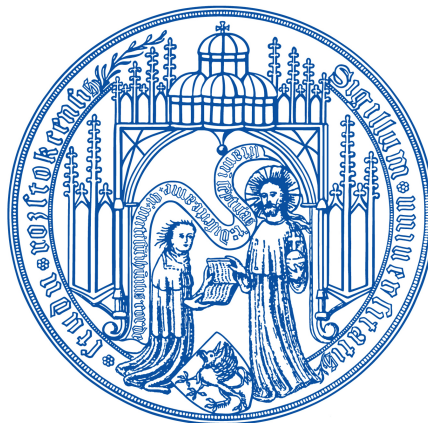

Der Einfluss von MiD51 auf die mitochondriale Dynamik

Dissertation

Universität Rostock
Fakultät für Humanmedizin
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie



vorgelegt von: Jeannette Warkus
geboren am: 05.04.1986 in Eisenhüttenstadt
Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Simone Erika Baltrusch
Institut für med. Biochemie und Molekularbiologie
Schillingallee 70
18057 Rostock
Abgabedatum: 6. November 2019

Dekan: Prof. Dr. E. Reisinger

1.Gutachter: Prof. Dr. Simone Baltrusch

2.Gutachter: Prof. Dr. Martina Düfer

3.Gutachter: Prof. Dr. Burkhard Hinz

Datum der Disputation: 09. Juli 2019

Tagungsbeiträge

Schultz J., Warkus J., Waterstradt R., Baltrusch S.: „Eine verstärkte MiD51 Expression führt zu einer veränderten mitochondrialen Netzwerkstruktur und einem Verlust der Glukoseresponsivität in Beta-Zellen“ ; Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft 2016

Schultz J., Warkus J., Waterstradt R., Baltrusch S.: „MiD51 is not only important for mitochondrial morphology but also for glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells“ , EASD 2016

Publikationen

Schultz J., Warkus J., Waterstradt R., Wolke C., Baltrusch S.: „MiD51 is important for maintaining mitochondrial health in pancreatic beta cells“ ; submitted

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Diabetes mellitus	1
1.2	Das Pankreas	2
1.2.1	Funktion der β -Zellen	2
1.2.2	Glukose-stimulierte Insulinsekretion	3
1.3	Mitochondrien	4
1.4	Mitochondriale Dynamik	5
1.4.1	Mitochondrialer Fusionsprozess	7
1.4.2	Mitochondrialer Teilungsprozess	9
1.5	Struktur und Funktion von MiD51	11
1.6	Zielstellung der Arbeit	13
2	Material	15
2.1	Zellen	15
2.2	Zellkultur-Medien	15
2.3	Inselisolation	16
2.4	Vektoren	16
2.5	Transfektionsreagenz	16
2.6	Antikörper	17
2.7	TaqMan [®] -Sonden	17
2.8	Fluoreszenzfarbstoffe	18
2.9	Molekulargewichtsmarker	18
2.10	Enzyme	18
2.11	Kits	19
2.12	Chemikalien	19
2.13	Verwendete Lösungen und Puffer	21
2.14	Verbrauchsmaterialien	22
2.15	Geräte	23
3	Methoden	25
3.1	MIN6-Zellen	25
3.1.1	Zellkultivierung	25
3.1.2	Zellzahlbestimmung und Zellvitalitätstest	25

3.2	Inselisolation	26
3.2.1	Inselkultivierung	28
3.3	Transfektion	28
3.4	Immunhistochemie	29
3.4.1	Indirekte Immunfluoreszenz	30
3.4.2	Mitochondriale Morphologie	30
3.4.3	Mitochondriales Membranpotential	31
3.5	Proteinbestimmung	31
3.5.1	Proteinpräparation	31
3.5.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	32
3.5.3	SDS-Page	32
3.5.4	Transfer der Proteine	33
3.5.5	Western Blot-Hybridisierung	34
3.6	Genexpressionsanalysen	34
3.6.1	RNA-Isolation	34
3.6.2	RNA-Konzentration	35
3.6.3	cDNA-Synthese	35
3.6.4	quantitative RT-PCR	35
3.7	Funktionsanalysen	38
3.7.1	Glukose-stimulierte Insulinsekretion	38
3.7.2	Insulin-ELISA	39
4	Ergebnisse	41
4.1	Analyse der Genexpression des mitochondrialen Elongationsfaktors MiD51 nach Überexpression in MIN6-Zellen	42
4.1.1	MIN6-Zellen	42
4.1.2	Primäre Maus-Inselzellen	43
4.2	Proteinexpressionsanalyse des mitochondrialen Elongationsfaktors MiD51 nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen	44
4.3	Immunhistochemische Analyse der MiD51-Expression nach Überexpression in MIN6-Zellen und primären Maus-Inselzellen	45
4.3.1	MIN6-Zellen	45
4.3.2	Primäre Maus-Inselzellen	46
4.4	Analyse der mitochondrialen Morphologie nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen	47
4.5	Analyse des mitochondrialen Membranpotential nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen	48

4.6	Analyse der glukose-stimulierten Insulinsekretion nach Überexpression von MiD51	49
4.6.1	MIN6-Zellen	49
4.6.2	Primäre Maus-Inselzellen	50
5	Diskussion	51
5.1	Veränderungen der mitochondrialen Morphologie nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen	53
5.2	Vermindertes mitochondriales Membranpotential nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen	54
5.3	Verminderte glukose-stimulierte Insulinsekretion nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen	57
6	Zusammenfassung	59
7	Thesen	61
	Abbildungsverzeichnis	63
	Tabellenverzeichnis	65
	Abkürzungen	66
	Literaturverzeichnis	71
	Eidesstaatliche Erklärung	95
	Lebenslauf	97
	Danksagung	99

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Definiert wird der Diabetes mellitus als ein heterogenes Krankheitsbild, welches durch eine hyperglykämische Stoffwechsellage charakterisiert ist. Ursächlich ist dabei entweder das Vorliegen einer gestörten Insulinsekretion oder einer verminderten Insulinwirkung oder beides.

Durch die chronische Hyperglykämie kann es zu diabetesspezifischer Mikroangiopathie kommen, die vorwiegend die Augen (diabetische Retinopathie), die Nieren (diabetische Nephropathie) und das Nervensystem (diabetische Neuropathie) betrifft. Darüber hinaus kann auch eine diabetes-assoziierte Makroangiopathie vorwiegend an Herz, Gehirn und peripheren Arterien resultieren [173].

In den letzten Jahrzehnten ist die Prävalenz des Diabetes mellitus kontinuierlich angestiegen. Einem Bericht von 2015 zufolge sind weltweit etwa 415 Millionen Menschen betroffen. Das bedeutet, dass 8,8 Prozent (%) der Weltbevölkerung und damit jeder Zehnte an dieser Stoffwechselerkrankung leidet. Entsprechend der Hochrechnung ist bis zum Jahre 2040 mit einem Anstieg der Diabetikerzahl auf etwa 642 Millionen zu rechnen, wobei die stärkste Zunahme in den Entwicklungsländern zu verzeichnen sein wird [74].

In der nachfolgenden Tabelle sind die vier Klassen des Diabetes mellitus nach pathogenetischen Mechanismen zusammengefasst.

I. Typ 1 Diabetes

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

A. Immunologisch vermittelt

B. Idiopathisch

II. Typ 2 Diabetes

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

III. Andere spezifische Diabetes-Typen

- A. Genetische Defekte der β -Zell-Funktion
- B. Genetische Defekte der Insulinwirkung
- C. Erkrankungen des exokrinen Pankreas
- D. Endokrinopathien
- E. medikamenten- oder chemikalieninduziert
- F. Infektionen
- G. seltene Formen des immunvermittelten Diabetes
- H. andere, gelegentlich mit Diabetes assoziierte genetische Syndrome

IV. Gestationsdiabetes

Tabelle 1.1: Klassifikation des Diabetes mellitus nach ADA, 1997, EK IV; Alberti et Zimmet, 1998b, EK IV

1.2 Das Pankreas

Das im Epigastrium befindliche sekundär retroperitoneale Pankreas ist ein Drüsenorgan, welches sich makroskopisch aus Caput, Corpus und Cauda zusammensetzt. Das Pankreas enthält funktionell exokrine und endokrine Eigenschaften. Den Hauptanteil macht das exokrine Drüsengewebe aus, welches täglich etwa 2 Liter an enzymreichen, alkalischen Verdauungssekret in das Duodenum entlässt. Die Gesamtheit aus den mehr als 1 Million Langerhans-Inseln stellen den endokrinen Anteil dar, der nur etwa 2 % der gesamten Organmasse ausmacht. Die Inseln, die in kleinen Gruppen zusammenliegen, sind im exokrinen Gewebe verstreut, wobei sie sich am dichtesten gesät im Schwanzteil befinden.

In den Langerhans-Inseln lassen sich vier Zelltypen unterscheiden. Etwa 70 % machen die insulinproduzierenden Beta (β)-Zellen aus. Einen Anteil von circa 20 % haben die glukagonproduzierenden Alpha (α)-Zellen, circa 5 % die somatostatinproduzierenden Delta (δ)-Zellen und weniger als 5 % sind pankreatisches Polypeptid (PP) sezernierende Zellen [106, S. 408 ff.].

1.2.1 Funktion der β -Zellen

Hauptaufgabe der β -Zellen ist die Produktion und Sezernierung von Insulin. Die Synthese des Insulins erfolgt am rauen endoplasmatischen Retikulum der β -Zellen, wobei zunächst ein einkettiges Vorläufermolekül (Präproinsulin) gebildet wird. Durch Abspaltung eines Signalpeptids entsteht das Proinsulin, welches anschließend im Lumen des endoplasmatischen Retikulums gefaltet wird. Die proteolytische Prozessierung überführt das Proinsulin in das reife Hormon Insulin. Dabei wird das sogenannte C-Peptid abgespalten. Bis zur Freisetzung werden reifes Insulin und C-Peptid gemeinsam in sekretorischen Granula gespeichert [13].

1.2.2 Glukose-stimulierte Insulinsekretion

Stimulierend für die Insulinsekretion wirken der Parasympathikus und einige Enteroenzyme (z.B. glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) und glucagon-like peptide (GLP-1) [106]. Der wichtigste Stimulus ist allerdings die Erhöhung der Blutglukosekonzentration. Das Glukosesensorenzym Glukokinase vermittelt eine sigmoidale Beziehung zwischen Glukoseanstieg und Insulinsekretion [11]. Ab einer Blutglukosekonzentration von 2-3 mmol/l beginnt die Insulinausschüttung. Diese ist bis zu einer Blutglukosekonzentration von 15 mmol/l ansteigend.

Da die Blutglukosekonzentration bei Gesunden nie unter 4 mmol/l fällt, besteht eine dauerhafte basale Insulinsekretion. Dies ist eine essenzielle Grundlage für die Versorgung der Gewebe mit Glukose.

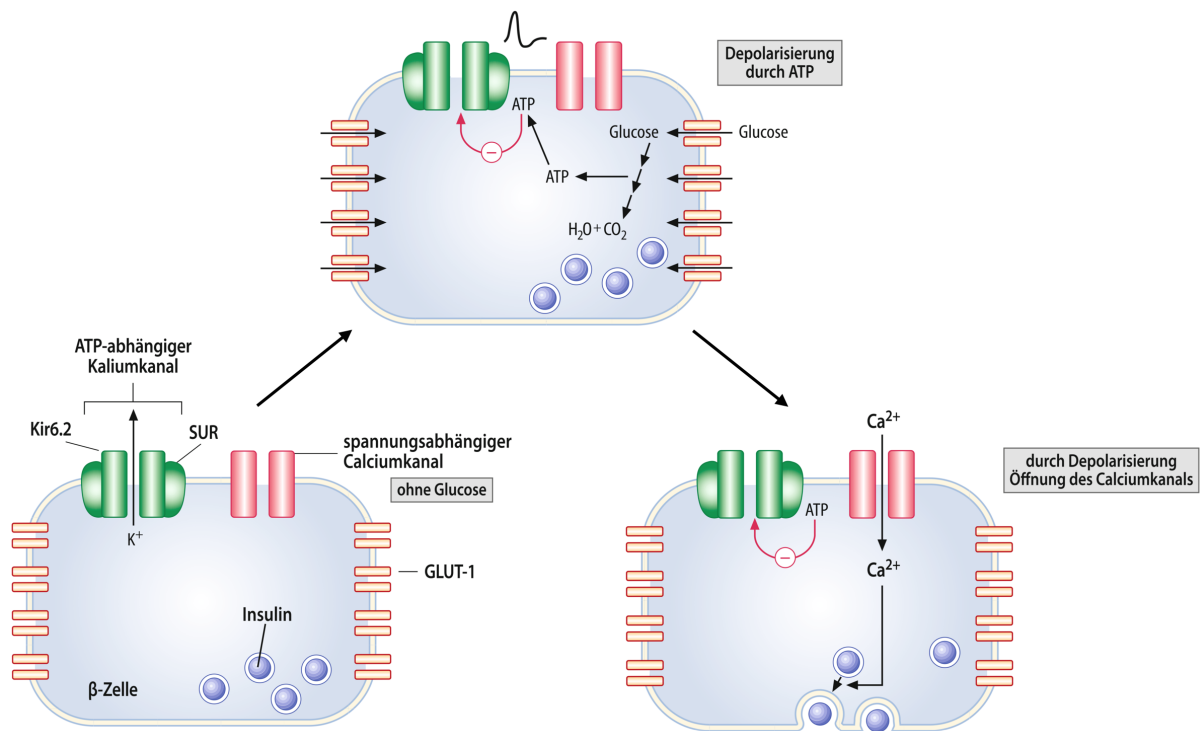


Abbildung 1.1: Mechanismus der glukose-stimulierten Insulinsekretion [67]

Die molekulare Grundlage für die Insulinsekretion ist Adenosintri-phosphat (ATP) als intrazelluläres Signal. In Abhängigkeit von der Konzentration wird Glukose von den β -Zellen aufgenommen und verstoffwechselt. Die Aufnahme von Glukose in die β -Zelle erfolgt über einen in der Zellmembran vorhandenen Glukosetransporter GLUT1 (Mensch) bzw. GLUT2 (Nagetiere). Dabei verhindert das Glukosesensorenzym Glukokinase den Rücktransport durch die Phosphorylierung zu Glukose-6-Phosphat, welches dann weiter zu Pyruvat verstoffwechselt wird. Anschlie-

ßend wird Pyruvat in die mitochondriale Matrix transportiert und zu Acetyl-CoA carboxyliert und in den Citratzyklus eingeschleust [158]. Die dabei entstehenden Reduktionsäquivalente werden in der mitochondrialen Atmungskette zur Gewinnung von ATP genutzt [144]. Das Resultat ist ein Anstieg des zellulären ATP/ADP-Verhältnisses.

Der Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) ist ein, in der Plasmamembran verankerter, ATP-sensitiver Kaliumkanal. Durch die Bindung von ATP an diesen Rezeptor kommt es zur Schließung des Kanals und zur Depolarisation der β -Zelle. Durch das kurzfristige Ionenmissverhältnis wird ein spannungsabhängiger Calciumkanal geöffnet. Die in das Zytosol einströmenden Calciumionen bewirken eine gesteigerte Exozytose der mit Insulin gefüllten Granula [67].

1.3 Mitochondrien

Mitochondrien sind essenzielle Zellorganellen, die von einer Doppelmembran umschlossen werden und in ihrer Funktion im Wesentlichen der ATP-Synthese dienen. Die Anzahl an Mitochondrien pro Zelle variiert deshalb je nach Energiebedarf. Es werden vier Reaktionsräume definiert. Die äußere und innere Mitochondrienmembran, der Intermembranraum und die mitochondriale Matrix. Die innere Mitochondrienmembran ist im Gegensatz zur äußeren Mitochondrienmembran durch Cristae charakterisiert, die zu einer Vergrößerung der Membranoberfläche führen. Der dazwischen liegende Intermembranraum steht durch Porine mit dem Zytoplasma in Verbindung. In der mitochondrialen Matrix laufen wichtige Reaktionen ab, wie zum Beispiel die β -Oxidation von Fettsäuren. Auch der Zitratzyklus und Teile der Harnstoff-, Steroidhormon- und Hämsynthese sind dort lokalisiert [67]. Mitochondrien sind zudem wichtig für die Calciumhomöostase [168]. In der inneren Mitochondrienmembran sind die vier Komplexe der Atmungskette sowie die ATP Synthase integriert [67].

Mitochondrien enthalten ein eigenes Genom. Die zirkuläre Desoxyribonukleinsäure (DNA), die 37 Gene umfasst, hat entwicklungs geschichtlich einen bakteriellen Ursprung. Während der größte Anteil der mitochondrialen Proteine durch Gene des Zellkerns codiert werden, verbleiben einige Proteine der Atmungskette und mitochondriale Transfer-Ribonukleinsäuren (tRNAs) auf dem mitochondrialen Genom [67, 8]. Wenn apoptotische Proteine, aus der Matrix und der inneren Membran des Mitochondriums, in die Zelle freigesetzt werden, kann der Zelltod dadurch eingeleitet werden. Außerdem werden verschiedene Erkrankungen mit der mitochondrialen Dysfunktion assoziiert, da die zelluläre Funktion den Grad der mitochondrialen Lebensfähigkeit widerspiegelt [129, 168].

1.4 Mitochondriale Dynamik

Mitochondrien existieren in lebenden Zellen als dynamisches Netzwerk, welches durch ständige Teilungs- und Fusionsprozesse aufrechterhalten wird. Diese Dynamik ist wichtig für viele zelluläre Funktionen wie Mitose, ATP-Produktion, Autophagie und Apoptose [171, 122, 12, 164, 94, 119]. Durch innere und äußere Membranfusion wird ermöglicht, dass Organelleninhalte wie Lösungen, Metabolite, Proteine und mitochondriale Desoxyribonukleinsäure (mtDNA) ausgetauscht werden [110, 109, 92, 91, 62, 171]. Dies erlaubt eine Anpassung an wechselnde Zellbedingungen, wobei die Häufigkeit der Fusions- und Teilungsprozesse variiert [15].

Der Umfang an mitochondrialen Morphologien (Größe, Form und Länge) ist sehr heterogen [45]. Von kleinen Kugeln oder kurzen Stäbchen bis hin zu langen Tubuli [15]. Diese morphologischen Möglichkeiten werden durch Verschmelzung und Teilung gesteuert. Außerdem werden Mitochondrien aktiv in der Zelle mittels Zytoskelett transportiert [29]. Sie werden beispielsweise zu Regionen mit erhöhtem Energieanspruch rekrutiert [45].

Der mitochondriale Lebenszyklus ist Bestandteil der mitochondrialen Dynamik [71]. Die mitochondrialen Proteine sind in der nukleären und mtDNA verschlüsselt und können posttranslational modifiziert, abgebaut, oxidiert oder anderweitig verändert werden. Diese Situation kann als „lokale Kontrolle“ beschrieben werden, welche sich durch Effekte von kleinsten Umgebungsänderungen ergibt und die individuelle mitochondriale Fusion und Teilung bewirkt. Daraus ergibt sich, dass die „lokale Kontrolle“ die Kapazität eines individuellen Mitochondriums bezüglich seiner Funktion der Energieproduktion, der Absonderung apoptotischer Stimuli oder die mtDNA-Vermehrung beeinflusst [171, 180].

Gegenüber der „lokale Kontrolle“ sind die „globale Kontrolle“ Mechanismen, die die „lokale Kontrolle“ entweder aufheben oder vereinnahmen können. Damit kann der dynamische Status der Mitochondrien in der ganzen Zelle modifiziert werden. Der Zellzyklus ist dabei ein wesentliches Beispiel für die „globale Kontrolle“. Eine Schlüsselphase des Zellzyklus ist G1-S, die durch nukleäre Transkriptionsfaktoren kontrolliert wird [116, 155]. Die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren führt zur Erhöhung der mitochondrialen Anhäufung, der respiratorischen Kapazität und Energieproduktion, die während der Synthese-Phase (S-Phase) der Zellteilung benötigt wird [155].

Es wurde herausgefunden, dass der mitochondriale Netzwerkzusammenschluss in der G1-S-Phase auftritt und für den Fortschritt in die S-Phase benötigt wird [116]. Zusätzlich beginnt auch eine Hyperfragmentation des mitochondrialen Netzwerkes in der S-Phase [169]. Schließlich werden in der Mitose-Phase (M-Phase) fragmentierte Mitochondrien zu den gegenüberliegenden Enden von Tochtermitochondrien dezentralisiert, um gemeinsame Bewegung und Verteilung zwischen den Tochterzellen zu gewährleisten. Mitochondrien können allerdings auch vom dynamischen Lebenszyklus gelöst und durch Autophagosomen abgebaut werden [171, 80, 124].

Eine Darstellung dieses Prozesses sowie die Rolle der globalen und lokalen Kontrolle wird in Abbildung 1.2 gezeigt.

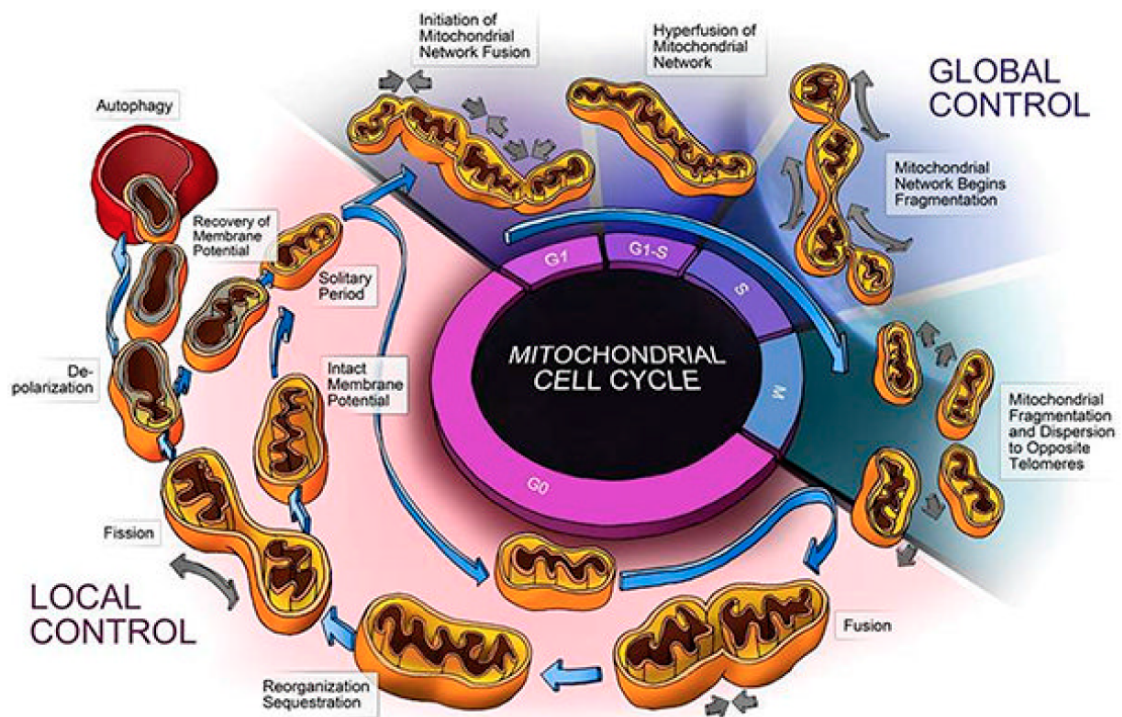


Abbildung 1.2: mitochondrialer Lebenszyklus [71]

Eine Dysfunktion der mitochondrialen Dynamik kann die Alterung zur Folge haben und eine Reihe von Krankheiten bedingen [95, 156], einschließlich neurodegenerative [83, 112, 147, 177], kardiovaskuläre Erkrankungen [69] und Krebserkrankungen [118, 64]. Neuste Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass eine mitochondriale Dysfunktion zur Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 beitragen kann [152].

1.4.1 Mitochondrialer Fusionsprozess

Die mitochondriale Fusion ist essenziell, um eine homogene Organellenpopulation aufrecht zu erhalten und die Bildung von mtDNA sowie den Austausch von Metaboliten zu gewährleisten. Die mitochondriale Fusion ist ein zweistufiger Prozess, bei dem sich zuerst die äußere und dann die innere Mitochondrienmembran separat voneinander vereinigt. In Säugerzellen wird die äußere Mitochondrienmembranverschmelzung durch zwei große Guanosintriphosphasen (GTPasen), Mitofusin 1 (Mfn1) und Mitofusin 2 (Mfn2), kontrolliert. Die Membranverschmelzung der inneren Mitochondrienmembran wird durch optic atrophy 1 (OPA1) kontrolliert. Allerdings ist nicht bekannt, wie dieser Fusionsprozess aktiviert wird und wie mitochondrialer Inhalt, die zeitliche Verteilung und Aufteilung koordiniert werden [129].

Eine Studie der Arbeitsgruppe Chen et al. zeigte, dass eine gestörte Funktion von Mfn1 oder Mfn2 zu einer Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes, mit Bildung von kurzen Stäben und Kugeln, führt [32]. Da die Mitofusine in den verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert werden, haben sie somit eine unterschiedliche Fusionsaktivität [154]. Mfn2 ist überall dort präsent, wo Mfn1 abwesend ist. Mfn2 wird spezifischer reguliert und durch andere Zellkomponenten und Prozesse moduliert, die keine Mfn1 Interaktion benötigen [95]. Mäuse, denen entweder Mfn1 oder Mfn2 fehlt, versterben bereits in der Schwangerschaft. Es konnte in den embryonalen Stammzellen dieser Mäuse mit Mitofusinmangel keine Fusionsaktivität nachgewiesen werden [32, 31, 128].

Veränderungen der mitochondrialen Morphologie und Funktion werden mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert. Es ist bekannt, dass eine Mutation von Mfn2 beim Menschen die neurodegenerative Erkrankung Charcot-Marie-Tooth Type 2A verursacht [190].

Mfn1 und Mfn2 sind homolog und besitzen ähnliche räumliche Strukturen [32, 154, 91]. Da sie zu 63 % identisch sind [154], können sie sich durch ihre gleichen biochemischen Aktivitäten funktionell ersetzen [32, 26]. Die Mitofusine sind Außenmembranproteine, die die Lipiddoppelmembran des Mitochondriums mit ihrer Transmembrandomäne U-förmig durchspannen. Somit verbleiben sowohl die C-terminale Domäne als auch die N-terminale GTPase Domäne im Zytosol (siehe Abbildung 1.3a) [154]. Der vom Membranpotential und Guanosintriphosphat (GTP) abhängige Fusionsmechanismus [113] ist über die Heptad Repeat 2 (HR2)-Region vermittelt. Mfn1 und Mfn2 können homo- oder heterooligomerische Proteinkomplexe bilden. Dadurch wird eine Interaktion mit dimeren, antiparallelen HR2-Domänen, welche sich zwischen zwei benachbarten Mitochondrien befinden, eingegangen (Abbildung 1.3b). Diese hetero- und homotypischen Dimere bewirken vorrangig die Fusion von Mitochondrien [85].

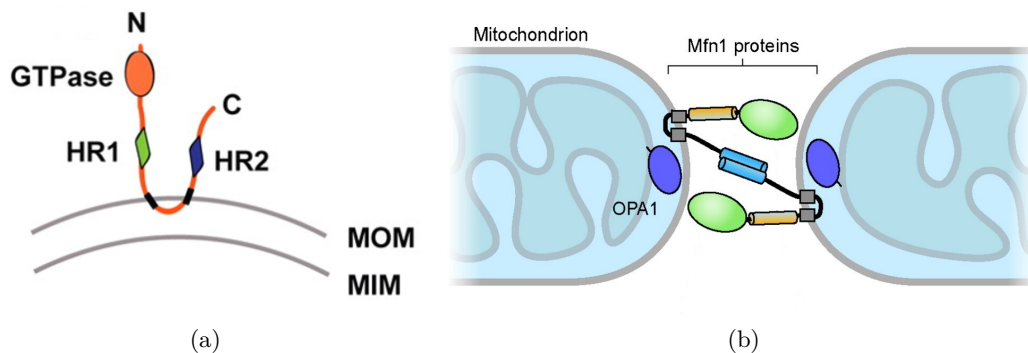


Abbildung 1.3: Mitochondrialer Fusionsprozess

- a) Proteinaufbau von Mitofusinen, modifiziert nach Cohen et al. [39], MOM = mitochondriale Außenmembran, MIM = mitochondriale Innenmembran
- b) Komplexbildung zwischen zwei Mfn1 Proteinen zweier benachbarter Mitochondrien über die HR2-Region [26]

OPA1 ist ein dynamin-ähnliches Protein, das sich in der inneren Mitochondrienmembran befindet und für die Aufrechterhaltung der Cristae Morphologie sowie für die innere Membranverschmelzung verantwortlich ist [37, 128]. Es folgt einem gewebespezifischen Verteilungsmuster und wird im gesamten Pankreas am höchsten exprimiert [43]. OPA1 kann in löslicher Form vorliegen, oder fest an die innere Membran verankert sein [43]. Es besteht aus acht Isoformen und der Morphologiezustand ist abhängig von der Balance der long und short Isoformen. OPA1 enthält eine NH₂-terminale mitochondriale Import Sequenz (MIS) [95]. Nach MIS folgt eine Transmembrandomäne, die OPA1 in der mitochondrialen Membran verankert. Anschließend folgt eine prolinreiche Region, die für die Protein-Protein-Interaktion verantwortlich ist. Die nachfolgende Domäne ist die „Splice Region“, bei der wahrscheinlich durch alternatives Spleißen die verschiedenen Isoformen entstehen. Nach der GTPase- und Mitteldomäne folgt eine GTPase Effektor Domäne [95], welche an der Oligomerisation und der Aktivierung von Dynamin beteiligt ist [143]. Die Regulation der OPA1 Spaltung durch verschiedene Proteasen ist stark abhängig von dem Zugang zu verarbeitende Stellen und zelluläre Stresstimuli [129]. Die Inaktivierung der GTPase Domäne führt zu vermehrter Fragmentierung der Mitochondrien [31]. Eine verminderte Expression von OPA1 in den β -Zellen führt zu Störungen der Stimulus-Sekretions-Kopplung [37]. Des Weiteren führt ein Fehlen von OPA1 zu einem verminderten Membranpotential, gestörter Enzymaktivität der Atmungskettenkomplexe, fragmentierten Mitochondrien und gesteigerter Apoptose [37, 55, 65, 128]. Mutationen in OPA1 verursachen beim Menschen eine dominante optische Atrophie [43].

1.4.2 Mitochondrialer Teilungsprozess

Die Balance zwischen mitochondrialer Teilung und Fusion ist Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit von Mitochondrien und daraus folgend auch essenziell für die Zellfunktion. Unkontrollierte Teilung führt zu heterogenen Organellenpopulationen mit nicht-uniformen mtDNA Vorkommen, einer veränderten Fähigkeit zur ATP-Produktion, einer erhöhten Kapazität für die Generation von reaktiven Sauerstoffspezies und einer erhöhten Empfänglichkeit der Zellaoptose [129]. Der Teilungsprozess wird vor allem benötigt, um gealterte oder beschädigte Mitochondrien durch Autophagie oder Mitophagie aus dem gesamten Netzwerk zu entfernen. Dies gewährleistet, dass defekte Mitochondrien klein genug sind, um in lytische Vesikel oder Autophagosomen verpackt und anschließend abgebaut und ihre Bestandteile wiederverwertet zu werden [129].

Eine zentrale Rolle im Teilungsprozess besitzt das dynamin-related protein 1 (Drp1) [87]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit fehlendem Drp1 bereits in einem frühen embryonalen Stadium versterben [77, 175]. Beim Menschen verursachen Mutationen im Drp1 erbliche Neuropathien [23, 137]. Der pathophysiologische Mechanismus dieser Erkrankungen liegt vermutlich ein abnormaler Transport und Fehlverteilung von Mitochondrien zugrunde, die zu einer distal betonten axonalen Degeneration führen [115].

Drp1 ist eine dynamin-ähnliche GTPase, die vorwiegend im Zytosol der Zelle lokalisiert, aber auch an der mitochondrialen Oberfläche zu finden ist [165]. Es enthält vier Domänen: 1) eine N-terminale GTPase Domäne, welche die enzymatische Aktivität beinhaltet, 2) eine mittlere Domäne, die wichtig ist für die Oligomerization, 3) eine alternativ-gespleißte, variable Domäne, die posttranslationale Modifikationen enthält und 4) eine C-terminale GTPase Effektor Domäne, die mit der GTPase Domäne interagiert.

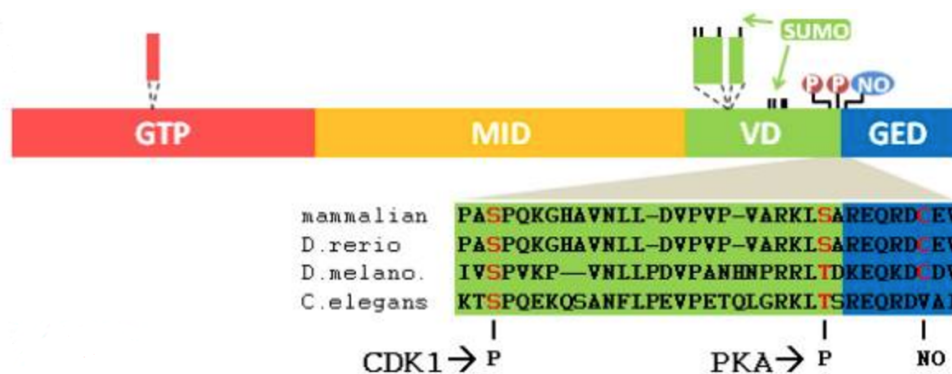


Abbildung 1.4: Struktur von Drp1. Basierend auf der Sequenzähnlichkeit zu Dynamin, kann die codierende Drp1-Sequenz in vier Domänen unterteilt werden: GTP = GTPase Domäne, MID = mittlere Domäne, VD = variable Domäne, GED = GTPase Effektor Domäne [181].

Das Protein Drp1 bindet an der äußeren Mitochondrienmembran als multimerische spiralarartige Struktur, um dort eine Einschnürung der Doppelmembran und damit die Teilung durch GTPase Aktivität zu ermöglichen [18, 73, 95]. Die funktionalen Eigenschaften von Drp1 werden durch eine Reihe von posttranslationalen Modifikationen moduliert, einschließlich Phosphorylierung [28, 24, 40], Sumoylierung [53], Ubiquitinierung [123], S-Nitrosylierung [35] und O-GlcNAc-Glykosylierung (N-Acetylglucosamin) [59]. Durch diese Modifikationen wird die Drp1-Lokalisation und Aktivität verändert. Die ausgelösten Effekte sind unter anderem vermehrte mitochondriale Fragmentierung und Teilung, Förderung der Rekrutierung von Drp1, Bindungsfestigkeit und der proteasom-abhängige Abbau von Drp1 [49].

Die aktuelle Literatur zeigt, dass es noch viele Unklarheiten bei dem Teilungsprozess von Mitochondrien gibt. Gegenstand derzeitiger Forschung ist es, den Teilungsvorgänge und den Einfluss von Drp1 besser zu verstehen. Laut aktueller Studien gibt es vier Proteine auf der mitochondrialen Außenmembran, die als Drp1 Rezeptor fungieren können: mitochondrial fission protein 1 (Fis1), mitochondrial fission factor (Mff), mitochondrial dynamics protein of 49 kDa (MiD49) und mitochondrial dynamics protein of 51 kDa (MiD51) [135].

Neuere Daten [132] zeigen, dass die Rekrutierung von Drp1 und damit die mitochondriale Teilung durch Mff ausgeübt wird. Diese Prozesse scheinen die Anwesenheit von Fis1 nicht zu benötigen [132]. Eine frühere Studie [90] zeigte, dass Fis1 nicht hauptverantwortlich für die Rekrutierung von Drp1 ist. Die Herabsetzung von Fis1 im Säugerzellen-System führte nicht zur Hemmung der Rekrutierung von Drp1 zur mitochondrialen Oberfläche [90]. Zwei neue Drp1-abhängige Teilungsproteine, die als Negativregulatoren wirken, wurden identifiziert: Mitochondrialer Elongationsfaktor 1 (MIEF1)/MiD51 und Mitochondrialer Elongationsfaktor 2 (MIEF2)/MiD49 [188]. Diese sind in der Lage, Drp1 an die mitochondriale Außenmembran zu rekrutieren, aber anstatt die Teilung zu fördern, binden und inhibieren sie Drp1 [188, 135]. In einer sich gegenseitig ausschließenden Weise kann MIEF1/MiD51 entweder einen Komplex mit Drp1 oder Fis1 bilden [135, 188].

Die Abbildung 1.5 illustriert mögliche Wirkweisen der vier Drp1 Rezeptoren. Das klassische Modell zeigt Fis1 als mitochondrialen Rezeptor für Drp1 und fördert die Teilung von Mitochondrien. Das erweiterte Modell stellt dar, dass Fis1, Mff und/oder MiD51/MiD49 das Drp1 an die mitochondriale Membran rekrutieren. Der Mff-Drp1 Komplex fördert die mitochondriale Teilung. Bei Bindung von MiD51/MiD49 an Drp1 wird dabei die Drp1-Funktion inhibiert und die Verschmelzung unabhängig von Mfn2 gefördert. Außerdem kann MiD51 einen Komplex mit Fis1 bilden, wodurch der inhibierende Effekt von MiD51 auf Drp1 reduziert ist und damit die mitochondriale Teilung indirekt durch Fis1 gefördert wird [46].

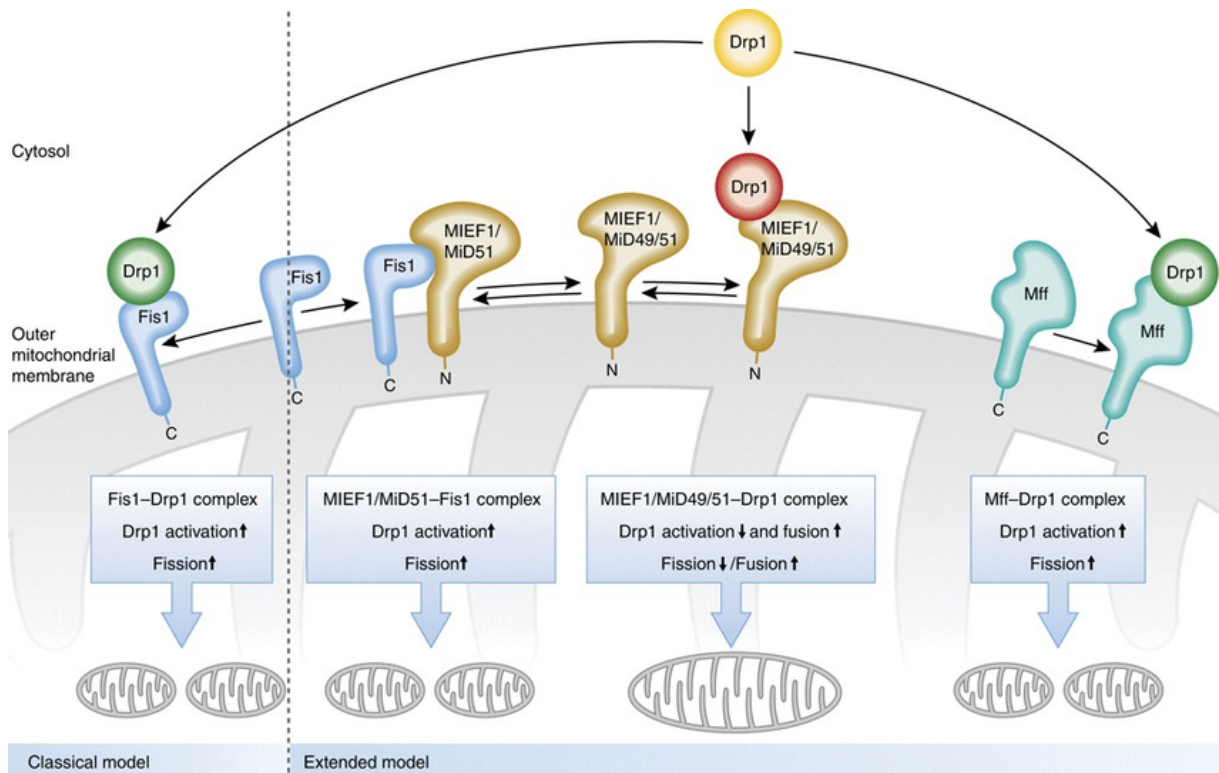


Abbildung 1.5: Modell für mitochondriale Teilung. Drp1 grün = aktiv, Drp1 rot = inhibiert [46].

1.5 Struktur und Funktion von MiD51

MiD51 ist unabhängig identifiziert als MIEF1 [185, 99]. MiD51 wird vom SMCR7L Gen codiert und enthält 463 Aminosäurereste mit einer N-terminalen Transmembran Domäne. Es ist mit seiner C-terminalen Region in der äußeren Membran des Mitochondriums verankert und dem Zytoplasma zugewandt. Die Expression von MIEF1 messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) wurde in folgenden menschlichen Geweben bestätigt: Herz, Skelettmuskel, Pankreas und Nieren [188]. Das Protein reguliert die mitochondriale Teilung, indem es mit Drp1 interagiert und dieses rekrutiert [134]. Paradoxe Weise zeigt die Hochregulation von MiD51 dabei aber eine Inhibition der Aktivität von Drp1, was sich in Mitochondrienelongation darstellt [135, 188, 134]. Strukturelle Analysen zeigen, dass MiD51 eine veränderliche NTase (Nucleotidyltransferase) Domäne enthält, die wahrscheinlich enzymatisch inaktiv ist. Die dimere Struktur scheint gut geeignet, um ein basales Stadium von Drp1 zu rekrutieren [101]. NTase Proteine katalysieren typischerweise die Polymerisation von Nucleinsäuren der Triphosphatnucleotide, was für MiD51 nicht gezeigt werden konnte [100]. Stattdessen bindet es stabil mit Adenosindiphosphat (ADP). Obwohl ADP MiD51 stabilisiert, induziert es keine Konformationsänderung. Auch die Bindung und Rekrutierung von Drp1 zeigt keinen Zusammenhang mit der ADP Bindung [100]. Allerdings ist die

mitochondriale Teilungsaktivität abhängig von Dimerisation, die durch ADP Bindung verbessert wird und zur Oligomerisation von Drp1 nötig ist. Außerdem verhilft die ADP Bindung bei der GTPase Aktivität von Drp1, indem es die Hydrolyse fördert. Obwohl also MiD51 auch ohne ADP Bindung Drp1 rekrutieren kann, ist es ohne ADP unmöglich, eine mitochondriale Teilung zu bewirken [100]. Allerdings ist der Prozess noch nicht eindeutig aufgeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

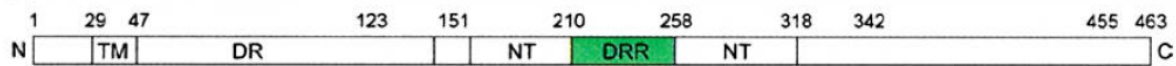


Abbildung 1.6: Proteinstruktur. TMD: Transmembrandomäne, DR: ungeordnete Region, NT: Nucleotidyltransferase Domäne, DRR: Drp1 Beschaffungsregion [149]

Der Zusammenhang einer mitochondrialen Dysfunktion und einer verminderten Sekretionsleistung in β -Zellen konnte bereits in vorangegangenen Studien gezeigt werden. So führte eine verminderte Expression von Fis1 zu einer vermehrten Elongation von Mitochondrien die mit einer verminderten Glukose-stimulierten Insulinsekretion (GSIS) einhergeht. In primären Maus Inselzellen zeigten die Überexpression von Fis1 eine reduzierte GSIS und eine verstärkte mitochondriale Clusterbildung [159]. In einer weiteren Studie an INS1 Zellen wurde die mitochondriale Dynamik nach Herunterregulation von Drp1 untersucht. Hierbei zeigte sich, dass eine verminderte Drp1 Expression ebenfalls zu stark elongierten Mitochondrien führt. Zusätzlich konnte sowohl in INS1 Zellen als auch in Maus Inselzellen eine verstärkte Bildung von Loop Strukturen der Mitochondrien gezeigt werden. Zusätzlich ist auch die Glukose-stimulierte Insulinsekretion von der Drp1 Expression abhängig [148]. Mittlerweile sind noch weitere mitochondriale Adapterproteine beschrieben worden, die Drp1 aus dem Cytosol an die mitochondriale Membran rekrutieren und die Teilung von Mitochondrien einleiten können. Dazu gehören vor allem die mitochondrialen Elongationsfaktoren 49, 51 (MiD49, 51), die eine wesentliche Rolle in der mitochondrialen Dynamik spielen. Bislang ist jedoch nicht untersucht, ob MiD51 in β -Zellen exprimiert wird.

1.6 Zielstellung der Arbeit

Eine regulierte Insulinfreisetzung aus den β -Zellen des Pankreas ist für das physiologische Blutglukosegleichgewicht essenziell. Hierbei spielt die mitochondriale Dynamik eine besondere Rolle. Koordinierte Fusions- und Teilungsprozesse sind für die Aufrechterhaltung der Mitochondrienfunktion entscheidend.

MiD51 wird als wichtiger Drp1 Rezeptor im mitochondrialen Teilungsprozess angesehen. Welche Funktion MiD51 in β -Zellen des Pankreas spielt ist bisher nicht untersucht worden. Eine Dysfunktion der mitochondrialen Teilung beeinflusst die Glukose-stimulierte Insulinsekretion und begünstigt die Entstehung des Typ 2 Diabetes mellitus. Die molekularen Mechanismen und Schlüsselfaktoren sind hierbei bislang wenig verstanden. Daher waren die Ziele dieser Studie:

1. die fluoreszenzmikroskopische Analyse des mitochondrialen Netzwerkes nach Überexpression von MiD51 in Maus-Insulinoma-Zelllinie (MIN6)-Zellen und primären Maus Inselzellen
2. die Analyse der mitochondrialen Aktivität in Form des mitochondrialen Membranpotentials nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen
3. die Analyse der Glukose-stimulierten Insulinsekretion in MIN6-Zellen und primären Maus Inselzellen nach Überexpression von MiD51

2 Material

2.1 Zellen

Bezeichnung	Spezies	Gewebeherkunft
Zelllinie		
MIN6	Maus	Insulinom
Primäre Zellen		
Inselzellen	Maus	Pankreas

Tabelle 2.1: Zellen

2.2 Zellkultur-Medien

Medium	Komponenten	Konzentration	Firma
DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium)	Glukose	4,5 g/l	Sigma-Aldrich
	Natriumpyruvate und L-Glutamin	0,1 g/l	Chemie GmbH
	hitzeinaktiviertes FCS	2 mM	Gibco
	Penicillin/Streptomycin	10 %	Gibco
		1 %	PAA
RPMI 1640	Hepes	10 mM	GE Healthcare
	Natriumpyruvat	1 mM	Chemie GmbH
	L-Glutamine	2 mM	Gibco
	2-Mercaptoethanol	50 μ M	Sigma-Aldrich
	hitzeinaktiviertes FCS	10 %	Gibco
	Penicillin/Streptomycin	1 %	PAA

Tabelle 2.2: Kulturmedien

2.3 Inselisolation

Lösungen	Komponenten	Konzentration
Krebs-Ringer-Stammlösung (Die Lösung wurde mit Aqua dest. äquibriert und mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.)	NaCl	7,21 g/l
	KCl	0,35 g/l
	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$	0,163 g/l
	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,296 g/l
	NaHCO_3	1,68 g/l
	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,38 g/l
	HEPES $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	2,4 g/l
BSA Stocklösung	BSA in Krebs-Ringer	10 %
Glukose Stocklösung	Glukose	140 mM
Ficoll [®] Lösung Type 400	Stammlösung verdünnt in PBS	25 %
Collagenase-P von Roche	verdünnt in Krebs-Ringer und 0,5 % BSA	2 mg/ml

Tabelle 2.3: Reagenzien für Inselisolation

2.4 Vektoren

Vektoren	Hersteller
pcDNA 3.1 (+)	Addgene, Teddington, United Kingdom
pcDNA 3.1 (-) MiD51 4xMyc Hisx6	Addgene, Teddington, United Kingdom

Tabelle 2.4: Vektoren

2.5 Transfektionsreagenz

Reagenzien	Hersteller
Effectene [®] Transfection Reagent	Qiagen, Venlo, Niederlande

Tabelle 2.5: Reagenz

2.6 Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller
Primärantikörper		
SMCR7L/MiD51	Kanninchen	ProteinTech Manchester, United Kingdom
GAPDH (A-3)	Maus	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, Deutschland
c-Myc-Antikörper (sc-40)	Maus	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper		
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor [®] 488)	Ziege	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Insulin-ELISA Antikörper		
monoklonaler Insulin Antikörper (3A6)	Maus	Abcam, Cambridge, United Kingdom
monoklonaler Insulin Antikörper (8E2) HRP	Maus	Abcam, Cambridge, United Kingdom

Tabelle 2.6: Antikörper

2.7 TaqMan[®]-Sonden

Gen/Sonde	Spezies	Hersteller
GAPDH	Maus	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
MiD51	Maus	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Tabelle 2.7: Sonden

2.8 Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoffe	Hersteller
Eindeckmedium - Roti [®] -Mount FluorCare DAPI MitoTracker [®] Green FM	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MitoTracker [®] Deep Red	Molecular Probes [®] Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
TMRE	Molecular Probes [®] Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2.8: Farbstoffe

2.9 Molekulargewichtsmarker

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

Tabelle 2.9: Molekulargewichtsmarker

2.10 Enzyme

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

Tabelle 2.10: Enzyme

2.11 Kits

Bezeichnung	Hersteller
ATPlite™	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA
RNeasy Mini Kit®	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Venlo, Niederlande
Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR	Fermentas (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA
Mouse High Range Insulin Elisa	Alpco, Salem, NH, USA
TaqMan universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, California, USA

Tabelle 2.11: Kits

2.12 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ratiphorese Gel 30	
Ammoniumpersulfat ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
2-β-Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Bromphenolblau (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
BSA	PAA, Cölbe, Deutschland
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ x 2 H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Dimethylsulfoxid, DMSO (C ₂ H ₆ OS)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Dithiothreitol, DTT (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Ethanol, >99 % (C ₂ H ₆ O)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe, Deutschland
Glukose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Calbiochem (Merck), Darmstadt, Dtl.
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES, 1 M (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	PAA, Cölbe, Deutschland
Isopropanol (2-Propanol, C ₃ H ₈ O)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Natriumazid (NaN_3)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Meck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Natrium Desoxycholsäure ($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Natriumdodecylsulfat, SDS ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat ($\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$)	PAA, Cölbe, Deutschland
NP-40	Calbiochem (Merck), Darmstadt, Deutschland
O-Dianisidin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe, Deutschland
Puromycin	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Recombinantes humanes Insulin	GIBCO® (Invitrogen), Darmstadt, Dtl.
Roti Block	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Quant (Bradford-Reagenz)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	J.T. Baker, Deventer, Netherlands
Schwefelsäure (H_2SO_4)	J.T. Baker, Deventer, Netherlands
Tetramethylethyldiamin, TEMED, 99 % ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TMB Chromogen Tris ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100 ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Trypanblau ($\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{S}_4$)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Trypsin-EDTA	PAA, Cölbe, Deutschland
Tween® 20 ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasser, Nuklease-frei	Fermantas (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 2.12: Chemikalien

2.13 Verwendete Lösungen und Puffer

Lösungen/Puffer	Komponenten	Konzentration
RIPA-Lysepuffer (Radioimmunoprecipitation assay buffer)	Tris HCl pH 8	50 mM
	NaCl	150 mM
	NP-40	1 %
	Natrium Desoxycholsäure	0,5 %
	SDS	0,1 %
SDS-PAGE Trenngel 15 %	AA/Bis AA	30 % / 0,8 %
	Tris/HCl pH 8,8/8,9	1 M
	SDS	10 %
	APS	10 %
	TEMED	9,9 mM
SDS-PAGE Trenngel 5 %	AA/Bis AA	30 % / 0,8 %
	Tris/HCl pH 6,8	1 M
	SDS	10 %
	APS	10 %
	TEMED	4,6 mM
10 x SDS Laufpuffer	Tris Base	0,25 M
	SDS	1 % w/v
	Glycin	1,92 M
5 x SDS Probenpuffer	Tris/HCl pH 6,8	312,5 mM
	SDS	10 % w/v
	DTT	325 mM
	Bromphenolblau	0,04 g
	Glycerin	50 %
Anodenpuffer I	Tris	0,3 M
	Natriumazid	0,01 % w/v
	Methanol	20 % v/v
Anodenpuffer II	Tris	0,25 M
	Natriumazid	0,01 % w/v
	Methanol	20 % v/v
Kathodenpuffer	SDS	0,01 % w/v
	Natriumazid	
	Methanol	
Waschpuffer PBS	Tween 20	0,1 % v/v
	pH 7,2	

Lösungen/Puffer	Komponenten	Konzentration
Odyssey Blocking Puffer		
UltraPure™ TBE	Tris	1 M
	Borsäure	0,9 M
	EDTA	0,01 M

Tabelle 2.13: Puffer und Lösungen

2.14 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Einwegpipetten, steril	Greiner Bio-One, Essen, Deutschland
ELISA-Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One, Essen, Deutschland
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikrotiterplatte für Fluoreszenz (ATP/ADP Ratio)	Greiner Bio-One, Essen, Deutschland
Objektträger	Superior Marienfeld Laboratory Glass- ware
Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
PCR-Gefäße und PCR-Platten	NerbePlus, Winsen/Luhe, Deutschland
PVDF Transfer Membran	Millipore, Schwalbach am Taunus, Deutsch- land
Ratiolabo® Blottingpapier	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Reagiergefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
x-well-Zellkulturkammer	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zählkammer „Neubauer Improved“	Karl Hecht GmbH, Sondheim, Deutschland
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
6-well Kulturplatte	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterican Kanülen Gr.18	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Pipetten (1-1000 µ l)	Gilson International, Limburg, Deutschland
Omnican 100 Spritzen	B.Braun, Melsungen, Deutschland

Tabelle 2.14: Verbrauchsmaterialien

2.15 Geräte

Gerät	Hersteller
Aesculap anatomische Pinzette	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Aesculap große Mikropräparierschere (gebogen)	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Aesculap chirurgische Pinzette	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Aesculap chirurgische Schere	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Aesculap mikrochirurgische Pinzette	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Aesculap Mikrofederschere (gerade)	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Aesculap Mikroknüpfpinzette	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Aesculap Mosquito-Klemme (gebogen)	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Aesculap Mosquito-Klemme (gerade)	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Aesculap Bulldog-Klemme, gerade 16 mm	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Aesculap Bulldog-Klemme, gebogen 14 mm	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Brutschrank Heraeus 6000	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland (Dtl.)
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Instruments, Hanau, Dtl.
Elektrophorese Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
FluoView FV 10i	Olympus, Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop Olympus CW2	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Luminometer Victor3 1420	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim, Dtl.
Laborwaage Laboratory LC 620 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer	Omnilab, Bremen, Deutschland
Odyseeey Infrared Imager	LI-COR, Bad Homburg, Deutschland
Olympus CK2	Olympus, Hamburg, Deutschland
Operationsmikroskop	Zeiss, Göttingen, Deutschland
PCR-Cycler	SensoQuest, Göttingen, Deutschland

Gerät	Hersteller
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
pH-Meter Ultra Basic	Denver Instrument, NY, USA
Real-Time PCR System 7900HT	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
Rollerpumpe	Ismatec, Wertheim, Deutschland
Thermoblock	Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Schüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
SDS-PAGE Apparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Spannungsgerät Gene Pulser	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Spectrophotometer NanoDrop 2000	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Spektralphotometer Ultrospec 2100	Amersham Biosciences, Freiburg, Dtl.
Stereomikroskop	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Trans-Blot [®] Semi-Dry, Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Ultraschallbad Sonoplus	Bandelin Electronic GmbH, Berlin, Deutschland
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach, Dtl.
Waage Sartorius	Omnilab, Bremen, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Wasserbad Julabo 13	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Mikro 20	Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 2.15: Geräte

3 Methoden

3.1 MIN6-Zellen

Bei der verwendeten Zelllinie handelt es sich um Insulinoma Zellen, abgeleitet von transgenen Mäusen, die in den Pankreaszellen das große T-Antigen von silian vacuolating virus 40 (SV40) exprimieren. Transgene Mäuse tragen ein Ratten Elastase I 5' Fusionsgen, welches die DNA-Sequenz flankiert, die zu dem früh-codierten (T-Antigen) Bereich des SV40 Genoms fusioniert (ELSV Mäuse). Dadurch entwickeln sich Karzinome in den Azinuszellen des exokrinen Pankreas [14]. SV40 ist ein zirkuläres DNA Virus von der Herkunft des Rhesusaffen und gliedert sich in die Gruppe der Polyomaviren. Es ist eines der am häufigsten erforschten viralen Systeme, welches eukaryonte Zellen infiziert und das Potential hat, Tumoren zu induzieren [163].

3.1.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung der MIN6 Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C, in einer Atmosphäre mit 60 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂.

Nach lichtmikroskopischer Kontrolle erfolgte die Passagierung der Zellen mit frischem Medium bei einer Zelldichte von circa 80-90 %. Dazu wurden sie mit Phosphate buffered saline = Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Im Anschluss wurden die Zellen mit Trypsin-Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA) abgelöst und für 5 Minuten bei 1.200 Rotationen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte die Resuspension des Zellpellets im vorgewärmten Medium. Für die Weiterkultivierung wurden die Zellen entsprechend der Dichteverhältnisse in neue Kulturflaschen gesplittet oder für weitere Versuchsreihen in die entsprechenden Kulturschalen ausgesät.

3.1.2 Zellzahlbestimmung und Zellvitalitätstest

Die Verwendung der Neubauer improved Zählkammer diente der Bestimmung der Zellzahl. Um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, wurden diese mit Trypanblau versetzt. Vitale Zellen sind in der Lage, den Farbstoff auszuschließen und erscheinen daher hell im mikroskopischen Bild. Dagegen nehmen tote Zellen diesen Farbstoff auf und unterscheiden sich mikroskopisch durch eine blaue Färbung. Für die Durchführung der Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension in einer Verdünnung von 1:2 mit Trypanblau-Lösung gemischt, circa 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und in die Neubauer Zählkammer überführt. Diese besteht aus 25 gleich großen Gruppenquadraten. Die Seiten jedes Eckquadrats sowie des Mittelquadrats sind

jeweils 1 mm lang. Die Fläche ist daher für Eck- und Mittelquadrat jeweils 1 mm^2 . Ein dreidimensionaler Raum wird durch Auflegen des Deckglases erzeugt und damit eine Kammertiefe von 0,1 mm gebildet.

Die Berechnung für die Zellzahl je μl ergibt sich aus folgender Formel:

Zellzahl/ μl = Mittelwert der gezählten Zellen pro Eckquadrat * Schichtdickenfaktor * Verdünnungsfaktor

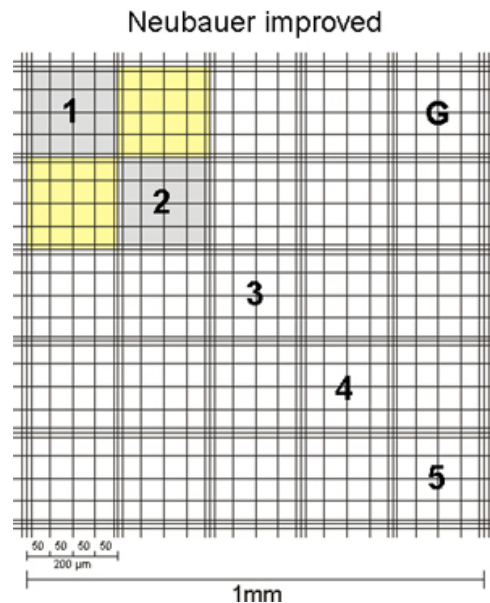


Abbildung 3.1: Neubauer improved Zählkammer [157]

3.2 Inselisolation

Um die Versuche an primären Inselzellen durchführen zu können, wurden Inseln von 3 Monate alten naval medical research Institute (NMRI) Mäusen isoliert. Mit Hilfe von Diethylether erfolgte die kurzzeitige Betäubung der Mäuse. Anschließend wurde zur Herbeiführung des Todes eine zervikale Dislokation durchgeführt. Nach Fixierung der Maus konnte die Eröffnung mittels kaudomedialen Abdominalschnitt umgesetzt werden. Für bessere Sichtverhältnisse und zur Darstellung der Papilla major des Ductus pancreaticus wurde die Leber unter die Rippen geschoben und das Duodenum hinter dem Magen nach lateral umgeklappt. Eine große Bulldog-Klemme wurde oberhalb der nun sichtbaren Papille gesetzt und der Ductus choledochus abgeklemmt. Mit Hilfe des Operationsmikroskops konnte eine Kanüle (0,3 * 12 mm) retrograd durch den Darm, über die Papille, in den Gang eingeführt werden. Die Kanüle wurde mit einer Pinzette umfasst. Anschließend erfolgte die Injektion mit 1-2 ml Krebs-Ringer-Lösung (mit 0,5 % Bovine Serum

Albumin (BSA)). Nach Lösen der Klemmen wurde das Pankreas zügig entnommen und in einer Petrischale mit einer spitzen Schere so klein wie möglich geschnitten. Anschließend erfolgte die Überführung der Pankreata mit einer Pipette in 50 ml Falcon-Gefäße mit Krebs-Ringer-Lösung. Durch Abzug der Krebs-Ringer-Lösung und erneuter Auffüllung konnten Fetttropfen entfernt werden. Bis zur Beendigung der Entnahme aller Pankreata wurden diese, mit etwa 5 ml Krebs-Ringer-Lösung mit 5 mM Glukose, im Kühlschrank gelagert. Zur enzymatischen Verdauung der Pankreata wurden sie mit Collagenase-Lösung in den Falcon-Gefäßen in einem Wasserbad mit 37 °C inkubiert. Nach 4 Minuten wurde der Ansatz alle 2 Minuten jeweils 30 Sekunden lang kräftigst geschüttelt. Das Terminieren des Verdaus erfolgte mit kaltem RPMI. Das anschließende Ruhen der Zellkulturmedien für 5-10 Minuten führte zum Absetzen der festen Bestandteile. Danach wurde das Medium mit einer Pipette bis circa 0,5 cm vor dem Sediment abgezogen. Das Sediment wurde resuspendiert und nachfolgend in ein Falcon-Gefäß überführt. Nach Zentrifugation für 2 Minuten bei 1000 rpm wurde der Überstand verworfen und anschließend das Pellet in Ficoll[®] resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Schichtung mit Ficoll-Lösung in verschiedenen Konzentrationen und abschließend die Zentrifugation für 10 Minuten bei 800 G ohne Bremse. Unter dem Stereomikroskop wurden dann die einzelnen Inseln herausgelesen und kultiviert.

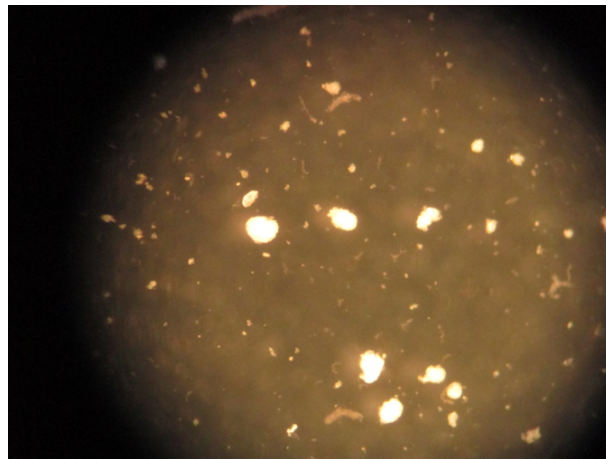


Abbildung 3.2: Mausinseln unter dem Stereomikroskop

3.2.1 Inselkultivierung

Die gewonnenen Inseln wurden anschließend unter Zellkulturbedingungen kultiviert. Um die Inselzellen aus den isolierten Inseln zu vereinzeln, wurden diese auf x-well Zellkulturkammern kultiviert. Eine spezielle Oberflächenbeschichtung ermöglicht nach einigen Tagen das Auswachsen einzelner Zellen aus dem Inselverband. Im Anschluss wurden verschiedene mikroskopische Analysen durchgeführt.

3.3 Transfektion

Durch eine Transfektion wird es möglich, fremde DNA oder DNA-Konstrukte in die Zelle einzuschleusen, um Gen-Expressionsprodukte zu erhalten [22].

Um MiD51 verstärkt in β -Zellen zu exprimieren wurde der Plasmid Cytomegalievirus Desoxyribonukleinsäure (pcDNA)3.1(-) Vektor der Firma Addgene verwendet (siehe Abb. 3.3). Die Kontrolle stellten mit dem Leervektor transfizierte Zellen dar.

Für die Transfektion einer 6-well Schale wurde folgender Ansatz verwendet:

Plasmid (DNA-Gehalt)	0,5 – 1 μ g
EC-Puffer	100 μ l
Enhancer	8 μ l

Tabelle 3.1: Transfektionsreagenzien

Nach 5-minütiger Inkubation wurden 20 μ l Effectene hinzugegeben, 10 Sekunden gevortext und für weitere 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in die 6-well Schalen gegeben und für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Effectene ist ein nicht-liposomales lipidhaltiges Reagenz, welches mit einem DNA kondensierenden Puffer verwendet wird. Die Effectene-DNA-Komplex-Bildung kann realisiert werden, indem die kondensierte DNA durch Effectene ummantelt wird und somit Micellen geformt werden. Diese uniforme Micellenbildung erleichtert die Fusion mit den Zielzellen [145].

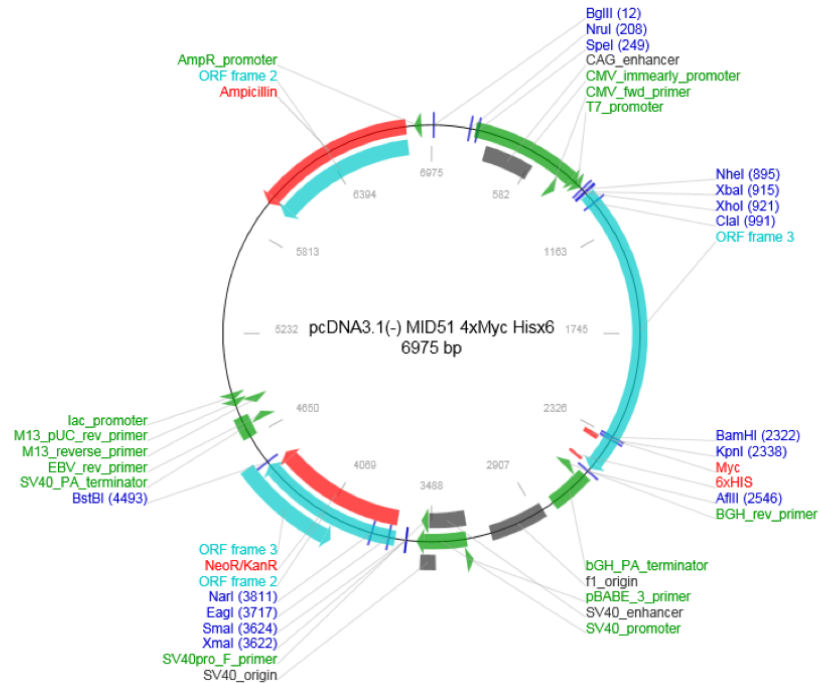


Abbildung 3.3: Vektorkarte pcDNA3.1(-) MiD51 4xMyc His6x [41]

3.4 Immunhistochemie

Mit Hilfe von speziellen Färbepinzipien ist es möglich, spezifische Proteine durch fluoreszenzgekoppelte Antikörper sichtbar zu machen. Dies wird durch eine Epitop-Antikörper-Bindung realisiert. Dieses Verfahren kann direkt oder indirekt sein (siehe Abb. 3.4). Durch die Kopplung mit einem Detektionssystem wird das Vorhandensein der verwendeten Antikörper angezeigt. An den sekundären Antikörpern befindet sich ein gebundenes Fluorochrom. Dieses kann, nach Anregung durch reine Lichtemission, die eine bestimmte Wellenlänge besitzt, nachgewiesen werden. Somit ist die quantitative Detektion der zu untersuchenden Proteine möglich.

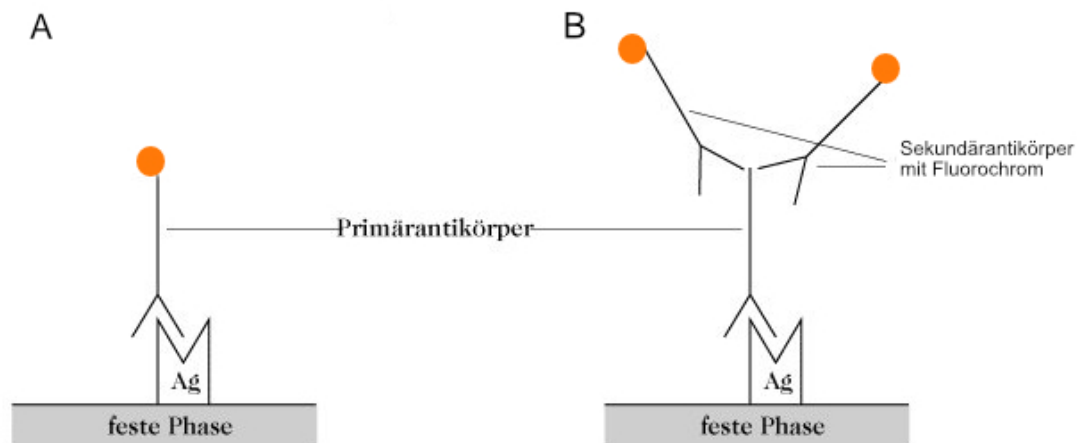


Abbildung 3.4: Prinzip der A) direkten B) indirekten Immunfluoreszenz
(modifiziert nach: [3])

3.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Kultivierung der Zellen für Immunfluoreszenz-Analysen erfolgte, in einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ pro well, auf Deckgläschen. Nach Entfernung des Zellkulturmediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 %igem Formalin fixiert. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und nachfolgend mit 0,2 % Triton X-100 für 5 Minuten permeabilisiert.

Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird zuerst ein spezifischer Primärantikörper (siehe Tabelle 2.6) auf die Zellen gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Primärantikörper (1:100 mit PBS verdünnt) bindet dabei an das Epitop des zu detektierenden Proteins. In einem anschließenden Waschschriff mit PBS wurden ungebundene Antikörper entfernt. Nun erfolgt die Zugabe des artenspezifischen Sekundärantikörpers (1:250 mit PBS verdünnt). Dieser ist mit einem Fluorochrom gekoppelt, weshalb die 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln erfolgte. Zur Darstellung des Zellkerns wurde 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet, welches an AT-reiche Regionen der DNA bindet. Für die Darstellung der Mitochondrien nach Fixation wurde der Farbstoff MitoTracker Deep Red verwendet. Die Inkubation des Farbstoffes MitoTracker Deep Red erfolgte in einer Konzentration von 50 nM für 30 Minuten bei 37 Grad Celcius (°C). Anschließend wurden die fixierten Zellen mit PBS gewaschen. Die Analyse erfolgte am konfokalen Laserscannmikroskop FluoView 10i (NA 1.35).

3.4.2 Mitochondriale Morphologie

Für die Visualisierung des mitochondrialen Netzwerkes wurde der Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Green FM verwendet. MitoTracker Green ist ein grünfluoreszierender Farbstoff, der durch Diffusion die Mitochondrienmembran überwindet und dort durch den thiol-reaktiven

Chloromethyl-Rest akkumuliert.

Für die Färbung wurden $5 * 10^5$ MIN6-Zellen in einer MatTek Zellkulturschale kultiviert. Die Inkubation des Farbstoffes MitoTracker Green erfolgte in einer Konzentration von 50 nM für 30 Minuten bei 37 °C. Danach wurden die Zellen 3-mal mit erwärmtem PBS gewaschen und im Anschluss mit Zellkulturmedium versorgt. Die Analyse der mitochondrialen Struktur erfolgte am konfokalen Laserscanmikroskop FluoView 10i (NA 1.35). Die Anregung erfolgte mit dem LD Laser bei 473 nm.

3.4.3 Mitochondriales Membranpotential

Für die Analyse des mitochondrialen Membranpotentials wurde der Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) verwendet. TMRE, ein rot-orange fluoreszierender Farbstoff, der zelldurchlässig und kationisch ist, kann leicht durch aktive Mitochondrien abgeschieden werden.

Für die Analysen wurden $5 * 10^5$ MIN6-Zellen in einer MatTek Zellkulturschale kultiviert. Nach Zugabe von TMRE in einer Konzentration von $6,2 \mu M/l$ erfolgte die Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen.

Die Analyse des mitochondrialen Membranpotentials erfolgte am konfokalen Laserscanmikroskop Olympus FluoView 10i durch Anregung mit dem LD Laser bei 559 nm und dem UPLASAPO 60x Öbobjektiv (NA 1.35). Mit dem Programm AutoQuant X2 wurden die Fluoreszenzintensitäten quantifiziert.

3.5 Proteinbestimmung

3.5.1 Proteinpräparation

Die in einer 6-well Platte kultivierten und transfizierten MIN6-Zellen werden mit Hilfe eines Zellschabers in 1ml PBS aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 1.200 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Die Resuspendierung der Zellpellets erfolgte mit 100 μl Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA)-Lysepuffer mit anschließender Inkubation für 30 Minuten auf Eis.

Die darauffolgende 10-minütige Zentrifugation bei 10.000 rpm bewirkte die Abtrennung der unlöslichen Bestandteile des Zellysats. Der Überstand wurde anschließend in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingelagert.

3.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Für die quantitative Bestimmung der Proteine wurde die Bradford-Methode verwendet. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 hat die Eigenschaft, sich an kationische und nicht-polare hydrophobe Seitenketten der Proteine zu binden. In diesen Komplexen wird er in seiner anionischen Form stabilisiert. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm (ohne Protein) nach 595 nm (mit Protein). Die Messung wird bei 595 nm durchgeführt. Dabei ist das Maß für die Proteinkonzentration der Lösung durch die Zunahme der Absorption bei 595 nm bestimmt[19].

Eine Eichgerade mit 1 – 14 μl Rinderserumalbumin (BSA, "bovine serum albumine") diene als Kalibrierung. Den Proteinproben mit jeweils 1 μl wurden 200 μl Bradford-Reagenz (Roti®-Quant) beigefügt und mit Aqua dest. auf 1 ml verdünnt.

Der Leerprobe wurde entsprechend der jeweilige Lysispuffer und der Standardprobe Rinderserumalbumin zugefügt. In Kunststoffküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm wurden die Ansätze bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte anschließend bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ in einem Spektralphotometer gegen eine Leerprobe.

Die Berechnung des Proteingehalts erfolgte anhand folgender Formel:

$$x = \frac{(BSA \ OD_{595}) + 0,3031}{0,121}$$

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

$$x = \frac{(Probe \ OD_{595}) + 0,3031}{0,121} * Faktor$$

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

3.5.3 SDS-Page

Ziel der Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gelelektrophorese (SDS-Page) ist es, Proteingemische nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen und damit bestimmte Proteine identifizieren zu können. Die zu untersuchende Probe wird mit dem negativ geladenen Detergens Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) versetzt, welches an Proteine bindet. Dadurch wird das Proteingemisch denaturiert. Durch die Aufspaltung der Sekundär- und Tertiärstruktur kommt es zur Ausbildung linearer Protein-Komplexe. Dies führt dazu, dass bei allen Proteinen das gleiche

Ladung/Masse-Verhältnis vorliegt, wodurch die Proteine danach gleichmäßig negativ geladen sind. Bei dem hier verwendeten DISK-System (diskontinuierlich) handelt es sich um zwei Gele: einem Trenngel (feinporig, unten) und einem Sammelgel (grobporig, oben). Beide unterscheiden sich im Hinblick auf ihre Eigenschaften (pH, Ionenstärke und Porengröße), wodurch die Trennung der Proteine ermöglicht wird.

Zuerst wurde dem Gel, Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED), in ihren jeweiligen Konzentrationen zwischen 2 Glasplatten mit den entsprechenden Spacern gegossen. Der Vernetzungsgrad und die daraus resultierende Größe der Poren sind abhängig von der Konzentration des Acrylamids. Nach Überführung der Gele in die Elektrophoresekammer wurde die Apparatur mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Proben wurden in einer Menge von 40 μg zu 5 μl SDS-Loadingpuffer gegeben und auf ein Volumen von 15 – 20 μl mit Aqua dest. aufgefüllt. Die Denaturierung der Proteinproben erfolgte bei 95 °C für 5 Minuten. Danach konnte die Übertragung der Proben in die Taschen des Gels durchgeführt werden. Damit mit einem Größenstandard verglichen werden kann, wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker (siehe Tabelle 2.9) aufgetragen.

3.5.4 Transfer der Proteine

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit einem diskontinuierlichem Semi-Dry Blotting Verfahren auf eine Polyvinylidene Difluoride (PVDF) Membran übertragen. Dazu wurde eine elektrische Spannung (140 mA) senkrecht zur Laufrichtung des Gels für eine Stunde angelegt. In Anodenpuffer 1 wurden 4 Lagen und Anodenpuffer 2 wurden 2 Lagen getränkte Blottingpapiere auf die Anode gelegt. Die Äquilibration der auf dem Polyacrylamidgel befindlichen PVDF-Membran erfolgte zuvor in Isopropanol und Anodenlösung 2. Anschließend folgten 4 Lagen in Kathodenpuffer getränkte Blottingpapiere, die vor die Kathode gelegt wurden.

Der Blotaufbau erfolgte nach folgendem Schema:

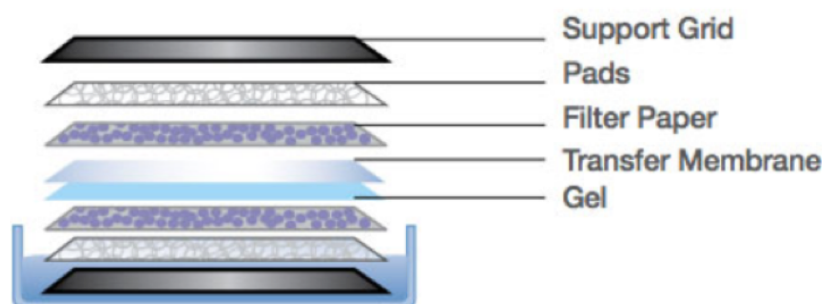


Abbildung 3.5: Detaillierter Blotaufbau [2]

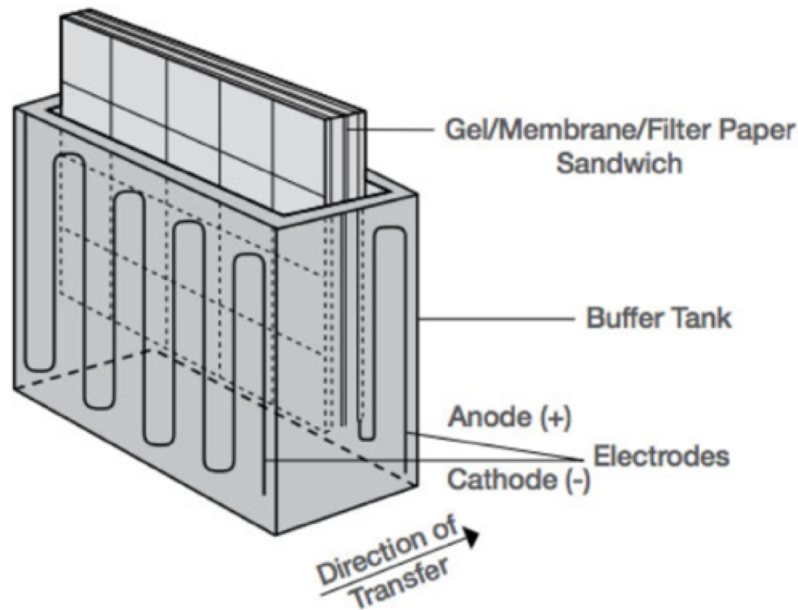


Abbildung 3.6: Blotaufbau [2]

3.5.5 Western Blot-Hybridisierung

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die PVDF-Membran nach dem Proteintransfer für mindestens 30 Minuten mit einer Blockierungslösung (1:4 mit PBS verdünnter Odyssey Blocking Puffer) auf dem Schüttler inkubiert. Mittels Immunfärbung, mit einem primären Antikörper bei 4 °C über Nacht, konnten entsprechende Proteine detektiert werden. Die PVDF-Membran wurde anschließend mit PBS 0,1 % Volumen pro Volumen (v/v) Tween 20, 3-mal für circa 10 Minuten gewaschen. Mit einem sekundären Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper erfolgte die Inkubation der PVDF-Membran für 1 Stunde. Die Identifikation der somit detektierten Proteine erfolgte mit dem Odyssey Infrared Imager der Firma LI-COR.

3.6 Genexpressionsanalysen

3.6.1 RNA-Isolation

Die Extraktion der Ribonukleinsäure (RNA) erfolgte mit Hilfe des QIAGEN RNeasy Mini Kit[®]. Zuvor kultivierte und transfizierte Zellen wurden mit 500 μ l RLT-Puffer (ein Guanidine-Thiocyanat-enthaltender Lysis Puffer) resuspendiert. Der RLT-Puffer (10 μ l Mercaptoethanol auf 1 ml RLT) dient hierbei der Lyse der Zellmembranen. Zur Verringerung der Viskosität erfolgte der Zellaufschluss in einer QIAshredder Spin Säule für 2 Minuten bei 12.000 rpm. Zum

Ausfällen der RNA und deren selektive Bindung an die RNeasy Membran wurde 350 μ l 75 % RNase-freies Ethanol hinzugefügt. Nach anschließendem Transfer auf die RNeasy Spin Säule wurde 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Auf die Säulen wurde je 500 μ l des Waschpuffers RW1 gegeben und bei 12.000 rpm 15 Sekunden zentrifugiert. Der DNA-Verdau erfolgte mit Hilfe der RNase-freien DNase der Firma Qiagen. Dazu wurden 70 μ l RDD-Puffer und 10 μ l DNase auf die RNeasy Membran gegeben und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Die sich anschließenden Waschgänge dienten dem Entfernen der DNase und Spuren von Salzen. Dazu wurde der RW1-Puffer und RPE-Puffer verwendet und jeweils 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Eluierung der RNA erfolgte mit RNase freien Wasser für 1 Minute und anschließender Zentrifugation bei 12.000 rpm für 1 Minute. Bis zur Weiterverwendung erfolgte die Einlagerung der RNA bei -80 °C.

3.6.2 RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des NanoDrop 2000 Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Als Referenzwert wurde Nuklease-freies Wasser verwendet.

3.6.3 cDNA-Synthese

Aus der extrahierten RNA kann mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase die komplementäre komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) hergestellt werden. Dazu wurde der Maxima[®] First Strand cDNA Synthesis Kit genutzt.

Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

4 μ l Reaction Mix (reaction buffer, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), oligo(dT)18 und random hexamer primer),

2 μ l Maxima Enzyme Mix (Maxima Reverse Transkriptase, RiboLock RNase Inhibitor),

100 ng - 1 μ g RNA.

Um ein Gesamtvolumen von 20 μ l zu erreichen, wurde der Mix mit einer berechneten Menge Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt.

Die cDNA-Synthese erfolgte im Polymerasekettenreaktion (PCR)-Cycler nach folgendem Programm:

3.6.4 quantitative RT-PCR

Die quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion ist eine Methode, die der Vervielfältigung von Nukleinsäuren dient und zusätzlich für die Quantifizierung der mRNA-Expression verwendet wird.

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

Tabelle 3.2: Cycler-Programm für cDNA-Synthese

Das hier verwendete TaqMan®-Prinzip nutzt spezifische TaqMan®-Sonden. Diese sequenzspezifischen Oligonukleotide besitzen am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff, am 3'-Ende einen nicht-fluoreszierenden Quencher sowie ein minor groove binder (MGB). Der Primer und die TaqMan®-Sonde hybridisieren im PCR-Produkt mit einer Zielsequenz (Annealing) zwischen Forward und Reverse-Primer.

Bei der Analyse mit den Hydrolyse-Sonden wird die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq) genutzt. Die Exonukleaseaktivität der Taq spaltet während der Amplifikation die TaqMan®-Sonde. Anschließend erfolgt die Verdrängung der Sondenfragmente von der Zielsequenz und die Strangpolymerisation wird fortgesetzt. Die Nähe des Reporter-Farbstoff zum Quencher-Farbstoff führt bei intakter Sonde zur Unterdrückung der Reporter-Fluoreszenz. Dieser Vorgang beruht auf einem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Durch die Sondenhydrolyse erfolgt eine Trennung des Reporter-Fluorophors vom Quencher. Die steigende Reporter-Fluoreszenz kann während der Amplifikationszyklen detektiert werden. Die Messung erfolgt in jedem Zyklus in der exponentiellen Phase am Ende der Elongation. Der Fluoreszenzanstieg ist direkt proportional zur Amplifikation der Zielsequenz, die während der PCR stattfindet.

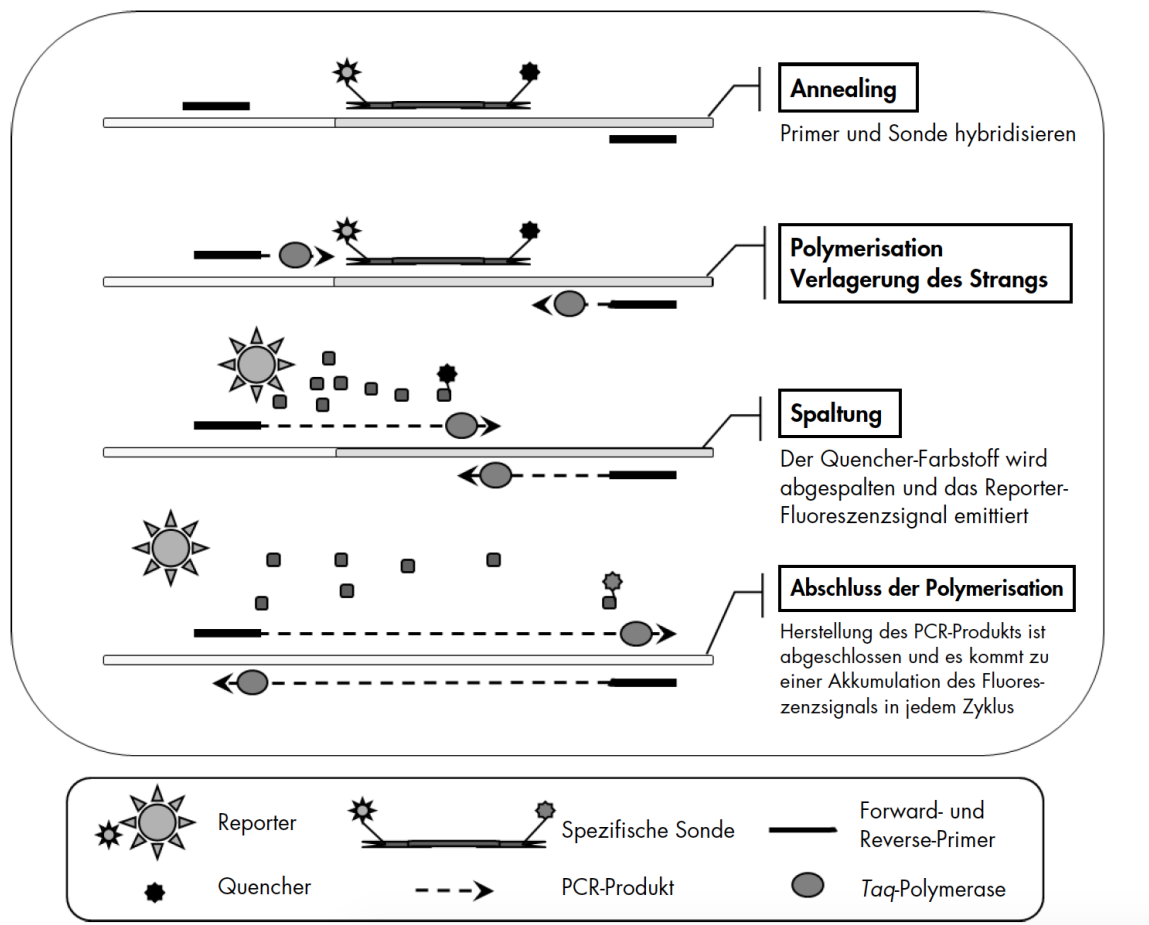


Abbildung 3.7: Funktionsprinzip der RT-PCR [146]

Für die Expressionsanalyse des mitochondrialen Teilungsproteins MiD51 wurde eine spezifische TaqMan®-Sonde der Firma Applied Biosystems verwendet. Zur internen Kontrolle diente das Referenzgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Als Reporter-Fluoreszenzfarbstoff wurde FAMTM genutzt.

Folgender Reaktionsansatz wurde für die RT-PCR verwendet:

cDNA	1 μ l
TaqMan®-Universal PCR Master Mix	5 μ l
TaqMan®-Sonde	1 μ l
Aqua dest.	6 μ l

Tabelle 3.3: Reaktionsansatz RT-PCR

Die Durchführung der quantitativen RT-PCR erfolgte mit dem Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR-Cycler nach folgendem Programm:

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

Tabelle 3.4: RT-PCR-Programm

Mit Hilfe des SDS 2.3 Programms wurde der PCR-Lauf erstellt und die Messwerte im RQ Manager 1.2 abgelesen. Die Delta-Delta-Ct-Methode diente der quantitativen Auswertung. Der cycle of threshold (Ct)-Wert entspricht den Zyklen, in denen die gemessene Fluoreszenz erstmalig signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Die Normierung von Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten mRNA (Delta-Ct) konnte durch die relative Quantifizierung des Referenzgens GAPDH erreicht werden. Durch Subtraktion des Referenzgens vom untersuchenden Gen erfolgte die Berechnung des Delta-Ct. Die Bestimmung von Delta-Delta-Ct wurde durch Expressionsänderung einer Zielsequenz der Probe zur gleichen Zielsequenz einer Kontrolle ermittelt. Durch die Ratio konnte der relative mRNA-Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ermittelt werden [114].

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

Abbildung 3.8: Berechnung des relativen mRNA-Expressionsunterschiedes

3.7 Funktionsanalysen

3.7.1 Glukose-stimulierte Insulinsekretion

Für die Analysen wurden $5 * 10^5$ MIN6-Zellen oder 20 Inseln in eine 6-well Platte ausgesät, kultiviert und transfiziert. Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit Krebs Ringer Gebrauchslösung (0,1 % BSA) zweimal gewaschen und 1 Stunde bei 37 °C in 0,1 % BSA inkubiert.

Eine anschließende Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C erfolgte nach erneutem Abzug des Mediums mit einer Stimulationslösung (0,5 % BSA, Glukose) mit jeweils 5,5 mmol/l und 25 mmol/l Glukose.

Für die Bestimmung der Insulinkonzentration werden 1 ml des Überstandes abgenommen und 5 Minuten bei 2.135 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 800 μ l Überstand abgenommen und mit Krebs Ringer Gebrauchslösung im Verhältnis 1:20 verdünnt. Für die Bestimmung des Insulingehalts wurden die im well befindlichen Zellen mit einem Zellschaber abgetragen, für 45 Sekunden mit 90 % Ultraschall behandelt und bei 2.135 rpm für 5 Minuten zentrifugiert.

3.7.2 Insulin-ELISA

Der Insulin-Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) wurde für die quantitative Bestimmung von Insulin verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Festphasen-Enzymimmunoassay basierend auf der direkten Sandwichtechnik mit einer enzymvermittelten Farbreaktion. Für dieses Prinzip wurde das Mouse High Range Insulin Elisa Kit verwendet. Die 96 well Mikrotitrierplatte ist mit einem monoklonalen Insulin-Antikörper beschichtet. Der monoklonale Antikörper kann das spezifische Zielantigen binden, welches gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des Insulin-Moleküls gerichtet ist. Für die Erstellung einer Kalibrierungskurve des Insulinstandard wurde rekombinantes humanes Insulins (1 mg/ml) genutzt, welches mit Krebs Ringer Gebrauchslösung verdünnt wurde. Damit ergibt sich folgende Verrdünnungsreihe: 0 ng/ml; 2,5 ng/ml; 5,0 ng/ml; 7,5 ng/ml; 10 ng/ml; 15 ng/ml; 20 ng/ml und 30 ng/ml.

Die Überstände und die Insulinstandards wurden mit jeweils 5 μ l pro well als Zweifachansatz in die Mikrotitrierplatte überführt. Anschließend wurden 75 μ l eines Enzym-Konjugats pro well hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte abgedeckt für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bei 700-900 rpm. Im Anschluss wurde die Mikrotitrierplatte 6 mal mit 350 μ l Waschpuffer gespült. In einer zweiten Inkubation wird ein Enzymkomplex aus Streptavidin und Peroxidase (Horseradish Peroxidase (HRP)) an den biotinylierten anti-Insulin-Antikörper gekoppelt. Anschließend wird 100 μ l des Chromogens 3,3'-5,5' Tetramethylbenzidine (TMB) zu jedem well hinzugefügt, wodurch eine Farbreaktion durch eine enzymatische Reaktion zustande kommt. Dabei katalysiert das Enzym HRP die Oxidation des Substrates TMB (1-StepTM Ultra TMB-ELISA). Die Inkubation erfolgte abgedunkelt für 15 Minuten auf einem Schüttler. Durch Zugabe von 100 μ l Terminierungslösung pro well wurde die Reaktion abgestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist proportional der Insulinkonzentration in der Probe. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 450 nm mit dem Luminometer Victor 3 1420 Multilabel Counter. Die Quantifizierung der Insulinkonzentration erfolgt anhand mitgeführter Standards.

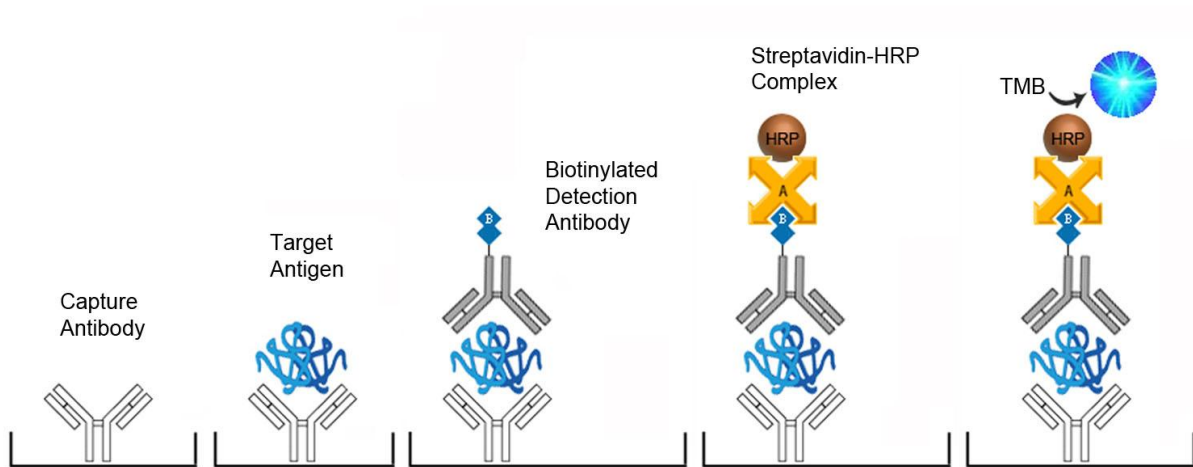


Abbildung 3.9: Funktionsprinzip des Insulin-ELISA [4].

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Rolle des mitochondrialen Elongationsfaktors MiD51 auf die mitochondriale Dynamik in pankreatischen β -Zellen untersucht. Dazu wurden zwei Zellarten verwendet, die MIN6-Zelllinie und primäre Maus Inselzellen. Anschließend wurden die Auswirkungen einer MiD51 Überexpression auf die mitochondriale Dynamik, die Morphologie der Mitochondrien und das Membranpotential analysiert. Außerdem wurde die Insulinsekretion nach Glukosestimulation untersucht.

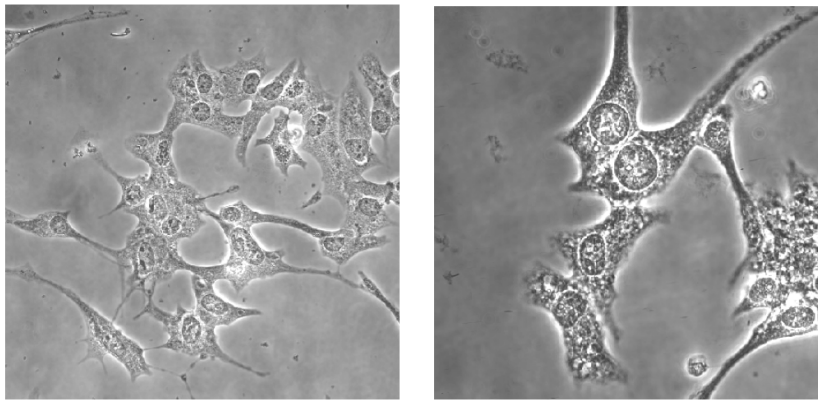


Abbildung 4.1: Mikroskopische Aufnahme von MIN6-Zellen.

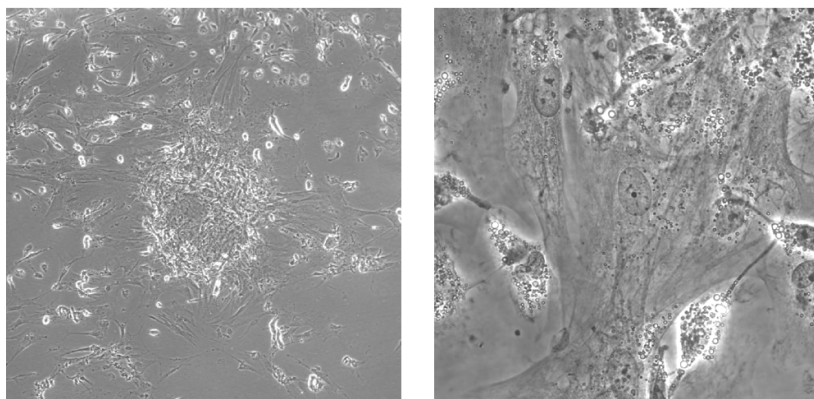


Abbildung 4.2: Mikroskopische Aufnahme von primären Maus Inselzellen.

4.1 Analyse der Genexpression des mitochondrialen Elongationsfaktors MiD51 nach Überexpression in MIN6-Zellen

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Transfektion wurde die Genexpression von MiD51 mit Hilfe der quantitativen RT-PCR untersucht.

4.1.1 MIN6-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass nach Hochregulation von MiD51 die Genexpression von MiD51 in den MIN6-Zellen signifikant um 155 % im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen anstieg (Abbildung 4.3).

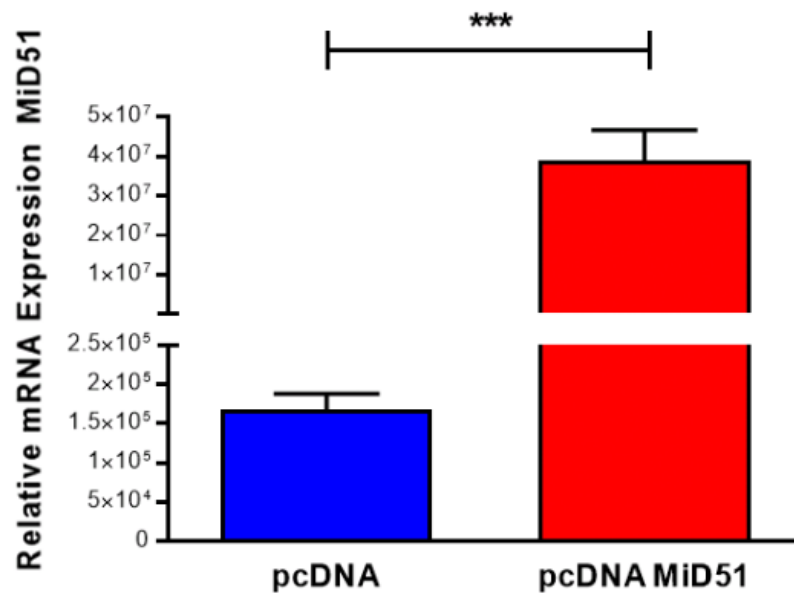


Abbildung 4.3: Quantitative RT-PCR des mitochondrialen Elongationsfaktors MiD51 in MIN6-Zellen nach Überexpression von MiD51 (roter Balken) im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen (blauer Balken): Die Genexpression wurde auf das Referenzgen GAPDH normalisiert. *** $p < 0.001$ (Student's t-Test) (n=6)

4.1.2 Primäre Maus-Inselzellen

In vier verschiedenen Experimenten wurden insgesamt 20 primäre Maus-Inseln circa 2 Wochen lang zum auswachsen inkubiert. Die nun vereinzelt Inseln wurden im Pool transfiziert. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der Genexpression auf das 400-fache (Abbildung 4.4).

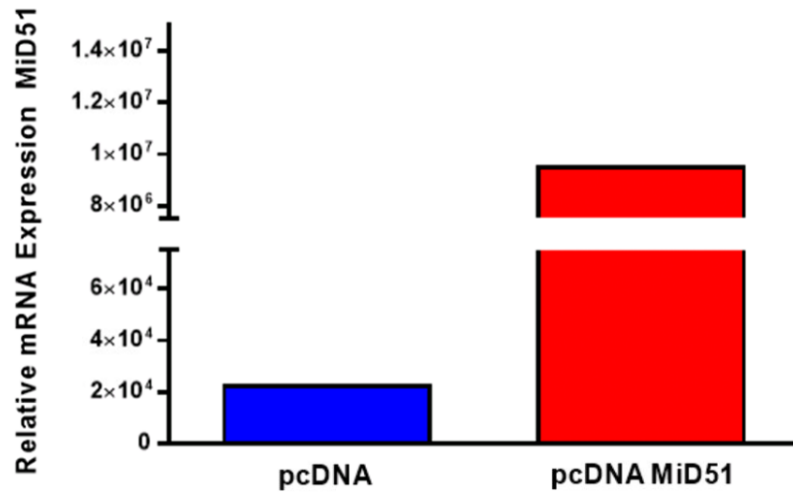


Abbildung 4.4: RT-PCR des mitochondrialen Elongationsfaktors MiD51 in primären Maus Inselzellen nach Überexpression von MiD51 (roter Balken) im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen (blauer Balken): Die Genexpression wurde auf das Referenzgen GAPDH normalisiert. (n=4, Pool aus circa 20 Maus-Inselzellen).

4.2 Proteinexpressionsanalyse des mitochondrialen Elongationsfaktors MiD51 nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen

Die Proteinexpression von MiD51 wurde nach Überexpression in MIN6-Zellen mittels Western Blot analysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe von primären und fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpern. Durch das Gen zelluläre Myelocytomatose (c-Myc) wird die Expression anderer Gene verstärkt. Beim verwendeten Vektor ist c-Myc ein Epitop-Tag, welcher Bestandteil des exprimierten Proteins ist (siehe Abbildung 3.3). Daher erfolgte die Untersuchung von c-Myc, um die Unterschiede in der Proteinexpression nachzuweisen. GAPDH wurde als interne Ladungskontrolle verwendet.

Im Western Blot konnte nach Hochregulation von MiD51 eine verstärkte Expression von MiD51 in MIN6-Zellen bestätigt werden (Abbildung 4.5).

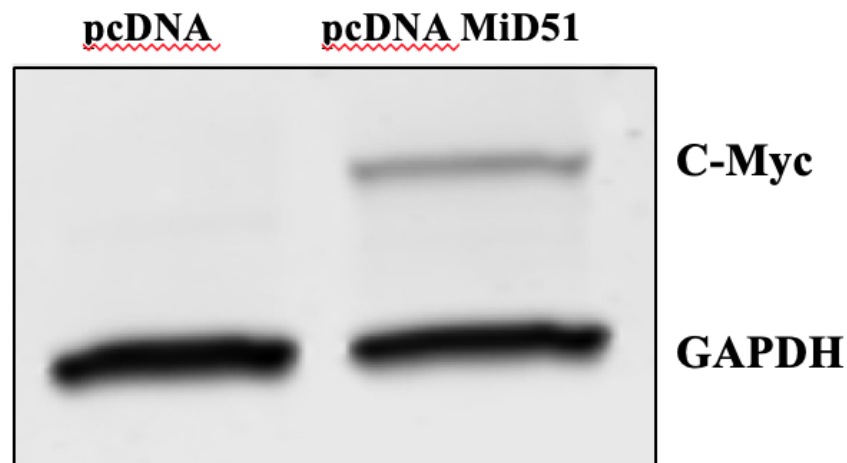


Abbildung 4.5: Western Blot Analyse des mitochondrialen Elongationsfaktors MiD51 in MIN6-Zellen nach Überexpression von MiD51 im Vergleich zu kontrolltransfizierten MIN6-Zellen (n=3)

4.3 Immunhistochemische Analyse der MiD51-Expression nach Überexpression in MIN6-Zellen und primären Maus-Inselzellen

Die Immunfluoreszenzfärbung diente zur weiteren Überprüfung einer erfolgreichen Überexpression von MiD51.

4.3.1 MIN6-Zellen

Die Abbildung 4.6 zeigt den immunhistochemischen Nachweis der Überexpression von MiD51 im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen. Eine signifikante Erhöhung der Expression von MiD51 ist durch die starke Grünfärbung im Vergleich zur endogenen Expression von MiD51 dargestellt.

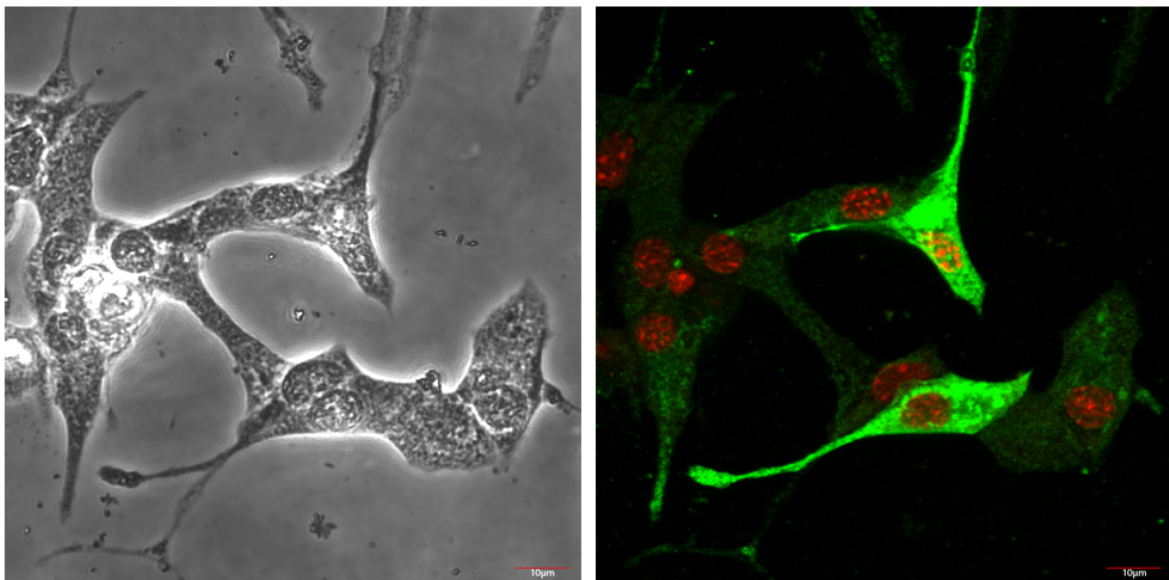


Abbildung 4.6: Links: Darstellung der MIN6-Zellen im Durchlicht, Rechts: Immunhistochemische Darstellung der MiD51-Expression in MIN6-Zellen nach Überexpression von MiD51. Immunhistochemische Darstellung der MiD51-Expression in MIN6-Zellen nach Überexpression von MiD51.
rot = DAPI, grün = MiD51.

4.3.2 Primäre Maus-Inselzellen

Für die Strukturuntersuchung an primären Maus-Inselzellen werden Inseln aus NMRI Mäusen isoliert, vereinzelt und mit dem Expressionsvektor pcDNA 3.1 für MiD51 transfiziert (Abbildung 4.7, Bilder D-F). Außerdem wurden zur Kontrolle primäre Maus-Inselzellen mit einem Leervektor transfiziert (Abbildung 4.7, Bilder A-C).

Bild B zeigt die endogene Expression von MiD51, im Vergleich dazu sind in Bild E die transfizierten primären Maus-Inselzellen mit Überexpression von MiD51 dargestellt. Durch die Färbung mit MitoTracker DeepRed wurde das mitochondriale Netzwerk dargestellt. Bild C zeigt ein homogenes tubulär-verzweigtes Netzwerk in kontrolltransfizierten MIN6-Zellen. Dagegen lassen sich im Bild F nach Überexpression von MiD51 mitochondriale Cluster erkennen.

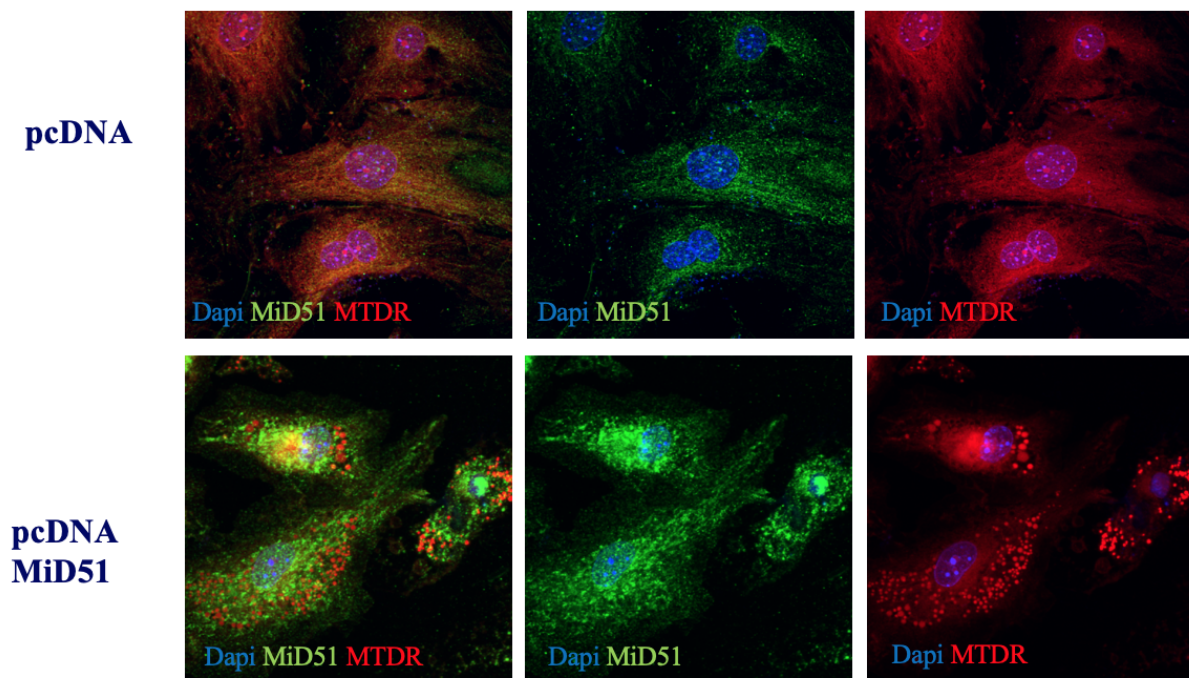


Abbildung 4.7: Immunhistochemische Darstellung der Überexpression von MiD51 und der Mitochondrienstruktur in Maus-Inselzellen. blau = DAPI, rot = MitoTracker Deep Red, grün = MiD51.

4.4 Analyse der mitochondrialen Morphologie nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen

Die Darstellung der mitochondrialen Morphologie erfolgte durch Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Green und anschließender Untersuchung am konfokalen Laserscannmikroskop. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte, dass die Kontrollzellen ein homogenes tubulär-verzweigtes mitochondriales Netzwerk besitzen (Abbildung 4.8, Bild A). Nach 24 Stunden wiesen dagegen die MIN6-Zellen nach Überexpression von MiD51 ein inhomogenes Netzwerk auf, welches durch fragmentierte Mitochondrien mit Clusterbildung charakterisiert war (Abbildung 4.8, Bild B). Die mitochondrialen Cluster verstärken sich weiterhin im Zeitverlauf nach 48 und 72 Stunden (Abbildung 4.9).

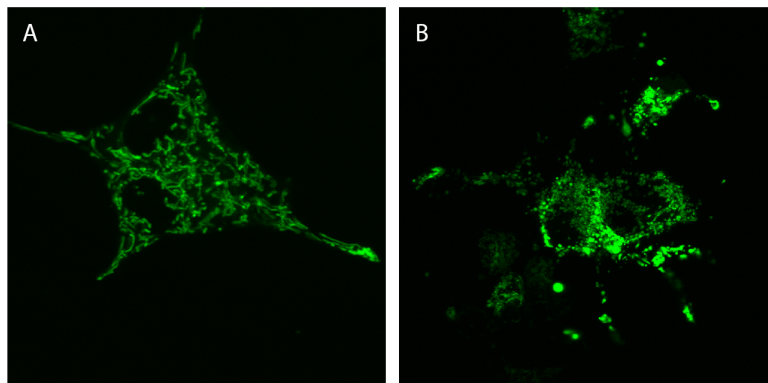


Abbildung 4.8: Darstellung von Mitochondrien nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen nach 24 Stunden (Bild B) im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen (Bild A).

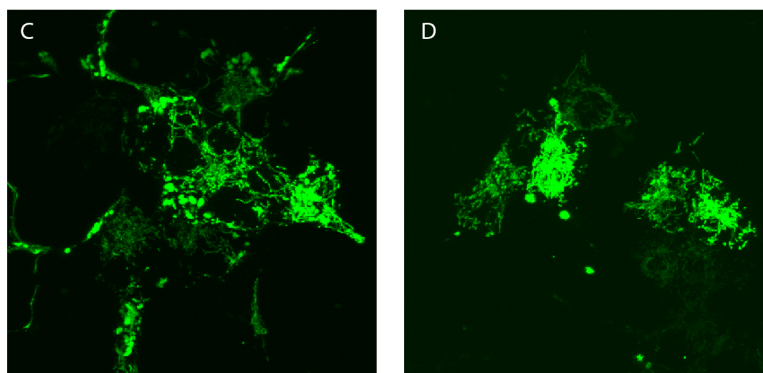


Abbildung 4.9: Darstellung von Mitochondrien nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen nach 48 Stunden (Bild C) und nach 72 Stunden (Bild D).

4.5 Analyse des mitochondrialen Membranpotential nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen

Um das mitochondriale Membranpotential nach Überexpression von MiD51 zu analysieren wurden MIN6-Zellen mit TMRE gefärbt und anschließend am konfokalen Laserscannmikroskop analysiert. Eine hohe TMRE Fluoreszenz korreliert dabei mit einem hohen mitochondrialen Membranpotential. Ein reduziertes mitochondriales Membranpotential konnte nach Überexpression von MiD51 im Vergleich zu Kontrollzellen gezeigt werden (Abbildung 4.10). Es konnte ein signifikant um 52 % verringertes Membranpotential quantifiziert werden (Abbildung 4.11).

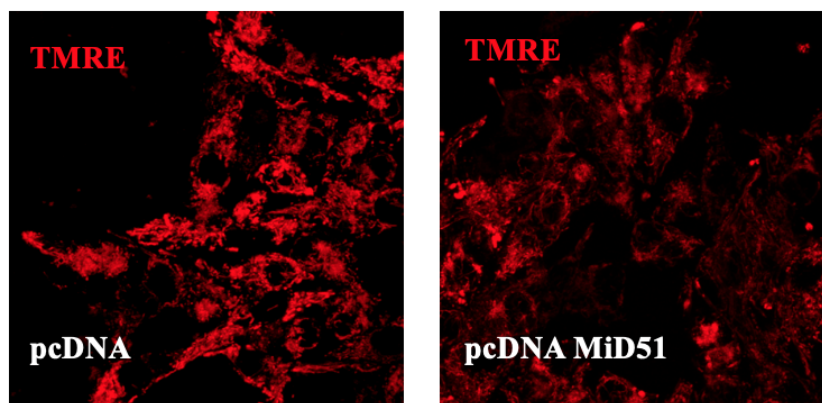


Abbildung 4.10: Analyse des mitochondrialen Membranpotentials mittels TMRE in MIN6-Zellen nach Überexpression von MiD51 im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen.

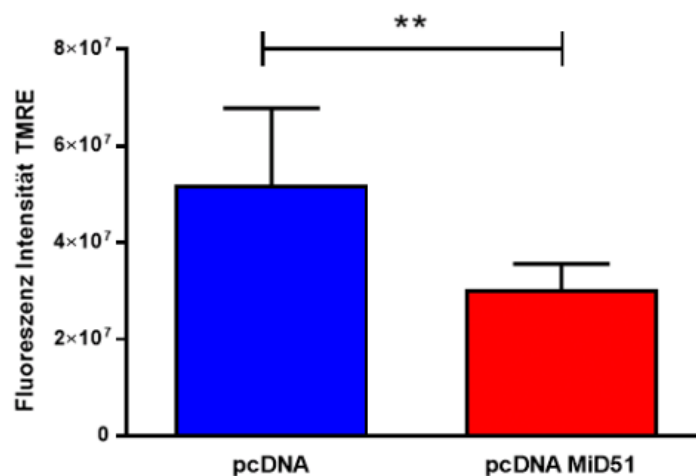


Abbildung 4.11: Quantifizierung des mitochondrialen Membranpotentials in MIN6-Zellen nach Überexpression von MiD51 (roter Balken) im Vergleich zu kontrolltransfizierten MIN6-Zellen (blauer Balken). **, $p < 0.01$; (ANOVA/Bonferroni-Test) ($n=4$)

4.6 Analyse der glukose-stimulierten Insulinsekretion nach Überexpression von MiD51

Der Einfluss einer Überexpression von MiD51 auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion wurde mit Hilfe eines Insulin Elisa bestimmt. Die Analyse erfolgte sowohl an MIN6-Zellen als auch an primären Maus-Inselzellen. Die Bestimmung der Insulinsekretion erfolgte nach 1-stündiger Inkubation mit 5,5 und 25 mmol/l Glukose. Die Insulinsekretion wurde auf den Insulingehalt und den Proteingehalt der Zellen bezogen.

4.6.1 MIN6-Zellen

Bei einer Inkubation von 5,5 mmol/l Glukose war die basale Insulinsekretion bei den Kontrollzellen und den MIN6-Zellen nach Überexpression mit MiD51 vergleichbar, während eine signifikant reduzierte Insulinsekretion in den MIN6-Zellen nach Überexpression von MiD51 nach Stimulation mit 25 mmol/l Glukose im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet werden konnte (Abbildung 4.12).

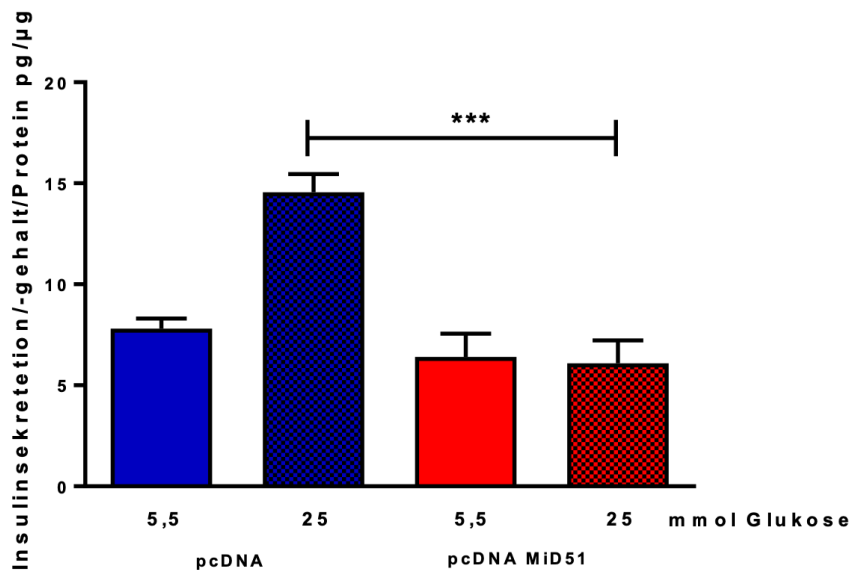


Abbildung 4.12: Glukose-stimulierte Insulinsekretion nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen (roter Balken) im Vergleich zu kontrolltransfizierten MIN6-Zellen (blauer Balken) nach einer Inkubation in 5,5 und 25 mmol/l Glukose. ***, $p < 0.001$; (ANOVA/Bonferroni-Test) (n=6)

4.6.2 Primäre Maus-Inselzellen

In den primären Inselzellen war bei einer Inkubation von 5,5 mmol/l Glukose bereits die basale Insulinsekretion nach Hochregulation von MiD51 um 150 % gesteigert, während bei einer Inkubation von 25 mmol/l eine deutlich reduzierte Insulinsekretion im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen zu beobachten war (Abbildung 4.13).

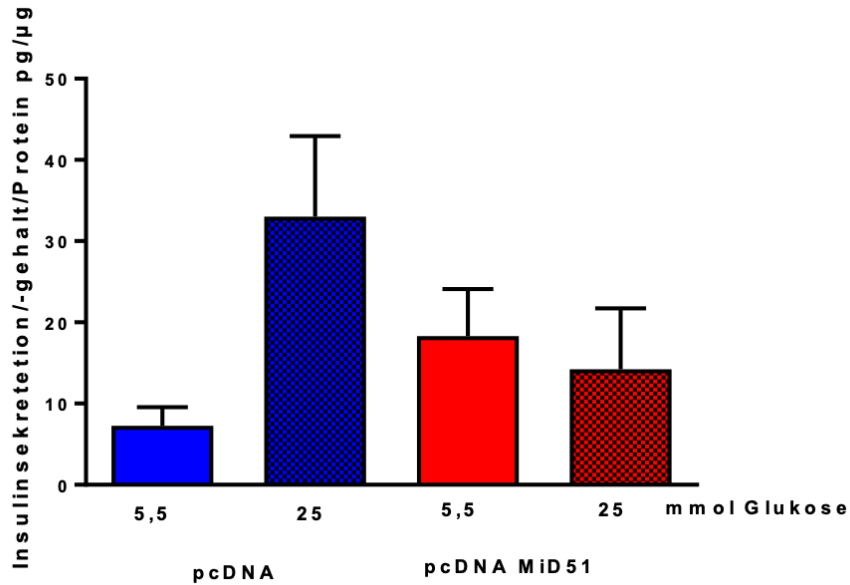


Abbildung 4.13: Glukose-stimulierte Insulinsekretion nach Überexpression von MiD51 in primären Maus Inselzellen (roter Balken) im Vergleich zu kontrolltransfizierten Maus Inselzellen (blauer Balken) nach einer Inkubation in 5,5 und 25 mmol/l Glukose. (n=6)

5 Diskussion

Mitochondrien sind hochdynamische Organellen mit vielfältigen Funktionen [26]. Eine wesentliche Aufgabe ist die ATP-Produktion, die damit die zelluläre Energieversorgung sichert [34]. Zu den weiteren Prozessen gehören die Regulation des Calciumhaushaltes [168], die Initiierung der Apoptose, die Oxidation von Fettsäuren sowie die Synthese von Häm, Harnstoff und Steroidhormonen [67]. Mitochondrien sind zudem sehr heterogen. Sie ändern ihre Form (z.B. durch Verlängerung, Verkürzung, Verzweigung, Verbiegung und Schwellung) und können ihre Position innerhalb der Zelle verändern [15].

Die Regulation der Insulinsekretion aus der β -Zelle des Pankreas erfolgt aufgrund der Veränderung der Blutglukosekonzentration. Eine zentrale Rolle in der Stimulus-Sekretionskopplung nehmen die Mitochondrien durch die Bildung von ATP ein [176]. Beim Diabetes mellitus Typ 2 beruht der Pathomechanismus auf einer Kombination aus einer gestörten Insulinsekretion durch Dysfunktion der β -Zellen des Pankreas und einer peripheren Insulinresistenz in Fettgewebe und Skelettmuskulatur [111, 98]. Defekte in der Insulinsekretion bei Typ 2 Diabetes sind gut dokumentiert [78, 151, 89]. Beim Menschen, sowie in Tiermodellen, wurden bei manifesten Typ 2 Diabetes morphologische Veränderungen in Mitochondrien zusammen mit funktionellen Veränderungen der β -Zellen festgestellt [9, 48, 16, 182]. Allerdings liegen bereits bei Patienten mit beeinträchtigter Glukosetoleranz und in frühen Stadien des Typ 2 Diabetes Defekte der Insulinsekretion der β -Zelle vor [52]. Die Arbeitsgruppe um Deng et al. beschrieb eine verminderte Insulinsekretion bei Inseln von Spendern mit Diabetes Typ 2 und es zeigten sich experimentell erhöhte Schwellenwerte für die Glukose-induzierte Insulinsekretion [44]. Auch die Gruppe um Anello et al. konnte einen selektiven Defekt der Insulinausschüttung nach Glukosestimulation in β -Zellen von Typ 2 Diabetikern zeigen [9]. Interessanterweise zeigen Mitochondrien dieser β -Zellen eine kreisförmige und hypertrophe Morphologie [9]. Verglichen mit Kontrollzellen ist die Anzahl an Mitochondrien ähnlich, die mitochondriale Dichte aber erhöht [9]. Mitochondrien sind dynamische Organellen, die sich kontinuierlich teilen und fusionieren. Diese mitochondriale Dynamik ist notwendig, um den Energiestatus der Zelle aufrecht zu erhalten. Eine Balance von Fusion und Teilung ist unverzichtbar für die mitochondriale Funktion und zelluläre Verteilung [27, 179, 184]. Defekte in den Bestandteilen der mitochondrialen Dynamik werden unter anderem mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Huntington und Parkinson assoziiert [30].

Zudem werden die Veränderungen der mitochondrialen Funktion mit Stoffwechselerkrankungen assoziiert [36]. Auch der Typ 2 Diabetes mellitus wird in direktem Zusammenhang mit einer gestörten mitochondrialen Funktion gesehen [107]. Dies spiegelt die zentrale Bedeutung

der Energiehomöostase in der Physiologie der β -Zellen wider [162]. Während der Fusion wird ermöglicht, dass Organelleninhalte wie Metabolite, Proteine und mtDNA ausgetauscht werden [110, 109, 92, 91, 62, 171]. Typischerweise wurden Fusionszustände in Situationen mit erhöhter Energieeffizienz aufgrund von akutem Stress oder Nährstoffmangel beobachtet [96]. Die mitochondriale Teilung ist ausschlaggebend für die Entfernung von defekten Mitochondrien mittels Mitophagie [174]. In einem Umfeld mit überschüssigen Nährstoffen, wie sie bei Adipositas oder Diabetes Typ 2 vorliegt, wird die mitochondriale Teilung gefördert und die mitochondriale Fusion reduziert [96]. Der Teilungsprozess, der ein oder mehrere Tochter-Mitochondrien produziert, benötigt die zytosolische dynamin-ähnliche GTPase Drp1, die als zentraler Regulator der mitochondrialen Teilung beschrieben ist [165, 142]. Mehrere mitochondriale Proteine der Außenmembran, dazu zählen Fis1, Mff, sowie MiD49 und MiD51, werden im Zusammenhang mit der mitochondrialen Teilung durch die Rekrutierung der GTPase Drp1 gesehen [102, 188, 135]. Das Protein MiD51 reguliert die mitochondriale Teilung, indem es mit Drp1 interagiert und dieses rekrutiert [134]. Obwohl sich herausgestellt hat, dass Mff, MiD49 und MiD51 in der Lage sind, Drp1 zu rekrutieren, gibt es noch Unklarheiten darüber, wie diese Adaptoren miteinander oder mit anderen Rezeptoren wie zum Beispiel Fis1 in der mitochondrialen Teilung interagieren. Allerdings hat der Verlust eines einzelnen Adaptors MiD49, MiD51, Mff oder Fis1 keinen bedeutenden Einfluss auf die Menge von Drp1 an der mitochondrialen Oberfläche [130]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Mff, MiD49 und MiD51 individuell ausreichend sind, um Drp1 zu rekrutieren und die Teilung auszulösen [134, 102, 84, 149]. Der inhibitorische Effekt, den MiD51 auf die GTPase Aktivität von Drp1 ausübt, war signifikant stärker, als der bei Mff beobachtete stimulierende Effekt. Dennoch ist unklar, wie diese Proteine an der mitochondrialen Teilung beteiligt sind. Auch die Art und Weise der Regulation wird noch nicht vollständig verstanden [102, 135, 134, 33]. Die Arbeitsgruppe um Rong Yu et al. konnte allerdings zeigen, dass MiD49 und MiD51 mit Drp1 und Mff auf der mitochondrialen Oberfläche interagieren und als Adaptoren dienen [185]. MiD51 kann die Mff-abhängige Erhöhung der Drp1 GTPase Aktivität supprimieren [130]. Mff und mitochondrial dynamics proteins (MiDs) haben gegensätzliche Effekte auf die mitochondriale Morphologie: bei Überexpression von Mff resultiert eine starke mitochondriale Fragmentierung [132, 58], während die Überexpression von MiD49 oder MiD51 zu einer Inhibition der Teilung und damit zu einer mitochondrialen Elongation führt [102, 135, 188]. Es wurde gezeigt, dass MiD49 und MiD51 in physiologischen Konzentrationen die direkte Bindung von Drp1 zu Mff erleichtert. Sie verbinden Drp1 mit Mff in einem trimeren Drp1-MiD-Mff-Komplex [185]. Es wird angenommen, dass sich anschließend die Zusammensetzung von Drp1, von dem trimerischen Komplex, zu einem aktiven dimerischen Drp1-Mff Komplex verändert, was letztlich in mitochondrialer Teilung resultiert. Wie bereits in mehreren anderen Studien gezeigt, konnte Rong Yu et al. bestätigen, dass hohe Konzentrationen von überexprimierten MiDs Drp1 auf der mitochondrialen Oberfläche sequestrieren, mit dem Resultat der mitochondrialen Elongation. Ei-

ne niedrige Expression von MiD49 und MiD51 hingegen begünstigt die mitochondriale Teilung, was zur mitochondrialen Fragmentierung führt [185]. Es wird angenommen, dass die endogenen MiDs die Mff-vermittelte Drp1-Rekrutierung zum Mitochondrium vereinfachen. Die Daten weisen darauf hin, dass MiDs Drp1 in einer Mff-abhängigen Weise zur mitochondrialen Oberfläche rekrutieren. Wohingegen die Mff-vermittelte Akkumulation von Drp1 auf der mitochondrialen Außenmembran nur teilweise von der Präsenz von endogenen MiDs abhängig ist [185].

Die mitochondriale Funktion ist von der Qualitätskontrolle abhängig, die der Aufrechterhaltung einer funktionalen mitochondrialen Population dient und zur Sicherung der zellulären Funktion notwendig ist. Wie MiD51 in der mitochondrialen Teilung involviert ist, ist bisher noch nicht gut verstanden. Die Funktion von MiD51 in β -Zellen des Pankreas ist zudem noch nicht untersucht worden. Daher wurde die Überexpression von MiD51 auf die mitochondriale Dynamik und Morphologie, auf die Veränderung der Insulinsekretion sowie auf das mitochondriale Membranpotential in MIN6-Zellen und primären Inselzellen der Maus untersucht.

5.1 Veränderungen der mitochondrialen Morphologie nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen

Die mitochondriale Morphologie reguliert die Funktion der Mitochondrien [95]. Eine fehlerhafte Balance zwischen Teilung und Fusion führt zu einem veränderten mitochondrialen Netzwerk, welches mit der Entstehung von Krankheiten assoziiert ist. Die Morphologie von Mitochondrien variiert stark zwischen verschiedenen Zelltypen. Beispielsweise sind die Mitochondrien in Hepatozyten klein, sphärisch oder oval, während sie sich bei Fibroblasten als lange Filamente darstellen [179, 184]. In primären Inselzellen der Maus weist das mitochondriale Netzwerk eine dichte mitochondriale Architektur auf, welche sich stabähnlicher Form präsentiert [119]. Physiologischerweise besteht in β -Zellen ein homogenes, tubuläres mitochondriales Netzwerk mit einer Durchschnittslänge von $3,5 \mu\text{m}$ [138]. Veränderungen in Form und Größe von Mitochondrien wurden bei Patienten mit Diabetes Typ 2 beobachtet. Mitochondrien von Patienten mit Typ 2 Diabetes sind kleiner als in den gesunden Kontrollzellen [79]. Eine Hyperglykämie induziert eine mitochondriale Fragmentation in verschiedenen Zelltypen, unter anderem in β -Zellen [186, 136]. In dieser Arbeit erfolgte die Darstellung der mitochondrialen Morphologie mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Green mit anschließender Untersuchung am konfokalen Laser-scannmikroskop. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte, dass die MIN6-Kontrollzellen und die primären Inselzellen der Maus ein homogenes tubulär-verzweigtes mitochondriales Netzwerk mit einem hohen Grad an Querverbindungen aufweisen. Interessanterweise wurde beobachtet, dass sich in MIN6-Zellen nach Überexpression von MiD51 ein inhomogenes Netzwerk darstellte, welches durch fragmentierte Mitochondrien mit Clusterbildung charakterisiert war. Die Ausbildung mitochondrialer Cluster verstärkte sich im Zeitverlauf. Nach 24 Stunden war eine peri-

phere Clusterbildung zu erkennen, allerdings bestand zentral ein homogenes Netzwerk. Nach 72 Stunden war kein homogenes Netzwerk mehr ersichtlich und auch eine zentrale Clusterbildung erkennbar. Die mitochondriale Aggregation erscheint primär perinukleär. Die Arbeitsgruppe um De Vos et al. konnte zeigen, dass Mitochondrien, die mit dem Tumor Nekrose Faktor (TNF) behandelt wurden, perinukleäre Cluster bilden. Diese Clusterbildung wurde spezifisch durch TNF induziert und korrelierte mit dem induzierenden Zelltod, unabhängig von der Art des aktivierten Zelltodprogramms, wie Nekrose oder Apoptose [172]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von MiD51 eine erhöhte Drp1-Rekrutierung, auch in Abwesenheit von Fis1 und Mff, zur mitochondrialen Oberfläche bewirkt. [102]. Interessanterweise zeigt jedoch die erhöhte Rekrutierung nicht die damit einhergehende erhöhte Teilungsrate. Die Mitochondrien sind stattdessen elongiert, was vermuten lässt, dass dies durch eine Inhibition der Aktivität von Drp1 bewirkt wird [135, 188, 134, 102]. Zudem zeigte eine Studie, dass es bei der Herunterregulation von MiD51 zu einer verstärkten mitochondrialen Fragmentation kommt [188]. Dies führte zur Annahme, dass MiD51 die mitochondriale Teilung inhibiert [188]. Die Fragmentierung und Clusterbildung nach Überexpression von MiD51, die in dieser Arbeit beobachtet wurde, wurde bislang nicht beschrieben. Dies könnte an einer zelltypspezifischen Regulation liegen. Die pathophysiologische Bedeutung von mitochondrialer Clusterbildung ist derzeit noch weitestgehend unbekannt. Es lässt sich vermuten, dass die Clusterbildung mit einem erschwerten Abbau von geschädigten Mitochondrien einhergeht. Physiologischerweise können geschädigte Mitochondrien aus dem mitochondrialen Lebenszyklus gelöst und mittels Bildung von Autophagosomen eliminiert werden [171, 80, 124]. Die Autophagie ist essenziell für die Aufrechterhaltung der Struktur, Masse und Funktionsfähigkeit der pankreatischen β -Zellen [88]. Allerdings scheint sie anders reguliert zu sein, da auch die spezifische Degradation von gealterten Insulingranula notwendig ist [63]. Es wurde gezeigt, dass die mitochondriale Teilung eine Voraussetzung für die Autophagie von Mitochondrien (Mitophagie) ist [171]. Eine mitochondriale Dysfunktion wird durch eine gestörte Autophagie und die unzureichende Elimination von geschädigten Mitochondrienbestandteilen begünstigt. Die Fragmentation und Clusterbildung des mitochondrialen Netzwerkes nach Überexpression von MiD51 lässt vermuten, dass die mitochondriale Dynamik dadurch gestört wird und MiD51 somit eine wichtige Rolle in pankreatischen β -Zellen einnimmt. Weitere Untersuchungen sind nötig, um herauszufinden, welche Rolle MiD51 in der Pathogenese des Diabetes mellitus spielt.

5.2 Vermindertes mitochondriales Membranpotential nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen

Mitochondrien produzieren über die chemiosmotische Kopplung ATP und gewährleisten die Energiebereitstellung für die Zelle. Die mitochondriale Elektronentransportkette ist hauptverant-

wortlich für das mitochondriale Membranpotential und die ATP Synthese. Das mitochondriale Membranpotential ist damit ein zentraler Mediator der Glukose-stimulierten Insulinsekretion [61]. Durch ein intaktes mitochondriales Membranpotential wird die Enzymaktivität der Atmungskette, die ATP-Synthese, der Proteinimport, die mitochondriale Dynamik, die Mitophagie und die reaktive Sauerstoffspezies (ROS)-Bildung kontrolliert [126]. Das mitochondriale Membranpotential spiegelt somit die energetische Kapazität wider [126]. Zusätzlich obliegt Mitochondrien auch die Regulation der Energiebalance durch die Induktion der mitochondrialen Biogenese. Der bioenergetische Status wird durch mitochondriale Teilung und Fusion bestimmt. Es gibt aber zunehmend Hinweise, dass auch ein Zusammenhang mit oxidativen Stress besteht [167]. Die Akkumulation von zerstörten oder depolarisierten Mitochondrien in pankreatischen β -Zellen wird mit oxidativem Stress und der darauffolgenden Entstehung von Diabetes assoziiert [167]. Eine der Hauptquellen von ROS ist die mitochondriale Elektronentransportkette (ETC). Wegen der unmittelbaren Nähe zu mitochondrialen Proteinen und mtDNA zur ETC, sind Mitochondrien ebenfalls das Hauptziel von ROS [167]. Eine Erhöhung der ROS Produktion konnte in β -Zellen mit Typ 2 Diabetes beobachtet werden [127]. Niedrige Konzentrationen von ROS mit akuter Exposition von Sauerstoffradikalen, zeigten eine Anregung der Insulinsekretion, während chronisch hohe Konzentrationen schädlich auf die β -Zellen wirken und Apoptose induzieren [141]. Anello et al. untersuchte Inselzellen von diabetischen Patienten und konnte zeigen, dass diabetische β -Zellen verminderte ATP Level, eine erniedrigte ATP/ADP Ratio und eine beeinträchtigte Hyperpolarisation der mitochondrialen Membran zeigen [9]. Es wird vermutet, dass MiD51 als Rezeptor für die Drp1-abhängige Teilung fungiert, aber inhibierend auf die Drp1-Aktivität wirkt. Dementsprechend übt MiD51 einen negativen Effekt auf die mitochondriale Teilung aus. Es konnte nachgewiesen werden, dass nach UV-Bestrahlung, der an Drp1 bindende Anteil von MiD51 deutlich vermindert war. Ursächlich war eine verminderte zytoplasmatische und mitochondriale Drp1 Phosphorylierung an Ser (637) einhergehend mit einer verminderten Interaktion zwischen Drp1 und MiD51 [187]. Die für die Apoptose notwendige mitochondriale Fragmentation, wird durch eine verstärkte Drp1-Rekrutierung bewirkt [54]. Wir vermuten, dass die, nach Überexpression von MiD51, zu beobachtende Fragmentierung daher mit einem Funktionsverlust des Mitochondriums assoziiert ist. Typischerweise kommt es in β -Zellen nach Glukosestimulus zur Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials [82]. Es konnte direkt nachgewiesen werden, dass die Hyperpolarisation der mitochondrialen Membran, ähnlich zu dem Protonexport aus der mitochondrialen Matrix, deutlich mit der Insulinsekretion korreliert [10]. Auch Heart et al. konnten zeigen, dass Mitochondrien in β -Zellen auf eine steigende Glukosekonzentration mit einer korrespondierenden Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials reagieren [66]. Wenn eine Depolarisation auftritt, ist es unwahrscheinlich, dass das Mitochondrion weitere Fusionsereignisse für das gesamte Depolarisationsintervall erfährt. Nach vorübergehender mitochondrialer Depolarisation wird sowohl das Membranpotential

als auch die Fusionskapazität wiederhergestellt. Bei einer Aufrechterhaltung der Depolarisation der Mitochondrienmembranen, kann das Mitochondrium aufgrund einer Verringerung der OPA1-Spiegel nicht mit dem Netzwerk verschmelzen und es kommt zur Eliminierung durch Autophagie [167].

In MIN6-Zellen war das mitochondriale Membranpotential nach Überexpression von MiD51 im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen signifikant verringert. Die Bewertung des Ausmaßes eines verminderten mitochondrialen Membranpotentials hat wie bereits dargelegt einen besonders wichtigen Stellenwert in der β -Zell Funktion. Die Studiengruppe um Gerencser et al. konnte zum ersten Mal das Ausmaß einer Glukose-stimulierten Aktivierung der mitochondrialen Polarisation quantifizieren [60]. Zellen von Diabetikern zeigten eine verringerte Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials, wenn die Glukosestimulation bis 16.7 mmol/l erhöht wurde [9]. Aktuell gibt es keine vergleichbaren Studien zum mitochondrialen Membranpotential bei Überexpression von MiD51. Das in unmittelbarem Zusammenhang zu MiD51 stehende Teilungsprotein Drp1 und die Fusionsproteine OPA1, Mfn1 und Mfn2 lassen allerdings Rückschlüsse zu, welchen Einfluss die mitochondriale Dynamik auf das mitochondriale Membranpotential hat. Eine Studie von Agarwal et al. zeigte bei Überexpression von Drp1 durch eine beeinträchtigte mitochondriale Dynamik in neuronalen Stammzellen der Ratte. Dies äußerte sich in erhöhten ROS-Leveln, einhergehend mit einem veränderten mitochondrialen Membranpotential und verminderte ATP-Konzentrationen [5]. In INS1 832/13 Zellen konnte nach Knockdown von Drp1 im Vergleich zu Kontrollzellen ein signifikant vermindertes mitochondriales Membranpotential gezeigt werden [148]. Zudem konnte ein Funktionsverlust der Fusionsproteine Mfn1 und Mfn2 Veränderungen im mitochondrialen Metabolismus, resultierend in einer Minderung des mitochondrialen Membranpotentials sowie einer reduzierten Enzymaktivität der Atmungskettenkomplexe bewirken [31]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown des Fusionsproteins OPA1 eine Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials bewirkt einhergehend mit einer Reduktion der basalen Funktion der Atmungskette [31, 128]. Ein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führt dementsprechend vermutlich zu einer Funktionseinschränkung des Mitochondriums mit einem Verlust der ATP-Generation. Des Weiteren kann vermutet werden, dass eine mitochondriale Clusterbildung durch eine verminderte Mitophagie zustande kommt. Dysfunktionale Mitochondrien werden selektiv durch Mitophagie eliminiert [80]. Frühere Studien deuten darauf hin, dass der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ein Signal für die Mitophagie darstellt [93, 183]. Störungen der Autophagie, die final für eine erfolgreiche Mitophagie notwendig ist, können zur Akkumulation von dysfunktionalen Mitochondrien führen [26, 133, 81, 47]. Weitere Untersuchungen zu spezifischen Markern von Mitophagie und Autophagie sind notwendig, um den Einfluss von MiD51 auf das mitochondriale Membranpotential und einen möglichen Zusammenhang mit einer defekten Mitophagie besser zu verstehen.

5.3 Verminderte glukose-stimulierte Insulinsekretion nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen

In gesunden pankreatischen β -Zellen kommt es zur Insulinsekretion, wenn eine erhöhte Glukoseverfügbarkeit gekoppelt durch das Glukosesensorprotein Glukokinase den mitochondrialen Energiemetabolismus erhöht. In Beziehung zu diesem Vorgang wird, durch die gesteigerten Glukosewerte, die oxidative Phosphorylierung in den β -Zellen induziert. Das mitochondriale Membranpotential hyperpolarisiert, die zytosolische ATP/ADP Ratio steigt, die ATP-sensitiven K^+ -Kanäle schließen (K_{ATP}) und das Plasmamembranpotential depolarisiert. Dadurch kommt es zum gesteigerten Calciumeinstrom in die Zelle. Diese Effekte triggern die Exozytose von Insulin, um adäquate Blutglukosewerte aufrechterhalten zu können [108, 68]. Die Störung der Insulinsekretion kann durch eine mitochondriale Dysfunktion zu einer fehlerhaften Glukosehomöostase führen, was die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 begünstigt [121].

Der mitochondriale Energiemetabolismus ist stark abhängig von der Substratbereitstellung und damit wesentlich für den Ablauf der Glukose-stimulierte Insulinsekretion (GSIS) [60]. Es gibt in Typ 2 Diabetes Modellen einige Belege für eine Korrelation der gestörten GSIS mit mitochondrialer Dysfunktion [121, 108, 104, 105]. Mitochondriale Dynamik und Morphologie wurden als Regulatoren der mitochondrialen Funktion in einer Vielzahl von Zelltypen identifiziert [95]. Diese Beobachtungen führen zur Annahme, dass eine beeinträchtigte Balance zwischen Fusion und Teilung zur Verschlechterung der β -Zellfunktion und der Progression von Diabetes mellitus Typ 2 beitragen. Es zeigte sich auch eine verminderte ATP/ADP Ratio in diabetischen Inseln im Vergleich zur Kontrollgruppe [9].

In dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der sekretorischen Leistung der Mitochondrien bezogen auf die Insulinausschüttung nach Stimulation mit 25 mmol/l Glukose. Reinhardt et al. konnte zeigen, dass eine Drp1 Überexpression in einer signifikant reduzierten Glukose-stimulierten Insulinsekretion in MIN6-Zellen im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen resultierte [148]. Die Stimulation mit 25 mmol/l Glukose führte bei den Kontrollzellen zu einer normalen Sekretionsantwort. Der Effekt auf die Sekretionsleistung bei Überexpression von MiD51 war jedoch noch stärker ausgeprägt, als bei der Drp1-Überexpression. Sowohl in MIN6-Zellen, als auch in primären Inselzellen der Maus zeigte sich eine signifikante Reduktion der Glukose-stimulierten Insulinsekretion bei 25 mmol/l Glukose. Bei den primären Maus Inselzellen lässt sich zudem zeigen, dass nach Überexpression von MiD51, bereits bei einer geringen Glukosemenge von 5 mmol/l, die basale Insulinsekretion signifikant gesteigert ist. Anhand dieser Ergebnisse wird vermutet, dass MiD51 als Rezeptor für Drp1 eine entscheidende Rolle bei der mitochondrialen Funktion spielt. Damit konnte gezeigt werden, dass die MiD51-Expression entscheidend für die Integrität der mitochondrialen Dynamik und dementsprechend auch für die Glukosesekretion in pankreatischen β -Zellen ist.

6 Zusammenfassung

Endokrine Stoffwechselerkrankungen sind mit Störungen der mitochondrialen Funktion assoziiert [36]. Der Diabetes mellitus ist die am häufigsten beschriebene endokrine Störung bei Patienten mit erblicher Mitochondriopathie [36]. Daher ist es von besonderem Interesse Pathomechanismen genauer zu betrachten. Der Diabetes mellitus Typ 2 ist als heterogenes Krankheitsbild durch eine chronisch, hyperglykämische Stoffwechsellage charakterisiert [173]. Die Kombination aus einer gestörten Insulinsekretion durch Dysfunktion der β -Zellen des Pankreas und einer peripheren Insulinresistenz in Fettgewebe und Skelettmuskulatur wird als Ursache angesehen [111, 98]. Der Diabetes Typ 2 ist aber auch mit einer mitochondrialen Dysfunktion assoziiert [104]. Mitochondrien sind hochdynamische Organellen, die stetig Fusionen und Teilungen durchlaufen. Die Balance beider Prozesse ist essenziell für die mitochondriale Funktion und zelluläre Verteilung [27, 179, 184]. Die dynamin-ähnliche GTPase Drp1 fungiert als zentraler Regulator der mitochondrialen Teilung [165, 142]. Mehrere mitochondriale Proteine der Außenmembran, dazu zählen Fis1, Mff, sowie MiD49 und MiD51, stehen im Zusammenhang mit der mitochondrialen Teilung durch die Rekrutierung von Drp1 [102, 188, 135]. Das Protein MiD51 reguliert die mitochondriale Teilung, indem es direkt mit Drp1 interagiert [134]. Seine Funktion in β -Zellen des Pankreas ist bislang unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die mitochondriale Morphologie und die zelluläre Funktion von MIN6- und primären Inselzellen der Maus nach Überexpression von MiD51 zu untersuchen. Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass eine Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen und in primären Inselzellen zu einer signifikanten Verminderung der Glukose-stimulierten Insulinsekretion führt. MiD51 spielt somit eine grundlegende Rolle bei der Funktion von pankreatischen β -Zellen und in der Ausbildung der mitochondrialen Morphologie. Das mitochondriale Netzwerk zeigte Fragmentierung und Clusterbildung nach Überexpression von MiD51. Außerdem zeigte sich durch ein vermindertes mitochondriales Membranpotential eine eingeschränkte mitochondriale Funktion, die ursächlich für den Verlust der Glukose-stimulierten Insulinsekretion angesehen werden kann. Somit konnte gezeigt werden, dass die Veränderung der mitochondrialen Dynamik mit einem gestörten Metabolismus einhergeht, der die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 begünstigen könnte. Allerdings ist noch unklar, auf welche Weise MiD51 in β -Zellen die mitochondriale Funktion und damit die GSIS reguliert. Die Clusterbildung nach Überexpression von MiD51 deutet auf eine Ansammlung von dysfunktionalen Mitochondrien in der Zelle hin. Da die Autophagie in β -Zellen sehr spezifisch reguliert wird, könnte es hier zu einer Störung in der Initiierung der Mitophagie kommen. Die genauen regulatorischen Mechanismen sind jedoch durch weitere Untersuchungen zu

überprüfen. Die Überexpression von MiD51 in β -Zellen, als Rezeptor für Drp1, führt zu einer Veränderung der mitochondrialen Struktur, die sich allerdings anders darstellt als in bereits untersuchten Zelltypen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um zu verstehen, wie eine Veränderung der MiD51-Expression zur Entwicklung einer β -Zellen Dysfunktion beitragen könnte, die ursächlich für die Entstehung eines Typ 2 Diabetes ist.

7 Thesen

1. Der Typ 2 Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die mit einem erhöhten Plasmaglukosespiegel einhergeht.
2. Der Erkrankung ist häufig eine gestörte glukose-stimulierte Insulinsekretion der pankreatischen β -Zellen zugrundeliegend.
3. Mitochondrien bilden in lebenden Zellen ein Netzwerk, welches durch ständige Teilungs- und Fusionsprozesse an die Energiebedürfnisse, Umgebungseinflüsse sowie den Entwicklungszustand angepasst wird.
4. Morphologische und funktionelle Veränderungen des mitochondrialen Netzwerkes der pankreatischen β -Zellen konnten sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell bei manifestem Diabetes mellitus festgestellt werden.
5. Das Protein MiD51 ist ein kleines Protein, welches an der äußeren mitochondrialen Membran verankert ist und als Rezeptor für das Teilungsprotein Drp1 fungiert.
6. In dieser Arbeit wurde die Rolle von MiD51 in pankreatischen β -Zellen untersucht. Hierzu wurden primäre Inselzellen der Maus und die Insulinoma Zelllinie MIN6 verwendet, in denen die Expression von MiD51 nachgewiesen werden konnte.
7. Die Überexpression von MiD51 führte zur Bildung von perinukleären mitochondrialen Clustern in MIN6-Zellen und primären Inselzellen der Maus.
8. Die Überexpression von MiD51 führte zu einem signifikant verringerten mitochondrialen Membranpotential in MIN6-Zellen.
9. Die Überexpression von MiD51 führte sowohl bei MIN6-Zellen, als auch bei primären Maus Inselzellen zu einer signifikant verringerten GSIS bei einer Stimulation mit 25 mmol/l Glukose.
10. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die MiD51-Expression entscheidend für die Integrität der mitochondrialen Dynamik in β -Zellen ist.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Mechanismus der glukose-stimulierten Insulinsekretion	3
1.2	mitochondrialer Lebenszyklus	6
1.3	Mitochondrialer Fusionsprozess	8
1.4	Struktur von Drp1	9
1.5	Modell für mitochondriale Teilung	11
1.6	Proteinstruktur	12
3.1	Neubauer improved Zählkammer	26
3.2	Mausinseln unter dem Stereomikroskop	27
3.3	Vektorkarte pcDNA3.1(-) MiD51 4xMyc His6x	29
3.4	Prinzip der A) direkten B) indirekten Immunfluoreszenz	30
3.5	Detaillierter Blotaufbau	33
3.6	Blotaufbau	34
3.7	Funktionsprinzip der RT-PCR	37
3.8	Berechnung des relativen mRNA-Expressionsunterschiedes	38
3.9	Funktionsprinzip des Insulin-ELISA	40
4.1	Mikroskopische Aufnahme von MIN6-Zellen.	41
4.2	Mikroskopische Aufnahme von primären Maus Inselzellen.	41
4.3	Quantitative RT-PCR des mitochondrialen Elongationsfaktors MiD51 in MIN6-Zellen nach Überexpression von MiD51	42
4.4	RT-PCR des mitochondrialen Elongationsfaktors MiD51 in primären Maus Inselzellen nach Überexpression von MiD51	43
4.5	Western Blot Analyse des mitochondrialen Elongationsfaktors MiD51 in MIN6-Zellen nach Überexpression von MiD51 im Vergleich zu kontrolltransfizierten MIN6-Zellen	44
4.6	Darstellung der MIN6-Zellen im Durchlicht, Immunhistochemische Darstellung der MiD51-Expression in MIN6-Zellen nach Überexpression von MiD51	45
4.7	Immunhistochemische Darstellung der Überexpression von MiD51 und der Mitochondrienstruktur in Maus-Inselzellen	46
4.8	Darstellung von Mitochondrien nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen nach 24 Stunden im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen	47
4.9	Darstellung von Mitochondrien nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen nach 48 Stunden und nach 72 Stunden	47

4.10	Analyse des mitochondrialen Membranpotentials mittels TMRE in MIN6-Zellen nach Überexpression von MiD51 im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen. . .	48
4.11	Quantifizierung des mitochondrialen Membranpotentials in MIN6-Zellen nach Überexpression von MiD51	48
4.12	Glukose-stimulierte Insulinsekretion nach Überexpression von MiD51 in MIN6-Zellen	49
4.13	Glukose-stimulierte Insulinsekretion nach Überexpression von MiD51 in primären Maus Inselzellen	50

Tabellenverzeichnis

1.1	Klassifikation des Diabetes mellitus nach ADA, 1997, EK IV; Alberti et Zimmet, 1998b, EK IV	2
2.1	Zellen	15
2.2	Kulturmedien	15
2.3	Reagenzien für Inselisolation	16
2.4	Vektoren	16
2.5	Reagenz	16
2.6	Antikörper	17
2.7	Sonden	17
2.8	Farbstoffe	18
2.9	Molekulargewichtsmarker	18
2.10	Enzyme	18
2.11	Kits	19
2.12	Chemikalien	20
2.13	Puffer und Lösungen	22
2.14	Verbrauchsmaterialien	22
2.15	Geräte	24
3.1	Transfektionsreagenzien	28
3.2	Cycler-Programm für cDNA-Synthese	36
3.3	Reaktionsansatz RT-PCR	37
3.4	RT-PCR-Programm	38

Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celcius
α	Alpha
β	Beta
δ	Delta
AA/Bis AA	Acrylamid/Bisacrylamid
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
c-Myc	zelluläre Myelocytomatose
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ct	cycle of threshold
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
Drp1	dynamamin-related protein 1
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay

ETC	Elektronentransportkette
FCS	Fetales Kälberserum
Fis1	mitochondrial fission protein 1
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GIP	glucose-dependent insulinotropic peptide
GLP-1	glucagon-like peptide
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
GSIS	Glukose-stimulierte Insulinsekretion
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, eine Puffersubstanz
HR2	Heptad Repeat 2
HRP	Horseradish Peroxidase
M-Phase	Mitose-Phase
Mfn1	Mitofusin 1
Mfn2	Mitofusin 2
MGB	minor groove binder
MiD	mitochondrial dynamics protein
MiD49	mitochondrial dynamics protein of 49 kDa
MiD51	mitochondrial dynamics protein of 51 kDa
MIEF1	Mitochondrialer Elongationsfaktor 1
MIEF2	Mitochondrialer Elongationsfaktor 2
Mff	mitochondrial fission factor
MIN6	Maus-Insulinoma-Zelllinie

MIS	mitochondriale Import Sequenz
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NMRI	naval medical research Institute
NP-40	Natriumpyruvat
OPA1	optic atrophy 1
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline = Phosphatgepufferte Salzlösung
pcDNA	Plasmid Cytomegalievirus Desoxyribonukleinsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
PP	pankreatisches Polypeptid
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rotationen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	RealTime Polymerasekettenreaktion
S-Phase	Synthese-Phase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-Page	Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gelelektrophorese
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor

SV40	silian vacuolating virus 40
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3'-5,5' Tetramethylbenzidine
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

Literaturverzeichnis

- [1] THERMOFISHER (Hrsg.): *Firefly luciferase reaction and example luciferase assay result*. <http://thermofisher.com/order/catalog/product/16176>
- [2] THERMOFISHER (Hrsg.): *Western Blot Transfer Methods | Thermo Fisher Scientific*. <https://www.thermofisher.com/ng/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/western-blot-transfer-methods.html>
- [3] SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG (Hrsg.): *ABC-Technik*. <http://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/abc-technik/9>. Version: 1999
- [4] LIFE SPAN BIOSCIENCES, I. (Hrsg.): *LSBio Sandwich ELISA Kits*. www.lsbio.com/products/elisakits/sandwich. Version: 2016
- [5] AGARWAL, S. ; YADAV, A. ; TIWARI, S. K. ; SETH, B. ; CHAUHAN, L. K. S. ; KHARE, P. ; RAY, R. S. ; CHATURVEDI, R. K.: Dynamin-related Protein 1 Inhibition Mitigates Bisphenol A-mediated Alterations in Mitochondrial Dynamics and Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation. In: *The Journal of biological chemistry* 291 (2016), Nr. 31, S. 15923–15939. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.709493>. – DOI 10.1074/jbc.M115.709493. – ISSN 0021–9258
- [6] AKEPATI, V. R. ; MULLER, E.-C. ; OTTO, A. ; STRAUSS, H. M. ; PORTWICH, M. ; ALEXANDER, C. : Characterization of OPA1 isoforms isolated from mouse tissues. In: *Journal of neurochemistry* 106 (2008), Nr. 1, S. 372–383. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05401.x>. – DOI 10.1111/j.1471-4159.2008.05401.x. – ISSN 0022–3042
- [7] ALEXANDER, C. ; VOTRUBA, M. ; PESCH, U. E. ; THISELTON, D. L. ; MAYER, S. ; MOORE, A. ; RODRIGUEZ, M. ; KELLNER, U. ; LEO-KOTTLER, B. ; AUBURGER, G. ; BHATTACHARYA, S. S. ; WISSINGER, B. : OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. In: *Nature genetics* 26 (2000), Nr. 2, S. 211–215. <http://dx.doi.org/10.1038/79944>. – DOI 10.1038/79944. – ISSN 1061–4036
- [8] ANDERSSON, S. G. ; ZOMORODIPOUR, A. ; ANDERSSON, J. O. ; SICHERITZ-PONTEN, T. ; ALSMARK, U. C. ; PODOWSKI, R. M. ; NASLUND, A. K. ; ERIKSSON, A. S. ; WINKLER, H. H. ; KURLAND, C. G.: The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin

- of mitochondria. In: *Nature* 396 (1998), Nr. 6707, S. 133–140. <http://dx.doi.org/10.1038/24094>. – DOI 10.1038/24094. – ISSN 0028–0836
- [9] ANELLO, M. ; LUPI, R. ; SPAMPINATO, D. ; PIRO, S. ; MASINI, M. ; BOGGI, U. ; DEL PRATO, S. ; RABUAZZO, A. M. ; PURRELLO, F. ; MARCHETTI, P. : Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. In: *Diabetologia* 48 (2005), Nr. 2, S. 282–289. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-004-1627-9>. – DOI 10.1007/s00125-004-1627-9. – ISSN 0012–186X
- [10] ANTINOZZI, P. A. ; ISHIHARA, H. ; NEWGARD, C. B. ; WOLLHEIM, C. B.: Mitochondrial metabolism sets the maximal limit of fuel-stimulated insulin secretion in a model pancreatic beta cell: a survey of four fuel secretagogues. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (2002), Nr. 14, S. 11746–11755. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M108462200>. – DOI 10.1074/jbc.M108462200. – ISSN 0021–9258
- [11] ARDEN, C. ; BALTRUSCH, S. ; AGIUS, L. : Glucokinase regulatory protein is associated with mitochondria in hepatocytes. In: *FEBS letters* 580 (2006), Nr. 8, S. 2065–2070. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.009>. – DOI 10.1016/j.febslet.2006.03.009. – ISSN 0014–5793
- [12] ARIMURA, S.-i. ; YAMAMOTO, J. ; AIDA, G. P. ; NAKAZONO, M. ; TSUTSUMI, N. : Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004), Nr. 20, S. 7805–7808. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0401077101>. – DOI 10.1073/pnas.0401077101. – ISSN 0027–8424
- [13] BEHRENDTS, J. C. ; BISCHOFBERGER, J. ; DEUTZMANN, R. ; EHMKE, H. ; FRINGS, S. ; GRISSMER, S. ; HOTH, M. ; KURTZ, A. ; LEIPZIGER, J. ; MÜLLER, F. ; PEDAIN, C. ; RETTIG, J. ; WAGNER, C. ; WISCHMEYER, E. : *Physiologie: 93 Tabellen. 2., überarbeitete Auflage*. Stuttgart : Thieme, 2012 (Duale Reihe). – ISBN 9783131531629
- [14] BELL, R. H. JR. ; MEMOLI, V. A. ; LONGNECKER, D. S.: Hyperplasia and tumors of the islets of Langerhans in mice bearing an elastase I-SV40 T-antigen fusion gene. In: *Carcinogenesis* (1990), S. 1393–1398
- [15] BEREITER-HAHN, J. ; VOTH, M. : Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. In: *Microscopy research and technique* 27 (1994), Nr. 3, S. 198–219. <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.1070270303>. – DOI 10.1002/jemt.1070270303. – ISSN 1059–910X

- [16] BINDOKAS, V. P. ; KUZNETSOV, A. ; SREENAN, S. ; POLONSKY, K. S. ; ROE, M. W. ; PHILIPSON, L. H.: Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (2003), Nr. 11, S. 9796–9801. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M206913200>. – DOI 10.1074/jbc.M206913200. – ISSN 0021–9258
- [17] BIOCHROM AG: *FAQ zum Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen in TPP-Kryoröhrchen*. http://www.biochrom.de/fileadmin/user_upload/service/FAQ/110616_biochrom_faq_kryoroehrchen.pdf. Version: 2011
- [18] BLEAZARD, W. ; MCCAFFERY, J. M. ; KING, E. J. ; BALE, S. ; MOZDY, A. ; TIEU, Q. ; NUNNARI, J. ; SHAW, J. M.: The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. In: *Nature cell biology* 1 (1999), Nr. 5, S. 298–304. <http://dx.doi.org/10.1038/13014>. – DOI 10.1038/13014. – ISSN 1465–7392
- [19] BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1976), Nr. 1-2, S. 248–254. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3). – DOI 10.1016/0003–2697(76)90527–3. – ISSN 00032697
- [20] BRAND, M. D.: Regulation analysis of energy metabolism. In: *The Journal of experimental biology* 200 (1997), Nr. Pt 2, S. 193–202. – ISSN 0022–0949
- [21] BRUCE, C. R. ; ANDERSON, M. J. ; CAREY, A. L. ; NEWMAN, D. G. ; BONEN, A. ; KRIKETOS, A. D. ; COONEY, G. J. ; HAWLEY, J. A.: Muscle oxidative capacity is a better predictor of insulin sensitivity than lipid status. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88 (2003), Nr. 11, S. 5444–5451. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2003-030791>. – DOI 10.1210/jc.2003–030791. – ISSN 0021–972X
- [22] BUDDECKE, E. : *Molekulare Medizin: Eine systematische Einführung*. Landsberg/Lech : ecomed, 2002. – ISBN 3609160918
- [23] BURTÉ, F. ; CARELLI, V. ; CHINNERY, P. F. ; YU-WAI-MAN, P. : Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. In: *Nature reviews. Neurology* 11 (2015), Nr. 1, S. 11–24. <http://dx.doi.org/10.1038/nrneuro1.2014.228>. – DOI 10.1038/nrneuro1.2014.228
- [24] CEREGHETTI, G. M. ; STANGHERLIN, A. ; MARTINS DE BRITO, O. ; CHANG, C. R. ; BLACKSTONE, C. ; BERNARDI, P. ; SCORRANO, L. : Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (2008), Nr. 41, S. 15803–15808. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0710111105>. – DOI 10.1073/pnas.0710111105. – ISSN 0027–8119

//dx.doi.org/10.1073/pnas.0808249105. – DOI 10.1073/pnas.0808249105. – ISSN 0027–8424

- [25] CHAN, D. C.: Mitochondria: Dynamic organelles in disease, aging, and development. In: *Cell* 125 (2006), Nr. 7, S. 1241–1252. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.010>. – DOI 10.1016/j.cell.2006.06.010. – ISSN 0092–8674
- [26] CHAN, D. C.: Mitochondrial fusion and fission in mammals. In: *Annual review of cell and developmental biology* 22 (2006), S. 79–99. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104638>. – DOI 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104638. – ISSN 1081–0706
- [27] CHAN, D. C.: Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. In: *Annual review of genetics* 46 (2012), S. 265–287. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132529>. – DOI 10.1146/annurev-genet-110410-132529. – ISSN 0066–4197
- [28] CHANG, C.-R. ; BLACKSTONE, C. : Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (2007), Nr. 30, S. 21583–21587. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C700083200>. – DOI 10.1074/jbc.C700083200. – ISSN 0021–9258
- [29] CHEN, H. ; CHAN, D. C.: Mitochondrial dynamics in mammals. In: *Current topics in developmental biology* 59 (2004), S. 119–144. [http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153\(04\)59005-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153(04)59005-1). – DOI 10.1016/S0070-2153(04)59005-1. – ISSN 0070–2153
- [30] CHEN, H. ; CHAN, D. C.: Mitochondrial dynamics–fusion, fission, movement, and mitophagy–in neurodegenerative diseases. In: *Human molecular genetics* 18 (2009), Nr. R2, S. R169–76. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddp326>. – DOI 10.1093/hmg/ddp326
- [31] CHEN, H. ; CHOMYN, A. ; CHAN, D. C.: Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (2005), Nr. 28, S. 26185–26192. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M503062200>. – DOI 10.1074/jbc.M503062200. – ISSN 0021–9258
- [32] CHEN, H. ; DETMER, S. A. ; EWALD, A. J. ; GRIFFIN, E. E. ; FRASER, S. E. ; CHAN, D. C.: Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. In: *The Journal of cell biology* 160 (2003), Nr. 2, S. 189–200. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200211046>. – DOI 10.1083/jcb.200211046. – ISSN 0021–9525
- [33] CHEN, H. ; REN, S. ; CLISH, C. ; JAIN, M. ; MOOTHA, V. ; MCCAFFERY, J. M. ; CHAN, D. C.: Titration of mitochondrial fusion rescues Mff-deficient cardiomyopathy. In: *The*

- Journal of cell biology* 211 (2015), Nr. 4, S. 795–805. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201507035>. – DOI 10.1083/jcb.201507035. – ISSN 0021–9525
- [34] CHINNERY, P. F.: Mitochondria. In: *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 74 (2003), Nr. 9, S. 1188–1199. <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.74.9.1188>. – DOI 10.1136/jnnp.74.9.1188. – ISSN 0022–3050
- [35] CHO, D.-H. ; NAKAMURA, T. ; FANG, J. ; CIEPLAK, P. ; GODZIK, A. ; GU, Z. ; LIPTON, S. A.: S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. In: *Science (New York, N.Y.)* 324 (2009), Nr. 5923, S. 102–105. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1171091>. – DOI 10.1126/science.1171091. – ISSN 0036–8075
- [36] CHOW, J. ; RAHMAN, J. ; ACHERMANN, J. C. ; DATTANI, M. T. ; RAHMAN, S. : Mitochondrial disease and endocrine dysfunction. In: *Nature reviews. Endocrinology* 13 (2017), Nr. 2, S. 92–104. <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2016.151>. – DOI 10.1038/nrendo.2016.151. – ISSN 1759–5037
- [37] CIPOLAT, S. ; MARTINS DE BRITO, O. ; DAL ZILIO, B. ; SCORRANO, L. : OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004), Nr. 45, S. 15927–15932. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0407043101>. – DOI 10.1073/pnas.0407043101. – ISSN 0027–8424
- [38] CIPOLAT, S. ; RUDKA, T. ; HARTMANN, D. ; COSTA, V. ; SERNEELS, L. ; CRAESSAERTS, K. ; METZGER, K. ; FREZZA, C. ; ANNAERT, W. ; D’ADAMIO, L. ; DERKS, C. ; DEJAEGERE, T. ; PELLEGRINI, L. ; D’HOOGHE, R. ; SCORRANO, L. ; STROOPER, B. de: Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. In: *Cell* 126 (2006), Nr. 1, S. 163–175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.021>. – DOI 10.1016/j.cell.2006.06.021. – ISSN 0092–8674
- [39] COHEN, M. M. ; AMIOTT, E. A. ; DAY, A. R. ; LEBOUCHER, G. P. ; PRYCE, E. N. ; GLICKMAN, M. H. ; MCCAFFERY, J. M. ; SHAW, J. M. ; WEISSMAN, A. M.: Sequential requirements for the GTPase domain of the mitofusin Fzo1 and the ubiquitin ligase SCFMdm30 in mitochondrial outer membrane fusion. In: *Journal of cell science* 124 (2011), Nr. Pt 9, S. 1403–1410. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.079293>. – DOI 10.1242/jcs.079293. – ISSN 0021–9533
- [40] CRIBBS, J. T. ; STRACK, S. : Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. In: *EMBO*

- reports* 8 (2007), Nr. 10, S. 939–944. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7401062>.
– DOI 10.1038/sj.embor.7401062. – ISSN 1469–221X
- [41] DAVID CHAN ; ADDGENE (Hrsg.): *pcDNA3.1(-) MID51 4xMyc Hisx6*. <https://www.addgene.org/44598/>
- [42] DEL GUERRA, S. ; LUPI, R. ; MARSELLI, L. ; MASINI, M. ; BUGLIANI, M. ; SBRANA, S. ; TORRI, S. ; POLLERA, M. ; BOGGI, U. ; MOSCA, F. ; DEL PRATO, S. ; MARCHETTI, P. : Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. In: *Diabetes* 54 (2005), Nr. 3, S. 727–735. – ISSN 0012–1797
- [43] DELETTRE, C. ; LENAERS, G. ; GRIFFOIN, J. M. ; GIGAREL, N. ; LORENZO, C. ; BELLENGUER, P. ; PELLOQUIN, L. ; GROSGEORGE, J. ; TURC-CAREL, C. ; PERRET, E. ; ASTARIE-DEQUEKER, C. ; LASQUELLEC, L. ; ARNAUD, B. ; DUCOMMUN, B. ; KAPLAN, J. ; HAMEL, C. P.: Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. In: *Nature genetics* 26 (2000), Nr. 2, S. 207–210. <http://dx.doi.org/10.1038/79936>. – DOI 10.1038/79936. – ISSN 1061–4036
- [44] DENG, S. ; VATAMANIUK, M. ; HUANG, X. ; DOLIBA, N. ; LIAN, M.-M. ; FRANK, A. ; VELIDEDEOGLU, E. ; DESAI, N. M. ; KOEBERLEIN, B. ; WOLF, B. ; BARKER, C. F. ; NAJI, A. ; MATSCHINSKY, F. M. ; MARKMANN, J. F.: Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. In: *Diabetes* 53 (2004), Nr. 3, S. 624–632. – ISSN 0012–1797
- [45] DETMER, S. A. ; CHAN, D. C.: Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (2007), Nr. 11, S. 870–879. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2275>. – DOI 10.1038/nrm2275. – ISSN 1471–0072
- [46] DIKOV, D. ; REICHERT, A. S.: How to split up: Lessons from mitochondria. In: *The EMBO Journal* 30 (2011), Nr. 14, S. 2751–2753. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.219>. – DOI 10.1038/emboj.2011.219. – ISSN 02614189
- [47] DIMAURO, S. ; SCHON, E. A.: Mitochondrial disorders in the nervous system. In: *Annual review of neuroscience* 31 (2008), S. 91–123. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094302>. – DOI 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094302
- [48] DLASKOVÁ, A. ; SPACEK, T. ; SANTOROVÁ, J. ; PLECITÁ-HLAVATÁ, L. ; BERKOVÁ, Z. ; SAUDEK, F. ; LESSARD, M. ; BEWERSDORF, J. ; JEZEK, P. : 4Pi microscopy reveals an impaired three-dimensional mitochondrial network of pancreatic islet beta-cells, an experimental model of type-2 diabetes. In: *Biochimica et biophysica acta* 1797 (2010),

- Nr. 6-7, S. 1327–1341. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabbio.2010.02.003>. – DOI 10.1016/j.bbabbio.2010.02.003. – ISSN 0006–3002
- [49] ELGASS, K. ; PAKAY, J. ; RYAN, M. T. ; PALMER, C. S.: Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. In: *Biochimica et biophysica acta* 1833 (2013), Nr. 1, S. 150–161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.002>. – DOI 10.1016/j.bbamcr.2012.05.002. – ISSN 0006–3002
- [50] ELGASS, K. D. ; SMITH, E. A. ; LEGROS, M. A. ; LARABELL, C. A. ; RYAN, M. T.: Analysis of ER-mitochondria contacts using correlative fluorescence microscopy and soft X-ray tomography of mammalian cells. In: *Journal of cell science* 128 (2015), Nr. 15, S. 2795–2804. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.169136>. – DOI 10.1242/jcs.169136. – ISSN 0021–9533
- [51] FERNANDEZ-ALVAREZ, J. ; CONGET, I. ; RASSCHAERT, J. ; SENER, A. ; GOMIS, R. ; MALAISSE, W. J.: Enzymatic, metabolic and secretory patterns in human islets of type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. In: *Diabetologia* 37 (1994), Nr. 2, S. 177–181. – ISSN 0012–186X
- [52] FERRANNINI, E. ; GASTALDELLI, A. ; MIYAZAKI, Y. ; MATSUDA, M. ; PETTITI, M. ; NATALI, A. ; MARI, A. ; DEFONZO, R. A.: Predominant role of reduced beta-cell sensitivity to glucose over insulin resistance in impaired glucose tolerance. In: *Diabetologia* 46 (2003), Nr. 9, S. 1211–1219. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-003-1169-6>. – DOI 10.1007/s00125-003-1169-6. – ISSN 0012–186X
- [53] FIGUEROA-ROMERO, C. ; INIGUEZ-LLUHI, J. A. ; STADLER, J. ; CHANG, C.-R. ; ARNOULT, D. ; KELLER, P. J. ; HONG, Y. ; BLACKSTONE, C. ; FELDMAN, E. L.: SUMOylation of the mitochondrial fission protein Drp1 occurs at multiple nonconsensus sites within the B domain and is linked to its activity cycle. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (2009), Nr. 11, S. 3917–3927. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.09-136630>. – DOI 10.1096/fj.09-136630. – ISSN 0892–6638
- [54] FRANK, S. ; GAUME, B. ; BERGMANN-LEITNER, E. S. ; LEITNER, W. W. ; ROBERT, E. G. ; CATEZ, F. ; SMITH, C. L. ; YOULE, R. J.: The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. In: *Developmental cell* 1 (2001), Nr. 4, S. 515–525. – ISSN 1534–5807
- [55] FREZZA, C. ; CIPOLAT, S. ; MARTINS DE BRITO, O. ; MICARONI, M. ; BEZNOUSSENKO, G. V. ; RUDKA, T. ; BARTOLI, D. ; POLISHUCK, R. S. ; DANIAL, N. N. ; STROOPER,

- B. de ; SCORRANO, L. : OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. In: *Cell* 126 (2006), Nr. 1, S. 177–189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.025>. – DOI 10.1016/j.cell.2006.06.025. – ISSN 0092–8674
- [56] FRIEDMAN, J. R. ; LACKNER, L. L. ; WEST, M. ; DiBENEDETTO, J. R. ; NUNNARI, J. ; VOELTZ, G. K.: ER tubules mark sites of mitochondrial division. In: *Science (New York, N.Y.)* 334 (2011), Nr. 6054, S. 358–362. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1207385>. – DOI 10.1126/science.1207385. – ISSN 0036–8075
- [57] GALLOWAY, C. A. ; YOON, Y. : Mitochondrial morphology in metabolic diseases. In: *Antioxidants & redox signaling* 19 (2013), Nr. 4, S. 415–430. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.4779>. – DOI 10.1089/ars.2012.4779. – ISSN 1557–7716
- [58] GANDRE-BABBE, S. ; VAN DER BLIEK, A. M.: The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. In: *Molecular biology of the cell* 19 (2008), Nr. 6, S. 2402–2412. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E07-12-1287>. – DOI 10.1091/mbc.E07-12-1287. – ISSN 1059–1524
- [59] GAWLOWSKI, T. ; SUAREZ, J. ; SCOTT, B. ; TORRES-GONZALEZ, M. ; WANG, H. ; SCHWAPPACHER, R. ; HAN, X. ; YATES, J. R. r. ; HOSHIJIMA, M. ; DILLMANN, W. : Modulation of dynamin-related protein 1 (DRP1) function by increased O-linked-beta-N-acetylglucosamine modification (O-GlcNAc) in cardiac myocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (2012), Nr. 35, S. 30024–30034. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.390682>. – DOI 10.1074/jbc.M112.390682. – ISSN 0021–9258
- [60] GERENCSEK, A. A.: Bioenergetic Analysis of Single Pancreatic β -Cells Indicates an Impaired Metabolic Signature in Type 2 Diabetic Subjects. In: *Endocrinology* 156 (2015), Nr. 10, S. 3496–3503. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2015-1552>. – DOI 10.1210/en.2015-1552. – ISSN 0013–7227
- [61] GERENCSEK, A. A. ; MOOKERJEE, S. A. ; JASTROCH, M. ; BRAND, M. D.: Measurement of the Absolute Magnitude and Time Courses of Mitochondrial Membrane Potential in Primary and Clonal Pancreatic Beta-Cells. In: *PloS one* 11 (2016), Nr. 7, S. e0159199. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0159199>. – DOI 10.1371/journal.pone.0159199. – ISSN 1932–6203
- [62] GILKERSON, R. W. ; SCHON, E. A. ; HERNANDEZ, E. ; DAVIDSON, M. M.: Mitochondrial nucleoids maintain genetic autonomy but allow for functional complementation. In: *The Journal of cell biology* 181 (2008), Nr. 7, S. 1117–1128. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200712101>. – DOI 10.1083/jcb.200712101. – ISSN 0021–9525

- [63] GOGINASHVILI, A. ; ZHANG, Z. ; ERBS, E. ; SPIEGELHALTER, C. ; KESSLER, P. ; MIHLAN, M. ; PASQUIER, A. ; KRUPINA, K. ; SCHIEBER, N. ; CINQUE, L. ; MORVAN, J. ; SUMARRA, I. ; SCHWAB, Y. ; SETTEMBRE, C. ; RICCI, R. : Insulin granules. Insulin secretory granules control autophagy in pancreatic β cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 347 (2015), Nr. 6224, S. 878–882. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aaa2628>. – DOI 10.1126/science.aaa2628. – ISSN 0036–8075
- [64] GRANDEMANGE, S. ; HERZIG, S. ; MARTINOU, J.-C. : Mitochondrial dynamics and cancer. In: *Seminars in cancer biology* 19 (2009), Nr. 1, S. 50–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.12.001>. – DOI 10.1016/j.semcancer.2008.12.001. – ISSN 1044–579X
- [65] GRIPARIC, L. ; VAN DER WEL, N. N. ; OROZCO, I. J. ; PETERS, P. J. ; VAN DER BLIEK, A. M.: Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (2004), Nr. 18, S. 18792–18798. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M400920200>. – DOI 10.1074/jbc.M400920200. – ISSN 0021–9258
- [66] HEART, E. ; YANEY, G. C. ; CORKEY, R. F. ; SCHULTZ, V. ; LUC, E. ; LIU, L. ; DEENEY, J. T. ; SHIRIHAI, O. ; TORNHEIM, K. ; SMITH, P. J. S. ; CORKEY, B. E.: Ca²⁺, NAD(P)H and membrane potential changes in pancreatic beta-cells by methyl succinate: Comparison with glucose. In: *The Biochemical journal* 403 (2007), Nr. 1, S. 197–205. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20061209>. – DOI 10.1042/BJ20061209
- [67] HEINRICH, P. C. (Hrsg.) ; MÜLLER, M. (Hrsg.) ; GRAEVE, L. (Hrsg.) ; LÖFFLER, G. (Hrsg.): *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9., vollst. überarb. Aufl. Springer (Springer-Lehrbuch). <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3>. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3>. – ISBN 978–3–642–17971–6
- [68] HOEKS, J. ; HESSELINK, M. K. C. ; RUSSELL, A. P. ; MENSINK, M. ; SARIS, W. H. M. ; MENSINK, R. P. ; SCHRAUWEN, P. : Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and insulin resistance: acute effect of fatty acids. In: *Diabetologia* 49 (2006), Nr. 10, S. 2419–2426. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-006-0369-2>. – DOI 10.1007/s00125-006-0369-2. – ISSN 0012–186X
- [69] HOM, J. ; SHEU, S.-S. : Morphological dynamics of mitochondria—a special emphasis on cardiac muscle cells. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 46 (2009), Nr. 6, S. 811–820. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.02.023>. – DOI 10.1016/j.yjmcc.2009.02.023. – ISSN 0022–2828
- [70] HUR, K. Y. ; JUNG, H. S. ; LEE, M.-S. : Role of autophagy in β -cell function and mass. In: *Diabetes, obesity & metabolism* 12 Suppl 2 (2010), S. 20–26. <http://dx.doi.org/10.1002/dm.2010>

org/10.1111/j.1463-1326.2010.01278.x. – DOI 10.1111/j.1463-1326.2010.01278.x. – ISSN 1463-1326

- [71] HYDE, B. B. ; TWIG, G. ; SHIRIHAI, O. S.: Organellar vs cellular control of mitochondrial dynamics. In: *Seminars in cell & developmental biology* 21 (2010), Nr. 6, S. 575–581. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2010.01.003>. – DOI 10.1016/j.semcd.2010.01.003. – ISSN 1084-9521
- [72] INCELLIGENCE: *Manuelle Zellzählung in der Zählkammer*. <http://www.incelligence.de/zellkultur/zellzaehlung/zellzaehlung-anleitung>
- [73] INGERMAN, E. ; PERKINS, E. M. ; MARINO, M. ; MEARS, J. A. ; MCCAFFERY, J. M. ; HINSHAW, J. E. ; NUNNARI, J. : Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. In: *The Journal of cell biology* 170 (2005), Nr. 7, S. 1021–1027. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200506078>. – DOI 10.1083/jcb.200506078. – ISSN 0021-9525
- [74] INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION: *Prävalenz und Fallzahlen von Diabetes und Glukosetoleranzstörungen (IGT) weltweit in den Jahren 2015 und 2040*. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/256852/umfrage/praevalenz-und-fallzahlen-von-diabetes-und-glukosetoleranzstoerungen-weltweit/>.
Version: 2016
- [75] ISHIHARA, H. ; ASANO, T. ; TSUKUDA, K. ; KATAGIRI, H. ; INUKAI, K. ; ANAI, M. ; KIKUCHI, M. ; YAZAKI, Y. ; MIYAZAKI, J. I. ; OKA, Y. : Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. In: *Diabetologia* 36 (1993), Nr. 11, S. 1139–1145. – ISSN 0012-186X
- [76] ISHIHARA, N. ; FUJITA, Y. ; OKA, T. ; MIHARA, K. : Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. In: *The EMBO Journal* 25 (2006), Nr. 13, S. 2966–2977. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601184>. – DOI 10.1038/sj.emboj.7601184. – ISSN 02614189
- [77] ISHIHARA, N. ; NOMURA, M. ; JOFUKU, A. ; KATO, H. ; SUZUKI, S. O. ; MASUDA, K. ; OTERA, H. ; NAKANISHI, Y. ; NONAKA, I. ; GOTO, Y.-i. ; TAGUCHI, N. ; MORINAGA, H. ; MAEDA, M. ; TAKAYANAGI, R. ; YOKOTA, S. ; MIHARA, K. : Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. In: *Nature Cell Biology* 11 (2009), Nr. 8, S. 958–966. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1907>. – DOI 10.1038/ncb1907. – ISSN 1465-7392

- [78] KAHN, S. E. ; MONTGOMERY, B. ; HOWELL, W. ; LIGUEROS-SAYLAN, M. ; HSU, C. H. ; DEVINENI, D. ; MCLEOD, J. F. ; HOROWITZ, A. ; FOLEY, J. E.: Importance of early phase insulin secretion to intravenous glucose tolerance in subjects with type 2 diabetes mellitus. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86 (2001), Nr. 12, S. 5824–5829. <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.86.12.8105>. – DOI 10.1210/jcem.86.12.8105. – ISSN 0021–972X
- [79] KELLEY, D. E. ; HE, J. ; MENSHIKOVA, E. V. ; RITOV, V. B.: Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. In: *Diabetes* 51 (2002), Nr. 10, S. 2944–2950. – ISSN 0012–1797
- [80] KIM, I. ; RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S. ; LEMASTERS, J. J.: Selective degradation of mitochondria by mitophagy. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 462 (2007), Nr. 2, S. 245–253. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2007.03.034>. – DOI 10.1016/j.abb.2007.03.034. – ISSN 0003–9861
- [81] KIM, J.-H. ; KIM, H. Y. ; LEE, Y.-K. ; YOON, Y.-S. ; XU, W. G. ; YOON, J.-K. ; CHOI, S.-E. ; KO, Y.-G. ; KIM, M.-J. ; LEE, S.-J. ; WANG, H.-J. ; YOON, G. : Involvement of mitophagy in oncogenic K-Ras-induced transformation: Overcoming a cellular energy deficit from glucose deficiency. In: *Autophagy* 7 (2011), Nr. 10, S. 1187–1198. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.7.10.16643>. – DOI 10.4161/auto.7.10.16643
- [82] KINDMARK, H. ; KÖHLER, M. ; BROWN, G. ; BRÄNSTRÖM, R. ; LARSSON, O. ; BERGGREN, P. O.: Glucose-induced oscillations in cytoplasmic free Ca²⁺ concentration precede oscillations in mitochondrial membrane potential in the pancreatic beta-cell. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (2001), Nr. 37, S. 34530–34536. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M102492200>. – DOI 10.1074/jbc.M102492200. – ISSN 0021–9258
- [83] KNOTT, A. B. ; BOSSY-WETZEL, E. : Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147 (2008), S. 283–292. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1427.030>. – DOI 10.1196/annals.1427.030. – ISSN 0077–8923
- [84] KOIRALA, S. ; GUO, Q. ; KALIA, R. ; BUI, H. T. ; ECKERT, D. M. ; FROST, A. ; SHAW, J. M.: Interchangeable adaptors regulate mitochondrial dynamin assembly for membrane scission. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (2013), Nr. 15, S. E1342–51. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1300855110>. – DOI 10.1073/pnas.1300855110. – ISSN 0027–8424
- [85] KOSHIBA, T. ; DETMER, S. A. ; KAISER, J. T. ; CHEN, H. ; MCCAFFERY, J. M. ; CHAN, D. C.: Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. In: *Science (New*

- York, N.Y.*) 305 (2004), Nr. 5685, S. 858–862. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1099793>. – DOI 10.1126/science.1099793. – ISSN 0036–8075
- [86] KROLS, M. ; VAN ISTERDAEL, G. ; ASSELBERGH, B. ; KREMER, A. ; LIPPENS, S. ; TIMMERMAN, V. ; JANSSENS, S. : Mitochondria-associated membranes as hubs for neurodegeneration. In: *Acta neuropathologica* 131 (2016), Nr. 4, S. 505–523. <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-015-1528-7>. – DOI 10.1007/s00401-015-1528-7. – ISSN 1432–0533
- [87] LACKNER, L. L. ; NUNNARI, J. : Small molecule inhibitors of mitochondrial division: tools that translate basic biological research into medicine. In: *Chemistry & biology* 17 (2010), Nr. 6, S. 578–583. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.05.016>. – DOI 10.1016/j.chembiol.2010.05.016. – ISSN 1074–5521
- [88] LAS, G. ; SHIRIHAI, O. S.: The role of autophagy in β -cell lipotoxicity and type 2 diabetes. In: *Diabetes, obesity & metabolism* 12 Suppl 2 (2010), S. 15–19. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01268.x>. – DOI 10.1111/j.1463-1326.2010.01268.x. – ISSN 1463–1326
- [89] LEAHY, J. L.: Natural history of beta-cell dysfunction in NIDDM. In: *Diabetes care* 13 (1990), Nr. 9, S. 992–1010. – ISSN 0149–5992
- [90] LEE, Y.-j. ; JEONG, S.-Y. ; KARBOWSKI, M. ; SMITH, C. L. ; YOULE, R. J.: Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. In: *Molecular biology of the cell* 15 (2004), Nr. 11, S. 5001–5011. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E04-04-0294>. – DOI 10.1091/mbc.E04-04-0294. – ISSN 1059–1524
- [91] LEGROS, F. ; LOMBES, A. ; FRACHON, P. ; ROJO, M. : Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. In: *Molecular biology of the cell* 13 (2002), Nr. 12, S. 4343–4354. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E02-06-0330>. – DOI 10.1091/mbc.E02-06-0330. – ISSN 1059–1524
- [92] LEGROS, F. ; MALKA, F. ; FRACHON, P. ; LOMBES, A. ; ROJO, M. : Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. In: *Journal of cell science* 117 (2004), Nr. Pt 13, S. 2653–2662. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.01134>. – DOI 10.1242/jcs.01134. – ISSN 0021–9533
- [93] LEMASTERS, J. J.: Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. In: *Rejuvenation research* 8 (2005), Nr. 1, S. 3–5. <http://dx.doi.org/10.1089/rej.2005.8.3>. – DOI 10.1089/rej.2005.8.3. – ISSN 1549–1684

- [94] LIESA, M. ; BORDA-D'AGUA, B. ; MEDINA-GOMEZ, G. ; LELLIOTT, C. J. ; PAZ, J. C. ; ROJO, M. ; PALACIN, M. ; VIDAL-PUIG, A. ; ZORZANO, A. : Mitochondrial fusion is increased by the nuclear coactivator PGC-1beta. In: *PloS one* 3 (2008), Nr. 10, S. e3613. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003613>. – DOI 10.1371/journal.pone.0003613. – ISSN 1932–6203
- [95] LIESA, M. ; PALACIN, M. ; ZORZANO, A. : Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. In: *Physiological reviews* 89 (2009), Nr. 3, S. 799–845. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00030.2008>. – DOI 10.1152/physrev.00030.2008. – ISSN 0031–9333
- [96] LIESA, M. ; SHIRIHAI, O. S.: Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. In: *Cell metabolism* 17 (2013), Nr. 4, S. 491–506. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.002>. – DOI 10.1016/j.cmet.2013.03.002. – ISSN 1932–7420
- [97] LIFESPAN BIOSCIENCES, I. ; LSBIO (Hrsg.): *Rabbit Insulin Elisa Kit (Sandwich Elisa)*. www.lsbio.com/elisakits/rabbit-insulin-elisa-ls-f21890/21890. Version: 2018
- [98] LILLIOJA, S. ; MOTT, D. M. ; SPRAUL, M. ; FERRARO, R. ; FOLEY, J. E. ; RAVUSSIN, E. ; KNOWLER, W. C. ; BENNETT, P. H. ; BOGARDUS, C. : Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. In: *The New England journal of medicine* 329 (1993), Nr. 27, S. 1988–1992. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199312303292703>. – DOI 10.1056/NEJM199312303292703. – ISSN 0028–4793
- [99] LIU, T. ; YU, R. ; JIN, S.-B. ; HAN, L. ; LENDAHL, U. ; ZHAO, J. ; NISTÉR, M. : The mitochondrial elongation factors MIEF1 and MIEF2 exert partially distinct functions in mitochondrial dynamics. In: *Experimental cell research* 319 (2013), Nr. 18, S. 2893–2904. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.07.010>. – DOI 10.1016/j.yexcr.2013.07.010
- [100] LOSON, O. C. ; LIU, R. ; ROME, M. E. ; MENG, S. ; KAISER, J. T. ; SHAN, S.-o. ; CHAN, D. C.: The mitochondrial fission receptor MiD51 requires ADP as a cofactor. In: *Structure (London, England : 1993)* 22 (2014), Nr. 3, S. 367–377. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2014.01.001>. – DOI 10.1016/j.str.2014.01.001. – ISSN 0969–2126
- [101] LOSON, O. C. ; MENG, S. ; NGO, H. ; LIU, R. ; KAISER, J. T. ; CHAN, D. C.: Crystal structure and functional analysis of MiD49, a receptor for the mitochondrial fission protein Drp1. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 24 (2015), Nr. 3, S. 386–394. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.2629>. – DOI 10.1002/pro.2629. – ISSN 0961–8368

- [102] LOSON, O. C. ; SONG, Z. ; CHEN, H. ; CHAN, D. C.: Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. In: *Molecular biology of the cell* 24 (2013), Nr. 5, S. 659–667. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E12-10-0721>. – DOI 10.1091/mbc.E12-10-0721. – ISSN 1059–1524
- [103] LOTTSPPEICH, F. : *Bioanalytik*. 3. Aufl. Heidelberg. : Spektrum, 2012. – ISBN 9783827429421
- [104] LOWELL, B. B. ; SHULMAN, G. I.: Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. In: *Science (New York, N.Y.)* 307 (2005), Nr. 5708, S. 384–387. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1104343>. – DOI 10.1126/science.1104343. – ISSN 0036–8075
- [105] LU, H. ; KOSHKIN, V. ; ALLISTER, E. M. ; GYULKHANDANYAN, A. V. ; WHEELER, M. B.: Molecular and metabolic evidence for mitochondrial defects associated with beta-cell dysfunction in a mouse model of type 2 diabetes. In: *Diabetes* 59 (2010), Nr. 2, S. 448–459. <http://dx.doi.org/10.2337/db09-0129>. – DOI 10.2337/db09-0129. – ISSN 0012–1797
- [106] LÜLLMANN-RAUCH, R. : *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen*. 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart : Thieme, 2009. – ISBN 978-3-13-129243-8
- [107] MAASSEN, J. A. ; HART, L. M. ; VAN ESSEN, E. ; HEINE, R. J. ; NIJPELS, G. ; JAHANGIR TAFRECHI, R. S. ; RAAP, A. K. ; JANSSEN, G. M. ; LEMKES, H. H.: Mitochondrial Diabetes: Molecular Mechanisms and Clinical Presentation. In: *Diabetes* 53 (2004), Nr. Supplement 1, S. S103–S109. <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.S103>. – DOI 10.2337/diabetes.53.2007.S103. – ISSN 0012–1797
- [108] MAECHLER, P. ; WOLLHEIM, C. B.: Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. In: *Nature* 414 (2001), Nr. 6865, S. 807–812. <http://dx.doi.org/10.1038/414807a>. – DOI 10.1038/414807a. – ISSN 0028–0836
- [109] MALKA, F. ; GUILLERY, O. ; CIFUENTES-DIAZ, C. ; GUILLOU, E. ; BELENGUER, P. ; LOMBES, A. ; ROJO, M. : Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. In: *EMBO reports* 6 (2005), Nr. 9, S. 853–859. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400488>. – DOI 10.1038/sj.embor.7400488. – ISSN 1469–221X
- [110] MALKA, F. ; LOMBES, A. ; ROJO, M. : Organization, dynamics and transmission of mitochondrial DNA: focus on vertebrate nucleoids. In: *Biochimica et biophysica acta* 1763 (2006), Nr. 5-6, S. 463–472. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.04.001>. – DOI 10.1016/j.bbamcr.2006.04.001. – ISSN 0006–3002
- [111] MARTIN, B. C. ; WARRAM, J. H. ; KROLEWSKI, A. S. ; BERGMAN, R. N. ; SOELDNER, J. S. ; KAHN, C. R.: Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes

- mellitus: results of a 25-year follow-up study. In: *Lancet (London, England)* 340 (1992), Nr. 8825, S. 925–929. – ISSN 0140–6736
- [112] MATTSON, M. P. ; GLEICHMANN, M. ; CHENG, A. : Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. In: *Neuron* 60 (2008), Nr. 5, S. 748–766. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.010>. – DOI 10.1016/j.neuron.2008.10.010. – ISSN 0896–6273
- [113] MEEUSEN, S. ; MCCAFFERY, J. M. ; NUNNARI, J. : Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. In: *Science (New York, N.Y.)* 305 (2004), Nr. 5691, S. 1747–1752. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1100612>. – DOI 10.1126/science.1100612. – ISSN 0036–8075
- [114] MICHAEL WALTER PFAFFL: *Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung*. <http://www.gene-quantification.de/pfaffl-biospektrum-2004.pdf>. Version: 2004
- [115] MISKO, A. L. ; SASAKI, Y. ; TUCK, E. ; MILBRANDT, J. ; BALOH, R. H.: Mitofusin2 mutations disrupt axonal mitochondrial positioning and promote axon degeneration. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (2012), Nr. 12, S. 4145–4155. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6338-11.2012>. – DOI 10.1523/JNEUROSCI.6338-11.2012
- [116] MITRA, K. ; WUNDER, C. ; ROYSAM, B. ; LIN, G. ; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. : A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (2009), Nr. 29, S. 11960–11965. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0904875106>. – DOI 10.1073/pnas.0904875106. – ISSN 0027–8424
- [117] MIYAZAKI, J. ; ARAKI, K. ; YAMATO, E. ; IKEGAMI, H. ; ASANO, T. ; SHIBASAKI, Y. ; OKA, Y. ; YAMAMURA, K. : Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. In: *Endocrinology* 127 (1990), Nr. 1, S. 126–132. <http://dx.doi.org/10.1210/endo-127-1-126>. – DOI 10.1210/endo-127-1-126. – ISSN 0013–7227
- [118] MODICA-NAPOLITANO, J. S. ; SINGH, K. K.: Mitochondrial dysfunction in cancer. In: *Mitochondrion* 4 (2004), Nr. 5-6, S. 755–762. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2004.07.027>. – DOI 10.1016/j.mito.2004.07.027. – ISSN 1567–7249
- [119] MOLINA, A. J. A. ; WIKSTROM, J. D. ; STILES, L. ; LAS, G. ; MOHAMED, H. ; ELORZA, A. ; WALZER, G. ; TWIG, G. ; KATZ, S. ; CORKEY, B. E. ; SHIRIHAI, O. S.: Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. In: *Diabetes* 58 (2009), Nr.

- 10, S. 2303–2315. <http://dx.doi.org/10.2337/db07-1781>. – DOI 10.2337/db07-1781. – ISSN 0012-1797
- [120] MOOTHA, V. K. ; LINDGREN, C. M. ; ERIKSSON, K.-F. ; SUBRAMANIAN, A. ; SIHAG, S. ; LEHAR, J. ; PUIGSERVER, P. ; CARLSSON, E. ; RIDDERSTRÅLE, M. ; LAURILA, E. ; HOUSTIS, N. ; DALY, M. J. ; PATTERSON, N. ; MESIROV, J. P. ; GOLUB, T. R. ; TAMAYO, P. ; SPIEGELMAN, B. ; LANDER, E. S. ; HIRSCHHORN, J. N. ; ALTSHULER, D. ; GROOP, L. C.: PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. In: *Nature genetics* 34 (2003), Nr. 3, S. 267–273. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1180>. – DOI 10.1038/ng1180. – ISSN 1061-4036
- [121] MULDER, H. ; LING, C. : Mitochondrial dysfunction in pancreatic beta-cells in Type 2 diabetes. In: *Molecular and cellular endocrinology* 297 (2009), Nr. 1-2, S. 34–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2008.05.015>. – DOI 10.1016/j.mce.2008.05.015. – ISSN 0303-7207
- [122] NAKADA, K. ; INOUE, K. ; ONO, T. ; ISOBE, K. ; OGURA, A. ; GOTO, Y. I. ; NONAKA, I. ; HAYASHI, J. I.: Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. In: *Nature medicine* 7 (2001), Nr. 8, S. 934–940. <http://dx.doi.org/10.1038/90976>. – DOI 10.1038/90976. – ISSN 1078-8956
- [123] NAKAMURA, N. ; KIMURA, Y. ; TOKUDA, M. ; HONDA, S. ; HIROSE, S. : MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. In: *EMBO reports* 7 (2006), Nr. 10, S. 1019–1022. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400790>. – DOI 10.1038/sj.embor.7400790. – ISSN 1469-221X
- [124] NARENDRA, D. ; TANAKA, A. ; SUEN, D.-F. ; YOULE, R. J.: Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. In: *The Journal of Cell Biology* 183 (2008), Nr. 5, S. 795–803. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200809125>. – DOI 10.1083/jcb.200809125. – ISSN 0021-9525
- [125] NGUYEN, M. ; BOESTEN, I. ; HELLEBREKERS, D. M. E. I. ; MULDER-DEN HARTOG, N. M. ; COO, I. F. M. ; SMEETS, H. J. M. ; GERARDS, M. : Novel pathogenic SLC25A46 splice-site mutation causes an optic atrophy spectrum disorder. In: *Clinical genetics* 91 (2017), Nr. 1, S. 121–125. <http://dx.doi.org/10.1111/cge.12774>. – DOI 10.1111/cge.12774
- [126] NICHOLLS, D. G.: Mitochondrial membrane potential and aging. In: *Aging cell* 3 (2004), Nr. 1, S. 35–40. – ISSN 1474-9718

- [127] NISHIKAWA, T. ; EDELSTEIN, D. ; DU, X. L. ; YAMAGISHI, S. ; MATSUMURA, T. ; KANEDA, Y. ; YOREK, M. A. ; BEEBE, D. ; OATES, P. J. ; HAMMES, H. P. ; GIARDINO, I. ; BROWNLEE, M. : Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. In: *Nature* 404 (2000), Nr. 6779, S. 787–790. <http://dx.doi.org/10.1038/35008121>. – DOI 10.1038/35008121. – ISSN 0028–0836
- [128] Olichon, A. ; Baricault, L. ; Gas, N. ; Guillou, E. ; Valette, A. ; Belenguer, P. ; Lenaers, G. : Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (2003), Nr. 10, S. 7743–7746. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C200677200>. – DOI 10.1074/jbc.C200677200. – ISSN 0021–9258
- [129] OSELLAME, L. D. ; BLACKER, T. S. ; DUCHEN: Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. In: *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 26 (2012), Nr. 6, S. 711–723. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.003>. – DOI 10.1016/j.beem.2012.05.003. – ISSN 1878–1594
- [130] OSELLAME, L. D. ; SINGH, A. P. ; STROUD, D. A. ; PALMER, C. S. ; STOJANOVSKI, D. ; RAMACHANDRAN, R. ; RYAN, M. T.: Cooperative and independent roles of the Drp1 adaptors Mff, MiD49 and MiD51 in mitochondrial fission. In: *Journal of cell science* 129 (2016), Nr. 11, S. 2170–2181. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.185165>. – DOI 10.1242/jcs.185165. – ISSN 0021–9533
- [131] OTERA, H. ; MIYATA, N. ; KUGE, O. ; MIHARA, K. : Drp1-dependent mitochondrial fission via MiD49/51 is essential for apoptotic cristae remodeling. In: *The Journal of cell biology* 212 (2016), Nr. 5, S. 531–544. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201508099>. – DOI 10.1083/jcb.201508099. – ISSN 0021–9525
- [132] OTERA, H. ; WANG, C. ; CLELAND, M. M. ; SETOGUCHI, K. ; YOKOTA, S. ; YOUNG, R. J. ; MIHARA, K. : Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. In: *The Journal of cell biology* 191 (2010), Nr. 6, S. 1141–1158. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201007152>. – DOI 10.1083/jcb.201007152. – ISSN 0021–9525
- [133] PALIKARAS, K. ; TAVERNARAKIS, N. : Mitophagy in neurodegeneration and aging. In: *Frontiers in genetics* 3 (2012), S. 297. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2012.00297>. – DOI 10.3389/fgene.2012.00297
- [134] PALMER, C. S. ; ELGASS, K. D. ; PARTON, R. G. ; OSELLAME, L. D. ; STOJANOVSKI, D. ; RYAN, M. T.: Adaptor Proteins MiD49 and MiD51 Can Act Independently of Mff

- and Fis1 in Drp1 Recruitment and Are Specific for Mitochondrial Fission. In: *Journal of Biological Chemistry* 288 (2013), Nr. 38, S. 27584–27593. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.479873>. – DOI 10.1074/jbc.M113.479873. – ISSN 0021–9258
- [135] PALMER, C. S. ; OSELLAME, L. D. ; LAINE, D. ; KOUTSOPOULOS, O. S. ; FRAZIER, A. E. ; RYAN, M. T.: MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. In: *EMBO reports* 12 (2011), Nr. 6, S. 565–573. <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2011.54>. – DOI 10.1038/embor.2011.54. – ISSN 1469–221X
- [136] PALTAUF-DOBURZYNSKA, J. ; MALLI, R. ; GRAIER, W. F.: Hyperglycemic conditions affect shape and Ca²⁺ homeostasis of mitochondria in endothelial cells. In: *Journal of cardiovascular pharmacology* 44 (2004), Nr. 4, S. 423–436. – ISSN 0160–2446
- [137] PAREYSON, D. ; SAVERI, P. ; SAGNELLI, A. ; PISCOSQUITO, G. : Mitochondrial dynamics and inherited peripheral nerve diseases. In: *Neuroscience letters* 596 (2015), S. 66–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2015.04.001>. – DOI 10.1016/j.neulet.2015.04.001
- [138] PARK, K.-S. ; WIEDERKEHR, A. ; KIRKPATRICK, C. ; MATTENBERGER, Y. ; MARTINOU, J.-C. ; MARCHETTI, P. ; DEMAUREX, N. ; WOLLHEIM, C. B.: Selective actions of mitochondrial fission/fusion genes on metabolism-secretion coupling in insulin-releasing cells. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (2008), Nr. 48, S. 33347–33356. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M806251200>. – DOI 10.1074/jbc.M806251200. – ISSN 0021–9258
- [139] PENG, J.-Y. ; LIN, C.-C. ; CHEN, Y.-J. ; KAO, L.-S. ; LIU, Y.-C. ; CHOU, C.-C. ; HUANG, Y.-H. ; CHANG, F.-R. ; WU, Y.-C. ; TSAI, Y.-S. ; HSU, C.-N. : Automatic morphological subtyping reveals new roles of caspases in mitochondrial dynamics. In: *PLoS computational biology* 7 (2011), Nr. 10, S. e1002212. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002212>. – DOI 10.1371/journal.pcbi.1002212. – ISSN 1553–7358
- [140] PETERSEN, K. F. ; BEFROY, D. ; DUFOUR, S. ; DZIURA, J. ; ARIYAN, C. ; ROTHMAN, D. L. ; DIPIETRO, L. ; CLINE, G. W. ; SHULMAN, G. I.: Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. In: *Science (New York, N.Y.)* 300 (2003), Nr. 5622, S. 1140–1142. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1082889>. – DOI 10.1126/science.1082889. – ISSN 0036–8075
- [141] PI, J. ; BAI, Y. ; ZHANG, Q. ; WONG, V. ; FLOERING, L. M. ; DANIEL, K. ; REECE, J. M. ; DEENEY, J. T. ; ANDERSEN, M. E. ; CORKEY, B. E. ; COLLINS, S. : Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. In: *Diabetes* 56 (2007), Nr. 7,

- S. 1783–1791. <http://dx.doi.org/10.2337/db06-1601>. – DOI 10.2337/db06-1601. – ISSN 0012-1797
- [142] PITTS, K. R. ; YOON, Y. ; KRUEGER, E. W. ; MCNIVEN, M. A.: The dynamin-like protein DLP1 is essential for normal distribution and morphology of the endoplasmic reticulum and mitochondria in mammalian cells. In: *Molecular biology of the cell* 10 (1999), Nr. 12, S. 4403–4417. – ISSN 1059-1524
- [143] PRAEFCKE, G. J. K. ; MCMAHON, H. T.: The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (2004), Nr. 2, S. 133–147. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1313>. – DOI 10.1038/nrm1313. – ISSN 1471-0072
- [144] PRENTKI, M. ; TORNHEIM, K. ; CORKEY, B. E.: Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. In: *Diabetologia* 40 Suppl 2 (1997), S. S32–41. – ISSN 0012-186X
- [145] QIAGEN: *What is the principle behind Effectene Transfection Reagent?* <https://www.qiagen.com/us/resources/faq?id=c538f935-ef79-409a-99c8-72ad98f9c6d9&lang=en>
- [146] QIAGEN GMBH ; QIAGEN (Hrsg.): *Funktionsprinzip der rT-PCR*. <http://www.qiagen.com/de/resources/download.aspx?id=0d819f29-1be2-4711-af01-7263156346d9&lang=de-DE>. Version: 2014
- [147] REDDY, P. H. ; MAO, P. ; MANCZAK, M. : Mitochondrial structural and functional dynamics in Huntington’s disease. In: *Brain research reviews* 61 (2009), Nr. 1, S. 33–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.04.001>. – DOI 10.1016/j.brainresrev.2009.04.001. – ISSN 0165-0173
- [148] REINHARDT, F. ; SCHULTZ, J. ; WATERSTRADT, R. ; BALTRUSCH, S. : Drp1 guarding of the mitochondrial network is important for glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 474 (2016), Nr. 4, S. 646–651. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.142>. – DOI 10.1016/j.bbrc.2016.04.142. – ISSN 1090-2104
- [149] RICHTER, V. ; PALMER, C. S. ; OSELLAME, L. D. ; SINGH, A. P. ; ELGASS, K. ; STROUD, D. A. ; SESAKI, H. ; KVANSAKUL, M. ; RYAN, M. T.: Structural and functional analysis of MiD51, a dynamin receptor required for mitochondrial fission. In: *The Journal of cell biology* 204 (2014), Nr. 4, S. 477–486. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201311014>. – DOI 10.1083/jcb.201311014. – ISSN 0021-9525

- [150] RICKMANN, A. : *Einfluss von Palmitinsäure bei der mitochondrialen Dysfunktion in einem Typ 2 Diabetes Zellmodell*, Universität Rostock, Dissertation, 2012
- [151] ROBERTSON, R. P.: Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes. In: *Current opinion in pharmacology* 6 (2006), Nr. 6, S. 615–619. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2006.09.002>. – DOI 10.1016/j.coph.2006.09.002. – ISSN 1471–4892
- [152] ROVIRA-LLOPIS, S. ; BAÑULS, C. ; DIAZ-MORALES, N. ; HERNANDEZ-MIJARES, A. ; ROCHA, M. ; VICTOR, V. M.: Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. In: *Redox biology* 11 (2017), S. 637–645. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.013>. – DOI 10.1016/j.redox.2017.01.013. – ISSN 2213–2317
- [153] SAITA, S. ; ISHIHARA, T. ; MAEDA, M. ; IEMURA, S.-I. ; NATSUME, T. ; MIHARA, K. ; ISHIHARA, N. : Distinct types of protease systems are involved in homeostasis regulation of mitochondrial morphology via balanced fusion and fission. In: *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 21 (2016), Nr. 5, S. 408–424. <http://dx.doi.org/10.1111/gtc.12351>. – DOI 10.1111/gtc.12351. – ISSN 1365–2443
- [154] SANTEL, A. ; FRANK, S. ; GAUME, B. ; HERRLER, M. ; YOULE, R. J. ; FULLER, M. T.: Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. In: *Journal of cell science* 116 (2003), Nr. Pt 13, S. 2763–2774. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00479>. – DOI 10.1242/jcs.00479. – ISSN 0021–9533
- [155] SCARPULLA, R. C.: Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. In: *Gene* 286 (2002), Nr. 1, S. 81–89. – ISSN 0378–1119
- [156] SCHAFER, A. ; REICHERT, A. S.: Emerging roles of mitochondrial membrane dynamics in health and disease. In: *Biological chemistry* 390 (2009), Nr. 8, S. 707–715. <http://dx.doi.org/10.1515/BC.2009.086>. – DOI 10.1515/BC.2009.086. – ISSN 1431–6730
- [157] SCHRÖDEL, A. : Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer. In: *Biologie in unserer Zeit* 40 (2010), Nr. 5, S. 298. <http://dx.doi.org/10.1002/biuz.201090074>. – DOI 10.1002/biuz.201090074. – ISSN 0045205X
- [158] SCHUIT, F. ; VOS, A. de ; FARFARI, S. ; MOENS, K. ; PIPELEERS, D. ; BRUN, T. ; PRENTKI, M. : Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (1997), Nr. 30, S. 18572–18579. – ISSN 0021–9258
- [159] SCHULTZ, J. ; WATERSTRADT, R. ; KANTOWSKI, T. ; RICKMANN, A. ; REINHARDT, F. ; SHAROYKO, V. ; MULDER, H. ; TIEDGE, M. ; BALTRUSCH, S. : Precise expression of

- Fis1 is important for glucose responsiveness of beta cells. In: *The Journal of endocrinology* 230 (2016), Nr. 1, S. 81–91. <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-16-0111>. – DOI 10.1530/JOE-16-0111
- [160] SERASINGHE, M. N. ; SENEVIRATNE, A. M. P. B. ; SMRCKA, A. V. ; YOON, Y. : Identification and characterization of unique proline-rich peptides binding to the mitochondrial fission protein hFis1. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (2010), Nr. 1, S. 620–630. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.027508>. – DOI 10.1074/jbc.M109.027508. – ISSN 0021–9258
- [161] SHAVIV, G. : *Bioanalytik*. [Place of publication not identified] : Springer, 2012. – ISBN 9783827429421
- [162] SILVA, J. P. ; KOHLER, M. ; GRAFF, C. ; OLDFORS, A. ; MAGNUSON, M. A. ; BERGGREN, P. O. ; LARSSON, N. G.: Impaired insulin secretion and beta-cell loss in tissue-specific knockout mice with mitochondrial diabetes. In: *Nature genetics* 26 (2000), Nr. 3, S. 336–340. <http://dx.doi.org/10.1038/81649>. – DOI 10.1038/81649. – ISSN 1061–4036
- [163] SKELIN, M. ; RUPNIK, M. ; CENCIC, A. : Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. In: *Altex* 27 (2010), Nr. 2/10, S. 105–113
- [164] SKULACHEV, V. P.: Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. In: *Trends in biochemical sciences* 26 (2001), Nr. 1, S. 23–29. – ISSN 0968–0004
- [165] SMIRNOVA, E. ; GRIPARIC, L. ; SHURLAND, D. L. ; VAN DER BLIEK, A. M.: Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. In: *Molecular biology of the cell* 12 (2001), Nr. 8, S. 2245–2256. – ISSN 1059–1524
- [166] SONG, Z. ; CHEN, H. ; FIKET, M. ; ALEXANDER, C. ; CHAN, D. C.: OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. In: *The Journal of cell biology* 178 (2007), Nr. 5, S. 749–755. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200704110>. – DOI 10.1083/jcb.200704110. – ISSN 0021–9525
- [167] STILES, L. ; SHIRIHAI, O. S.: Mitochondrial dynamics and morphology in beta-cells. In: *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 26 (2012), Nr. 6, S. 725–738. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.004>. – DOI 10.1016/j.beem.2012.05.004. – ISSN 1878–1594
- [168] SUSIN, S. A. ; LORENZO, H. K. ; ZAMZAMI, N. ; MARZO, I. ; SNOW, B. E. ; BROTHERS, G. M. ; MANGION, J. ; JACOTOT, E. ; COSTANTINI, P. ; LOEFFLER, M. ; LAROCLETTE,

- N. ; GOODLETT, D. R. ; AEBERSOLD, R. ; SIDEROVSKI, D. P. ; PENNINGER, J. M. ; KROEMER, G. : Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. In: *Nature* 397 (1999), Nr. 6718, S. 441–446. <http://dx.doi.org/10.1038/17135>. – DOI 10.1038/17135. – ISSN 0028–0836
- [169] TAGUCHI, N. ; ISHIHARA, N. ; JOFUKU, A. ; OKA, T. ; MIHARA, K. : Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (2007), Nr. 15, S. 11521–11529. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M607279200>. – DOI 10.1074/jbc.M607279200. – ISSN 0021–9258
- [170] TREVISAN, T. ; PENDIN, D. ; MONTAGNA, A. ; BOVA, S. ; GHELLI, A. M. ; DAGA, A. : Manipulation of Mitochondria Dynamics Reveals Separate Roles for Form and Function in Mitochondria Distribution. In: *Cell reports* 23 (2018), Nr. 6, S. 1742–1753. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.017>. – DOI 10.1016/j.celrep.2018.04.017
- [171] TWIG, G. ; ELORZA, A. ; MOLINA, A. J. A. ; MOHAMED, H. ; WIKSTROM, J. D. ; WALZER, G. ; STILES, L. ; HAIGH, S. E. ; KATZ, S. ; LAS, G. ; ALROY, J. ; WU, M. ; PY, B. F. ; YUAN, J. ; DEENEY, J. T. ; CORKEY, B. E. ; SHIRIHAI, O. S.: Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. In: *The EMBO Journal* 27 (2008), Nr. 2, S. 433–446. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963>. – DOI 10.1038/sj.emboj.7601963. – ISSN 02614189
- [172] VOS, K. de ; GOOSSENS, V. ; BOONE, E. ; VERCAMMEN, D. ; VANCOMPERNOLLE, K. ; VANDENABEELE, P. ; HAEGEMAN, G. ; FIERS, W. ; GROOTEN, J. : The 55-kDa tumor necrosis factor receptor induces clustering of mitochondria through its membrane-proximal region. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (1998), Nr. 16, S. 9673–9680. – ISSN 0021–9258
- [173] W. KERNER, C. FUCHS, M. REDAËLLI, B. O. BÖHM, J. KÖBBERLING, W. A. SCHERBAUM, H. TILLIL: *Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus*. <http://buster.zibmt.uni-ulm.de/ftp/leitlin/DDGDef.pdf>
- [174] WAI, T. ; LANGER, T. : Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 27 (2016), Nr. 2, S. 105–117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2015.12.001>. – DOI 10.1016/j.tem.2015.12.001. – ISSN 1879–3061
- [175] WAKABAYASHI, J. ; ZHANG, Z. ; WAKABAYASHI, N. ; TAMURA, Y. ; FUKAYA, M. ; KENSLER, T. W. ; IJIMA, M. ; SESAKI, H. : The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. In: *The Journal of cell biology* 186 (2009), Nr. 6, S. 805–816. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200903065>. – DOI 10.1083/jcb.200903065. – ISSN 0021–9525

- [176] WALLACE, D. C.: A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. In: *Annual review of genetics* 39 (2005), S. 359–407. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.39.110304.095751>. – DOI 10.1146/annurev.genet.39.110304.095751. – ISSN 0066–4197
- [177] WANG, X. ; SU, B. ; ZHENG, L. ; PERRY, G. ; SMITH, M. A. ; ZHU, X. : The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer’s disease. In: *Journal of neurochemistry* 109 Suppl 1 (2009), S. 153–159. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05867.x>. – DOI 10.1111/j.1471–4159.2009.05867.x. – ISSN 0022–3042
- [178] WATERHAM, H. R. ; KOSTER, J. ; VAN ROERMUND, C. W. T. ; MOOYER, P. A. W. ; WANDERS, R. J. A. ; LEONARD, J. V.: A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. In: *The New England journal of medicine* 356 (2007), Nr. 17, S. 1736–1741. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa064436>. – DOI 10.1056/NEJMoa064436. – ISSN 0028–4793
- [179] WESTERMANN, B. : Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 11 (2010), Nr. 12, S. 872–884. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3013>. – DOI 10.1038/nrm3013. – ISSN 1471–0072
- [180] WIKSTROM, J. D. ; KATZMAN, S. M. ; MOHAMED, H. ; TWIG, G. ; GRAF, S. A. ; HEART, E. ; MOLINA, A. J. A. ; CORKEY, B. E. ; VARGAS, L. M. ; DANIAL, N. N. ; COLLINS, S. ; SHIRIHAI, O. S.: beta-Cell mitochondria exhibit membrane potential heterogeneity that can be altered by stimulatory or toxic fuel levels. In: *Diabetes* 56 (2007), Nr. 10, S. 2569–2578. <http://dx.doi.org/10.2337/db06-0757>. – DOI 10.2337/db06–0757. – ISSN 0012–1797
- [181] WILSON, T. J. ; SLUPE, A. M. ; STRACK, S. : Cell signaling and mitochondrial dynamics: Implications for neuronal function and neurodegenerative disease. In: *Neurobiology of disease* 51 (2013), S. 13–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2012.01.009>. – DOI 10.1016/j.nbd.2012.01.009. – ISSN 0969–9961
- [182] YOON, Y. ; GALLOWAY, C. A. ; JHUN, B. S. ; YU, T. : Mitochondrial dynamics in diabetes. In: *Antioxidants & redox signaling* 14 (2011), Nr. 3, S. 439–457. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2010.3286>. – DOI 10.1089/ars.2010.3286. – ISSN 1557–7716
- [183] YOULE, R. J. ; NARENDRA, D. P.: Mechanisms of mitophagy. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 12 (2011), Nr. 1, S. 9–14. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3028>. – DOI 10.1038/nrm3028. – ISSN 1471–0072

- [184] YOULE, R. J. ; VAN DER BLIEK, A. M.: Mitochondrial fission, fusion, and stress. In: *Science (New York, N.Y.)* 337 (2012), Nr. 6098, S. 1062–1065. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1219855>. – DOI 10.1126/science.1219855. – ISSN 0036–8075
- [185] YU, R. ; LIU, T. ; JIN, S.-B. ; NING, C. ; LENDAHL, U. ; NISTÉR, M. ; ZHAO, J. : MIEF1/2 function as adaptors to recruit Drp1 to mitochondria and regulate the association of Drp1 with Mff. In: *Scientific reports* 7 (2017), Nr. 1, S. 880. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-00853-x>. – DOI 10.1038/s41598-017-00853-x. – ISSN 2045–2322
- [186] YU, T. ; ROBOTHAM, J. L. ; YOON, Y. : Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006), Nr. 8, S. 2653–2658. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0511154103>. – DOI 10.1073/pnas.0511154103. – ISSN 0027–8424
- [187] ZHANG, Z. ; LIU, L. ; WU, S. ; XING, D. : Drp1, Mff, Fis1, and MiD51 are coordinated to mediate mitochondrial fission during UV irradiation-induced apoptosis. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30 (2016), Nr. 1, S. 466–476. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.15-274258>. – DOI 10.1096/fj.15-274258. – ISSN 0892–6638
- [188] ZHAO, J. ; LIU, T. ; JIN, S. ; WANG, X. ; QU, M. ; UHLEN, P. ; TOMILIN, N. ; SHUPLIAKOV, O. ; LENDAHL, U. ; NISTER, M. : Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. In: *The EMBO Journal* 30 (2011), Nr. 14, S. 2762–2778. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.198>. – DOI 10.1038/emboj.2011.198. – ISSN 02614189
- [189] ZORZANO, A. ; LIESA, M. ; PALACIN, M. : Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 41 (2009), Nr. 10, S. 1846–1854. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2009.02.004>. – DOI 10.1016/j.biocel.2009.02.004. – ISSN 1357–2725
- [190] ZÜCHNER, S. ; MERSIYANOVA, I. V. ; MUGLIA, M. ; BISSAR-TADMOURI, N. ; ROCHELLE, J. ; DADALI, E. L. ; ZAPPIA, M. ; NELIS, E. ; PATITUCCI, A. ; SENDEREK, J. ; PARMAN, Y. ; EVGRAFOV, O. ; JONGHE, P. D. ; TAKAHASHI, Y. ; TSUJI, S. ; PERICAK-VANCE, M. A. ; QUATTRONE, A. ; BATTALOGLU, E. ; POLYAKOV, A. V. ; TIMMERMAN, V. ; SCHRÖDER, J. M. ; VANCE, J. M. ; BATTALOGLU, E. : Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. In: *Nature genetics* 36 (2004), Nr. 5, S. 449–451. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1341>. – DOI 10.1038/ng1341. – ISSN 1061–4036

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Jeannette Warkus, die vorliegende, an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock angefertigte, Dissertation zum Thema „*Der Einfluss von MiD51 auf die mitochondriale Dynamik*“ selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst zu haben. Es wurden nur die ausgewiesenen Hilfsmittel zuhilfe genommen. Sämtliche Stellen der Arbeit, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen gedruckten oder im Internet verfügbaren Werken entnommen sind, habe ich durch genaue Quellenangaben kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde bisher noch nicht veröffentlicht und keiner in- oder ausländischen Prüfungsbehörde als Dissertation vorgelegt.

.....

Ort, Datum

.....

Unterschrift

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Jeannette Warkus
Geburtsdaten 05. April 1986 in Eisenhüttenstadt
Staatsbürgerschaft deutsch
Familienstand ledig, einen Sohn (geboren im Januar 2017)

Ausbildung

- 10/2012 – 09/2019 **Studium der Humanmedizin, Universität Rostock, Rostock.**
1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: Herbst 2014
2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: Frühjahr 2018
3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: Frühjahr 2019
- 10/2005 – 10/2008 **Ausbildung Gesundheits- und Krankenpflege, Vivantes Institut für berufliche Bildung im Gesundheitswesen, Berlin.**
Abschluss: Gesundheits- und Krankenpflegerin
- 08/1998 – 07/2005 **Fürstenberger Gymnasium, Eisenhüttenstadt.**
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Beruflicher Werdegang

- 07/2009 – 09/2012 **Gesundheits- und Krankenpflegerin im Personalleasing, Bundesweit.**
- 1 Monat Hauskrankenpflege in Frankfurt/Oder
- 3 Monate IMC in Hamburg
- 3 Monate HNO-Klinik in Köln
- 6 Monate in einer Privatklinik für Wirbelsäulenerkrankungen in Berlin
- 8 Monate in Reha Klinik Höhenried bei München
- 9 Monate im Theodorus-Hospiz in Berlin
sowie verschiedene Fachbereiche mit unterschiedlichen zeitlichen Rahmen: Chirurgie, Neurologie, Geriatrie, Gastroenterologie, Gynäkologie
- 11/2008 – 06/2009 **Travel and Work in Australien.**

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei Allen zu bedanken, die mich während des Studiums unterstützt und insbesondere zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Spezieller Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. S.E. Baltrusch, die mir dieses Thema bereitgestellt und mir damit ermöglicht hat, eine wissenschaftliche Arbeit am biochemischen Institut zu erstellen.

Besonderen Dank möchte ich Frau Dr. rer. nat. Julia Schultz aussprechen, die mir stets mit anhaltender Hilfestellung zur Seite stand und mich während der ganzen Zeit wissenschaftlich und methodisch betreut hat. Sie hat mir konstruktive Ratschläge und Anmerkungen gegeben, die sehr hilfreich für den Weg zur fertigen Arbeit waren.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Rica Waterstradt und den medizinisch technischen Assistenten bedanken, die mir bei der Durchführung der Experimente geholfen haben.

Großer Dank gebührt natürlich auch meinem lieben Mann Michael, der mir bei der Erstellung der Dissertation mit LaTeX mit seinen technischen Know-How zur Seite stand und unser Kind betreut hat, während ich die Zusammenschrift verfasst habe.