,4 n=10			
	+ 0,1 SNOC	+ 0,25 mM SNOC	+ 0,5 mM SNOC	+ 1 mM SNOC
	1,1 ± 0,1 n=3	0,3 ± 0,1 n=7	0,3 ± 0,1 n=7	0,01 ± 0,02 n=3
	+ 0,1 mM SNOC (10 µM Gliclazid)	+ 0,25 mM SNOC (10 µM Gliclazid)	+ 0,5 mM SNOC (10 µM Gliclazid)	+ 1 mM SNOC (10 µM Gliclazid)
	1,0 ± 0,1 n=3	0,5 ± 0,2 n=7	0,4 ± 0,2 n=7	0,1 ± 0,1 n=3

Tab. 3.18 - [ng Insulin/(Insel*h)] - Messwerte der Insulinsekretionsexperimente zu Abb. 3.18 - Als Stimulationskontrolle diente der Vergleich der Sekretionswerte bei Inseln in einer Badlösung mit 3 mM Glucose mit denen von Inseln in einer 15 mM Glucoselösung, welcher sich als statistisch signifikant ($p \leq 0,001$) herausstellte. Die Insulinsekretion von Inseln, die über Nacht und akut mit 10 µM Gliclazid inkubiert waren, war mit $1,8 \pm 0,3$ ng Insulin/(Insel*h) nicht unterschiedlich (n.s.) zu der von unbehandelten Inseln. Beim Vergleich der Insulinsekretionen in Anwesenheit von verschiedenen SNOC-Konzentrationen zur Insulinsekretion bei 15 mM Glucose ohne SNOC zeigten sich bei Inseln, unabhängig ob mit Gliclazid inkubiert wurde oder nicht, bereits bei 0,1 mM SNOC eine signifikante ($p \leq 0,01$) Hemmung, die bei höheren SNOC-Konzentrationen stärker ausgeprägt war. Die konzentrationsabhängige Hemmung der Insulinsekretion unterschied sich zwischen Inseln, die mit Gliclazid inkubiert waren, und Inseln ohne Gliclazid-Inkubation nicht voneinander (n.s.).

Zusammenfassung

Die erhöhte Aktivität der antioxidativen Enzyme, welche durch die langfristige Inkubation mit Gliclazid induziert wird, konnte die *beta*-Zellfunktion unter Bedingungen erhöhter ROS- und RNS-Konzentrationen, welche experimentell durch 100 µM H₂O₂ bzw. 0,1 - 1 mM SNOC generiert wurden, nicht erhalten. Interessanterweise waren jedoch TEMPOL als SOD-Mimetikum und Oltipraz als Nrf2-Aktivator in der Lage, die Insulinsekretion unter H₂O₂ aufrechtzuerhalten. Für TBHQ, einem weiteren Vertreter der Nrf2-Aktivatoren, zeigte sich ebenfalls eine tendenzielle Verbesserung der *beta*-Zellfunktion. In weiteren Experimenten sollte daher überprüft werden, ob die Nrf2-Aktivierung die Insulinsekretion auch vor dem schädlichen Einfluss von SNOC schützen kann und ob sich diese protektiven Effekte auch auf die Viabilität von Inseln bei oxidativem Stress positiv auswirken.

H₂O₂ hatte einen ähnlichen Effekt auf die FAD-Autofluoreszenz wie 3-NPA, der auf eine Komplex-II-Hemmung hinweist. Außerdem verringerte es die Konzentration an NAD(P)H. Die Vorinkubation mit TEMPOL schwächte den Effekt von H₂O₂ auf die NAD(P)H-Autofluoreszenz ab, während der Einfluss auf FAD ähnlich stark ausgeprägt blieb.

3.2.3 Glucolipotoxizität

Eine Über- bzw. Fehlernährung führt zu erhöhter Zirkulation von Glucose und Fetten im Blut und damit bereits in einer prädiabetischen Phase sowie bei einem manifesten T2DM zu schädigenden Einflüssen auf die *beta*-Zellen. Der exzessive Glucosestoffwechsel sowohl im Zytosol als auch in den Mitochondrien verursacht neben der Umsetzung von Protonen und Sauerstoff zu Wasser auch die Bildung weiterer reaktiver (radikalischer) Sauerstoffspezies (Glucotoxizität) (s. Kap. 1.6.3.1). Fettsäuren werden intrazellulär spontan oder enzymatisch durch Lipidperoxidation ebenfalls zu Radikalen umgesetzt (s. Kap. 1.6.1) und haben darüber hinaus auch durch extrazelluläre Interaktionen mit Membranen und Rezeptoren Einfluss auf die Funktion und Viabilität von *beta*-Zellen (Lipotoxizität) (s. Kap. 1.6.3.2).

Um die Funktion von kultivierten *beta*-Zellen unter diesen Bedingungen zu testen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Zellkultur etabliert, bei der durch Erhöhung der Glucosekonzentration im Zellkulturmedium (25 mM statt 11 mM) und die Zugabe von Na-Palmitat (100 μ M, gebunden an 0,056 % fettsäurefreies BSA) über einen Zeitraum von bis zu drei Tagen ein sowohl gluco- als auch lipotoxisches Milieu geschaffen wurde.

Folgende Parameter wurden in Inseln bzw. Inselzellclustern überprüft:

- Morphologische Veränderungen von Inseln unter Gluco- und/oder Lipotoxizität: Auswertung der Inselfläche und -granularität
- Insulingehalt
- Insulinsekretion unter stimulierten (15 mM Glucose) und substimulatorischen (3 mM Glucose) Bedingungen
- Reaktion von $[Ca^{2+}]_c$ auf Änderung der Glucosekonzentration von 15 auf 0,5 mM
- Intrazelluläre ROS-Konzentrationen

Darüber hinaus sollte getestet werden, ob Gliclazid die *beta*-Zellfunktion vor dem schädlichen Einfluss einer glucolipotoxischen Zellkultur schützen kann. Hierfür wurden ein Teil der Inseln bzw. Inselzellcluster ab unmittelbar nach der Präparation im normalen Zellkulturmedium mit 10 μ M Gliclazid inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium aller Gliclazid-inkubierten sowie einiger unbehandelter Zellen durch ein Medium mit glucolipotoxischem Milieu (s.o.) ersetzt. Die Gliclazid-Inkubation wurde während den darauffolgenden Tagen beibehalten. Somit konnten die oben aufgeführten Parameter unter Kontrollbedingungen und unter glucolipotoxischen Bedingungen in An- und Abwesenheit von Gliclazid an den drei folgenden Tagen (1. - 3. Tag) überprüft werden.

3.2.3.1 Veränderung der Inselmorphologie durch Glucolipotoxizität

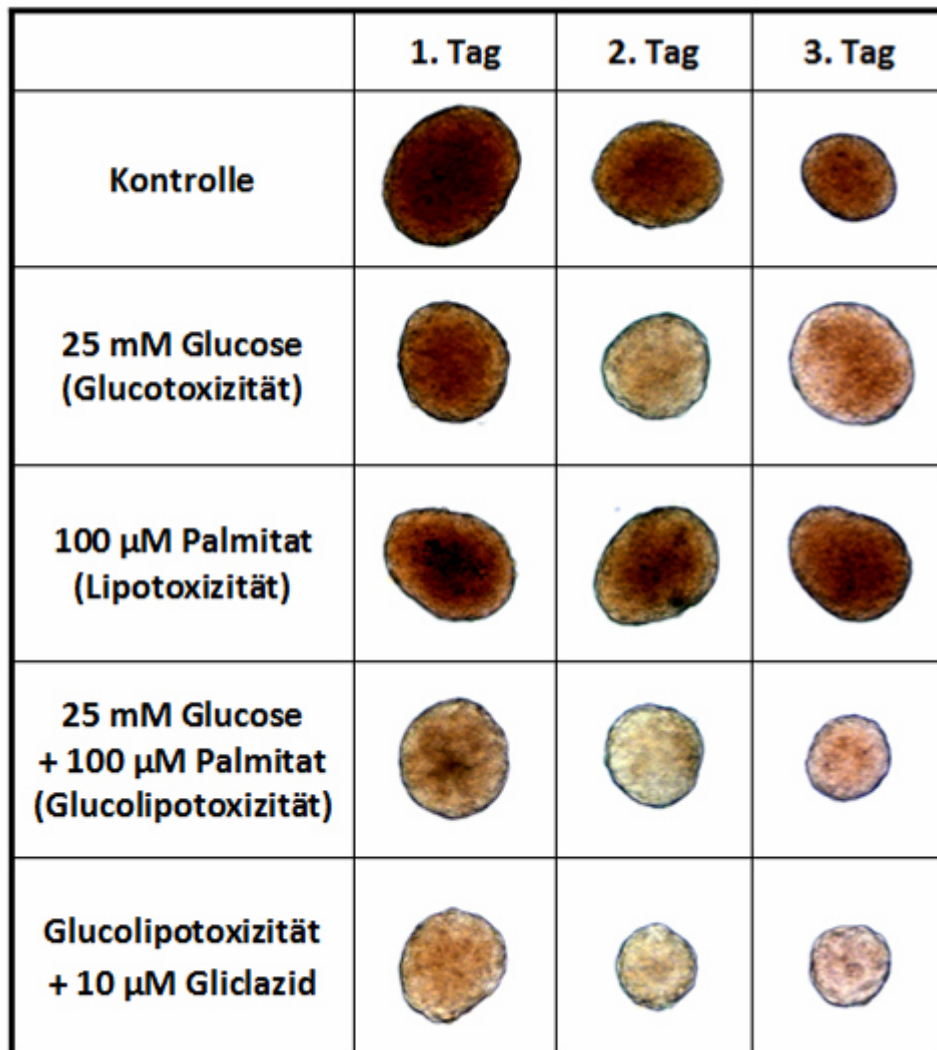


Abb. 3.19 – Veränderung der Morphologie von Inseln unter Bedingungen einer gluco- und/oder lipotoxischen Zellkultur (25 mM Glucose, 100 µM Palmitat gebunden an 0,056 % fettsäurefreiem BSA) über drei Tage - Inseln wurden unmittelbar nach der Präparation in Zellkulturmedium überführt (11 mM Glucose) und teilweise mit 10 µM Gliclazid versetzt. Am darauffolgenden Tag wurden alle mit Gliclazid-inkubierten Inseln in ein Medium mit glucolipotoxischem Milieu und Gliclazid überführt und die unbehandelten Inseln in Medien mit gluco-, lipo- oder glucolipotoxischen oder normalen Bedingungen (Kontrolle). - Repräsentative Aufnahmen von Inseln, die aufgrund ihrer Fläche und Granularität ungefähr dem jeweiligen Durchschnitt entsprechen.

Bereits am ersten Tag nach Überführen der Inseln in die entsprechenden Zellkulturmedien zeigten sich morphologische Unterschiede zwischen den Bedingungen. Inseln, die unter glucolipotoxischen Bedingungen kultiviert waren, hatten augenscheinlich ihre im Auflicht charakteristische weiße Färbung verloren. Die Mikroskopaufnahmen im Durchlicht (Abb. 3.19) wurden wie in Kapitel 2.4 angefertigt und machen die Unterschiede deutlich. Der Grad der weißen Färbung im Auflicht bzw. dunklen Färbung im Durchlicht wird im Folgenden als

„Granularität“ bezeichnet. Bei Abb. 3.19 handelt es sich um repräsentative Aufnahmen von Inseln, die aufgrund ihrer Fläche und Granularität ungefähr dem Mittelwert unter der jeweiligen Bedingung entsprechen.

Vergleicht man die ermittelten Werte für die durchschnittliche Inselgröße und -granularität des ersten und dritten Tages miteinander, so stellt man fest, dass Inseln im normalen Zellkulturmedium (Kontrolle) kleiner wurden und an dunkler Färbung im Durchlicht verloren (Abb. 3.20 A+B).

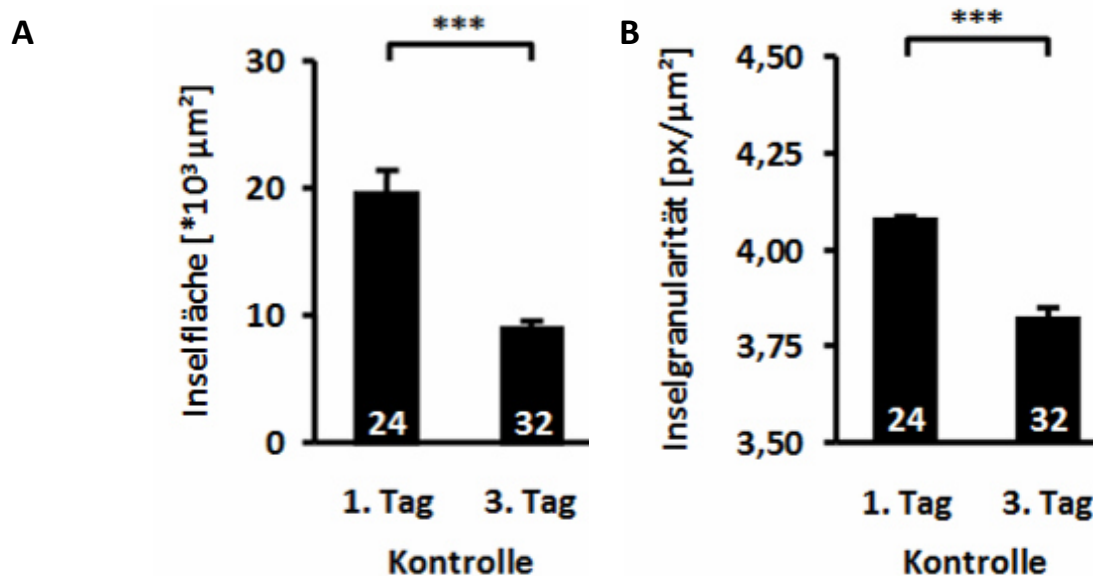


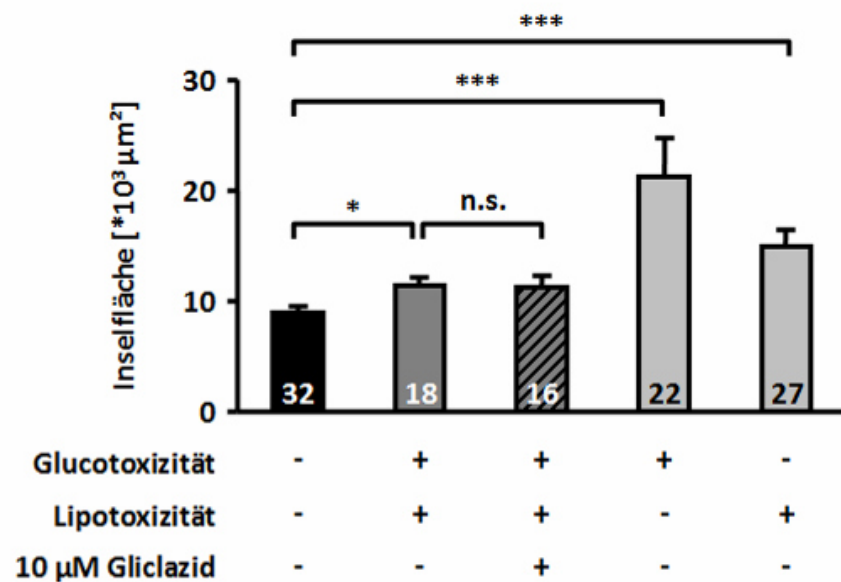
Abb. 3.20 - Einfluss von normalen Zellkulturbedingungen (Zellkulturmedium, 11 mM Glucose) auf die Inselfläche (A) und -granularität (B) am ersten und dritten Tag - Inseln aus drei Präparationen wurden gesammelt. Die Auswertung der Inselfläche und daran anschließend der Granularität wurde wie in Kap. 2.7.3 beschrieben durchgeführt.

Die Verringerung der Inselfläche über drei Tage trat auch unter glucolipotoxischen Bedingungen (25 mM Glucose, 100 μM Palmitat gebunden an 0,056 % fettsäurefreiem BSA) in An- und Abwesenheit von 10 μM Gliclazid auf. Bei Inseln, die entweder nur unter glucotoxischen oder lipotoxischen Bedingungen inkubiert waren, veränderte sich die Größe der Inseln nicht. Die Inselgranularität nahm ähnlich wie unter Kontrollbedingungen sowohl unter glucolipotoxischen als auch unter glucotoxischen Bedingungen ab. Bei Inseln im Zellkulturmedium mit lipotoxischem Milieu alleine fand keine signifikante Veränderung der Inselgranularität statt.

Vergleicht man die Veränderungen zwischen den Bedingungen am dritten Tag, so stellt man fest, dass die Inselfläche durch die Zellkultur mit einem Überangebot an Glucose (Glucotoxizität) oder Palmitat (Lipotoxizität) bzw. mit glucolipotoxischen Milieu größer war

als unter Kontrollbedingungen (Abb. 3.21 A). Die Granularität wurde durch das glucolipotoxische Milieu deutlich gesenkt, während eine hohe Glucosekonzentration alleine vergleichsweise wenig und die Anwesenheit von Palmitat keinen Einfluss hat. Die langfristige Inkubation von Inseln mit Gliclazid in glucolipotoxischem Zellkulturmedium konnte vor diesen Veränderungen nicht schützen (Abb. 3.21 B).

A



B

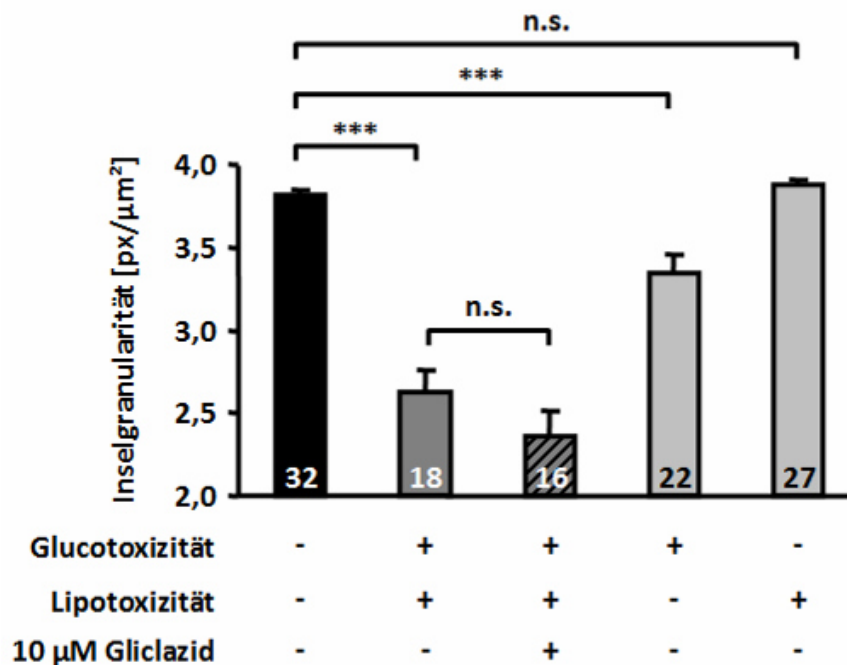


Abb. 3.21 - Veränderung der Inselfläche (A) und -granularität (B) unter Bedingungen einer gluco- und/oder lipotoxischen Zellkultur (25 mM Glucose, 100 μM Palmitat gebunden an 0,056 % fettsäurefreiem BSA) im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Zellkulturmedium, 11 mM Glucose) am dritten Tag - Inseln aus drei Präparationen wurden gesammelt und am nächsten Tag auf die Inkubationsbedingungen aufgeteilt. Einige Inseln wurden bereits ab unmittelbar nach der Präparation mit 10 μM Gliclazid inkubiert. Die Auswertung der Inselfläche und daran anschließend der Granularität wurde wie in Kap. 2.7.3 beschrieben durchgeführt.

Diese Experimente verdeutlichten, dass Inseln, die in Anwesenheit einer erhöhten Glucosekonzentration oder Fettsäure über drei Tage inkubiert waren, eine vergrößerte Fläche aufwiesen, während die Kombination in Form von Glucolipotoxizität die Inselfläche im Vergleich zu Kontrollbedingungen nur wenig beeinflussten. Eine Abnahme der Inselgranularität wurde dagegen vor allem unter glucolipotoxischen Bedingungen beobachtet. Gliclazid konnte diese morphologischen Veränderungen nicht verhindern.

3.2.3.2 Einfluss von Glucolipotoxizität auf den Insulingehalt

Um zu prüfen, ob die beobachtete Abnahme der Inselgranularität durch die glucolipotoxische Zellkultur (25 mM Glucose, 100 μ M Palmitat gebunden an 0,056 % fettsäurefreiem BSA) in Verbindung mit einem veränderten Insulingehalt der *beta*-Zelle steht, wurden Inseln an allen drei Inkubationstagen gemäß Kapitel 2.2.2.2 in Insulinsekretionsexperimenten verwendet, im Anschluss lysiert und das freigesetzte Insulin mittels RIA vermessen. Exemplarisch werden in Abb. 3.22 die Ergebnisse für den zweiten Tag dargestellt, da hier die Unterschiede am deutlichsten waren. Glucolipotoxizität führte zu einer Reduktion des Insulingehalts, welcher durch die Anwesenheit von 10 μ M Gliclazid nicht verhindert werden konnte. Während eine Insel unter Kontrollbedingungen am zweiten Tag durchschnittlich $54,0 \pm 13,0$ ng ($n=3$) Insulin aufwies, war der Gehalt bei Inseln unter glucolipotoxischen Bedingungen auf durchschnittlich $12 \pm 4,1$ ng Insulin ($n=3$, $p \leq 0,05$ zur Kontrolle) vermindert. Die Inkubation von Inseln mit 10 μ M Gliclazid unter denselben Bedingungen konnte diese Veränderung nicht beeinflussen ($9,8 \pm 0,6$ ng Insulin, $n=3$). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Abnahme der Inselgranularität mit einem verminderten Insulingehalt unter glucolipotoxischen Bedingungen zusammenhängen könnte.

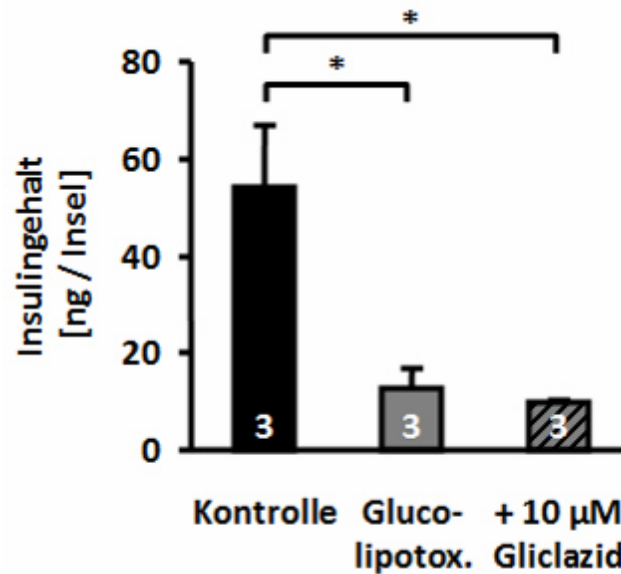


Abb. 3.22 – Veränderung des Insulingehaltes bei Inseln unter Bedingungen von einer glucolipotoxischen Zellkultur (25 mM Glucose, 100 µM Palmitat gebunden an 0,056 % fettsäurefreiem BSA) in An- und Abwesenheit von 10 µM Gliclazid im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Zellkulturmedium, 11 mM Glucose) auf den Insulingehalt am zweiten Tag der Inkubation - Inseln aus den jeweiligen Kulturbedingungen wurden gemäß Kap. 2.2.2.2 in Insulinsekretionsexperimenten getestet (1 h Stimulation mit 15 mM Glucose), lysiert und das freigesetzte Insulin mittels RIA vermessen.

3.2.3.3 Auswirkungen von Glucolipotoxizität auf die Insulinsekretion

Die Sekretionsleistung der *beta*-Zellen ist für die Glucosehomöostase ausschlaggebend. Daher wurde die Insulinsekretion in Anwesenheit einer substimulatorischen (3 mM) und stimulatorischen (15 mM) Glucosekonzentration von Inseln unter Kontrollbedingungen (Zellkulturmedium, 11 mM Glucose) und von Inseln aus einer Zellkultur mit glucolipotoxischem Milieu (25 mM Glucose, 100 µM Palmitat gebunden an 0,056 % fettsäurefreiem BSA) am zweiten und dritten Inkubationstag getestet. Ein Teil der Inseln unter glucolipotoxischen Zellkulturbedingungen war seit der Präparation zusätzlich mit 10 µM Gliclazid inkubiert. So sollte ein möglicher protektiver Effekt von Gliclazid gegenüber den glucolipotoxischen Einflüssen auf die Insulinsekretion geprüft werden.

Inseln, die unter Bedingungen eines Nährstoffüberangebotes kultiviert waren, wiesen bei einer substimulatorischen Glucosekonzentration von 3 mM eine tendenziell erhöhte Insulinsekretion von $0,3 \pm 0,1$ ng Insulin/(Insel*h) (n=3) im Gegensatz zu Inseln unter Kontrollbedingungen ($0,1 \pm 0,02$ ng Insulin/(Insel*h), n=3) auf. Diese Unterschiede waren sehr klein und statistisch nicht zu sichern (Abb. 3.23 A). Wurde die basale Sekretionsrate auf den Insulingehalt der jeweiligen Inseln bezogen, zeigte sich, dass Inseln, die zwei Tage unter glucolipotoxischen Bedingungen kultiviert wurden, eine signifikant erhöhte Sekretionsrate von $1,8 \pm 0,4$ % (n=3) im Gegensatz zu $0,1 \pm 0,1$ % (n=3) unter Kontrollbedingungen hatten

(Abb. 3.23 B). Diese gesteigerte Insulinsekretion unter basalen Stimulationsbedingungen (3 mM Glucose) von Inseln aus glucolipotoxischen Kulturbedingungen korrelierte mit der verminderten Inselgranularität bzw. dem reduzierten Insulingehalt.

Die Inkubation mit Gliclazid hatte keinen Effekt auf das Stimulationsniveau (3mM Glucose: $0,2 \pm 0,1$ ng Insulin/(Insel*h), 15 mM Glucose $2,2 \pm 0,1$ %, n=3) (Abb. 3.23 B).

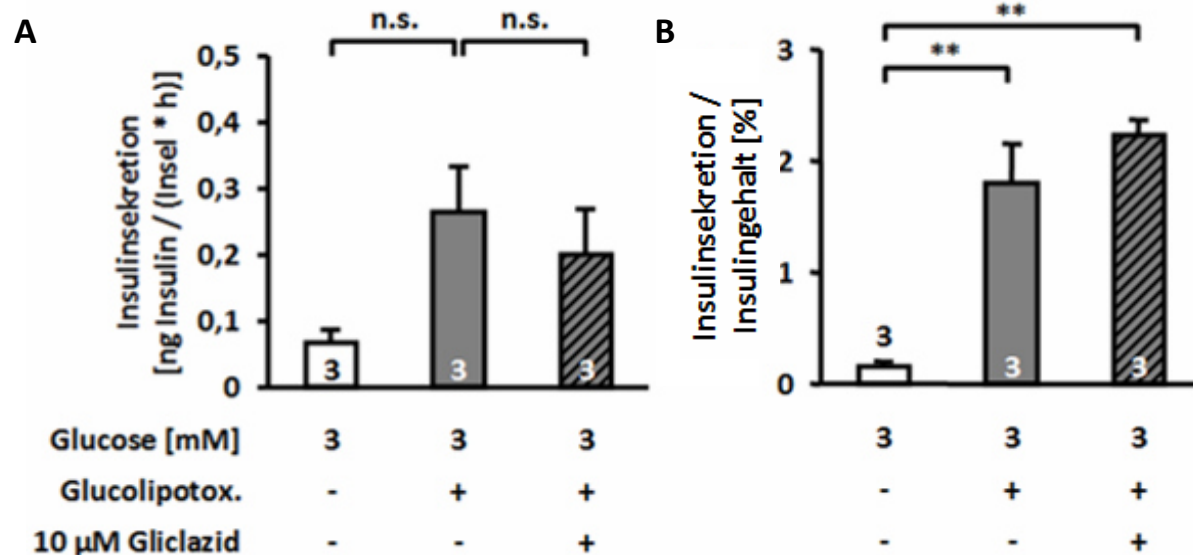


Abb. 3.23 Veränderung der basalen Insulinsekretion (3 mM Glucose) bei Inseln unter Bedingungen einer glucolipotoxischen Zellkultur (25 mM Glucose, 100 μ M Palmitat gebunden an 0,056 % fettsäurefreiem BSA) in An- und Abwesenheit von 10 μ M Gliclazid im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Zellkulturmedium, 11 mM Glucose) am zweiten Inkubationstag - Inseln aus den jeweiligen Kulturbedingungen wurden gemäß Kap. 2.2.2.2 in Insulinsekretionsexperimenten getestet das sezernierte Insulin mittels RIA vermessen (A). Dann wurden die Inseln lysiert und das freigesetzte Insulin mittels RIA bestimmt. Daraufhin wurde der prozentuale Anteil aus sezerniertem zu gesamtem Insulin einer Insel berechnet (B).

Bei einer stimulatorischen Glucosekonzentration von 15 mM war die Insulinsekretion bei Inseln, die unter glucolipotoxischen Bedingungen inkubiert waren, mit $3,0 \pm 0,8$ ng Insulin/(Insel*h) im Vergleich zum Kontrollniveau von $4,5 \pm 0,6$ ng Insulin/(Insel*h) am zweiten Tag signifikant niedriger (n=3, $p \leq 0,01$). Die Inkubation mit Gliclazid senkte die Insulinsekretion sogar noch weiter ab auf durchschnittlich $1,6 \pm 0,4$ ng Insulin/(Insel*h) (n=3, $p \leq 0,05$) (Abb. 3.24).

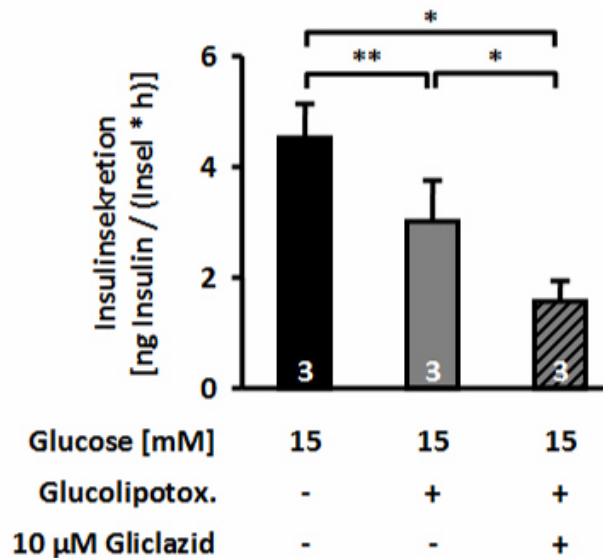


Abb. 3.24 - Veränderung der Insulinsekretion (15 mM Glucose) bei Inseln unter Bedingungen von einer glucolipotoxischen Zellkultur (25 mM Glucose, 100 µM Palmitat gebunden an 0,056 % fettsäurefreiem BSA) in An- und Abwesenheit von 10 µM Gliclazid im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Zellkulturmedium, 11 mM Glucose) am zweiten Inkubationstag - Inseln aus den jeweiligen Kulturbedingungen wurden gemäß Kap. 2.2.2.2 in Insulinsekretionsexperimenten getestet und das sezernierte Insulin mittels RIA vermessen.

Nach zweitägiger glucolipotoxischer Zellkultur war die Insulinsekretion von Inseln somit in zweierlei Weise verändert: Während bei einer substimulatorischen Glucosekonzentration von 3 mM eine gesteigerte basale Sekretionsrate auftrat, war die glucosestimulierte Insulinsekretion (15 mM) eingeschränkt. Gliclazid konnte vor diesen Veränderungen nicht schützen sondern verstärkte sogar die Reduktion der glucosestimulierten Insulinsekretion.

In Tab. 3.19 sind die Werte für die Insulinsekretionen von Inseln in Badlösungen mit 3 und 15 mM Glucose nach drei Tagen in den jeweiligen Kulturbedingungen aufgeführt. Unter substimulatorischen Bedingungen (3 mM) verfügten Inseln aus glucolipotoxischen Kulturbedingungen im Vergleich zu Kontrollbedingungen über eine signifikant erhöhte Sekretionsrate ($p \leq 0,05$), Gliclazid veränderte den glucolipotoxischen Einfluss nicht (n.s.). Die Insulinsekretion unter 15 mM Glucose war unter allen Bedingungen tendenziell ähnlich ausgeprägt wie am zweiten Tag, jedoch statistisch nicht unterschiedlich (n.s.).

Kontrollbedingungen 3. Tag [ng Insulin/(Insel*h)]		Glucolipotoxizität 3. Tag [ng Insulin/(Insel*h)]		+ 10 µM Gliclazid 3. Tag [ng Insulin/(Insel*h)]		n
G3	G15	G3	G15	G3	G15	
0,04 ± 0,01	3,3 ± 0,6	0,4 ± 0,1	3,0 ± 0,9	0,3 ± 0,1	2,0 ± 0,3	3

Tab. 3.19 - Insulinsekretionsmessungen mit Inseln, die unter glucolipotoxischen Bedingungen mit und ohne 10 µM Gliclazid oder Kontrollbedingungen 3 Tage inkubiert waren – Weitere Anmerkungen im Text

3.2.3.4 Beeinflussung der metabolischen Reaktion von $[Ca^{2+}]_c$

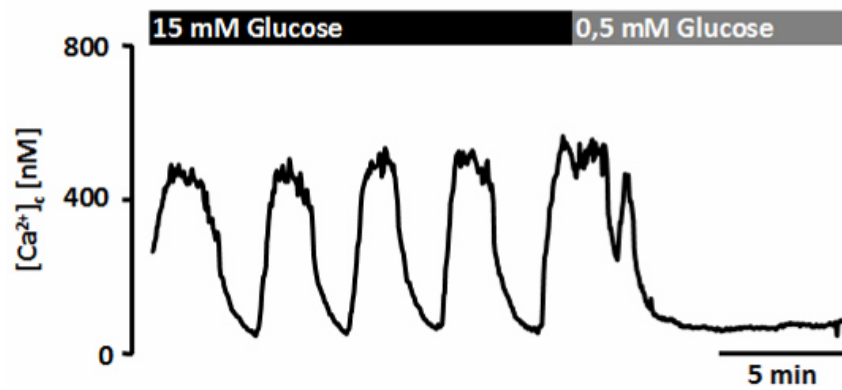
Die vorherigen Experimente zeigten, dass Inseln unter glucolipotoxischen Zellkulturbedingungen (25 mM Glucose, 100 μ M Palmitat gebunden an 0,056 % fettsäurefreiem BSA) morphologische Veränderungen und funktionelle Beeinträchtigungen im Hinblick auf ihre Insulinsekretion aufwiesen. Um eine mögliche Ursache für die beschädigte Insulinsekretion näher zu untersuchen, wurde die Veränderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration $[Ca^{2+}]_c$, die durch den Glucosestoffwechsel beeinflusst wurde, nach einem und zwei Tagen Kultur geprüft und bewertet. Als Kriterium diente die Klassifizierung der beobachteten Reaktionen von $[Ca^{2+}]_c$ nach dem in Abb. 3.25 dargestellten Schema. Auch in dieser Versuchsserie waren ein Teil der Inselzellen unter glucolipotoxischen Zellkulturbedingungen seit der Präparation zusätzlich mit 10 μ M Gliclazid inkubiert, um zu testen, ob ein möglicher Schutzeffekt auf dieser Ebene der Stimulus-Sekretionskopplung zu erkennen ist.

Eine metabolisch intakte *beta*-Zelle weist unter stimulatorischen Bedingungen (15 mM Glucose) typische Oszillationen von $[Ca^{2+}]_c$ auf, die beim Wechsel auf eine niedrige Glucosekonzentration enden, wobei $[Ca^{2+}]_c$ auf basale Werte sinkt (Abb. 3.25 Klasse I). Auch eine permanent erhöhte $[Ca^{2+}]_c$, die während der Messung in Anwesenheit von 15 mM Glucose keine Oszillationen zeigt, aber unter substimulatorischen Bedingungen (0,5 mM Glucose) auf ein basales Niveau sinkt, wurde als metabolisch intakt gewertet (Klasse II). Die *beta*-Zellen hingegen, deren Veränderungen in $[Ca^{2+}]_c$ nicht an die jeweilige Glucosekonzentration gekoppelt waren oder während der gesamten Messung nur ein geringes Niveau von $[Ca^{2+}]_c$ aufwiesen, wurden als metabolisch defekt in Klasse III eingeordnet.

Die Inselzellcluster wurden aus den jeweiligen Zellkulturmedien in eine Badlösung mit 15 mM Glucose und dem Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoff überführt (s. Kap. 2.3.2.1) und anschließend während der Messungen mit Badlösungen mit der jeweiligen Glucosekonzentration (15 bzw. 0,5 mM) überströmt.

Für jede einzelne Präparation von Inselzellclustern wurde pro Kulturbedingung der prozentuale Anteil von Zellen mit korrekter $[Ca^{2+}]_c$ Reaktion (Klasse I + II) an allen getesteten Zellen (n) ermittelt und anschließend wurde ein Mittelwert über alle Präparationen gebildet.

Klasse I



Klasse II



Klasse III

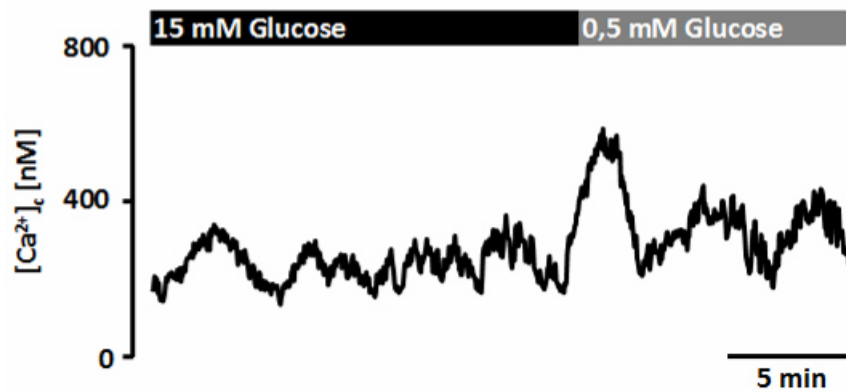
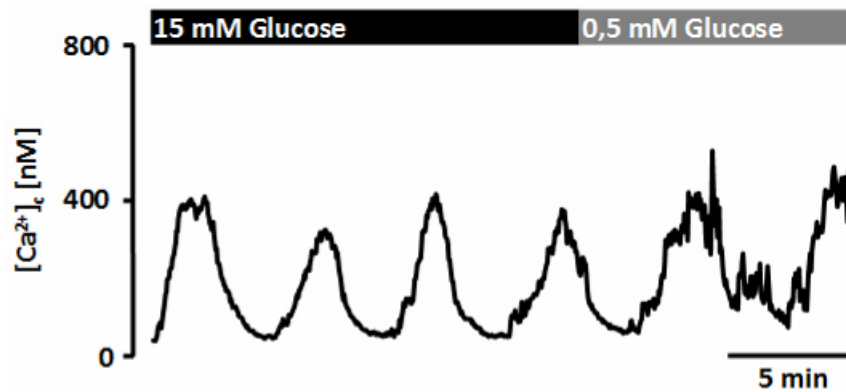


Abb. 3.25 - Bewertung der metabolischen Reaktion von [Ca²⁺]_i auf verschiedene Glucosekonzentrationen nach drei Klassen (I+II: metabolisch intakt, III: metabolisch defekt) - Repräsentative Aufnahmen

Während am ersten Tag kein signifikanter Schaden durch die glucolipotoxischen Zellkulturbedingungen ($83,9 \pm 8,9$ % Inselzellcluster mit korrekter $[Ca^{2+}]_c$ Reaktion, $n=48$) gegenüber Kontrollbedingungen ($87,8 \pm 6,2$ % Inselzellcluster mit korrekter $[Ca^{2+}]_c$ Reaktion, $n=22$) erreicht wurde, konnten am zweiten Tag nur noch $46,0 \pm 8,4$ % ($n=63$) der getesteten Inselzellcluster, die unter Glucolipotoxizität kultiviert wurden, der Klasse I und II zugeordnet und als metabolisch intakt gewertet werden (Kontrolle: $78,4 \pm 6,2$ % Inselzellcluster mit korrekter $[Ca^{2+}]_c$ Reaktion, $n=45$, $p \leq 0,05$). Waren Inselzellcluster seit der Präparation und während der glucolipotoxischen Zellkultur mit $10 \mu\text{M}$ Gliclazid inkubiert, war der Anteil von solchen mit korrekter $[Ca^{2+}]_c$ Reaktion mit $69,7 \pm 2,6$ % ($n=63$) signifikant höher als ohne Gliclazid-Inkubation ($p \leq 0,05$) (Abb. 3.26). Die metabolische $[Ca^{2+}]_c$ Reaktion auf verschiedene Glucosekonzentrationen war also durch Gliclazid vor Glucolipotoxizität geschützt.

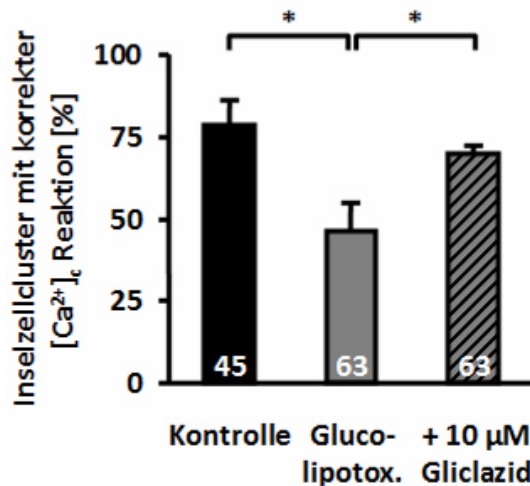


Abb. 3.26 - Einfluss von Glucolipotoxizität (25 mM Glucose, 100 μM Palmitat gebunden an 0,056 % fettsäurefreiem BSA) in An- und Abwesenheit von 10 μM Gliclazid im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Zellkulturmedium, 11 mM Glucose) auf die Reaktion von $[Ca^{2+}]_c$ beim Wechsel von 15 auf 0,5 mM Glucose am zweiten Tag der Inkubation - Ermittelt und klassifiziert wurde die metabolische Reaktion von Inselzellclustern (n) in der jeweiligen Kulturbedingung. Der Mittelwert wurde mit der Anzahl an Präparationen gebildet.

Eine weitere Aussage lässt sich aus der Differenzierung intakter Inselzellcluster, die in Anwesenheit von 15 mM Glucose Oszillationen zeigen (Klasse I) und solchen, die ein Ca^{2+} -Plateau aufwiesen (Klasse II), ableiten: Glucolipotoxizität führte neben einem Defekt der metabolischen Reaktion auch zu einem Verlust der Oszillationen von $[Ca^{2+}]_c$ (Kontrolle: $63,6 \pm 5,1$ %, $n=45$; Glucolipotox.: $36,5 \pm 9,2$ % Inselzellcluster mit Klasse-I-Reaktion, $n=63$, $p \leq 0,05$). Gliclazid konnte zwar zu einer metabolischen $[Ca^{2+}]_c$ Reaktion, jedoch nicht zum Erhalt der Oszillationen bei stimulierten *beta*-Zellen beitragen (Glucolipotox. + Gliclazid: $54,1 \pm 3,5$ % Inselzellcluster mit Klasse-I-Reaktion, $n=63$, n.s. zu Glucolipotox., keine Abb.).

3.2.3.5 Einfluss der Zellkultur auf die intrazelluläre ROS-Akkumulation

Da Inseln bzw. Inselzellcluster, die unter glucolipotoxischen Bedingungen kultiviert wurden, deutlichen morphologischen und funktionellen Veränderungen zeigten, sollte im Folgenden überprüft werden, inwiefern oxidativer Stress bei diesen schädigenden Einflüssen eine Rolle spielt.

Zunächst wurde untersucht, wie sich die intrazellulären ROS-Konzentrationen bei einer Langzeitinkubation mit 0,5 bzw. 15 mM Glucose verhielt. Dazu wurde das Zellkulturmedium mit den entsprechenden Glucosekonzentrationen hergestellt und die ROS-Konzentrationen von Inselzellclustern nach ein, zwei und drei Inkubationstagen gemessen. Als Referenztest diente eine einstündige Inkubation in Zellkulturmedium bei denselben Glucosekonzentrationen. Wie Abb 3.27 zeigt, konnten an allen drei Tagen Unterschiede in der ROS-Akkumulation zwischen den Glucosekonzentrationen beobachtet werden.

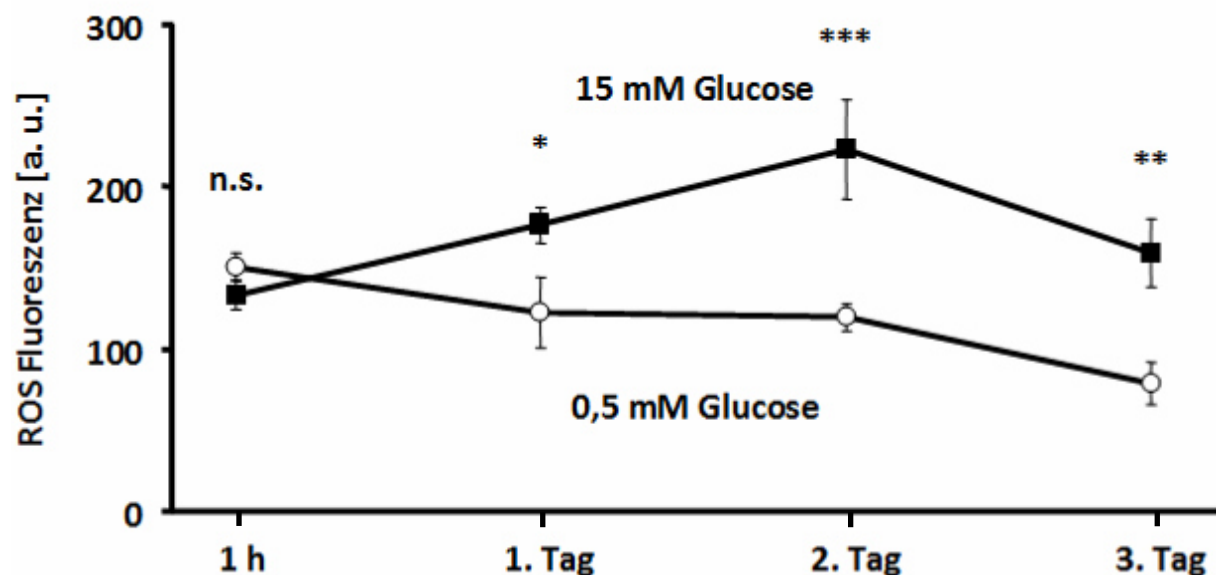


Abb. 3.27 - Einstündige und mehrtägige Inkubationen (1-3 Tage) von Inselzellclustern in Zellkulturmedien mit verschiedenen Glucosekonzentrationen (0,5 und 15 mM) und anschließenden ROS-Messungen - Die Inkubation in verschiedenen Glucosekonzentrationen führte an allen drei Tagen zu signifikanten Unterschieden bei den intrazellulären ROS-Konzentrationen. Eine einstündige Inkubation erbrachte keinen Unterschied.

	1 h [a.u.]	1. Tag [a.u.]	2. Tag [a.u.]	3. Tag [a.u.]
G0,5	150 ± 9 n=50	122 ± 22 n=23	119 ± 22 n=36	79 ± 13 n=26
G15	133 ± 9 n=57	176 ± 11 n=48	223 ± 31 n=26	160 ± 20 n=30

Tab. 3.20 - Fluoreszenzwerte der ROS-Messungen von Abb. 3.27

Im Gegensatz zu einstündigen ROS-Messungen, die in Badlösungen mit 0,5 und 15 mM Glucosekonzentration im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden (z.B. in Kap. 3.1.4), wies die einstündige Inkubation im Zellkulturmedium mit 0,5 oder 15 mM Glucosekonzentration keine unterschiedlichen ROS-Konzentration auf.

Um zu verifizieren, dass dieses Ergebnis aufgrund der verschiedenen Zusammensetzung von Badlösung und Zellkulturmedium zustande kommt, wurden einstündige ROS-Messungen in Badlösungen durchgeführt, denen fetales Kälberserum (FKS) oder bovines Serumalbumin (BSA) entsprechend den Konzentrationen im Zellkulturmedium (10 % FKS bzw. 0,2 % BSA) zugesetzt wurde. Die einstündige Inkubation von Inselzellclustern in einer Badlösung mit 15 mM Glucose führte erwartungsgemäß zu einer deutlichen Akkumulation von ROS gegenüber 0,5 mM Glucose (G0,5: 295 ± 14 ; G15: 629 ± 29 a.u., $n=67-74$, $p \leq 0,001$). Sowohl 10 % FKS (498 ± 29 a.u., $n=46$, $p \leq 0,01$ zu G15) als auch 0,2 % BSA (185 ± 9 a.u., $n=30$, $p \leq 0,001$ zu G15) verhinderten die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies im Vergleich zu FKS/BSA-freier Badlösung mit 15 mM Glucose in der ersten Stunde (Abb. 3.28).

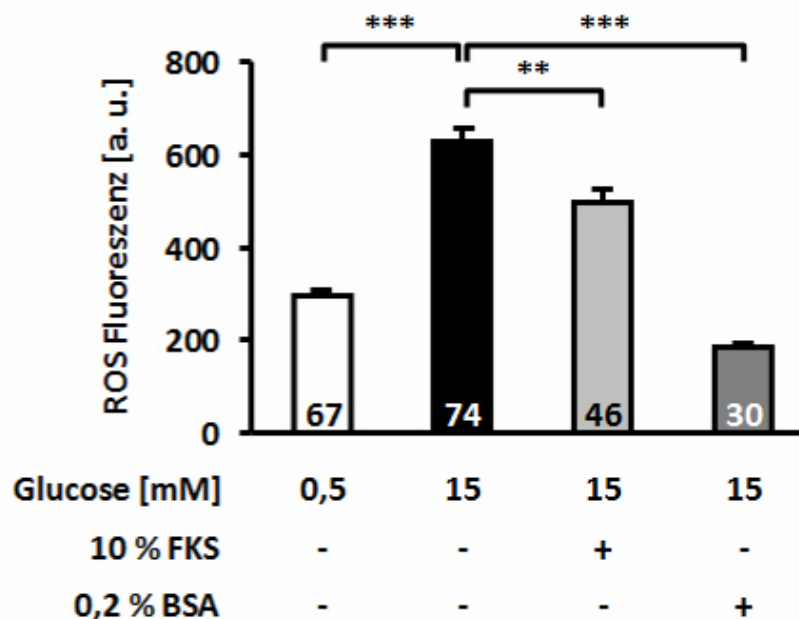


Abb. 3.28 - Einfluss von 10 % FKS bzw. 0,2 % BSA in einer Badlösung mit 15 mM Glucose auf die ROS-Konzentrationen von Inselzellclustern (1 h Inkubation) - Dargestellt ist die ROS-Akkumulation in Anwesenheit von 0,5 bzw. 15 mM Glucose sowie 15 mM Glucose mit 10 % FKS oder 0,2 % BSA.

Da bei den in Abb. 3.27 aufgeführten Langzeitinkubationen kein Mediumwechsel vorgenommen wurde und es schließlich am ersten Tag zu einer glucoseabhängigen ROS-Akkumulation kam, kann davon ausgegangen werden, dass der Einfluss von FKS und BSA auf die intrazellulären ROS-Konzentrationen bei längeren Inkubationen vernachlässigbar ist.

3.2.3.6 Einfluss von Glucolipotoxizität auf die ROS-Konzentrationen

Unter glucolipotoxischen Zellkulturbedingungen traten zwischen dem zweiten und dritten Tag deutliche Veränderungen von Inselgröße bzw. -granularität, Insulingehalt, Insulinsekretion und $[Ca^{2+}]_c$ auf und für Gliclazid konnte auf Ebene der Ca^{2+} -Homöostase ein schützender Effekt beobachtet werden. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, wie sich die Akkumulation intrazellulärer ROS unter diesen Inkubationsbedingungen verhält.

In einer ersten Versuchsreihe wurde in Analogie zu den $[Ca^{2+}]_c$ -Experimenten (s. Kap. 3.2.3.4) geprüft, ob durch die Anwesenheit von 10 μ M Gliclazid ab dem Zeitpunkt der Inkulturnahme die intrazellulären ROS-Konzentrationen bei Inselzellclustern unter glucolipotoxischen Bedingungen (25 mM Glucose, 100 μ M Palmitat gebunden an 0,056 % fettsäurefreiem BSA) verändert waren. Es zeigte sich, dass im Vergleich zu Inselzellclustern, die unter glucolipotoxischen Bedingungen eine ROS-Fluoreszenz von 1166 ± 76 a.u. ($n=251$) aufwiesen, die Inkubation mit Gliclazid zu einer signifikant verringerten ROS-Akkumulation von durchschnittlich 728 ± 48 a.u. ($n=250$) führte (Abb. 3.29 A). In einem weiteren Versuch sollte getestet werden, ob die glucolipotoxischen Zellkulturbedingungen gegenüber Kontrollbedingungen (11 mM Glucose) selbst zu erhöhten ROS-Konzentrationen führten. Der Vergleich beider ROS-Niveaus ergab keinen signifikanten Unterschied (Kontrolle: 499 ± 27 ; Glucolipotox.: 447 ± 26 a.u., $n=87-98$, n.s., Abb. 3.29 B).

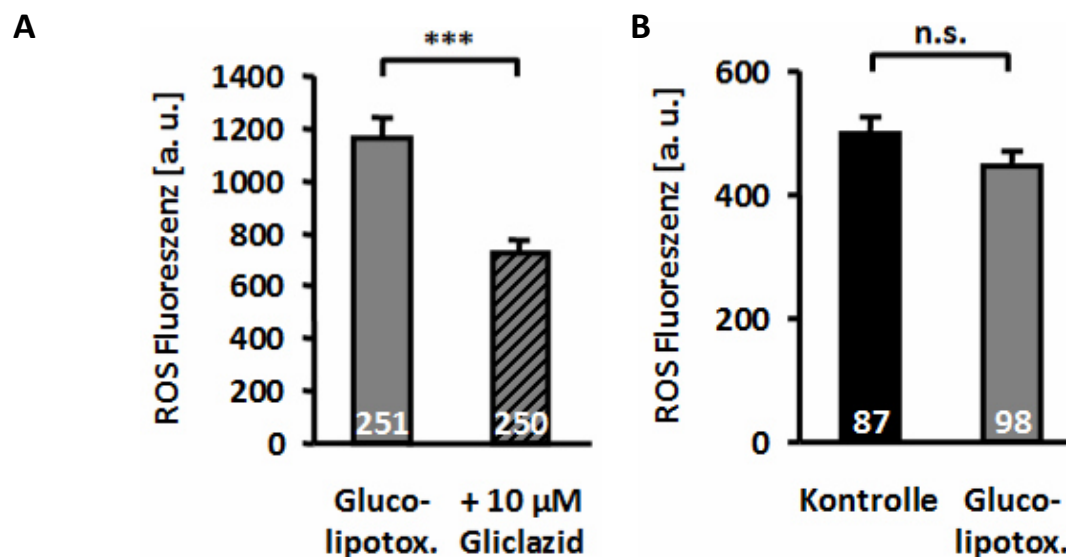


Abb. 3.29 - Vergleich der intrazellulären ROS-Konzentrationen bei Inselzellclustern, die unter glucolipotoxischen Bedingungen kultiviert sind (25 mM Glucose, 100 μ M Palmitat gebunden an 0,056 % fettsäurefreiem BSA) in An- und Abwesenheit von 10 μ M Gliclazid (A), sowie im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Zellkulturmedium, 11 mM Glucose) (B) am zweiten Tag der Inkubation - Anmerkung zu den unterschiedlichen Zahlendimensionen der y-Achsen: Die Messungen sind in einem zweijährigen Abstand mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffchargen und Monochromatoren entstanden.

Zusammenfassung

Morphologisch wiesen Inseln, die unter glucolipotoxischen Bedingungen kultiviert wurden, eine verminderte Granularität und eine vergrößerte Fläche auf. Betrachtet man die Granularität unter glucotoxischen und lipotoxischen Bedingungen, zeigte sich, dass eine hohe Glucosekonzentration von 25 mM wenig und 100 μ M Palmitat (0,056 % BSA) alleine gar keinen Einfluss hatten. Erst die Kombination aus beiden senkte die Granularität deutlich.

Darüberhinaus führte Glucolipotoxizität zu einem verminderten Insulingehalt und einer eingeschränkten Insulinsekretion bei stimulierten Inseln. Unstimulierte Inseln hingegen wiesen bezogen auf den Insulingehalt eine übermäßig erhöhte basale Sekretionsrate auf. Gliclazid führte zu keiner protektiven Wirkung gegen diese morphologischen und funktionellen Veränderungen der Inseln.

Ein weiterer Schaden war in der metabolischen Regulation von $[Ca^{2+}]_c$ zu beobachten: Glucolipotoxizität führte zu einem Verlust der Oszillationen sowie zu einer unphysiologischen Reaktion beim Übergang von einer stimulatorischen zu einer substimulatorischen Glucose-konzentration. Gliclazid konnte *beta*-Zellen vor dieser Fehlregulation von $[Ca^{2+}]_c$ schützen.

Dieser Schutzeffekt steht in Einklang mit der beobachteten Senkung intrazellulärer ROS-Konzentrationen durch Gliclazid unter glucolipotoxischen Bedingungen. Bemerkenswerterweise führte die glucolipotoxische Zellkultur im Vergleich zu Kontrollbedingungen aber zu keiner signifikanten ROS-Akkumulation.

Sowohl 10 % FKS als auch 0,2 % BSA führten in einstündigen Inkubationen zur signifikanten Senkung der intrazellulären ROS-Konzentrationen bei *beta*-Zellen, die mit 15 mM Glucose stimuliert waren. Da sich in der menschlichen Blutbahn weitaus höhere Serumalbuminkonzentrationen (3,5 - 5 %) befinden, sollte diese Beobachtung sowohl bei ROS-Experimenten als auch in der klinischen Beurteilung von oxidativem Stress Beachtung finden, da Albumin als zirkulierendes natürliches Antioxidans die ROS-Wirkung abschwächen könnte (Roche et al. 2008). Die vermehrte Albuminexkretion, wie bei der diabetischen Nephropathie, erlangt vor diesem Hintergrund einen ganz neuen Stellenwert (Rehman et al. 2012).

3.3 Sulfonylharnstoffe und *beta*-Zellmetabolismus

Sulfonylharnstoffe vermitteln ihren insulinotropen Effekt durch Blockade der ATP-sensitiven Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) in *beta*-Zellen. Darüber hinaus zeigten die Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe, dass die genetische Ausschaltung bzw. pharmakologische Inhibition des K_{ATP} -Kanals eine Hochregulation antioxidativer Enzyme bewirkt und die *beta*-Zellviabilität vor oxidativem Stress schützt (Gier et al. 2009). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss der Sulfonylharnstoffe auf die Insulinsekretion, das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi$ sowie die ROS-Entstehung bei unterschiedlich langen Inkubationen näher untersucht werden.

3.3.1 Einfluss der Sulfonylharnstoffe auf die Insulinsekretion

In einer einstündigen Steady-state-Inkubation mit drei verschiedenen Sulfonylharnstoffen in Anwesenheit von 15 mM Glucose war die Insulinsekretion in Relation zur Sekretion, die durch 15 mM Glucose alleine hervorgerufen wird, jeweils gleichmäßig erhöht (Abb. 3.30).

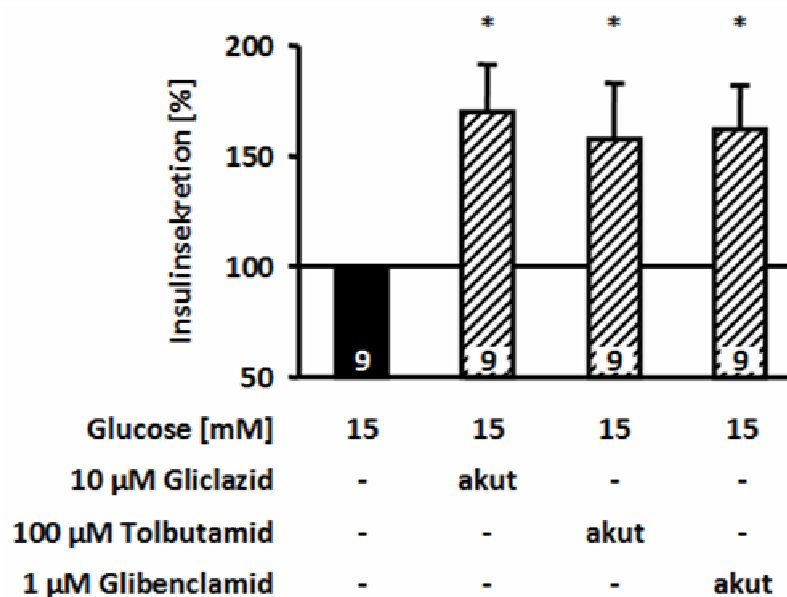


Abb. 3.30 - Einfluss von 10 µM Gliclazid, 100 µM Tolbutamid und 1 µM Glibenclamid (akute Inkubationen) auf die Insulinsekretion in Anwesenheit von 15 mM Glucose nach einer 1 h Steady-state-Inkubation - Statistisch getestet wurde die prozentuale Veränderung gegenüber dem Sekretionsniveau bei 15 mM Glucose.

G3	G15	+ 10 µM Gliclazid	+ 100 µM Tolbutamid	+ 1 µM Glibenclamid	n
0,2 ± 0,1 ng Insulin/(Insel*h)	1,6 ± 0,5 ng Insulin/(Insel*h)	2,2 ± 0,5 ng Insulin/(Insel*h)	2,1 ± 0,5 ng Insulin/(Insel*h)	2,3 ± 0,7 ng Insulin/(Insel*h)	9
15,1 ± 6,0 %	100 %	170 ± 22 %	158 ± 26 %	162 ± 19 %	

Tab 3.21 - Gegenüberstellung der absoluten und relativen Werte für den Insulinsekretionsversuch in Abb. 3.30

Für die Untersuchungen der *beta*-Zellfunktion unter Bedingungen von oxidativem Stress ist die Insulinsekretionsfähigkeit von wesentlicher Bedeutung. Da Gliclazid als Sulfonylharnstoff mit seiner charakteristischen insulinotropen Wirkung (s. Abb. 3.30) jedoch auch unabhängig von seiner antioxidativen Wirkung bei *beta*-Zellen trotz defektem Metabolismus die Insulinsekretion aufrecht halten könnte (s. Kap. 3.1.3), musste getestet werden, ob auch die Langzeitinkubation mit 10 μ M Gliclazid (über Nacht und akut während der 1 h Steady-state-Inkubation) eine signifikante Steigerung der Insulinsekretion herbeiführt.

Nach der einstündigen Steady-state-Inkubation unter Anwesenheit von 15 mM Glucose konnte bei Inseln, die langfristig mit Gliclazid inkubiert waren, keine signifikante Steigerung der Insulinsekretion beobachtet werden (G15: $2,2 \pm 0,3$; + 10 μ M Gliclazid: $2,4 \pm 0,2$ ng Insulin/(Insel*h), n=22, n.s.).

Wurden die Inseln jedoch während der Steady-state-Inkubation in einer Badlösung mit einer substimulatorischen Glucosekonzentration von 3 mM inkubiert, konnte die sekretionssteigernde Wirkung des Sulfonylharnstoffes gemessen werden (G3: $0,1 \pm 0,01$; + 10 μ M Gliclazid: $0,9 \pm 0,04$ ng Insulin/(Insel*h), n=4, $p \leq 0,01$) (Abb. 3.31).

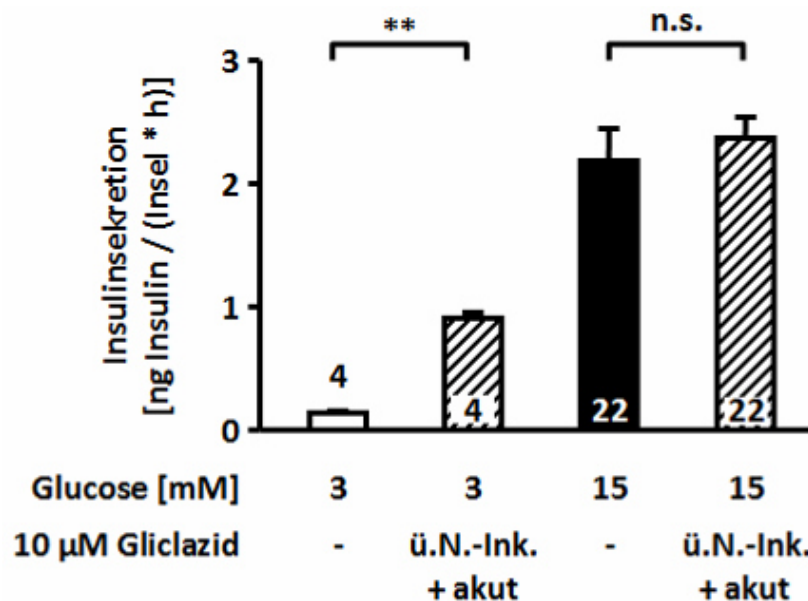


Abb. 3.31 - Einfluss einer langfristigen Inkubation von Inseln (über Nacht und akut) mit 10 μ M Gliclazid auf die Insulinsekretion nach einer 1 h Steady-state-Inkubation in Anwesenheit von 3 oder 15 mM Glucose

Diese Versuche machten deutlich, dass abhängig von der metabolischen Aktivität der *beta*-Zelle und damit der Fähigkeit die Offenwahrscheinlichkeit ihrer K_{ATP} -Kanäle zu regulieren, Gliclazid in seiner Eigenschaft als K_{ATP} -Kanalinhibitor auch nach langfristiger Inkubation unter bestimmten Umständen, wie einer verminderten ATP-Synthese bei substimulatorischen Glucosekonzentrationen, die Insulinsekretion pharmakologisch aufrecht erhalten kann.

3.3.2 Einfluss der Sulfonylharnstoffe auf $\Delta\Psi$

Sulfonylharnstoffe vermitteln ihre insulinotrope Wirkung weitgehend unabhängig vom Glucoseangebot und der mitochondrialen ATP-Produktion. Jedoch ist es möglich, dass der durch Sulfonylharnstoffe induzierte Ca^{2+} -Einstrom ins Zytosol oder die Sulfonylharnstoffe selbst mit weiteren Kompartimenten und Funktionsproteinen wechselwirken. Den Mitochondrien kommt bei der Entstehung von endogenen ROS eine besondere Rolle zu. Im Hinblick auf das in klinischen Studien beschriebene Sekundärversagen der *beta*-Zellen unter einer Langzeittherapie mit Sulfonylharnstoffen und die in den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe beobachteten Ca^{2+} -abhängigen Hochregulation antioxidativer Enzyme sollte überprüft werden, wie und in welchem Ausmaß die Sulfonylharnstoffe Gliclazid und Tolbutamid mit dem mitochondrialen Membranpotential $\Delta\Psi$ interagieren.

Eine zehnmünütige Inkubation mit 10 μM Gliclazid bzw. 100 μM Tolbutamid in Anwesenheit von 15 mM Glucose führte zu einer signifikanten Depolarisation von $\Delta\Psi$ (Abb. 3.32 A).

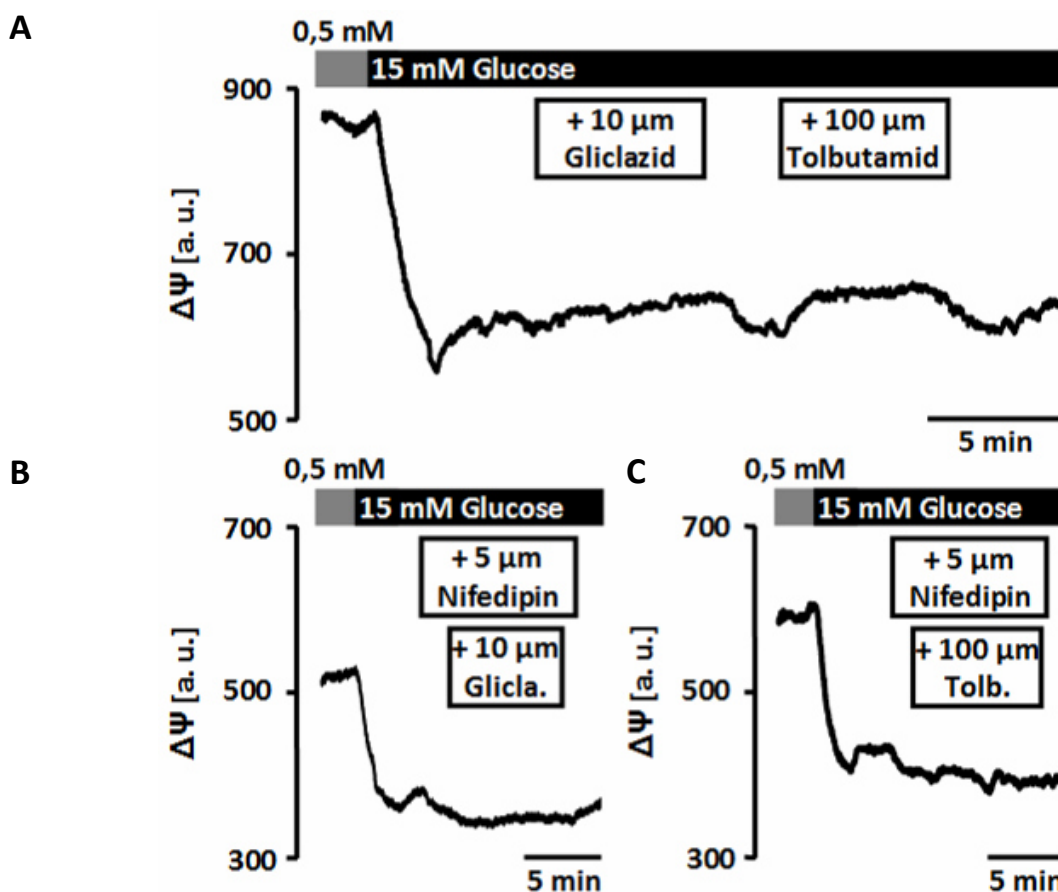


Abb. 3.32 - Akuter Einfluss von 10 μM Gliclazid bzw. 100 μM Tolbutamid auf $\Delta\Psi$ in An- und Abwesenheit von 5 μM Nifedipin - A-C: Repräsentative Aufnahmen - Beim Wechsel von einer Badlösung mit 0,5 mM auf eine mit 15 mM Glucose beobachtete man eine Hyperpolarisation von $\Delta\Psi$. Die Zugabe von Gliclazid bzw. Tolbutamid führte zu einer Depolarisation (A), welche durch die gleichzeitige Gabe von Nifedipin ausblieb (B+C).

Bei beiden Sulfonylharnstoffen waren diese Änderungen von $\Delta\Psi$ ähnlich ausgeprägt (10 μM Gliclazid: Depolarisation um $9,5 \pm 3,0$ a.u., $n=28$; 100 μM Tolbutamid: Depolarisation um $10,4 \pm 4,4$ a.u., $n=31$, n.s. zu Gliclazid) und unabhängig davon, welche Substanz zuerst gegeben wurde. Diese Effekte konnten durch den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Blocker Nifedipin vollständig unterdrückt werden (5 μM Nifedipin + 10 μM Gliclazid: Abnahme der Fluoreszenz um $-7,6 \pm 2,5$ a.u., $n=11$; + 100 μM Tolbutamid: Abnahme um $-8,1 \pm 3,1$ a.u., $n=22$, n.s.) (Abb. 3.32 B+C). Kontrollmessungen, bei denen nach dem Wechsel auf 15 mM Glucose nur Nifedipin hinzugegeben wurde, veränderten $\Delta\Psi$ ähnlich ($-7,3 \pm 2,9$ a.u., $n=27$). Diese Daten zeigten somit, dass die getesteten Sulfonylharnstoffe nur indirekt, durch den gesteigerten Ca^{2+} -Einstrom, in der Lage waren, $\Delta\Psi$ zu verändern.

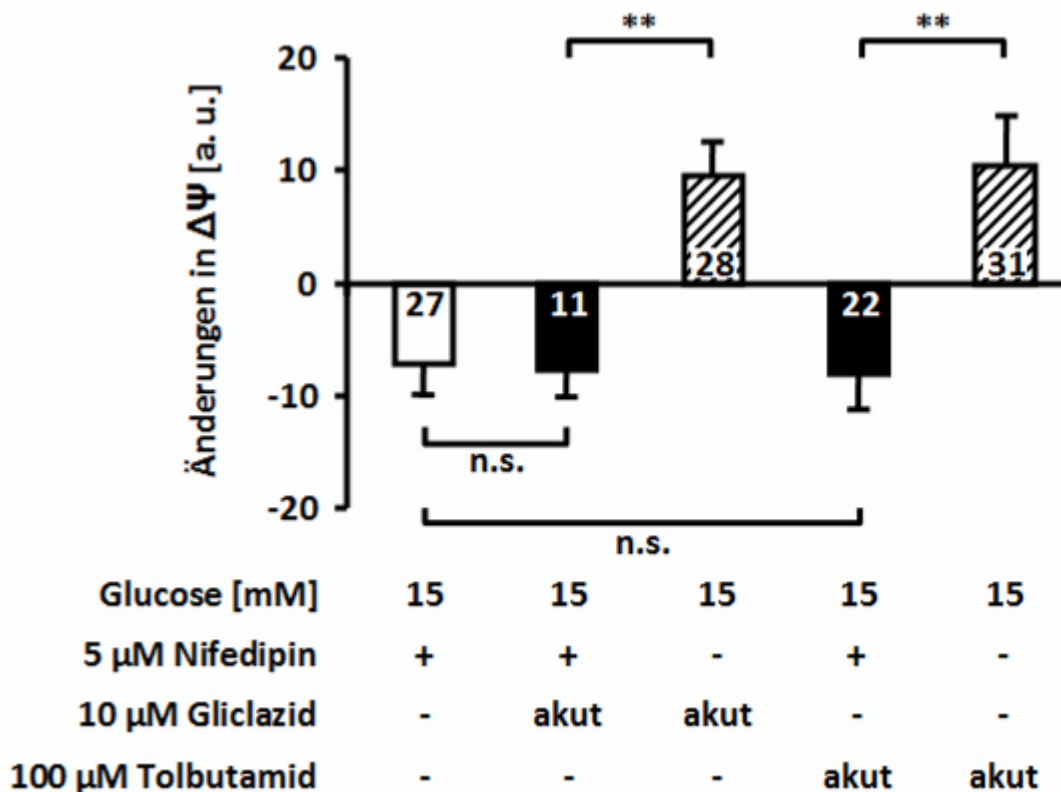


Abb. 3.33 - Akuter Einfluss von 10 μM Gliclazid bzw. 100 μM Tolbutamid auf $\Delta\Psi$ in An- und Abwesenheit von 5 μM Nifedipin - Dargestellt sind die Änderungen in $\Delta\Psi$ 10 min nach Zugabe von Gliclazid bzw. Tolbutamid im Vergleich zum Niveau von $\Delta\Psi$ unmittelbar vor Substanzzugabe. Die Änderung in positive Richtung entspricht einer Depolarisation von $\Delta\Psi$ während die Änderung in negative Richtung einer Hyperpolarisation entspricht.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob eine Übernacht-Inkubation mit 10 μM Gliclazid $\Delta\Psi$ ebenfalls verändert. Hierfür wurden Inselzellcluster, die entweder unbehandelt oder mit Gliclazid inkubiert waren, aus dem Zellkulturmedium in eine Badlösung mit 0,5 mM Glucose überführt (Kap. 2.3.2.2).

Bei der anschließenden fluoreszenzoptischen Messung von $\Delta\Psi$ wurde durch den Wechsel von einer Badlösung mit 0,5 mM Glucose auf eine mit 15 mM $\Delta\Psi$ hyperpolarisiert. Mit FCCP (0,5 μ M) wurde daraufhin eine maximale Depolarisation ausgelöst (Abb. 3.34 A).

Bezieht man das $\Delta\Psi$ -Niveau unter Anwesenheit von 0,5 mM Glucose auf den Wert bei der maximalen Depolarisation durch FCCP, zeigte sich, dass die langfristige Inkubation mit dem Sulfonylharnstoff die innere Mitochondrienmembran depolarisierte (Abb. 3.34 B).

In Analogie zu den zuvor gezeigten akuten Einflüssen der Sulfonylharnstoffe wurde dieser Langzeiteffekt möglicherweise ebenfalls über einen permanent gesteigerten Ca^{2+} -Einstrom in die *beta*-Zellen verursacht.

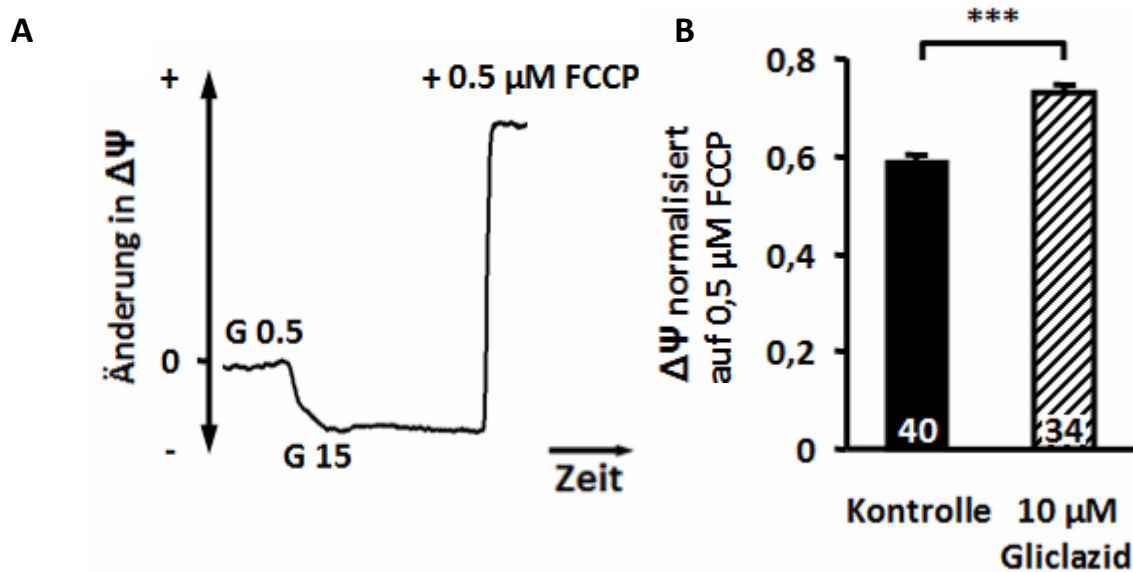


Abb. 3.34 - Einfluss einer langfristigen Inkubation von Inselzellclustern (über Nacht) mit 10 μ M Gliclazid auf das $\Delta\Psi$ -Niveau unter unstimulierten Bedingungen (Badlösung mit 0,5 mM Glucose) bezogen auf die maximale Depolarisation mit FCCP - A: Versuchsskizze - B: Dargestellt ist das $\Delta\Psi$ -Niveau bei 0,5 mM Glucose bezogen auf das $\Delta\Psi$ -Niveau bei maximaler Depolarisation mit FCCP.

	G0,5 [a. u.]	G15 [a. u.]	+ 0,5 μ M FCCP [a. u.]	G0,5/FCCP	n
Kontrolle	564 \pm 26	449 \pm 16	1016 \pm 14	0,59 \pm 0,02	40
10 μM Gliclazid	551 \pm 19	430 \pm 12	772 \pm 36	0,73 \pm 0,02	34

Tab. 3.22 - Fluoreszenzwerte der $\Delta\Psi$ -Messungen zu Abb. 3.34 A sowie die ermittelten Verhältnisse vom $\Delta\Psi$ -Niveau bei 0,5 mM Glucose bezogen auf das $\Delta\Psi$ -Niveau bei maximaler Depolarisation mit FCCP

3.3.3 Einfluss der K_{ATP} -Kanalinhibition auf die ROS-Akkumulation

Neben der akut gesteigerten Insulinsekretion führen Sulfonylharnstoffe durch den vermehrten Ca^{2+} -Einstrom auch zur Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran. Die Verringerung von $\Delta\Psi$ korreliert mit einer verminderten ATP-Produktion, während die Aktivität der Atmungsketten bei gleichem Substratangebot beschleunigt ist. Dieses Missverhältnis in der aeroben ATP-Produktion kann zur bevorzugten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen. Daher sollte im Folgenden die Bildung von ROS unter verschiedenen metabolischen Bedingungen und die Beeinflussung durch K_{ATP} -Kanalinhibitoren überprüft werden.

Zunächst wurde die Bedeutung des Ca^{2+} -Einstroms für die Bildung von ROS bei substimulatorischen (0,5 mM Glucose) und stimulatorischen (15 mM Glucose) Bedingungen in Inselzellclustern getestet.

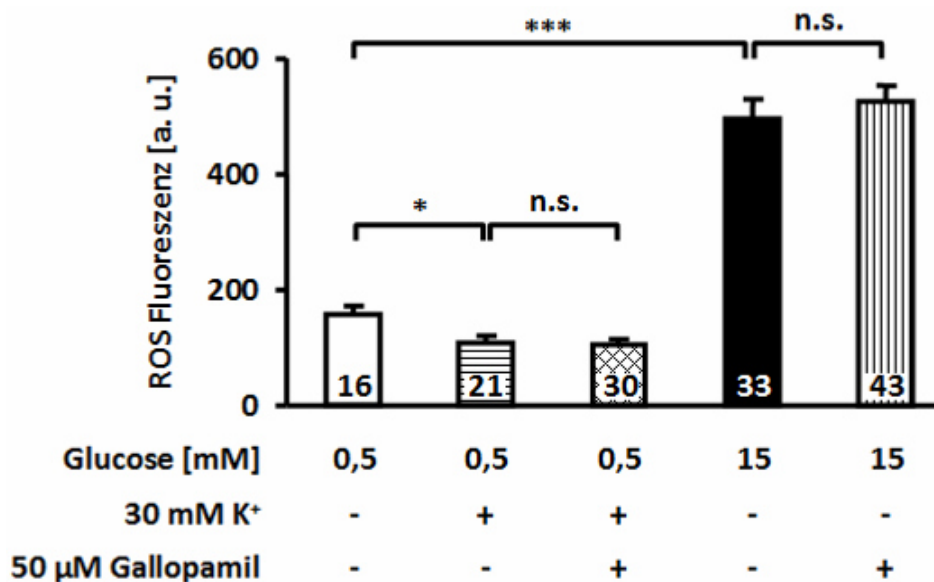


Abb. 3.35 - Einfluss einer 1 h Inkubation von Inselzellclustern mit Badlösungen verschiedener Glucosekonzentrationen (0,5 bzw. 15 mM) sowie in An- und Abwesenheit von 30 mM K^+ bzw. 50 μ M Gallopamil auf die intrazelluläre ROS-Akkumulation

Das Diagramm in Abb. 3.35 zeigt, dass Inselzellcluster nach einer einstündigen Inkubation mit 0,5 mM glucosehaltiger Badlösung eine ROS-Konzentration von durchschnittlich 156 ± 15 a.u. ($n=16$) aufwiesen und die Inkubation mit einer Badlösung mit 15 mM Glucose zu einer signifikant erhöhten ROS-Akkumulation (495 ± 33 a.u., $n=33$) führte. Dieser Anstieg war unabhängig vom Ca^{2+} -Einstrom, da die Hemmung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle durch 50 μ M Gallopamil bei Anwesenheit von 15 mM Glucose den Anstieg an ROS nicht verhindern konnte (527 ± 26 a.u., $n=43$) und die durch 30 mM extrazelluläres K^+ erzeugte

Membrandepolarisation und Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen bei einer substimulatorischen Glucosekonzentration von 0,5 mM zu keiner erhöhten ROS-Akkumulation führte ($106,9 \pm 13,5$ a.u., $n=21$). Die signifikante ROS-Reduktion durch 30 mM K^+ scheint ein Ca^{2+} -unabhängiger Effekt zu sein, da er unter Gallopamil ähnlich ausgeprägt war ($103,3 \pm 10,5$ a.u., $n=30$).

Aus diesen Experimenten kann also geschlossen werden, dass die intrazelluläre ROS-Akkumulation durch 15 mM Glucose in *beta*-Zellen hauptsächlich über den gesteigerten Glucosemetabolismus und Ca^{2+} -unabhängig verläuft. Nun sollte getestet werden, ob die Anwesenheit eines Sulfonylharnstoffes während der einstündigen Inkubation der Inselzellcluster mit 0,5 oder 15 mM Glucose die intrazellulären ROS-Konzentrationen verändern kann.

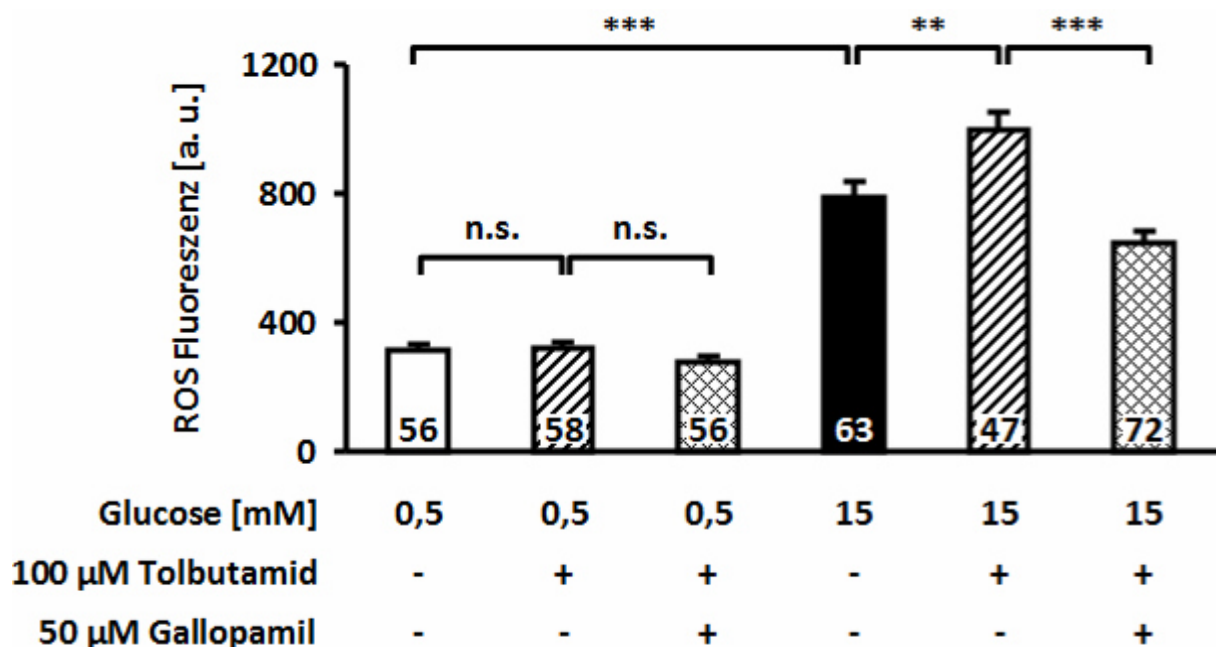


Abb. 3.36 - Einfluss einer 1 h Inkubation von Inselzellclustern mit Badlösungen verschiedener Glucosekonzentrationen (0,5 bzw. 15 mM) sowie in An- und Abwesenheit von 100 µM Tolbutamid sowie 50 µM Gallopamil auf die intrazelluläre ROS-Akkumulation

Wie Abb. 3.36 illustriert, konnte bei einer substimulatorischen Konzentration von 0,5 mM Glucose die ROS-Akkumulation von durchschnittlich 315 ± 19 a.u. ($n=56$) durch 100 µM Tolbutamid nicht beeinflusst werden (319 ± 21 a.u., $n=58$, n.s.). Die gleichzeitige Inkubation mit dem Ca^{2+} -Kanalblocker Gallopamil blieb ebenfalls wirkungslos (277 ± 19 a.u., $n=56$, n.s.). Inselzellcluster, die 1 h in einer Badlösung mit 15 mM Glucose inkubiert wurden, wiesen eine signifikant höhere ROS-Fluoreszenz von 789 ± 46 a.u. auf ($n=63$, $p \leq 0,001$). Durch die gleichzeitige Inkubation mit Tolbutamid wurde die ROS-Konzentration noch weiter auf $996 \pm$

19 a.u. gesteigert ($n=47$, $p\leq 0,01$). Dass dieser Effekt über einen vermehrten Ca^{2+} -Einstrom, der durch Tolbutamid verursacht wird, vermittelt wurde, zeigt die gleichzeitige Inkubation mit dem L-Typ- Ca^{2+} -Kanalblocker Gallopamil: Unter diesen Bedingungen war die durch Tolbutamid induzierte Steigerung von ROS signifikant geringer (649 ± 34 a.u., $n=72$, $p\leq 0,001$). Die Steigerung der intrazellulären ROS-Konzentration durch Tolbutamid unter Anwesenheit einer stimulatorischen Glucosekonzentration wurde also durch einen vermehrten Ca^{2+} -Einstrom verursacht, der zu einer Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi$ führte (s. Kap. 3.3.2). Dieser Mechanismus konnte auch für Gliclazid nachgewiesen werden und wird sehr wahrscheinlich für alle pharmakologischen Maßnahmen der K_{ATP} -Kanalhemmung (Sulfonylharnstoffe, Glinide) gelten. Doch zeigen Apoptosemessungen aus den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, dass sich die Sulfonylharnstoffe bezüglich ihres Einflusses auf die Zellviabilität unterscheiden: Während im Vergleich zu Kontrollbedingungen eine vierstündige Inkubation mit Gliclazid die Anzahl apoptotischer Zellen nicht beeinflusste, konnte für Tolbutamid unter denselben Bedingungen eine signifikante Steigerung der Apoptoserate nachgewiesen werden (Gier et al. 2009). Deshalb sollte in einem weiteren Experiment getestet werden, ob auch Gliclazid zu einer vermehrten ROS-Akkumulation unter Anwesenheit von 15 mM Glucose führt.

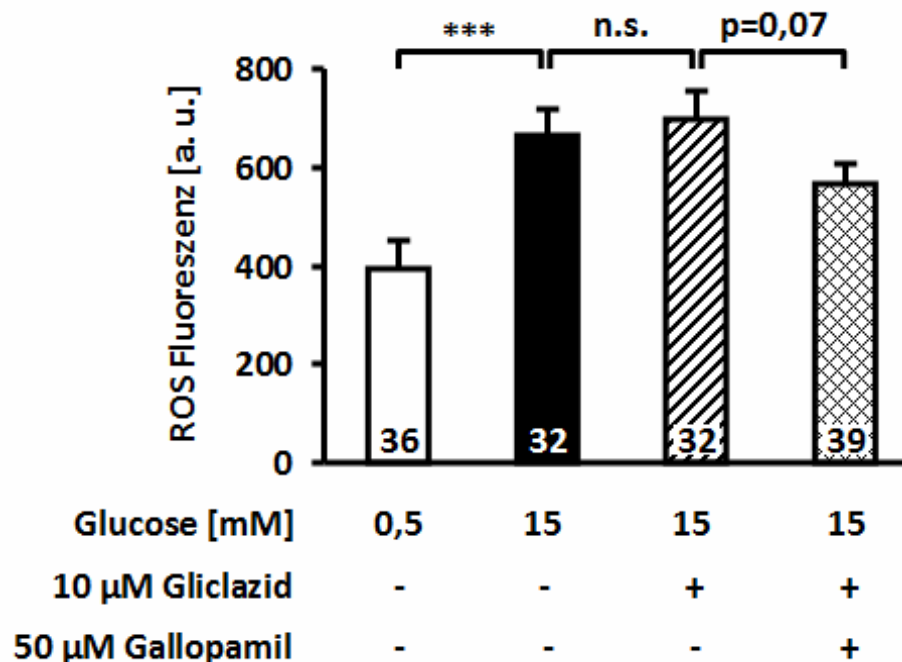


Abb. 3.37 - Einfluss einer 1 h Inkubation von Inselzellclustern mit Badlösungen verschiedener Glucosekonzentrationen (0,5 bzw. 15 mM) sowie in An- und Abwesenheit von 10 µM Gliclazid sowie 50 µM Gallopamil auf die intrazelluläre ROS-Akkumulation

Abb. 3.37 zeigt, dass die einstündige Inkubation von Inselzellclustern in einer Badlösung mit 15 mM Glucose zu einer ROS-Akkumulation führte (G0,5: 395 ± 55 , $n=36$; G15: 666 ± 55 a.u., $n=32$, $p \leq 0,001$). 10 μM Gliclazid in Anwesenheit von 15 mM Glucose hatten keinen zusätzlichen Einfluss auf die intrazellulären ROS-Konzentrationen (G15 + 10 μM Gliclazid: 696 ± 60 a.u., $n=32$, n.s. zu G15). Auf eine tendenzielle, aber statistisch nicht signifikante Verringerung der ROS-Fluoreszenz auf 564 ± 40 a.u. durch die gleichzeitige Inkubation der Inselzellcluster mit 10 μM Gliclazid und 50 μM Gallopamil sei an dieser Stelle hingewiesen.

Um zu testen, inwiefern sich eine Langzeitinkubation mit Sulfonylharnstoffen auf die ROS-Akkumulation auswirkt, wurden Inselzellcluster ähnlich zu den Langzeitversuchen, die in Kap. 3.2.3.5 beschrieben wurden, für 24 h in Kulturmedium mit 15 mM Glucose in An- und Abwesenheit von 100 μM Tolbutamid bzw. 10 μM Gliclazid inkubiert. Als Kontrolle diente wiederum die signifikante ROS-Akkumulation durch 15 mM Glucose im Vergleich zu einer substimulatorischen Konzentration von 0,5 mM (G0,5: 193 ± 9 , $n=124$; G15: 423 ± 19 a.u., $n=100$, $p \leq 0,001$). Tolbutamid führte auch nach einer Inkubationsdauer von 24 h zu signifikant erhöhten ROS-Konzentrationen von durchschnittlich 539 ± 26 a.u. ($n=57$, $p \leq 0,001$ zu G15), wohingegen Gliclazid nach dieser langfristigen Inkubation sogar eine Reduktion der ROS auf 313 ± 24 a.u. bewirkte ($n=48$, $p \leq 0,001$ zu G15) (Abb. 3.38).

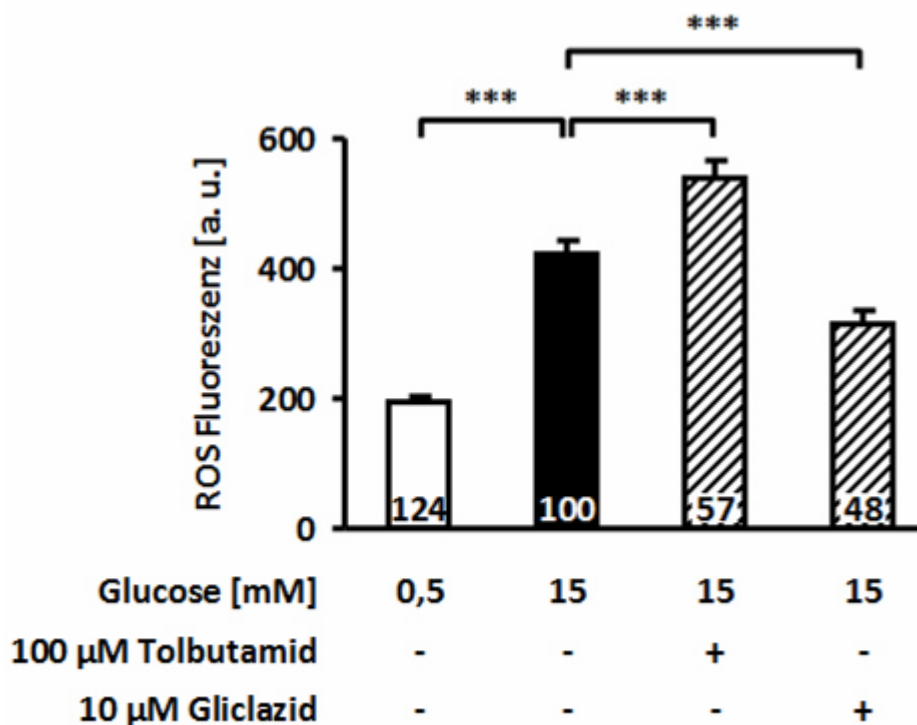


Abb. 3.38 - Einfluss einer 24 h Inkubation von Inselzellclustern mit Zellkulturmedien verschiedener Glucosekonzentrationen (0,5 bzw. 15 mM) sowie in An- und Abwesenheit von 100 μM Tolbutamid bzw. 10 μM Gliclazid auf die intrazelluläre ROS-Akkumulation

Um zu klären, weshalb Tolbutamid und Gliclazid in völlig gegensätzlicher Weise die intrazellulären ROS-Konzentrationen beeinflussen und ob die antioxidativen Enzyme für die fehlende ROS-Steigerung bei der Gliclazid-Inkubation ursächlich sind, wurden sowohl das Superoxiddismutase-Mimetikum TEMPOL als auch der SOD-Hemmstoff Na-DETC in weiteren ROS-Messungen eingesetzt.

Es wurden Inkubationsbedingungen ausgewählt, bei denen weder TEMPOL noch Na-DETC einen Effekt auf die *beta*-Zellfunktion vermitteln: Die einstündige Inkubation mit 1 mM TEMPOL in Anwesenheit von 15 mM Glucose beeinflusste die Insulinsekretion nicht (s. Tab. 3.10). In ROS-Messungen zeigte sich jedoch, dass die selben Inkubationsbedingungen zu einem Anstieg der ROS-Fluoreszenz führte (G15: 588 ± 34 , $n=24$; + 1 mM TEMPOL: 3012 ± 86 a.u., $n=30$, $p \leq 0,001$) (Abb. 3.39 A). Im Rahmen der Diplom-Arbeit von Bettina Winter (2011) konnte nachgewiesen werden, dass die einstündige Inkubation von Inseln mit 10 μ M Na-DETC in Anwesenheit von 15 mM Glucose keinen Effekt auf die Insulinsekretion hatte. Die Hemmung der zellulären SOD-Aktivität durch Na-DETC hatte ebenfalls keinen messbaren Einfluss auf die intrazellulären ROS-Konzentrationen (G15: 789 ± 59 , $n=31$; + 10 μ M Na-DETC: 748 ± 99 a.u., $n=28$, n.s.) (Abb. 3.39 B).

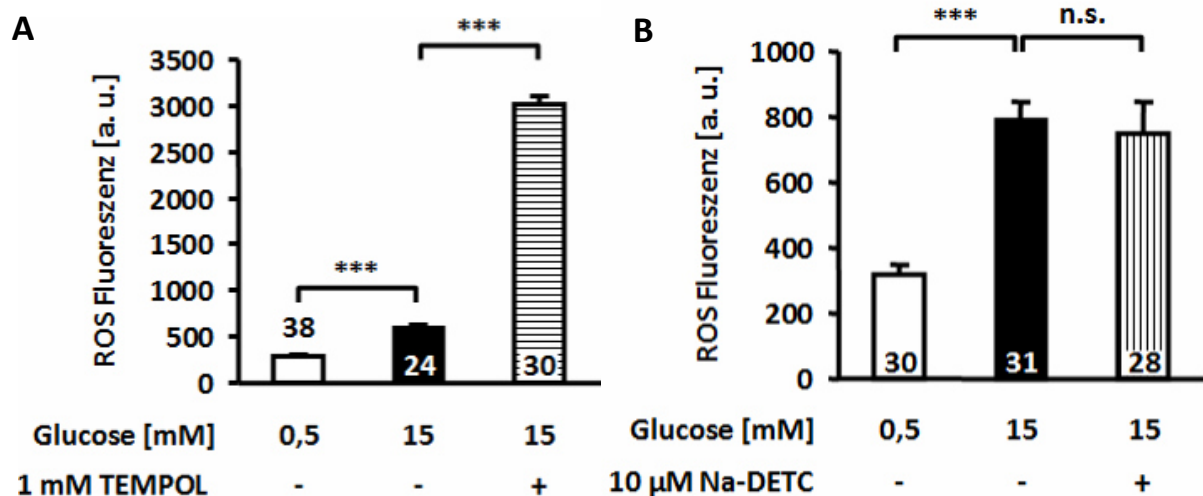


Abb. 3.39 - Einfluss einer 1 h Inkubation von Inselzellclustern mit Badlösungen verschiedener Glucosekonzentrationen (0,5 bzw. 15 mM) sowie in An- und Abwesenheit von 1 mM TEMPOL (A) bzw. 10 μ M Na-DETC (B) auf die intrazelluläre ROS-Akkumulation

In einem weiteren Experiment sollte geprüft werden, ob die durch 1 mM TEMPOL verursachte starke Fluoreszenzänderung tatsächlich auf einer vermehrten Produktion von ROS (z.B. H_2O_2) beruht und durch gleichzeitige Inkubation mit Gliclazid gesenkt werden kann. Außerdem muss erwartet werden, dass die zusätzliche Hemmung der zellulären Superoxiddismutase durch Na-DETC keinen Einfluss auf die ROS-Konzentration hat, da das molekulare Mimetikum die Abbaureaktion weiterhin ausführt.

10 μM Gliclazid konnte die durch 1 mM TEMPOL hervorgerufene ROS-Akkumulation nicht senken (G15 + 1 mM TEMPOL: 2736 ± 72 , $n=39$; + 10 μM Gliclazid: 2600 ± 99 a.u., $n=31$, n.s.), wohingegen die gleichzeitige Inkubation von TEMPOL und 10 μM Na-DETC bemerkenswerterweise zu einer signifikanten ROS-Minderung führte (+ 10 μM Na-DETC: 977 ± 122 , $n=28$, $p \leq 0,001$) (Abb. 3.40).

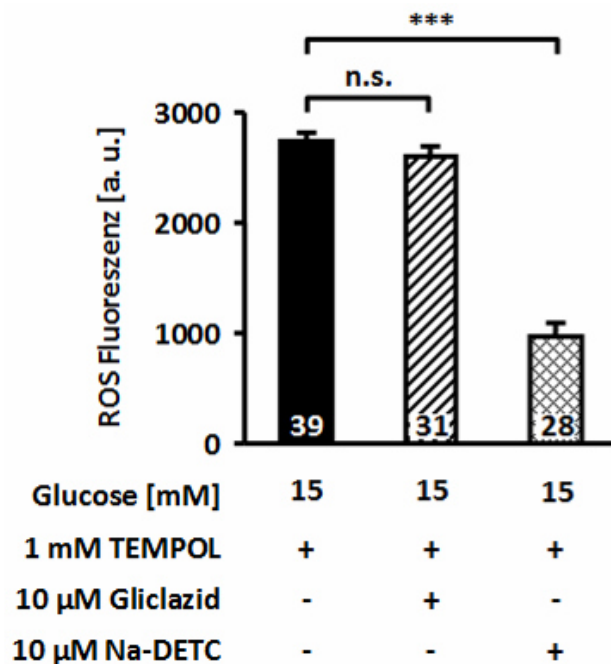


Abb. 3.40 - Einfluss einer 1 h Inkubation von Inselzellclustern mit Badlösungen verschiedener Glucosekonzentrationen (0,5 bzw. 15 mM) sowie in An- und Abwesenheit von 1 mM TEMPOL, 10 μM Gliclazid bzw. 10 μM Na-DETC auf die intrazelluläre ROS-Akkumulation

Diese Experimente zeigen, dass die Nachahmung lediglich eines antioxidativen Enzyms - der SOD mit TEMPOL - zu einer übermäßigen intrazellulären ROS-Akkumulation führt. Es gibt Hinweise in der Literatur, dass der verwendete ROS-Fluoreszenzfarbstoff (DCDHF) besonders sensitiv gegenüber H_2O_2 ist, welches maßgeblich bei der durch die SOD katalysierten und durch TEMPOL nachgeahmten Abbaureaktion von Superoxidanion-Radikalen entsteht (Tang et al. 2007). Interessanterweise konnte Gliclazid diese ROS-Akkumulation nicht senken, was sowohl gegen ausgeprägte Scavenger-Eigenschaften des Gliclazid-Moleküls gegenüber H_2O_2 als auch gegen die durch Gliclazid induzierte erhöhte Aktivität antioxidativer Enzyme innerhalb der relativ kurzen Inkubationszeit von 1 h spricht. Eine gleichzeitig erhöhte Aktivität von Katalase oder Glutathionperoxidase hätte einen senkenden Einfluss auf die H_2O_2 -Konzentration haben müssen. Für die beobachtete intrazelluläre ROS-Senkung durch längere Gliclazid-Inkubationen konnte also nicht nur die erhöhte Aktivität der SOD sondern auch die der Katalase und Glutathionperoxidase verantwortlich sein.

Die Hemmung der endogenen SOD durch 10 μM Na-DETC führte zu keiner messbaren Veränderung der intrazellulären ROS-Konzentrationen. Erwartungsgemäß müsste durch eine verminderte SOD-Aktivität die intrazelluläre Konzentration an Superoxidanion-Radikalen zunehmen. Entweder war die gewählte Konzentration von Na-DETC zu gering oder der ROS-Fluoreszenzfarbstoff war nicht in der Lage die erhöhte Konzentration an Superoxidanion-Radikalen zu erfassen, das in Einklang mit den Experimenten mit TEMPOL stehen würde. Da die gleichzeitige Inkubation von 1 mM TEMPOL mit 10 μM Na-DETC zu einer deutlichen Reduktion der ROS-Akkumulation in Anwesenheit von 15 mM Glucose führte, muss angenommen werden, dass eine Interaktion zwischen den Substanzen und dem Fluoreszenzfarbstoff eintrat, die eine zuverlässige Aussage aus den Experimenten mit Na-DETC unmöglich machte.

Zusammenfassung

Neben ihrer insulinotropen Wirkung führen Sulfonylharnstoffe über die K_{ATP} -Kanalinhibition und dem Öffnen spannungsabhängiger L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle auch zu einer Ca^{2+} -abhängigen Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi$. Dieser Effekt ließ sich sowohl bei akuter Gabe als auch nach längerer Inkubationsdauer (über Nacht) beobachten.

Die ROS-Akkumulation in *beta*-Zellen war glucoseabhängig und bei einer stimulatorischen Glucosekonzentration von 15 mM durch einen L-Typ- Ca^{2+} -Kanalblocker nicht beeinflussbar. Darüber hinaus ließ sich die niedrige ROS-Konzentration bei einer substimulatorischen Glucosekonzentration von 0,5 mM nicht durch Maßnahmen beeinflussen, die zu einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führten.

Durch Tolbutamid wurde das ROS-Niveau von mit 15 mM Glucose stimulierten *beta*-Zellen sowohl akut (1 h) als auch bei längeren Inkubationen (24 h) gesteigert. Dieser Effekt war Ca^{2+} -abhängig. Gliclazid hingegen führte bei akuter Inkubation zu keiner vermehrten ROS-Akkumulation bei stimulierten *beta*-Zellen. In Langzeitinkubationen senkte Gliclazid die intrazellulären ROS-Konzentration.

Das SOD-Mimetikum TEMPOL führte zu einem Anstieg intrazellulärer ROS-Konzentrationen, sehr wahrscheinlich von H_2O_2 -Konzentrationen. Somit scheint für die langfristige ROS-Senkung durch Gliclazid nicht nur die erhöhte Aktivität der endogenen SOD sondern auch die der Cat und GPx eine Rolle zu spielen.

3.4 Schutzeffekt von Gliclazid vor HFD-induziertem *beta*-Zellschaden

In Kapitel 3.2.3.6 und 3.3.3 wurde dargestellt, dass Gliclazid *in vitro* die intrazelluläre ROS-Konzentration in Inselzellclustern senkte und so vermutlich davor schützte, dass unter glucolipotoxischen Bedingungen die Stimulus-Sekretionskopplung auf Ebene von $[Ca^{2+}]_c$ gestört wurde (s. Kap. 3.2.3.4). Wie in Kap. 1.6.6 ausgeführt, deuten auch eine Reihe von Untersuchungen aus anderen Arbeitsgruppen daraufhin, dass Gliclazid im Gegensatz zu den meisten anderen Sulfonylharnstoffen neben seiner klassischen insulinotropen Wirkung auch den oxidativen Status der *beta*-Zellen positiv beeinflusst. Daher sollte *in vivo* getestet werden, inwiefern die Überernährung durch eine Hochfettdiät (HFD) bei Mäusen diabetische Symptome auslöst und ob die Gabe von Gliclazid während der gesamten Dauer der Diät (12 Wochen) vor diesen Veränderungen schützen kann. Hierzu wurden zwei verschiedene Tagesdosen von Gliclazid ausgewählt (2,5 und 10 mg / kg Körpergewicht (KG)), um neben einer in der Literatur beschriebenen therapeutischen Dosierung (Sarkar et al. 2011), die bei Mäusen vermutlich wegen des insulinotropen Effekts die Blutglucosekonzentration senkt, auch mit einer geringeren Dosis zu testen, ob diese protektive Effekte aufweist ohne die Blutglucosekonzentration zu beeinflussen. Die Gliclazid-Dosen wurden den Mäusen bereits zwei Wochen (Woche -1 und 0) vor der HFD über das Trinkwasser appliziert, um einen möglichen antioxidativen Schutz zu induzieren. Als HFD wurde ein Futter mit 45 % Energie aus Fett (35 % Kohlenhydrate, 20 % Protein) ausgewählt, welches im Vergleich zur Standarddiät (SD) mit 10 % Energie aus Fett (66 % Kohlenhydrate, 24 % Protein) bereits in vorausgegangenen Projekten unserer Arbeitsgruppe bei männlichen C57/Bl6J Mäusen nach zwölf Wochen diabetestypische Symptome auslöste. Die Gliclazid-Gaben über das Trinkwasser wurden während der gesamten HFD-Periode beibehalten (Abb. 3.41).

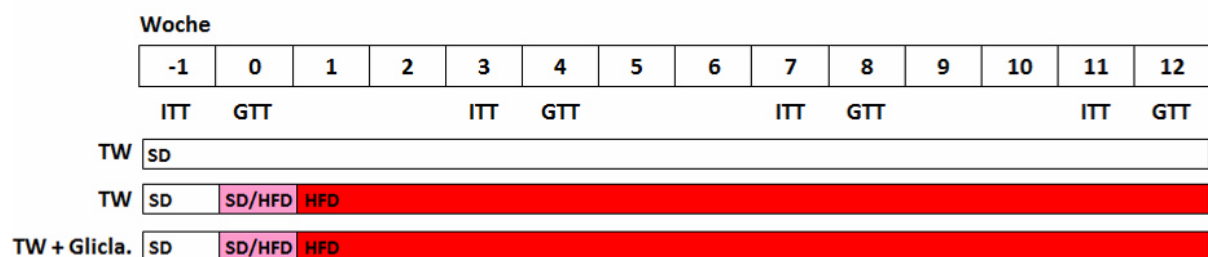


Abb. 3.41 - Schematische Darstellung der In-vivo-Versuche mit Mäusen auf Standarddiät (SD) mit Trinkwasser (TW) oder auf Hochfettdiät (HFD) mit TW bzw. Gliclazid (2,5 und 10 mg / kg KG) in TW - Alle vier Wochen wurde ein Insulin- bzw. Glucosetoleranztest (ITT, GTT) durchgeführt. Mäuse, die nach einem zweiwöchigen Vorlauf HFD bekamen, erhielten zur Gewöhnung eine Woche Mischdiät (SD/HFD).

3.4.1 Einfluss von HFD und Gliclazid auf den Gewichtsverlauf

Der deutlichste Parameter, auf den sich der Konsum der verschiedenen Diäten bei Mäusen auswirkt, ist die sichtbare Zunahme ihrer Körpermasse, die sich anhand des wöchentlich ermittelten Körpergewichtes in einem Verlauf darstellen lässt (Abb. 3.42). Es zeigte sich, dass nach fünf Wochen HFD der Unterschied im Körpergewicht gegenüber Mäusen auf SD signifikant wurde und im weiteren Verlauf zu immer größeren Unterschieden führte. Interessanterweise konnte ab der zehnten Woche beobachtet werden, dass die Tagesdosis von 10 mg Gliclazid / kg KG bei Mäusen auf HFD zu einer deutlich verminderten Gewichtszunahme im Vergleich zu Mäusen auf HFD ohne Gliclazid führte. Bei der niedrigeren Gliclazid-Dosis trat dieser Effekt nicht auf. Nach zwölf Wochen wogen die Mäuse auf HFD durchschnittlich $31,5 \pm 0,6$ g ($n=10$) und unterschieden sich damit deutlich von ihrer Kontrollgruppe (Mäuse auf SD), die ein Körpergewicht von durchschnittlich $27,4 \pm 0,2$ g ($n=9$) hatten ($p \leq 0,001$). Die niedrigere Gliclazid-Dosis von 2,5 mg nahm keinen Einfluss auf das Körpergewicht (Woche 12 unter HFD + 2,5 mg Gliclazid: $31,3 \pm 0,2$ g, $n=10$, zu HFD n.s.), doch 10 mg Gliclazid führten zu einem signifikant geringeren Gewicht (Woche 12 unter HFD + 10 mg Gliclazid: $29,7 \pm 0,4$ g, $n=10$, zu HFD $p \leq 0,01$).

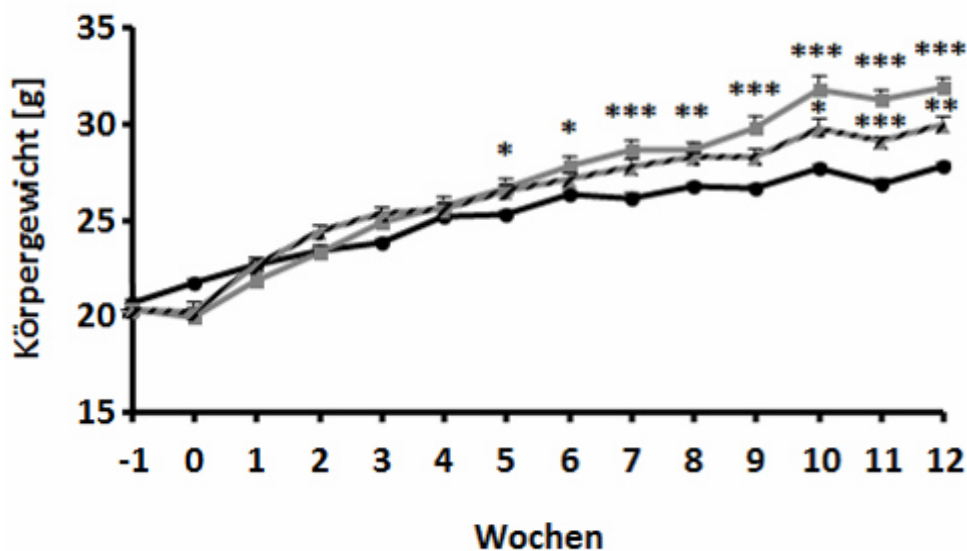


Abb. 3.42 - Einfluss der SD bzw. HFD (gegeben ab Woche 1) sowie 10 mg / kg KG Gliclazid-Tagesdosis (ab Woche -1) auf den Gewichtsverlauf von männlichen C57/Bl6J-Mäusen - SD: schwarzer Graph mit kreisförmigen Datenpunkten, HFD: grau mit Quadraten, HFD + 10 mg Gliclazid / kg KG / d: schwarz-grau schraffiert mit Dreiecken - Getestet wurde die statistische Signifikanz des Verlaufs von Mäusen auf SD gegen Mäuse auf HFD sowie die Gruppen HFD gg. HFD + 10 mg Gliclazid

3.4.2 Futtermittelverbrauch und Trinkmenge

Ziel dieser HFD war es, bei Mäusen über einen Zeitraum von drei Monaten eine erhöhte Kalorienzufuhr zu erreichen. Dies wird über das Fressverhalten der Tiere gesteuert und kann dementsprechend bei erhöhtem oder vermindertem Futtermittelverbrauch variieren. Daher wurde wöchentlich der durchschnittliche Futtermittelverbrauch pro Gruppe ermittelt und in einem kumulativen Verlauf dargestellt. Abb. 3.43 zeigt, dass es über einen Zeitraum von drei Monaten zu keinem unterschiedlichen Fressverhalten der Gruppen kam und kumulativ gleichviel Futter konsumiert wurde (pro Maus in 12 Wochen unter SD: $300,0 \pm 2,4$ g, $n=7$; HFD: $296,3 \pm 4,1$ g, $n=10$; + 2,5 mg Gliclazid: $302,0 \pm 6,4$ g, $n=7$; + 10 mg Gliclazid: $290,4 \pm 4,3$ g, $n=9$). Diese Ergebnisse stellen sicher, dass Mäuse auf HFD einer erhöhten Kalorienzufuhr ausgesetzt waren.

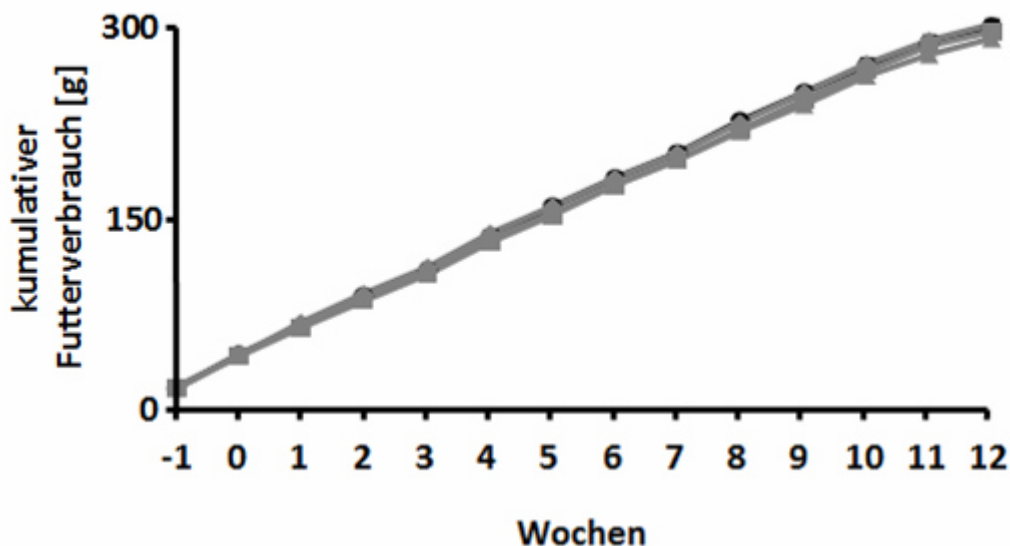


Abb. 3.43 - **Kumulativer Futtermittelverbrauch pro Maus** - SD: schwarzer Graph mit kreisförmigen Datenpunkten, HFD: grau mit Quadraten, HFD + 10 mg Gliclazid / kg KG / d: schwarz-grau schraffiert mit Dreiecken - Alle Kurven überlagern sich vollständig.

Die Gliclazid-Tagesdosen wurden den Mäusen über das Trinkwasser appliziert und mussten daher auf das Körpergewicht und die durchschnittliche Trinkmenge bezogen werden. Daraus ergab sich ein weiterer Parameter, der zur Beurteilung der verschiedenen Diät- und Gliclazid-Einflüsse herangezogen werden kann. Die kumulative Auftragsweise in Abb. 3.44 verdeutlicht, dass es diätabhängig zu einem unterschiedlichen Trinkverhalten der Mäuse kam. Die erhöhte Kalorienzufuhr bewirkte eine deutlich reduzierte Flüssigkeitsaufnahme (pro Maus in 12 Wochen unter SD: $492,5 \pm 16,5$ ml, $n=4$; HFD: $434,1 \pm 10,4$ ml, $n=6$, $p \leq 0,01$), die durch die Gabe von Gliclazid noch weiter gesenkt wurde (pro Maus: 12 Wochen unter

HFD + 2,5 mg Gliclazid: $380,5 \pm 12,0$ ml, $n=7$, $p \leq 0,01$ zu HFD; + 10 mg Gliclazid: $394,7 \pm 17,1$ ml, $n=7$, n.s. zu HFD). Aufgrund dieses unterschiedlichen Trinkverhaltens wurde die jeweilige Gliclazid-Konzentration während der HFD entsprechend der vorgesehenen Tagesdosis angepasst (s. Kap. 2.6.1.5).

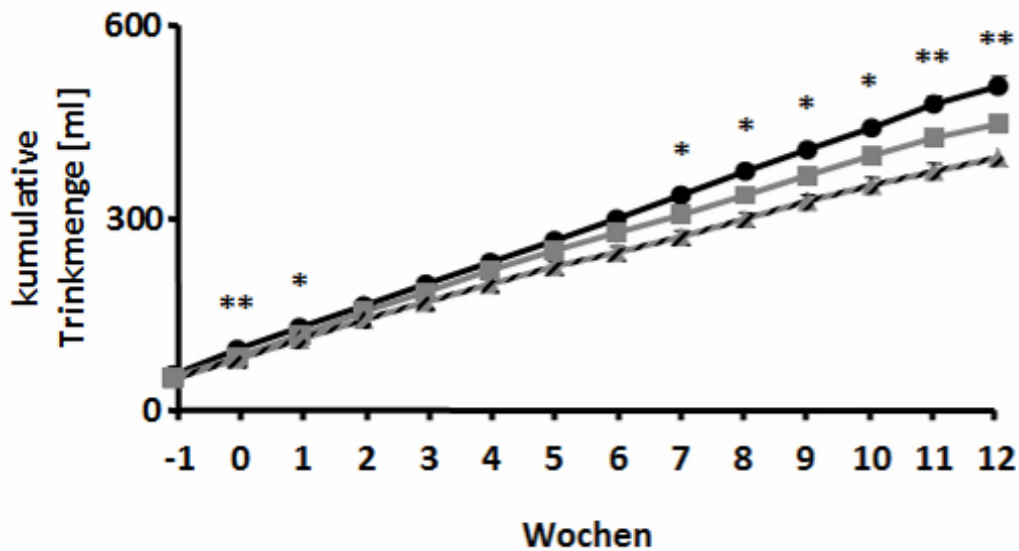


Abb. 3.44 - **Kumulative Trinkmenge pro Maus** - SD: schwarzer Graph mit kreisförmigen Datenpunkten, HFD: grau mit Quadraten, HFD + 10 mg Gliclazid / kg KG / d: schwarz-grau schraffiert mit Dreiecken - Getestet wurde die statistische Signifikanz von SD gegen HFD sowie die von HFD gg. HFD + 10 mg Gliclazid (n.s.)

3.4.3 Einfluss von HFD und Gliclazid auf die Blutglucosekonzentration

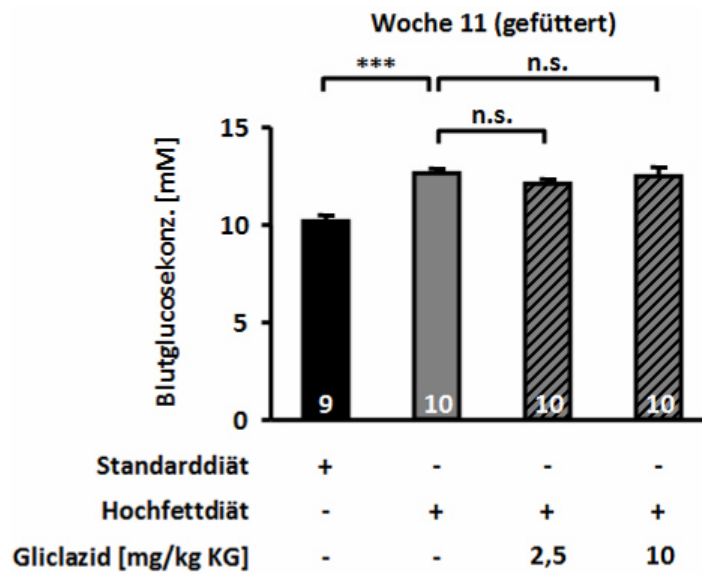
Im Rahmen der Glucosetoleranz- und Insulinsensitivitätstests wurden während des Projektes regelmäßig die Blutglucosekonzentrationen der Mäuse gemessen. Im Hinblick auf die labormedizinische Auswertung der Plasmaproben und die anschließenden In-vitro-Experimente werden im Folgenden die Werte zum Ende der Diät (11. bzw. 12. Woche) dargestellt, da sie in diesem Zusammenhang am aussagekräftigsten sind (Abb. 3.45).

Hatten die Mäuse bis unmittelbar vor der Messung Zugang zur jeweiligen Diät und Trinkwasser bzw. ihrer jeweiligen Gliclazid-Lösung *ad libitum* (Abb. 3.45 A), konnte beobachtet werden, dass die Tiere auf HFD signifikant erhöhte Blutzuckerwerte hatten (SD: $10,16 \pm 0,3$ mM, n=9; HFD: $12,6 \pm 0,2$ mM Glucose, n=10, $p \leq 0,001$). Keine Gliclazid-Dosis konnte diesen Diäteinfluss verändern (HFD + 2,5 mg Gliclazid: $12,1 \pm 0,2$; + 10 mg Gliclazid: $12,5 \pm 0,4$ mM Glucose, n=10, jeweils n.s. zu HFD).

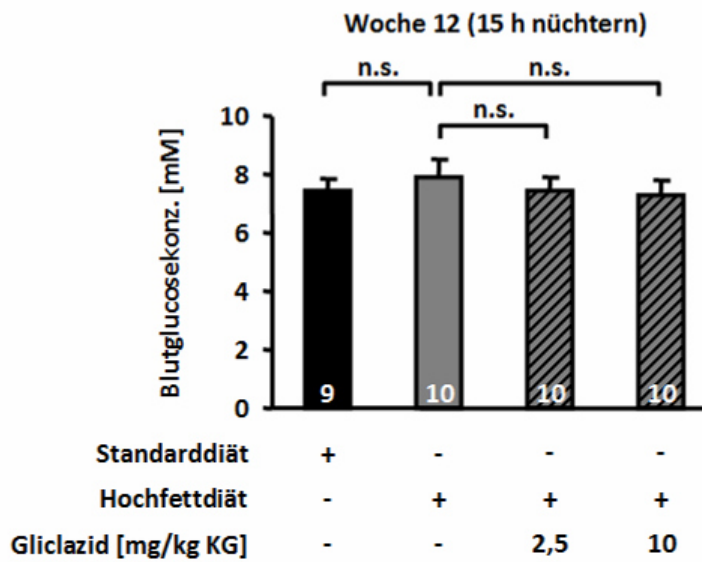
Für die Glucosetoleranztests wurden gemäß des in unserer Arbeitsgruppe etablierten Protokolls die Mäuse über Nacht (ca. 15 h) nüchtern gesetzt (Trinkwasser in allen Gruppen ohne Gliclazid-Zusatz *ad libitum*) (Abb. 3.45 B). Am nächsten Morgen zeigte sich, dass die Blutzuckerwerte im Vergleich zu den Werten gefütterter Tiere zwar in allen Gruppen erniedrigt waren, jedoch keine diätabhängigen Unterschiede mehr existierten (SD: $7,4 \pm 0,5$ mM, n=9; HFD: $7,9 \pm 0,6$ mM Glucose, n=10, n.s.). Auch Gliclazid hatte auf den Nüchternwert keinen Einfluss (HFD + 2,5 mg Gliclazid: $7,5 \pm 0,4$; + 10 mg Gliclazid: $7,3 \pm 0,5$ mM Glucose, n=10, jeweils n.s. zu HFD).

In einem weiteren Experiment wurde die Nahrungskarenz auf 6 h verkürzt (Abb. 3.45 C). In der Literatur wird diskutiert, inwieweit die Blutglucosekonzentration nach dieser Zeit die murinen Nüchtern- und HbA_{1c}-Werte am ehesten widerspiegelt, da bei längeren Nüchternzeiten womöglich bereits gegenregulatorische Mechanismen einsetzen (Han et al. 2008). Es ergab sich, dass unter diesen Bedingungen eine diätinduzierte Steigerung des Blutzuckers zu beobachten war (SD: $8,8 \pm 0,3$ mM, n=9; HFD: $9,9 \pm 0,4$ mM Glucose, n=10, $p \leq 0,05$). Gliclazid hatte darauf keinen Einfluss (HFD + 2,5 mg Gliclazid: $10,0 \pm 0,4$; + 10 mg Gliclazid: $10,1 \pm 0,4$ mM Glucose, n=10, jeweils n.s. zu HFD).

A



B



C

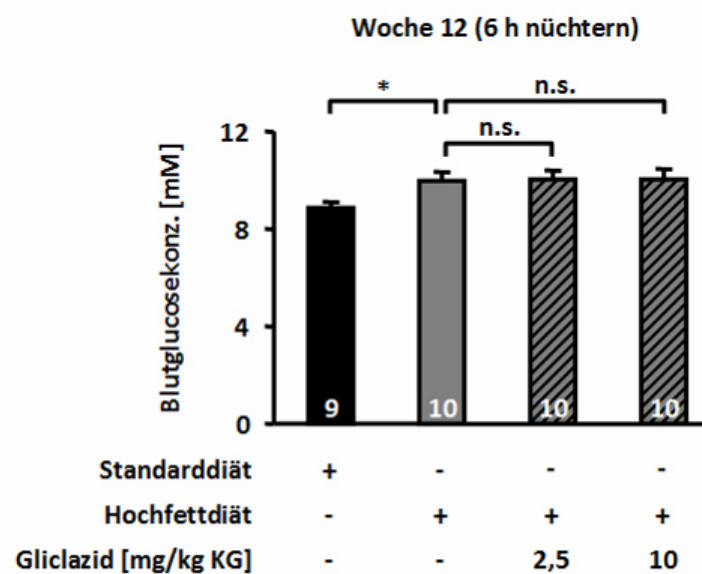


Abb. 3.45 - Einfluss von 11 bzw. 12 Wochen SD bzw. HFD sowie Gliclazid (2,5 und 10 mg / kg KG) auf die Blutglucosekonzentration - : gefüttert (A), 15 h nüchtern über Nacht (B) sowie 6 h nüchtern über Tag (C)

3.4.3.1 Ermittlung der Glucosetoleranz

Alle vier Wochen wurde ein Glucosetoleranztest (GTT) bei den Mäusen durchgeführt. Da erwartungsgemäß zum Ende des Projektes und damit beim vierten GTT der Einfluss der Diät am deutlichsten zu erkennen war, wird im Folgenden dieser Test vorgestellt (Abb. 3.46).

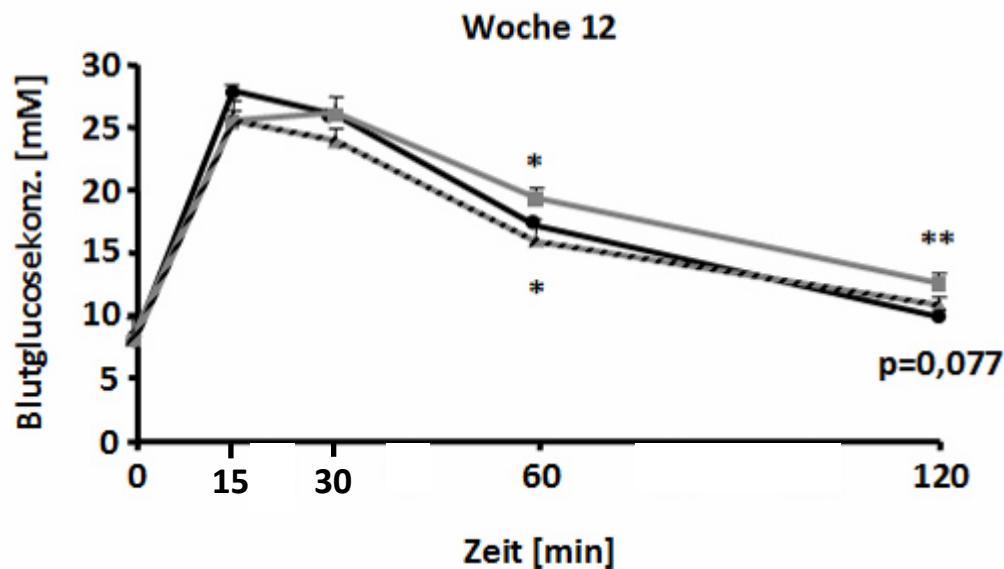


Abb. 3.46 - Glucosetoleranztest bei Mäusen nach 12 Wochen unter SD bzw. HFD sowie Gliclazid (2,5 und 10 mg / kg KG) - n=8-10 - SD: schwarzer Graph mit kreisförmigen Datenpunkten, HFD: grau mit Quadraten, HFD + 10 mg Gliclazid / kg KG / d: schwarz-grau schraffiert mit Dreiecken

Der GTT wurde bei den Mäusen protokollgemäß (s. Kap. 2.6.2.4) am Morgen nach einer etwa 15 h langen Nahrungskarenz durchgeführt. Wie schon in Kap. 3.4.3 dargestellt, konnten keine Unterschiede in den Nüchternblutzuckerwerten (Zeitpunkt 0 min) beobachtet werden. Nach der Applikation von 2 g Glucose / kg KG *intraperitoneal* (i.p.) wurde jeweils nach 15, 30, 60 und 120 min die Blutglucosekonzentration gemessen. Es zeigte sich, dass der Blutzucker der Mäuse aus der HFD-Kohorte zu den Zeitpunkten 60 und 120 min im Vergleich zu den Werten der Mäuse, die SD-Futter erhalten hatten, signifikant erhöht war. Mäuse hingegen, die HFD-Futter und eine Gliclazid-Tagesdosis von 10 mg erhalten hatten, verfügten über eine im Vergleich zur HFD-Kohorte verbesserte Glucosetoleranz, wobei der Wert bei 60 min signifikant und bei 120 min tendenziell ($p=0,077$) niedriger war.

Die Berechnung der Flächen unter den auf den Zeitpunkt 0 min normalisierten Kurven (AUC, *area under the curve*) erbrachte keine signifikanten Unterschiede, wobei auffiel, dass alle drei Gruppen, die HFD erhielten, tendenziell kleinere AUCs als die SD-Gruppe aufwiesen, was paradoxerweise auf eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der exogen zugeführten Glucose hinweisen könnte (Abb. 3.47).

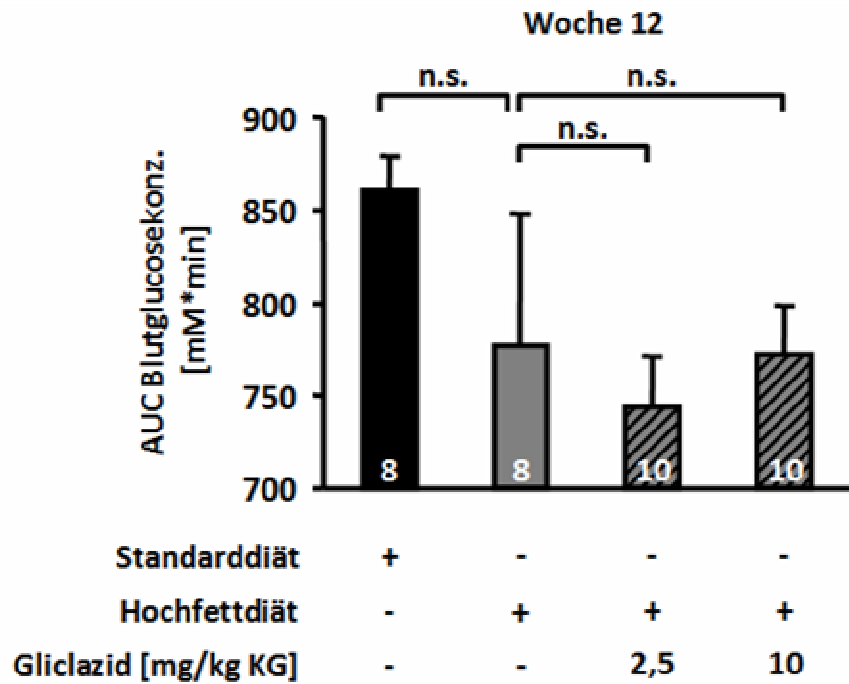


Abb. 3.47 - AUCs (*area under the curves*) der Messwerte des Glucosetoleranztests mit Mäusen nach 12 Wochen unter SD bzw. HFD sowie Gliclazid (2,5 und 10 mg / kg KG)

3.4.3.2 Ermittlung der Insulinsensitivität

Die Insulinsensitivität wurde im Rahmen eines Insulintoleranztests (ITT) ebenfalls alle vier Wochen ermittelt. Nach Bestimmen des Ausgangsblutzuckerwertes (0 min in Abb. 3.48) erhielten die Mäuse, die bis kurz vor dem Test Zugriff auf Futter und Trinkwasser oder Gliclazidlösung *ad libitum* hatten, eine Insulindosis von 1 I.E./ kg KG durch i.p. Injektion. Die Blutglucosekonzentration wurde zu den Zeitpunkten 15, 30 und 60 min nach Injektion gemessen. Im Folgenden wird der vierte und letzte ITT am Ende des Projektes vorgestellt, da er mögliche Diät- und Gliclazid-induzierte Einflüsse am besten darstellt. Da die Startwerte Blutglucosekonzentrationen im gefütterten Zustand darstellen und sich diese, wie bereits in Kap. 3.43 gezeigt, statistisch unterschieden, wurden alle Kurven auf den 0-min-Wert normalisiert. Sie stellen somit die Abnahme der Blutglucose durch die exogen zugeführte Insulindosis dar, welche abhängig von der peripheren Gewebesensitivität gegenüber Insulin ist (Abb. 3.48). Obwohl die Kurven nicht komplett deckungsgleich sind, kann zu keinem Zeitpunkt zwischen den Gruppen eine statistische Signifikanz ermittelt werden. Weder die Diät noch die zusätzliche Gabe von Gliclazid hatten somit einen Einfluss auf die Insulinsensitivität des peripheren Gewebes.

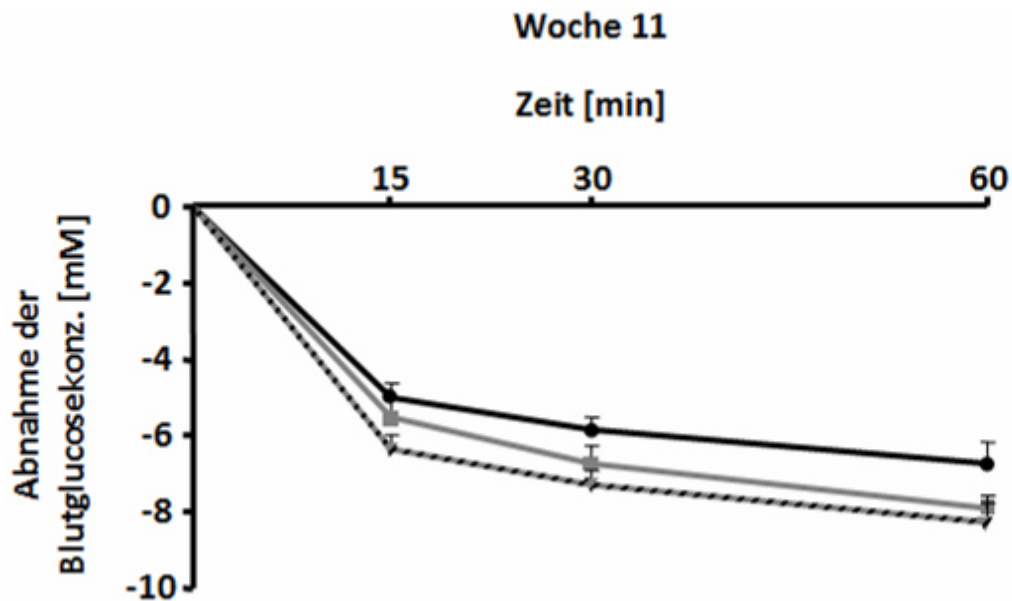


Abb. 3.48 - Insulinsensitivitätstest bei Mäusen nach 11 Wochen unter SD bzw. HFD sowie Gliclazid (2,5 und 10 mg / kg KG) - n=7-9 - SD: schwarzer Graph mit kreisförmigen Datenpunkten, HFD: grau mit Quadraten, HFD + 10 mg Gliclazid / kg KG / d: schwarz-grau schraffiert mit Dreiecken - Dargestellt sind die Veränderungen der Blutglucosekonzentration (mM) nach Injektion von Insulin.

Auch die Berechnung der AUCs ergab keine Signifikanz, wobei größere Werte in diesem Fall eine verbesserte Insulinsensitivität widerspiegeln könnten. Paradoxerweise zeigte sich hier, dass alle HFD-Gruppen tendenziell sensitiver gegenüber Insulin waren (Abb. 3.49).

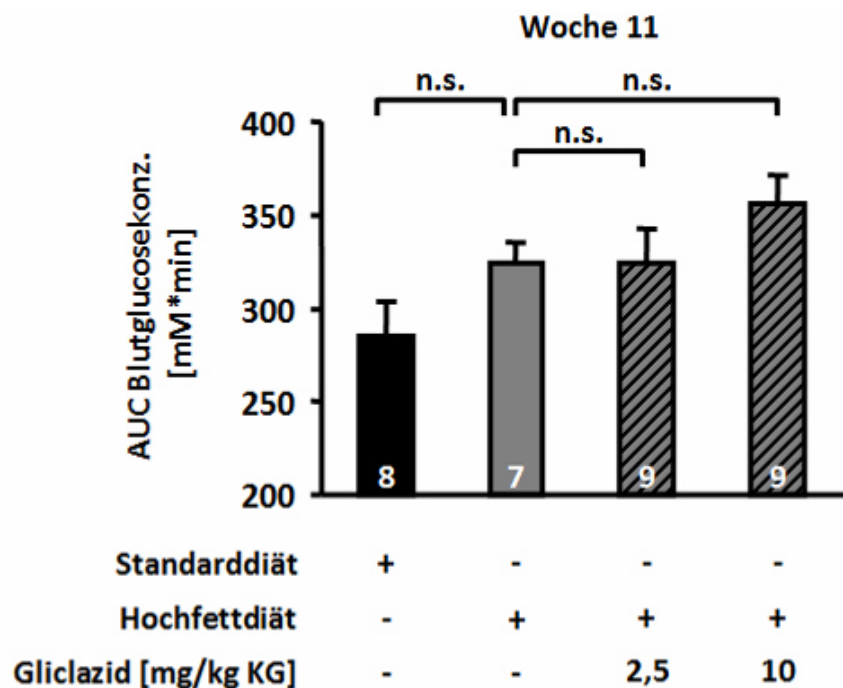


Abb. 3.49 - AUCs (*area under the curves*) der Messwerte des Insulinsensitivitätstest nach 11 Wochen unter SD bzw. HFD sowie Gliclazid (2,5 und 10 mg / kg KG) – AUC-Berechnung aus den normalisierten Kurven

3.4.3.3 Weitere Glucosetoleranz- und Insulinsensitivitätstests

Im Folgenden (Abb. 3.50) werden die jeweils drei Tests zur Glucosetoleranz bzw. Insulinsensitivität in chronologischer Reihenfolge aufgeführt, die den in Kap. 3.4.3.1 und 3.4.3.2 dargestellten Tests vorausgingen.

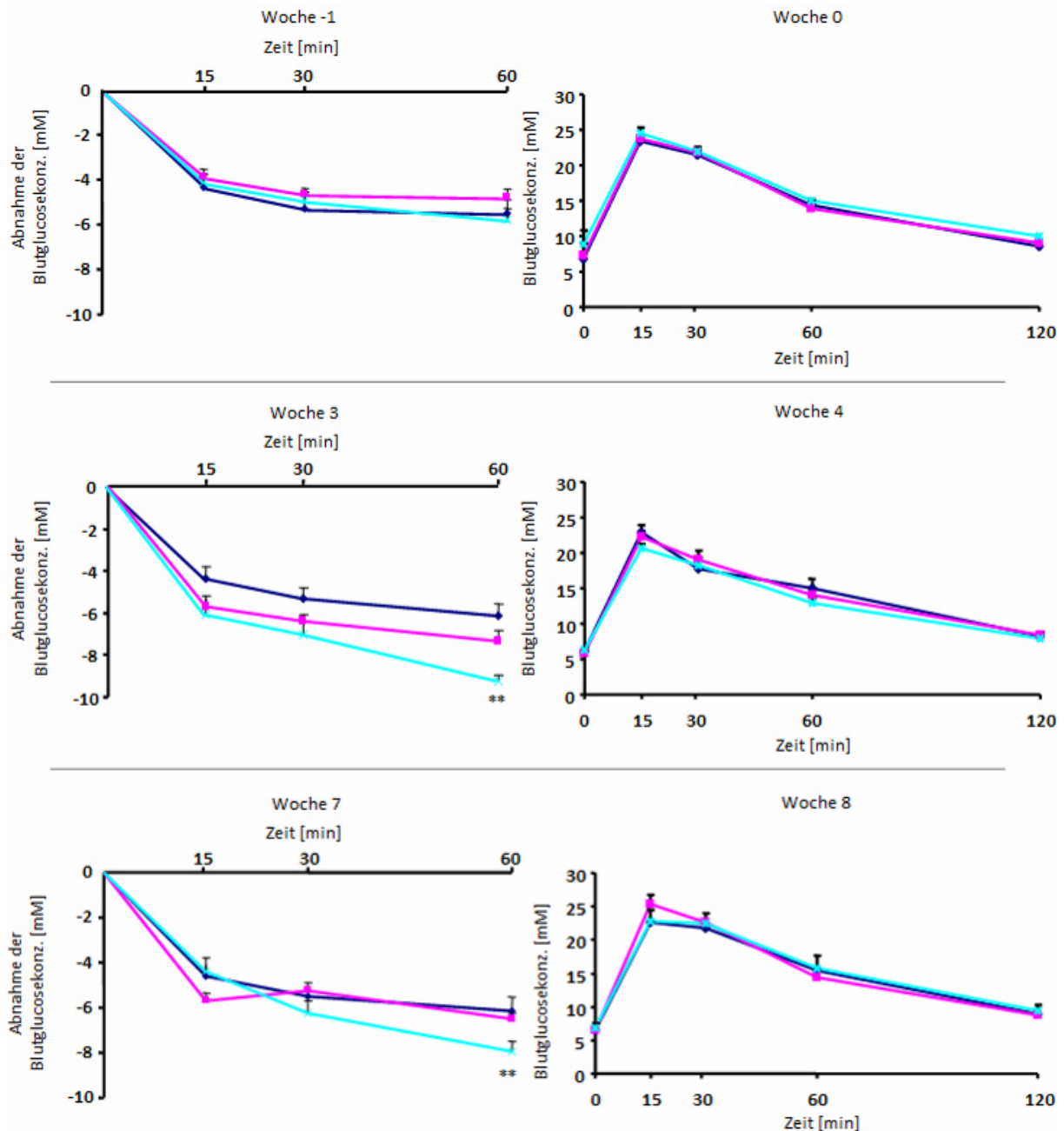


Abb. 3.50 - Insulinsensitivitätstests (linke Seite, n=7-10) und Glucosetoleranztests (rechte Seite, n=9-10) bei Mäusen während der In-vivo-Studie unter SD bzw. HFD sowie Gliclazid (2,5 und 10 mg / kg KG) - SD: dunkelblauer Graph mit rautenförmigen Datenpunkten, HFD: rosa mit Quadraten, HFD + 10 mg Gliclazid / kg KG / d: türkis mit Kreuzen – ITT: Dargestellt sind die Veränderungen der Blutglucosekonzentration (mM) nach Injektion von Insulin.

3.4.4 Labormedizinische Diagnostik

Im Anschluss an das HFD-Projekt wurden den Mäusen Plasmaproben entnommen (s. Kap. 2.6.2.5) und einer labormedizinischen Diagnostik (Kooperation mit PD Dr. med. Andreas Peter) im Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen zugeführt. Neben der Ermittlung der Plasmainsulinkonzentrationen (gefütterte Mäuse) am Ende der Diäten (Abb. 3.51) wurden auch verschiedene Lipide wie freie Fettsäuren, Triglyzeride, Cholesterin (Gesamt, HDL und LDL) sowie die Gesamtproteinmenge, Harnstoffkonzentration und die Aktivität von drei Leberenzymen bestimmt (Tab. 3.23).

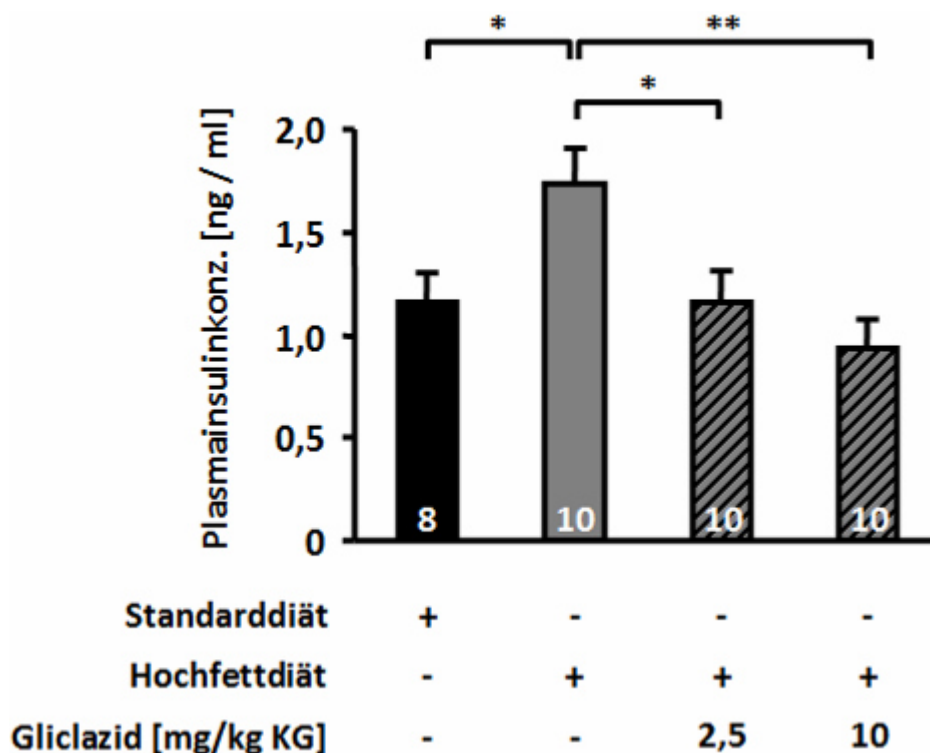


Abb. 3.51 – Plasmainsulinkonzentration von Mäusen nach 12 Wochen SD bzw. HFD sowie Gliclazid (2,5 und 10 mg / kg KG) - Die Tiere hatten bis unmittelbar vor der Blutentnahme Zugang zu Futter und Trinkwasser bzw. ihrer jeweiligen Gliclazid-Lösung *ad libitum*.

Die Plasmainsulinkonzentration von Tieren der HFD-Gruppe war signifikant gesteigert. Interessanterweise waren Mäuse vor dieser hochfettdiätinduzierten Hyperinsulinämie durch die Gabe von Gliclazid in beiden Dosierungen geschützt.

Tab. 3.23 stellt die weiteren Labordaten dar. An dieser Stelle sei auf die durch HFD erhöhten Lipidwerte (freie Fettsäuren, Cholesterin, HDL, LDL) hingewiesen, die durch Gliclazid nicht beeinflusst werden. Die Aktivität der Leberenzyme war nach 12 Wochen HFD vermindert. Dies deutet zwar nicht auf einen akuten Leberschaden hin (dabei würde es zu einem deutlichen Anstieg kommen), kann aber durch fettinduzierte Umbauprozesse des Lebergewebes auch nicht befriedigend erklärt werden.

	Standarddiät	Hochfettdiät	Hochfettdiät + 2,5 mg / kg KG Gliclazid	Hochfettdiät + 10 mg / kg KG Gliclazid
Cholesterin (mg/dl)	162,3 ± 6,7	215,5 ± 15,3 **	201,8 ± 12,3	191,9 ± 7,2
HDL (mg/dl)	67,5 ± 4,0	91,6 ± 6,6 **	83,2 ± 4,8	81,5 ± 3,8
LDL (mg/dl)	6,2 ± 0,3	11,3 ± 2,1 *	11,2 ± 1,2	9,4 ± 0,7
Triglyceride (mg/dl)	131,2 ± 15,5	131,8 ± 12,6	102,7 ± 7,6	107,4 ± 3,5
freie Fettsäuren (µmol/l)	761,3 ± 75,5	1161,0 ± 113,3 **	1047,2 ± 232,2	1038,3 ± 251,4
Eiweiß (g/dl)	6,2 ± 0,3	6,4 ± 0,3	5,3 ± 0,2 **	5,3 ± 0,2 **
Harnstoff (mg/dl)	79,1 ± 4,1	52,6 ± 2,9 ***	46,0 ± 2,4	61,7 ± 15,3
Alkalische Phosphatase (U/l)	103,3 ± 8,2	64,5 ± 8,6 **	45,0 ± 2,9 *	44,4 ± 2,4 *
Glutamat- Oxalacetat- Transaminase (U/l)	312,8 ± 46,0	263,5 ± 32,5	286,1 ± 60,4	221,1 ± 22,4
Glutamat- pyruvat- transaminase (U/l)	44,4 ± 3,3	47,0 ± 3,3	47,8 ± 4,3	36,7 ± 2,5 * †

Tab. 3.23 - Einfluss von SD bzw. HFD sowie Gliclazid (2,5 u. 10 mg / kg KG) auf verschiedene Plasmawerte - n=8-10 - Dargestellt sind die Plasmakonzentrationen 12 Wochen nach Beginn der Diäten. - Mäuse hatten Zugang zu Futter und Trinkwasser bzw. der jeweiligen Gliclazid-Lösung *ad libitum*. - *: Statistische Signifikanz von SD gegen HFD bzw. HFD gg. HFD + Gliclazid, †: Sign. zwischen 2,5 u. 10 mg / kg KG Gliclazid

3.4.5 In-vitro-Experimente mit Inseln aus der In-vivo-Studie

Nach Präparation der Mäuse der In-vivo-Studie wurden ihre Inseln direkt für die Steady-state-Inkubation zur Bestimmung der Insulinsekretion verwendet oder zur fluoreszenzoptischen Bestimmung ihres ROS-Gehaltes zu Inselzellclustern trypsinisiert und bis zum nächsten Tag kultiviert. Ein Teil der Inseln wurde für die Ermittlung ihrer Granularität ebenfalls bis zum nächsten Tag in Zellkulturmedium überführt.

3.4.5.1 Einfluss von HFD und Gliclazid auf die Insulinsekretion

Um zu prüfen, welchen Einfluss die HFD und die Gabe der beiden Gliclazid-Dosierungen auf die glucosestimulierte Insulinsekretion hat, wurden die Inseln der verschiedenen Testreihen einer unter physiologischen Bedingungen substimulatorischen Glucosekonzentration von 3 mM sowie einer stimulatorischen von 15 mM für eine Stunde ausgesetzt und die Insulinkonzentration im Überstand per RIA vermessen.

Unter physiologischen Bedingungen ist die Insulinmenge, die aus stimulierten Inseln freigesetzt wird, deutlich größer als die aus unstimulierten Inseln sezernierte Menge. Bildet man den Quotienten aus der bei 15 mM und bei 3 mM Glucose sezernierten Insulinmenge, muss der daraus resultierende Stimulationsindex also deutlich größer als 1,0 sein. Tab. 3.24 stellt dar, wie oft dies in den jeweiligen Gruppen der Fall ist.

Standarddiät	Hochfettdiät	+ 2,5 mg / kg KG / d Gliclazid	+ 10 mg / kg KG / d Gliclazid
5 von 6 Präparationen	3 von 7 Präparationen	7 von 7 Präparationen	6 von 7 Präparationen

Tab 3.24 - Anzahl der Präparationen, welche über einen Stimulationsindex von größer als 1,0 verfügten.

Von den sechs Inselpräparationen aus Tieren, die SD erhalten hatten, war eine nicht durch Glucose stimulierbar (G3: 1,8; G15: 1,0 ng Insulin/(Insel*h)) und wurde somit ausgeschlossen. Die restlichen Präparationen hatten eine basale Insulinsekretion von $0,3 \pm 0,02$ ng Insulin/(Insel*h) (n=5). Mit 15 mM Glucose stimulierte Inseln sezernierten $1,0 \pm 0,3$ ng Insulin/(Insel*h) (n=5). In der Gruppe der HFD-Kohorte fiel auf, dass drei von sieben Präparationen über einen physiologischen Stimulationsindex (>1) und gleichzeitig auch über normale Insulinsekretionsraten verfügten (G3: $0,3 \pm 0,1$; G15: $1,2 \pm 0,6$ ng Insulin/(Insel*h), n=3, n.s. zu SD). Im Vergleich zur SD wurden die Inseln der restlichen vier Präparationen aus Tieren auf HFD sowohl durch 3 als auch durch 15 mM Glucose deutlich mehr stimuliert (G3: $5,6 \pm 1,5$; G15: $4,8 \pm 1,4$ ng Insulin/(Insel*h), n=4, jeweils $p \leq 0,001$ zu SD) und waren daher in ihrer Glucoseresponsivität deutlich unterschiedlich.

Betrachtet man die zwei HFD-Kohorten, die Gliclazid erhalten hatten, verfügten die Inseln einer Präparation (HFD + 10 mg / kg KG Gliclazid) über einen Stimulationsindex von weniger als 1,0. Um die Beobachtung einer möglichen protektiven Wirkung von Gliclazid auf die Insulinsekretion nicht durch Ausschlusskriterien zu beeinflussen, wurde diese Präparation in die Auswertung miteinbezogen.

Es zeigte sich, dass die Applikation von Gliclazid vor und während der HFD die basale Insulinsekretion und die Stimulierbarkeit der Inseln auf einem ähnlichen Niveau wie die der SD-Kohorte hielt (Abb. 3.52).

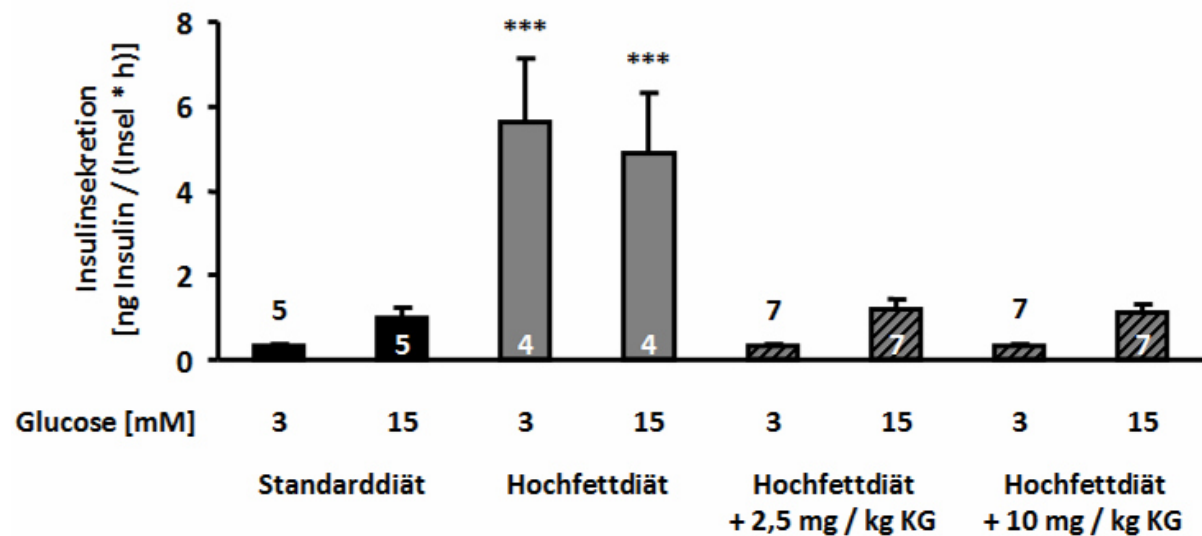


Abb. 3.52 - Einfluss von 12 Wochen SD bzw. HFD sowie Gliclazid (2,5 u. 10 mg / kg KG) auf die Insulinsekretion isolierter Inseln unter Anwesenheit einer substimulatorischen (3 mM) und stimulatorischen (15 mM) Glucosekonzentration - Die Insulinsekretion der Inseln, die aus Tieren der HFD-Gruppe gewonnen wurden, sind bei Stimulation mit 3 mM und 15 mM Glucose jeweils im Vergleich zur Sekretionsleistung von Inseln aus Tieren der SD-Gruppe und der HFD-Gruppen mit Gliclazid signifikant erhöht.

	Standarddiät [ng Insulin/(Insel*h)]	Hochfett diät [ng Insulin/(Insel*h)]	+ 2,5 mg / kg KG Gliclazid [ng Insulin/(Insel*h)]	+ 10 mg / kg KG Gliclazid [ng Insulin/(Insel*h)]	n
G3	0,3 ± 0,02	5,6 ± 1,5	0,3 ± 0,04	0,3 ± 0,1	4-7
G15	1,0 ± 0,3	4,9 ± 1,4	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,2	4-7

Tab. 3.25 - Dargestellt sind die Werte der Insulinsekretionsmessungen aus Abb. 3.51

Bezieht man die Sekretionsleistung von stimulierten Inseln innerhalb der einstündigen Inkubation mit 15 mM Glucose auf ihren Insulingehalt und wendet die oben beschriebenen Ausschlusskriterien an, erkennt man, dass die Inseln der HFD-Kohorte im Vergleich zu denen aus der SD-Kohorte prozentual mehr Insulin sezernierten (SD: 1,2 ± 0,3 %, n=5; HFD: 8,9 ±

3,3 % vom Gehalt, $n=4$, $p \leq 0,05$). Sowohl 2,5 als auch 10 mg Gliclazid konnten diese HFD-induzierten Effekte verhindern. Die Inseln dieser Mäuse sezernierten bezogen auf ihren Gehalt ähnlich viel Insulin wie Inseln aus Tieren der SD-Gruppe (HFD + 2,5 mg Gliclazid: $2,0 \pm 0,2$ %, $n=6$; + 10 mg Gliclazid: $1,6 \pm 0,3$ % vom Gehalt, $n=7$, jeweils $p \leq 0,05$ zu HFD) (Abb. 3.53). Da bei einer Inselpräparation aus der HFD-Kohorte mit 2,5 mg Gliclazid der Insulingehalt außerhalb des RIA-Messbereichs lag, wurde dieser Wert nicht gebildet.

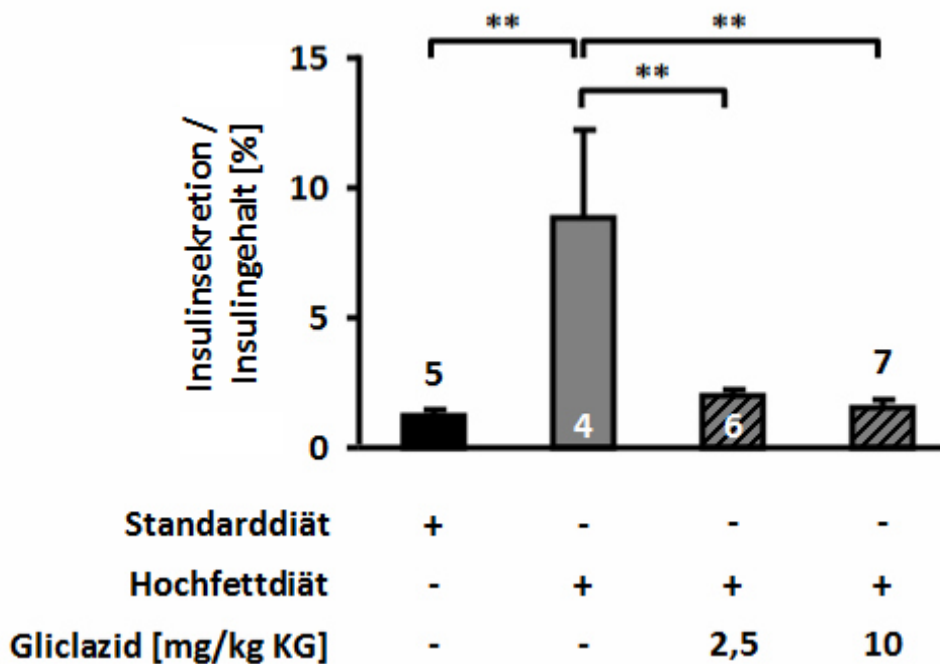


Abb. 3.53 - Einfluss von 12 Wochen SD bzw. HFD sowie Gliclazid (2,5 u. 10 mg / kg KG) auf die Insulinsekretion bezogen auf den jeweiligen Insulingehalt bei mit 15 mM Glucose stimulierten Inseln - Bei HFD + 2,5 mg Gliclazid konnte ein Wert nicht gebildet werden, da der Insulingehalt dieser Inseln außerhalb des RIA-Messbereichs lag.

3.4.5.2 Einfluss von HFD und Gliclazid auf die Inselgranularität

Um zu testen, ob die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Bestimmung der Inselgranularität auch Aufschluss über Veränderungen der Inseln durch Diät- und Gliclazid-Einflüsse geben kann, wurden Inseln nach Übernacht-Kultur abfotografiert und wie in Kap. 2.4.2 beschrieben ausgewertet. Es stellten sich signifikante, jedoch verglichen zu den Ergebnissen in Kap. 3.2.3.1 eher kleine Unterschiede zwischen den verschiedenen Diäten heraus: So wurde für Inseln von Mäusen der SD-Gruppe eine durchschnittliche Granularität von $4,2 \pm 0,02$ px / μm^2 ($n=77$) ermittelt, die von Inseln aus Tieren der HFD mit $4,08 \pm 0,01$ px / μm^2 ($n=57$) signifikant ($p \leq 0,001$) unterschritten wurde. Für die HFD-Bedingungen mit 10 mg Gliclazid konnte eine Granularität von $4,02 \pm 0,01$ px / μm^2 ($n=125$) errechnet werden, die signifikant ($p \leq 0,001$) unter dem Niveau der Inseln aus Tieren liegt, denen HFD gefüttert wurde.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Werten für den Insulingehalt aus der RIA-Messung, zeigen sich zwischen SD und HFD ähnliche Tendenzen, die jedoch statistisch nicht sicherbar sind (Tab. 3.26).

	Standarddiät	Hochfettdiät	+ 2,5 mg / kg KG Gliclazid	+ 10 mg / kg KG Gliclazid
Granularität	4,2 ± 0,01 px / μm ² n=77	4,08 ± 0,01 px / μm ² n=57	-	4,02 ± 0,01 px / μm ² n=125
Insulingehalt	76,0 ± 7,6 ng / Insel n=5	60,9 ± 7,0 ng / Insel n=4	54,7 ± 9,7 ng / Insel n=6	60,8 ± 4,0 ng / Insel n=7

Tab. 3.26 - Gegenüberstellung der Werte für Granularität und Insulingehalt der Inseln nach 12 Wochen SD bzw. HFD sowie Gliclazid (2,5 u. 10 mg / kg KG) - Statistische Signifikanz der Granularität im Text angegeben, keine statistische Signifikanz (n.s.) zwischen den Werte für den Insulingehalt

3.4.5.3 Auswirkungen von HFD und Gliclazid auf die ROS-Akkumulation

Ob die auf Ebene der Insulinsekretion beobachtete *beta*-Zellschädigung durch HFD und der mit Gliclazid erreichte Schutzeffekt auf der Modulation intrazellulärer ROS beruht, sollte im Folgenden überprüft werden. Hierfür wurden Inselzellcluster der verschiedenen Kohorten nach Übernacht-Kultur für eine Stunde verschiedenen Glucosekonzentrationen ausgesetzt (0,5 und 15 mM) und die ROS-Akkumulation anschließend fluorezenzoptisch gemessen.

Es zeigte sich, dass die einstündige Inkubation mit 0,5 mM Glucose in allen Gruppen relativ niedrige Fluoreszenzwerte ergab, deren Niveaus sich nicht signifikant voneinander unterschieden (Tab. 3.27). Die Inkubation von Inselzellclustern in 15 mM glucosehaltiger Badlösung führte in allen Gruppen zu einem signifikanten Anstieg der ROS, wobei es zu deutlichen Unterschieden kam (Abb. 3.54, Tab 3.27). Gemessen am Referenzwert der Inselzellcluster aus Mäusen, die SD erhalten hatten (598 ± 65 a.u., n=25) führte die HFD überraschenderweise zu signifikant erniedrigten ROS-Niveaus (408 ± 55 a.u., n=19, p≤0,05). Die Applikation von Gliclazid konnte dosisabhängig diese Abnahme verhindern und bei 10 mg Gliclazid war mit 574 ± 55 a.u. (n=31) in etwa wieder das SD-Niveau erreicht.

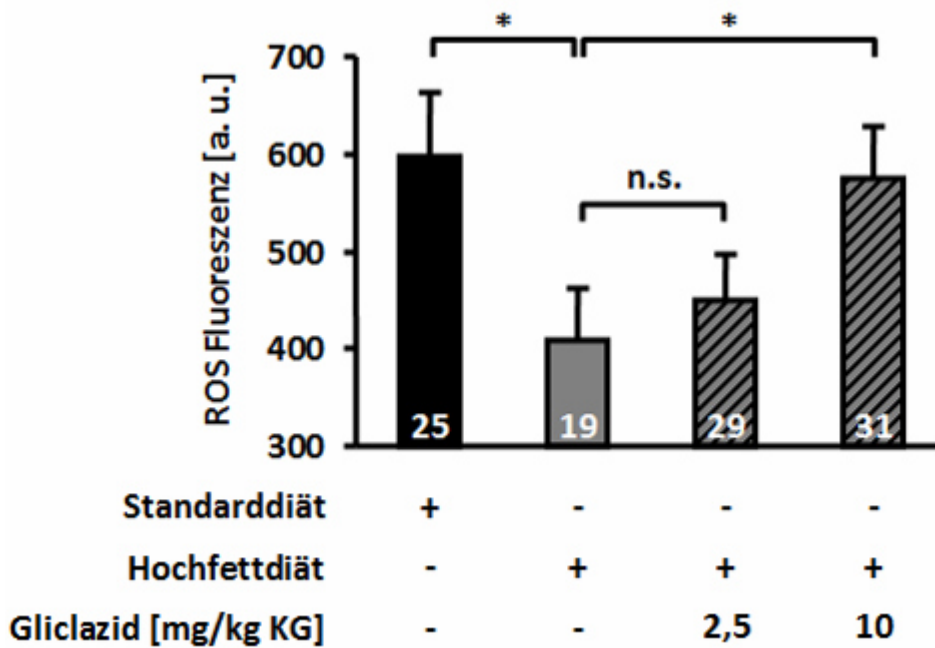


Abb. 3.54 - Einfluss von 12 Wochen SD bzw. HFD sowie Gliclazid (2,5 u. 10 mg / kg KG) auf die intrazellulären ROS-Konzentrationen bei mit 15 mM Glucose (1 h) stimulierten Inselzellclustern

	Standarddiät [a.u.]	Hochfettdiät [a.u.]	+ 2,5 mg / kg KG Gliclazid [a.u.]	+ 10 mg / kg KG Gliclazid [a.u.]
G0,5	248 ± 20 n=20	238 ± 39 n=13	277 ± 25 n=35	274 ± 22 n=35
G15	598 ± 65 n=25	408 ± 55 n=19	451 ± 47 n=29	574 ± 55 n=31

Tab. 3.27 - Fluoreszenzwerte der ROS-Messungen zu Abb. 3.53 - Alle Kohorten wiesen eine statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$) zwischen den ROS-Konzentrationen bei mit 0,5 oder 15 mM Glucose stimulierten Inselzellclustern auf.

Zusammenfassung

Mäuse auf Hochfettdiät (HFD, 45% Energie aus Fett) nahmen im Vergleich zu Tieren auf Standarddiät (SD, 10%) nach fünf Wochen signifikant an Körpergewicht zu. Der Futterverbrauch war gleich, woraus zu schließen ist, dass durch die HFD den Tieren mehr Kalorien zugeführt wurden. Die Trinkmenge war durch die HFD vermindert.

Die perorale Applikation einer Tagesdosis von 10 mg Gliclazid / kg Körpergewicht (zwei Wochen im Vorlauf und während der HFD) führte bei Tieren, denen HFD gefüttert wurde, zu einer geringeren Gewichtszunahme, die sich ab Woche 10 signifikant von der unter HFD unterschied.

Tiere unter HFD verfügten im gefütterten und nüchternen (6 h) Zustand über erhöhte Blutzuckerwerte. Außerdem waren die Plasmalipidwerte erhöht. Gliclazid hatte hierauf keinen Einfluss, konnte aber die Toleranz gegenüber einer intraperitonealen Zufuhr von Glucose, die in der HFD-Kohorte nach 60 und 120 min im Vergleich zur SD-Gruppe verschlechtert war, tendenziell verbessern.

Interessanterweise ließ sich sowohl anhand der Plasmainsulinkonzentrationen als auch bei einem Großteil der im Anschluss an die In-vivo-Studie durchgeführten Steady-state-Inkubationen von unstimulierten (3 mM Glucoselösung) und stimulierten Inseln (15 mM) feststellen, dass unter HFD-Bedingungen die Insulinsekretion im Vergleich zur SD erhöht war und durch Gliclazid diese gestörte Glucoseresponsivität verhindert wurde.

Darüber hinaus zeigte sich, dass Gliclazid vor den durch HFD verursachten Veränderungen der ROS-Akkumulation in Inselzellclustern schützte.

4 Diskussion

Oxidativer Stress hat auf das Überleben und die Funktion pankreatischer *beta*-Zellen bereits im prädiabetischen Stadium des T2DM eine fundamentale Bedeutung: Durch die gesteigerte Aufnahme und Verwertung von Glucose und Nährstoffen sowie die außerordentliche Empfindlichkeit gegenüber reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies erfahren die *beta*-Zellen einen allmählichen Funktionsverlust, der die stetige Diabetesprogression verursacht und schließlich zur Glucoseintoleranz führt.

Die Manifestation des Diabetes mellitus ist in den meisten Fällen vor allem an den Verlust der endogenen Insulinproduktion gekoppelt (Ritzel et al. 2006). In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass Menschen mit einer genetisch bedingten oder erworbenen „Insulinresistenz“ des peripheren Gewebes jahrzehntelang ohne klinische Auffälligkeiten leben können, da die *beta*-Zellen diesen erhöhten Insulinbedarf noch eine gewisse Zeit kompensieren können. Doch der langfristige und übermäßige Einfluss erhöhter Nährstoffkonzentrationen auf die *beta*-Zellen führt schließlich zu einer Schädigung ihrer Funktion und letztendlich auch zum Untergang von *beta*-Zellmasse (Martin et al. 1992, Butler et al. 2003, Robertson et al. 2004, Leahy 2005, Tabak et al. 2009). Die Ursachen hierfür sind offensichtlich gesteigerte ROS- und RNS-Konzentrationen mit einer gesteigerten Apoptose, die auf vielen verschiedenen Faktoren beruht, wie verschiedene Untersuchungen mit Inseln von menschlichen Spendern belegen (Robertson 2004, Del Guerra et al. 2005, Marchetti et al. 2006, Lupi et al. 2007). Daneben ist auch die Insulinwirkung im peripheren Gewebe besonders empfindlich gegenüber oxidativem Stress (Evans et al. 2003). Der gesteigerte mitochondriale Nährstoffmetabolismus und die systemische Anwesenheit einer „*low grad inflammation*“ mit verschiedenen zirkulierenden Entzündungsfaktoren (Interleukine, TNF- α) sowie ROS- und RNS-produzierenden Immunzellen führt zu oxidativem Stress, dem somit ein großer Stellenwert innerhalb der prädiabetischen Phase zukommt (Ehnes et al. 2007, Böni-Schnetzler et al. 2008, Lumeng et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde auf Grundlage verschiedener Stressmodelle versucht, die *beta*-Zellfunktion mit antioxidativen Mechanismen zu erhalten. Dabei wurde deutlich, dass die Herkunft von oxidativem Stress genauso eine Rolle spielt wie der Einfluss von ROS und RNS auf bestimmte Parameter der Stimulus-Sekretionskopplung und sich daraus ein sehr komplexes Konzept für einen möglichen Schutz ergibt (Robertson 2004). Bemerkenswerterweise entstehen durch den physiologischen Glucosemetabolismus permanent bestimmte ROS-Konzentrationen, die für eine funktionstüchtige Insulinsekretion unabdingbar zu sein scheinen (Pi et al. 2007). Die unspezifische Hemmung dieser Quellen

mittels Antioxidantien würde die *beta*-Zellen vor diesem Hintergrund möglicherweise noch zusätzlich schädigen (Pi et al. 2010c).

Somit wurde ein Schwerpunkt in dieser Arbeit auf die Untersuchung der Entstehung und Wirkung von oxidativem bzw. metabolischem Stress in *beta*-Zellen gelegt. Desweiteren wurden verschiedene antioxidative Maßnahmen auf ihre mögliche protektive Wirkung gegenüber der *beta*-Zellfunktion näher betrachtet.

4.1 Ursachen von oxidativem und metabolischem Stress in *beta*-Zellen

4.1.1 Komplex-II-Inhibition durch 3-NPA

Eine Intoxikation mit dem Pflanzengift 3-Nitropropionsäure (3-NPA) führt bei Menschen und Tieren nachweislich zur Neurodegeneration mit Symptomen, die dem Krankheitsbild Chorea Huntington ähneln (Beal et al. 1993). Dementsprechend wird die Substanz für Tiermodelle verwendet, in denen solche Erkrankungen erforscht werden sollen (Borlongan et al. 1997). Die gezielte Hemmung der Atmungsketten auf Ebene des Komplex II soll über die Bildung von oxidativem Stress eine Mitochondriendysfunktion und den Untergang von neuronalem Gewebe herbeiführen. So konnte in verschiedenen In-vivo-Studien und an isolierten Zellen und Mitochondrien gezeigt werden, dass 3-NPA zu Schädigungen führt, die nachweislich durch oxidativen Stress entstehen (Browne et al. 1997, Busija et al. 2005) und durch antioxidative Abwehrmechanismen abgemildert werden können (Beal et al. 1995, Binienda et al. 1998, Andreassen et al. 2001, Mandavilli et al. 2005, Sandhir et al. 2012).

Tatsächlich scheint bei Patienten mit Chorea Huntington eine eingeschränkte Mitochondrienfunktion durch eine gestörte Aktivität der Succinat-Dehydrogenase für die Degeneration des Corpus striatum verantwortlich zu sein (Gu et al. 1996, Benchoua et al. 2006). Als Ursache wird die Akkumulation des Huntingtin-Proteins angenommen, welches durch eine Gain-of-function-Mutation in einer anderen Konformation vorliegt und den zellulären Energiestoffwechsel stört. Dies ist bei den Patienten nicht nur auf das zentrale Nervensystem und Gehirn begrenzt, sondern hat auch Auswirkungen auf den gesamten Organismus (Aziz et al. 2007, Saleh et al. 2009). So treten Glucosestoffwechselstörungen in Form von Diabetes mellitus bei diesen Patienten sieben Mal häufiger auf (Podolsky et al. 1972, Podolsky et al. 1977, Farrer 1985). Studien an Chorea-Huntington-Patienten und einem Mausmodell ergaben, dass die gestörte Glucosehomöostase hauptsächlich über einen Defekt in der Insulinsekretion, aber auch über eine verminderte Hormonwirkung im hepatischen und peripheren Gewebe verursacht wird (Andreassen et al. 2002, Ristow 2004, Bjorkqvist et al. 2005, Lalic et al. 2008).

Die in der Literatur genannten Ursachen der ROS-Entstehung in verschiedenen Zelltypen (Browne et al. 1997, Busija et al. 2005, Bacsi et al. 2006, Moreno-Sanchez et al. 2013) durch die gezielte Hemmung der Succinat-Dehydrogenaseaktivität des Komplex II durch 3-NPA, wie bereits in Kap. 1.6.2.2 dargestellt wurden, lassen erwarten, dass dieser Mechanismus auch bei murinen *beta*-Zellen eine ROS-Akkumulation bewirkt und somit ein neues Modell für mitochondrialen oxidativen Stress darstellen könnte.

3-NPA zeigte in den Insulinsekretionsexperimenten dieser Arbeit deutliche Hemmeffekte, die jedoch durch keine antioxidative Maßnahme verhindert werden konnten. So bewirkte die Aktivierung antioxidativer Enzyme durch Vorinkubation mit Gliclazid oder den Nrf2-Aktivatoren Oltipraz und TBHQ keine Verbesserung der Sekretionsrate. Auch die Inkubation mit TEMPOL oder Mito-TEMPO, welche die Aktivität der SOD nachahmen, hatte keinen protektiven Effekt (s. Kap. 3.1.3).

Die ROS-Messungen mit 3-NPA in akuter und einstündiger Inkubation gaben keine Hinweise auf oxidativen Stress (s. Kap. 3.1.4). Entweder sind die ROS-Konzentrationen, die durch die Hemmung der Succinat-Dehydrogenaseuntereinheit des Komplex II entstehen, so gering oder lokal begrenzt, dass sie mit der gewählten fluoreszenzoptischen Methode und den Inkubationsbedingungen nicht erfassbar waren, oder es handelt sich um transiente Effekte. Liot und Kollegen zeigten beispielsweise, dass die ROS-Entstehung unter 3-NPA in Neuronen einem biphasischen Verlauf folgt, der nach ungefähr einer Stunde ein erstes Plateau und nach elf Stunden das zweite Plateau erreichte, welches erst dann eine Zerstörung der Mitochondrien herbeiführte (Liot et al. 2009). Auf der anderen Seite könnte ROS durch den vermehrten Einbau von Thermogenin (UCP, *Uncoupling Protein*) durch 3-NPA, wie ihn Bienda und Kollegen postulieren (Binienda et al. 2006), vermindert sein, denn verschiedene Studien zeigen, dass UCP in der Lage ist die ROS-Akkumulation signifikant zu senken (Arsenijevic et al. 2000, Vidal-Puig et al. 2000, Duval et al. 2002, Produit-Zengaffinen et al. 2007, Pi et al. 2009). Bemerkenswerterweise verhinderte die einstündige Inkubation von Inselzellclustern mit 3-NPA in Anwesenheit von 15 mM Glucose sogar die ROS-Akkumulation signifikant. Diese Tatsache verdeutlicht, dass die Succinat-Dehydrogenase in *beta*-Zellen einen essentiellen Stellenwert zu besitzen scheint, da über sie sowohl die glucosestimulierte Insulinsekretion als auch ROS-Akkumulation beeinflusst wird.

Die akute K_{ATP} -Kanalhemmung mit Gliclazid führte zu einem fast vollständigen Sekretionsschutz, was auf eine unterbrochene Stimulus-Sekretionskopplung vor den K_{ATP} -Kanälen - also auf Ebene des Glucosemetabolismus - hindeutet (s. Kap. 3.1.3). Daher wurde der Einfluss von 3-NPA auf den mitochondrialen Metabolismus näher untersucht: Der steile und nicht auswaschbare Anstieg der FAD-Autofluoreszenz bei akuter Zugabe von 3-NPA (s. Kap. 3.1.1)

steht in Einklang mit der beschriebenen spezifischen und irreversiblen Hemmung der Succinat-Dehydrogenaseuntereinheit von Komplex II (Alston et al. 1977, Coles et al. 1979, Huang et al. 2006). Außerdem verdeutlichten die Experimente, dass *beta*-Zellen mit einem gehemmten Atmungskettenkomplex II signifikant weniger FAD zu FADH₂ umsetzen, wenn ihr Metabolismus durch hohe Glucosekonzentrationen gesteigert wurde. Die Bildung und Umsetzung von NAD(P)H im Citratzyklus und an Komplex I war hiervon nicht betroffen. Ähnliche Untersuchungen bezüglich der Effekte von 3-NPA und anderen Inhibitoren der Atmungskette auf die Autofluoreszenz der Reduktionsäquivalente wurden an Schnitten des Hippocampusgewebes durchgeführt. Für 3-NPA wurde in diesen Arbeiten keine statistisch signifikante Änderung der NAD(P)H- oder FAD-Autofluoreszenzen registriert (Gerich et al. 2006). Leibowitz und Kollegen zeigten an isolierten Inseln aus der Ratte, dass 3-NPA die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase signifikant einschränkt, das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi$ vermindert und hierüber einen hemmenden Effekt auf Insulinsekretion und -biosynthese vermittelt (Leibowitz et al. 2005). Für Zellen neuronalen Ursprungs und isolierte Mitochondrien hingegen existieren in der Literatur Arbeiten mit teilweise widersprüchlichen Beobachtungen bezüglich des Einflusses von 3-NPA auf $\Delta\Psi$ (Wang et al. 2001, Horiguchi et al. 2003, Nasr et al. 2003, Gerich et al. 2006, Liot et al. 2009, Mbaya et al. 2010). Untersuchungen von Busija und Kollegen an isolierten Mitochondrien aus Schweinegehirnzellen beispielsweise weisen auf eine ROS-Zunahme hin, die jedoch nicht mit einer Veränderung von $\Delta\Psi$ einhergeht (Busija et al. 2005).

Die im Rahmen dieser Arbeit gemessene partielle Depolarisation von $\Delta\Psi$ bei akuter oder einstündiger Inkubation mit 3-NPA stellte sich als Ca²⁺-unabhängig heraus (s. Kap. 3.1.2). Aus zahlreichen Studien mit murinen und humanen Langerhans-Inseln ist bekannt, dass die Hemmung der Atmungskettenkomplexe I, II, und IV zu einer deutlichen Depolarisation von $\Delta\Psi$ führt (Misler et al. 1992, Düfer et al. 2002b). Dies wird mit dem Zusammenbrechen des Protonengradienten und der damit verbundenen Erhöhung positiver Ladung in der Mitochondrienmatrix in Verbindung gebracht. Da der Komplex II jedoch als einziges Enzym in der Atmungskette nicht am aktiven Protonentransport beteiligt ist, müssen durch seine gezielte Hemmung mit 3-NPA also vorrangig andere mitochondriale Prozesse angestoßen werden, die zur Depolarisation von $\Delta\Psi$ führen.

Bei den in einer Vielzahl von Arbeiten gezeigten apoptotischen Prozesse, die durch 3-NPA induziert werden, handelt es sich um langfristige zelluläre Schädigungen, die als Ursache für die akuten Effekte auf die Mitochondrienfunktion im Bereich von wenigen Minuten unwahrscheinlich sind (Behrens et al. 1995, Pang et al. 1997, Vis et al. 2001, Cho et al. 2013). Die Erkenntnisse dieser Arbeit sind, dass die Einschränkung der *beta*-Zellfunktion durch 3-

NPA nicht durch ROS-induzierte Schädigungen der Mitochondrien hervorgerufen wird, sondern sehr wahrscheinlich im direkten Zusammenhang mit der gehemmten Succinat-Dehydrogenasefunktion steht.

In der Literatur finden sich eine Reihe weiterer Mechanismen, die durch 3-NPA induziert werden können: So konnten einige Veröffentlichungen zeigen, dass 3-NPA eine Aktivierung der PTP (*permeability transition pore*) in der inneren Mitochondrienmembran bewirkt (Rosenstock et al. 2004, Nishimura et al. 2008). Dies vermittelt 3-NPA in Neuronen zum einen über ROS und zum anderen über eine veränderte Ca^{2+} -Homöostase im Mitochondrium (Maciel et al. 2004). Weder eine vermehrte ROS-Akkumulation (Kap. 3.1.4) noch eine Ca^{2+} -abhängige Depolarisation von $\Delta\Psi$ durch 3-NPA bei *beta*-Zellen konnten im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden (Kap. 3.1.2).

Andere Untersuchungen belegen, dass die PTP-Aktivierung durch 3-NPA zur Autophagozytose der Mitochondrien führt, was bereits in weniger als zehn Minuten mit einem Anschwellen der betroffenen Kompartimente verbunden war (Solesio et al. 2013). Die Autoren konnten zeigen, dass dieser Prozess zwar nicht durch die präventive Gabe von Antioxidantien (u.a. TEMPOL), jedoch durch Cyclosporin A, einem Inhibitor der PTP, effektiv verhindert wird. Sie schließen daraus, dass ROS hierbei nicht als *second messenger* für die Öffnung der PTP in Frage kommt (Gonzalez-Polo et al. 2013, Solesio et al. 2013).

Diese Schlussfolgerung steht in Einklang mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit, da die Hemmung der Insulinsekretion weder durch TEMPOL, noch durch andere antioxidative Maßnahme bei Anwesenheit von 3-NPA geschützt werden konnte (s. Kap. 3.1.3).

Dass die Aktivierung der PTP für die Gewebeschädigung eine große Bedeutung hat, machen Experimente deutlich, in denen *in vitro* und *in vivo* die durch 3-NPA ausgelöste Schädigung von Neuronen durch Cyclosporin A verhindert werden konnte (Leventhal et al. 2000, Kumar et al. 2010).

Auch in *beta*-Zellen hat die PTP als Regulator der mitochondrialen Ca^{2+} -Homöostase einen essentiellen Stellenwert (Duchen 1999). Ihr Öffnen und Schließen, induziert durch die jeweilige Ca^{2+} -Konzentration, bedingt die Oszillationen und damit die pulsatile Insulinsekretion (Krippeit-Drews et al. 2000). Die pharmakologische Inhibition der PTP durch Cyclosporin A im Rahmen einer immunsuppressiven Therapie kann bei Patienten diabetogene Effekte auslösen, die auf eine eingeschränkte Mitochondrienaktivität der *beta*-Zellen zurückzuführen sind (Robertson 1986, Düfer et al. 2001). Die unphysiologische Induktion der PTP durch Oxidantien, thiolgruppenhaltige Reagenzien oder einigen Fettsäuren bewirkt ebenfalls eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials mit einer gehemmten Zellfunktion (Zoratti et al. 1995). Düfer und Kollegen konnten zeigen, dass durch Tolbutamid

die Insulinsekretion während der Modulation der PTP-Aktivität mit Cyclosporin A aufrechterhalten werden kann (Düfer et al. 2001). Dies deckt sich mit den Experimenten dieser Arbeit, in denen durch die gleichzeitige Inkubation von Inseln mit 3-NPA und Gliclazid in Anwesenheit von 15 mM Glucose keine Sekretionshemmung auftrat (Kap. 3.1.3).

Ein weiterer Mechanismus wird von Binienda und Kollegen diskutiert, die zeigen konnten, dass die Injektion von 3-NPA in Ratten eine erhöhte Expression der Isoform 2 des Thermogenins (UCP, *Uncoupling Protein*) im Striatumgewebe verursacht (Binienda et al. 2006). Der Einbau des Protonophors bewirkt ein Protonenleck in der inneren Mitochondrienmembran, die Hemmung der ATP-Synthese und die partielle Depolarisation von $\Delta\Psi$, die auch für *beta*-Zellen im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde (Kap. 3.1.2). UCP scheint für die Regulation der Insulinsekretion sowohl in murinen als auch humanen Langerhans-Inseln von großer Bedeutung zu sein, da bereits die Kultivierung von Inseln in verschiedenen Glucosekonzentrationen das Expressionsmuster der Isoformen 2 und 3 verändert (Chan et al. 1999a, Li et al. 2008). Auch ROS führt zum vermehrten Einbau von UCP-2 und der damit verbundenen Einschränkung der Insulinsekretion (Krauss et al. 2003).

Die Komplex-II-Hemmung durch 3-NPA scheint Prozesse auszulösen, die in relativ kurzer Zeit die mitochondriale Funktion deutlich beeinflussen und zu einer Hemmung der Insulinsekretion führen, möglicherweise über eine erhöhte Leitfähigkeit der PTP oder den Einbau von UCP-2. Weitere biochemische und elektrophysiologische Untersuchungen sollten daher den Stellenwert der Succinat-Dehydrogenase für die Funktion und Viabilität von *beta*-Zellen noch eindringlicher prüfen. Insbesondere vor dem Hintergrund einer eingeschränkten Succinat-Dehydrogenaseaktivität durch oxidativen Stress (Nulton-Persson et al. 2001, Moser et al. 2009), T2DM (Oberbach et al. 2006) oder bei Erkrankungen wie Chorea Huntington, welche mit einer Prävalenz von bis zu 1:10000 (Pringsheim et al. 2012) zu den häufigsten erblich bedingten Hirnstörungen zählt, sollte aufgeklärt werden, ob die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte Verbesserung der *beta*-Zellfunktion durch Gliclazid ein geeignetes Therapiekonzept darstellt.

4.1.2 Einfluss von H₂O₂ und SNOC auf den *beta*-Zellmetabolismus

H₂O₂ und SNOC sind seit Jahrzehnten etablierte Modellsubstanzen für die experimentelle Erzeugung von oxidativem Stress. Sowohl H₂O₂ als auch verschiedene NO-Donatoren führen zu deutlichen Hemmeffekten auf die Insulinsekretion (Antoine et al. 1993, Cunningham et al. 1994, Tsuura et al. 1994, Antoine et al. 1996, Sjöholm 1996, Drews et al. 2010b), wie auch im Rahmen dieser Arbeit mittels Steady-state-Inkubationen mit murinen Langerhans-Inseln bestätigt werden konnte (s. Kap. 3.2.1 u. 3.2.2). Bei näherer Betrachtung ihrer Effekte auf

verschiedene Parameter der Stimulus-Sekretionskopplung wird klar, dass dabei primär nicht die oxidative Schädigung von Kanalproteinen und Membranlipiden zur *beta*-Zelldysfunktion führt, sondern eine Interaktion mit dem Zellmetabolismus stattfinden muss. Durch elektrophysiologische Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen wurde das Öffnen der K_{ATP} -Kanäle und die daraus resultierende Hyperpolarisation der Zellmembran als ursächlich für die durch H_2O_2 und NO-Donatoren bewirkte Sekretionshemmung herausgestellt (Antoine et al. 1993, Krippeit-Drews et al. 1994, Nakazaki et al. 1995, Antoine et al. 1996, Krippeit-Drews et al. 1999, Drews et al. 2000b). Mit einem speziellen Modus der Patch-Clamp-Technik konnte gezeigt werden, dass für das Öffnen der Kanäle zunächst kein direkter Effekt der Substanzen auf das Kanalprotein, sondern primär eine Senkung des intrazellulären ATP-Gehalts verantwortlich ist. Darüber hinaus konnte eine Depolarisation von $\Delta\Psi$ nachgewiesen werden, die mit einer Öffnung der PTP und der Verminderung des zellulären ATP-Gehaltes in Verbindung gebracht wird (Duchen 1999, Krippeit-Drews et al. 1999, Drews et al. 2000b).

Die Hemmung der ATP-Produktion durch oxidativen Stress kann neben dem Öffnen der PTP ein Resultat der Hemmung und Inaktivierung einer ganzen Reihe von Enzymen der Glykolyse und des Citratzyklus sein. Vor allem die Oxidation von Thiolgruppen und eine veränderte Tertiärstruktur von oxidationsempfindlichen Proteinen scheint der schädigende Mechanismus von ROS und RNS zu sein (Lei et al. 1992, Stamler et al. 1992). In der Literatur wird beschrieben, dass die Glykolyse beispielsweise auf Ebene der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenaseaktivität besonders sensitiv gegenüber ROS und RNS ist (Little et al. 1969, Spragg et al. 1985, Hyslop et al. 1988, Dimmeler et al. 1992, Kots et al. 1992, Zhang et al. 1992, Eizirik et al. 1994, Colussi et al. 2000). Die Hemmung der Glykolyse führt zu einer verminderten Bereitstellung der Reduktionsäquivalente, aus denen die Atmungskettenkomplexe ihre Energie für den aktiven Protonentransport beziehen. Infolgedessen ist $\Delta\Psi$ reduziert. Aber auch eine direkte Interaktion von oxidativem Stress mit Funktionsproteinen in der mitochondrialen Membran könnte für die Depolarisation verantwortlich sein (Lotscher et al. 1980, Wu et al. 1990, Ichas et al. 1998, Duchen 1999) und führt zu einem eingeschränkten mitochondrialen Energiemetabolismus, wie beispielsweise auf Ebene der Cytochrom C Oxidase (Hyslop et al. 1988, Welsh et al. 1991, Cleeter et al. 1994, Nakazaki et al. 1995, Yan et al. 1997, Duchen 1999). Außerdem werden durch ROS und RNS sowohl nukleäre und mitochondriale DNA (Takasu et al. 1991, Fehsel et al. 1993, Wilson et al. 1997) als auch DNA-Reparaturmechanismen in Form der Poly(ADP-ribose)polymeraseaktivität zerstört (Radons et al. 1994, Park et al. 1995).

Diese Ausführungen machen deutlich, dass die am Glucosemetabolismus beteiligten Enzyme und Kompartimente der *beta*-Zellen eine große Anzahl von möglichen Targets für oxidativen

Stress darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Nrf2-Aktivator Oltipraz und interessanterweise auch das SOD-Mimetikum TEMPOL die Insulinsekretion vor einer hemmenden H_2O_2 -Konzentration schützen konnten (s. Kap. 3.2.1). Für TEMPOL konnten darüber hinaus auch ein Schutz der elektrischen Aktivität von *beta*-Zellen gezeigt werden (Krippeit-Drews et al. 2012).

Doch konnte die Erhöhung der antioxidativen Enzymaktivität durch Langzeitinkubation mit Gliclazid weder gegenüber dem Einfluss von H_2O_2 noch hemmender Konzentrationen von SNOG die *beta*-Zellfunktion schützen. Selbst die Anwesenheit des Sulfonylharnstoffes während der Steady-state-Inkubation verbesserte die Insulinsekretion nicht. Perfusionsexperimente, bei denen der zeitliche Verlauf der Insulinsekretion stimulierter Inseln unter dem Einfluss von H_2O_2 gemessen wurden, zeigten hingegen, dass die akute Gabe von Tolbutamid die Sekretionsrate etwas verbesserte (Krippeit-Drews et al. 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde vor allem die schädliche Wirkung von H_2O_2 auf die mitochondriale Funktion näher beleuchtet. Hierzu wurden die Änderungen der NAD(P)H- und FAD-Autofluoreszenzen unter der akuten Zugabe von H_2O_2 getestet (s. Kap. 3.2.1.1). Es kam zu einer deutlichen Konzentrationsabnahme beider Reduktionsäquivalente. Diese Effekte stellten sich als auswaschbar und somit reversibel heraus. Cita Bauer konnte in ihrer Diplom-Arbeit (2012) zeigen, dass durch eine Vorinkubation muriner Inselzellen mit 3-NPA und der damit verbundenen Komplex-II-Hemmung der H_2O_2 -Effekt auf die FAD-Konzentration ausblieb. Daraus kann geschlossen werden, dass eine Interaktion von H_2O_2 mit der Succinat-Dehydrogenaseaktivität von Komplex II stattfindet, welche die FADH_2 -Bildung hemmt.

Ähnliche Untersuchungen führten González und Kollegen an pankreatischen Azinus-Zellen der Ratte durch (González et al. 2005). Sie testeten den Einfluss von H_2O_2 auf die FAD-Autofluoreszenz nach Vorinkubation mit dem Komplex-I-Inhibitor Rotenon oder dem Komplex-IV-Inhibitor Cyanid. Dabei konnten sie keinen Unterschied im Ausmaß des H_2O_2 -Effektes zu Kontrollbedingungen ohne Atmungsketteninhibitor feststellen. Diese Untersuchungen bestätigen unsere Erkenntnisse, dass die Interaktion von H_2O_2 mit Komplex II für die Veränderung der FAD-Autofluoreszenz hauptursächlich ist.

Eine Vorinkubation von Inseln mit TEMPOL konnte zwar die glucosestimulierte Insulinsekretion vor der H_2O_2 -induzierten Hemmung schützen (s. Kap. 3.2.1), hatte jedoch keinen Einfluss auf die Steigerung der FAD-Autofluoreszenz durch H_2O_2 (s. Kap. 3.2.1.1). Dies könnte darauf hinweisen, dass H_2O_2 selbst für die Hemmung der Succinat-Dehydrogenase verantwortlich ist, denn TEMPOL ist als SOD-Mimetikum am Abbau von H_2O_2 nicht beteiligt. In einigen Arbeiten wird anhand verschiedener ROS-Messmethoden und anhand von

funktionellen Studien gezeigt, dass TEMPOL - entsprechend seiner Funktion als SOD-Mimetikum - nicht H_2O_2 sondern hauptsächlich Superoxidanion-Radikal abbaut (Reddan et al. 1992, Reddan et al. 1993, Padgaonkar et al. 1994, Kopkan et al. 2006, Santiago et al. 2013, Sasaki et al. 2013). Auch wäre es möglich, dass H_2O_2 über einen weiteren (mitochondrialen) Faktor die Hemmung der Succinat-Dehydrogenase vermittelt, da Versuche mit zerkleinerten isolierten Mitochondrien keine Hemmung der Aktivität zeigten (Zhang et al. 1990). Moser und Kollegen machen in ihren Experimenten Oxalacetat für die direkte Hemmung der Succinat-Dehydrogenase verantwortlich, da sie die Aktivitätshemmung durch H_2O_2 nur bei einem aktivierten Zellmetabolismus beobachteten (Moser et al. 2009).

Wenn TEMPOL nicht direkt mit H_2O_2 interagiert, stellt sich die Frage, über welchen Mechanismus die Insulinsekretion durch TEMPOL geschützt wird. Interessanterweise konnte für die NAD(P)H-Autofluoreszenz gezeigt werden, dass ihre H_2O_2 -bedingte Abnahme bei stimulierten Inselzellen nach Vorinkubation mit TEMPOL weniger stark ausgeprägt ist (s. Kap. 3.2.1.1). Es ist sehr wahrscheinlich, dass H_2O_2 intrazellulär die Bildung von weiteren ROS begünstigt oder selbst zu aggressiveren ROS-Formen umgesetzt wird. So konnte nachgewiesen werden, dass H_2O_2 in murinen *beta*-Zellen direkt die NADPH-Oxidase aktiviert und hierüber die Bildung von Superoxidanion-Radikalen fördert (Michalska et al. 2010). Außerdem findet bei der Anwesenheit von zweiwertigen Eisenionen die katalysierte Umsetzung von H_2O_2 und Superoxidanion-Radikalen im Sinne einer Haber-Weiß-Reaktion zu Hydroxylradikalen statt (Kehrer 2000) (Abb. 4.01). Superoxidanion-Radikale sind bei dieser Reaktion für die Bereitstellung von zweiwertigen aus dreiwertigen Eisenkationen verantwortlich. TEMPOL hemmt auf dieser Ebene die Haber-Weiß-Reaktion, da es Superoxidanion-Radikale in einem ersten Schritt zu Sauerstoff und in einem weiteren zu H_2O_2 umwandelt (Mitchell et al. 1991, Reddan et al. 1993). Hierdurch erhöht sich zwar der intrazelluläre Gehalt von H_2O_2 , doch scheint durch die gehemmte Bildung der weitaus aggressiveren Hydroxylradikale (s. Kap. 1.6.1) die Zelle mit dieser Situation besser zurechtzukommen. Diese Beobachtung machten auch Tang und Kollegen an isolierten Inseln aus Ratten, denen 48 h lang eine hohe Glucosekonzentration infundiert wurde und die gleichzeitige Anwesenheit von TEMPOL vor einer *beta*-Zelldysfunktion nachweislich durch die Senkung von Superoxidanion-Radikalen und nicht durch einen Effekt auf H_2O_2 schützte (Tang et al. 2007).

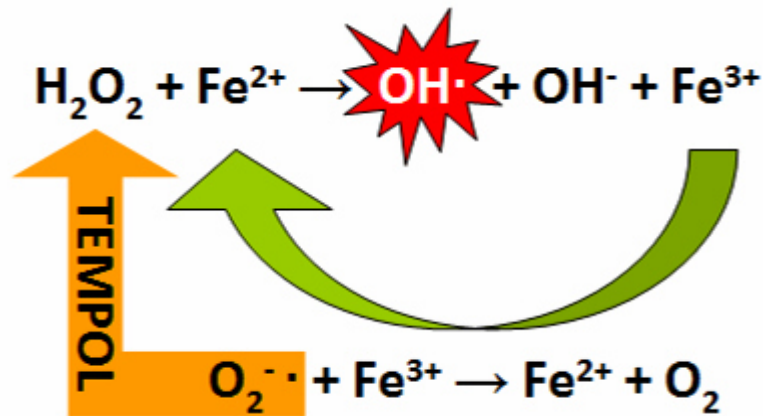


Abb. 4.01 - Reaktionsschema der Haber-Weiß-Reaktion zur Bildung von Hydroxylradikalen aus H_2O_2 und Superoxidanion-Radikalen - H_2O_2 wird in Anwesenheit von zweiwertigen Eisenionen zu Hydroxylradikalen und -anionen umgesetzt. Superoxidanion-Radikale reduzieren dreiwertige Eisenkationen und stellen der Reaktion wieder zweiwertige Eisenkationen bereit. TEMPOL dismutiert Superoxidanion-Radikale zu H_2O_2 und entzieht damit der Regenerationsreaktion ihr Substrat.

Interessanterweise stellen auch die Insulinvesikel mit ihrem Gehalt an Zink- und Eisenionen (Kulaksiz et al. 2008, Lemaire et al. 2009) einen bedeutenden Ursprungsort für die H_2O_2 -induzierte Bildung von Hydroxylradikalen dar. Olejnicka und Kollegen konnten zeigen, dass *beta*-Zellen, deren Insulinsekretion durch eine hohe Glucosekonzentration über einen kurzen Zeitraum (20 mM Glucose, 30 min) gesteigert war, anschließend gegenüber H_2O_2 weniger empfindlich waren. Die Autoren brachten dieses Ergebnis mit dem verminderten Gehalt an vesikulär gespeicherten Metallionen in Zusammenhang (Olejnicka et al. 1997, Olejnicka et al. 1999). Eine weitere pharmakologische Maßnahme, die Haber-Weiß-Reaktion zu hemmen, wäre neben TEMPOL die Bindung von dreiwertigem Eisen in einem Chelatkomplex, was ebenfalls zu einem Schutz der insulinproduzierenden Zellen vor oxidativem Stress führt (Grankvist et al. 1983, Eizirik et al. 1986, Halliwell 1989, Jorns et al. 1999, Mechlovich et al. 2010).

Die Beobachtung von Olejnicka und Kollegen erklärt möglicherweise die Befunde an *beta*-Zellen aus SUR1-KO-Mäusen: Deren basale Insulinsekretion ist bei geringen Glucosekonzentrationen im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Haspel et al. 2005) und könnte einen verringerten intrazellulären Gehalt an Metallionen bedingen. Diese Tatsache könnte neben der nachgewiesenen erhöhten Aktivität antioxidativer Enzyme (Gier et al. 2009) den geringeren H_2O_2 -Effekt auf die Insulinsekretion erklären.

Auch die Inkubation mit Sulfonylharnstoffen steigert gemäß ihrer pharmakologischen Hauptwirkung die Insulinsekretion. In dieser Arbeit wurde der insulinotrope Effekt von Gliclazid nach Übernachtinkubation ähnlich zu den Untersuchungen von Haspel und Kollegen

an Inseln aus SUR1-KO-Mäusen bei einer substimulatorischen Glucosekonzentration von 3 mM gemessen (s. Kap. 3.3.1). Die Versuche zum antioxidativen Schutzkonzept in den vorausgegangenen Arbeiten und in dieser Arbeit wurden jedoch mit stimulierten *beta*-Zellen (15 mM Glucose) durchgeführt, bei der die Sekretionsraten sowohl der SUR1-KO- bzw. Gliclazid-inkubierten Inseln als auch der Kontrollinseln nahezu identisch waren. Im Bezug auf die Experimente von Olejnicka und Kollegen ist es somit schwierig eine eindeutige Aussage darüber zu treffen, ob in diesen Experimenten unterschiedliche Exozytoseraten die intrazelluläre H₂O₂-Wirkung beeinflussen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die in den Vorarbeiten (Gier et al. 2009) beobachtete geringere Empfindlichkeit der Insulinsekretion von SUR1-KO-Inseln gegenüber H₂O₂ nicht durch pharmakologische K_{ATP}-Kanalinhibition imitiert werden kann. Die erhöhte Aktivität der antioxidativen Enzyme, die sowohl in SUR1-KO-Inseln als auch in WT-Inseln mit pharmakologischer K_{ATP}-Kanalinhibition nachgewiesen wurde (Gier et al. 2009), kann somit nicht allein für den Sekretionsschutz vor H₂O₂ im genetischen KO-Modell ursächlich sein.

4.1.3 Glucolipotoxizität und Hochfettdiät

4.1.3.1 Zellkultur unter glucolipotoxischen Bedingungen

Als Ursache der gesteigerten Formation von ROS und RNS und dem daraus resultierenden oxidativen Stress in *beta*-Zellen wird dem übermäßigen Nährstoffmetabolismus *in vivo* eine bedeutende Rolle zugesprochen (Prentki et al. 2002, Robertson 2004, Newsholme et al. 2007, Poitout et al. 2008, Cnop 2008a, Poitout et al. 2010, Kim et al. 2011). Die synergistischen Effekte bestimmter Fettsäuren und hoher Glucosekonzentrationen auf den *beta*-Zellmetabolismus in Form von Glucolipotoxizität (s. Kap. 1.6.3) werden dabei als zentrales Element der metabolischen Schädigung angesehen. Der Einfluss vieler weiterer Faktoren, die bei der Manifestation eines T2DM eine Rolle spielen, wie die (epi-)genetische Prädisposition, Protein- und Enzym polymorphismen, immunologische, endokrinologische und andere Begleiterkrankungen, diverse Umweltfaktoren wie Arzneistoffe, bestimmte Ernährungsgewohnheiten, Lebensumstände und Suchterkrankungen (Heber et al. 2011) und nicht zuletzt die Psychosomatik (Penninx et al. 2013), kann bei Glucolipotoxizität als ein *In-vitro*-Modell für diabetesähnliche *beta*-Zellschädigung keine Berücksichtigung finden.

In der Literatur findet man zahlreiche Publikationen, die den Einfluss von Glucolipotoxizität auf die Funktion und Viabilität der *beta*-Zelle testen. Neben einer unphysiologisch hohen Glucosekonzentration zwischen 20 und 30 mM dienen als Lipidkomponenten häufig Palmitat, Stearat oder Oleat als Vertreter der gesättigten und einfach ungesättigten freien

Fettsäuren, die in Anwesenheit von fettsäurefreiem bovines Serumalbumin (BSA) teilweise ungebunden vorliegen. In den verwendeten Modellen sind diese Komponenten meist zwischen 24 und 72 h im Zellkulturmedium vorhanden (Poitout et al. 2010). Die Kultivierung von insulinproduzierenden Zelllinien oder Primärzellen unter glucolipotoxischen Bedingungen kann somit von Labor zu Labor viele Variablen aufweisen. Poitout und Robertson gehen in ihrem Übersichtsartikel ausführlich auf die Problematik bezüglich der Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen und experimenteller Ansätze ein. Es existieren zwischen insulinproduzierenden Tumorzelllinien oder Primärzellen verschiedener Spezies erhebliche Differenzen in Funktion und Empfindlichkeit gegenüber gluco- und lipotoxischen Einflüssen. Bei Primärzellen sind diese auch von der Güte der jeweiligen Präparation abhängig. So führt die unterschiedliche Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einer jeweils andersartigen Ausprägung und womöglich auch Reversibilität der beobachteten Funktionseinschränkungen beim Vergleich von verschiedenen Zelltypen in glucotoxischem Milieu (Poitout et al. 2008).

Auf Grundlage der von Unger und Kollegen beschriebenen Konzepte (Unger et al. 1985, Unger 1995) und aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (s. Kap. 3.2.3) ist zu schließen, dass eine Zellkultur unter glucolipotoxischen Bedingungen im Vergleich zu normalen Inkubationsbedingungen unbedingt die Voraussetzung erfüllen muss, dass ihr Einfluss auf die jeweiligen Zellen tatsächlich „toxisch“ ist. Die Steigerung der Insulinsekretion durch primäre oder sekundäre Stimulation, wie es die Einzelkomponenten auch in ihrer akuten und kurzfristigen physiologischen Funktion vermitteln würde (Paolisso et al. 1995), kann daher kein glucolipotoxisches Modell darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Zellkultur unter glucolipotoxischen Bedingungen mit primären Inseln bzw. Inselzellclustern der Maus etabliert (25 mM Glucose, 100 µM Palmitat gebunden an 0,056 % fettsäurefreiem BSA), die bereits am ersten Tag nach Inkubation zu funktionellen und morphologischen Veränderungen führte. An diesem Modell wurde getestet, ob die beobachteten Schädigungen mit einer vermehrten ROS-Bildung einhergehen und durch die Inkubation mit Gliclazid im Sinne eines antioxidativen Schutzes abgewendet werden können.

4.1.3.2 *beta*-Zellfunktion unter Glucolipotoxizität

beta-Zellen unter glucolipotoxischem Einfluss wiesen eine verminderte Granularität (s. Kap. 3.2.3.1), einen reduzierten Insulingehalt (s. Kap. 3.2.3.2), Veränderungen der basalen und glucosestimulierte Insulinsekretion (s. Kap. 3.2.3.3) sowie eine gestörte Ca²⁺-Homöostase auf (s. Kap. 3.2.3.4). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den in der Literatur beschriebenen

Beobachtungen, dass es glucoseabhängig zu einer Hemmung der Insulinsekretion durch den lipotoxischen Einfluss kommt (Elks 1993, Zhou et al. 1994) und die gehemmte Proteinbiosynthese zu einem verminderten Gehalt an Insulin führt (Ritz-Laser et al. 1999, Jacqueminet et al. 2000, Kelpé et al. 2003). Eine erst kürzlich veröffentlichte Arbeit von Somesh und Kollegen zeigt außerdem, dass Glucolipotoxizität zu einem Verlust der metabolischen Ca^{2+} -Regulation führt, da die getesteten insulinproduzierenden Zellen auf einen Glucosestimulus mit keiner adäquaten Ca^{2+} -Steigerung reagierten (Somesh et al. 2013). Diese quantitativen Ergebnisse lassen sich mit den Erkenntnissen aus dieser Arbeit erweitern, die belegen, dass es durch Glucolipotoxizität auch qualitativ zu einer Verschlechterung der metabolischen Ca^{2+} -Reaktion in *beta*-Zellen kommt, da weniger Zellen bei stimulatorischer Glucosekonzentration (15 mM) oszillieren und beim Wechsel zu einer substimulatorischen Glucosekonzentration (0,5 mM) nicht in der Lage sind $[\text{Ca}^{2+}]_c$ auf ein basales Niveau zu reduzieren. Auch bei Inseln aus T2DM-Patienten beobachtet man einen Verlust der Ca^{2+} -Oszillationen und der Sensibilität der Stimulus-Sekretionskopplung gegenüber stimulatorischer Glucosekonzentration. Diese Veränderungen wirken sich negativ auf die pulsatile Insulinsekretion und die damit verbundene Glucosehomöostase aus und können daher als früher diabetischer Marker herangezogen werden (Lang et al. 1981, Ward et al. 1990, O'Meara et al. 1993).

Insulingehalt und Inselgranularität

Als Ursache für die Verringerung des Insulingehaltes durch Glucolipotoxizität wird eine Hemmung der Proteinbiosynthese der Insulinvorstufen auf mRNA-Ebene angenommen (Ritz-Laser et al. 1999, Jacqueminet et al. 2000, Briaud et al. 2001, Kelpé et al. 2003). Interessanterweise konnten Moore und Kollegen eine Sekretionseinschränkung sowohl für Oleat als auch Palmitat nachweisen während die mRNA-Expression für Präproinsulin nur durch Palmitat gehemmt wurde (Moore et al. 2004). Eine andere Veröffentlichung versucht diese unterschiedlichen Einflüsse der Fettsäuren auf die Insulinbiosynthese aufzuzählen und zeigt, dass Palmitat im Gegensatz zu Oleat als Substrat für die *de novo* Synthese von Ceramid in Frage kommt und durch Blockade dieses Syntheseweges die Abnahme des Insulingehalts verhindert werden kann (Kelpé et al. 2003). Die Autoren schlussfolgern aus ihren Experimenten, dass für die Hemmung der Insulinbiosynthese eine erhöhte intrazelluläre Konzentration an Ceramid ursächlich ist, welche nachgeschaltet über verschiedene Signalwege die Aktivität der entsprechenden Transkriptionsfaktoren hemmt (Mathias et al. 1998, Hagman et al. 2005, Poitout et al. 2008).

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Messmethode der Inselgranularität anhand von mikroskopischen Durchlichtaufnahmen (s. Kap. 2.4) konnte bei Inseln, die unter glucolipotoxischen Bedingungen kultiviert waren, zeigen, dass die verminderte Granularität mit einem reduzierten Insulingehalt korreliert (s. Kap. 3.2.3.1). Es konnte nachgewiesen werden, dass für die beobachtete Abnahme der Granularität eine synergistische Wirkung von Gluco- und Lipotoxizität verantwortlich ist. Diese Methode kann als Erweiterung der morphologischen Charakterisierung und Auswertung von Langerhans-Inseln dienen, die schon in den 1950er Jahren verwendet wurde, um eine Aussage über den Insulingehalt der Langerhans-Inseln von gesunden und diabetischen Probanden zu erhalten (Hartroft et al. 1955). Anhand von Färbungen und immunhistologischen Methoden konnte gezeigt werden, dass die Granularität mit dem Vorhandensein der insulin- und zinkhaltigen Vesikel korreliert (Lever et al. 1964, Diani et al. 2004) und die genetische Ausschaltung des Zinktransporters zu einer verminderten Granularität führt (Lemaire et al. 2009).

Vorteile dieser Methode sind, dass Inseln für die Bestimmung ihrer Granularität nicht irreversibel angefärbt oder fixiert werden müssen und sie so im Anschluss weiteren Experimenten, wie Insulinsekretionsmessungen, unverändert zur Verfügung stehen. Außerdem könnte der zeitliche Verlauf der Granularität von denselben Inseln im Medium verfolgt werden. Wenn sich in weiteren Experimenten mit anderen Stimuli oder Wirkstoffen bestätigen lässt, dass die Granularität als Marker für den Insulingehalt geeignet ist, ließe sich diese Methode an Stelle von kostenintensiven und aufwändigen Messungen wie RIA (s. Kap. 2.2.2.4) oder ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) anwenden.

In der Diplom-Arbeit von Betina Pajaziti (2013) wurden bereits erste Granularitätsmessungen von Inseln unter dem Einfluss verschiedener Gallensäuren durchgeführt, die abhängig vom Grad ihrer Lipophilie teilweise gegensätzliche Effekte auf die Granularität zeigten. Weitere Untersuchungen mit Gallensäuren und deren Einflüssen auf die Inselgranularität bei Anwesenheit von glucolipotoxischen Bedingungen werden derzeit von Björn Schittenhelm im Rahmen seiner Promotionsarbeit (2014, unveröffentlicht) durchgeführt.

Basale und glucosestimulierte Insulinsekretion

Die Insulinsekretion der Inseln, die unter glucolipotoxischen Bedingungen kultiviert wurden, war in unterschiedlicher Weise beeinflusst (s. Kap. 3.2.3.3): 15 mM Glucose führten unter Glucolipotoxizität im Vergleich zu Kontrollbedingungen nach zwei Kulturtagen zu einer eingeschränkten Sekretionsrate. Interessanterweise war dies bei einer substimulatorischen Glucosekonzentration von 3 mM genau entgegengesetzt. Eine erhöhte basale

Insulinsekretionsrate unter Glucolipotoxizität wird auch in der Literatur beschrieben (Zhou et al. 1994, Paolisso et al. 1995, Mason et al. 1999, Somesh et al. 2013). Die Steigerung der basalen Insulinsekretionsrate bei 3 mM Glucose kann mit einer erhöhten glykolytischen Aktivität und der damit einhergehenden Herabsetzung der Glucoseschwelle erklärt werden (Hosokawa et al. 1997, Liu et al. 1998b). Durch Palmitat wird die Aktivität der Citratsynthase im Citratzyklus gehemmt und hierdurch kompensatorisch die Phosphofruktokinaseaktivität in der Glykolyse gesteigert. Der vermehrte Verbrauch von Glucose-6-Phosphat führt zu einem verminderten *feedback*-Mechanismus auf die Glucokinase. Hierdurch kommt es zu einer glykolytischen Glucoseverwertung und erhöhten Insulinsekretion bereits bei geringe Glucosekonzentrationen (Liu et al. 1998b).

Die Ursache der Sekretionshemmung stimulierter Inseln durch Glucolipotoxizität wird in der Literatur auf verschiedene Weise diskutiert. So konnte nachgewiesen werden, dass die langfristige Inkubation von Inseln mit Fettsäuren den vermehrten Einbau von UCP-2 in die innere Mitochondrienmembran induziert (Lameloise et al. 2001, Patane et al. 2002). UCP-2 provoziert ein Zusammenbrechen des Protonengradienten und der ATP-Synthese und verschlechtert die glucosestimulierte Insulinsekretion (Zhang et al. 2001, Chan et al. 2001a). Das genetische Ausschalten von UCP-2 in Mausinseln führt dazu, dass die Tiere vor einer durch Hochfettdiät (HFD) induzierten Lipotoxizität geschützt sind und über eine adäquate Insulinsekretion verfügen (Joseph et al. 2002).

Außerdem wurde gezeigt, dass die Langzeitinkubation mit Fettsäuren die Aktivität wichtiger metabolischer Enzyme in *beta*-Zellen vermindert. Zhou und Kollegen wiesen eine Interaktion mit dem Pyruvatdehydrogenase-Komplex nach, welcher eine essentielle Verbindung zwischen zytosolischer Glykolyse und der mitochondrialen ATP-Synthese darstellt (Zhou et al. 1995, Xu et al. 2008a). Die Succinat-Dehydrogenaseaktivität, welche im Rahmen dieser Arbeit als wichtiger Regulator der *beta*-Zellfunktion herausgestellt werden konnte (s. Kap. 3.1 u. 4.1.1), ist unter glucolipotoxischen Bedingungen ebenfalls eingeschränkt (Somesh et al. 2013). Desweiteren zeigen die Experimente von Somesh und Kollegen eine Einschränkung der Glucokinaseaktivität, was die Autoren mit einer verminderten GLUT-2-Expression und Glucoseaufnahme in Verbindung bringen. Diese Ergebnisse widersprechen der Hypothese einer palmitatinduzierten Beschleunigung der Glykolyse von Liu und Kollegen (Liu et al. 1998b). Unabhängig von der Aktivität einzelner metabolischer Enzyme kann vor allem anhand des reduzierten Gehalts an mitochondrialer DNA und gesamtzellulärem ATP erklärt werden (Somesh et al. 2013), weshalb *beta*-Zellen bei Glucolipotoxizität eine eingeschränkte Glucoseverwertung aufweisen und damit die Stimulus-Sekretionskopplung und der zelluläre Energiebedarf eingeschränkt sind. Die durch Langzeitinkubation mit Gliclazid noch weiter

verminderte Insulinsekretion könnte zusätzlich auf einer Interaktion des Sulfonylharnstoffes mit der CPT-1 (s. Kap. 1.6.3.2) beruhen, die von Lehtihet und Kollegen für Glibenclamid nachgewiesen wurde (Lehtihet et al. 2003). Hierdurch wird sehr wahrscheinlich der glucolipotoxische Schaden auf die Insulinsekretion verstärkt.

Intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase und Exozytoseprozess

Im Rahmen dieser Arbeit konnte Gliclazid einen Schutz der Ca^{2+} -Homöostase jedoch nicht der Insulinsekretion vor Glucolipotoxizität herbeiführen. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in der Nähe von Insulinvesikeln stellt das Triggersignal für die Exozytose dar (Henquin 2000, Drews et al. 2010a). So ist es nicht erstaunlich, dass eine gestörte Ca^{2+} -Homöostase als Ursache für die Dysfunktion der Langerhans-Inseln immer mehr in den Fokus rückt (Barg 2003, MacDonald et al. 2005, Rutter et al. 2006b, Misler 2009, Rorsman et al. 2012). Im glucolipotoxischen Modell dieser Arbeit scheint jedoch eine Entkopplung des Triggersignals Ca^{2+} vom Exozytoseprozess vorzuliegen, da die durch Gliclazid geschützte Ca^{2+} -Homöostase zu keiner metabolisch intakten Insulinsekretion führen konnte (s. Kap. 3.2.3.3 u. 3.2.3.4).

In der Literatur findet man verschiedene Arbeiten, die einen direkten Einfluss der glucolipotoxischen Bedingungen auf den vesikulären Transport und die Exozytose beschreiben. Ausgehend von der gehemmten Insulinbiosynthese wäre es möglich, dass weniger Insulinmoleküle vesikulär verpackt werden und infolgedessen weniger Insulin pro Vesikel sezerniert wird (Bollheimer et al. 1998, Furukawa et al. 1999). Olofsson und Kollegen präsentieren ebenfalls Ergebnisse, in denen die Einschränkung der Insulinsekretion durch gluco- und lipotoxische Bedingungen nicht mit Veränderungen in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ erklärt werden kann, da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ durch Glucotoxizität alleine sogar erhöht und durch Lipotoxizität unbeeinflusst ist (Olofsson et al. 2007). Ihre Hypothese ist, dass der Exozytosevorgang auf Ebene der Vesikelverschmelzung mit der Zellmembran gestört ist und die *beta*-Zellen daher bei gleicher intrazellulärer Bereitstellung von Insulinvesikeln weniger sezernieren. Es konnte nämlich nachgewiesen werden, dass sowohl unter gluco- als auch lipotoxischen Bedingungen in *beta*-Zellen ein Protein namens Granuphilin exprimiert wird, welches sich hemmend auf die Insulinsekretion auswirkt (Coppola et al. 2002, Torii et al. 2002, Kato et al. 2006). Darüber hinaus muss auch angenommen werden, dass durch Glucolipotoxizität die Expression wichtiger vesikulärer und membranärer Funktionsproteine verändert oder gehemmt ist (Lovis et al. 2008, Somesh et al. 2013). Außerdem wird die Existenz von Ca^{2+} -Mikrodomänen in der Nähe von Ca^{2+} -Kanälen und Insulinvesikeln diskutiert (Wiser et al. 1999, Rutter et al. 2006a, Pedersen 2010). Für Palmitat konnte nachgewiesen werden, dass

es diese Konglomerate stört bzw. auflöst und somit den für die Exozytose notwendigen vesikelnahen Ca^{2+} -Einstrom abschwächt (Hoppa et al. 2009). Abschließend muss auch auf die direkte Interaktion von Fettsäuren mit der Zellmembran hingewiesen werden, deren Fluidität durch Einlagerungen oder über Acylierungsreaktionen beeinflusst werden kann und so zu einer gestörten Vesikelverschmelzung und veränderten Insulinexozytose führen könnte (Yajima et al. 2000, Olofsson et al. 2007, Koshkin et al. 2008, Leekumjorn et al. 2009).

Zusammenfassung

Diese Ausführungen machen deutlich, dass nach heutigem Wissensstand die durch Glucolipotoxizität hervorgerufenen Veränderungen auf vielen Ebenen der Stimulus-Sekretionskopplung eingreifen und auch die Genexpression in der *beta*-Zelle beeinträchtigen. Inseln aus glucolipotoxischen Kulturbedingungen, die durch Gliclazid über eine geschützte metabolische Ca^{2+} -Regulation verfügten, wiesen trotzdem eine im Vergleich zu Kontrollbedingungen veränderte Insulinsekretion auf. Dies zeigt, dass der glucolipotoxische Einfluss noch zu einem sehr späten Zeitpunkt innerhalb der Stimulus-Sekretionskopplung - nämlich auf Ebene der Exozytose - auftreten kann. Ein Schutzkonzept, das nur einen definierten Parameter erhält, scheint daher nicht erfolgversprechend. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Kwon und Kollegen wird der Einfluss von Glucolipotoxizität auf die Funktion und Viabilität einer insulinproduzierenden Tumorzelllinie getestet (Kwon et al. 2013). Mit niedrigen Konzentrationen von Glibenclamid wurde versucht, die Zellen vor den schädlichen Einflüssen zu schützen. Die Apoptoserate und verschiedene Marker für zellulären Stress konnten auf diese Weise zwar gesenkt werden, die glucosestimulierte Insulinsekretion war jedoch unter Anwesenheit von Glucolipotoxizität und verschiedenen Konzentrationen von Glibenclamid weiterhin eingeschränkt.

Die Auswertung der Inselgranularität unter dem Einfluss von Glucolipotoxizität, Glucotoxizität und Lipotoxizität gegenüber Kontrollbedingungen machte deutlich, dass die morphologischen Veränderungen vor allem in Kombination beider Modelle auftraten und es daher ein Therapieziel sein muss diesen Synergismus von den *beta*-Zellen abzuwenden.

4.1.3.3 Beeinflussung der ROS-Akkumulation durch Glucolipotoxizität

Inselzellcluster, die im Zellkulturmedium mit entweder 0,5 mM oder 15 mM Glucose über mehrere Tage inkubiert wurden, verfügten über deutliche Unterschiede bezüglich ihrer intrazellulären ROS-Akkumulation (s. Kap 3.2.3.5).

Für Inselzellcluster in einem glucolipotoxischen Milieu (25 mM Glucose, 100 μM Palmitat gebunden an 0,056 % fettsäurefreiem BSA) konnten im Vergleich zu Kontrollbedingen (11

mM Glucose) hingegen keine erhöhten ROS-Konzentrationen nachgewiesen werden (s. Kap. 3.2.3.6). Diese Ergebnisse stellen die Hypothese in Frage, ob ein Nährstoffüberangebot immer mit einer erhöhten Akkumulation von ROS und dem damit einhergehenden oxidativen Stress in Verbindungen steht, das die Grundlage vieler Übersichtsarbeiten darstellt (Robertson 2006, Newsholme et al. 2007, Lenzen 2008, Poitout et al. 2008, Kim et al. 2011).

Die Experimente dieser Arbeit verdeutlichen, dass der Glucosemetabolismus die Hauptquelle für endogen gebildete ROS darstellt (s. Kap. 3.1.4, 3.2.3.5 und 3.3.3). Interessanterweise spielen dabei sowohl mitochondriale als auch zytosolische Stoffwechselwege eine Rolle, wie bereits in Kap. 1.6.2 einleitend dargestellt wurde (Robertson 2004, Newsholme et al. 2007). Es gibt nur wenige Arbeiten in der Literatur, die Fettsäuren in einen direkten Zusammenhang mit erhöhten intrazellulären Konzentrationen von ROS bringen: Maestre und Kollegen zeigten an einer insulinproduzierenden Tumorzelllinie, dass die Inkubation mit verschiedenen Fettsäuren (u.a. Palmitat) in Anwesenheit einer niedrigen Glucosekonzentration von 5 mM zu erhöhten intrazellulären Konzentrationen von Superoxidation-Radikalen führte (Maestre et al. 2003). Bemerkenswerterweise konnten die Autoren jedoch weder eine ROS-Akkumulation noch eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi$ durch eine hohe Glucosekonzentration von 25 mM nachweisen.

Ähnliche Untersuchungen liefern die Veröffentlichungen von Koshkin, Wang und Kollegen, die ebenfalls an verschiedenen insulinproduzierenden Tumorzelllinien eine durch Oleat induzierte ROS-Akkumulation nachweisen (Koshkin et al. 2003, Wang et al. 2004).

Opreescu und Kollegen zeigten an Ratten, dass nach einer 48 h Infusion mit Oleat oder Olivenöl *in vivo* sowie der direkten Inkubation von isolierten Inseln mit Oleat oder Palmitat *in vitro* erhöhte ROS-Konzentrationen in Ratteninseln auftraten und durch Antioxidantien gesenkt werden konnten (Opreescu et al. 2007). In einer anderen Arbeit inkubierten Lim und Kollegen insulinproduzierende Tumorzelllinien für 48 h in hohen Glucosekonzentrationen mit und ohne einem spezifischen Agonisten für den Leber-X-Rezeptor (*liver x receptor*, LXR) und wiesen erhöhte ROS-Akkumulationen nach, die sie durch die Inkubation mit Mito-TEMPO verhindern konnten (Lim et al. 2011). Zwar wurden LXR-Isoformen in pankreatischen *beta*-Zellen und deren Beteiligung an der glucosestimulierten Insulinsekretion nachgewiesen, doch ist bisher unklar, welche physiologische Rolle genau der LXR im *beta*-Zellmetabolismus einnimmt (Efanov et al. 2004). Die gezielte Aktivierung fördert die Lipogenese und Apoptose und hemmt die Proliferation (Choe et al. 2007, Wenthe et al. 2007, Meng et al. 2009). Palmitat in Kombination mit einem LXR-Agonist bewirkt eine synergistische Verstärkung der Apoptose (Liang et al. 2011). Wie schon im Hinblick auf die

GPR40-Aktivität in *beta*-Zellen ausgeführt wurde (s. Kap. 1.6.3.2), ist es jedoch problematisch durch die alleinige Gabe eines spezifischen Fettsäureagonisten, der im Gegensatz zu Lipiden beispielsweise keiner weiteren Metabolisierung unterliegt, in Anwesenheit von Glucose die Ansprüche und Voraussetzungen von glucolipotoxischen Bedingungen zu erfüllen.

Die NADPH-Oxidase (NOX) ist das bisher einzig bekannte Enzym, welches unter physiologischen Bedingungen die Aufgabe hat, ROS zu bilden. Während ihre Bedeutung in phagozytierenden Immunzellen offensichtlich ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt ihr Stellenwert in anderen Körperzellen nur schwer nachvollzogen werden (Newsholme et al. 2007). Für die pankreatischen *beta*-Zellen konnte ihre Existenz nachgewiesen werden, jedoch ist ihre genaue physiologische Funktion bisher noch ungeklärt (Oliveira et al. 2003, Morgan et al. 2009, Newsholme et al. 2009). Glucolipotoxische Bedingungen scheinen die NOX-Aktivität zu beeinflussen (Guichard et al. 2008). So konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass durch Lipidinfusionen bei Ratten oder der gezielten Inkubationen von Inseln mit Fettsäuren die Superoxidanion-Radikalbildung in Inselzellen zunahm und durch NOX-Hemmung verhindert werden konnte (Michalska et al. 2010, Yuan et al. 2010, Graciano et al. 2011, Koulajian et al. 2013). Morgan und Kollegen machen aber mit ihrer Arbeit auf das grundlegende Problem aufmerksam, dass abhängig von der Wahl der Lipidfraktion und vor allem der Inkubationszeit grundverschiedene Effekte auf die intrazellulären ROS-Konzentrationen auftreten können (Morgan et al. 2007). In ihren Versuchen können sie nach einer Stunde eine erhöhte Aktivität der NOX und der ROS-Produktion nachweisen, welche jedoch nach 24 h wieder vermindert ist. Dieser transiente Effekt kann abhängig von den Inkubationsbedingungen und dem gewählten Zellsystem unterschiedlich ausgeprägt sein und wird durch den funktionellen Zustand der Gesamtzelle, der sich im Laufe der Inkubation in glucolipotoxischem Milieu ändert, maßgeblich beeinflusst.

Die Einschränkung der mitochondrialen Funktion durch den metabolischen Stress bei einem erhöhten Nährstoffangebot führt neben dem Zusammenbrechen des elektrochemischen Gradienten (Brand et al. 2004) auch zu Prozessen in den Mitochondrien, die sich deutlich auf die endogene ROS-Entstehung auswirken können. Es kann zwar im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, ob die glucolipotoxische Zellkultur beispielsweise zu einer vermehrten UCP-2-Expression führte. Wenn dieser Mechanismus jedoch eine Rolle spielt kann man davon ausgehen, dass nach einer gewissen Zeit sowohl die Insulinsekretion (s. Kap. 3.2.3.3) als auch die intrazelluläre ROS-Akkumulation negativ moduliert werden.

Der Einbau von UCP-2 in die innere Mitochondrienmembran durch ROS (Echtay et al. 2002) oder glucolipotoxische Einflüsse (Carlsson et al. 1999, Lameloise et al. 2001, Joseph et al. 2002, Patane et al. 2002) führt dabei nicht nur zum Zusammenbrechen der Stimulus-

Sekretionskopplung (Chan et al. 1999a) sondern scheint auch maßgeblich an der Ausschleusung von ROS selbst aus den Mitochondrien beteiligt zu sein (Krauss et al. 2003, Robson-Doucette et al. 2011). Bei Mäusen, bei denen UCP-2 genetisch ausgeschaltet ist, konnten nämlich vermehrte oxidative Schädigungen beobachtet werden (Arsenijevic et al. 2000, Pi et al. 2009). Dagegen führt die Überexpression von UCP-2 in insulinproduzierenden Zelllinien zu einem protektiven Schutz vor oxidativem Stress (Li et al. 2001). In der Literatur wird diskutiert, ob der Einbau von UCP-2 zu einem Selbstschutz der pankreatischen *beta*-Zellen beiträgt, die mit ihrer geringen antioxidativen Kapazität über diesen Mechanismus ROS zu entgiften versuchen (Pi et al. 2010a, Li et al. 2012, Barlow et al. 2013).

Abschließend sei auch darauf hingewiesen, dass die glucolipotoxische Zellkultur bei *beta*-Zellen apoptotische Prozesse (Piro et al. 2002) und die Autophagozytose (Komiya et al. 2010) fördern kann. Diese grundlegenden zellulären Veränderungen und Beeinträchtigungen führen ebenfalls dazu, dass die Zellen geringere Konzentrationen endogen gebildeter ROS-Konzentrationen als unter normalen Zellkulturbedingungen aufbringen können.

Moore und Kollegen konnten durch eine 72 h Langzeitinkubation von Ratteninseln mit Palmitat und Oleat in Anwesenheit einer stimulatorischen Glucosekonzentration zwar eine Einschränkung der Insulinsekretion und des Insulingehalts feststellen, jedoch waren die ROS-Konzentrationen im Vergleich zu Kontrollbedingungen unverändert (Moore et al. 2004). Dies entspricht dem Ergebnis der glucolipotoxischen Zellkultur im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Moore und Kollegen diskutieren ihre Befunde in interessanter Weise: Wenn oxidativer Stress im jeweiligen glucolipotoxischen Modell überhaupt auftritt, so muss er nicht ursächlich für jegliche Art der *beta*-Zellschädigung sein. Antioxidative Maßnahmen können somit nicht alle funktionellen Parameter vor diesen Einflüssen schützen.

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Glucolipotoxizitätsmodell vermittelt also seine schädigende Wirkung auf Granularität und Sekretion hauptsächlich über ROS-unabhängige Mechanismen. Dies erklärt, dass diese durch die Hochregulation antioxidativer Enzyme mit Gliclazid nicht zu verhindern waren.

Einzig die durch Glucolipotoxizität veränderte intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase scheint durch Prozesse hervorgerufen zu werden, vor denen durch die Senkung intrazellulärer ROS-Konzentration durch Gliclazid geschützt werden konnte (s. Kap. 3.2.3.4).

4.1.3.4 HFD-Einfluss auf *beta*-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *beta*-Zellen durch eine Langzeitinkubation mit Gliclazid *in vitro* vor einer gestörten Ca^{2+} -Homöostase unter glucolipotoxischen Bedingungen geschützt waren (s. Kap. 3.2.3.4). Außerdem senkte Gliclazid die intrazellulären ROS-Konzentrationen nach längerer Inkubation bei *beta*-Zellen, die mit 15 mM Glucose stimuliert waren (s. Kap. 3.2.3.5) oder unter glucolipotoxischem Einfluss (s. Kap. 3.2.3.6) standen. Im Rahmen einer HFD sollte daher überprüft werden, ob sich diese vorteilhaften Eigenschaften von Gliclazid auch *in vivo* äußern.

Körpergewicht und Plasmalipidwerte

Mäuse auf HFD (45% Energie aus Fett, 35 % Kohlenhydrate, 20 % Protein) nahmen im Vergleich zu ihren Artgenossen auf Standarddiät (SD, 10 % Energie aus Fett, 66 % Kohlenhydrate, 24 % Protein) ab der fünften Woche signifikant an Körpergewicht zu (s. Kap. 3.4.1). Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen in der Literatur (Surwit et al. 1988, Yu et al. 2011). Die labormedizinische Diagnostik ergab eine erhöhte Zirkulation von Lipiden, wie freien Fettsäuren, Cholesterin, HDL und LDL (s. Kap. 3.4.4). Gliclazid in einer Tagesdosis von 10 mg / kg KG führte ab der zehnten Woche zu einem verminderten Gewichtsanstieg bei Mäusen auf HFD, während die Lipidwerte davon unbeeinflusst waren. Dieses Ergebnis ist überraschend und deckt sich nicht mit den langjährigen Erfahrungen und Erkenntnissen aus klinischen Studien, dass Sulfonylharnstoffe in ihrer therapeutischen Dosierung Lipide im Blut senken (Baba et al. 1983, Li et al. 2010b) und das Körpergewicht steigern (Purnell et al. 2003, Mitri et al. 2009, McFarland et al. 2010). Doch der entscheidende Unterschied zwischen der gängigen Therapie eines bestehenden T2DM bei Patienten mit Sulfonylharnstoffen und der im Rahmen dieser Arbeit umgesetzten In-vivo-Studie ist, dass die Gabe von Gliclazid bereits zwei Wochen vor der HFD begonnen wurde, um durch die Hochregulation antioxidativer Enzyme in *beta*-Zellen einen Schutz zu induzieren, der die Manifestation diabetesähnlicher Symptome bei den Mäusen verhindern sollte. Die verminderte Gewichtszunahme von Mäusen auf HFD durch Gliclazid ist somit ein erster Hinweis darauf, dass diese Tiere vor den markanten Veränderungen durch die HFD geschützt waren. Für weitere Untersuchungen dieses protektiven Effektes müssten Untersuchungen gezielt am Fett- und Muskelgewebe der Mäuse durchgeführt werden. Einen ersten Hinweis geben Nakano und Kollegen in ihren Zellkulturexperimenten mit weißem und braunem Fettgewebe, in denen Gliclazid im Gegensatz zu Glibenclamid die Gewebeproliferation hemmte, jedoch die Differenzierung förderte. Hierfür machten sie eine Hemmung des epidermalen Wachstumsfaktors verantwortlich (Nakano et al. 2007).

Glucosetoleranz und Insulinsensitivität

Zum Ende der Diät nach 12 Wochen zeigte sich, dass Mäuse auf HFD eine erhöhte Blutglucosekonzentration im gefütterten und nüchternen (6 h) Zustand bei gleicher Insulinsensitivität hatten (s. Kap. 3.4.3). Dieser Diäteeinfluss konnte durch Gliclazid nicht verhindert werden. Der intraperitoneale GTT ergab, dass die HFD zu einer verschlechterten Glucoseverwertung 60 und 120 min nach Glucoseinjektion führte und 10 mg Gliclazid diesen Diäteeinfluss tendenziell reduzierte. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass durch die permanente Aufnahme dieser Tagesdosis von Gliclazid über das Trinkwasser bei Mäusen auf HFD eine verbesserte Toleranz gegenüber einer akuten Glucosegabe erreicht wurde ohne jedoch die Blutglucosekonzentrationen im gefütterten und nüchternen Zustand oder die Insulinsensitivität bedeutend zu beeinflussen.

Die in der Literatur beschriebene Wirkung von Gliclazid, die Insulinsensitivität des peripheren Gewebes zu verbessern (Bak et al. 1989, Kumar et al. 2002) konnte nur bei den ITTs in Woche 3 und 7 bei 60 min nach Insulininjektion beobachtet werden (s. Kap. 3.4.3.3).

Plasmainsulinkonzentrationen und Sekretionsraten der Inseln *in vitro*

Die Plasmainsulinkonzentrationen nach 12 Wochen zeigten ebenfalls positive Effekte der Gliclazid-Gabe (s. Kap. 3.4.4): Während die HFD zu einer Hyperinsulinämie führte, verblieben die Plasmainsulinkonzentrationen unter Gliclazid und HFD auf SD-Niveau. Auch die In-vitro-Insulinsekretionsmessungen verdeutlichten diesen überraschenden Effekt des Sulfonylharnstoffes (s. Kap. 3.4.5.1): Unstimulierte (3 mM Glucose) und stimulierte (15 mM Glucose) Inseln aus der HFD-Kohorte verfügten über drastisch erhöhte Insulinsekretionen. Die Sekretionsraten der Inseln aus der HFD-Kohorte mit Gliclazid hingegen befanden sich auf einem niedrigeren Niveau, ähnlich wie dem der Inseln aus der SD-Gruppe. Gliclazid in beiden Tagesdosen führte also während der Diät zu einem Schutz der endogenen Insulinsekretion vor einer Überstimulation durch HFD.

Welche Ursachen könnten neben einer erhöhten Blutglucosekonzentration zu dieser übermäßig gesteigerten Insulinsekretion unter HFD führen? Wie ist der beobachtete Schutz durch Gliclazid zu erklären?

Eine mögliche Begründung der beobachteten Hyperinsulinämie wäre, dass das zentrale Nervensystem in diesem Fall die Insulinsekretion maßgeblich beeinflusst. Es konnte nämlich nachgewiesen werden, dass bei Mäusen auf HFD der Parasympathikustonus zunimmt und somit eine Steigerung der Sekretionsrate über einen bestimmten Zeitraum beobachtet werden kann (Ahren et al. 1997, Cruciani-Guglielmacci et al. 2005). Inwiefern die Gliclazid-Applikation diesen Einfluss abschirmt, konnte jedoch damit nicht nachvollzogen werden.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Gliclazid in der Lage ist, die durch HFD hervorgerufenen Lipideinlagerungen in *beta*-Zellen (s. Kap. 1.6.3.2) in einer Weise zu verändern, dass die Insulinsekretion trotz erhöhter Lipidbelastung physiologisch ablaufen kann. So konnte eine Interaktion der Sulfonylharnstoffe mit Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) nachgewiesen werden, die an der Differenzierung und Insulinsensitivität der Muskel- und Fettzellen beteiligt sind (Fukuen et al. 2005, Inukai et al. 2005, Lee et al. 2011) und auch in *beta*-Zellen exprimiert werden (Dubois et al. 2000). Die gezielte Aktivierung der γ -Isoform der PPAR in *beta*-Zellen führt bei adipösen Mäusen zu einer verminderten Apoptoserate und einer erhöhten Proliferation (Kanda et al. 2010).

Nicht zu unterschätzen ist jedoch, dass vor allem die vermehrte Zirkulation von Glucose und Nährstoffen im Blut eine permanente Stimulation der Insulinsekretion bewirkt und durch Glucolipotoxizität zu einer allmählichen Schädigung der *beta*-Zellen führt. Es wird kontrovers diskutiert, ob auch erhöhte Plasmainsulinkonzentrationen die Sekretionsleistung der *beta*-Zellen beeinflussen und somit einen Teufelskreis darstellen, der letztendlich durch die Überstimulation der *beta*-Zellen zu deren Dysfunktion führt. Durch Verspohl und Kollegen konnte die Existenz von Insulinrezeptoren auf Langerhans-Inseln nachgewiesen werden (Verspohl et al. 1980). In der Literatur kommen neuere Untersuchungen im Gegensatz zu den Veröffentlichungen von Iversen und Elahi aus den 1970ern bzw. 1980ern zu dem Ergebnis, dass Insulin seine eigene Synthese und Exozytose über Rezeptoren in *beta*-Zellen durchaus vermitteln und potenzieren kann (Iversen et al. 1971, Elahi et al. 1982, Aspinwall et al. 1999, Kulkarni et al. 1999, Luciani et al. 2005, Leibiger et al. 2008, Shahl et al. 2009). Da in allen drei HFD-Gruppen die Glucose- und Lipidwerte erhöht waren, jedoch die übermäßig gesteigerte Insulinsekretion bzw. Plasmakonzentration durch Gliclazid wieder auf das Niveau der SD-Gruppe gesenkt wurde (s. Kap. 3.4.4 und 3.4.5.1), kann angenommen werden, dass durch Gliclazid ein *feedforward*-Mechanismus im Sinne einer „insulinstimulierten Insulinsekretion“ unterbrochen wird. Weil hierfür keine Veränderung der Insulinsensitivität in Frage kommen kann (s. Kap. 3.4.3.2) scheint der protektive Effekt auf Ebene der *beta*-Zellen vermittelt zu werden.

Beeinflussung der intrazellulären ROS-Akkumulation durch HFD und Gliclazid

Um zu ergründen, ob die protektiven Effekte von Gliclazid auf die *beta*-Zellfunktion unter HFD-Einfluss mit den Erkenntnissen dieser Arbeit zu vereinbaren sind, dass Gliclazid langfristig und unter Bedingungen eines erhöhten Nährstoffangebotes die intrazelluläre ROS-Konzentration *in vivo* senkte (s. Kap. 3.2.3.6 und 3.3.3), wurden im Anschluss an das In-

vivo-Projekt ROS-Messungen mit den isolierten Inselzellclustern aus den Mäusen aller Kohorten durchgeführt.

Die übermäßig gesteigerte Insulinsekretion unter HFD-Einfluss könnte gemäß der von Pi und Kollegen aufgestellten Hypothese damit begründet werden, dass gewisse ROS-Konzentrationen für eine erhöhte Insulinsekretion bei unstimulierten *beta*-Zellen im Sinne eines *feedforward*-Mechanismus ursächlich sind (Pi et al. 2007). So könnte Gliclazid durch seine nachgewiesene antioxidative Wirkung die *beta*-Zellen vor diesem Stimulus schützen.

Die ROS-Messungen im Anschluss an das In-vivo-Projekt zeigten aber überraschenderweise, dass die physiologische ROS-Akkumulation in Anwesenheit von 15 mM Glucose in Inselzellen unter HFD vermindert war und durch Gliclazid auf ein Niveau ähnlich der SD gehalten werden konnte (s. Kap. 3.4.5.3). Der HFD-Einfluss führte also dazu, dass stimulierte *beta*-Zellen nicht mehr die ROS-Konzentrationen wie die der *beta*-Zellen aus der SD-Kohorte aufbringen konnten. Ferner muss davon ausgegangen werden, dass auch transiente Effekte bei diesen Untersuchungen eine Rolle spielen: So könnten erhöhte ROS-Konzentrationen während der HFD zelluläre Schädigungen verursacht haben, die durch Gliclazid abgewendet werden konnten.

Ähnliche Beobachtungen machten auch Valle und Kollegen (Valle et al. 2011): Sie stellten ebenfalls verminderte ROS-Konzentrationen in *beta*-Zellen von Ratten auf HFD fest und korrelierten diese Beobachtung mit der reduzierten Expression und Aktivität der NADPH-Oxidase. Denkbar wäre demnach folgende Kaskade: Die permanente Nährstoffzufuhr führt eine gewisse Zeit lang zu erhöhter ROS-Akkumulation aus verschiedenen intrazellulären ROS-Quellen (Robertson 2004). Die *beta*-Zellen regulieren die Aktivität der NADPH-Oxidase im Sinne eines Selbstschutzes herunter. In den In-vivo-Studien der vorliegenden Arbeit könnte Gliclazid durch seine antioxidative Wirkung einen initialen ROS-Anstieg in den *beta*-Zellen durch die HFD abfangen und dadurch die Herunterregulation ROS-produzierender Signalwege unnötig machen, sodass die Zellen den Selbstschutzmechanismus nicht aktivieren müssen.

Die im Anschluss an die HFD durchgeführten ROS-Messungen wurden nach Übernacht-Inkubation im Zellkulturmedium und einer einstündigen Inkubation in Badlösung mit 15 mM Glucose ohne Gliclazid an *beta*-Zellen vorgenommen. Somit existierte kein akuter antioxidativer Einfluss mehr, der den Zustand der Inseln „*ex vivo*“ hätte beeinflussen können (Abb. 4.02).

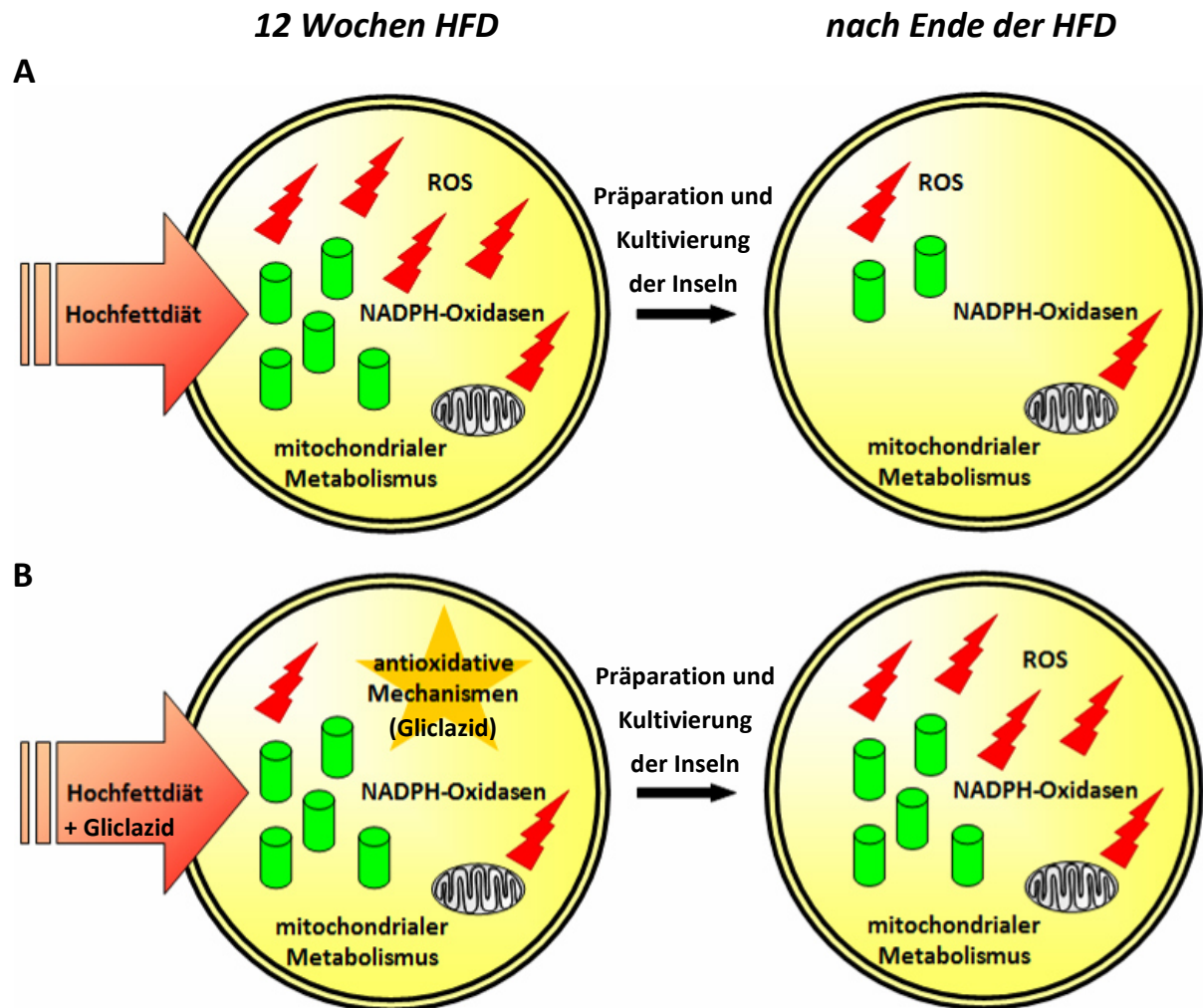


Abb. 4.02 - **Hypothese zur HFD-vermittelten Reduktion der NADPH-Oxidaseaktivität in *beta*-Zellen** - *beta*-Zellen sind durch den Einfluss der HFD unter metabolischem und oxidativem Stress. Die Reduktion der NADPH-Oxidaseaktivität durch eine verminderte Expression (Valle et al. 2011) stellt einen möglichen Selbstschutzmechanismus dar (A). Bei *beta*-Zellen mit einer erhöhten antioxidativen Kapazität (Gliclazid als Scavenger oder antioxidativer Enzyminduktor) findet keine Aktivitätsminderung im Sinne eines Selbstschutzes statt (B). Sie verfügen in anschließenden In-vitro-Versuchen über eine physiologische NADPH-Oxidaseaktivität und damit erhöhten intrazellulären ROS-Konzentrationen.

4.2 Regulation von antioxidativen Schutzmechanismen in der *beta*-Zelle

4.2.1 K_{ATP} -Kanalhemmung

Sulfonylharnstoffe wie Tolbutamid oder Gliclazid vermitteln ihre antihyperglykämische Wirkung durch direkte Interaktion mit der Stimulus-Sekretionskopplung pankreatischer *beta*-Zellen. Hierzu binden sie an die SUR1-Untereinheit des K_{ATP} -Kanals, was dessen Konformationsänderung induziert und den hyperpolarisierenden K^+ -Ausstrom hemmt (Ashcroft et al. 1999). Durch die pharmakologisch induzierte Membrandepolarisation werden spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle geöffnet, das wiederum die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration ansteigen lässt und die Insulinsekretion triggert (Bokvist et al. 1995, Mariot et al. 1998, Rutter et al. 2006a).

K_{ATP} -Kanalinhhibitoren wie die Sulfonylharnstoffe führen im Gegensatz zum physiologischen Glucose- und Nährstoffmetabolismus in *beta*-Zellen zu einer kontinuierlichen K_{ATP} -Kanalhemmung und provozieren damit einen unphysiologischen Ca^{2+} -Einstrom, der zwar die Insulinsekretion verbessert aber auch die Überladung der Mitochondrien mit Ca^{2+} fördert. Die im Rahmen dieser Arbeit gemessene Beeinflussung von $\Delta\Psi$ zeigten, dass die Übernacht-Inkubation mit Gliclazid die Mitochondrien im Vergleich zu Kontrollbedingungen stärker depolarisiert (s. Kap. 3.3.2). Vor allem eine diabetische Stoffwechsellage bedingt aufgrund der gesteigerten mitochondrialen Aktivität eine vermehrte Ca^{2+} -Überladung der Mitochondrien und induziert langfristig eine Einschränkung der mitochondrialen ATP-Synthese (Duchen 1999) sowie apoptotische Prozesse (Richter et al. 1996, Ichas et al. 1998, Kruman et al. 1999). Patientenstudien zeigen, dass die Therapie mit K_{ATP} -Kanalinhhibitoren den Untergang der *beta*-Zellen begünstigt und damit zwangsläufig zur Insulinpflichtigkeit führt (Del Prato et al. 2006, Aston-Mourney et al. 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch auch nachgewiesen werden, dass zwischen den Sulfonylharnstoffen im Bezug auf die intrazelluläre ROS-Akkumulation Unterschiede herrschen (s. Kap. 3.3.3): Während Tolbutamid in kurz- und langzeitigen Inkubationen Ca^{2+} -abhängig zu einer Steigerung intrazellulärer ROS-Konzentrationen in stimulierten *beta*-Zellen führte, hatte Gliclazid keinen Einfluss und senkte die ROS-Niveaus sogar langfristig und unter glucolipotoxischen Bedingungen (s. Kap. 3.2.3.6). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Untersuchungen von Sawada und Kollegen an einer insulinproduzierenden Tumorzelllinie (Sawada et al. 2008). Eine unterschiedliche Wirkung der Sulfonylharnstoffe auf die ROS-Akkumulation könnte die Ursache für die in den vorausgegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gemessene erhöhte Apoptoserate von Inselzellen, die mit Tolbutamid inkubiert waren, im Vergleich zu mit Gliclazid inkubierten Zellen sein (Gier et al. 2009). Die

Steigerung der Apoptose konnte anhand von Glibenclamid auch in humanen Inseln gezeigt werden (Maedler et al. 2005).

Für Tolbutamid wurde weiterhin auch eine Verminderung des Insulingehalts und der Expression von K_{ATP} -Kanälen nachgewiesen (Takahashi et al. 2007). Remedi und Kollegen beobachteten eine *beta*-Zelldysfunktion auch *in vivo* an Mäusen, die jedoch nach Absetzen des Sulfonylharnstoffes reversibel war (Remedi et al. 2008).

Diese schädlichen Einflüsse von Tolbutamid sind Ca^{2+} -abhängig, wie Efanov und Kollegen in ihrer Veröffentlichung Ende der 1990er Jahre aufzeigen, in der sie auch erstmals die apoptoseinduzierenden Eigenschaften von Tolbutamid nachwiesen (Efanova et al. 1998). In einer insulinproduzierenden Tumorzelllinie konnte diese Ca^{2+} -Abhängigkeit hingegen nicht nachvollzogen werden (Rustenbeck et al. 2004).

Wie kann der unter Tolbutamid beobachtete Ca^{2+} -abhängige ROS-Anstieg und die damit einhergehende Einschränkung der mitochondrialen Funktion erklärt werden? Im Hinblick auf die mitochondriale Aktivität induzierte der vermehrte Ca^{2+} -Einstrom durch die pharmakologische K_{ATP} -Kanalinhibition mit Tolbutamid oder Gliclazid eine Depolarisation von $\Delta\Psi$ (s. Kap. 3.3.2). Dieser Effekt wurde durch die gleichzeitige Inkubation mit einem L-Typ- Ca^{2+} -Kanalblocker vollständig verhindert, daher können direkte Effekte der getesteten Sulfonylharnstoffe auf $\Delta\Psi$ ausgeschlossen werden. In einer Übersichtsarbeit von Wiederkehr und Wollheim wird der metabolisch oder pharmakologisch induzierte Ca^{2+} -Einstrom in die Mitochondrien der *beta*-Zellen mit einem *feedforward*-Mechanismus auf die ATP-Syntheserate in Verbindung gebracht (Wiederkehr et al. 2008). Erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen sollen glucoseunabhängig über die Aktivierung mehrerer Dehydrogenasen im Citratzyklus die Generierung der Reduktionsäquivalente induzieren. Dies steht in klarem Widerspruch zu den Erkenntnissen aus unserer Arbeitsgruppe: Im Rahmen der Diplomarbeit von Cita Bauer (2012) wurde gezeigt, dass der durch Tolbutamid induzierte Ca^{2+} -Einstrom unter Glucosestimulation die Konzentrationen von NAD(P)H und $FADH_2$ in *beta*-Zellen nicht erhöhte. NAD(P)H nahm hingegen unter dem Einfluss von Tolbutamid ab. Dies kann mit einer beschleunigten Atmungskette und dem erhöhten NAD(P)H-Verbrauch an Komplex I erklärt werden.

Außerdem würde ein *feedforward*-Mechanismus gegen die unter stimulatorischen Glucosekonzentrationen auftretenden Oszillationen von $[Ca]^{2+}$, $\Delta\Psi$ und V_m und der pulsatilen Insulinsekretion sprechen (s. Kap. 1.4.2.4). Der durch Sulfonylharnstoffe induzierte Ca^{2+} -Einstrom führt hingegen zu einer Depolarisation von $\Delta\Psi$, das einen verminderten Protonenrückstrom über die F_1F_0 -ATPase bedingt und die ATP-Synthese vermindert. Die Beschleunigung der Atmungsketten begünstigt die Bildung von ROS.

Während Tolbutamid gemäß dem zuvor beschriebenen Regelkreis zu einer Zunahme der ROS-Konzentration führte, wurde durch Gliclazid keine zusätzliche ROS-Akkumulation induziert bzw. in Langzeitexperimenten wurden die ROS-Konzentrationen sogar gesenkt. Dieser Umstand wird sehr wahrscheinlich auf die in der Literatur beschriebenen Radikalfängereigenschaften des Moleküls zurückzuführen sein (Scott et al. 1991, Noda et al. 1997, Sliwinska et al. 2012). Gliclazid ist also aufgrund seiner molekularen Eigenschaft in der Lage, die ROS-Entstehung, die es durch die K_{ATP} -Kanalhemmung eigentlich bewirken müsste, gleich wieder abzufangen. Darüber hinaus muss man annehmen, dass Sulfonylharnstoffe nicht nur mit den K_{ATP} -Kanälen sondern auch mit weiteren zellulären Targets interagieren, die für die ROS-Entstehung entscheidend sind. So wurde beispielsweise gezeigt, dass Tolbutamid und andere Vertreter im Gegensatz zu Gliclazid eine direkte Aktivierung von Epac2 (*Exchange protein directly activated by cAMP 2*) vermitteln (Zhang et al. 2009). Es bleibt abzuwarten, welchen Stellenwert dieser Signalweg für die *beta*-Zellfunktion und intrazellulären ROS-Konzentrationen hat.

4.2.2 Nrf2-Aktivierung

Nrf2 rückt als wichtiger Regulationsfaktor des endogenen antioxidativen Systems immer mehr in den Fokus der Grundlagenforschung (Lee et al. 2005b, Kaspar et al. 2009). Die pharmakologische Induktion der Nrf2-Translokation in den Zellkern stellt dabei ein mögliches therapeutisches Konzept dar, die Expression von durch Nrf2 positiv regulierter Gene gezielt zu steuern und damit metabolische Erkrankungen zu behandeln, deren Ursache und Auswirkungen auf oxidativem Stress beruhen (Pi et al. 2010c, Sykiotis et al. 2011, Wang et al. 2011, Chartoumpakis et al. 2013, Xu et al. 2013).

Yu und Kollegen konnten bereits in einer In-vivo-Studie an Mäusen zeigen, dass die Gabe von Oltipraz vor durch HFD ausgelöstem Übergewicht und Insulinresistenz schützt (Yu et al. 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals versucht mit der gezielten pharmakologischen Nrf2-Aktivierung, einen antioxidativen Schutz in isolierten murinen Wildtyp-Inseln zu induzieren, der die Insulinsekretion vor den schädlichen Einflüssen von H_2O_2 und 3-NPA schützen sollte (s. Kap. 3.1.3 und 3.2.1).

Ähnliche Experimente sind bisher hauptsächlich an genetischen Mausmodellen durchgeführt worden. Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung von Yagishita und Kollegen untersuchte den Einfluss erhöhter ROS- und RNS-Konzentration auf die Viabilität und Funktion pankreatischer *beta*-Zellen bei Keap1-KO- bzw. Nrf2-KO-Mäusen. Sie testeten außerdem den Nrf2-Aktivator Bardoxolon (CDDO) und konnten einen Anstieg in der Expression antioxidativer Enzyme und eine Reduktion von oxidativem Stress beobachten (Yagishita et al.

2013). Weitere Untersuchungen führten Uruno und Kollegen an einem diabetischen Mausmodell durch, bei dem durch die genetische Ausschaltung von Keap1 oder durch die Applikation von CDDO die Glucosetoleranz verbessert werden konnte (Uruno et al. 2013).

Die Vorinkubation mit einem Nrf2-Aktivator (Oltipraz oder TBHQ) konnte Langerhans-Inseln vor einer Einschränkung der Insulinsekretion durch H₂O₂ bewahren. Für TBHQ war dieser Schutzeffekt allerdings statistisch nicht sicherbar und muss daher in zukünftigen Experimenten durch Variation der Inkubationsbedingungen, wie Substanzkonzentration und Inkubationsdauer, weiter untersucht werden.

Oltipraz und TBHQ unterscheiden sich hinsichtlich ihres Nrf2-Aktivierungsmechanismus grundlegend voneinander: Während Oltipraz direkt und über seine Metabolite mit dem Keap1-Nrf2-Komplex reagiert, vermittelt TBHQ seinen Effekt über seine Autooxidation und die dabei entstehenden ROS.

Für das Anthelminthikum Oltipraz konnte nachgewiesen werden, dass es in Zellen chemopräventive und antioxidative Verteidigungsmechanismen aktiviert (Kensler et al. 1999, Kensler et al. 2003, Zhang et al. 2008). Über die Expression von Phase-I-Enzyme (Buetler et al. 1995) vermittelt es zudem seine eigene Metabolisierung und verstärkt hierüber seinen Nrf2-translozierenden Effekt auf die Keap1-Proteinbindung (Primiano et al. 1995, Clapper 1998, Petzer et al. 2003, Iida et al. 2004, Choi et al. 2010). Auch die Bildung von ROS durch Oltipraz konnte nachgewiesen werden, was einen weiteren Wirkmechanismus auf das Keap1-Nrf2-System darstellen könnte (Velayutham et al. 2005, Jia et al. 2008, Holland et al. 2009). Oltipraz konnte in einer metabolischen Studie an Mäusen auf HFD deren Glucosetoleranz und Insulinsensitivität verbessern (Yu et al. 2011). In einem diabetischen Streptozotocin-Modell, welches auf einer H₂O₂-induzierten *beta*-Zellschädigung beruht (Takasu et al. 1991), führte die Applikation von Oltipraz zu einem milderem Verlauf der Hyperglykämie (Aleksunes et al. 2010).

TBHQ gehört zur Substanzklasse der Chinone und wurde ausgehend von seiner methylierten Vorstufe 3-BHA durch Untersuchungen der Struktur-Wirkungsbeziehung in den 1970er Jahren entwickelt (Benson et al. 1978). Es zeigte sich nämlich, dass die demethylierten Derivate von 3-BHA in der Induktion einer Expression ARE-positiver Gene wesentlich potenter waren (De Long et al. 1985, Prochaska et al. 1985). Dem Nrf2-Aktivierungsmechanismus liegt die chemische Instabilität dieser Substanzen zu Grunde: In Anwesenheit von Sauerstoff und Metallionen werden sie über eine Semichinon-Zwischenstufe zur chinoiden Form oxidiert (Bensasson et al. 2008, Wang et al. 2010). Die dabei entstehenden ROS setzen die Thiolgruppen des Keap1-Proteins zu intramolekularen Disulfidbrücken um, sodass es zu einer Konformationsänderung mit der anschließenden Nrf2-Translokation

kommt (Yu et al. 1997) (s. Kap. 1.6.5). Dieser Aktivierungsmechanismus kann abhängig von der Konzentration und der Inkubationszeit die Zellen mit erhöhten ROS-Konzentrationen belasten. Inseln, die über Nacht mit TBHQ inkubiert waren, zeigten womöglich aus diesem Grund morphologische Schäden, während ihre Insulinsekretion nach wie vor auf dem Niveau der uninkubierten Inseln lag. Dass auch eine kurze Inkubationszeit mit TBHQ zur Nrf2-Aktivierung führen könnte, zeigen die Untersuchungen von Wang und Kollegen, die eine Expression ARE-positiver Gene bereits nach 30 min nachwiesen (Wang et al. 2010).

Für TBHQ konnte die Nrf2-vermittelte Verbesserung der Zellviabilität einer insulinproduzierenden Tumorzelllinie gegenüber Arsen nachgewiesen werden (Yang et al. 2012). Darüber hinaus konnten Nishizono und Kollegen in einem Rattenmodell aufzeigen, dass die Gabe von TBHQ vor einem durch Streptozotocin induzierten *beta*-Zelluntergang schützt (Nishizono et al. 2000). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde mit TBHQ eine Reduktion von RNS und der damit einhergehenden Apoptose in insulinproduzierenden Tumorzelllinie festgestellt (Ogasawara et al. 2013).

Oltipraz und TBHQ stellen nur zwei Vertreter von Prototypen einer ganz neuen Klasse von Wirkstoffen dar, deren Mechanismus und Bedeutung noch weitgehend unbekannt sind. Darüber hinaus muss man annehmen, dass auch viele aktuell eingesetzte Arzneistoffe synthetischer und natürlicher Art einen Einfluss auf das Keap1-Nrf2-System nehmen können. In diesem Zusammenhang sei auf eine interessante Übersichtsarbeit von Castellano und Kollegen hingewiesen, in der antidiabetisch wirkende Naturstoffe mit einem pentazyklischen Triterpen-Grundgerüst wie die Oleanolsäure, deren Wirkmechanismen bisher weitgehend ungeklärt sind, mit einer Transkription entsprechender Gene in Zusammenhang gebracht werden (Castellano et al. 2013). Dies zeigt, dass neben der Aufklärung vieler bisher unbekannter Wirkmechanismen von Naturstoffen im Hinblick auf deren Rolle als Nrf2-Aktivatoren auch die Bedeutung des Keap1-Nrf2-Systems selbst im Kontext von neurologischen, onkologischen oder endokrinologischen Erkrankungen geklärt werden muss. Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass die pharmakologische Nrf2-Aktivierung vor allem für die pankreatischen *beta*-Zellen eine therapeutische Option darstellt, sie bereits in einer prädiabetischen Phase vor oxidativen und metabolischen Schäden zu schützen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht, dass metabolischer Stress in Form von erhöhten Konzentrationen an ROS und RNS zu deutlichen Einschränkungen der *beta*-Zellfunktion führt und daher für die Pathogenese des T2DM eine große Rolle spielt.

Langerhans-Inseln aus dem SUR1-KO-Mausmodell zeichneten sich in den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe als äußerst widerstandsfähig gegenüber oxidativen Einflüssen aus. Die erhöhte Aktivität der wichtigsten antioxidativen Enzyme wurde sowohl im genetischen Modell als auch durch die pharmakologische Inhibition des K_{ATP} -Kanals in Wildtyp-Inseln nachgewiesen. Im Vergleich zu Tolbutamid erwies sich Gliclazid dabei als ein Vertreter der Sulfonylharnstoffe, der selbst keinen steigernden Einfluss auf die Grundapoptoserate hatte und sich demzufolge für eine langfristige Gabe besser eignet.

Es sollte untersucht werden, ob die präventive Gabe von Gliclazid die *beta*-Zellfunktion vor oxidativen Schädigungen schützt und sich daher als Langzeittherapeutikum bereits in einer Phase des Prädiabetes eignen könnte. Hierfür wurden verschiedene experimentelle Methoden angewandt, um die intrazellulären Konzentrationen an ROS und RNS zu erhöhen, ihre metabolischen Auswirkungen zu charakterisieren sowie verschiedene antioxidative Strategien, wie die durch Gliclazid erhöhte Enzymaktivität, zu testen:

- Die in der Literatur beschriebene Erzeugung von oxidativem Stress durch die spezifische Inhibition des Komplex II der mitochondrialen Atmungsketten mit 3-Nitropropionsäure (3-NPA) findet in murinen Inselzellen nicht statt. Die physiologische ROS-Akkumulation durch Glucosestimulation wird durch die Komplex-II-Hemmung sogar verhindert. Dementsprechend können verschiedene antioxidative Schutzkonzepte die Sekretionshemmung, die durch 3-NPA hervorgerufen wird, nicht verhindern. Die Versuche mit 3-NPA stellen jedoch die Bedeutung der Succinat-Dehydrogenaseaktivität des Komplex II für eine uneingeschränkte *beta*-Zellfunktion und die endogene ROS-Entstehung heraus. Die Einschränkung der mitochondrialen Funktion und die daraus resultierende Sekretionshemmung können durch K_{ATP} -Kanalhemmung kompensiert werden.
- H_2O_2 und der NO-Donor SNOC führen zu erheblichen Einschränkungen der Insulinsekretion. Im Rahmen der Diplom-Arbeit von Cita Bauer (2012) konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen H_2O_2 und der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) als eine mögliche Ursache für die Hemmung der Stimulus-Sekretionskopplung gelten kann. Die Experimente der vorliegenden Arbeit

zeigen, dass auch die NAD(P)H-Konzentrationen durch H_2O_2 gesenkt werden. Die Modulation der K_{ATP} -Kanalaktivität durch Gliclazid kann den H_2O_2 - oder SNOC-induzierten Sekretionsverlust nicht verhindern. Der Nrf2-Aktivator Oltipraz sowie das SOD-Mimetikum TEMPOL dagegen schützen die Insulinsekretion vor H_2O_2 .

- Die bei Typ 2 Diabetikern häufig vorliegende Fehl- bzw. Überernährung kann *in vitro* durch ein Glucolipotoxizitätsmodell und *in vivo* durch ein Hochfettdiät-Projekt nachgeahmt werden. Die langfristige Gliclazid-Inkubation bewirkt unter Glucolipotoxizität eine Senkung der ROS-Konzentrationen und einen Schutz der metabolischen Ca^{2+} -Regulation. Nach einer zwölfwöchigen HFD sind Mäuse, die Gliclazid bekamen, vor Gewichtszunahme und einer übermäßigen Insulinsekretion geschützt. Gliclazid kann darüber hinaus vor *beta*-Zellschädigungen während der HFD schützen, die in anschließenden In-vitro-Untersuchungen zu einer verminderten ROS-Akkumulation in Anwesenheit einer stimulatorischen Glucosekonzentration führen.
- Tolbutamid erhöht Ca^{2+} -abhängig die ROS-Konzentration in *beta*-Zellen. Gliclazid hat dagegen kurzfristig keinen Effekt auf ROS und senkt die ROS-Konzentrationen in Langzeitinkubationen über 24 h. Dies könnte erklären, weshalb in den vorausgegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zwischen Gliclazid und Tolbutamid unterschiedliche Grundapoptoseraten gemessen wurden.

Der Schutz der *beta*-Zellfunktion vor oxidativem Stress stellt eine wichtige therapeutische Option dar, die die Insulinpflichtigkeit der Patienten deutlich hinauszögern könnte. Doch sollte die Erhöhung der antioxidativen Kapazität nicht durch Arzneistoffe erfolgen, die selbst schädigende Effekte auf die *beta*-Zelle haben können. Die Hemmung der K_{ATP} -Kanäle durch Sulfonylharnstoffe ist ein seit Jahrzehnten etabliertes Therapiekonzept, deren insulinotrope Wirkung mit dem allmählichen Untergang von *beta*-Zellmasse einhergeht. Das sogenannte Sekundärversagen und die nachgewiesene Erhöhung der antioxidativen Enzymaktivität hängen mit dem Einfluss der Sulfonylharnstoffe auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase und mit Ausnahme von Gliclazid der gesteigerten ROS-Akkumulation zusammen. Deshalb sollte das Augenmerk auf neuartige Targets und Signalwege wie das Keap1-Nrf2-System gelegt werden, die ähnliche protektive Effekte aufweisen können ohne jedoch die *beta*-Zellfunktion übermäßig zu beeinflussen.

Darüber hinaus sollte durch Lebensstiländerung und pharmakotherapeutische Interventionen versucht werden für die *beta*-Zellen im Gesamtorganismus bessere Bedingungen zu schaffen. Die Senkung von Glucose-, Lipid- und Insulinkonzentrationen im

Blut stellt dabei den wichtigsten Schritt dar und würde die dauerhafte Stimulation der endogenen Insulinsekretion vermindern.

Eine kompensatorische Steigerung der Plasmainsulinkonzentration kann durch die gezielte Einflussnahme auf die Insulinsensitivität des peripheren Gewebes verhindert werden. Dadurch wird die Sekretionsleistung der *beta*-Zellen geschont. Die sogenannten „Insulin-Sensitizer“ sind jedoch aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen bis auf Pioglitazon vollständig vom deutschen Arzneimittelmarkt verschwunden. Metformin als Standardtherapeutikum bei T2DM kann ebenfalls die Glucoseaufnahme in peripheres Gewebe verbessern, ist aber aufgrund therapielimitierender Effekte, wie dem Auftreten von gastrointestinale Beschwerden und Laktatazidosen, nicht bei allen Patienten uneingeschränkt einsetzbar.

Das zukunftsweisende antidiabetische Therapiekonzept sollte daher aus einem möglichst frühzeitigen Schutz der Langerhans-Inseln vor durch Fehlernährung induzierten metabolischen Schädigungen in Kombination mit Maßnahmen zur Verbesserung der Hormonwirkung an den Zielzellen bestehen. Außerdem müssen entzündliche und autoimmunologische Begleiterkrankungen therapiert und durch eine gesunde Lebensweise abgewendet werden. So könnte die Manifestation eines T2DM bereits in der prädiabetischen Phase verhindert werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abderrahmani, A., G. Niederhauser, D. Favre, S. Abdelli, M. Ferdaoussi, J. Y. Yang, R. Regazzi, C. Widmann and G. Waeber** (2007). "Human high-density lipoprotein particles prevent activation of the JNK pathway induced by human oxidised low-density lipoprotein particles in pancreatic beta cells." *Diabetologia* 50(6): 1304-1314.
- Aguilar-Bryan, L., C. G. Nichols, S. W. Wechsler, J. P. t. Clement, A. E. Boyd, 3rd, G. Gonzalez, H. Herrera-Sosa, K. Nguy, J. Bryan and D. A. Nelson** (1995). "Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion." *Science* 268(5209): 423-426.
- Ahren, B., E. Simonsson, A. J. Scheurink, H. Mulder, U. Myrsen and F. Sundler** (1997). "Dissociated insulinotropic sensitivity to glucose and carbachol in high-fat diet-induced insulin resistance in C57BL/6J mice." *Metabolism* 46(1): 97-106.
- Ainscow, E. K. and G. A. Rutter** (2002). "Glucose-stimulated oscillations in free cytosolic ATP concentration imaged in single islet beta-cells: evidence for a Ca²⁺-dependent mechanism." *Diabetes* 51 Suppl 1: S162-170.
- Aleksunes, L. M., S. A. Reisman, R. L. Yeager, M. J. Goedken and C. D. Klaassen** (2010). "Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 deletion impairs glucose tolerance and exacerbates hyperglycemia in type 1 diabetic mice." *J Pharmacol Exp Ther* 333(1): 140-151.
- Alston, T. A., L. Mela and H. J. Bright** (1977). "3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(9): 3767-3771.
- Ammala, C., F. M. Ashcroft and P. Rorsman** (1993). "Calcium-independent potentiation of insulin release by cyclic AMP in single beta-cells." *Nature* 363(6427): 356-358.
- Ammon, H. P., R. Hagele, N. Youssif, R. Eujen and N. El-Amri** (1983). "A possible role of intracellular and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release." *Endocrinology* 112(2): 720-726.
- Andersson, A.** (1974). "Long-term effects of glucose on insulin release and glucose oxidation by mouse pancreatic islets maintained in tissue culture." *Biochem J* 140(3): 377-382.
- Andreassen, O. A., A. Dedeoglu, V. Stanojevic, D. B. Hughes, S. E. Browne, C. A. Leech, R. J. Ferrante, J. F. Habener, M. F. Beal and M. K. Thomas** (2002). "Huntington's disease of the endocrine pancreas: insulin deficiency and diabetes mellitus due to impaired insulin gene expression." *Neurobiol Dis* 11(3): 410-424.
- Andreassen, O. A., R. J. Ferrante, A. Dedeoglu, D. W. Albers, P. Klivenyi, E. J. Carlson, C. J. Epstein and M. F. Beal** (2001). "Mice with a partial deficiency of manganese superoxide

dismutase show increased vulnerability to the mitochondrial toxins malonate, 3-nitropropionic acid, and MPTP." *Exp Neurol* 167(1): 189-195.

Antoine, M. H., M. Hermann, A. Herchuelz and P. Lebrun (1993). "Sodium nitroprusside inhibits glucose-induced insulin release by activating ATP-sensitive K⁺ channels." *Biochim Biophys Acta* 1175(3): 293-301.

Antoine, M. H., R. Ouedraogo, J. Sergooris, M. Hermann, A. Herchuelz and P. Lebrun (1996). "Hydroxylamine, a nitric oxide donor, inhibits insulin release and activates K⁺ATP channels." *Eur J Pharmacol* 313(3): 229-235.

Araki, T., M. Hirayama, S. Hiroi and K. Kaku (2012). "GPR40-induced insulin secretion by the novel agonist TAK-875: first clinical findings in patients with type 2 diabetes." *Diabetes Obes Metab* 14(3): 271-278.

Arkhammar, P., T. Nilsson, M. Welsh, N. Welsh and P. O. Berggren (1989). "Effects of protein kinase C activation on the regulation of the stimulus-secretion coupling in pancreatic beta-cells." *Biochem J* 264(1): 207-215.

Arsenijevic, D., H. Onuma, C. Pecqueur, S. Raimbault, B. S. Manning, B. Miroux, E. Couplan, M. C. Alves-Guerra, M. Gubern, R. Surwit, F. Bouillaud, D. Richard, S. Collins and D. Ricquier (2000). "Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production." *Nat Genet* 26(4): 435-439.

Ashcroft, F. M. and F. M. Gribble (1999). "ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease." *Diabetologia* 42(8): 903-919.

Ashcroft, F. M., P. Proks, P. A. Smith, C. Ammala, K. Bokvist and P. Rorsman (1994). "Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells." *J Cell Biochem* 55 Suppl: 54-65.

Ashcroft, F. M. and P. Rorsman (1989). "Electrophysiology of the pancreatic beta-cell." *Prog Biophys Mol Biol* 54(2): 87-143.

Ashcroft, F. M. and P. Rorsman (1990). "ATP-sensitive K⁺ channels: a link between B-cell metabolism and insulin secretion." *Biochem Soc Trans* 18(1): 109-111.

Aspinwall, C. A., J. R. Lakey and R. T. Kennedy (1999). "Insulin-stimulated insulin secretion in single pancreatic beta cells." *J Biol Chem* 274(10): 6360-6365.

Aston-Mourney, K., J. Proietto, G. Morahan and S. Andrikopoulos (2008). "Too much of a good thing: why it is bad to stimulate the beta cell to secrete insulin." *Diabetologia* 51(4): 540-545.

Aziz, N. A., D. F. Swaab, H. Pijl and R. A. Roos (2007). "Hypothalamic dysfunction and neuroendocrine and metabolic alterations in Huntington's disease: clinical consequences and therapeutic implications." *Rev Neurosci* 18(3-4): 223-251.

- Baba, S., S. Nakagawa, K. Takebe, Y. Goto, H. Maezawa, R. Takeda, N. Sakamoto and I. Fukui** (1983). "Comparison of gliclazide and glibenclamide treatment in non-insulin-dependent diabetes." *Tohoku J Exp Med* 141 Suppl: 693-706.
- Bacsi, A., M. Woodberry, W. Widger, J. Papaconstantinou, S. Mitra, J. W. Peterson and I. Boldogh** (2006). "Localization of superoxide anion production to mitochondrial electron transport chain in 3-NPA-treated cells." *Mitochondrion* 6(5): 235-244.
- Baird, L. and A. T. Dinkova-Kostova** (2011). "The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway." *Arch Toxicol* 85(4): 241-272.
- Bak, J. F., O. Schmitz, N. S. Sorensen and O. Pedersen** (1989). "Postreceptor effects of sulfonylurea on skeletal muscle glycogen synthase activity in type II diabetic patients." *Diabetes* 38(11): 1343-1350.
- Barg, S.** (2003). "Mechanisms of exocytosis in insulin-secreting B-cells and glucagon-secreting A-cells." *Pharmacol Toxicol* 92(1): 3-13.
- Barlow, J. and C. Affourtit** (2013). "Novel insights in pancreatic beta cell glucolipotoxicity from real-time functional analysis of mitochondrial energy metabolism in INS-1E insulinoma cells." *Biochem J*.
- Baukrowitz, T., U. Schulte, D. Oliver, S. Herlitz, T. Krauter, S. J. Tucker, J. P. Ruppersberg and B. Fakler** (1998). "PIP2 and PIP as determinants for ATP inhibition of KATP channels." *Science* 282(5391): 1141-1144.
- Beal, M. F., E. Brouillet, B. G. Jenkins, R. J. Ferrante, N. W. Kowall, J. M. Miller, E. Storey, R. Srivastava, B. R. Rosen and B. T. Hyman** (1993). "Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid." *J Neurosci* 13(10): 4181-4192.
- Beal, M. F., R. J. Ferrante, R. Henshaw, R. T. Matthews, P. H. Chan, N. W. Kowall, C. J. Epstein and J. B. Schulz** (1995). "3-Nitropropionic acid neurotoxicity is attenuated in copper/zinc superoxide dismutase transgenic mice." *J Neurochem* 65(2): 919-922.
- Behrens, M. I., J. Koh, L. M. Canzoniero, S. L. Sensi, C. A. Csernansky and D. W. Choi** (1995). "3-Nitropropionic acid induces apoptosis in cultured striatal and cortical neurons." *Neuroreport* 6(3): 545-548.
- Benchoua, A., Y. Trioulier, D. Zala, M. C. Gaillard, N. Lefort, N. Dufour, F. Saudou, J. M. Elalouf, E. Hirsch, P. Hantraye, N. Deglon and E. Brouillet** (2006). "Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin." *Mol Biol Cell* 17(4): 1652-1663.
- Bensasson, R. V., V. Zoete, A. T. Dinkova-Kostova and P. Talalay** (2008). "Two-step mechanism of induction of the gene expression of a prototypic cancer-protective enzyme by diphenols." *Chem Res Toxicol* 21(4): 805-812.

- Benson, A. M., R. P. Batzinger, S. Y. Ou, E. Bueding, Y. N. Cha and P. Talalay (1978).** "Elevation of hepatic glutathione S-transferase activities and protection against mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene by dietary antioxidants." *Cancer Res* 38(12): 4486-4495.
- Binienda, Z., C. Simmons, S. Hussain, W. Slikker, Jr. and S. F. Ali (1998).** "Effect of acute exposure to 3-nitropropionic acid on activities of endogenous antioxidants in the rat brain." *Neurosci Lett* 251(3): 173-176.
- Binienda, Z. K., S. F. Ali, A. Virmani, A. Amato, N. Salem and B. D. Przybyla (2006).** "Co-regulation of dopamine D1 receptor and uncoupling protein-2 expression in 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity: neuroprotective role of L-carnitine." *Neurosci Lett* 410(1): 62-65.
- Bjelakovic, G., D. Nikolova, L. L. Gluud, R. G. Simonetti and C. Gluud (2007).** "Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis." *JAMA* 297(8): 842-857.
- Bjorkqvist, M., M. Fex, E. Renstrom, N. Wierup, A. Petersen, J. Gil, K. Bacos, N. Popovic, J. Y. Li, F. Sundler, P. Brundin and H. Mulder (2005).** "The R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease develops diabetes due to deficient beta-cell mass and exocytosis." *Hum Mol Genet* 14(5): 565-574.
- Bloom, D. A. and A. K. Jaiswal (2003).** "Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from I κ Nrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression." *J Biol Chem* 278(45): 44675-44682.
- Bokvist, K., L. Eliasson, C. Ammala, E. Renstrom and P. Rorsman (1995).** "Co-localization of L-type Ca²⁺ channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells." *EMBO J* 14(1): 50-57.
- Bollheimer, L. C., R. H. Skelly, M. W. Chester, J. D. McGarry and C. J. Rhodes (1998).** "Chronic exposure to free fatty acid reduces pancreatic beta cell insulin content by increasing basal insulin secretion that is not compensated for by a corresponding increase in proinsulin biosynthesis translation." *J Clin Invest* 101(5): 1094-1101.
- Böni-Schnetzler, M., J. A. Ehses, M. Faulenbach and M. Y. Donath (2008).** "Insulinitis in type 2 diabetes." *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4: 201-204.
- Bonner-Weir, S., D. F. Trent, R. N. Honey and G. C. Weir (1981).** "Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited B-cell regeneration and hyperglycemia." *Diabetes* 30(1): 64-69.
- Borlongan, C. V., T. K. Koutouzis and P. R. Sanberg (1997).** "3-Nitropropionic acid animal model and Huntington's disease." *Neurosci Biobehav Rev* 21(3): 289-293.

- Bowker, S. L., S. R. Majumdar, P. Veugelers and J. A. Johnson** (2006). "Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin." *Diabetes Care* 29(2): 254-258.
- Brady, N. R., S. P. Elmore, J. J. van Beek, K. Krab, P. J. Courtoy, L. Hue and H. V. Westerhoff** (2004). "Coordinated behavior of mitochondria in both space and time: a reactive oxygen species-activated wave of mitochondrial depolarization." *Biophys J* 87(3): 2022-2034.
- Brand, M. D., C. Affourtit, T. C. Esteves, K. Green, A. J. Lambert, S. Miwa, J. L. Pakay and N. Parker** (2004). "Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins." *Free Radic Biol Med* 37(6): 755-767.
- Braun, M., R. Ramracheya, M. Bengtsson, Q. Zhang, J. Karanauskaite, C. Partridge, P. R. Johnson and P. Rorsman** (2008). "Voltage-gated ion channels in human pancreatic beta-cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion." *Diabetes* 57(6): 1618-1628.
- Briaud, I., J. S. Harmon, C. L. Kelpe, V. B. Segu and V. Poitout** (2001). "Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids." *Diabetes* 50(2): 315-321.
- Briaud, I., C. L. Kelpe, L. M. Johnson, P. O. Tran and V. Poitout** (2002). "Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats." *Diabetes* 51(3): 662-668.
- Brissova, M., M. J. Fowler, W. E. Nicholson, A. Chu, B. Hirshberg, D. M. Harlan and A. C. Powers** (2005). "Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy." *J Histochem Cytochem* 53(9): 1087-1097.
- Britsch, S., P. Krippeit-Drews, F. Lang, M. Gregor and G. Drews** (1995). "Glucagon-like peptide-1 modulates Ca²⁺ current but not K⁺ATP current in intact mouse pancreatic B-cells." *Biochem Biophys Res Commun* 207(1): 33-39.
- Brookes, P. S. and V. M. Darley-Usmar** (2004a). "Role of calcium and superoxide dismutase in sensitizing mitochondria to peroxynitrite-induced permeability transition." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(1): H39-46.
- Brookes, P. S., Y. Yoon, J. L. Robotham, M. W. Anders and S. S. Sheu** (2004b). "Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle." *Am J Physiol Cell Physiol* 287(4): C817-833.
- Browne, S. E., A. C. Bowling, U. MacGarvey, M. J. Baik, S. C. Berger, M. M. Muqit, E. D. Bird and M. F. Beal** (1997). "Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia." *Ann Neurol* 41(5): 646-653.
- Brunham, L. R., J. K. Kruit, T. D. Pape, J. M. Timmins, A. Q. Reuwer, Z. Vasanji, B. J. Marsh, B. Rodrigues, J. D. Johnson, J. S. Parks, C. B. Verchere and M. R. Hayden** (2007). "Beta-cell

ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment." *Nat Med* 13(3): 340-347.

Buetler, T. M., E. P. Gallagher, C. Wang, D. L. Stahl, J. D. Hayes and D. L. Eaton (1995). "Induction of phase I and phase II drug-metabolizing enzyme mRNA, protein, and activity by BHA, ethoxyquin, and oltipraz." *Toxicol Appl Pharmacol* 135(1): 45-57.

Buetler, T. M., A. Krauskopf and U. T. Rugg (2004). "Role of superoxide as a signaling molecule." *News Physiol Sci* 19: 120-123.

Burg, E. D., C. V. Remillard and J. X. Yuan (2006). "K⁺ channels in apoptosis." *J Membr Biol* 209(1): 3-20.

Busija, D. W., P. Katakam, N. C. Rajapakse, B. Kis, G. Grover, F. Domoki and F. Bari (2005). "Effects of ATP-sensitive potassium channel activators diazoxide and BMS-191095 on membrane potential and reactive oxygen species production in isolated piglet mitochondria." *Brain Res Bull* 66(2): 85-90.

Butler, A. E., J. Janson, S. Bonner-Weir, R. Ritzel, R. A. Rizza and P. C. Butler (2003). "Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes." *Diabetes* 52(1): 102-110.

Buysschaert, M. and M. Bergman (2011). "Definition of prediabetes." *Med Clin North Am* 95(2): 289-297, vii.

Cabrera, O., D. M. Berman, N. S. Kenyon, C. Ricordi, P. O. Berggren and A. Caicedo (2006). "The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(7): 2334-2339.

Cantley, J., J. G. Burchfield, G. L. Pearson, C. Schmitz-Peiffer, M. Leitges and T. J. Biden (2009). "Deletion of PKCepsilon selectively enhances the amplifying pathways of glucose-stimulated insulin secretion via increased lipolysis in mouse beta-cells." *Diabetes* 58(8): 1826-1834.

Carlsson, C., L. A. Borg and N. Welsh (1999). "Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro." *Endocrinology* 140(8): 3422-3428.

Carpentier, A., S. D. Mittelman, B. Lamarche, R. N. Bergman, A. Giacca and G. F. Lewis (1999). "Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation." *Am J Physiol* 276(6 Pt 1): E1055-1066.

Carter, C. L. and C. W. Mc (1949). "Hiptagenic acid identified as beta-nitropropionic acid." *Nature* 164(4170): 575.

- Castellano, J. M., A. Guinda, T. Delgado, M. Rada and J. A. Cayuela** (2013). "Biochemical basis of the antidiabetic activity of oleanolic acid and related pentacyclic triterpenes." *Diabetes* 62(6): 1791-1799.
- Chan, C. B., D. De Leo, J. W. Joseph, T. S. McQuaid, X. F. Ha, F. Xu, R. G. Tsushima, P. S. Pennefather, A. M. Salapatek and M. B. Wheeler** (2001a). "Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action." *Diabetes* 50(6): 1302-1310.
- Chan, C. B., P. E. MacDonald, M. C. Saleh, D. C. Johns, E. Marban and M. B. Wheeler** (1999a). "Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets." *Diabetes* 48(7): 1482-1486.
- Chan, K., X. D. Han and Y. W. Kan** (2001b). "An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(8): 4611-4616.
- Chan, K. and Y. W. Kan** (1999b). "Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12731-12736.
- Chartoumpakis, D. V. and T. W. Kensler** (2013). "New player on an old field; the keap1/Nrf2 pathway as a target for treatment of type 2 diabetes and metabolic syndrome." *Curr Diabetes Rev* 9(2): 137-145.
- Cheeseman, K. H. and T. F. Slater** (1993). "An introduction to free radical biochemistry." *Br Med Bull* 49(3): 481-493.
- Chen, H., X. Li and P. N. Epstein** (2005). "MnSOD and catalase transgenes demonstrate that protection of islets from oxidative stress does not alter cytokine toxicity." *Diabetes* 54(5): 1437-1446.
- Chen, L. L., F. Yu, T. S. Zeng, Y. F. Liao, Y. M. Li and H. C. Ding** (2011). "Effects of gliclazide on endothelial function in patients with newly diagnosed type 2 diabetes." *Eur J Pharmacol* 659(2-3): 296-301.
- Cho, K. J., H. W. Kim, S. Y. Cheon, J. E. Lee and G. W. Kim** (2013). "Apoptosis signal-regulating kinase-1 aggravates ROS-mediated striatal degeneration in 3-nitropropionic acid-infused mice." *Biochem Biophys Res Commun*.
- Choe, S. S., A. H. Choi, J. W. Lee, K. H. Kim, J. J. Chung, J. Park, K. M. Lee, K. G. Park, I. K. Lee and J. B. Kim** (2007). "Chronic activation of liver X receptor induces beta-cell apoptosis through hyperactivation of lipogenesis: liver X receptor-mediated lipotoxicity in pancreatic beta-cells." *Diabetes* 56(6): 1534-1543.
- Choi, S. H., Y. M. Kim, J. M. Lee and S. G. Kim** (2010). "Antioxidant and mitochondrial protective effects of oxidized metabolites of oltipraz." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 6(2): 213-224.

Chowdhry, S., M. H. Nazmy, P. J. Meakin, A. T. Dinkova-Kostova, S. V. Walsh, T. Tsujita, J. F. Dillon, M. L. Ashford and J. D. Hayes (2010). "Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis." *Free Radic Biol Med* 48(2): 357-371.

Clapper, M. L. (1998). "Chemopreventive activity of oltipraz." *Pharmacol Ther* 78(1): 17-27.

Cleeter, M. W., J. M. Cooper, V. M. Darley-Usmar, S. Moncada and A. H. Schapira (1994). "Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases." *FEBS Lett* 345(1): 50-54.

Clement, J. P. t., K. Kunjilwar, G. Gonzalez, M. Schwanstecher, U. Panten, L. Aguilar-Bryan and J. Bryan (1997). "Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits." *Neuron* 18(5): 827-838.

Cnop, M. (2008a). "Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes." *Biochem Soc Trans* 36(Pt 3): 348-352.

Cnop, M., J. C. Hannaert, A. Y. Gruppig and D. G. Pipeleers (2002). "Low density lipoprotein can cause death of islet beta-cells by its cellular uptake and oxidative modification." *Endocrinology* 143(9): 3449-3453.

Cnop, M., M. Igoillo-Esteve, D. A. Cunha, L. Ladriere and D. L. Eizirik (2008b). "An update on lipotoxic endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells." *Biochem Soc Trans* 36(Pt 5): 909-915.

Coles, C. J., D. E. Edmondson and T. P. Singer (1979). "Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate." *J Biol Chem* 254(12): 5161-5167.

Collins, S. C., A. Salehi, L. Eliasson, C. S. Olofsson and P. Rorsman (2008). "Long-term exposure of mouse pancreatic islets to oleate or palmitate results in reduced glucose-induced somatostatin and oversecretion of glucagon." *Diabetologia* 51(9): 1689-1693.

Colussi, C., M. C. Albertini, S. Coppola, S. Rovidati, F. Galli and L. Ghibelli (2000). "H₂O₂-induced block of glycolysis as an active ADP-ribosylation reaction protecting cells from apoptosis." *FASEB J* 14(14): 2266-2276.

Cook, D. L. and C. N. Hales (1984). "Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells." *Nature* 311(5983): 271-273.

Cook, D. L. and E. Perara (1982). "Islet electrical pacemaker response to alpha-adrenergic stimulation." *Diabetes* 31(11): 985-990.

Coppieters, K., N. Amirian and M. von Herrath (2012). "Intravital imaging of CTLs killing islet cells in diabetic mice." *J Clin Invest* 122(1): 119-131.

- Coppola, T., C. Frantz, V. Perret-Menoud, S. Gattesco, H. Hirling and R. Regazzi (2002).** "Pancreatic beta-cell protein granuphilin binds Rab3 and Munc-18 and controls exocytosis." *Mol Biol Cell* 13(6): 1906-1915.
- Corbett, J. A., J. L. Wang, M. A. Sweetland, J. R. Lancaster, Jr. and M. L. McDaniel (1992).** "Interleukin 1 beta induces the formation of nitric oxide by beta-cells purified from rodent islets of Langerhans. Evidence for the beta-cell as a source and site of action of nitric oxide." *J Clin Invest* 90(6): 2384-2391.
- Cordeiro, R. M. (2013).** "Reactive oxygen species at phospholipid bilayers: Distribution, mobility and permeation." *Biochim Biophys Acta*.
- Coyle, J. T. and P. Puttfarcken (1993).** "Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders." *Science* 262(5134): 689-695.
- Cruciani-Guglielmacci, C., M. Vincent-Lamon, C. Rouch, M. Orosco, A. Ktorza and C. Magnan (2005).** "Early changes in insulin secretion and action induced by high-fat diet are related to a decreased sympathetic tone." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(1): E148-154.
- Cruz, N. G., L. P. Sousa, M. O. Sousa, N. T. Pietrani, A. P. Fernandes and K. B. Gomes (2013).** "The linkage between inflammation and Type 2 diabetes mellitus." *Diabetes Res Clin Pract* 99(2): 85-92.
- Cullinan, S. B., D. Zhang, M. Hannink, E. Arvisais, R. J. Kaufman and J. A. Diehl (2003).** "Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival." *Mol Cell Biol* 23(20): 7198-7209.
- Cunningham, J. M., J. G. Mabley, C. A. Delaney and I. C. Green (1994).** "The effect of nitric oxide donors on insulin secretion, cyclic GMP and cyclic AMP in rat islets of Langerhans and the insulin-secreting cell lines HIT-T15 and RINm5F." *Mol Cell Endocrinol* 102(1-2): 23-29.
- Curry, D. L., L. L. Bennett and G. M. Grodsky (1968).** "Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas." *Endocrinology* 83(3): 572-584.
- Daniel, S., M. Noda, S. G. Straub and G. W. Sharp (1999).** "Identification of the docked granule pool responsible for the first phase of glucose-stimulated insulin secretion." *Diabetes* 48(9): 1686-1690.
- De Long, M. J., H. J. Prochaska and P. Talalay (1985).** "Tissue-specific induction patterns of cancer-protective enzymes in mice by tert-butyl-4-hydroxyanisole and related substituted phenols." *Cancer Res* 45(2): 546-551.
- De Mattia, G., O. Laurenti and D. Fava (2003).** "Diabetic endothelial dysfunction: effect of free radical scavenging in Type 2 diabetic patients." *J Diabetes Complications* 17(2 Suppl): 30-35.

- De Vos, A., H. Heimberg, E. Quartier, P. Huypens, L. Bouwens, D. Pipeleers and F. Schuit** (1995). "Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression." *J Clin Invest* 96(5): 2489-2495.
- Debuyser, A., G. Drews and J. C. Henquin** (1991). "Adrenaline inhibition of insulin release: role of the repolarization of the B cell membrane." *Pflugers Arch* 419(2): 131-137.
- Del Guerra, S., M. Grupillo, M. Masini, R. Lupi, M. Bugliani, S. Torri, U. Boggi, M. Del Chiaro, F. Vistoli, F. Mosca, S. Del Prato and P. Marchetti** (2007). "Gliclazide protects human islet beta-cells from apoptosis induced by intermittent high glucose." *Diabetes Metab Res Rev* 23(3): 234-238.
- Del Guerra, S., R. Lupi, L. Marselli, M. Masini, M. Bugliani, S. Sbrana, S. Torri, M. Pollera, U. Boggi, F. Mosca, S. Del Prato and P. Marchetti** (2005). "Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes." *Diabetes* 54(3): 727-735.
- Del Prato, S. and N. Pulizzi** (2006). "The place of sulfonylureas in the therapy for type 2 diabetes mellitus." *Metabolism* 55(5 Suppl 1): S20-27.
- Detimary, P., S. Dejonghe, Z. Ling, D. Pipeleers, F. Schuit and J. C. Henquin** (1998). "The changes in adenine nucleotides measured in glucose-stimulated rodent islets occur in beta cells but not in alpha cells and are also observed in human islets." *J Biol Chem* 273(51): 33905-33908.
- Diakogiannaki, E., S. Dhayal, C. E. Childs, P. C. Calder, H. J. Welters and N. G. Morgan** (2007). "Mechanisms involved in the cytotoxic and cytoprotective actions of saturated versus monounsaturated long-chain fatty acids in pancreatic beta-cells." *J Endocrinol* 194(2): 283-291.
- Diani, A. R., G. Sawada, B. Wyse, F. T. Murray and M. Khan** (2004). "Pioglitazone preserves pancreatic islet structure and insulin secretory function in three murine models of type 2 diabetes." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286(1): E116-122.
- Dimmeler, S., F. Lottspeich and B. Brune** (1992). "Nitric oxide causes ADP-ribosylation and inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase." *J Biol Chem* 267(24): 16771-16774.
- Dinkova-Kostova, A. T., W. D. Holtzclaw, R. N. Cole, K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, M. Yamamoto and P. Talalay** (2002). "Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18): 11908-11913.
- Dinkova-Kostova, A. T., M. A. Massiah, R. E. Bozak, R. J. Hicks and P. Talalay** (2001). "Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3404-3409.

- Drews, G., C. Krämer, M. Düfer and P. Krippeit-Drews (2000a).** "Contrasting effects of alloxan on islets and single mouse pancreatic beta-cells." *Biochem J* 352 Pt 2: 389-397.
- Drews, G., C. Krämer and P. Krippeit-Drews (2000b).** "Dual effect of NO on K(+)(ATP) current of mouse pancreatic B-cells: stimulation by deenergizing mitochondria and inhibition by direct interaction with the channel." *Biochim Biophys Acta* 1464(1): 62-68.
- Drews, G., P. Krippeit-Drews and M. Düfer (2010a).** "Electrophysiology of islet cells." *Adv Exp Med Biol* 654: 115-163.
- Drews, G., P. Krippeit-Drews and M. Düfer (2010b).** "Oxidative stress and beta-cell dysfunction." *Pflugers Arch* 460(4): 703-718.
- Dubois, M., F. Pattou, J. Kerr-Conte, V. Gmyr, B. Vandewalle, P. Desreumaux, J. Auwerx, K. Schoonjans and J. Lefebvre (2000).** "Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in normal human pancreatic islet cells." *Diabetologia* 43(9): 1165-1169.
- Duchen, M. R. (1999).** "Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death." *J Physiol* 516 (Pt 1): 1-17.
- Duchen, M. R., P. A. Smith and F. M. Ashcroft (1993).** "Substrate-dependent changes in mitochondrial function, intracellular free calcium concentration and membrane channels in pancreatic beta-cells." *Biochem J* 294 (Pt 1): 35-42.
- Düfer, M., D. Haspel, P. Krippeit-Drews, M. Kelm, F. Ranta, R. Nitschke, S. Ullrich, L. Aguilar-Bryan, J. Bryan and G. Drews (2007).** "The KATP channel is critical for calcium sequestration into non-ER compartments in mouse pancreatic beta cells." *Cell Physiol Biochem* 20(1-4): 65-74.
- Düfer, M., P. Krippeit-Drews, L. Buntinas, D. Siemen and G. Drews (2002a).** "Methyl pyruvate stimulates pancreatic beta-cells by a direct effect on KATP channels, and not as a mitochondrial substrate." *Biochem J* 368(Pt 3): 817-825.
- Düfer, M., P. Krippeit-Drews and G. Drews (2002b).** "Inhibition of mitochondrial function affects cellular Ca²⁺ handling in pancreatic B-cells." *Pflugers Arch* 444(1-2): 236-243.
- Düfer, M., P. Krippeit-Drews, N. Lember, L. A. Idahl and G. Drews (2001).** "Diabetogenic effect of cyclosporin A is mediated by interference with mitochondrial function of pancreatic B-cells." *Mol Pharmacol* 60(4): 873-879.
- Dukes, I. D., M. S. McIntyre, R. J. Mertz, L. H. Philipson, M. W. Roe, B. Spencer and J. F. Worley, 3rd (1994).** "Dependence on NADH produced during glycolysis for beta-cell glucose signaling." *J Biol Chem* 269(15): 10979-10982.
- Dunne, M. J., C. Kane, R. M. Shepherd, J. A. Sanchez, R. F. James, P. R. Johnson, A. Aynsley-Green, S. Lu, J. P. t. Clement, K. J. Lindley, S. Seino and L. Aguilar-Bryan (1997).** "Familial

persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy and mutations in the sulfonylurea receptor." *N Engl J Med* 336(10): 703-706.

Dupre, J., S. A. Ross, D. Watson and J. C. Brown (1973). "Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man." *J Clin Endocrinol Metab* 37(5): 826-828.

Duval, C., A. Negre-Salvayre, A. Dogilo, R. Salvayre, L. Penicaud and L. Casteilla (2002). "Increased reactive oxygen species production with antisense oligonucleotides directed against uncoupling protein 2 in murine endothelial cells." *Biochem Cell Biol* 80(6): 757-764.

Ebert, R. and W. Creutzfeldt (1987). "Gastrointestinal peptides and insulin secretion." *Diabetes Metab Rev* 3(1): 1-26.

Echtay, K. S., D. Roussel, J. St-Pierre, M. B. Jekabsons, S. Cadenas, J. A. Stuart, J. A. Harper, S. J. Roebuck, A. Morrison, S. Pickering, J. C. Clapham and M. D. Brand (2002). "Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins." *Nature* 415(6867): 96-99.

Efanov, A. M., S. Sewing, K. Bokvist and J. Gromada (2004). "Liver X receptor activation stimulates insulin secretion via modulation of glucose and lipid metabolism in pancreatic beta-cells." *Diabetes* 53 Suppl 3: S75-78.

Efanova, I. B., S. V. Zaitsev, B. Zhivotovsky, M. Kohler, S. Efendic, S. Orrenius and P. O. Berggren (1998). "Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic beta-cells. A process dependent on intracellular Ca²⁺ concentration." *J Biol Chem* 273(50): 33501-33507.

Ehnes, J. A., A. Perren, E. Eppler, P. Ribaux, J. A. Pospisilik, R. Maor-Cahn, X. Gueripel, H. Ellingsgaard, M. K. Schneider, G. Biollaz, A. Fontana, M. Reinecke, F. Homo-Delarche and M. Y. Donath (2007). "Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes." *Diabetes* 56(9): 2356-2370.

Eitel, K., H. Staiger, M. D. Brendel, D. Brandhorst, R. G. Bretzel, H. U. Haring and M. Kellerer (2002). "Different role of saturated and unsaturated fatty acids in beta-cell apoptosis." *Biochem Biophys Res Commun* 299(5): 853-856.

Eizirik, D. L., M. A. de Lucio, A. C. Boschero and M. E. Hoffmann (1986). "1,10-phenanthroline, a metal chelator, protects against alloxan- but not streptozotocin-induced diabetes." *J Free Radic Biol Med* 2(3): 189-192.

Eizirik, D. L., D. G. Pipeleers, Z. Ling, N. Welsh, C. Hellerstrom and A. Andersson (1994). "Major species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic beta-cell injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(20): 9253-9256.

El-Assaad, W., J. Buteau, M. L. Peyot, C. Nolan, R. Roduit, S. Hardy, E. Joly, G. Dbaibo, L. Rosenberg and M. Prentki (2003). "Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death." *Endocrinology* 144(9): 4154-4163.

- Elahi, D., M. Nagulesparan, R. J. Herschcopf, D. C. Muller, J. D. Tobin, P. M. Blix, A. H. Rubenstein, R. H. Unger and R. Andres** (1982). "Feedback inhibition of insulin secretion by insulin: relation to the hyperinsulinemia of obesity." *N Engl J Med* 306(20): 1196-1202.
- Elks, M. L.** (1993). "Chronic perfusion of rat islets with palmitate suppresses glucose-stimulated insulin release." *Endocrinology* 133(1): 208-214.
- Eto, K., Y. Tsubamoto, Y. Terauchi, T. Sugiyama, T. Kishimoto, N. Takahashi, N. Yamauchi, N. Kubota, S. Murayama, T. Aizawa, Y. Akanuma, S. Aizawa, H. Kasai, Y. Yazaki and T. Kadowaki** (1999). "Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion." *Science* 283(5404): 981-985.
- Etoh, T., T. Inoguchi, M. Kakimoto, N. Sonoda, K. Kobayashi, J. Kuroda, H. Sumimoto and H. Nawata** (2003). "Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventional insulin treatment." *Diabetologia* 46(10): 1428-1437.
- Evans, J. L., I. D. Goldfine, B. A. Maddux and G. M. Grodsky** (2003). "Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction?" *Diabetes* 52(1): 1-8.
- Farrer, L. A.** (1985). "Diabetes mellitus in Huntington disease." *Clin Genet* 27(1): 62-67.
- Fehsel, K., A. Jalowy, S. Qi, V. Burkart, B. Hartmann and H. Kolb** (1993). "Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide." *Diabetes* 42(3): 496-500.
- Fei, P., G. A. Matwyshyn, T. H. Rushmore and A. N. Kong** (1996). "Transcription regulation of rat glutathione S-transferase Ya subunit gene expression by chemopreventive agents." *Pharm Res* 13(7): 1043-1048.
- Finkel, T.** (1998). "Oxygen radicals and signaling." *Curr Opin Cell Biol* 10(2): 248-253.
- Flanagan, S. E., A. M. Patch, D. J. Mackay, E. L. Edghill, A. L. Gloyn, D. Robinson, J. P. Shield, K. Temple, S. Ellard and A. T. Hattersley** (2007). "Mutations in ATP-sensitive K⁺ channel genes cause transient neonatal diabetes and permanent diabetes in childhood or adulthood." *Diabetes* 56(7): 1930-1937.
- Fukuen, S., M. Iwaki, A. Yasui, M. Makishima, M. Matsuda and I. Shimomura** (2005). "Sulfonylurea agents exhibit peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonistic activity." *J Biol Chem* 280(25): 23653-23659.
- Furukawa, H., R. J. Carroll, H. H. Swift and D. F. Steiner** (1999). "Long-term elevation of free fatty acids leads to delayed processing of proinsulin and prohormone convertases 2 and 3 in the pancreatic beta-cell line MIN6." *Diabetes* 48(7): 1395-1401.
- Gallwitz, B.** (2010). "[DPP-4 inhibitors in clinical use. Therapy without the risk of hypoglycaemia]." *Pharm Unserer Zeit* 39(2): 114-118.

- Garg, R., W. Chen and M. Pendergrass** (2010). "Acute pancreatitis in type 2 diabetes treated with exenatide or sitagliptin: a retrospective observational pharmacy claims analysis." *Diabetes Care* 33(11): 2349-2354.
- Gerbitz, K. D., K. Gempel and D. Brdiczka** (1996). "Mitochondria and diabetes. Genetic, biochemical, and clinical implications of the cellular energy circuit." *Diabetes* 45(2): 113-126.
- Gerich, F. J., S. Hepp, I. Probst and M. Muller** (2006). "Mitochondrial inhibition prior to oxygen-withdrawal facilitates the occurrence of hypoxia-induced spreading depression in rat hippocampal slices." *J Neurophysiol* 96(1): 492-504.
- Gier, B., P. Krippeit-Drews, T. Sheiko, L. Aguilar-Bryan, J. Bryan, M. Düfer and G. Drews** (2009). "Suppression of KATP channel activity protects murine pancreatic beta cells against oxidative stress." *J Clin Invest* 119(11): 3246-3256.
- Gilon, P., A. Arredouani, P. Gailly, J. Gromada and J. C. Henquin** (1999). "Uptake and release of Ca²⁺ by the endoplasmic reticulum contribute to the oscillations of the cytosolic Ca²⁺ concentration triggered by Ca²⁺ influx in the electrically excitable pancreatic B-cell." *J Biol Chem* 274(29): 20197-20205.
- Gilon, P., R. M. Shepherd and J. C. Henquin** (1993). "Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ as evidences in single pancreatic islets." *J Biol Chem* 268(30): 22265-22268.
- Giudice, A. and M. Montella** (2006). "Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention." *Bioessays* 28(2): 169-181.
- Goldstein, M. B. and E. A. Davis, Jr.** (1968). "The three dimensional architecture of the islets of Langerhans." *Acta anatomica* 71(2): 161-171.
- Gonzalez-Polo, R. A., J. M. Bravo-San Pedro, R. Gomez-Sanchez, E. Pizarro-Estrella, M. Niso-Santano and J. M. Fuentes** (2013). "Autophagy, mitochondria and 3-nitropropionic acid joined in the same model." *Br J Pharmacol* 168(1): 60-62.
- González, A., M. P. Granados, G. M. Salido and J. A. Pariente** (2005). "H₂O₂-induced changes in mitochondrial activity in isolated mouse pancreatic acinar cells." *Mol Cell Biochem* 269(1-2): 165-173.
- Goodner, C. J., B. C. Walike, D. J. Koerker, J. W. Ensink, A. C. Brown, E. W. Chideckel, J. Palmer and L. Kalnasy** (1977). "Insulin, glucagon, and glucose exhibit synchronous, sustained oscillations in fasting monkeys." *Science* 195(4274): 177-179.
- Gorin, Y. and K. Block** (2013). "Nox as a target for diabetic complications." *Clin Sci (Lond)* 125(8): 361-382.

- Graciano, M. F., L. R. Santos, R. Curi and A. R. Carpinelli** (2011). "NAD(P)H oxidase participates in the palmitate-induced superoxide production and insulin secretion by rat pancreatic islets." *J Cell Physiol* 226(4): 1110-1117.
- Grankvist, K. and S. L. Marklund** (1983). "Opposite effects of two metal-chelators on alloxan-induced diabetes in mice." *Life Sci* 33(25): 2535-2540.
- Grankvist, K., S. L. Marklund and I. B. Taljedal** (1981). "CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse." *Biochem J* 199(2): 393-398.
- Gribble, F. M., S. J. Tucker, T. Haug and F. M. Ashcroft** (1998). "MgATP activates the beta cell KATP channel by interaction with its SUR1 subunit." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(12): 7185-7190.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie and R. Y. Tsien** (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." *J Biol Chem* 260(6): 3440-3450.
- Gu, M., M. T. Gash, V. M. Mann, F. Javoy-Agid, J. M. Cooper and A. H. Schapira** (1996). "Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus." *Ann Neurol* 39(3): 385-389.
- Guichard, C., R. Moreau, D. Pessayre, T. K. Epperson and K. H. Krause** (2008). "NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets: a role in the metabolic syndrome and diabetes?" *Biochem Soc Trans* 36(Pt 5): 920-929.
- Gurgul, E., S. Lortz, M. Tiedge, A. Jorns and S. Lenzen** (2004). "Mitochondrial catalase overexpression protects insulin-producing cells against toxicity of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines." *Diabetes* 53(9): 2271-2280.
- Hagman, D. K., L. B. Hays, S. D. Parazzoli and V. Poitout** (2005). "Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans." *J Biol Chem* 280(37): 32413-32418.
- Halliwell, B.** (1989). "Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: what is its mechanism of action?" *Free Radic Biol Med* 7(6): 645-651.
- Han, B. G., C. M. Hao, E. E. Tchekneva, Y. Y. Wang, C. A. Lee, B. Ebrahim, R. C. Harris, T. S. Kern, D. H. Wasserman, M. D. Breyer and Z. Qi** (2008). "Markers of glycemic control in the mouse: comparisons of 6-h- and overnight-fasted blood glucoses to Hb A1c." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(4): E981-986.
- Hanenberg, H., V. Kolb-Bachofen, G. Kantwerk-Funke and H. Kolb** (1989). "Macrophage infiltration precedes and is a prerequisite for lymphocytic insulinitis in pancreatic islets of pre-diabetic BB rats." *Diabetologia* 32(2): 126-134.
- Harmon, J. S., C. E. Gleason, Y. Tanaka, V. Poitout and R. P. Robertson** (2001). "Antecedent hyperglycemia, not hyperlipidemia, is associated with increased islet triacylglycerol content

and decreased insulin gene mRNA level in Zucker diabetic fatty rats." *Diabetes* 50(11): 2481-2486.

Hartroft, W. S. and G. A. Wrenshall (1955). "Correlation of beta-cell granulation with extractable insulin of the pancreas; studies in adult human diabetics and nondiabetics." *Diabetes* 4(1): 1-7.

Haspel, D., P. Krippeit-Drews, L. Aguilar-Bryan, J. Bryan, G. Drews and M. Düfer (2005). "Crosstalk between membrane potential and cytosolic Ca²⁺ concentration in beta cells from Sur1^{-/-} mice." *Diabetologia* 48(5): 913-921.

Heber, D. and C. L. Carpenter (2011). "Addictive genes and the relationship to obesity and inflammation." *Mol Neurobiol* 44(2): 160-165.

Hedekov, C. J. (1980). "Mechanism of glucose-induced insulin secretion." *Physiol Rev* 60(2): 442-509.

Heller, R. S. (2010). "The comparative anatomy of islets." *Advances in experimental medicine and biology* 654: 21-37.

Hellman, B., Ed. (1969). Histology and histophysiology of the islets of Langerhans in man. Handbook of diabetes mellitus. *Munich*, Lehmanns, V.

Henquin, J. C. (1978). "D-glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells." *Nature* 271(5642): 271-273.

Henquin, J. C. (2000). "Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose." *Diabetes* 49(11): 1751-1760.

Henquin, J. C. and H. P. Meissner (1981). "Effects of amino acids on membrane potential and 86Rb⁺ fluxes in pancreatic beta-cells." *Am J Physiol* 240(3): E245-252.

Henriksen, E. J., M. K. Diamond-Stanic and E. M. Marchionne (2011). "Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes." *Free Radic Biol Med* 51(5): 993-999.

Holland, R., M. Navamal, M. Velayutham, J. L. Zweier, T. W. Kensler and J. C. Fishbein (2009). "Hydrogen peroxide is a second messenger in phase 2 enzyme induction by cancer chemopreventive dithiolethiones." *Chem Res Toxicol* 22(8): 1427-1434.

Hollander, P. and C. Spellman (2012). "Controversies in prediabetes: do we have a diagnosis?" *Postgrad Med* 124(4): 109-118.

Hoppa, M. B., S. Collins, R. Ramracheya, L. Hodson, S. Amisten, Q. Zhang, P. Johnson, F. M. Ashcroft and P. Rorsman (2009). "Chronic palmitate exposure inhibits insulin secretion by dissociation of Ca(2+) channels from secretory granules." *Cell Metab* 10(6): 455-465.

Horiguchi, T., B. Kis, N. Rajapakse, K. Shimizu and D. W. Busija (2003). "Opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels is a trigger of 3-nitropropionic acid-induced tolerance to transient focal cerebral ischemia in rats." *Stroke* 34(4): 1015-1020.

Hosokawa, H., B. E. Corkey and J. L. Leahy (1997). "Beta-cell hypersensitivity to glucose following 24-h exposure of rat islets to fatty acids." *Diabetologia* 40(4): 392-397.

Huang, H. C., T. Nguyen and C. B. Pickett (2002). "Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription." *J Biol Chem* 277(45): 42769-42774.

Huang, L. S., G. Sun, D. Cobessi, A. C. Wang, J. T. Shen, E. Y. Tung, V. E. Anderson and E. A. Berry (2006). "3-nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by complex II, forms a covalent adduct with a catalytic base arginine in the active site of the enzyme." *J Biol Chem* 281(9): 5965-5972.

Hughes, S. J., A. Clark, P. McShane, H. H. Contractor, D. W. Gray and P. R. Johnson (2006). "Characterisation of collagen VI within the islet-exocrine interface of the human pancreas: implications for clinical islet isolation?" *Transplantation* 81(3): 423-426.

Hyslop, P. A., D. B. Hinshaw, W. A. Halsey, Jr., I. U. Schraufstatter, R. D. Sauerheber, R. G. Spragg, J. H. Jackson and C. G. Cochrane (1988). "Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide." *J Biol Chem* 263(4): 1665-1675.

Ichas, F. and J. P. Mazat (1998). "From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state." *Biochim Biophys Acta* 1366(1-2): 33-50.

Iida, K., K. Itoh, Y. Kumagai, R. Oyasu, K. Hattori, K. Kawai, T. Shimazui, H. Akaza and M. Yamamoto (2004). "Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis." *Cancer Res* 64(18): 6424-6431.

Imoto, H., N. Sasaki, M. Iwase, U. Nakamura, M. Oku, K. Sonoki, Y. Uchizono and M. Iida (2008). "Impaired insulin secretion by diphenyleioidium associated with perturbation of cytosolic Ca²⁺ dynamics in pancreatic beta-cells." *Endocrinology* 149(11): 5391-5400.

Inoguchi, T., P. Li, F. Umeda, H. Y. Yu, M. Kakimoto, M. Imamura, T. Aoki, T. Etoh, T. Hashimoto, M. Naruse, H. Sano, H. Utsumi and H. Nawata (2000). "High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells." *Diabetes* 49(11): 1939-1945.

Inukai, K., M. Watanabe, Y. Nakashima, N. Takata, A. Isoyama, T. Sawa, S. Kurihara, T. Awata and S. Katayama (2005). "Glimepiride enhances intrinsic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity in 3T3-L1 adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 328(2): 484-490.

- Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel and M. Yamamoto** (1999). "Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain." *Genes Dev* 13(1): 76-86.
- Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, T. O'Connor and M. Yamamoto** (2003a). "Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles." *Genes Cells* 8(4): 379-391.
- Itoh, Y., Y. Kawamata, M. Harada, M. Kobayashi, R. Fujii, S. Fukusumi, K. Ogi, M. Hosoya, Y. Tanaka, H. Uejima, H. Tanaka, M. Maruyama, R. Satoh, S. Okubo, H. Kizawa, H. Komatsu, F. Matsumura, Y. Noguchi, T. Shinohara, S. Hinuma, Y. Fujisawa and M. Fujino** (2003a). "Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40." *Nature* 422(6928): 173-176.
- Iversen, J. and D. W. Miles** (1971). "Evidence for a feedback inhibition of insulin on insulin secretion in the isolated, perfused canine pancreas." *Diabetes* 20(1): 1-9.
- Jacqueminet, S., I. Briaud, C. Rouault, G. Reach and V. Poitout** (2000). "Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic beta cells to palmitate is dependent on the presence of a stimulatory glucose concentration." *Metabolism* 49(4): 532-536.
- Janjic, D., P. Maechler, N. Sekine, C. Bartley, A. S. Annen and C. B. Wolheim** (1999). "Free radical modulation of insulin release in INS-1 cells exposed to alloxan." *Biochem Pharmacol* 57(6): 639-648.
- Jennings, P. E. and J. J. Belch** (2000). "Free radical scavenging activity of sulfonylureas: a clinical assessment of the effect of gliclazide." *Metabolism* 49(2 Suppl 1): 23-26.
- Jennings, P. E., N. A. Scott, A. R. Saniabadi and J. J. Belch** (1992). "Effects of gliclazide on platelet reactivity and free radicals in type II diabetic patients: clinical assessment." *Metabolism* 41(5 Suppl 1): 36-39.
- Jia, Z., H. Zhu, M. A. Trush, H. P. Misra and Y. Li** (2008). "Generation of superoxide from reaction of 3H-1,2-dithiole-3-thione with thiols: implications for dithiolethione chemoprotection." *Mol Cell Biochem* 307(1-2): 185-191.
- Jiang, T., Z. Huang, Y. Lin, Z. Zhang, D. Fang and D. D. Zhang** (2010). "The protective role of Nrf2 in streptozotocin-induced diabetic nephropathy." *Diabetes* 59(4): 850-860.
- Jorns, A., M. Tiedge, S. Lenzen and R. Munday** (1999). "Effect of superoxide dismutase, catalase, chelating agents, and free radical scavengers on the toxicity of alloxan to isolated pancreatic islets in vitro." *Free Radic Biol Med* 26(9-10): 1300-1304.
- Joseph, J. W., V. Koshkin, C. Y. Zhang, J. Wang, B. B. Lowell, C. B. Chan and M. B. Wheeler** (2002). "Uncoupling protein 2 knockout mice have enhanced insulin secretory capacity after a high-fat diet." *Diabetes* 51(11): 3211-3219.

Kahn, S. E., S. Zraika, K. M. Utzschneider and R. L. Hull (2009). "The beta cell lesion in type 2 diabetes: there has to be a primary functional abnormality." *Diabetologia* 52(6): 1003-1012.

Kanda, Y., M. Shimoda, S. Hamamoto, K. Tawaramoto, F. Kawasaki, M. Hashiramoto, K. Nakashima, M. Matsuki and K. Kaku (2010). "Molecular mechanism by which pioglitazone preserves pancreatic beta-cells in obese diabetic mice: evidence for acute and chronic actions as a PPARgamma agonist." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(2): E278-286.

Kaneto, H., G. Xu, K. H. Song, K. Suzuma, S. Bonner-Weir, A. Sharma and G. C. Weir (2001). "Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress." *J Biol Chem* 276(33): 31099-31104.

Kang, M. I., A. Kobayashi, N. Wakabayashi, S. G. Kim and M. Yamamoto (2004). "Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(7): 2046-2051.

Karaskov, E., C. Scott, L. Zhang, T. Teodoro, M. Ravazzola and A. Volchuk (2006). "Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis." *Endocrinology* 147(7): 3398-3407.

Kasai, H., H. Hatakeyama, M. Ohno and N. Takahashi (2010). "Exocytosis in islet beta-cells." *Adv Exp Med Biol* 654: 305-338.

Kaspar, J. W., S. K. Niture and A. K. Jaiswal (2009). "Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress." *Free Radic Biol Med* 47(9): 1304-1309.

Kato, T., H. Shimano, T. Yamamoto, T. Yokoo, Y. Endo, M. Ishikawa, T. Matsuzaka, Y. Nakagawa, S. Kumadaki, N. Yahagi, A. Takahashi, H. Sone, H. Suzuki, H. Toyoshima, A. H. Hasty, S. Takahashi, H. Gomi, T. Izumi and N. Yamada (2006). "Granuphilin is activated by SREBP-1c and involved in impaired insulin secretion in diabetic mice." *Cell Metab* 4(2): 143-154.

Kebede, M., T. Alquier, M. G. Latour, M. Semache, C. Tremblay and V. Poitout (2008). "The fatty acid receptor GPR40 plays a role in insulin secretion in vivo after high-fat feeding." *Diabetes* 57(9): 2432-2437.

Kehrer, J. P. (2000). "The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity." *Toxicology* 149(1): 43-50.

Kelpe, C. L., P. C. Moore, S. D. Parazzoli, B. Wicksteed, C. J. Rhodes and V. Poitout (2003). "Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis." *J Biol Chem* 278(32): 30015-30021.

Kennedy, H. J., A. E. Pouli, E. K. Ainscow, L. S. Jouaville, R. Rizzuto and G. A. Rutter (1999). "Glucose generates sub-plasma membrane ATP microdomains in single islet beta-cells. Potential role for strategically located mitochondria." *J Biol Chem* 274(19): 13281-13291.

- Kensler, T. W., J. D. Groopman, T. R. Sutter, T. J. Curphey and B. D. Roebuck (1999).** "Development of cancer chemopreventive agents: oltipraz as a paradigm." *Chem Res Toxicol* 12(2): 113-126.
- Kensler, T. W., G. S. Qian, J. G. Chen and J. D. Groopman (2003).** "Translational strategies for cancer prevention in liver." *Nat Rev Cancer* 3(5): 321-329.
- Kim, J. W. and K. H. Yoon (2011).** "Glucolipotoxicity in Pancreatic beta-Cells." *Diabetes Metab J* 35(5): 444-450.
- Kimoto, K., K. Suzuki, T. Kizaki, Y. Hitomi, H. Ishida, H. Katsuta, E. Itoh, T. Ookawara, K. Suzuki, K. Honke and H. Ohno (2003).** "Gliclazide protects pancreatic beta-cells from damage by hydrogen peroxide." *Biochem Biophys Res Commun* 303(1): 112-119.
- Kiraly-Borri, C. E., A. Morgan, R. D. Burgoyne, U. Weller, C. B. Wollheim and J. Lang (1996).** "Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein and N-ethylmaleimide-insensitive factors are required for Ca²⁺-stimulated exocytosis of insulin." *Biochem J* 314 (Pt 1): 199-203.
- Kirkinezos, I. G. and C. T. Moraes (2001).** "Reactive oxygen species and mitochondrial diseases." *Semin Cell Dev Biol* 12(6): 449-457.
- Kitteringham, N. R., A. Abdullah, J. Walsh, L. Randle, R. E. Jenkins, R. Sison, C. E. Goldring, H. Powell, C. Sanderson, S. Williams, L. Higgins, M. Yamamoto, J. Hayes and B. K. Park (2010).** "Proteomic analysis of Nrf2 deficient transgenic mice reveals cellular defence and lipid metabolism as primary Nrf2-dependent pathways in the liver." *J Proteomics* 73(8): 1612-1631.
- Kobayashi, A., M. I. Kang, Y. Watai, K. I. Tong, T. Shibata, K. Uchida and M. Yamamoto (2006).** "Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1." *Mol Cell Biol* 26(1): 221-229.
- Koerker, D. J., C. J. Goodner, B. W. Hansen, A. C. Brown and A. H. Rubenstein (1978).** "Synchronous, sustained oscillation of C-peptide and insulin in the plasma of fasting monkeys." *Endocrinology* 102(5): 1649-1652.
- Komiya, K., T. Uchida, T. Ueno, M. Koike, H. Abe, T. Hirose, R. Kawamori, Y. Uchiyama, E. Kominami, Y. Fujitani and H. Watada (2010).** "Free fatty acids stimulate autophagy in pancreatic beta-cells via JNK pathway." *Biochem Biophys Res Commun* 401(4): 561-567.
- Kondo, H., S. Mori, H. Takino, H. Kijima, H. Yamasaki, M. Ozaki, I. Tetsuya, Y. Urata, T. Abe, Y. Sera, K. Yamakawa, E. Kawasaki, Y. Yamaguchi, T. Kondo and K. Eguchi (2000).** "Attenuation of expression of gamma-glutamylcysteine synthetase by ribozyme transfection enhance insulin secretion by pancreatic beta cell line, MIN6." *Biochem Biophys Res Commun* 278(1): 236-240.

- Konstantinova, I., G. Nikolova, M. Ohara-Imaizumi, P. Meda, T. Kucera, K. Zarbalis, W. Wurst, S. Nagamatsu and E. Lammert** (2007). "EphA-Ephrin-A-mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets." *Cell* 129(2): 359-370.
- Kopkan, L., A. Castillo, L. G. Navar and D. S. Majid** (2006). "Enhanced superoxide generation modulates renal function in ANG II-induced hypertensive rats." *Am J Physiol Renal Physiol* 290(1): F80-86.
- Koshkin, V., F. F. Dai, C. A. Robson-Doucette, C. B. Chan and M. B. Wheeler** (2008). "Limited mitochondrial permeabilization is an early manifestation of palmitate-induced lipotoxicity in pancreatic beta-cells." *J Biol Chem* 283(12): 7936-7948.
- Koshkin, V., X. Wang, P. E. Scherer, C. B. Chan and M. B. Wheeler** (2003). "Mitochondrial functional state in clonal pancreatic beta-cells exposed to free fatty acids." *J Biol Chem* 278(22): 19709-19715.
- Kots, A., A. V. Skurat, E. A. Sergienko, T. V. Bulargina and E. S. Severin** (1992). "Nitroprusside stimulates the cysteine-specific mono(ADP-ribosylation) of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes." *FEBS Lett* 300(1): 9-12.
- Koulajian, K., T. Desai, G. C. Liu, A. Iovic, J. N. Patterson, C. Tang, J. El-Benna, J. W. Joseph, J. W. Scholey and A. Giacca** (2013). "NADPH oxidase inhibition prevents beta cell dysfunction induced by prolonged elevation of oleate in rodents." *Diabetologia* 56(5): 1078-1087.
- Krauss, S., C. Y. Zhang, L. Scorrano, L. T. Dalgaard, J. St-Pierre, S. T. Grey and B. B. Lowell** (2003). "Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction." *J Clin Invest* 112(12): 1831-1842.
- Krippeit-Drews, P., M. Backer, M. Düfer and G. Drews** (2003). "Phosphocreatine as a determinant of K(ATP) channel activity in pancreatic beta-cells." *Pflugers Arch* 445(5): 556-562.
- Krippeit-Drews, P., M. Düfer and G. Drews** (2000). "Parallel oscillations of intracellular calcium activity and mitochondrial membrane potential in mouse pancreatic B-cells." *Biochem Biophys Res Commun* 267(1): 179-183.
- Krippeit-Drews, P., C. Krämer, S. Welker, F. Lang, H. P. Ammon and G. Drews** (1999). "Interference of H₂O₂ with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells." *J Physiol* 514 (Pt 2): 471-481.
- Krippeit-Drews, P., K. D. Kroncke, S. Welker, G. Zempel, M. Roenfeldt, H. P. Ammon, F. Lang and G. Drews** (1995). "The effects of nitric oxide on the membrane potential and ionic currents of mouse pancreatic B cells." *Endocrinology* 136(12): 5363-5369.
- Krippeit-Drews, P., F. Lang, D. Haussinger and G. Drews** (1994). "H₂O₂ induced hyperpolarization of pancreatic B-cells." *Pflugers Arch* 426(6): 552-554.

- Krippeit-Drews, P., S. Schönecker, B. Winter, A. Edalat, M. Düfer, E. Günther, U. Kraushaar and G. Drews** (2012). "Effects of a SOD mimetic on H₂O₂-induced oxidative stress in mouse pancreatic beta-cells." *Acta Physiologica* 204: Supplement 689.
- Kruman, II and M. P. Mattson** (1999). "Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis." *J Neurochem* 72(2): 529-540.
- Kulaksiz, H., E. Fein, P. Redecker, W. Stremmel, G. Adler and Y. Cetin** (2008). "Pancreatic beta-cells express hepcidin, an iron-uptake regulatory peptide." *J Endocrinol* 197(2): 241-249.
- Kulkarni, R. N., J. C. Bruning, J. N. Winnay, C. Postic, M. A. Magnuson and C. R. Kahn** (1999). "Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes." *Cell* 96(3): 329-339.
- Kullin, M., Z. Li, J. Bondo Hansen, N. Welsh, F. A. Karlsson and S. Sandler** (2003). "Protection of rat pancreatic islets by potassium channel openers against alloxan, sodium nitroprusside and interleukin-1beta mediated suppression--possible involvement of the mitochondrial membrane potential." *Diabetologia* 46(1): 80-88.
- Kullin, M., Z. Li, J. B. Hansen, E. Bjork, S. Sandler and F. A. Karlsson** (2000). "K(ATP) channel openers protect rat islets against the toxic effect of streptozotocin." *Diabetes* 49(7): 1131-1136.
- Kumar, N. and C. S. Dey** (2002). "Gliclazide increases insulin receptor tyrosine phosphorylation but not p38 phosphorylation in insulin-resistant skeletal muscle cells." *J Exp Biol* 205(Pt 23): 3739-3746.
- Kumar, P., H. Kalonia and A. Kumar** (2010). "Cyclosporine A attenuates 3-nitropropionic acid-induced Huntington-like symptoms in rats: possible nitric oxide mechanism." *Int J Toxicol* 29(3): 318-325.
- Kwon, M. J., H. S. Chung, C. S. Yoon, E. J. Lee, T. K. Kim, S. H. Lee, K. S. Ko, B. D. Rhee, M. K. Kim and J. H. Park** (2013). "Low glibenclamide concentrations affect endoplasmic reticulum stress in INS-1 cells under glucotoxic or glucolipotoxic conditions." *Korean J Intern Med* 28(3): 339-346.
- Lacruz, G., F. Figeac, J. Movassat, N. Kassis, J. Coulaud, A. Galinier, C. Leloup, D. Bailbe, F. Homo-Delarche and B. Portha** (2009). "Diabetic beta-cells can achieve self-protection against oxidative stress through an adaptive up-regulation of their antioxidant defenses." *PLoS One* 4(8): e6500.
- Lalic, N. M., J. Maric, M. Svetel, A. Jotic, E. Stefanova, K. Lalic, N. Dragasevic, T. Milicic, L. Lukic and V. S. Kostic** (2008). "Glucose homeostasis in Huntington disease: abnormalities in insulin sensitivity and early-phase insulin secretion." *Arch Neurol* 65(4): 476-480.

- Lambeth, J. D., K. H. Krause and R. A. Clark** (2008). "NOX enzymes as novel targets for drug development." *Semin Immunopathol* 30(3): 339-363.
- Lameloise, N., P. Muzzin, M. Prentki and F. Assimacopoulos-Jeannet** (2001). "Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion?" *Diabetes* 50(4): 803-809.
- Lang, D. A., D. R. Matthews, M. Burnett and R. C. Turner** (1981). "Brief, irregular oscillations of basal plasma insulin and glucose concentrations in diabetic man." *Diabetes* 30(5): 435-439.
- Lang, F.** (2007). "Mechanisms and significance of cell volume regulation." *J Am Coll Nutr* 26(5 Suppl): 613S-623S.
- Lang, F., M. Foller, K. S. Lang, P. A. Lang, M. Ritter, E. Gulbins, A. Vereninov and S. M. Huber** (2005). "Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death." *J Membr Biol* 205(3): 147-157.
- Lang, F., S. Ullrich and E. Gulbins** (2011). "Ceramide formation as a target in beta-cell survival and function." *Expert Opin Ther Targets* 15(9): 1061-1071.
- Larsson, O., J. T. Deeney, R. Branstrom, P. O. Berggren and B. E. Corkey** (1996). "Activation of the ATP-sensitive K⁺ channel by long chain acyl-CoA. A role in modulation of pancreatic beta-cell glucose sensitivity." *J Biol Chem* 271(18): 10623-10626.
- Latour, M. G., T. Alquier, E. Oseid, C. Tremblay, T. L. Jetton, J. Luo, D. C. Lin and V. Poitout** (2007). "GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo." *Diabetes* 56(4): 1087-1094.
- Leahy, J. L.** (2005). "Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus." *Arch Med Res* 36(3): 197-209.
- LeBrasseur, N. K., M. Kelly, T. S. Tsao, S. R. Farmer, A. K. Saha, N. B. Ruderman and E. Tomas** (2006). "Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291(1): E175-181.
- Lee, J. M., J. Li, D. A. Johnson, T. D. Stein, A. D. Kraft, M. J. Calkins, R. J. Jakel and J. A. Johnson** (2005a). "Nrf2, a multi-organ protector?" *FASEB J* 19(9): 1061-1066.
- Lee, J. S. and Y. J. Surh** (2005b). "Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention." *Cancer Lett* 224(2): 171-184.
- Lee, K. W., Y. H. Ku, M. Kim, B. Y. Ahn, S. S. Chung and K. S. Park** (2011). "Effects of Sulfonylureas on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Activity and on Glucose Uptake by Thiazolidinediones." *Diabetes Metab J* 35(4): 340-347.

- Leekumjorn, S., H. J. Cho, Y. Wu, N. T. Wright, A. K. Sum and C. Chan** (2009). "The role of fatty acid unsaturation in minimizing biophysical changes on the structure and local effects of bilayer membranes." *Biochim Biophys Acta* 1788(7): 1508-1516.
- Lehtihet, M., N. Welsh, P. O. Berggren, G. A. Cook and A. Sjöholm** (2003). "Glibenclamide inhibits islet carnitine palmitoyltransferase 1 activity, leading to PKC-dependent insulin exocytosis." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(2): E438-446.
- Lei, S. Z., Z. H. Pan, S. K. Aggarwal, H. S. Chen, J. Hartman, N. J. Sucher and S. A. Lipton** (1992). "Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex." *Neuron* 8(6): 1087-1099.
- Leibiger, I. B., B. Leibiger and P. O. Berggren** (2008). "Insulin signaling in the pancreatic beta-cell." *Annu Rev Nutr* 28: 233-251.
- Leibowitz, G., M. Z. Khaldi, A. Shauer, M. Parnes, A. I. Oprescu, E. Cerasi, J. C. Jonas and N. Kaiser** (2005). "Mitochondrial regulation of insulin production in rat pancreatic islets." *Diabetologia* 48(8): 1549-1559.
- Leloup, C., C. Turrel-Cuzin, C. Magnan, M. Karaca, J. Castel, L. Carneiro, A. L. Colombani, A. Ktorza, L. Casteilla and L. Penicaud** (2009). "Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion." *Diabetes* 58(3): 673-681.
- Lemaire, K., M. A. Ravier, A. Schraenen, J. W. Creemers, R. Van de Plas, M. Granvik, L. Van Lommel, E. Waelkens, F. Chimienti, G. A. Rutter, P. Gilon, P. A. in't Veld and F. C. Schuit** (2009). "Insulin crystallization depends on zinc transporter ZnT8 expression, but is not required for normal glucose homeostasis in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(35): 14872-14877.
- Lemmens, R., O. Larsson, P. O. Berggren and M. S. Islam** (2001). "Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum amplifies the Ca²⁺ signal mediated by activation of voltage-gated L-type Ca²⁺ channels in pancreatic beta-cells." *J Biol Chem* 276(13): 9971-9977.
- Lenzen, S.** (2008). "Oxidative stress: the vulnerable beta-cell." *Biochem Soc Trans* 36(Pt 3): 343-347.
- Lenzen, S., J. Drinkgern and M. Tiedge** (1996). "Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues." *Free Radic Biol Med* 20(3): 463-466.
- Leventhal, L., C. E. Sortwell, R. Hanbury, T. J. Collier, J. H. Kordower and S. Palfi** (2000). "Cyclosporin A protects striatal neurons in vitro and in vivo from 3-nitropropionic acid toxicity." *J Comp Neurol* 425(4): 471-478.
- Lever, J. D. and J. A. Findlay** (1964). "Specific Granularity in the Pancreatic Beta-Cells of the Starved and Free-Fed Guinea Pig. A Quantitative Assessment." *J Anat* 98: 55-62.

- Li, L. X., F. Skorpen, K. Egeberg, I. H. Jorgensen and V. Grill** (2001). "Uncoupling protein-2 participates in cellular defense against oxidative stress in clonal beta-cells." *Biochem Biophys Res Commun* 282(1): 273-277.
- Li, M., W. Fu and X. A. Li** (2010a). "Differential fatty acid profile in adipose and non-adipose tissues in obese mice." *Int J Clin Exp Med* 3(4): 303-307.
- Li, N., S. Stojanovski and P. Maechler** (2012). "Mitochondrial hormesis in pancreatic beta cells: does uncoupling protein 2 play a role?" *Oxid Med Cell Longev* 2012: 740849.
- Li, Y., K. Maedler, L. Shu and L. Haataja** (2008). "UCP-2 and UCP-3 proteins are differentially regulated in pancreatic beta-cells." *PLoS One* 3(1): e1397.
- Li, Y., L. Xu, J. Shen, J. Ran, Y. Zhang, M. Wang, L. Yan, H. Cheng and Z. Fu** (2010b). "Effects of short-term therapy with different insulin secretagogues on glucose metabolism, lipid parameters and oxidative stress in newly diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus." *Diabetes Res Clin Pract* 88(1): 42-47.
- Liang, H., Y. Zhong, S. Zhou and Q. Q. Li** (2011). "Palmitic acid-induced apoptosis in pancreatic beta-cells is increased by liver X receptor agonist and attenuated by eicosapentaenoate." *In Vivo* 25(5): 711-718.
- Lim, S., M. A. Rashid, M. Jang, Y. Kim, H. Won, J. Lee, J. T. Woo, Y. S. Kim, M. P. Murphy, L. Ali, J. Ha and S. S. Kim** (2011). "Mitochondria-targeted antioxidants protect pancreatic beta-cells against oxidative stress and improve insulin secretion in glucotoxicity and glucolipotoxicity." *Cell Physiol Biochem* 28(5): 873-886.
- Liot, G., B. Bossy, S. Lubitz, Y. Kushnareva, N. Sejbuk and E. Bossy-Wetzel** (2009). "Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway." *Cell Death Differ* 16(6): 899-909.
- Listenberger, L. L., X. Han, S. E. Lewis, S. Cases, R. V. Farese, Jr., D. S. Ory and J. E. Schaffer** (2003). "Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(6): 3077-3082.
- Little, C. and P. J. O'Brien** (1969). "Mechanism of peroxide-inactivation of the sulphhydryl enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase." *Eur J Biochem* 10(3): 533-538.
- Liu, X., M. J. Miller, M. S. Joshi, D. D. Thomas and J. R. Lancaster, Jr.** (1998a). "Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5): 2175-2179.
- Liu, Y. Q., K. Tornheim and J. L. Leahy** (1998b). "Fatty acid-induced beta cell hypersensitivity to glucose. Increased phosphofructokinase activity and lowered glucose-6-phosphate content." *J Clin Invest* 101(9): 1870-1875.

Lizcano, J. M. and D. R. Alessi (2002). "The insulin signalling pathway." *Curr Biol* 12(7): R236-238.

Lontchi-Yimagou, E., E. Sobngwi, T. E. Matsha and A. P. Kengne (2013). "Diabetes mellitus and inflammation." *Curr Diab Rep* 13(3): 435-444.

Lotscher, H. R., K. H. Winterhalter, E. Carafoli and C. Richter (1980). "Hydroperoxide-induced loss of pyridine nucleotides and release of calcium from rat liver mitochondria." *J Biol Chem* 255(19): 9325-9330.

Lovis, P., E. Roggli, D. R. Laybutt, S. Gattesco, J. Y. Yang, C. Widmann, A. Abderrahmani and R. Regazzi (2008). "Alterations in microRNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction." *Diabetes* 57(10): 2728-2736.

Luciani, D. S. and J. D. Johnson (2005). "Acute effects of insulin on beta-cells from transplantable human islets." *Mol Cell Endocrinol* 241(1-2): 88-98.

Lumeng, C. N. and A. R. Saltiel (2011). "Inflammatory links between obesity and metabolic disease." *J Clin Invest* 121(6): 2111-2117.

Lupi, R., S. Del Guerra, R. Mancarella, M. Novelli, L. Valgimigli, G. F. Pedulli, M. Paolini, A. Soleti, F. Filippini, F. Mosca, U. Boggi, S. Del Prato, P. Masiello and P. Marchetti (2007). "Insulin secretion defects of human type 2 diabetic islets are corrected in vitro by a new reactive oxygen species scavenger." *Diabetes Metab* 33(5): 340-345.

Lupi, R., F. Dotta, L. Marselli, S. Del Guerra, M. Masini, C. Santangelo, G. Patane, U. Boggi, S. Piro, M. Anello, E. Bergamini, F. Mosca, U. Di Mario, S. Del Prato and P. Marchetti (2002). "Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated." *Diabetes* 51(5): 1437-1442.

MacDonald, P. E., J. W. Joseph and P. Rorsman (2005). "Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360(1464): 2211-2225.

Maciel, E. N., A. J. Kowaltowski, F. D. Schwalm, J. M. Rodrigues, D. O. Souza, A. E. Vercesi, M. Wajner and R. F. Castilho (2004). "Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca²⁺ and respiratory chain complex II inhibition." *J Neurochem* 90(5): 1025-1035.

Maechler, P., L. Jornot and C. B. Wollheim (1999). "Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells." *J Biol Chem* 274(39): 27905-27913.

Maedler, K., R. D. Carr, D. Bosco, R. A. Zuellig, T. Berney and M. Y. Donath (2005). "Sulfonylurea induced beta-cell apoptosis in cultured human islets." *J Clin Endocrinol Metab* 90(1): 501-506.

- Maedler, K., J. Oberholzer, P. Bucher, G. A. Spinas and M. Y. Donath** (2003). "Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function." *Diabetes* 52(3): 726-733.
- Maedler, K., J. Storling, J. Sturis, R. A. Zuellig, G. A. Spinas, P. O. Arkhammar, T. Mandrup-Poulsen and M. Y. Donath** (2004). "Glucose- and interleukin-1beta-induced beta-cell apoptosis requires Ca²⁺ influx and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 activation and is prevented by a sulfonylurea receptor 1/inwardly rectifying K⁺ channel 6.2 (SUR/Kir6.2) selective potassium channel opener in human islets." *Diabetes* 53(7): 1706-1713.
- Maestre, I., J. Jordan, S. Calvo, J. A. Reig, V. Cena, B. Soria, M. Prentki and E. Roche** (2003). "Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the beta-cell line INS-1." *Endocrinology* 144(1): 335-345.
- Maier, C. M. and P. H. Chan** (2002). "Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders." *Neuroscientist* 8(4): 323-334.
- Malaisse, W. J., F. Malaisse-Lagae, M. O. Walker and P. E. Lacy** (1971). "The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. V. The participation of a microtubular-microfilamentous system." *Diabetes* 20(5): 257-265.
- Malaisse, W. J. and A. Sener** (1987). "Glucose-induced changes in cytosolic ATP content in pancreatic islets." *Biochim Biophys Acta* 927(2): 190-195.
- Mandavilli, B. S., I. Boldogh and B. Van Houten** (2005). "3-nitropropionic acid-induced hydrogen peroxide, mitochondrial DNA damage, and cell death are attenuated by Bcl-2 overexpression in PC12 cells." *Brain Res Mol Brain Res* 133(2): 215-223.
- Marchetti, P., S. Del Prato, R. Lupi and S. Del Guerra** (2006). "The pancreatic beta-cell in human Type 2 diabetes." *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16 Suppl 1: S3-6.
- Marhfour, I., J. C. Jonas, J. Marchandise, A. Lefevre, J. Rahier, C. Sempoux and Y. Guiot** (2010). "Endoplasmic reticulum accumulation of Kir6.2 without activation of ER stress response in islet cells from adult Sur1 knockout mice." *Cell Tissue Res* 340(2): 335-346.
- Mariot, P., P. Gilon, M. Nenquin and J. C. Henquin** (1998). "Tolbutamide and diazoxide influence insulin secretion by changing the concentration but not the action of cytoplasmic Ca²⁺ in beta-cells." *Diabetes* 47(3): 365-373.
- Maris, M., E. Waelkens, M. Cnop, W. D'Hertog, D. A. Cunha, H. Korf, T. Koike, L. Overbergh and C. Mathieu** (2011). "Oleate-induced beta cell dysfunction and apoptosis: a proteomic approach to glucolipototoxicity by an unsaturated fatty acid." *J Proteome Res* 10(8): 3372-3385.
- Markworth, E., C. Schwanstecher and M. Schwanstecher** (2000). "ATP4- mediates closure of pancreatic beta-cell ATP-sensitive potassium channels by interaction with 1 of 4 identical sites." *Diabetes* 49(9): 1413-1418.

- Martin, B. C., J. H. Warram, A. S. Krolewski, R. N. Bergman, J. S. Soeldner and C. R. Kahn** (1992). "Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study." *Lancet* 340(8825): 925-929.
- Martin, F., J. V. Sanchez-Andres and B. Soria** (1995). "Slow $[Ca^{2+}]_i$ oscillations induced by ketoisocaproate in single mouse pancreatic islets." *Diabetes* 44(3): 300-305.
- Mason, T. M., T. Goh, V. Tchipashvili, H. Sandhu, N. Gupta, G. F. Lewis and A. Giacca** (1999). "Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats." *Diabetes* 48(3): 524-530.
- Mates, J. M.** (2000). "Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology." *Toxicology* 153(1-3): 83-104.
- Mates, J. M., C. Perez-Gomez and I. Nunez de Castro** (1999). "Antioxidant enzymes and human diseases." *Clin Biochem* 32(8): 595-603.
- Mathias, S., L. A. Pena and R. N. Kolesnick** (1998). "Signal transduction of stress via ceramide." *Biochem J* 335 (Pt 3): 465-480.
- Matschinsky, F. M.** (1990). "Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes." *Diabetes* 39(6): 647-652.
- Matsuo, M., Y. Kimura and K. Ueda** (2005). "KATP channel interaction with adenine nucleotides." *J Mol Cell Cardiol* 38(6): 907-916.
- Matthaei, S., R. Bierwirth, A. Fritsche, B. Gallwitz, H. U. Haring, H. G. Joost, M. Kellerer, C. Kloos, T. Kunt, M. Nauck, G. Schernthaner, E. Siegel and F. Thienel** (2009). "Medical antihyperglycaemic treatment of type 2 diabetes mellitus: update of the evidence-based guideline of the German Diabetes Association." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117(9): 522-557.
- Matthaei, S., M. Stumvoll, M. Kellerer and H. U. Haring** (2000). "Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance." *Endocr Rev* 21(6): 585-618.
- Mbaya, E., B. Oules, C. Caspersen, R. Tacine, H. Massinet, M. Pennuto, D. Chretien, A. Munnich, A. Rotig, R. Rizzuto, G. A. Rutter, P. Paterlini-Brechot and M. Chami** (2010). "Calcium signalling-dependent mitochondrial dysfunction and bioenergetics regulation in respiratory chain Complex II deficiency." *Cell Death Differ* 17(12): 1855-1866.
- McFarland, M. S., T. N. Knight, A. Brown and J. Thomas** (2010). "The continuation of oral medications with the initiation of insulin therapy in type 2 diabetes: a review of the evidence." *South Med J* 103(1): 58-65.

- Mechlovich, D., T. Amit, S. A. Mandel, O. Bar-Am, K. Bloch, P. Vardi and M. B. Youdim** (2010). "The novel multifunctional, iron-chelating drugs M30 and HLA20 protect pancreatic beta-cell lines from oxidative stress damage." *J Pharmacol Exp Ther* 333(3): 874-882.
- Meissner, H. P., J. C. Henquin and M. Preissler** (1978). "Potassium dependence of the membrane potential of pancreatic B-cells." *FEBS Lett* 94(1): 87-89.
- Mendonca, A. C., E. M. Carneiro, J. R. Bosqueiro, S. C. Crepaldi-Alves and A. C. Boschero** (1998). "Development of the insulin secretion mechanism in fetal and neonatal rat pancreatic B-cells: response to glucose, K⁺, theophylline, and carbamylcholine." *Braz J Med Biol Res* 31(6): 841-846.
- Meng, W., B. A. Ellsworth, A. A. Nirschl, P. J. McCann, M. Patel, R. N. Girotra, G. Wu, P. M. Sher, E. P. Morrison, S. A. Biller, R. Zahler, P. P. Deshpande, A. Pullockaran, D. L. Hagan, N. Morgan, J. R. Taylor, M. T. Obermeier, W. G. Humphreys, A. Khanna, L. Discenza, J. G. Robertson, A. Wang, S. Han, J. R. Wetterau, E. B. Janovitz, O. P. Flint, J. M. Whaley and W. N. Washburn** (2008). "Discovery of dapagliflozin: a potent, selective renal sodium-dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes." *J Med Chem* 51(5): 1145-1149.
- Meng, Z. X., J. Nie, J. J. Ling, J. X. Sun, Y. X. Zhu, L. Gao, J. H. Lv, D. Y. Zhu, Y. J. Sun and X. Han** (2009). "Activation of liver X receptors inhibits pancreatic islet beta cell proliferation through cell cycle arrest." *Diabetologia* 52(1): 125-135.
- Mertz, R. J., J. F. Worley, B. Spencer, J. H. Johnson and I. D. Dukes** (1996). "Activation of stimulus-secretion coupling in pancreatic beta-cells by specific products of glucose metabolism. Evidence for privileged signaling by glycolysis." *J Biol Chem* 271(9): 4838-4845.
- Michael, D. J., W. Xiong, X. Geng, P. Drain and R. H. Chow** (2007). "Human insulin vesicle dynamics during pulsatile secretion." *Diabetes* 56(5): 1277-1288.
- Michalska, M., G. Wolf, R. Walther and P. Newsholme** (2010). "Effects of pharmacological inhibition of NADPH oxidase or iNOS on pro-inflammatory cytokine, palmitic acid or H₂O₂-induced mouse islet or clonal pancreatic beta-cell dysfunction." *Biosci Rep* 30(6): 445-453.
- Mikhailov, M. V., J. D. Campbell, H. de Wet, K. Shimomura, B. Zadek, R. F. Collins, M. S. Sansom, R. C. Ford and F. M. Ashcroft** (2005). "3-D structural and functional characterization of the purified KATP channel complex Kir6.2-SUR1." *EMBO J* 24(23): 4166-4175.
- Miki, T., K. Nagashima, F. Tashiro, K. Kotake, H. Yoshitomi, A. Tamamoto, T. Gonoj, T. Iwanaga, J. Miyazaki and S. Seino** (1998). "Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10402-10406.
- Misler, S.** (2009). "Unifying concepts in stimulus-secretion coupling in endocrine cells and some implications for therapeutics." *Adv Physiol Educ* 33(3): 175-186.

Misler, S., D. W. Barnett and L. C. Falke (1992). "Effects of metabolic inhibition by sodium azide on stimulus-secretion coupling in B cells of human islets of Langerhans." *Pflugers Arch* 421(2-3): 289-291.

Mitchell, J. B., W. DeGraff, D. Kaufman, M. C. Krishna, A. Samuni, E. Finkelstein, M. S. Ahn, S. M. Hahn, J. Gamson and A. Russo (1991). "Inhibition of oxygen-dependent radiation-induced damage by the nitroxide superoxide dismutase mimic, tempol." *Arch Biochem Biophys* 289(1): 62-70.

Mitri, J. and O. Hamdy (2009). "Diabetes medications and body weight." *Expert Opin Drug Saf* 8(5): 573-584.

Moller, M. N., Q. Li, J. R. Lancaster, Jr. and A. Denicola (2007). "Acceleration of nitric oxide autoxidation and nitrosation by membranes." *IUBMB Life* 59(4-5): 243-248.

Monauni, T., M. G. Zenti, A. Cretti, M. C. Daniels, G. Targher, B. Caruso, M. Caputo, D. McClain, S. Del Prato, A. Giaccari, M. Muggeo, E. Bonora and R. C. Bonadonna (2000). "Effects of glucosamine infusion on insulin secretion and insulin action in humans." *Diabetes* 49(6): 926-935.

Moncada, S. and A. Higgs (1993). "The L-arginine-nitric oxide pathway." *N Engl J Med* 329(27): 2002-2012.

Moore, P. C., M. A. Ugas, D. K. Hagman, S. D. Parazzoli and V. Poitout (2004). "Evidence against the involvement of oxidative stress in fatty acid inhibition of insulin secretion." *Diabetes* 53(10): 2610-2616.

Moore, S. M., E. A. Hardie, N. J. Hackworth, C. R. Critchley, M. Kyrios, S. A. Buzwell and N. A. Crafti (2011). "Can the onset of type 2 diabetes be delayed by a group-based lifestyle intervention? A randomised control trial." *Psychol Health* 26(4): 485-499.

Moreno-Sanchez, R., L. Hernandez-Esquivel, N. A. Rivero-Segura, A. Marin-Hernandez, J. Neuzil, S. J. Ralph and S. Rodriguez-Enriquez (2013). "Reactive oxygen species are generated by the respiratory complex II--evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I." *FEBS J* 280(3): 927-938.

Morgan, D., H. R. Oliveira-Emilio, D. Keane, A. E. Hirata, M. Santos da Rocha, S. Bordin, R. Curi, P. Newsholme and A. R. Carpinelli (2007). "Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line." *Diabetologia* 50(2): 359-369.

Morgan, D., E. Rebelato, F. Abdulkader, M. F. Graciano, H. R. Oliveira-Emilio, A. E. Hirata, M. S. Rocha, S. Bordin, R. Curi and A. R. Carpinelli (2009). "Association of NAD(P)H oxidase with glucose-induced insulin secretion by pancreatic beta-cells." *Endocrinology* 150(5): 2197-2201.

Morgan, N. G. and S. Dhayal (2010). "Unsaturated fatty acids as cytoprotective agents in the pancreatic beta-cell." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82(4-6): 231-236.

Moriscot, C., F. Pattou, J. Kerr-Conte, M. J. Richard, P. Lemarchand and P. Y. Benhamou (2000). "Contribution of adenoviral-mediated superoxide dismutase gene transfer to the reduction in nitric oxide-induced cytotoxicity on human islets and INS-1 insulin-secreting cells." *Diabetologia* 43(5): 625-631.

Moser, M. D., S. Matsuzaki and K. M. Humphries (2009). "Inhibition of succinate-linked respiration and complex II activity by hydrogen peroxide." *Arch Biochem Biophys* 488(1): 69-75.

Moutzouri, E., V. Tsimihodimos, E. Rizos and M. Elisaf (2011). "Prediabetes: to treat or not to treat?" *Eur J Pharmacol* 672(1-3): 9-19.

Nakano, N., N. Miyazawa, T. Sakurai, T. Kizaki, K. Kimoto, K. Takahashi, H. Ishida, M. Takahashi, K. Suzuki and H. Ohno (2007). "Gliclazide inhibits proliferation but stimulates differentiation of white and brown adipocytes." *J Biochem* 142(5): 639-645.

Nakazaki, M., M. Kakei, N. Koriyama and H. Tanaka (1995). "Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in free radical-mediated inhibition of insulin secretion in rat pancreatic beta-cells." *Diabetes* 44(8): 878-883.

Nasr, P., H. I. Gursahani, Z. Pang, V. Bondada, J. Lee, R. W. Hadley and J. W. Geddes (2003). "Influence of cytosolic and mitochondrial Ca²⁺, ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron death induced by 3-nitropropionic acid." *Neurochem Int* 43(2): 89-99.

Newsholme, P., E. P. Haber, S. M. Hirabara, E. L. Rebelato, J. Procopio, D. Morgan, H. C. Oliveira-Emilio, A. R. Carpinelli and R. Curi (2007). "Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity." *J Physiol* 583(Pt 1): 9-24.

Newsholme, P., D. Morgan, E. Rebelato, H. C. Oliveira-Emilio, J. Procopio, R. Curi and A. Carpinelli (2009). "Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell." *Diabetologia* 52(12): 2489-2498.

Nguyen, T., P. J. Sherratt and C. B. Pickett (2003). "Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 233-260.

Niki, I., F. M. Ashcroft and S. J. Ashcroft (1989). "The dependence on intracellular ATP concentration of ATP-sensitive K-channels and of Na,K-ATPase in intact HIT-T15 beta-cells." *FEBS Lett* 257(2): 361-364.

Nilsson, T., P. Arkhammar, P. Rorsman and P. O. Berggren (1988). "Inhibition of glucose-stimulated insulin release by alpha 2-adrenoceptor activation is paralleled by both a

repolarization and a reduction in cytoplasmic free Ca²⁺ concentration." *J Biol Chem* 263(4): 1855-1860.

Nishimura, M., Y. Okimura, H. Fujita, H. Yano, J. Lee, E. Suzaki, M. Inoue, K. Utsumi and J. Sasaki (2008). "Mechanism of 3-nitropropionic acid-induced membrane permeability transition of isolated mitochondria and its suppression by L-carnitine." *Cell Biochem Funct* 26(8): 881-891.

Nishizono, S., T. Hayami, I. Ikeda and K. Imaizumi (2000). "Protection against the diabetogenic effect of feeding tert-butylhydroquinone to rats prior to the administration of streptozotocin." *Biosci Biotechnol Biochem* 64(6): 1153-1158.

Noda, Y., A. Mori and L. Packer (1997). "Gliclazide scavenges hydroxyl, superoxide and nitric oxide radicals: an ESR study." *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 96(2): 115-124.

Nulton-Persson, A. C. and L. I. Szweda (2001). "Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide." *J Biol Chem* 276(26): 23357-23361.

O'Brien, R. C. and M. Luo (1997). "The effects of gliclazide and other sulfonylureas on low-density lipoprotein oxidation in vitro." *Metabolism* 46(12 Suppl 1): 22-25.

O'Brien, R. C., M. Luo, N. Balazs and J. Mercuri (2000). "In vitro and in vivo antioxidant properties of gliclazide." *J Diabetes Complications* 14(4): 201-206.

O'Meara, N. M., J. Sturis, E. Van Cauter and K. S. Polonsky (1993). "Lack of control by glucose of ultradian insulin secretory oscillations in impaired glucose tolerance and in non-insulin-dependent diabetes mellitus." *J Clin Invest* 92(1): 262-271.

Oberbach, A., Y. Bossenz, S. Lehmann, J. Niebauer, V. Adams, R. Paschke, M. R. Schon, M. Bluher and K. Punkt (2006). "Altered fiber distribution and fiber-specific glycolytic and oxidative enzyme activity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes." *Diabetes Care* 29(4): 895-900.

Oberley, L. W. and G. R. Buettner (1979). "Role of superoxide dismutase in cancer: a review." *Cancer Res* 39(4): 1141-1149.

Obrenovich, M. E., Y. Li, K. Parvathaneni, B. B. Yendluri, H. H. Palacios, J. Leszek and G. Aliev (2011). "Antioxidants in health, disease and aging." *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10(2): 192-207.

Ogasawara, A., S. Simizu, A. Ito, T. Kawai, Y. Saisho, I. Takei and K. Umezawa (2013). "Inhibition of NO-induced beta-cell death by novel NF-kappaB inhibitor (-)-DHMEQ via activation of Nrf2-ARE pathway." *Biochem Biophys Res Commun* 433(2): 181-187.

Okada, K., E. Warabi, H. Sugimoto, M. Horie, N. Gotoh, K. Tokushige, E. Hashimoto, H. Utsunomiya, H. Takahashi, T. Ishii, M. Yamamoto and J. Shoda (2013). "Deletion of Nrf2

leads to rapid progression of steatohepatitis in mice fed atherogenic plus high-fat diet." *J Gastroenterol* 48(5): 620-632.

Olejnicka, B. T., A. Andersson, B. Tyrberg, H. Dalen and U. T. Brunk (1999). "Beta-cells, oxidative stress, lysosomal stability, and apoptotic/necrotic cell death." *Antioxid Redox Signal* 1(3): 305-315.

Olejnicka, B. T., K. Ollinger and U. T. Brunk (1997). "A short exposure to a high-glucose milieu stabilizes the acidic vacuolar apparatus of insulinoma cells in culture to ensuing oxidative stress." *APMIS* 105(9): 689-698.

Oliveira, H. R., R. Verlengia, C. R. Carvalho, L. R. Britto, R. Curi and A. R. Carpinelli (2003). "Pancreatic beta-cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase." *Diabetes* 52(6): 1457-1463.

Olofsson, C. S., S. Collins, M. Bengtsson, L. Eliasson, A. Salehi, K. Shimomura, A. Tarasov, C. Holm, F. Ashcroft and P. Rorsman (2007). "Long-term exposure to glucose and lipids inhibits glucose-induced insulin secretion downstream of granule fusion with plasma membrane." *Diabetes* 56(7): 1888-1897.

Olson, L. K., W. Schroeder, R. P. Robertson, N. D. Goldberg and T. F. Walseth (1996). "Suppression of adenylate kinase catalyzed phosphotransfer precedes and is associated with glucose-induced insulin secretion in intact HIT-T15 cells." *J Biol Chem* 271(28): 16544-16552.

Oprescu, A. I., G. Bikopoulos, A. Naassan, E. M. Allister, C. Tang, E. Park, H. Uchino, G. F. Lewis, I. G. Fantus, M. Rozakis-Adcock, M. B. Wheeler and A. Giacca (2007). "Free fatty acid-induced reduction in glucose-stimulated insulin secretion: evidence for a role of oxidative stress in vitro and in vivo." *Diabetes* 56(12): 2927-2937.

Orci, L. (1986). "The insulin cell: its cellular environment and how it processes (pro)insulin." *Diabetes/metabolism reviews* 2(1-2): 71-106.

Orrenius, S., D. J. McConkey, G. Bellomo and P. Nicotera (1989). "Role of Ca²⁺ in toxic cell killing." *Trends Pharmacol Sci* 10(7): 281-285.

Ortiz, D., L. Gossack, U. Quast and J. Bryan (2013). "Reinterpreting the action of ATP analogs on K(ATP) channels." *J Biol Chem* 288(26): 18894-18902.

Pace, C. S. (1980). "Somatostatin: control of stimulus--secretion coupling in pancreatic islet cells." *Soc Gen Physiol Ser* 35: 163-195.

Padgaonkar, V., F. J. Giblin, V. Leverenz, L. R. Lin and V. N. Reddy (1994). "Studies of H₂O₂-Induced Effects on Cultured Bovine Trabecular Meshwork Cells." *J Glaucoma* 3(2): 123-131.

Pang, Z. and J. W. Geddes (1997). "Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis." *J Neurosci* 17(9): 3064-3073.

- Paolisso, G., A. Gambardella, L. Amato, R. Tortoriello, A. D'Amore, M. Varricchio and F. D'Onofrio** (1995). "Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects." *Diabetologia* 38(11): 1295-1299.
- Papanas, N., A. I. Vinik and D. Ziegler** (2011). "Neuropathy in prediabetes: does the clock start ticking early?" *Nat Rev Endocrinol* 7(11): 682-690.
- Pardo, L. A.** (2004). "Voltage-gated potassium channels in cell proliferation." *Physiology (Bethesda)* 19: 285-292.
- Park, B. H., H. W. Rho, J. W. Park, C. G. Cho, J. S. Kim, H. T. Chung and H. R. Kim** (1995). "Protective mechanism of glucose against alloxan-induced pancreatic beta-cell damage." *Biochem Biophys Res Commun* 210(1): 1-6.
- Patane, G., M. Anello, S. Piro, R. Vigneri, F. Purrello and A. M. Rabuazzo** (2002). "Role of ATP production and uncoupling protein-2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high glucose or free fatty acids and effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibition." *Diabetes* 51(9): 2749-2756.
- Patterson, G. H., S. M. Knobel, P. Arkhammar, O. Thastrup and D. W. Piston** (2000). "Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic and mitochondrial NAD(P)H responses in pancreatic islet beta cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10): 5203-5207.
- Pedersen, M. G.** (2010). "Insulin secretory granules enter a highly calcium-sensitive state following palmitate-induced dissociation from calcium channels: a theoretical study." *J Neuroendocrinol* 22(12): 1315-1324.
- Penninx, B. W., Y. Milaneschi, F. Lamers and N. Vogelzangs** (2013). "Understanding the somatic consequences of depression: biological mechanisms and the role of depression symptom profile." *BMC Med* 11: 129.
- Perreault, L., Q. Pan, K. J. Mather, K. E. Watson, R. F. Hamman, S. E. Kahn and G. Diabetes Prevention Program Research** (2012). "Effect of regression from prediabetes to normal glucose regulation on long-term reduction in diabetes risk: results from the Diabetes Prevention Program Outcomes Study." *Lancet* 379(9833): 2243-2251.
- Peternelj, T. T. and J. S. Coombes** (2011). "Antioxidant supplementation during exercise training: beneficial or detrimental?" *Sports Med* 41(12): 1043-1069.
- Petzer, J. P., M. Navamal, J. K. Johnson, M. K. Kwak, T. W. Kensler and J. C. Fishbein** (2003). "Phase 2 enzyme induction by the major metabolite of oltipraz." *Chem Res Toxicol* 16(11): 1463-1469.
- Peyot, M. L., C. Guay, M. G. Latour, J. Lamontagne, R. Lussier, M. Pineda, N. B. Ruderman, G. Haemmerle, R. Zechner, E. Joly, S. R. Madiraju, V. Poitout and M. Prentki** (2009). "Adipose triglyceride lipase is implicated in fuel- and non-fuel-stimulated insulin secretion." *J Biol Chem* 284(25): 16848-16859.

Pi, J., Y. Bai, K. W. Daniel, D. Liu, O. Lyght, D. Edelstein, M. Brownlee, B. E. Corkey and S. Collins (2009). "Persistent oxidative stress due to absence of uncoupling protein 2 associated with impaired pancreatic beta-cell function." *Endocrinology* 150(7): 3040-3048.

Pi, J., Y. Bai, Q. Zhang, V. Wong, L. M. Floering, K. Daniel, J. M. Reece, J. T. Deeney, M. E. Andersen, B. E. Corkey and S. Collins (2007). "Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion." *Diabetes* 56(7): 1783-1791.

Pi, J. and S. Collins (2010a). "Reactive oxygen species and uncoupling protein 2 in pancreatic beta-cell function." *Diabetes Obes Metab* 12 Suppl 2: 141-148.

Pi, J., L. Leung, P. Xue, W. Wang, Y. Hou, D. Liu, E. Yehuda-Shnaidman, C. Lee, J. Lau, T. W. Kurtz and J. Y. Chan (2010b). "Deficiency in the nuclear factor E2-related factor-2 transcription factor results in impaired adipogenesis and protects against diet-induced obesity." *J Biol Chem* 285(12): 9292-9300.

Pi, J., Q. Zhang, J. Fu, C. G. Woods, Y. Hou, B. E. Corkey, S. Collins and M. E. Andersen (2010c). "ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function." *Toxicol Appl Pharmacol* 244(1): 77-83.

Pickup, J. C. and M. A. Crook (1998). "Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?" *Diabetologia* 41(10): 1241-1248.

Piper, H. M. (1989). "Energy deficiency, calcium overload or oxidative stress: possible causes of irreversible ischemic myocardial injury." *Klin Wochenschr* 67(9): 465-476.

Piro, S., M. Anello, C. Di Pietro, M. N. Lizzio, G. Patane, A. M. Rabuazzo, R. Vigneri, M. Purrello and F. Purrello (2002). "Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress." *Metabolism* 51(10): 1340-1347.

Podolsky, S. and N. A. Leopold (1977). "Abnormal glucose tolerance and arginine tolerance tests in Huntington's disease." *Gerontology* 23(1): 55-63.

Podolsky, S., N. A. Leopold and D. S. Sax (1972). "Increased frequency of diabetes mellitus in patients with Huntington's chorea." *Lancet* 1(7765): 1356-1358.

Poitout, V., J. Amyot, M. Semache, B. Zarrouki, D. Hagman and G. Fontes (2010). "Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell." *Biochim Biophys Acta* 1801(3): 289-298.

Poitout, V. and R. P. Robertson (2008). "Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction." *Endocr Rev* 29(3): 351-366.

Polonsky, K. S., B. D. Given, L. J. Hirsch, H. Tillil, E. T. Shapiro, C. Beebe, B. H. Frank, J. A. Galloway and E. Van Cauter (1988). "Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus." *N Engl J Med* 318(19): 1231-1239.

- Prentki, M. and B. E. Corkey** (1996). "Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM?" *Diabetes* 45(3): 273-283.
- Prentki, M., E. Joly, W. El-Assaad and R. Roduit** (2002). "Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipototoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes." *Diabetes* 51 Suppl 3: S405-413.
- Prentki, M. and C. J. Nolan** (2006). "Islet beta cell failure in type 2 diabetes." *J Clin Invest* 116(7): 1802-1812.
- Primiano, T., P. A. Egner, T. R. Sutter, G. J. Kelloff, B. D. Roebuck and T. W. Kensler** (1995). "Intermittent dosing with oltipraz: relationship between chemoprevention of aflatoxin-induced tumorigenesis and induction of glutathione S-transferases." *Cancer Res* 55(19): 4319-4324.
- Pringsheim, T., K. Wiltshire, L. Day, J. Dykeman, T. Steeves and N. Jette** (2012). "The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis." *Mov Disord* 27(9): 1083-1091.
- Prochaska, H. J., H. S. Bregman, M. J. De Long and P. Talalay** (1985). "Specificity of induction of cancer protective enzymes by analogues of tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA)." *Biochem Pharmacol* 34(21): 3909-3914.
- Produit-Zengaffinen, N., N. Davis-Lameloise, H. Perreten, D. Becard, A. Gjinovci, P. A. Keller, C. B. Wollheim, P. Herrera, P. Muzzin and F. Assimacopoulos-Jeannet** (2007). "Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species." *Diabetologia* 50(1): 84-93.
- Purnell, J. Q. and C. Weyer** (2003). "Weight effect of current and experimental drugs for diabetes mellitus: from promotion to alleviation of obesity." *Treat Endocrinol* 2(1): 33-47.
- Radons, J., B. Heller, A. Burkle, B. Hartmann, M. L. Rodriguez, K. D. Kroncke, V. Burkart and H. Kolb** (1994). "Nitric oxide toxicity in islet cells involves poly(ADP-ribose) polymerase activation and concomitant NAD⁺ depletion." *Biochem Biophys Res Commun* 199(3): 1270-1277.
- Rahier, J., Y. Guiot, R. M. Goebbels, C. Sempoux and J. C. Henquin** (2008). "Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes." *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4: 32-42.
- Rains, J. L. and S. K. Jain** (2011). "Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes." *Free Radic Biol Med* 50(5): 567-575.

Reddan, J., M. Sevilla, F. Giblin, V. Padgaonkar, D. Dziedzic and V. Leverenz (1992). "Tempol and deferoxamine protect cultured rabbit lens epithelial cells from H₂O₂ insult: insight into the mechanism of H₂O₂-induced injury." *Lens Eye Toxic Res* 9(3-4): 385-393.

Reddan, J. R., M. D. Sevilla, F. J. Giblin, V. Padgaonkar, D. C. Dziedzic, V. Leverenz, I. C. Misra and J. L. Peters (1993). "The superoxide dismutase mimic TEMPOL protects cultured rabbit lens epithelial cells from hydrogen peroxide insult." *Exp Eye Res* 56(5): 543-554.

Rehman, A., S. Zamir, A. Bhatti, S. S. Saeed Jan, S. Ali and F. Wazir (2012). "Evaluation of Albuminuria, Total Plasma Proteins, and Serum Albumin in Diabetics." *Gomal J Med Sci* 10: 198-200.

Remedi, M. S. and C. G. Nichols (2008). "Chronic antidiabetic sulfonylureas in vivo: reversible effects on mouse pancreatic beta-cells." *PLoS Med* 5(10): e206.

Richter, C., M. Schweizer, A. Cossarizza and C. Franceschi (1996). "Control of apoptosis by the cellular ATP level." *FEBS Lett* 378(2): 107-110.

Ristow, M. (2004). "Neurodegenerative disorders associated with diabetes mellitus." *J Mol Med (Berl)* 82(8): 510-529.

Ristow, M., K. Zarse, A. Oberbach, N. Klötting, M. Birringer, M. Kiehntopf, M. Stumvoll, C. R. Kahn and M. Bluher (2009). "Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(21): 8665-8670.

Ritz-Laser, B., P. Meda, I. Constant, N. Klages, A. Charollais, A. Morales, C. Magnan, A. Ktorza and J. Philippe (1999). "Glucose-induced preproinsulin gene expression is inhibited by the free fatty acid palmitate." *Endocrinology* 140(9): 4005-4014.

Ritzel, R. A., A. E. Butler, R. A. Rizza, J. D. Veldhuis and P. C. Butler (2006). "Relationship between beta-cell mass and fasting blood glucose concentration in humans." *Diabetes Care* 29(3): 717-718.

Ritzel, R. A., J. B. Hansen, J. D. Veldhuis and P. C. Butler (2004). "Induction of beta-cell rest by a Kir6.2/SUR1-selective K(ATP)-channel opener preserves beta-cell insulin stores and insulin secretion in human islets cultured at high (11 mM) glucose." *J Clin Endocrinol Metab* 89(2): 795-805.

Robertson, R., H. Zhou, T. Zhang and J. S. Harmon (2007). "Chronic oxidative stress as a mechanism for glucose toxicity of the beta cell in type 2 diabetes." *Cell Biochem Biophys* 48(2-3): 139-146.

Robertson, R. P. (1986). "Cyclosporin-induced inhibition of insulin secretion in isolated rat islets and HIT cells." *Diabetes* 35(9): 1016-1019.

Robertson, R. P. (2004). "Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes." *J Biol Chem* 279(41): 42351-42354.

- Robertson, R. P.** (2006). "Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes." *Curr Opin Pharmacol* 6(6): 615-619.
- Robertson, R. P., J. Harmon, P. O. Tran and V. Poitout** (2004). "Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes." *Diabetes* 53 Suppl 1: S119-124.
- Robinson, B. H.** (1998). "The role of manganese superoxide dismutase in health and disease." *J Inherit Metab Dis* 21(5): 598-603.
- Robson-Doucette, C. A., S. Sultan, E. M. Allister, J. D. Wikstrom, V. Koshkin, A. Bhattacharjee, K. J. Prentice, S. B. Sereda, O. S. Shirihai and M. B. Wheeler** (2011). "Beta-cell uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species production, which influences both insulin and glucagon secretion." *Diabetes* 60(11): 2710-2719.
- Roche, M., P. Rondeau, N. R. Singh, E. Tarnus and E. Bourdon** (2008). "The antioxidant properties of serum albumin." *FEBS Lett* 582(13): 1783-1787.
- Rodeberg, D. A., M. S. Chaet, R. C. Bass, M. S. Arkovitz and V. F. Garcia** (1995). "Nitric oxide: an overview." *Am J Surg* 170(3): 292-303.
- Rolo, A. P. and C. M. Palmeira** (2006). "Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress." *Toxicol Appl Pharmacol* 212(2): 167-178.
- Rorsman, P. and M. Braun** (2013). "Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets." *Annu Rev Physiol* 75: 155-179.
- Rorsman, P., M. Braun and Q. Zhang** (2012). "Regulation of calcium in pancreatic alpha- and beta-cells in health and disease." *Cell Calcium* 51(3-4): 300-308.
- Rorsman, P., L. Eliasson, E. Renstrom, J. Gromada, S. Barg and S. Gopel** (2000). "The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion." *News Physiol Sci* 15: 72-77.
- Rorsman, P. and E. Renstrom** (2003). "Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells." *Diabetologia* 46(8): 1029-1045.
- Rorsman, P. and G. Trube** (1985). "Glucose dependent K⁺-channels in pancreatic beta-cells are regulated by intracellular ATP." *Pflugers Arch* 405(4): 305-309.
- Rosenstock, T. R., A. C. Carvalho, A. Jurkiewicz, R. Frussa-Filho and S. S. Smaili** (2004). "Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid." *J Neurochem* 88(5): 1220-1228.
- Rubenstein, A. H., L. A. Pottenger, M. Mako, G. S. Getz and D. F. Steiner** (1972). "The metabolism of proinsulin and insulin by the liver." *J Clin Invest* 51(4): 912-921.

- Rushmore, T. H., M. R. Morton and C. B. Pickett** (1991). "The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity." *J Biol Chem* 266(18): 11632-11639.
- Rustenbeck, I., A. Krautheim, A. Jorns and H. J. Steinfelder** (2004). "Beta-cell toxicity of ATP-sensitive K⁺ channel-blocking insulin secretagogues." *Biochem Pharmacol* 67(9): 1733-1741.
- Rutter, G. A., T. Tsuboi and M. A. Ravier** (2006a). "Ca²⁺ microdomains and the control of insulin secretion." *Cell Calcium* 40(5-6): 539-551.
- Rutter, G. A., A. Varadi, T. Tsuboi, L. Parton and M. Ravier** (2006b). "Insulin secretion in health and disease: genomics, proteomics and single vesicle dynamics." *Biochem Soc Trans* 34(Pt 2): 247-250.
- Sakai, K., K. Matsumoto, T. Nishikawa, M. Suefuji, K. Nakamaru, Y. Hirashima, J. Kawashima, T. Shirotani, K. Ichinose, M. Brownlee and E. Araki** (2003). "Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells." *Biochem Biophys Res Commun* 300(1): 216-222.
- Saleh, N., S. Moutereau, A. Durr, P. Krystkowiak, J. P. Azulay, C. Tranchant, E. Broussolle, F. Morin, A. C. Bachoud-Levi and P. Maison** (2009). "Neuroendocrine disturbances in Huntington's disease." *PLoS One* 4(3): e4962.
- Salter, J. and C. H. Best** (1953). "Insulin as a growth hormone." *Br Med J* 2(4832): 353-356.
- Saltiel, A. R. and C. R. Kahn** (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." *Nature* 414(6865): 799-806.
- Sandhir, R., A. Sood, A. Mehrotra and S. S. Kamboj** (2012). "N-Acetylcysteine reverses mitochondrial dysfunctions and behavioral abnormalities in 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease." *Neurodegener Dis* 9(3): 145-157.
- Santiago, E., C. Contreras, A. Garcia-Sacristan, A. Sanchez, L. Rivera, B. Climent and D. Prieto** (2013). "Signaling pathways involved in the H₂O₂-induced vasoconstriction of rat coronary arteries." *Free Radic Biol Med* 60: 136-146.
- Santos, R. M., L. M. Rosario, A. Nadal, J. Garcia-Sancho, B. Soria and M. Valdeolmillos** (1991). "Widespread synchronous [Ca²⁺]_i oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets." *Pflugers Arch* 418(4): 417-422.
- Sarkar, A., A. Tiwari, P. S. Bhasin and M. Mitra** (2011). "Pharmacological and Pharmaceutical Profile of Gliclazide: A Review." *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01(09): 11-19.
- Sasaki, M., S. Fujimoto, Y. Sato, Y. Nishi, E. Mukai, G. Yamano, H. Sato, Y. Tahara, K. Ogura, K. Nagashima and N. Inagaki** (2013). "Reduction of reactive oxygen species ameliorates

metabolism-secretion coupling in islets of diabetic GK rats by suppressing lactate overproduction." *Diabetes* 62(6): 1996-2003.

Satoh, J., K. Takahashi, Y. Takizawa, H. Ishihara, M. Hirai, H. Katagiri, Y. Hinokio, S. Suzuki, I. Tsuji and Y. Oka (2005). "Secondary sulfonylurea failure: comparison of period until insulin treatment between diabetic patients treated with gliclazide and glibenclamide." *Diabetes Res Clin Pract* 70(3): 291-297.

Sawada, F., T. Inoguchi, H. Tsubouchi, S. Sasaki, M. Fujii, Y. Maeda, H. Morinaga, M. Nomura, K. Kobayashi and R. Takayanagi (2008). "Differential effect of sulfonylureas on production of reactive oxygen species and apoptosis in cultured pancreatic beta-cell line, MIN6." *Metabolism* 57(8): 1038-1045.

Schellenberg, E. S., D. M. Dryden, B. Vandermeer, C. Ha and C. Korownyk (2013). "Lifestyle Interventions for Patients With and at Risk for Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis." *Ann Intern Med* 159(8): 543-551.

Schmidt, J., K. Liebscher, N. Merten, M. Grundmann, M. Mielenz, H. Sauerwein, E. Christiansen, M. E. Due-Hansen, T. Ulven, S. Ullrich, J. Gomeza, C. Drewke and E. Kostenis (2011). "Conjugated linoleic acids mediate insulin release through islet G protein-coupled receptor FFA1/GPR40." *J Biol Chem* 286(14): 11890-11894.

Schmitz-Peiffer, C., D. R. Laybutt, J. G. Burchfield, E. Gurisik, S. Narasimhan, C. J. Mitchell, D. J. Pedersen, U. Braun, G. J. Cooney, M. Leitges and T. J. Biden (2007). "Inhibition of PKCepsilon improves glucose-stimulated insulin secretion and reduces insulin clearance." *Cell Metab* 6(4): 320-328.

Schramm, T. K., G. H. Gislason, A. Vaag, J. N. Rasmussen, F. Folke, M. L. Hansen, E. L. Fosbol, L. Kober, M. L. Norgaard, M. Madsen, P. R. Hansen and C. Torp-Pedersen (2011). "Mortality and cardiovascular risk associated with different insulin secretagogues compared with metformin in type 2 diabetes, with or without a previous myocardial infarction: a nationwide study." *Eur Heart J* 32(15): 1900-1908.

Schuit, F. C. and D. G. Pipeleers (1985). "Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate levels in the pancreatic B cell." *Endocrinology* 117(3): 834-840.

Schulze, D., M. Rapedius, T. Krauter and T. Baukrowitz (2003). "Long-chain acyl-CoA esters and phosphatidylinositol phosphates modulate ATP inhibition of KATP channels by the same mechanism." *J Physiol* 552(Pt 2): 357-367.

Schulze, D. U., M. Düfer, B. Wieringa, P. Krippeit-Drews and G. Drews (2007). "An adenylate kinase is involved in KATP channel regulation of mouse pancreatic beta cells." *Diabetologia* 50(10): 2126-2134.

Scott, N. A., P. E. Jennings, J. Brown and J. J. Belch (1991). "Gliclazide: a general free radical scavenger." *Eur J Pharmacol* 208(2): 175-177.

- Seghers, V., M. Nakazaki, F. DeMayo, L. Aguilar-Bryan and J. Bryan** (2000). "Sur1 knockout mice. A model for K(ATP) channel-independent regulation of insulin secretion." *J Biol Chem* 275(13): 9270-9277.
- Sener, A., S. Kawazu, J. C. Hutton, A. C. Boschero, G. Devis, G. Somers, A. Herchuelz and W. J. Malaisse** (1978). "The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Effect of exogenous pyruvate on islet function." *Biochem J* 176(1): 217-232.
- Sepe, V., A. Loviselli and G. F. Bottazzo** (2009). "Genetics of type 1A diabetes." *N Engl J Med* 361(2): 211.
- Shah, J. H., D. J. Maguire, D. Brown and A. Cotterill** (2007). "The role of ATP sensitive channels in insulin secretion and the implications in persistent hyperinsulinemic hypoglycaemia of infancy (PHHI)." *Adv Exp Med Biol* 599: 133-138.
- Shaw, J.** (2011). "Diagnosis of prediabetes." *Med Clin North Am* 95(2): 341-352, viii.
- Shawl, A. I., K. H. Park and U. H. Kim** (2009). "Insulin receptor signaling for the proliferation of pancreatic beta-cells: involvement of Ca²⁺ second messengers, IP₃, NAADP and cADPR." *Islets* 1(3): 216-223.
- Shimabukuro, M., Y. T. Zhou, M. Levi and R. H. Unger** (1998). "Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5): 2498-2502.
- Shin, S., J. Wakabayashi, M. S. Yates, N. Wakabayashi, P. M. Dolan, S. Aja, K. T. Liby, M. B. Sporn, M. Yamamoto and T. W. Kensler** (2009). "Role of Nrf2 in prevention of high-fat diet-induced obesity by synthetic triterpenoid CDDO-imidazolide." *Eur J Pharmacol* 620(1-3): 138-144.
- Shiota, C., O. Larsson, K. D. Shelton, M. Shiota, A. M. Efanov, M. Hoy, J. Lindner, S. Kooptiwut, L. Juntti-Berggren, J. Gromada, P. O. Berggren and M. A. Magnuson** (2002). "Sulfonylurea receptor type 1 knock-out mice have intact feeding-stimulated insulin secretion despite marked impairment in their response to glucose." *J Biol Chem* 277(40): 37176-37183.
- Shyng, S. and C. G. Nichols** (1997). "Octameric stoichiometry of the KATP channel complex." *J Gen Physiol* 110(6): 655-664.
- Singh, S., H. Y. Chang, T. M. Richards, J. P. Weiner, J. M. Clark and J. B. Segal** (2013). "Glucagonlike peptide 1-based therapies and risk of hospitalization for acute pancreatitis in type 2 diabetes mellitus: a population-based matched case-control study." *JAMA Intern Med* 173(7): 534-539.
- Sjoholm, A.** (1996). "Nitric oxide donor SIN-1 inhibits insulin release." *Am J Physiol* 271(4 Pt 1): C1098-1102.

- Sliwinska, A., A. Rogalska, M. Szwed, J. Kasznicki, Z. Jozwiak and J. Drzewoski** (2012). "Gliclazide may have an antiapoptotic effect related to its antioxidant properties in human normal and cancer cells." *Mol Biol Rep* 39(5): 5253-5267.
- Smith, G. R. and D. P. Shanley** (2013). "Computational modelling of the regulation of Insulin signalling by oxidative stress." *BMC Syst Biol* 7: 41.
- Solesio, M. E., S. Saez-Atienzar, J. Jordan and M. F. Galindo** (2013). "3-Nitropropionic acid induces autophagy by forming mitochondrial permeability transition pores rather than activating the mitochondrial fission pathway." *Br J Pharmacol* 168(1): 63-75.
- Somesh, B. P., M. K. Verma, M. K. Sadasivuni, A. Mammen-Oommen, S. Biswas, P. C. Shilpa, A. K. Reddy, A. N. Yateesh, P. M. Pallavi, S. Nethra, R. Smitha, K. Neelima, U. Narayanan and M. R. Jagannath** (2013). "Chronic glucolipotoxic conditions in pancreatic islets impair insulin secretion due to dysregulated calcium dynamics, glucose responsiveness and mitochondrial activity." *BMC Cell Biol* 14: 31.
- Southern, C., D. Schulster and I. C. Green** (1990). "Inhibition of insulin secretion by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha via an L-arginine-dependent nitric oxide generating mechanism." *FEBS Lett* 276(1-2): 42-44.
- Spragg, R. G., D. B. Hinshaw, P. A. Hyslop, I. U. Schraufstatter and C. G. Cochrane** (1985). "Alterations in adenosine triphosphate and energy charge in cultured endothelial and P388D1 cells after oxidant injury." *J Clin Invest* 76(4): 1471-1476.
- Stamler, J. S., D. I. Simon, O. Jaraki, J. A. Osborne, S. Francis, M. Mullins, D. Singel and J. Loscalzo** (1992). "S-nitrosylation of tissue-type plasminogen activator confers vasodilatory and antiplatelet properties on the enzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(17): 8087-8091.
- Steiner, D. F., S. J. Chan, J. M. Welsh and S. C. Kwok** (1985). "Structure and evolution of the insulin gene." *Annu Rev Genet* 19: 463-484.
- Sugimoto, H., K. Okada, J. Shoda, E. Warabi, K. Ishige, T. Ueda, K. Taguchi, T. Yanagawa, A. Nakahara, I. Hyodo, T. Ishii and M. Yamamoto** (2010). "Deletion of nuclear factor-E2-related factor-2 leads to rapid onset and progression of nutritional steatohepatitis in mice." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298(2): G283-294.
- Surwit, R. S., C. M. Kuhn, C. Cochrane, J. A. McCubbin and M. N. Feinglos** (1988). "Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice." *Diabetes* 37(9): 1163-1167.
- Suschk, C., K. Fehsel, K. D. Kroncke, A. Sommer and V. Kolb-Bachofen** (1994). "Primary cultures of rat islet capillary endothelial cells. Constitutive and cytokine-inducible macrophagelike nitric oxide synthases are expressed and activities regulated by glucose concentration." *Am J Pathol* 145(3): 685-695.

- Swann, J. D., M. W. Smith, P. C. Phelps, A. Maki, I. K. Berezsky and B. F. Trump** (1991). "Oxidative injury induces influx-dependent changes in intracellular calcium homeostasis." *Toxicol Pathol* 19(2): 128-137.
- Sykiotis, G. P. and D. Bohmann** (2008). "Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*." *Dev Cell* 14(1): 76-85.
- Sykiotis, G. P., I. G. Habeos, A. V. Samuelson and D. Bohmann** (2011). "The role of the antioxidant and longevity-promoting Nrf2 pathway in metabolic regulation." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14(1): 41-48.
- Tabak, A. G., M. Jokela, T. N. Akbaraly, E. J. Brunner, M. Kivimaki and D. R. Witte** (2009). "Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study." *Lancet* 373(9682): 2215-2221.
- Takahashi, A., K. Nagashima, A. Hamasaki, N. Kuwamura, Y. Kawasaki, H. Ikeda, Y. Yamada, N. Inagaki and Y. Seino** (2007). "Sulfonylurea and glinide reduce insulin content, functional expression of K(ATP) channels, and accelerate apoptotic beta-cell death in the chronic phase." *Diabetes Res Clin Pract* 77(3): 343-350.
- Takahashi, H., P. O. Tran, E. LeRoy, J. S. Harmon, Y. Tanaka and R. P. Robertson** (2004). "D-Glyceraldehyde causes production of intracellular peroxide in pancreatic islets, oxidative stress, and defective beta cell function via non-mitochondrial pathways." *J Biol Chem* 279(36): 37316-37323.
- Takasu, N., I. Komiya, T. Asawa, Y. Nagasawa and T. Yamada** (1991). "Streptozocin- and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H₂O₂ as mediator for DNA fragmentation." *Diabetes* 40(9): 1141-1145.
- Talalay, P., M. J. De Long and H. J. Prochaska** (1988). "Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(21): 8261-8265.
- Tan, C. P., Y. Feng, Y. P. Zhou, G. J. Eiermann, A. Petrov, C. Zhou, S. Lin, G. Salituro, P. Meinke, R. Mosley, T. E. Akiyama, M. Einstein, S. Kumar, J. P. Berger, S. G. Mills, N. A. Thornberry, L. Yang and A. D. Howard** (2008). "Selective small-molecule agonists of G protein-coupled receptor 40 promote glucose-dependent insulin secretion and reduce blood glucose in mice." *Diabetes* 57(8): 2211-2219.
- Tanabe, K., S. J. Tucker, M. Matsuo, P. Proks, F. M. Ashcroft, S. Seino, T. Amachi and K. Ueda** (1999). "Direct photoaffinity labeling of the Kir6.2 subunit of the ATP-sensitive K⁺ channel by 8-azido-ATP." *J Biol Chem* 274(7): 3931-3933.
- Tanaka, Y., L. M. Aleksunes, R. L. Yeager, M. A. Gyamfi, N. Esterly, G. L. Guo and C. D. Klaassen** (2008). "NF-E2-related factor 2 inhibits lipid accumulation and oxidative stress in mice fed a high-fat diet." *J Pharmacol Exp Ther* 325(2): 655-664.

- Tang, C., P. Han, A. I. Oprescu, S. C. Lee, A. V. Gyulhandanyan, G. N. Chan, M. B. Wheeler and A. Giacca** (2007). "Evidence for a role of superoxide generation in glucose-induced beta-cell dysfunction in vivo." *Diabetes* 56(11): 2722-2731.
- Tarasov, A., J. Dusonchet and F. Ashcroft** (2004). "Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel: a pas de deux." *Diabetes* 53 Suppl 3: S113-122.
- Tarasov, A. I., C. A. Girard and F. M. Ashcroft** (2006). "ATP sensitivity of the ATP-sensitive K⁺ channel in intact and permeabilized pancreatic beta-cells." *Diabetes* 55(9): 2446-2454.
- Thomas, P. M., G. J. Cote, N. Wohlk, B. Haddad, P. M. Mathew, W. Rabl, L. Aguilar-Bryan, R. F. Gagel and J. Bryan** (1995). "Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy." *Science* 268(5209): 426-429.
- Thorens, B. and G. Waeber** (1993). "Glucagon-like peptide-I and the control of insulin secretion in the normal state and in NIDDM." *Diabetes* 42(9): 1219-1225.
- Thornalley, P. J., A. Langborg and H. S. Minhas** (1999). "Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose." *Biochem J* 344 Pt 1: 109-116.
- Thurmond, D. C., C. Gonelle-Gispert, M. Furukawa, P. A. Halban and J. E. Pessin** (2003). "Glucose-stimulated insulin secretion is coupled to the interaction of actin with the t-SNARE (target membrane soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor protein) complex." *Mol Endocrinol* 17(4): 732-742.
- Tiedge, M., S. Lortz, J. Drinkgern and S. Lenzen** (1997). "Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells." *Diabetes* 46(11): 1733-1742.
- Tiedge, M., S. Lortz, R. Munday and S. Lenzen** (1998). "Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species." *Diabetes* 47(10): 1578-1585.
- Tiedge, M., S. Lortz, R. Munday and S. Lenzen** (1999). "Protection against the co-operative toxicity of nitric oxide and oxygen free radicals by overexpression of antioxidant enzymes in bioengineered insulin-producing RINm5F cells." *Diabetologia* 42(7): 849-855.
- Torii, S., S. Zhao, Z. Yi, T. Takeuchi and T. Izumi** (2002). "Granuphilin modulates the exocytosis of secretory granules through interaction with syntaxin 1a." *Mol Cell Biol* 22(15): 5518-5526.
- Tsuura, Y., H. Ishida, S. Hayashi, K. Sakamoto, M. Horie and Y. Seino** (1994). "Nitric oxide opens ATP-sensitive K⁺ channels through suppression of phosphofructokinase activity and inhibits glucose-induced insulin release in pancreatic beta cells." *J Gen Physiol* 104(6): 1079-1098.

Tucker, S. J., F. M. Gribble, C. Zhao, S. Trapp and F. M. Ashcroft (1997). "Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor." *Nature* 387(6629): 179-183.

Tullet, J. M., M. Hertweck, J. H. An, J. Baker, J. Y. Hwang, S. Liu, R. P. Oliveira, R. Baumeister and T. K. Blackwell (2008). "Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*." *Cell* 132(6): 1025-1038.

Tyrberg, B., D. L. Eizirik, S. L. Marklund, B. Olejnicka, O. D. Madsen and A. Andersson (1999). "Human islets in mixed islet grafts protect mouse pancreatic beta-cells from alloxan toxicity." *Pharmacol Toxicol* 85(6): 269-275.

Tzoulaki, I., M. Molokhia, V. Curcin, M. P. Little, C. J. Millett, A. Ng, R. I. Hughes, K. Khunti, M. R. Wilkins, A. Majeed and P. Elliott (2009). "Risk of cardiovascular disease and all cause mortality among patients with type 2 diabetes prescribed oral antidiabetes drugs: retrospective cohort study using UK general practice research database." *BMJ* 339: b4731.

U.K. Prospective Diabetes Study Group, U. (1995). "U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group." *Diabetes* 44(11): 1249-1258.

Ueda, K., N. Inagaki and S. Seino (1997). "MgADP antagonism to Mg²⁺-independent ATP binding of the sulfonylurea receptor SUR1." *J Biol Chem* 272(37): 22983-22986.

Ullrich, S., S. Berchtold, F. Ranta, G. Seebohm, G. Henke, A. Lupescu, A. F. Mack, C. M. Chao, J. Su, R. Nitschke, D. Alexander, B. Friedrich, P. Wulff, D. Kuhl and F. Lang (2005). "Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) mediates glucocorticoid-induced inhibition of insulin secretion." *Diabetes* 54(4): 1090-1099.

Unger, R. H. (1995). "Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications." *Diabetes* 44(8): 863-870.

Unger, R. H. and S. Grundy (1985). "Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes." *Diabetologia* 28(3): 119-121.

Uruno, A., Y. Furusawa, Y. Yagishita, T. Fukutomi, H. Muramatsu, T. Negishi, A. Sugawara, T. W. Kensler and M. Yamamoto (2013). "The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus." *Mol Cell Biol* 33(15): 2996-3010.

Valle, M. M., M. F. Graciano, E. R. Lopes de Oliveira, J. P. Camporez, E. H. Akamine, C. R. Carvalho, R. Curi and A. R. Carpinelli (2011). "Alterations of NADPH oxidase activity in rat pancreatic islets induced by a high-fat diet." *Pancreas* 40(3): 390-395.

Van De Winkel, M. and D. Pipeleers (1983). "Autofluorescence-activated cell sorting of pancreatic islet cells: purification of insulin-containing B-cells according to glucose-induced changes in cellular redox state." *Biochem Biophys Res Commun* 114(2): 835-842.

- Van Obberghen, E., V. Baron, L. Delahaye, B. Emanuelli, N. Filippa, S. Giorgetti-Peraldi, P. Lebrun, I. Mothe-Satney, P. Peraldi, S. Rocchi, D. Sawka-Verhelle, S. Tartare-Deckert and J. Giudicelli** (2001). "Surfing the insulin signaling web." *Eur J Clin Invest* 31(11): 966-977.
- Vasu, S., N. H. McClenaghan, J. T. McCluskey and P. R. Flatt** (2014). "Mechanisms of toxicity by proinflammatory cytokines in a novel human pancreatic beta cell line, 1.1B4." *Biochim Biophys Acta* 1840(1): 136-145.
- Velayutham, M., F. A. Villamena, J. C. Fishbein and J. L. Zweier** (2005). "Cancer chemopreventive oltipraz generates superoxide anion radical." *Arch Biochem Biophys* 435(1): 83-88.
- Verspohl, E. J. and H. P. Ammon** (1980). "Evidence for presence of insulin receptors in rat islets of Langerhans." *J Clin Invest* 65(5): 1230-1237.
- Vidal-Puig, A. J., D. Grujic, C. Y. Zhang, T. Hagen, O. Boss, Y. Ido, A. Szczepanik, J. Wade, V. Mootha, R. Cortright, D. M. Muoio and B. B. Lowell** (2000). "Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice." *J Biol Chem* 275(21): 16258-16266.
- Vis, J. C., M. M. Verbeek, R. M. de Waal, H. J. ten Donkelaar and B. Kremer** (2001). "The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces differential expression patterns of apoptosis-related markers in rat striatum." *Neuropathol Appl Neurobiol* 27(1): 68-76.
- Wagner, R., G. Kaiser, F. Gerst, E. Christiansen, M. E. Due-Hansen, M. Grundmann, F. Machicao, A. Peter, E. Kostenis, T. Ulven, A. Fritsche, H. U. Haring and S. Ullrich** (2013). "Reevaluation of fatty acid receptor 1 as a drug target for the stimulation of insulin secretion in humans." *Diabetes* 62(6): 2106-2111.
- Wakabayashi, N., A. T. Dinkova-Kostova, W. D. Holtzclaw, M. I. Kang, A. Kobayashi, M. Yamamoto, T. W. Kensler and P. Talalay** (2004). "Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(7): 2040-2045.
- Walton, R. J., I. T. Sherif, G. A. Noy and K. G. Alberti** (1979). "Improved metabolic profiles in insulin-treated diabetic patients given an alpha-glucosidase inhibitor." *Br Med J* 1(6158): 220-221.
- Wang, C., B. Geng, Q. Cui, Y. Guan and J. Yang** (2013a). "Intracellular and extracellular ATP in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells." *J Diabetes*.
- Wang, J., P. S. Green and J. W. Simpkins** (2001). "Estradiol protects against ATP depletion, mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma cells." *J Neurochem* 77(3): 804-811.

- Wang, X., W. Bao, J. Liu, Y. Y. Ouyang, D. Wang, S. Rong, X. Xiao, Z. L. Shan, Y. Zhang, P. Yao and L. G. Liu** (2013b). "Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis." *Diabetes Care* 36(1): 166-175.
- Wang, X. and C. X. Hai** (2011). "ROS acts as a double-edged sword in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: is Nrf2 a potential target for the treatment?" *Mini Rev Med Chem* 11(12): 1082-1092.
- Wang, X., H. Li, D. De Leo, W. Guo, V. Koshkin, I. G. Fantus, A. Giacca, C. B. Chan, S. Der and M. B. Wheeler** (2004). "Gene and protein kinase expression profiling of reactive oxygen species-associated lipotoxicity in the pancreatic beta-cell line MIN6." *Diabetes* 53(1): 129-140.
- Wang, X., L. Zhou, G. Li, T. Luo, Y. Gu, L. Qian, X. Fu, F. Li, J. Li and M. Luo** (2007). "Palmitate activates AMP-activated protein kinase and regulates insulin secretion from beta cells." *Biochem Biophys Res Commun* 352(2): 463-468.
- Wang, X. J., J. D. Hayes, L. G. Higgins, C. R. Wolf and A. T. Dinkova-Kostova** (2010). "Activation of the NRF2 signaling pathway by copper-mediated redox cycling of para- and ortho-hydroquinones." *Chem Biol* 17(1): 75-85.
- Ward, G. M., J. M. Walters, P. M. Aitken, J. D. Best and F. P. Alford** (1990). "Effects of prolonged pulsatile hyperinsulinemia in humans. Enhancement of insulin sensitivity." *Diabetes* 39(4): 501-507.
- Warnotte, C., P. Gilon, M. Nenquin and J. C. Henquin** (1994). "Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids. A study of palmitate effects in mouse beta-cells." *Diabetes* 43(5): 703-711.
- Wasserman, W. W. and W. E. Fahl** (1997). "Functional antioxidant responsive elements." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10): 5361-5366.
- Weir, G. C. and S. Bonner-Weir** (1990). "Islets of Langerhans: the puzzle of intra-islet interactions and their relevance to diabetes." *J Clin Invest* 85(4): 983-987.
- Wells-Knecht, K. J., D. V. Zyzak, J. E. Litchfield, S. R. Thorpe and J. W. Baynes** (1995). "Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose." *Biochemistry* 34(11): 3702-3709.
- Welsh, N., D. L. Eizirik, K. Bendtzen and S. Sandler** (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." *Endocrinology* 129(6): 3167-3173.
- Wente, W., M. B. Brenner, H. Zitzer, J. Gromada and A. M. Efanov** (2007). "Activation of liver X receptors and retinoid X receptors induces growth arrest and apoptosis in insulin-secreting cells." *Endocrinology* 148(4): 1843-1849.

- Wiederkehr, A. and C. B. Wollheim** (2008). "Impact of mitochondrial calcium on the coupling of metabolism to insulin secretion in the pancreatic beta-cell." *Cell Calcium* 44(1): 64-76.
- Wilson, G. L., N. J. Patton and S. P. LeDoux** (1997). "Mitochondrial DNA in beta-cells is a sensitive target for damage by nitric oxide." *Diabetes* 46(8): 1291-1295.
- Wiser, O., M. Trus, A. Hernandez, E. Renstrom, S. Barg, P. Rorsman and D. Atlas** (1999). "The voltage sensitive Lc-type Ca²⁺ channel is functionally coupled to the exocytotic machinery." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(1): 248-253.
- Wolff, S. P. and R. T. Dean** (1987). "Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes." *Biochem J* 245(1): 243-250.
- Wu, E. Y., M. T. Smith, G. Bellomo and D. Di Monte** (1990). "Relationships between the mitochondrial transmembrane potential, ATP concentration, and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes." *Arch Biochem Biophys* 282(2): 358-362.
- Xu, B., J. T. Moritz and P. N. Epstein** (1999). "Overexpression of catalase provides partial protection to transgenic mouse beta cells." *Free Radic Biol Med* 27(7-8): 830-837.
- Xu, J., J. Han, Y. S. Long, P. N. Epstein and Y. Q. Liu** (2008a). "The role of pyruvate carboxylase in insulin secretion and proliferation in rat pancreatic beta cells." *Diabetologia* 51(11): 2022-2030.
- Xu, J., L. Zhang, A. Chou, T. Allaby, G. Belanger, J. Radziuk, B. J. Jasmin, T. Miki, S. Seino and J. M. Renaud** (2008b). "KATP channel-deficient pancreatic beta-cells are streptozotocin resistant because of lower GLUT2 activity." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294(2): E326-335.
- Xu, X., P. Luo, Y. Wang, Y. Cui and L. Miao** (2013). "Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NFE2L2) is a novel therapeutic target for diabetic complications." *J Int Med Res* 41(1): 13-19.
- Yagishita, Y., T. Fukutomi, A. Sugawara, H. Kawamura, T. Takahashi, J. Pi, A. Uruno and M. Yamamoto** (2013). "Nrf2 Protects Pancreatic beta-Cells from Oxidative and Nitrosative Stress in Diabetic Model Mice." *Diabetes*.
- Yajima, H., M. Komatsu, S. Yamada, S. G. Straub, T. Kaneko, Y. Sato, K. Yamauchi, K. Hashizume, G. W. Sharp and T. Aizawa** (2000). "Ceruleinin, an inhibitor of protein acylation, selectively attenuates nutrient stimulation of insulin release: a study in rat pancreatic islets." *Diabetes* 49(5): 712-717.
- Yan, L. J., R. L. Levine and R. S. Sohal** (1997). "Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(21): 11168-11172.

- Yang, B., J. Fu, H. Zheng, P. Xue, K. Yarborough, C. G. Woods, Y. Hou, Q. Zhang, M. E. Andersen and J. Pi** (2012). "Deficiency in the nuclear factor E2-related factor 2 renders pancreatic beta-cells vulnerable to arsenic-induced cell damage." *Toxicol Appl Pharmacol* 264(3): 315-323.
- Yankovskaya, V., R. Horsefield, S. Tornroth, C. Luna-Chavez, H. Miyoshi, C. Leger, B. Byrne, G. Cecchini and S. Iwata** (2003). "Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation." *Science* 299(5607): 700-704.
- Yip, S., L. D. Plank and R. Murphy** (2013). "Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy for Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis of Outcomes." *Obes Surg*.
- Yoh, K., A. Hirayama, K. Ishizaki, A. Yamada, M. Takeuchi, S. Yamagishi, N. Morito, T. Nakano, M. Ojima, H. Shimohata, K. Itoh, S. Takahashi and M. Yamamoto** (2008). "Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice." *Genes Cells* 13(11): 1159-1170.
- Yoshikawa, H., Z. Ma, A. Bjorklund and V. Grill** (2004). "Short-term intermittent exposure to diazoxide improves functional performance of beta-cells in a high-glucose environment." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287(6): E1202-1208.
- Yu, R., T. H. Tan and A. N. Kong** (1997). "Butylated hydroxyanisole and its metabolite tert-butylhydroquinone differentially regulate mitogen-activated protein kinases. The role of oxidative stress in the activation of mitogen-activated protein kinases by phenolic antioxidants." *J Biol Chem* 272(46): 28962-28970.
- Yu, Z., W. Shao, Y. Chiang, W. Foltz, Z. Zhang, W. Ling, I. G. Fantus and T. Jin** (2011). "Oltipraz upregulates the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 [corrected](NRF2) antioxidant system and prevents insulin resistance and obesity induced by a high-fat diet in C57BL/6J mice." *Diabetologia* 54(4): 922-934.
- Yuan, H., X. Zhang, X. Huang, Y. Lu, W. Tang, Y. Man, S. Wang, J. Xi and J. Li** (2010). "NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species mediate FFAs-induced dysfunction and apoptosis of beta-cells via JNK, p38 MAPK and p53 pathways." *PLoS One* 5(12): e15726.
- Zeller, M., N. Danchin, D. Simon, A. Vahanian, L. Lorgis, Y. Cottin, J. Berland, P. Gueret, P. Wyart, R. Deturck, X. Tabone, J. Machecourt, F. Leclercq, E. Drouet, G. Mulak, V. Bataille, J. P. Cambou, J. Ferrieres, T. Simon, S. T. E. French Registry of Acute and S. T. E. M. I. i. Non** (2010). "Impact of type of preadmission sulfonylureas on mortality and cardiovascular outcomes in diabetic patients with acute myocardial infarction." *J Clin Endocrinol Metab* 95(11): 4993-5002.
- Zhang, C. L., M. Katoh, T. Shibasaki, K. Minami, Y. Sunaga, H. Takahashi, N. Yokoi, M. Iwasaki, T. Miki and S. Seino** (2009). "The cAMP sensor Epac2 is a direct target of antidiabetic sulfonylurea drugs." *Science* 325(5940): 607-610.

- Zhang, C. Y., G. Baffy, P. Perret, S. Krauss, O. Peroni, D. Grujic, T. Hagen, A. J. Vidal-Puig, O. Boss, Y. B. Kim, X. X. Zheng, M. B. Wheeler, G. I. Shulman, C. B. Chan and B. B. Lowell** (2001). "Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes." *Cell* 105(6): 745-755.
- Zhang, D. D.** (2006). "Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway." *Drug Metab Rev* 38(4): 769-789.
- Zhang, J. and S. H. Snyder** (1992). "Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(20): 9382-9385.
- Zhang, Y., O. Marcillat, C. Giulivi, L. Ernster and K. J. Davies** (1990). "The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase." *J Biol Chem* 265(27): 16330-16336.
- Zhang, Y. and R. Munday** (2008). "Dithiolethiones for cancer chemoprevention: where do we stand?" *Mol Cancer Ther* 7(11): 3470-3479.
- Zhang, Y. K., R. L. Yeager, Y. Tanaka and C. D. Klaassen** (2010). "Enhanced expression of Nrf2 in mice attenuates the fatty liver produced by a methionine- and choline-deficient diet." *Toxicol Appl Pharmacol* 245(3): 326-334.
- Zhou, G., R. Myers, Y. Li, Y. Chen, X. Shen, J. Fenyk-Melody, M. Wu, J. Ventre, T. Doebber, N. Fujii, N. Musi, M. F. Hirshman, L. J. Goodyear and D. E. Moller** (2001). "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action." *J Clin Invest* 108(8): 1167-1174.
- Zhou, Y. P. and V. E. Grill** (1994). "Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle." *J Clin Invest* 93(2): 870-876.
- Zhou, Y. P. and V. E. Grill** (1995). "Palmitate-induced beta-cell insensitivity to glucose is coupled to decreased pyruvate dehydrogenase activity and enhanced kinase activity in rat pancreatic islets." *Diabetes* 44(4): 394-399.
- Zingman, L. V., A. E. Alekseev, M. Bienengraeber, D. Hodgson, A. B. Karger, P. P. Dzeja and A. Terzic** (2001). "Signaling in channel/enzyme multimers: ATPase transitions in SUR module gate ATP-sensitive K⁺ conductance." *Neuron* 31(2): 233-245.
- Zipper, L. M. and R. T. Mulcahy** (2002). "The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm." *J Biol Chem* 277(39): 36544-36552.
- Zoratti, M. and I. Szabo** (1995). "The mitochondrial permeability transition." *Biochim Biophys Acta* 1241(2): 139-176.

7 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2010 bis Dezember 2013 unter wissenschaftlicher Anleitung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Martina Düfer am Pharmazeutischen Institut der Eberhard Karls Universität Tübingen angefertigt.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Martina Düfer danke ich für das entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit eine Reihe spannender Aspekte aus dem großen Feld der „ox.-Stress-Themen“ unter ihrer fachlichen Anleitung zu bearbeiten. Unser häufiger wissenschaftlicher Austausch über die kleinen und großen Probleme des *beta*-Zellalltages war für mich Motivation und Herausforderung zugleich und hat meine wissenschaftliche und persönliche Entwicklung nachhaltig geprägt. Vor allem möchte ich mich für die vielen Phasen bedanken, in denen sie es mir großzügig ermöglichte, wissenschaftliche Fragestellungen mit eigenen Ideen und Lösungsvorschlägen bearbeiten zu dürfen. Diese Freiheiten gestalteten unsere Zusammenarbeit stets erfrischend und besonders.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Gisela Drews danke ich für die nette Aufnahme in ihren Arbeitskreis und die ständige Hilfs- und Gesprächsbereitschaft. Das kritische Hinterfragen meiner wissenschaftlichen Arbeit, das ausgewogene Verhältnis zwischen Fordern und Fördern sowie das uneingeschränkte Vertrauen in mich und mein Vorankommen sind Gründe, warum ich diese Zeit sehr gerne in Erinnerung behalten werde.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Peter Krippeit-Drews danke ich für die herzliche und begeisternde Art wissenschaftliche Grundlagen der (*beta*-Zell-)Physiologie zu vermitteln und hin und wieder auch ausdiskutieren. Darüber hinaus war er bei kleineren und größeren technischen Problemen im Labor mit seiner geduldigen Hilfsbereitschaft unersetzlich.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Susanne Ullrich und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Harald Groß danke ich für die Bereitschaft als weitere Prüfer zu fungieren. Für die Organisation der interessanten Diabetes-Seminare in den letzten Jahren möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Peter Ruth und Herrn JProf. Dr. rer. nat. Robert Lukowski danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft bei methodischen und fachlichen Fragen und die unkomplizierte Mitbenutzung einiger wichtiger Geräte und Einrichtungen.

Meiner lieben Familie und Freundin Lena danke ich für die Unterstützung während der letzten Jahre. Durch euren Rückhalt und Beistand konnte ich diese Stationen meines Lebens so unbeschwert meistern.

Meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor danke ich für das lustige und heitere Miteinander in den letzten Jahren: Cita Bauer, Eva Heider, Dr. rer. nat. Katrin Hörth, Sabrina Undank, Rebecca Wagner, Björn Schittenhelm und Sven Schönecker. Auch den entfernten Kollegen in Münster Simone Brouwer, Betina Pajaziti, Johanna Schultheis, Dr. rer. nat. Frank Begrow, Philipp Schulte-Mecklenbeck und Mats Wiedemann sei für die nette Aufnahme und Unterstützung bei meinen zahlreichen Visiten gedankt.

Vielen Dank an „meine“ (med.) Doktoranden, Diplomanden und Wahlpflichtfachstudenten, die ich betreuen durfte und die wichtige Beiträge zum Gelingen dieser Arbeit leisteten: Cita Bauer, Hanna-Marie Frunder, Dunia Graf geb. Cornejo Diaz, Anne-Christine von Hagen, Vanessa Sigg geb. Dillmann, Bettina Winter und Anita Wurster.

Den vielen Leuten auf der 7. Ebene des Instituts aus den Arbeitskreisen Ruth und Schultz sei gedankt, die das (Labor-)Leben und die Arbeitsatmosphäre so erträglich und unterhaltsam gemacht haben. Ihr wart ein einzigartiges Team, an das ich mich gerne erinnern werde.

Den technischen Assistenten Isolde Breuning und Clement Kabagema-Bilan danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz und ihre Unterstützung im Labor. Ise danke ich vor allem für die immer zuverlässige Unterstützung bei den Insulinsekretionsmessungen. PD Dr. med. Andreas Peter danke ich für die freundliche Kooperation im Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen.

Den Tierpflegern Ilona Böhler und Herrn Bröckel und den vielen weiteren Helfern im Tierstall danke ich für die Versorgung unserer Mäuse, den Sekretärinnen Frau Straub und Frau Weber für die Verwaltung unserer Unterlagen.

Allen Weggefährten vielen Dank für die wundervolle Zeit in der Universitätsstadt Tübingen.

8 Lebenslauf

Armin Edalat

geboren am 27. August 1985 in Gummersbach

2004	Abitur am Abtei-Gymnasium Brauweiler, Pulheim-Brauweiler
2004 – 2005	Zivildienst im St. Katharinen-Hospital, Frechen
2005 – 2009	Studium der Pharmazie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
2005	Famulatur in der Römer-Apotheke, Köln-Weiden
2006	Famulatur im Bereich Klinische Pharmazie des Pharmazeutischen Instituts
2007	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2008	Studentische Hilfskraft im Bereich Pharmazeutische Chemie des Pharmazeutischen Instituts
2008 – 2009	Wahlpflichtfach im Bereich Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Instituts
2009	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2009 – 2010	Praktisches Jahr in der Apotheke der Uniklinik Köln und in der Stein-Apotheke, Köln-Lövenich
2010	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation als Apotheker
Juni 2010 bis Dezember 2013	Akademischer Mitarbeiter in der Abteilung Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie des Pharmazeutischen Instituts der Eberhard Karls Universität Tübingen; ab August 2012 externer wissenschaftlicher Mitarbeiter des Instituts für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
seit Januar 2014	Apotheker in der Alamannen-Apotheke, Holzgerlingen

9 Veröffentlichungen

9.1 Wissenschaftliche Publikationen

Mol Pharmacol. 2013 Jan;83(1):51-60

Glitazones exert multiple effects on β -cell stimulus-secretion coupling.

Düfer M, Noack K, **Edalat A**, Krippeit-Drews P, Drews G.

9.2 Kongress- und Tagungsbeiträge

03.08.2011, Summer retreat Biel/Drews/Feil/Ruth 2011, Chiemsee-Frauenwörth

K_{ATP} channel inhibitors: Protection of pancreatic β cells against oxidative stress

22. – 25.03.2012, 91. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG), Dresden

K_{ATP} channel inhibition as a promising strategy to protect pancreatic *beta*-cells against oxidative damage

A. Edalat, P. Krippeit-Drews, G. Drews, M. Düfer

Effects of a SOD mimetic on H₂O₂-induced oxidative stress in mouse pancreatic *beta*-cells

P. Krippeit-Drews, S. Schönecker, B. Winter, **A. Edalat**, M. Düfer, E. Guenther, U. Kraushaar, G. Drews

Effects of FFA1 agonists on stimulus-secretion coupling in *beta*-cells

G. Drews, D. Cornejo, **A. Edalat**, M. Düfer, P. Krippeit-Drews, C. Elisabeth, T. Ulven, S. Ullrich

16. – 19.05.2012, 47. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG), Stuttgart

Ein SOD-Mimetikum schützt *beta*-Zellen vor oxidativem Stress

P. Krippeit-Drews, S. Schönecker, B. Winter, **A. Edalat**, M. Düfer, E. Guenther, U. Kraushaar, G. Drews

01. – 05.10.2012, 48. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes (EASD), Berlin

Regulation of $[Ca^{2+}]_c$ and insulin secretion by activation of FFAR1 in murine beta cells

G. Drews, D. Cornejo, **A. Edalat**, G. Schulz-Raffelt, M. Düfer, P. Krippeit-Drews, E. Christiansen, H.U. Häring, T. Ulven, S. Ullrich

05. – 07.10.2012, Jahrestagung der EASD Islet Study Group (ISG 2012), Rostock

Contribution of mitochondrial oxidative stress to *beta*-cell failure

Edalat A., Bauer C., Krippeit-Drews P., Drews G., Düfer M.

02. – 05.03.2013, 92. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG), Heidelberg

Inhibition of mitochondrial succinate dehydrogenase impairs *beta*-cell function by generation of oxidative stress

Edalat, A., Düfer, M., Bauer C., Krippeit-Drews P., Drews G.

23. – 27.09.2013, 49. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes (EASD), Barcelona

Influence of K_{ATP} channel inhibition on ROS production in pancreatic *beta*-cells

Edalat A., Bauer C., Krippeit-Drews P., Drews G., Düfer M.

13. – 15.03.2014, 93. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG), Mainz

Genetic ablation of K_{ATP} channels protects murine *beta*-cells against nutrient stress

R. Wagner, **A. Edalat**, B. Schittenhelm, V. Kähny, M. Düfer, A. Ktorza, J. Bryan, P. Krippeit-Drews, G. Drews

Influence of Ca^{2+} influx on mitochondrial activity of mouse pancreatic *beta*-cells

C. Bauer, **A. Edalat**, M. Düfer, P. Krippeit-Drews, G. Drews

Influence of the Nrf2 activator oltipraz and the SOD mimetic tempol on *beta*-cell viability and insulin secretion

J. Schultheis, **A. Edalat**, P. Krippeit-Drews, G. Drews, M. Düfer

9.3 Universitätsinterne Vorträge

Pharmazeutisches Institut

08.02.2011

Diabetes mellitus type 2: Can K_{ATP} channel inhibitors - preemptively applied - avoid damages of pancreatic β cells induced by oxidative stress?

05.06.2012

Die *beta*-Zelle im Kontext von Diabetes mellitus Typ 2: Mitochondriale Atmungsketten als Ursprung und Target von oxidativem Stress

08.01.2013

Oxidativer Stress als Ursache des 3-NPA induzierten *beta*-Zellschadens?

28.05.2013

beta-Zellen und Glucolipotoxizität: Ein High-Fat-Diet-Modell für die Zellkultur?

21.10.2013

Gliclazid schützt murine *beta*-Zellfunktion während Hochfettdiät

WPV / GRK Diabetes-Seminar, Medizinische Klinik IV

12.12.2012

Mitochondriale Atmungsketten der *beta*-Zelle als Ursprung und Target von oxidativem Stress

29.05.2013

beta-Zellen und Glucolipotoxizität: Ein High-Fat-Diet-Modell für die Zellkultur?

9.4 Universitätsexterne Vorträge

Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Münster

22.10.2012

Die *beta*-Zelle im Kontext von Diabetes mellitus Typ 2: Mitochondriale Atmungsketten als Ursprung und Target von oxidativem Stress

15.05.2013

beta-Zellen und Glucolipotoxizität: Ein High-Fat-Diet-Modell für die Zellkultur?

20.11.2013

Gliclazid schützt murine *beta*-Zellfunktion während Hochfettdiät

