

Die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für die Lipotoxizität in insulinproduzierenden Zellen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Wiebke Gehrman

geboren am 18. April 1980 in Bremen

2010

Referent: Prof. Dr. Sigurd Lenzen

Korreferentin: Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn

Tag der Promotion: 15. Juli 2010

Kurzzusammenfassung

Der Typ 2 Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, die durch eine Insulinresistenz der peripheren Zielorgane und eine Sekretionsstörung der pankreatischen β -Zellen gekennzeichnet ist. Zu den wichtigsten Risikofaktoren zählen das metabolische Syndrom und Adipositas. Unter diesen Umständen sind die Serumkonzentrationen freier Fettsäuren erhöht und können zu einer Beeinträchtigung der glucoseinduzierten Insulinsekretion und zur Apoptose der β -Zellen führen. Dieses Phänomen wird als Lipotoxizität bezeichnet. Die molekularen Mechanismen der Lipotoxizität sind jedoch noch weitestgehend unklar. In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die zellulären Effekte freier Fettsäuren strukturabhängig sind. Nur langkettige gesättigte Fettsäuren wie Palmitinsäure sind toxisch. Langkettige ungesättigte Fettsäuren wie Ölsäure sind hingegen in der Lage, gegen diese Zytotoxizität zu schützen. Kurzkettige Fettsäuren unabhängig von ihrem Sättigungsgrad haben keinen Einfluss auf die Vitalität insulinproduzierender Zellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass Palmitinsäure zur Aktivierung der ER-Stress-Antwort führt. Eine Analyse verschiedener kompartimentspezifischer Caspasen zeigte jedoch, dass die Induktion von ER-Stress nicht von besonderer Bedeutung für die Lipotoxizität ist. Langkettige Fettsäuren steigern die glucoseinduzierte Insulinsekretion über die Aktivierung des G-Proteingekoppelten Rezeptors 40 (GPR40). Eine Expressionsanalyse von GPR40 und GPR120, der auch spezifisch von langkettigen Fettsäuren aktiviert wird, in verschiedenen β -Zelllinien ergab, dass beide Rezeptoren als Vermittler der Lipotoxizität nicht in Frage kommen. Neben dem Mitochondrium können Fettsäuren auch im Peroxisom abgebaut werden. Die Enzyme der β -Oxidation in beiden Kompartimenten unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität, wobei die peroxisomalen Enzyme langkettige Fettsäuren bevorzugen. Bei der peroxisomalen β -Oxidation wird in der ersten Reaktion H_2O_2 gebildet. Anhand SOD- und Katalase-überexprimierender Zellen konnte gezeigt werden, dass die Bildung von H_2O_2 von besonderer Bedeutung für die Lipotoxizität ist. Um eine direkte kompartimentspezifische Detektion von H_2O_2 zu ermöglichen, wurde das Fluoreszenzprotein HyPer mit der *peroxisomal targeting sequence* fusioniert und als Messmethode etabliert. Mit Hilfe von Zellen, die das HyPer-Protein in den Peroxisomen oder Mitochondrien exprimieren, konnte das während der peroxisomalen β -Oxidation gebildete H_2O_2 als toxisches Agens der Lipotoxizität identifiziert werden. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit dem Toxizitätsprofil von Fettsäuren in insulinproduzierenden Zellen.

Schlagwörter: Typ 2 Diabetes mellitus, Fettsäuren, Peroxisom, H_2O_2

Abstract

Type 2 diabetes mellitus is a complex metabolic disorder, which is characterized by peripheral insulin resistance and pancreatic β -cell dysfunction. The metabolic syndrome and obesity typically precede type 2 diabetes development. Thereby occurring elevated serum concentrations of non-esterified fatty acids can impair glucose-induced insulin secretion and cause β -cell death through apoptosis, a phenomenon referred to as lipotoxicity. However, the molecular mechanisms of lipotoxicity are still unclear. In this thesis it was shown that the cellular effects of non-esterified fatty acids are strongly dependent on their structure. Only long-chain saturated fatty acids, like palmitic acid, are toxic. Whereas long-chain unsaturated fatty acids, like oleic acid, provide protection against this toxicity. Short-chain fatty acids independent from their degree of saturation have no influence on the viability of insulin-producing cells. It was verified that palmitic acid activates the ER stress response in RINm5F insulin-producing cells. The analysis of different compartment specific caspases revealed that the induction of ER stress is only of minor importance for lipotoxicity. Long-chain fatty acids enhance the glucose-induced insulin secretion through the activation of the G-protein coupled receptor 40 (GPR40). The expression analysis of GPR40 and GPR120, which is also specific for long-chain fatty acids, in different β -cell lines showed that both receptors could not mediate lipotoxicity. Beside the mitochondria the peroxisomes are an important intracellular site for the degradation of fatty acids. The enzymes for the β -oxidation in both compartments differ in their substrate specificity in which peroxisomal enzymes prefer long-chain fatty acids. H_2O_2 is directly formed in the first step of peroxisomal β -oxidation. On the basis of experiments with superoxide dismutase (SOD) and catalase overexpressing cells the particular importance of H_2O_2 formation was shown. The H_2O_2 sensitive fluorescence protein HyPer was fused to a peroxisomal targeting sequence and established as a new method which allows compartment specific detection of H_2O_2 . Using cells overexpressing the HyPer protein in either peroxisomes or mitochondria it was possible to identify H_2O_2 , generated by peroxisomal β -oxidation, as toxic agent in lipotoxicity. This is in accordance with the chain-length dependent toxicity of non-esterified fatty acids in insulin-producing cells.

Keywords: Type 2 Diabetes mellitus, fatty acids, peroxisome, H_2O_2

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Glucoseinduzierte Insulinsekretion.....	1
1.2 Diabetes mellitus.....	2
1.3 Molekulare Mechanismen der Lipotoxizität.....	3
1.3.1 Der mitochondriale und peroxisomale Fettsäure-Stoffwechsel.....	4
1.3.2 ER-Stress.....	8
1.3.3 Apoptose.....	10
1.3.4 Fettsäure-bindende Rezeptoren.....	11
1.3.5 Oxidativer Stress.....	14
1.3.6 Spezifische Messung von Wasserstoffperoxid durch das Fluoreszenzprotein HyPer.....	17
1.4 Fragestellung.....	19
2 Publikationen	20
2.1 Peroxisome generated hydrogen peroxide as mediator of lipotoxicity in insulin-producing cells Zur Publikation eingereicht.....	21
2.2 A specific fluorescence probe for hydrogen peroxide detection in peroxisomes In Vorbereitung.....	54
2.3 The antagonism between saturated and unsaturated fatty acids in ROS mediated lipotoxicity in insulin-producing cells In Vorbereitung.....	69
2.4 Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic β -cells Zur Publikation angenommen.....	95
3 Diskussion	121
3.1 Strukturabhängige Toxizität freier Fettsäuren.....	121
3.2 Die Bedeutung von ER-Stress für die Lipotoxizität.....	123
3.3 Rezeptor-vermittelte Lipotoxizität.....	124
3.4 Spezifische Detektion von H_2O_2 in Peroxisomen.....	127
3.5 Oxidativer Stress als Ursache der Lipotoxizität.....	128
4 Zusammenfassung	133
5 Literaturverzeichnis	136
6 Publikationen	143
7 Curriculum Vitae	144
8 Erklärung	146
9 Danksagung	147

1 Einleitung

1.1 Glucoseinduzierte Insulinsekretion

Für die Glucosehomöostase ist das Peptidhormon Insulin von entscheidender Bedeutung. Es besteht aus 51 Aminosäuren und wird von den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas sezerniert. Im Rahmen der Proteinbiosynthese des Insulins wird zunächst Präproinsulin als Vorstufe in den β -Zellen gebildet. Durch das Signalpeptid am N-terminalen Ende wird das Präproinsulin in das Endoplasmatische Retikulum transferiert. Nach Abspaltung des Signalpeptids und der Ausbildung von zwei Disulfidbrücken zwischen der A- und B-Kette und einer dritten Disulfidbrücke innerhalb der A-Kette gelangt das entstandene Proinsulin in den Golgi-Apparat. Dort wird durch spezifische Prohormon-Konvertasen das C-Peptid abgespalten und zusammen mit dem nun reifen biologisch-aktiven Insulin in Granula in den β -Zellen gespeichert (Davidson *et al.* 1988).

Der wichtigste physiologische Stimulus für die Insulinsekretion ist der Anstieg der Blutglucosekonzentration nach Nahrungsaufnahme. Im Gegensatz zu anderen endokrinen Zelltypen entsteht das Signal für die glucoseinduzierte Insulinsekretion dabei im Metabolismus der β -Zelle (Lenzen & Panten 1988; Lenzen 1990; Lenzen 1992; Matschinsky 2002). Nach Glucoseaufnahme über erleichterte Diffusion mit Hilfe des niedrigaffinen Glucosetransportproteins GLUT2 (Bell *et al.* 1990; Kayano *et al.* 1990; Lenzen & Tiedge 1994) wird die Glucose, im ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykolyse, durch das Enzym Glucokinase phosphoryliert (Lenzen & Panten 1988; Lenzen 1992; Iynedjian 1993; Efrat *et al.* 1994; Matschinsky 2002). Der Stoffwechsel von Glucose zunächst in der Glykolyse und dann weiter im Citrat-Zyklus führt zu einem Anstieg der ATP/ADP Ratio. Der ATP-sensitive K^+ -Kanal (Kir 6.2) wird daraufhin geschlossen, woraus eine Depolarisation der Plasmamembran resultiert, die wiederum einen Einstrom von Ca^{2+} über den spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal (VDCC, *voltage dependent calcium channel*) zur Folge hat. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration löst die Sekretion der Insulingranula aus (Ashcroft & Rorsman 1990; Prentki 1996) (Abb. 3).

Durch Insulin werden generell die Stoffwechselwege aktiviert, die zu einer Senkung der Blutglucosekonzentration führen. So fördert es zum Beispiel in der Muskulatur und im Fettgewebe die Aufnahme von Glucose aus dem Blut über das Glucosetransportprotein GLUT4. In der Leber und der Muskulatur wird die Glykogensynthese stimuliert. Auch erhöht Insulin in der Leber die Glykolyserate, was wiederum die Fettsäuresynthese fördert. In der Fettzelle wird die Speicherung von Triacylglyceriden ausgelöst. Auf die Proteinsynthese hat

Insulin einen allgemein stimulierenden Effekt, wobei es zusätzlich den intrazellulären Proteinabbau hemmt.

1.2 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist die weitaus häufigste Stoffwechselerkrankung, von der in den westlichen Industriestaaten ca. 5 - 6% der Bevölkerung betroffen sind. Klinisch und pathogenetisch werden im wesentlichen der insulinpflichtige Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM), früher auch als jugendlicher bzw. juveniler Diabetes mellitus oder IDDM bezeichnet, vom nicht-insulinpflichtigen Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM), auch als Altersdiabetes oder NIDDM bezeichnet, unterschieden. Für die Entstehung beider Diabetesformen werden sowohl genetische als auch unterschiedliche exogene Faktoren als mögliche Ursachen verantwortlich gemacht, so dass beide Formen des Diabetes mellitus als multifaktorielle und polygenetische Krankheiten angesehen werden (Daneman 2006). Vom Typ 1 Diabetes mellitus sind in Deutschland ca. 0,3 – 0,4 % der Gesamtbevölkerung betroffen (Achenbach *et al.* 2008). Dabei werden durch eine T-Zell-vermittelte Autoimmunreaktion mit Insulitis die pankreatischen β -Zellen selektiv zerstört woraus ein absoluter Insulinmangel resultiert (Waldhäusl & Lenzen 2007). Als genetische Faktoren sind bestimmte HLA-Antigene prädisponierend; als exogene Faktoren werden virale Infektionen und Umwelteinflüsse wie allergene Nahrungsbestandteile (Akerblom & Knip 1998; Jun & Yoon 2001) diskutiert.

Beim Typ 2 Diabetes mellitus handelt es sich um eine komplexe metabolische Störung mit einer weltweit dramatisch ansteigenden Prävalenz-Rate und daraus resultierenden weitreichenden sozioökonomischen Folgen. So sind im Jahr 2010 ca. 31 Millionen Menschen in Europa und ca. 239 Millionen weltweit auf eine Behandlung des Typ 2 Diabetes angewiesen (King *et al.* 1998; Zimmet *et al.* 2001). Ursächlich für den dramatischen Anstieg in der Prävalenz ist der westliche Lebensstil, mit einer kalorienreichen Ernährung, überwiegend bestehend aus Kohlenhydraten und gesättigten Fettsäuren, sowie Bewegungsmangel. So ist die Manifestation des Typ 2 Diabetes eng mit dem metabolischen Syndrom korreliert, dass verschiedene Symptome, wie Bluthochdruck, hohe Triglycerid- und niedrige HDL-Serumkonzentrationen, sowie Insulin-Resistenz und Adipositas, umfasst (Roche *et al.* 2005).

Das Krankheitsbild des Typ 2 Diabetes ist gekennzeichnet durch eine Insulinresistenz der peripheren Organe und einer Dysfunktion der pankreatischen β -Zellen (DeFronzo 1988; Boden 1997). Adipositas trägt unmittelbar zur Entwicklung der Insulinresistenz bei, wodurch die Responsivität der Zielgewebe, wie z.B. der Muskulatur, gegenüber diesem Hormon

vermindert ist. Die β -Zelle wirkt durch eine kompensatorische Hypersekretion von Insulin dieser Resistenz entgegen, um so die Blutglucosekonzentration konstant zu halten. In dieser prädiabetischen Phase, der so genannten β -Zell-Kompensation, ist die Blutglucosekonzentration normal, während die Plasmainsulinkonzentration erhöht ist. Die β -Zell-Kompensation kann eine Expansion der β -Zell-Masse (Steil *et al.* 2001; Jetton *et al.* 2005), eine gesteigerte Insulinsynthese und eine gesteigerte Responsivität bei der Nahrungsekretions-Kopplung (Chen *et al.* 1994; Liu *et al.* 2002b) umfassen. Die anhaltende Überfunktion der β -Zelle in dieser kompensatorischen Phase führt zu einer Abnahme der β -Zell-Funktionalität (Paolisso *et al.* 1995; Carpentier *et al.* 1999; Kashyap *et al.* 2003) und schließlich im weiteren Verlauf durch apoptotischen Zelltod zu einer sinkenden β -Zell-Masse (Clark *et al.* 1988; Butler *et al.* 2003; Rahier *et al.* 2008) und chronisch erhöhten Blutglucosewerten (Leahy 2005). Als Mechanismen, die ursächlich für den β -Zell-Verlust sind, werden mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress, ER-Stress, ein gestörter Triglycerid-/FFA-Zyklus und Glucolipotoxizität diskutiert. Die Insulinresistenz, zu Beginn der Krankheit, kann in vielen Fällen durch Gewichtsreduktion und verstärkte Bewegung behandelt werden, wohingegen bei fortschreitender Erkrankung eine Therapie mit oralen Antidiabetika oder sogar mit Insulin zur Senkung der Blutglucosewerte benötigt wird. Unklar ist noch, zu welchem Zeitpunkt die β -Zell-Dysfunktion beginnt, wahrscheinlich, wie neuere Studien zeigen, ist dies bereits früh im Krankheitsverlauf, im normoglykämischen Zustand, der Fall (Godsland *et al.* 2004).

Der Typ 2 Diabetes ist genetisch stärker determiniert als der Typ 1 Diabetes, es besteht aber kein Zusammenhang mit dem HLA-System. In einer Vielzahl genetischer Untersuchungen konnten Polymorphismen in verschiedenen Genen gefunden werden, wie z.B. im *transcription factor 7-like 2*-Gen (*TCF7L2*) oder im *KCNJ11*-Gen (*Kir6.2*), die mit einem erhöhten Risiko für Typ 2 Diabetes assoziiert sind (Gloyn *et al.* 2003; Grant *et al.* 2006).

Aufgrund der chronisch erhöhten Blutglucosekonzentration kommt es bei beiden Diabetesformen, abhängig davon, wie gut der Glucosestoffwechsel eingestellt ist, zu Spätschäden. Zu diesen zählen kardiovaskuläre Komplikationen, Niereninsuffizienz, Retinopathie und Polyneuropathie. Eine Ursache für diese Schädigungen sind u.a. nicht-enzymatische Glykosylierungen, die zu einer Strukturveränderung oder einem Funktionsverlust der betroffenen Proteine führen können.

1.3 Molekulare Mechanismen der Lipotoxizität

Die bei Adipositas oder beim metabolischen Syndrom auftretenden erhöhten Serumkonzentrationen freier Fettsäuren (Gordon 1960) können die Insulinsekretion hemmen und

schließlich zur Apoptose der β -Zellen führen. Ein Phänomen, das als Lipotoxizität bezeichnet wird (Zhou & Grill 1994; Poitout & Robertson 2002). Die molekularen Mechanismen, die zur Lipotoxizität führen, sind noch weitestgehend ungeklärt und Gegenstand intensiver Forschung. So ist z.B. unklar, ob ein gesteigerter Metabolismus von Fettsäuren für ihre Toxizität verantwortlich ist. Zu den möglichen molekularen Mechanismen zählt die Induktion von ER-Stress, eine Rezeptor-vermittelte Lipotoxizität und eine vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*).

1.3.1 Der mitochondriale und peroxisomale Fettsäure-Stoffwechsel

Fettsäuren (FFAs, *free fatty acids*) sind Kohlenstoffverbindungen, die aus einer Carboxygruppe (-COOH) und einer Kohlenwasserstoffkette unterschiedlicher Länge bestehen, wobei sie entweder als gesättigt bezeichnet werden, wenn sie keine oder als ungesättigt, wenn sie eine oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Palmitinsäure (C16:0), eine gesättigte FFA, und Ölsäure (C18:1), eine einfach ungesättigte FFA, sind die physiologisch bedeutendsten FFAs.

In allen Säugetieren sind der Transport und die Speicherung von FFAs abhängig von der Nährstoffversorgung. So werden nach der Nahrungsaufnahme die FFAs als Triacylglyceride im Fettgewebe gespeichert, um im Hunger-Zustand dem Körper als Energiequelle zur Verfügung zu stehen. Beim Typ 2 Diabetes sind die Konzentrationen freier Fettsäuren erhöht, so dass sie auch verstärkt metabolisiert werden können.

FFAs werden hauptsächlich über β -Oxidation abgebaut, die in Säugetieren sowohl in den Mitochondrien als auch in den Peroxisomen stattfinden kann. In Pflanzen und Pilzen hingegen sind die Peroxisomen der einzige Ort der β -Oxidation (Wanders & Waterham 2006). In beiden Kompartimenten umfasst die Reaktionsabfolge eine Dehydrierung, eine Hydratisierung, eine weitere Dehydrierung und eine abschließende thiolytische Spaltung. Obwohl sich die peroxisomale und die mitochondriale β -Oxidation sehr ähnlich sind, unterscheiden sie sich in Funktion und Substratspezifität. In den Mitochondrien werden FFAs hauptsächlich zur Energiegewinnung abgebaut. Das gebildete $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 aus der β -Oxidation und der nachfolgenden Oxidation des Acetyl-CoAs im Citrat-Zyklus wird im Mitochondrium für die Produktion von ATP in der Atmungskette genutzt. So liefert die vollständige Oxidation eines Palmitinsäure-Moleküls im Mitochondrium 106 mol ATP (Eaton *et al.* 1996). Der Abbau von FFAs zur Energiegewinnung kann je nach Gewebe und metabolischem Status stark variieren.

Kurze und mittellange (C4-C8) Fettsäuren werden ausschließlich und lange (C10-C16) Fettsäuren hauptsächlich in den Mitochondrien abgebaut, während sehr lange (C16-C24)

Fettsäuren bevorzugt in den Peroxisomen verstoffwechselt werden (Wanders & Waterham 2006). Andere Fettsäuren werden ausschließlich in den Peroxisomen metabolisiert, wie (a) Pristansäure (2,4,6,10- Tetramethylpentadecanoic Säure), die mittels α -Oxidation abgebaut wird; (b) Di- und Trihydroxycholesteronsäure; (c) langkettige Dicarboxylsäuren resultierend aus der Ω -Oxidation von Monocarboxylsäuren; (d) einige mehrfach ungesättigte FFAs, wie z.B. Tetracosahexaensäure (C24:6), wobei nach einem Zyklus der β -Oxidation Docosahexaensäure (C22:6) entsteht; (e) einige Leukotriene und Prostaglandine; (f) Carboxy-Derivate einiger Xenobiotika; (g) die fettlöslichen Vitamine E und K (Poirier *et al.* 2006).

Bevor die Fettsäuren oxidiert werden, müssen sie zuerst über die Membran in das jeweilige Organell transportiert werden. Mitochondrien nehmen langkettige Fettsäuren in einem Carnitin-abhängigen Mechanismus, katalysiert durch die Carnitin-Palmitoyl-Transferase, (CPT) auf. Kurze und mittellange FFAs hingegen werden direkt in ihrer protonierten Form aufgenommen (Kunau *et al.* 1995). Der peroxisomale Import von Fettsäuren ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, ein Carnitin-abhängiger Transport ähnlich wie in den Mitochondrien wird aber ausgeschlossen (Wanders *et al.* 2001). Es wird vielmehr angenommen, dass FFAs entweder direkt als freie Fettsäure oder als CoA-Ester über ABC-Transporter ins Peroxisom gelangen (Visser *et al.* 2007). So sind in der peroxisomalen Membran zwei Acyl-CoA-Synthasen lokalisiert, die eine entsprechende Substratspezifität für langkettige FFAs aufweisen (Kunau *et al.* 1995).

Im ersten Schritt der mitochondrialen β -Oxidation wird das Acyl-CoA durch die Acyl-CoA Dehydrogenase oxidiert, wobei die Elektronen auf FAD übertragen und anschließend in der Elektronentransportkette für die oxidative Phosphorylierung genutzt werden (Abb. 1). Es gibt vier verschiedene Dehydrogenasen, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden und somit den vollständigen Abbau aller FFAs, die im Mitochondrium oxidiert werden können, gewährleistet. So ist die Kettenlängen-Spezifität der Acyl-CoA-Dehydrogenasen die Basis für die Unterscheidung von sehr langen ($>C16$), langen, mittellangen (C10-C16) und kurzen (C6-C9) FFAs. Die spezifische Dehydrogenase für langkettige FFAs ist wahrscheinlich an der Oxidation verzweigter Fettsäuren, wie z.B. 2-Methylpalmitoyl-CoA, beteiligt (Kunau *et al.* 1995). Das Produkt der ersten Reaktion, ein Enoyl-CoA mit einer trans-Doppelbindung zwischen C2 und C3, wird im nächsten Schritt unter Wasseranlagerung zu einem 3-L-Hydroxyacyl-CoA umgewandelt und im folgenden zu 3-Ketoacyl-CoA oxidiert. Die Elektronen werden dabei auf NAD^+ übertragen, das wiederum in der Atmungskette regeneriert wird. Im letzten Schritt wird das Kohlenstoffgerüst durch eine Thiolase gespalten,

wobei Acetyl-CoA und ein um zwei Kohlenstoffatome kürzeres Acyl-CoA entsteht (Kunau *et al.* 1995). Die verkürzte Acyl-CoA-Kette wird durch einen erneuten Durchlauf der β -Oxidation weiter abgebaut und das Acetyl-CoA im Citrat-Zyklus oxidiert. Bei langkettigen FFAs werden die Reaktionen der Enoyl-CoA-Hydratase, der 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und der β -Ketothiolase durch einen membrangebundenen Komplex aus drei Enzymen (Trifunktionelles Protein) katalysiert. Dieser Komplex unterscheidet sich von den Enzymen, die die Oxidation von mittel- bis kurzkettigen Acyl-CoAs katalysieren, da diese alle in der mitochondrialen Matrix löslich sind. Bei der Oxidation ungradzahliger FFAs entsteht Acetyl-CoA und Propionyl-CoA, das schließlich zu Succinyl-CoA abgebaut wird (Kunau *et al.* 1995).

Die Reaktionsabfolge der peroxisomalen β -Oxidation gleicht der mitochondrialen β -Oxidation, obwohl unterschiedliche Enzyme in beiden Kompartimenten exprimiert sind. Gesättigte unverzweigte und 2-Methyl-FFAs sind die einzigen Fettsäuren, die strukturell direkt durch die peroxisomale β -Oxidation metabolisiert werden können. Im Gegensatz dazu müssen einfach ungesättigte und mehrfach ungesättigte, ebenso wie 3-Methyl- oder 2-Hydroxy-FFAs erst durch verschiedene spezifische Enzyme umgelagert werden, damit sie der peroxisomalen β -Oxidation zur Verfügung stehen.

Der erste geschwindigkeitsbestimmende Schritt der peroxisomalen β -Oxidation wird durch Acyl-CoA-Oxidasen (ACOX) katalysiert. Diese peroxisomalen Enzyme enthalten als Koenzym FAD und gehören zur gleichen Superfamilie wie die tetrameren mitochondrialen Acyl-CoA-Dehydrogenasen. Im Gegensatz zur mitochondrialen β -Oxidation, bei der die Elektronen auf NAD^+ übertragen werden, werden die Elektronen vom FADH_2 in den Peroxisomen direkt auf O_2 übertragen, wobei Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entsteht (Abb. 1) (Wanders & Waterham 2006). Dieses wird durch Katalase in einer Disproportionierungsreaktion zu Wasser und Sauerstoff abgebaut. Ähnlich wie bei den mitochondrialen Acyl-CoA-Dehydrogenasen gibt es in Säugern drei ACOX-Enzyme, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden: ACOX1 (Palmitoyl-CoA-Oxidase) ist spezifisch für langkettige FFAs (Vamecq & Draye 1989), ACOX2 (Pristanoyl-CoA-Oxidase) ist spezifisch für verzweigte Fettsäuren und ACOX3 (Cholestanoyl-CoA-Oxidase), das spezifisch mit CoA-Estern verschiedener Gallensäure-Intermediate reagiert (Van Veldhoven *et al.* 1992). Dagegen gibt es nur zwei humane Acyl-CoA-Oxidasen; zum einen die Palmitoyl-CoA-Oxidase und zum anderen eine Acyl-CoA-Oxidase, die spezifisch für verzweigte FFAs ist. Die zweite und dritte Reaktion der peroxisomalen β -Oxidation werden durch die multifunktionellen Enzyme MFE1 und MFE2, die sich in ihrer Stereospezifität unterscheiden, katalysiert (Filppula *et al.* 1995).

MFE2 ist nicht nur von Bedeutung für die β -Oxidation, sondern auch für die Synthese von Gallensäure und Docosahexaensäure (Su *et al.* 2001; Wanders & Waterham 2006). Beide Enzymkomplexe enthalten jeweils eine Enoyl-CoA-Hydratase und eine 3-Hydroxy-acyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität und katalysieren somit die Reaktion von 2-trans-enoyl-CoA zu 3-Ketoacyl-CoA. In der letzten Reaktion der peroxisomalen β -Oxidation wird ebenso wie bei der mitochondrialen β -Oxidation das entstandene 3-Ketoacyl-CoA durch die Thiolase gespalten, so dass ein Acetyl-CoA und ein um zwei Kohlenstoffatome verkürztes Acyl-CoA entsteht (Wanders & Waterham 2006).

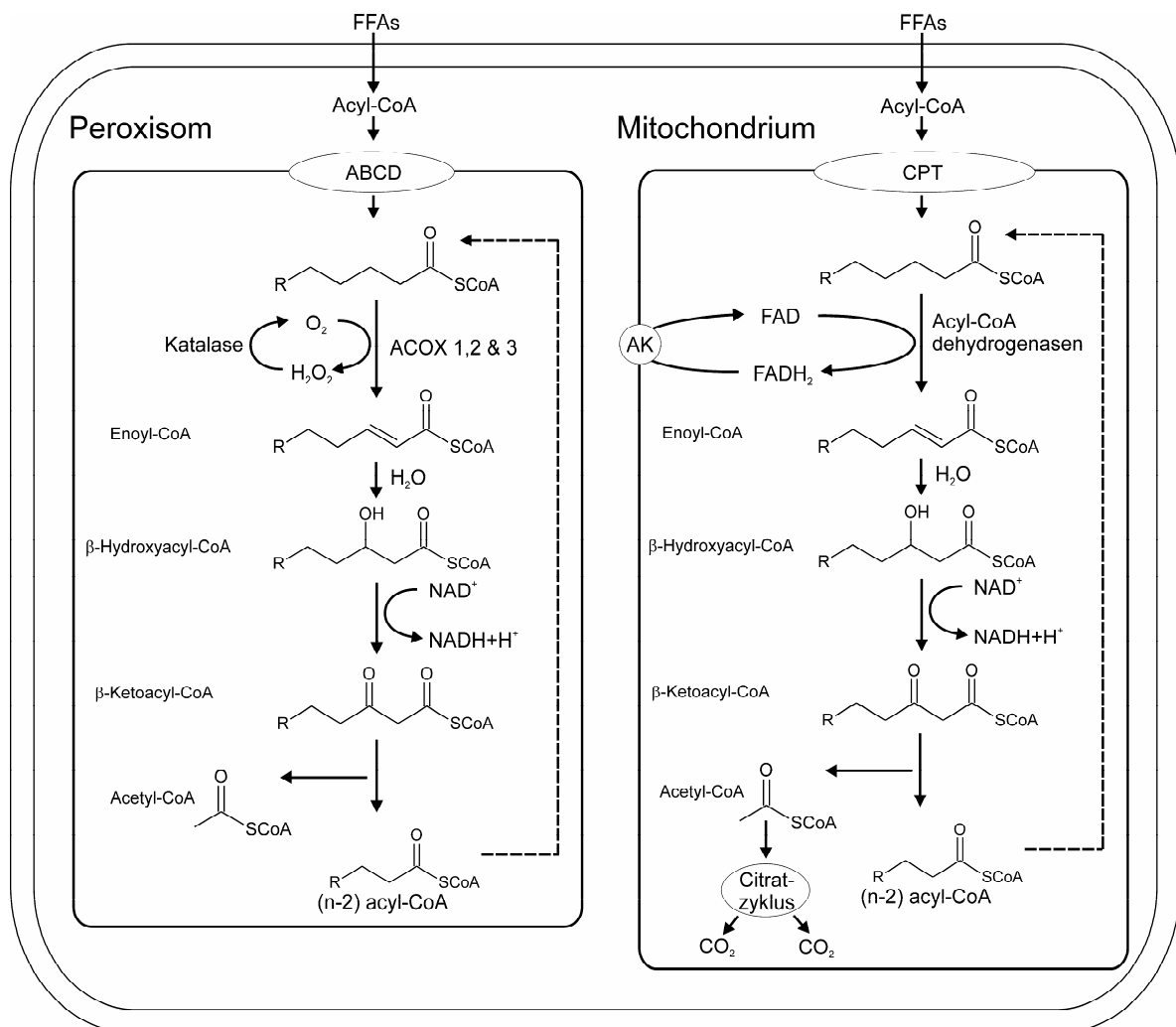


Abb. 1 Vergleich der peroxisomalen und mitochondrialen β -Oxidation

FFAs werden von den Peroxisomen über ABC-Transporter (ABCD) aufgenommen, während Mitochondrien die FFAs in einer Carnitin-palmitoyl-transferase (CPT) katalysierten Reaktion aufnehmen. Die Elektronen der ersten Reaktion werden in den Peroxisomen von der Acyl-CoA-Oxidase auf O_2 übertragen, im Gegensatz dazu überträgt die Acyl-CoA-Dehydrogenase in den Mitochondrien die Elektronen auf FAD. Das entstandene $FADH_2$ wird in der Atmungskette (AK) regeneriert. Die nachfolgenden Reaktionen sind in beiden Kompartimenten gleich, wobei sie von Enzymen mit unterschiedlicher Substratspezifität katalysiert werden.

Das Ziel der peroxisomalen β -Oxidation ist eine Verkürzung der FFAs, die keine Substrate der mitochondrialen β -Oxidation sind, so dass diese anschließend im Mitochondrium weiter metabolisiert werden können. Die verkürzten FFAs können in höheren Eukaryonten auf zwei Arten das Peroxisom verlassen. So können sie entweder durch eine Thioesterase in die freie Fettsäure und Coenzym A hydrolysiert werden oder in einem Carnitin-abhängigen Transport aus dem Peroxisom geschleust werden (Jakobs & Wanders 1995). Die Carnitin-Ester können im Folgenden über die Carnitin-Palmitoyl-Transferase zum weiteren Abbau in das Mitochondrium transportiert werden. Die Acyl-CoA Thioesterasen sind in fast allen zellulären Kompartimenten, wie z.B. im ER, im Zytosol, im Mitochondrium und im Peroxisom, zu finden. Die peroxisomalen Thioesterasen ACOT3 und ACOT5 reagieren spezifisch mit langen bzw. mittellangen Acyl-CoAs (Westin *et al.* 2004). Diese Enzyme können eine Schlüsselfunktion für die Aufrechterhaltung des Fettsäure-Flusses durch die peroxisomale β -Oxidation einnehmen, da sie das Gleichgewicht zwischen FFAs und CoA veresterten FFAs einstellen.

1.3.2 ER-Stress

Ein möglicher molekularer Mechanismus basierend auf einigen *in vitro* Studien (Kharroubi *et al.* 2004; Diakogiannaki *et al.* 2008), über den FFAs zur β -Zell-Apoptose führen, ist die Induktion von ER-Stress, auch bezeichnet als *unfolded protein response* (UPR). Im endoplasmatischen Reticulum (ER) werden die wachsenden Polypeptid-Ketten zu nativen Proteinen gefaltet und aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt, bevor sie im Golgi-Apparat weiter prozessiert werden. Es kommt zur Induktion von ER-Stress, wenn das Gleichgewicht zwischen dem Protein-Faltungs-Bedarf und der -Kapazität gestört ist. Fehlgefaltete Proteine werden dann entweder im ER-Lumen an Chaperone gebunden und wieder entfaltet oder sie werden in einem Prozess, der als *ER-associated degradation* (ERAD) bezeichnet wird, abgebaut. Die ER-Stress-Antwort zielt durch eine Reduktion der Protein-Translation, eine verstärkte Expression von ER-Chaperonen und den Abbau fehlgefalteter Proteine auf eine Wiederherstellung der ER-Homöostase ab. Die drei ER-Stress-Sensoren IRE1 (*inositol requiring ER-to-nucleus signal kinase*), ATF6 (*activating transcription factor*) und PERK (*protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*) sind in ihrem inaktiven Zustand an das ER-Chaperon BiP (*immunoglobulin heavy-chain-binding protein*) gebunden. Durch eine Anhäufung fehlgefalteter Proteine wird diese Bindung gelöst, so dass BiP bei der Proteinfaltung assistieren kann. Durch diese Dissoziation von BiP werden die ER-Stress-Sensoren aktiviert und induzieren eine Signalkaskade (Abb. 2). Dabei führt die Aktivierung von IRE1 zu einem alternativen *Splicing* von XBP-1 (*X-box binding protein*), das

wiederum eine Untergruppe verschiedener ER-Stress-Gene reguliert, die bei der ER-assoziierten Degradation fehlgefalteter Proteine und der ER Biogenese von Bedeutung sind. ATF6 wird im inaktiven Zustand durch BiP an der ER-Membran gebunden. Wenn BiP von der luminalen Seite dissoziiert, kann ATF6 ungehindert zum Golgi Apparat transportiert werden. Dort wird ATF6 durch die beiden Proteasen S1P und S2P gespalten, wodurch ein Import in den Zellkern ermöglicht wird und die Transkription von ER-Stress-Genen, wie z.B. BiP, induziert wird. Die aktivierte Kinase PERK phosphoryliert eIF2 α (*eukaryotic translation initiation factor*) und führt somit zu einer Hemmung der Proteinbiosynthese. Parallel dazu werden Proteine wie ATF4 induziert, die wiederum die Expression von proapoptotischen Genen, wie CHOP (*C/EBP homologous protein*), auslösen. Ein andauernder ER-Stress führt auch über die Aktivierung der ER-ständigen Caspase-12 zur Induktion von Apoptose.

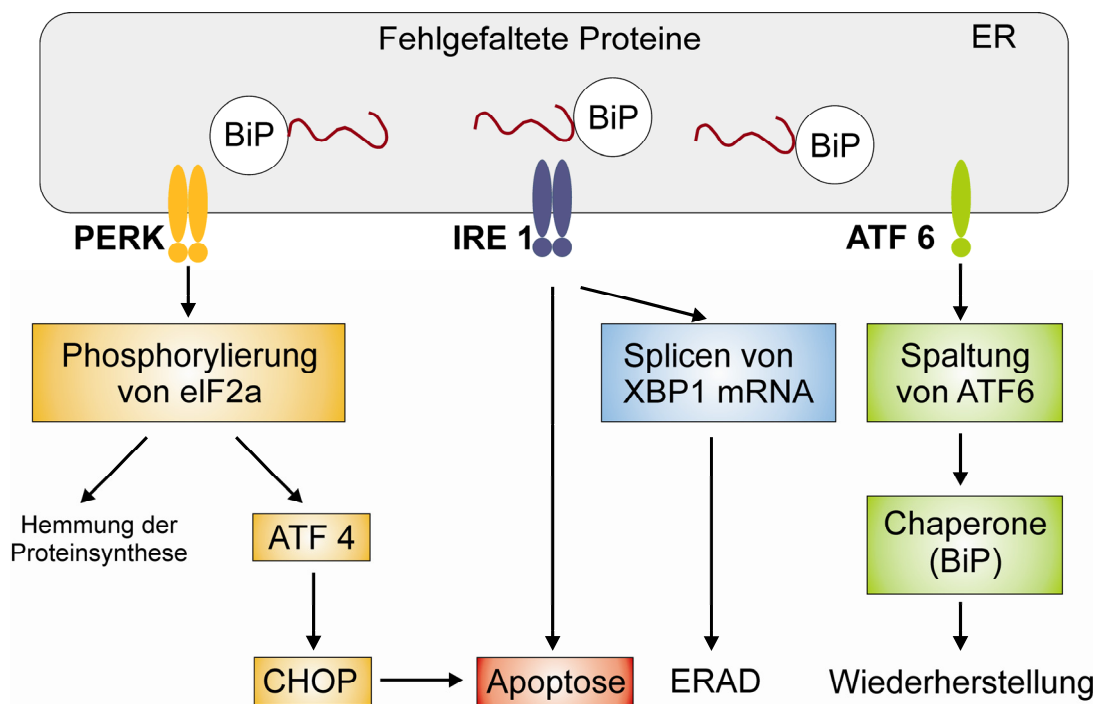


Abb. 2 Signalwege der ER-Stress-Sensoren

Ein Ungleichgewicht zwischen dem ER Protein-Faltungs-Bedarf und der -Kapazität führt zur Dissoziation von BiP und den ER-Stress-Proteinen PERK, IRE1 und ATF6, wodurch diese aktiviert werden. Die aktivierte Kinase PERK phosphoryliert eIF2 α und führt somit zu einer Hemmung der Proteinbiosynthese und zur Induktion von CHOP. IRE1 induziert das *splicing* der XBP1 mRNA, die wiederum die Degradierung fehlgefalteter Proteine aktiviert (*ER-associated degradation* ERAD). Die Spaltung von ATF6 ermöglicht den nukleären Import und die darauf folgende Induktion von ER-Chaperonen wie BiP.

In verschiedenen *in vitro* Studien konnte eine Induktion der ER-Stress-Antwort durch Palmitinsäure gezeigt werden. Sogar in humanen Pankreata von Typ 2 Diabetikern wurden erhöhte Spiegel verschiedener ER-Stress-Marker wie XBP-1 spliced, CHOP oder auch

eIF2 α P nachgewiesen (Cunha *et al.* 2008). Trotz vieler Studien, die belegen, dass FFAs ER-Stress induzieren, ist der Mechanismus oder der initiale Faktor, der dies auslöst, noch unklar.

1.3.3 Apoptose

Es gibt zwei unterschiedliche Wege, die zum Tod einer eukaryotischen Zelle führen können. Bei der Nekrose wird der Tod durch äußere mechanische oder chemische Einflüsse hervorgerufen. Die Zelle und die Mitochondrien schwellen an und es kommt zu einem Verlust der Membranintegrität. Das Zellplasma tritt aus und führt im umliegenden Gewebe zu einer Entzündungsreaktion.

Bei der Apoptose dagegen handelt es sich um einen programmierten Zelltod, einem lebenswichtigen evolutionär stark konservierten Vorgang. In einem ausgereiften Gewebe existiert ein Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Apoptose. Morphologisch beginnt die Apoptose mit der Schrumpfung des Zellkerns, wobei die DNA in einzelne Nucleosomen-assoziierte Fragmente zerlegt wird, das so genannte *DNA-Laddering*. Am Ende des apoptotischen Zelltods zerfällt die Zelle in kleine Apoptosekörper, sogenannte *apoptotic bodies*. Diese sind von einer Membran umgeben, so dass keine Bestandteile freigesetzt werden und keine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Vielmehr werden diese Membranabschnürungen von umgebenden Zellen oder Makrophagen phagozytiert und verdaut. Eine fehlerhaft induzierte Apoptose führt zu Defekten in der Entwicklung, zu Autoimmunerkrankungen, zu neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Parkinson und zur Entstehung von Tumoren. Beim Typ 2 Diabetes mellitus wird im Krankheitsverlauf die β -Zell-Masse durch Apoptose reduziert (Butler *et al.* 2003; Rahier *et al.* 2008), wobei die ursächlichen Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind.

Bei der Apoptose kommt den Caspasen eine entscheidende Bedeutung zu. Es handelt sich dabei um Cystein-Proteasen, die spezifisch in apoptotischen Zellen aktiviert werden (Alnemri *et al.* 1996). Diese evolutionär stark konservierten Proteine, die sowohl in Säugetieren als auch in Nematoden vorkommen (Cikala *et al.* 1999; Earnshaw *et al.* 1999), spalten die C-terminale Bindung von Aspartat. Die Substratspezifität wird dabei durch die vier N-terminalen Aminosäuren von Aspartat bestimmt (Thornberry *et al.* 1997). Wie die meisten Proteasen werden auch Caspasen als inaktive Zymogene synthetisiert. Effektor-Caspasen, zu denen die Caspasen 3, 6 und 7 zählen, werden proteolytisch durch eine andere Caspase aktiviert, während Initiator-Caspasen, zu denen die Caspasen 8, 9 und 12 zählen, durch regulierte Protein-Protein-Interaktionen aktiviert werden (Hengartner 2000).

Es gibt zwei verschiedene, unabhängige Wege der Apoptoseinduktion: einen Rezeptor-abhängigen und einen Rezeptor-unabhängigen, der auch als intrinsische Apoptose bezeichnet

wird. Beim Rezeptor-abhängigen Weg binden sogenannte „Todes“-Rezeptoren, zu denen der Fas- (CD95 / APO-1) und der TNFR-1-Rezeptor gehören, ihre jeweiligen Liganden (FasL) und leiten so das Signal weiter in die Zelle. Die Bindung von FasL oder TNF- α führt zur Aggregation des Adapterproteins FADD (*Fas associated death domain protein*) an der intrazellulären Seite des Rezeptors (Muzio *et al.* 1996). Durch die Bindung mehrerer Caspase-8-Moleküle an das Adapterprotein FADD entsteht eine hohe lokale Pro-Caspase-Konzentration. Das Modell der induzierten Nähe postuliert, dass unter diesen Umständen die geringe intrinsische Protease-Aktivität der Procaspase-8-Moleküle ausreicht, um sich gegenseitig durch die Abspaltung eines Pro-Peptids zu aktivieren (Muzio *et al.* 1998). Dies ist der erste Schritt einer Caspase-Kaskade, die zur Apoptose führt.

Durch zellulären Stress, wie z.B. Schädigung der DNA, werden proapoptische Proteine im Zytosol aktiviert. Ein Überschuss an proapoptischen Proteinen führt zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Zytosol (Adams & Cory 1998; Antonsson & Martinou 2000). Zusammen mit Apaf-1 und Procaspase-9 bildet Cytochrom c einen Komplex, das Apoptosom, in dem die Procaspase aktiviert wird (Li *et al.* 1997). Eine weitere Initiator-Caspase ist Caspase-12, die im ER lokalisiert ist und bei anhaltendem ER-Stress aktiviert wird und somit zur Apoptose führt (Fan *et al.* 2005).

Im letzten Schritt der apoptotischen Signalkaskade wird bei der Rezeptor-abhängigen wie auch bei der intrinsischen Apoptose die Procaspase-3 aktiviert. Diese führt zur Apoptose durch Spaltung verschiedener Proteine, die wichtig sind für die Regulation der Apoptose, der DNA-Reparatur, des Zellzyklus, sowie verschiedener Strukturproteine (Degterev *et al.* 2003). Unter anderem wird auch die Nuklease CAD (*caspase activated dnase*), die für das charakteristische DNA-*Laddering* verantwortlich ist, aktiviert (Wyllie 1980).

Eine Analyse der verschiedenen kompartimentspezifischen Initiator-Caspasen 8, 9 und 12 kann somit Aufschluss über die zellulären Strukturen geben, die initial durch exogene Faktoren, wie z.B. FFAs, geschädigt werden.

1.3.4 Fettsäure-bindende Rezeptoren

Alle Mitglieder der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPRs) sind aus sieben membrandurchspannenden α -Helices aufgebaut, über die sie ein Signal in eine intrazelluläre Antwort übertragen. Diese Rezeptoren sind in nahezu allen Geweben exprimiert und werden durch eine große Vielfalt verschiedener Liganden, wie Hormone, Neurotransmitter, Peptide, Proteine, Steroide oder auch freie Fettsäuren, aktiviert. Die GPR-Isoformen GPR40, GPR41, GPR43, GPR119 und GPR120 gehören zu den Lipid-bindenden Rezeptoren (Fredriksson *et al.* 2003; Brown *et al.* 2005), die vermutlich auch in den pankreatischen β -Zellen exprimiert

werden. GPR119 und GPR120 gehören beide zur Rhodopsin- (Klasse A) Familie und sind strukturell nur wenig homolog zu GPR40, 41 oder 43 (Fredriksson *et al.* 2003). Der Rezeptor GPR119 ist hauptsächlich im Pankreas und im Magen-Darm-Trakt lokalisiert und wird selektiv durch Fettsäure-Derivate, wie Lysophosphatidylcholin (LPC) oder Oleoyl Ethanolamid (OEA) (Soga *et al.* 2005; Overton *et al.* 2006) aktiviert. Es konnte gezeigt werden, dass LPC über die Aktivierung von GPR119 und die nachfolgende G_s -Signalkaskade zu einer gesteigerten glucoseinduzierten Insulinsekretion führt (Soga *et al.* 2005). Der GPR120 im Gegensatz dazu ist ähnlich wie der GPR40 ein spezifischer Rezeptor für langkettige Fettsäuren (Hirasawa *et al.* 2005). Die höchste Expression ist im Darm zu finden, wobei auch eine Expression in verschiedenen β -Zelllinien nachgewiesen werden konnte (Dhayal *et al.* 2008; Kebede *et al.* 2009). Die Aktivierung des Rezeptors mittels langkettiger ungesättigter FFAs führt, über die Aktivierung des ERK- und des PI3 Kinase-Signalweges, zur Sekretion von GLP-1 in den enteroendokrinen STC-1-Zellen (Hirasawa *et al.* 2005). Die Rezeptoren GPR40, GPR41 und GPR43 sind strukturell sehr homolog, unterscheiden sich jedoch in ihrer Substratspezifität und der Gewebespezifität. So werden die Rezeptoren GPR41 und GPR43 spezifisch durch kurzkettige Fettsäuren, wie Propionsäure, Buttersäure oder Valeriansäure in unterschiedlicher Intensität aktiviert (Brown *et al.* 2005). Beide Rezeptoren werden am stärksten in Immunzellen und im Fettgewebe exprimiert, wo sie zur Produktion von Leptin und zur Adipogenese führen (Xiong *et al.* 2004; Hong *et al.* 2005). Ob beide Rezeptoren auch im Pankreas exprimiert werden, wird kontrovers in der Literatur diskutiert (Swaminath 2008; Kebede *et al.* 2009).

Der dritte Rezeptor dieser Gruppe, der GPR40, wird sowohl im Pankreas von Nagern als auch vom Menschen gefunden (Briscoe *et al.* 2003; Itoh *et al.* 2003; Kotarsky *et al.* 2003). Darüber hinaus konnte auch eine Expression in verschiedenen β -Zelllinien nachgewiesen werden (Itoh *et al.* 2003). Bevorzugte Agonisten dieses Rezeptors sind gesättigte sowie ungesättigte mittel- bis langkettige FFAs (C12-C18). Es konnte gezeigt werden, dass Fettsäuren über den GPR40 die glucoseinduzierte Insulinsekretion steigern (Itoh *et al.* 2003). Durch die Bindung der Fettsäure an den Rezeptor wird der G_{α_q} -Signalweg aktiviert, der zu einer Phospholipase-C vermittelten Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol Triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) führt. Die Bindung von IP₃ an bestimmte Rezeptoren in der Membran des endoplasmatischen Retikulums führt zur Mobilisierung von Ca^{2+} aus dem ER-Lumen ins Zytosol (Fujiwara *et al.* 2005; Shapiro *et al.* 2005) (Abb. 3). Diese erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ist schließlich das Signal zur Exocytose der Insulingranula. Fettsäuren können außerdem über ihren Metabolismus im Mitochondrium

(1.3.1) und einem daraus resultierenden Anstieg der ATP/ADP Ratio zu einer verstärkten glucoseinduzierten Insulinsekretion führen. Ein weiterer postulierter Signalweg über den FFA die Insulinsekretion steigern können, ist der Malonyl-CoA/LC-CoA Signalweg (Prentki & Nolan 2006). Malonyl-CoA inhibiert die Fettsäure-Oxidation, so dass LC-CoA im Zytosol akkumuliert und so die Produktion von Lipid-Signalmolekülen, wie Diacylglycerol (DAG) steigert (Corkey *et al.* 2000).

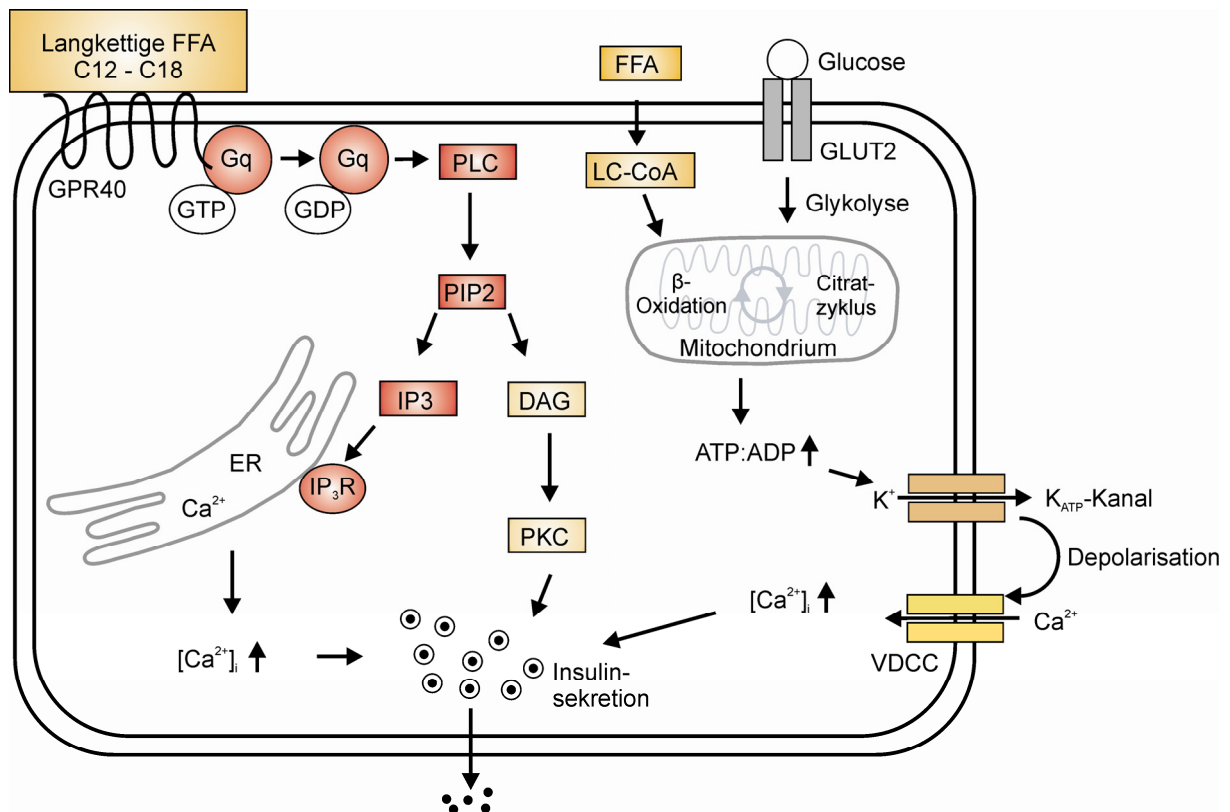


Abb. 3 Verstärkung der glucoseinduzierten Insulinsekretion durch Fettsäuren

Durch die Bindung langkettiger Fettsäuren an den GPR40 Rezeptor wird die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration gesteigert, die wiederum zur Exocytose der Insulingranula führt. Des Weiteren führt der Metabolismus der Fettsäuren, genau wie bei Glucose, zu einer erhöhten ATP/ADP Ratio, die zum Ausstrom an K^+ über den K_{ATP} Kanal führt. Die darauf folgende Depolarisation der Membran öffnet den spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal (VDCC). PLC: Phospholipase-C; PIP2: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; IP3: Inositol Triphosphate; DAG: Diacylglycerol; PKC: Proteinkinase C; VDCC: voltage-dependent Ca^{2+} -channel

Diese Lipid-bindenden Rezeptoren stellen eine interessante Zielstruktur dar, über die Fettsäuren auf die β -Zelle wirken können. Die physiologische Bedeutung von GPR40 für die Insulinsekretion steht mittlerweile außer Frage. Ob diese Rezeptoren allerdings auch für die β -Zell-Dysfunktion oder -Apoptose beim T2DM von Bedeutung sind, ist noch unklar.

1.3.5 Oxidativer Stress

Sauerstoff ist das stärkste oxidierende Agens in aeroben Organismen. Die Oxidationszahl kann von 0 (O_2) bis -2 (H_2O) variieren. Bei den dazwischen liegenden Oxidationsstufen liegt der Sauerstoff entweder als Radikal oder in teilweise reduzierter Form vor. Diese Zwischenstufen haben ein hohes Oxidationspotential und werden deswegen auch als reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) bezeichnet. Dazu gehören freie Radikale wie das Superoxid- ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxyl- (HO^{\cdot}), das Peroxyl- (RO_2^{\cdot}) oder das Alkoxy-Radikal (RO^{\cdot}), oder auch nicht-radikale Spezies, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Halliwell & Gutteridge 2007). Die verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies unterscheiden sich in ihrer Halbwertszeit, ihrer Reaktivität und der intrazellulären Konzentration. Wasserstoffperoxid hat eine relativ lange Halbwertszeit und ist somit das reaktionsträgste ROS. Obwohl H_2O_2 nur ein geringes Oxidationspotential hat, kann es direkt mit Cystein-Gruppen in Proteinen reagieren, wohingegen eine direkte Oxidation von Proteinen, Lipiden oder DNA nicht möglich ist (Lenzen 2008; Schönfeld & Wojtczak 2008). Die zellulären Effekte von H_2O_2 sind stark von der Konzentration abhängig. So wird bei niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen (10^{-8} M) die Proliferation induziert; wenn die Konzentration ansteigt (10^{-4} M), wird die Zellteilung inhibiert und schließlich Apoptose induziert (Giorgio *et al.* 2007). H_2O_2 kann aber in der Fe- oder Cu-katalysierten Fenton- bzw. Haber-Weiss-Reaktion in das hochreaktive HO^{\cdot} überführt werden. Dieses Radikal hat eine extrem kurze Halbwertszeit und reagiert unmittelbar mit Molekülen in direkter Umgebung. $O_2^{\cdot-}$ ist deutlich reaktionsträger als HO^{\cdot} , ist aber durch die große Menge, die während des aeroben Metabolismus gebildet wird, von großer Bedeutung. Die Mitochondrien sind ein wichtiger intrazellulärer Ort für die Entstehung von ROS. So wird ca. 1-2% des O_2 in den Mitochondrien, während der Atmung in ROS, zumeist $O_2^{\cdot-}$, umgewandelt (Ames *et al.* 1993), wobei hauptsächlich Komplex I und Komplex III der mitochondrialen Atmungskette beteiligt sind (Turrens 2003; Murphy 2009). Der Mechanismus der $O_2^{\cdot-}$ Bildung an Komplex I ist bereits relativ gut aufgeklärt. Innerhalb des Komplexes I kann $O_2^{\cdot-}$ durch einen Elektronentransfer vom vollständig reduzierten FMN zu O_2 gebildet werden. Der Anteil des vollständig reduzierten FMN wird durch die $NADH/NAD^+$ Ratio bestimmt (Hirst *et al.* 2008; Murphy 2009). Eine Inhibierung der Atmungskette durch Schädigung, Mutation, Ischämie, Ausstrom an Cytochrom c oder eine hohe $NADH+H^+$ -Konzentration, verursacht durch einen geringen ATP-Bedarf und einer damit verbundenen verringerten Respirationsrate, führt zu einem Anstieg der $NADH/NAD^+$ Ratio, die in einer verstärkten Bildung von $O_2^{\cdot-}$ resultiert (Kushnareva *et al.* 2002; Liu *et al.* 2002a; Kudin *et al.* 2004). Ein weiterer wichtiger Mechanismus, durch den Komplex I große Mengen an $O_2^{\cdot-}$ generiert, ist der Reverse Elektronentransport (RET) (Liu *et al.* 2002a; Kudin

et al. 2004). Dieser Prozess wird durch eine hohe protonenmotorische Kraft (Δp) ermöglicht, da so Elektronen vom Ubihydrochinon zurück in Komplex I fließen. Die Generierung von $O_2^{\cdot -}$ durch den RET in Komplex I konnte in isolierten Mitochondrien aus dem Gehirn, Herz, Muskel oder auch der Leber unter den Bedingungen einer erhöhten Δp mit einem Elektronenzustrom in den Q Pool von Succinat, α -Glycerophosphat oder der Fettsäureoxidation, nachgewiesen werden (Votyakova & Reynolds 2001; Liu *et al.* 2002a; St-Pierre *et al.* 2002). Die Lokalisation innerhalb von Komplex I, an der durch den RET $O_2^{\cdot -}$ gebildet wird, ist noch unklar (Hirst *et al.* 2008). Die einfachste Möglichkeit ist, dass durch den RET die Elektronen direkt durch Komplex I wieder zum FMN fließen. Dabei würde es sich um die gleiche Lokalisation handeln, wie bei der $O_2^{\cdot -}$ Bildung durch das reduzierte FMN, resultierend aus einer erhöhten $NADH+H^+/NAD^+$ Ratio (Liu *et al.* 2002a; Hirst *et al.* 2008). Des Weiteren könnte das $O_2^{\cdot -}$ auch an der Ubichinon-Bindungsstelle in Komplex I gebildet werden (Lambert & Brand 2004).

Komplex III, der Elektronen vom Q Pool zu Cytochrom c transportiert, wurde für lange Zeit auch als Quelle an $O_2^{\cdot -}$ innerhalb der Mitochondrien betrachtet (Stillwell *et al.* 1997; Murphy 2009). Obwohl in Komplex III auch $O_2^{\cdot -}$ durch die Reaktion von Ubisemichinon mit O_2 , gebunden an die Q_o Bindungsstelle, entstehen kann, ist die $O_2^{\cdot -}$ Produktion im Vergleich zu der an Komplex I vernachlässigbar. An Komplex I gebildetes $O_2^{\cdot -}$ strömt zur Matrix-Seite aus, während an Komplex III gebildetes $O_2^{\cdot -}$ zu beiden Seiten der inneren mitochondrialen Membran freigesetzt wird (St-Pierre *et al.* 2002; Kudin *et al.* 2004). Der oxidative Abbau von FFAs führt zu einer erhöhten $NADH+H^+/NAD^+$ Ratio, die wiederum eine gesteigerte Bildung von ROS in den Mitochondrien und somit eine Schädigung der β -Zelle verursachen kann.

Neben diesem indirekten Einfluss von FFAs durch einen gesteigerten Elektroneneinstrom ist auch eine direkte Interaktion von FFAs mit den Komplexen der Atmungskette möglich (Schönfeld & Wojtczak 2008). Besonders mehrfach ungesättigte FFAs sind in der Lage, den Elektronentransport in Komplex I und III teilweise zu inhibieren und somit die Ein-Elektron-Reduktion von O_2 zu $O_2^{\cdot -}$ zu ermöglichen. Nach neuesten Erkenntnissen interagieren die Komplexe der Atmungskette miteinander und bilden einen „Superkomplex“, das Respirasom (Schagger 2001). Ein Vorteil des Respirasoms könnte die Ausbildung eines Elektronenkanals sein, um so die ROS Generierung zu vermeiden (Schagger 2001). Unter Berücksichtigung dessen ist es möglich, dass FFAs das Respirasom destabilisieren und somit die ROS-Bildung steigern. Es wurde außerdem gezeigt, dass FFAs zu einer Ablösung des Cardiolipin gebundenen Cytochrom c von der äußeren Seite der inneren Membran führen können (Di Paola *et al.* 2000; Schönfeld & Wojtczak 2008). Unter diesen Umständen ist der Elektronen-

transport beeinträchtigt, so dass die davor liegenden Elektronen-Transporter ein erhöhtes Reduktionspotential aufweisen. Dies wiederum hat einen dramatischen Anstieg der ROS-Produktion zur Folge (Kushnareva *et al.* 2002). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Membranfluidität, die durch die Inkorporation von Fettsäuren beeinflusst werden kann (Stillwell *et al.* 1997; Kushnareva *et al.* 2002). Durch Erucasäure (C22:1) konnte zum Beispiel die Membranfluidität und somit auch die ROS-Produktion gesteigert werden (Gille & Nohl 2001). Der Mechanismus über den eine gesteigerte Membranfluidität die Ein-Elektron Reduktion von O₂ ermöglicht ist unklar.

Im Gegensatz zur beschriebenen FFA induzierten gesteigerten ROS-Produktion, können diese auch die RET abhängige O₂^{•-} Bildung aufheben. An isolierten Mitochondrien aus dem Herz oder dem Gehirn von Ratten konnte dies gezeigt werden (Korshunov *et al.* 1998; Schönfeld & Wojtczak 2007). Das Phänomen basiert auf der protonophorischen Aktivität („mildes entkoppeln“) von FFAs, die durch eine zyklische Bewegung der protonierten und deprotonierten Form über die innere mitochondriale Membran verursacht wird.

Im Mitochondrium gibt es neben der Atmungskette noch weitere potentielle ROS-bildende Systeme. Zu ihnen gehören Enzyme des Citrat-Zyklus, wie die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase oder die Pyruvat-Dehydrogenase (Starkov *et al.* 2004), p66^{Shc}, ein Enzym im Intermembranraum (Migliaccio *et al.* 2006) oder die Monoaminoxidase, die in der äußeren Membran lokalisiert ist (Andreyev *et al.* 2005).

Die Konzentration der verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies ist bestimmt durch das Gleichgewicht zwischen ihrer Bildung und ihrem Abbau durch verschiedene antioxidative Substanzen oder Enzyme. Antioxidantien sind per Definition von Halliwell und Gutteridge (Halliwell & Gutteridge 2007) Substanzen, die auch bei niedrigen Konzentrationen um die Oxidation mit anderen Substraten konkurrieren, so dass diese dann nicht mehr oxidiert werden. Dazu gehören Enzyme wie die Superoxiddismutasen (SOD), die Glutathionperoxidase (GPx) und Katalase, oder nicht-enzymatische Substanzen wie Vitamin E, β -Carotin, Vitamin C und Glutathion.

Das in den Mitochondrien oder im Zytosol gebildete O₂^{•-} wird in einer Disproportionierungsreaktion, katalysiert durch die Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD) bzw. die Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase (CuZnSOD), zu H₂O₂ umgewandelt. H₂O₂ ist permeabel und kann so durch das peroxisomale Enzym Katalase in einer weiteren Disproportionierung zu H₂O und O₂ abgebaut werden. Ein weiteres Enzym, das die Disproportionierung von H₂O₂ katalysiert, ist die GPx. Eine Besonderheit der pankreatischen β -Zellen ist die geringe Expression von antioxidativen Enzymen wie GPx und Katalase (Lenzen *et al.* 1996; Tiedge *et al.* 1997). Aus diesem Grund sind β -Zellen besonders empfindlich gegenüber einer vermehrten ROS-

Bildung, da sie nicht über die entsprechenden Abbaumechanismen verfügen. Die Aufklärung der β -zelltoxischen Wirkung verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies führte zur Strategie des antioxidativen oder zytoprotektiven Schutzes. Dafür wurde die Aktivität der entsprechenden enzymatischen Schutzsysteme wie z.B. Katalase oder SOD durch Überexpression in insulinproduzierenden Zellen gesteigert.

1.3.6 Spezifische Messung von Wasserstoffperoxid durch das Fluoreszenzprotein HyPer

Um die Bedeutung von H_2O_2 in bestimmten zellulären Prozessen zu analysieren, ist eine spezifische Messmethode unabdingbar. Die am weitesten verbreitete Methode ist die Detektion von ROS durch den chemischen Fluoreszenzfarbstoff Dichlorodihydrofluorescein ($DCFH_2$) (Wardman 2007). Diese Methode hat die Vorteile einer sensitiven, einfachen und kostengünstigen Messung von intrazellulär gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies. Ein entscheidender Nachteil ist allerdings, dass die Oxidation von $DCFH_2$ nicht spezifisch für eine reaktive Sauerstoffspezies ist. So stellt die Messung mit $DCFH_2$ eine geeignete Methode für ROS im Allgemeinen, aber nicht für eine bestimmte reaktive Sauerstoffspezies dar (Tarpey *et al.* 2004; Wardman 2007). Ein weiterer Nachteil ist, dass die Messung nicht spezifisch in einem zellulären Kompartiment erfolgen kann und somit auch keinen weiteren Aufschluss über den Entstehungsort oder die Art der Induktion gibt. Um diese Nachteile zu überwinden, wurde von Belousov *et al.* (2006) ein neuer spezifischer Sensor für H_2O_2 generiert. Bei diesem Sensor handelt es sich um ein Fusionsprotein von OxyR, ein reversibel oxidierbares bakterielles Protein (Aslund *et al.* 1999), mit dem *circularly permuted yellow fluorescent protein* (cpYFP). Durch die Oxidation von OxyR ändert sich dessen Konformation, die durch die Fusion mit cpYFP in einen Fluoreszenzshift umgewandelt wird. Dieses neu generierte Fluoreszenzprotein, genannt HyPer, hat zwei Anregungsmaxima bei 420 und 500 nm und ein Emissionsmaximum bei 516 nm. Bei einer Oxidation durch H_2O_2 sinkt das Anregungsmaximum bei 420 nm proportional zum Anstieg im Anregungsmaximum bei 500 nm (Belousov *et al.* 2006) (Abb. 4).

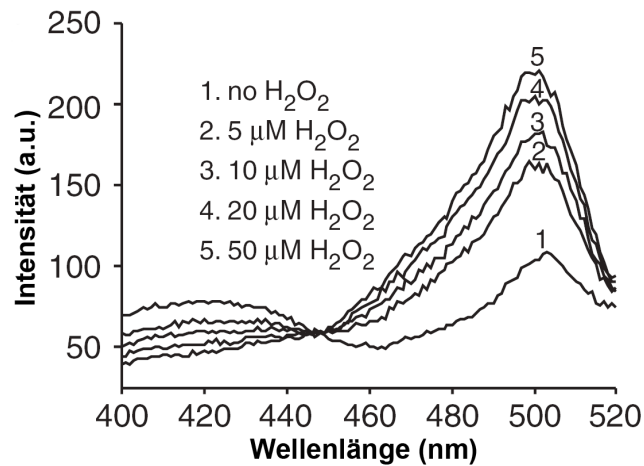


Abb. 4 Anregungsmaxima von HyPer in Abhängigkeit zur H₂O₂ Konzentration

Die spektralen Eigenschaften von HyPer wurden in einer *E.coli* Zellsuspension nach Zugabe verschiedener H₂O₂ Konzentrationen bestimmt. Dargestellt sind die Änderungen der Anregungsmaxima bei 420 nm und 500 nm bei einer Emission von 530 nm (Belousov *et al.* 2006).

HyPer weist eine submikromolare Affinität gegenüber H₂O₂ auf, während es nicht sensitiv gegenüber anderen Oxidantien ist (Belousov *et al.* 2006). Das neue HyPer-Protein bietet den weiteren großen Vorteil der kompartimentspezifischen Expression. So kann das HyPer-Protein z.B. mit der mitochondrialen Import-Sequenz fusioniert werden, um die H₂O₂ Produktion spezifisch in den Mitochondrien zu messen.

1.4 Fragestellung

Beim Typ 2 Diabetes mellitus können erhöhte Konzentrationen freier Fettsäuren zu einer β -Zell-Dysfunktion und -Apoptose führen, ein Phänomen, das als Lipotoxizität bezeichnet wird. Die molekularen Mechanismen, über die Fettsäuren zum Zelltod der β -Zellen führen, sind noch weitestgehend ungeklärt. Für ein besseres Verständnis der pathobiochemischen Vorgänge während der Manifestation des Typ 2 Diabetes mellitus, sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Die Struktur-Wirkungs-Beziehung verschiedener gesättigter und ungesättigter Fettsäuren sollte in Vitalitätsstudien an insulinproduzierenden Gewebekulturzellen analysiert und die Art des Zelltodes geklärt werden.
2. Die Induktion von ER-Stress wird als molekularer Mechanismus der Lipotoxizität diskutiert. Es sollte somit die Expression verschiedener ER-Stress Markergene nach einer Inkubation mit Palmitinsäure und Ölsäure im zeitlichen Verlauf bestimmt werden. Des Weiteren sollte die Aktivierung verschiedener kompartimentspezifischer Caspasen nach Palmitinsäureinkubation gemessen werden.
3. Es sollte geklärt werden, ob Fettsäure-bindende G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPR) Vermittler der Lipotoxizität sind.
4. Anhand von Vitalitätsstudien mit insulinproduzierenden Zellen, die unterschiedliche antioxidative Enzyme stabil überexprimieren, sollte geklärt werden, ob es während der Lipotoxizität zu einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies kommt.
5. Für eine organellspezifische Quantifizierung der H_2O_2 -Bildung nach Fettsäureexposition sollte eine spezifische Messmethode unter Verwendung des Fluoreszenzproteins HyPer etabliert werden. Für eine spezifische Expression in den Peroxisomen sollte HyPer mit einer *peroxisomal targeting sequence* fusioniert werden.

2 Publikationen

Titel:

Peroxisome generated hydrogen peroxide as mediator of lipotoxicity
in insulin-producing cells

Zeitschrift:

Diabetes

Zur Publikation eingereicht

Titel:

A specific fluorescence probe for hydrogen peroxide detection in peroxisomes

In Vorbereitung

Titel:

The antagonism between saturated and unsaturated fatty acids in
ROS mediated lipotoxicity in insulin-producing cells

In Vorbereitung

Titel:

Role of metabolically generated reactive oxygen species for
lipotoxicity in pancreatic β -cells

Zeitschrift:

Diabetes, Obesity and Metabolism

Zur Publikation angenommen am 29.04.2010

Peroxisome generated hydrogen peroxide as mediator of lipotoxicity in insulin-producing cells

Running title: Hydrogen peroxide mediated lipotoxicity

Matthias Elsner^{*}, Wiebke Gehrman^{*}, Sigurd Lenzen

^{*} Both authors contributed equally to this work

Institute of Clinical Biochemistry, Hannover Medical School, 30623 Hannover, Germany.

Address correspondence and reprint requests to:

Prof. Sigurd Lenzen
Institute of Clinical Biochemistry
Hannover Medical School
30623 Hannover
Germany
Telephone: + 49/511/5326525
Fax: + 49/511/5323584
lenzen.sigurd@mh-hannover.de

ABSTRACT

Objective: Type 2 diabetes mellitus is a complex disease that is accompanied by elevated levels of non-esterified fatty acids (NEFAs), which contribute to β -cell dysfunction and β -cell loss, referred to as lipotoxicity. Experimental evidence suggests that oxidative stress is involved in lipotoxicity. In this study, we analyzed the molecular mechanisms of reactive oxygen species-mediated lipotoxicity in insulin-producing RINm5F cells and INS-1E cells as well as in primary rat islet cells.

Research Design and Methods: The toxicity of saturated NEFAs with different chain lengths upon insulin-producing cells was determined by MTT and PI viability assays. Catalase or superoxide dismutase overexpressing cells were used to analyze the nature and the cellular compartment of reactive oxygen species formation. With the new H_2O_2 -sensitive fluorescent protein HyPer H_2O_2 formation induced by exposure to palmitic acid was determined.

Results: Only long chain ($>C_{14}$) saturated NEFAs were toxic to insulin-producing cells. Overexpression of catalase in the peroxisomes and in the cytosol, but not in the mitochondria, significantly reduced H_2O_2 formation and protected the cells against palmitic acid-induced toxicity. With the HyPer protein H_2O_2 generation was directly detectable in the peroxisomes of RINm5F and INS-1E insulin-producing cells as well as in primary rat islet cells.

Conclusions: The results demonstrate that H_2O_2 formation in the peroxisomes rather than in the mitochondria are responsible for NEFA-induced toxicity. Therefore, we propose a new concept of fatty acid-induced β -cell lipotoxicity mediated via reactive oxygen species formation through peroxisomal β -oxidation.

Abbreviations

DCF-DA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; EC_{50} , half maximally effective concentration; H_2O_2 , hydrogen peroxide; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; NEFA, non-esterified fatty acids; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase

Type 2 diabetes mellitus is a complex metabolic syndrome characterized by peripheral insulin resistance and pancreatic β -cell dysfunction (1; 2), resulting in defective glucose-induced insulin secretion (3-5) and β -cell dysfunction and loss through apoptosis (6-8). Obesity and the metabolic syndrome typically precede diabetes manifestation, which is accompanied by elevated levels of non-esterified fatty acids (NEFAs) (9). NEFA elevation can suppress insulin secretion and cause β -cell dysfunction, which may ultimately lead to β -cell loss, a phenomenon referred to as lipotoxicity (10; 11).

Saturated long-chain fatty acids are toxic to primary β -cells and insulin-producing cell lines (12; 13). However, the molecular mechanisms underlying lipotoxicity are only partially understood (14; 15). Recent evidence suggested that lipotoxic β -cell damage is accompanied by endoplasmic reticulum (ER) stress and calcium depletion in the ER, ultimately leading to β -cell apoptosis via caspase activation (16). However, this model does not explain why metabolism of NEFAs is required for their toxicity; non-metabolizable methylated fatty acids are non-toxic and induce little or no ER stress (15; 17). Recently, Lai et al. (2008) showed that overexpression of the ER chaperone Bip could not protect against palmitic acid-induced toxicity, supporting the argument against ER stress as the main molecular mechanism of lipotoxicity (18).

NEFA catabolism via mitochondrial β -oxidation is an important source of energy for pancreatic β -cells (19-21). It has been proposed that increased β -oxidation and oxidative phosphorylation cause lipotoxicity by enhancing formation of reactive oxygen species (ROS) in the mitochondria (15). Superoxide radicals are generated at complexes I and III of the respiratory chain (22) and can give rise to toxic hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radicals (23; 24). Interestingly, some studies have suggested that mitochondrial β -oxidation can be protective, while inhibition of β -oxidation increases lipotoxicity (25; 26). However, neither concept fully explains the molecular mechanism of lipotoxicity.

Herein, we provide experimental evidence in support of an entirely new concept of NEFA-induced β -cell lipotoxicity based on peroxisomal metabolism of NEFAs. Long-chain NEFAs, such as palmitic and stearic acid, can be metabolized through β -oxidation in the peroxisomes as well as in the mitochondria (27; 28). In contrast to mitochondrial β -oxidation, the acyl-CoA oxidases in the peroxisomes form H_2O_2 and not reducing equivalents (28). For H_2O_2 inactivation, the oxidoreductase catalase is typically expressed in peroxisomes (28). However, expression of H_2O_2 -inactivating catalase is virtually absent in the peroxisomes of insulin-producing cells (29; 30). This lack of a low affinity, high capacity H_2O_2 -inactivating enzyme (29; 30) impedes inactivation of peroxisome-generated H_2O_2 , thereby increasing the vulnerability of pancreatic β -cells to ROS-mediated lipotoxicity (15; 23).

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Tissue culture of insulin-producing cells

Insulin-producing RINm5F cells and INS-1E cells (kindly provided by C. Wollheim) were cultured as described previously (30; 31).

RINm5F cell clones that overexpressed different antioxidative enzymes were generated as described previously (32; 33). Cellular expression of antioxidative enzymes was analyzed by Western blot or catalase enzyme activity measurement (33).

For the quantification of the catalase activity the method originally described by (34) was used. In brief, cells were homogenized in phosphate buffered saline (pH 7.4) through sonication on ice for 1 min in 15-s bursts at 90 W. Catalase activity was measured by ultraviolet spectroscopy, monitoring the decomposition of H₂O₂ at 240 nm. Catalase activity was calculated by the following equation:

$$U / mg = \frac{\Delta A \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1000 \cdot \text{ml Reaction Mix}}{43.6 \cdot \text{mg Protein}}$$

NEFAs (Sigma, St. Louis, MO, USA) were dissolved in 90% ethanol heated to 60°C and used at different concentrations in RPMI 1640 (PAN, Aidenbach, Germany) with 1% fetal calf serum and a final BSA (MP Biomedicals, Eschwege, Germany) : NEFA ratio of 2% : 1 mM, according to (13). All control wells received the same amount of solvent and BSA. This procedure did not cause a significant decrease in viability in the absence of added fatty acids.

Rat islet isolation and culture

Pancreatic islets were isolated from 250-300 g adult male Lewis rats by collagenase digestion, separated by Ficoll gradient, and handpicked under a stereo microscope. Isolated islets were cultured on extracellular matrix (ECM)-coated plates (35mm) (Novamed, Jerusalem, Israel, the ECM being derived from bovine corneal endothelial cells) in RPMI-1640 medium containing 5 mM glucose, 10% FCS, penicillin, and streptomycin at 37 °C in a

humidified atmosphere of 5% CO₂ according to (35) et al. The islets were cultured for 7-10 d on the ECM plates to adhere and spread before they were infected with HyPer-Peroxi lentivirus or treated with palmitic acid.

Assessment of cell viability

RINm5F mock-transfected and cytoprotective enzyme overexpressing RINm5F insulin-producing cells were seeded at 25,000 cells/well in 100 µl culture medium in 96-well plates (for PI staining, black 96-well plates) and allowed to attach for 24 h before they were incubated at 37°C with NEFAs for 24 h. Cell viability was then determined by either microplate-based MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (36) or PI staining (Sigma, St. Louis, MO, USA). PI is membrane impermeant and usually excluded from viable cells (37). To measure the rate of cell death after NEFA treatment, the PI stock solution (12.5 µg/ml) was diluted in the incubation media to a final concentration of 0.625 µg/ml. After 15 min incubation in the dark, the plates were analyzed at 520/620 nm excitation/emission using the fluorescence reader Victor² 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, Wiesbaden, Germany).

Determination of oxidative stress by DCF-DA fluorescence

To detect overall oxidative stress, 25,000 cells were seeded in 96-well black plates and cultured for 24 h. The cells were then pre-incubated with 10 µM DCF-DA (2, 7-dichlorofluorescein diacetate, Sigma, St. Louis, MO, USA) for 30 min at 37°C. Thereafter, medium containing DCF-DA was replaced with fresh medium with or without palmitic acid. After 24 h incubation, the plates were analyzed at 480/520 nm excitation/emission using the fluorescence reader Victor² 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, Wiesbaden, Germany) (38). Data are expressed as percentages relative to untreated cells.

Cloning of HyPer vectors

For in vivo analyses of mitochondrial H₂O₂ generation, the cDNA of the H₂O₂-sensitive fluorescent HyPer protein (39) was subcloned from the pHyPer-dMito (Evrogen, Moscow,

Russia) into the lentiviral transfer plasmid pLenti6/V5-MCS (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). The cDNA was excised from the pHyPer-dMito plasmid using the NheI and NotI restriction sites, blunted, and ligated into the EcoRV site of the pLenti6/V5-MCS plasmid. To construct the expression vector for the HyPer-Peroxi protein the peroxisome target signal (PTS1) (40; 41) was joined to the 3'-end of the HyPer cDNA by PCR using composite Primer (HyPer-PTS1-XbaI-fw (5'-TATCTAGACGCCACCATGGAGATGGCAA-3') and HyPer-PTS1-Bsp119I-rv (5'-GCTTCGAATTACAGCTTGGAACCGCCTGTTTTAAAC-3')) and the pHyper-dCyto plasmid as template. Then, the HyPer-Peroxi cDNA was subcloned into the XbaI/Bsp119I site of the pLenti6/V5-MCS plasmid.

Preparation of lentiviruses

To express the HyPer-Mito and HyPer-Peroxi proteins lentivirus was prepared according to (42): 500,000 293FT cells were transfected with the packaging plasmid pPAX2 (37.5 µg), the envelope plasmid pcDNA-MDG (7.5 µg), and the transfer plasmids pLenti6/V5-MCS-HyPer-Mito or pLenti6/V5-MCS-HyPer-Peroxi (25 µg) by calcium phosphate precipitation. The virus particles were harvested from the culture medium 48 h later and purified by ultracentrifugation (2 h at 70,000 g). The virus titers ($3\text{-}5 \times 10^7$ infectious particles) were quantified by Taqman qPCR assay as described elsewhere (43).

Lentiviral transduction

The RINm5F-control, RINm5F-Cat, RINm5F-MitoCat (33), INS-1E, and primary rat islet cells were infected with HyPer-Mito or HyPer-Peroxi lentivirus at a MOI of 10. The tissue culture cells were selected for HyPer expression using blasticidin (1 µmol/L).

Analysis of H₂O₂ generation using HyPer proteins

RINm5F cells or primary rat islet cells that overexpressed HyPer-Mito or HyPer-Peroxi were seeded onto black 24-well glass-bottom plates (Greiner, Frickenhausen, Germany). Cells were cultured for 24 h and afterwards exposed to palmitic acid for another 24 h. Live cell imaging was performed using a CFP-YFP dual filter (excitation, 427 nm and 504 nm;

emission, 520 nm) with a cell^R/Olympus IX 81 inverted microscope system and CellR software (Olympus, Hamburg, Germany) for imaging and analysis.

To determine H₂O₂ production, changes in the fluorescence ratios of RINm5F, RINm5F-Cat, RINm5F-MitoCat, and INS-1E cells that overexpressed HyPer-Mito or HyPer-Peroxi were quantified spectrofluorometrically. Those cells were seeded at 25,000 cells per well onto black 96-well plates and cultured for 24 h. The fluorescence ratio was measured immediately before and after 24 h treatment with palmitic acid.

Immunocytochemical staining

For immunocytochemical staining of primary rat β -cells, HepG2 cells, RINm5F cells, and RINm5F cells that overexpressed catalase, 100,000 cells were seeded overnight on collagen-coated glass slides and subsequently fixed with 4% paraformaldehyde. After washing, the cells were permeabilized and blocked with PBS containing 0.2% Triton X-100 and 1% BSA. The slides were incubated with primary antibodies (for detailed information see Table S1) diluted in PBS containing 0.1% Triton X-100 and 0.1% BSA at room temperature for 60 min. Then, the cells were washed with PBS and incubated with secondary antibodies (for detailed information see Table S1) for 60 min. For nuclear counterstaining, 300 nM DAPI was applied for 5 min at room temperature. Finally, the cells were washed and mounted with Mowiol/DABCO (Sigma, St. Louis, MO, USA) anti-photobleaching mounting media. Stained cells were examined on an Olympus IX81 inverted microscope (Olympus, Hamburg, Germany) and microscopic images were post-processed using AutoDeblur and AutoVisualize (Autoquant Imaging, New York, USA).

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were performed using ANOVA plus Dunnett's test for multiple comparisons, unless stated otherwise. EC₅₀ values were calculated from nonlinear regression analyses using least square algorithms of the Prism analysis program (Graphpad, San Diego, CA, USA).

RESULTS

Chain length-dependent toxicity of saturated non-esterified fatty acids in insulin-producing cells

Saturated NEFAs were toxic to RINm5F insulin-producing cells. In both the MTT cell viability and the propidium iodide (PI) cytotoxicity assays, toxicity was dependent on NEFA chain length (Fig. 1). The longest chain length fatty acid analyzed, stearic acid (C18:0), was the most toxic, with a half-maximal effective concentration (EC_{50}) below 100 μ M. The EC_{50} for palmitic acid (C16:0), the physiologically most abundant and important saturated NEFA, was around 100 μ M after 24 h incubation. Toxicity decreased with decreasing chain length. Myristic acid (C14:0) was highly toxic ($EC_{50} \cong 200 \mu$ M), while tridecanoic acid (C13:0) was significantly less toxic, with an EC_{50} well above 500 μ M. With further chain length shortening (C12:0 to C10:0), toxicity was negligible with EC_{50} values exceeding 1000 μ M. For even shorter chain saturated fatty acids (C8:0 to C4:0), EC_{50} values could not be calculated due to marginal toxicity (data not shown). Toxicity was also observed in a FACS-based caspase-3 assay (30% caspase-3 positive cells at 100 μ M palmitic acid as compared to 6% caspase-3 positive cells under control conditions), indicating an apoptotic mode of fatty acid-induced cell death.

Palmitic acid-induced cell death was also observed in isolated primary rat islet cells in the propidium iodide cytotoxicity assay. After 24 h incubation with 500 μ M palmitic acid $33\% \pm 4$ of rat islet cells stained positive for propidium iodide, whereas in untreated cells the cell death rate was low ($6\% \pm 1$).

Intracellular localization and enzyme activity of catalase in RINm5F insulin-producing cells overexpressing catalase

While primary rat islet cells as well as untransfected RINm5F insulin-producing cells showed virtually no immunostaining for catalase (data not shown), RINm5F insulin-producing cells transfected to overexpress catalase in the cytosol (Cat) showed a homogenous

distribution of catalase in the cytoplasm and a dot-like pattern of catalase co-localization with peroxisomes (Fig. 2A); on the other hand, catalase did not co-localize with mitochondria (Fig. 2B). Catalase was not detectable in the cytoplasm or in the peroxisomes of insulin-producing cells that overexpressed catalase in the mitochondria (Mito-Cat; Fig. 2C); in these cells, catalase co-localized specifically with the mitochondria (Fig. 2D).

The localization of catalase in RINm5F-Cat cells was additionally analysed in 3D images using the Imaris software (Bitplane, Zurich, Switzerland). The 3D models were generated from 20 z-layers of the immunocytochemical staining of catalase and the peroxisomes (Fig. S1) or the mitochondria (Fig. S2). In these images, catalase showed a clear co-localization with the peroxisomes while no significant co-localisation was detectable with the mitochondria.

The results of these immunostainings were also reflected by the catalase enzyme activities of the examined cells. Primary rat islet cells and untransfected RINm5F cells showed a comparable catalase activity of 20 ± 5 U/mg and 13 ± 1 U/mg, respectively. By contrast in RINm5F-catalase (353 ± 7 U/mg) and RINm5F-mito-catalase (367 ± 43 U/mg) cells the enzyme activity was approximately 17-fold higher.

Effects of the antioxidative enzymes catalase and SOD on palmitic acid toxicity in insulin-producing cells

RINm5F insulin-producing cells that overexpressed different antioxidative enzymes were used as a tool to analyze the role of ROS in palmitic acid toxicity. While overexpression of the H₂O₂-inactivating enzyme catalase in peroxisomes and in the cytosol (Cat) protected against palmitic acid (100 μ M) toxicity, catalase overexpression in the mitochondria (Mito-Cat) did not provide protection (Fig. 3). Neither overexpression of the cytosolic superoxide radical detoxifying isoenzyme CuZnSOD (copper zinc superoxide dismutase) nor overexpression of the mitochondrial isoenzyme MnSOD (manganese superoxide dismutase) provided significant protection against palmitic acid toxicity.

Overexpression of catalase in insulin-producing cells reduced palmitic acid-induced ROS generation

ROS generation in RINm5F insulin-producing control cells as measured by the DCF fluorescence method was increased by about 40% in response to exposure to 100 μ M palmitic acid (Fig. 4). Overexpression of catalase in the peroxisomes and the cytosol, but not in the mitochondria, significantly reduced palmitic acid-induced (100 μ M) ROS generation.

Peroxisomes in rat islet cells, RINm5F insulin-producing cells, and HepG2 cells

Peroxisomes were clearly detectable by immunofluorescence as small green spots in primary rat β -cells, RINm5F insulin-producing cells, and HepG2 cells (Fig. S3). β -cells isolated from rat pancreatic islets were identified by immunofluorescent staining of insulin; RINm5F cells were also positive for insulin. To quantify the density of peroxisomes in insulin-producing and hepatoma cells the peroxisomes were counted in β -cells, RINm5F cells, and HepG2 cells after immunofluorescence staining of the peroxisomes by PMP-70 in 5-8 images (Fig. S4). The number of peroxisomes per cell was determined by the image analysis software Imaris (Bitplane, Zurich, Switzerland). The results clearly show that there were no significant differences in peroxisome density in hepatoma and in insulin-producing RINm5F cells as well as in primary rat β -cells.

Intracellular localization of the HyPer-Peroxi protein

To proof the intracellular localization of the HyPer protein targeted to the peroxisomes in RINm5F cells, fixed cells were stained for the peroxisomal membrane protein 70 (PMP-70). The fluorescence (504/520 nm) of the HyPer protein was clearly detectable as green spots after fixation with paraformaldehyde. Staining of the peroxisomes (PMP-70) showed a distinct co-localization with the HyPer-Peroxi protein (Fig. S5 A-C).

Subcellular site of H₂O₂ generation in insulin-producing cells following exposure to palmitic acid

In order to obtain more information about the nature of the reactive oxygen species and the intracellular site of ROS production following palmitic acid exposure, the HyPer protein, which is a specific sensor for H₂O₂, was expressed in either the peroxisomes (RINm5F-HyPer-Peroxi) or the mitochondria (RINm5F-HyPer-Mito) of RINm5F insulin-producing cells. The HyPer protein allows ratiometric measurement of H₂O₂ by fluorescence microscopy at two different wavelengths. In the false-colored overlay images, green staining corresponds to low, yellow to medium, and red to high H₂O₂ concentrations. After 24 h of exposure to palmitic acid, RINm5F-HyPer-Peroxi cells showed a strong shift towards red fluorescence (Fig. 5C and 5D). In contrast, the RINm5F-HyPer-Mito cells showed only a slight increase in red fluorescence, indicating a lower H₂O₂ concentration in the mitochondria relative to the peroxisomes (Fig. 5A and 5B). RINm5F-HyPer-Peroxi and RINm5F-HyPer-Mito cells incubated without palmitic acid under control conditions for 24 h showed no changes in fluorescence signals (data not shown).

The key finding of H₂O₂ generation in the peroxisomes of RINm5F cells after exposure to palmitic acid was confirmed in primary rat islet cells. Single rat islet cells were lentivirally transduced with Hyper-Peroxi cDNA and incubated with palmitic acid for 24 h. In the palmitic acid treated islet cells a clear shift towards red fluorescence was detectable, which corresponds to a higher H₂O₂ concentration in comparison to untreated cells (Fig. 6).

Quantification of H₂O₂ generation in insulin-producing cells following exposure to palmitic acid

Differences in peroxisomal and mitochondrial H₂O₂ concentration following 24 h exposure to palmitic acid were quantified spectrofluorometrically. Treatment with 100 μM palmitic acid induced a significantly higher rate of H₂O₂ production in both the peroxisomes and the mitochondria of control RINm5F cells than did treatment with 50 μM palmitic acid

(Fig. 7A and B). At 100 μM palmitic acid, there was a tendency for a greater increase of the peroxisomal as compared to the mitochondrial H_2O_2 production in RINm5F cells (Fig. 7A and B). In INS-1E cells the H_2O_2 production was even significantly higher in the peroxisomes than in the mitochondria after palmitic acid treatment (Fig. 8).

Additional information about the intracellular site of H_2O_2 production after palmitic acid exposure was obtained by overexpressing the H_2O_2 detoxifying enzyme catalase either in the peroxisomes and the cytosol or in the mitochondria of RINm5F-HyPer-Peroxi and RINm5F-HyPer-Mito cells, respectively. Catalase expression in the peroxisomes and cytosol of RINm5F-HyPer-Peroxi cells reduced H_2O_2 production significantly in the presence of 50 and 100 μM palmitic acid as compared to control cells, while overexpression of catalase in the mitochondria did not significantly reduce H_2O_2 production in the peroxisomes (Fig. 7A).

Overexpression of catalase in the peroxisomes and the cytosol significantly reduced the mitochondrial H_2O_2 concentration in response to incubation with 100 μM (and to a lesser extent with 50 μM) palmitic acid as compared to control cells. Overexpression of catalase in the mitochondria did not significantly affect mitochondrial production of H_2O_2 even though there was a tendency towards a reduction at 100 μM palmitic acid (Fig. 7B).

Overall, the data showed that overexpression of catalase in peroxisomes and cytosol reduced H_2O_2 generation in the peroxisomes and, to a lesser extent, in the mitochondria. In contrast, overexpression of catalase in the mitochondria had no significant effect on H_2O_2 production in either organelle (compare Fig. 7A and 7B).

DISCUSSION

The present data clearly show that NEFA toxicity increases with increasing chain length. NEFAs are oxidized not only in the mitochondria, but also in the peroxisomes. Fatty acid β -oxidation is a property of peroxisomes in most, if not all, organisms (27). Moreover, in yeast and plants, peroxisomes are the sole sites of fatty acid β -oxidation (44). One product of peroxisomal β -oxidation is H_2O_2 , whereas mitochondrial β -oxidation generates reducing equivalents (27; 28). Mitochondrial β -oxidation is tightly coupled to the respiratory chain and oxidative phosphorylation. It provides acetyl-CoA for further oxidation in the TCA cycle and ensures the production of ATP, which is not an apparent function of peroxisomal β -oxidation. In peroxisomal β -oxidation, the initial step generates H_2O_2 and energy is lost as heat. Peroxisomal β -oxidation results in chain shortening of long- and very long-chain fatty acids, which are poor substrates for mitochondrial β -oxidation. The shortened fatty acids are subsequently transported to the mitochondria in a carnitine-dependent manner for further degradation (27; 28).

The observation of the chain length-dependent increase in the toxicity of saturated fatty acids to insulin-producing cells prompted us to study the role of oxygen free radicals generated by peroxisomal β -oxidation as mediators of lipotoxicity. In the first step of peroxisomal β -oxidation, FAD-containing acyl-CoA oxidase introduces a double bond at the β -position of the fatty-acyl-CoA ester and the hydrogen atoms are transferred to molecular oxygen to yield H_2O_2 (28). Remarkably, in rat liver for example about 20% of total oxygen consumption is accounted for peroxisomal oxidase activity (45). For the detoxification of H_2O_2 , the oxidoreductase catalase, which has a high turnover rate, is expressed in the peroxisomes of most tissues (28) but not in those of pancreatic β -cells (29; 30). This low catalase enzyme activity could also be found in RINm5F cells, which makes these cells well-suited as model cells for H_2O_2 mediated lipotoxicity.

Experiments with insulin-producing cells overexpressing antioxidative enzymes showed that only cytosolic catalase provided protection against palmitic acid-induced toxicity; mitochondrial catalase was not protective. The superoxide radical detoxifying isoenzymes MnSOD and CuZnSOD were also not protective, indicating that the formation of superoxide radicals does not play as crucial a role in lipotoxicity as does the formation of H₂O₂. Indeed, determination of ROS production by DCF fluorescence measurements provided support for this hypothesis by showing a reduction in ROS generation in insulin-producing cells that overexpressed catalase in the peroxisomes and the cytosol but not in the mitochondria. Using the H₂O₂-sensitive HyPer protein as a novel, specific method for detecting H₂O₂, we clearly identified H₂O₂ as the main reactive oxygen species formed during palmitic acid treatment. To determine the subcellular site of H₂O₂ formation, the HyPer protein was fused to a peroxisome- or a mitochondrion-targeting sequence to allow organelle-specific expression. These experiments showed that peroxisomes were the major site of H₂O₂ formation in insulin-producing cells, whereas the mitochondria were a minor site. Primary rat islet cells are well equipped with peroxisomes, and showed also an increased peroxisomal H₂O₂ formation in response to palmitic acid, as demonstrated in this study.

An additional argument for this hypothesis is the fact that overexpression of catalase in the peroxisomes and the cytosol (RINm5F-Cat) significantly reduced H₂O₂ production not only in the peroxisomes but also in the mitochondria, though catalase was not overexpressed in the latter organelle. H₂O₂ as a membrane-permeable ROS (23; 24) can diffuse from its site of generation in the peroxisome into the mitochondria where it is detected through the HyPer-Mito protein. Thus the source of the elevated H₂O₂ concentration detected in the mitochondria is at least in part H₂O₂ generated in the peroxisomes.

However, in contrast to the peroxisomes in other cell types, insulin-producing cells do not appear to express catalase mRNA or protein (29; 30). This lack of catalase expression leaves insulin-producing cells badly protected against potentially hazardous effects of H₂O₂

generated through peroxisomal β -oxidation. Mitochondrial β -oxidation may not be able to cope with the elevated levels of NEFAs that are associated with obesity and type 2 diabetes, resulting in a higher proportion of fatty acids being metabolized through peroxisomal β -oxidation, leading to increased H_2O_2 formation. The membrane-permeable H_2O_2 , could leave the peroxisomes and harm insulin biosynthesis and secretion (11; 46; 47), as has been shown for insulin-secreting cells after exposure to high NEFA concentrations for extended periods (15). The results of the present study do not support the concept of mitochondrial ROS formation through β -oxidation as a potential cause of lipotoxicity-mediated β -cell dysfunction. Rather, our results indicate that ROS generated in the peroxisomes are the major cause of lipotoxicity-mediated β -cell dysfunction.

NADPH oxidase activation could also be a source of long-chain fatty acid-mediated superoxide radical generation (22) that has been postulated to cause lipotoxicity in insulin-producing cells (15; 48). Palmitic acid has been shown to activate this plasma membrane enzyme in aortic smooth muscle and endothelial cells in a protein kinase C-dependent manner, leading to superoxide radical formation (49). In insulin-producing cells, palmitic acid can induce superoxide radical formation along with increased expression of the NADPH oxidase p47^{phox} subunit (15; 48; 50). However, data from the present study indicated that cytosolic CuZnSOD did not protect insulin-producing cells against palmitic acid-induced toxicity, suggesting that an increased rate of superoxide radical formation per se is insufficient to explain NEFA-induced lipotoxicity.

Thus, we hypothesize that NEFA-induced lipotoxicity is mediated by H_2O_2 generated during peroxisomal β -oxidation of long-chain saturated fatty acids. This novel hypothesis can explain lipid-induced glucose intolerance in obesity and diabetic hyperglycemia as a result of β -cell dysfunction in patients with type 2 diabetes. The lack of catalase expression in pancreatic β -cell peroxisomes (29; 30) explains the exceptional susceptibility of pancreatic β -cells to lipotoxicity (14; 15; 23).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Maren Böger and Martin Wirth for their skillful technical assistance. This work was supported by the European Union (Integrated Project EuroDia LSHM-CT-2006-518153 in the Framework Program 6 [FP6] of the European Community).

REFERENCES

1. Boden G: Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46:3-10, 1997
2. DeFronzo RA: Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 37:667-687, 1988
3. Carpentier A, Mittelman SD, Lamarche B, Bergman RN, Giacca A, Lewis GF: Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation. *Am J Physiol* 276:E1055-1066, 1999
4. Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, Pratipanawatr T, Berria R, Pratipanawatr W, Bajaj M, Mandarino L, DeFronzo R, Cusi K: A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes* 52:2461-2474, 2003
5. Paolisso G, Gambardella A, Amato L, Tortoriello R, D'Amore A, Varricchio M, D'Onofrio F: Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects. *Diabetologia* 38:1295-1299, 1995
6. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC: Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102-110, 2003
7. Clark A, Wells CA, Buley ID, Cruickshank JK, Vanhegan RI, Matthews DR, Cooper GJ, Holman RR, Turner RC: Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res* 9:151-159, 1988
8. Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM, Sempoux C, Henquin JC: Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4:32-42, 2008
9. Gordon ES: Non-esterified fatty acids in the blood of obese and lean subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 8:740-747, 1960
10. Poitout V, Robertson RP: Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143:339-342, 2002
11. Zhou YP, Grill VE: Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J Clin Invest* 93:870-876, 1994
12. Azevedo-Martins AK, Monteiro AP, Lima CL, Lenzen S, Curi R: Fatty acid-induced toxicity and neutral lipid accumulation in insulin-producing RINm5F cells. *Toxicol In Vitro* 20:1106-1113, 2006
13. Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Eizirik DL, Pipeleers DG: Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* 50:1771-1777, 2001
14. Cnop M: Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans* 36:348-352, 2008
15. Newsholme P, Keane D, Welters HJ, Morgan NG: Life and death decisions of the pancreatic beta-cell: the role of fatty acids. *Clin Sci (Lond)* 112:27-42, 2007
16. Cnop M, Igoillo-Esteve M, Cunha DA, Ladriere L, Eizirik DL: An update on lipotoxic endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. *Biochem Soc Trans* 36:909-915, 2008
17. Cunha DA, Hekerman P, Ladriere L, Bazarra-Castro A, Ortis F, Wakeham MC, Moore F, Rasschaert J, Cardozo AK, Bellomo E, Overbergh L, Mathieu C, Lupi R, Hai T, Herchuelz A, Marchetti P, Rutter GA, Eizirik DL, Cnop M: Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. *J Cell Sci* 121:2308-2318, 2008

18. Lai E, Bikopoulos G, Wheeler MB, Rozakis-Adcock M, Volchuk A: Differential activation of ER stress and apoptosis in response to chronically elevated free fatty acids in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E540-550, 2008
19. Berne C: The metabolism of lipids in mouse pancreatic islets. The oxidation of fatty acids and ketone bodies. *Biochem J* 152:661-666, 1975
20. Lenzen S, Panten U: 2-oxocarboxylic acids and function of pancreatic islets in obese-hyperglycaemic mice. Insulin secretion in relation to ⁴⁵Ca uptake and metabolism. *Biochem J* 186:135-144, 1980
21. Panten U, Lenzen S: *Alterations in energy metabolism of secretory cells. In: The energetics of secretion responses.* Boca Raton, CRC Press, 1988
22. Schonfeld P, Wojtczak L: Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 45:231-241, 2008
23. Lenzen S: Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans* 36:343-347, 2008
24. Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, 2007
25. El-Assaad W, Buteau J, Peyot ML, Nolan C, Roduit R, Hardy S, Joly E, Dbaibo G, Rosenberg L, Prentki M: Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology* 144:4154-4163, 2003
26. Hellemans K, Kerckhofs K, Hannaert JC, Martens G, Van Veldhoven P, Pipeleers D: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-retinoid X receptor agonists induce beta-cell protection against palmitate toxicity. *FEBS J* 274:6094-6105, 2007
27. Kunau WH, Dommes V, Schulz H: beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res* 34:267-342, 1995
28. Dansen TB, Wirtz KW: The peroxisome in oxidative stress. *IUBMB Life* 51:223-230, 2001
29. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M: Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 20:463-466, 1996
30. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S: Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46:1733-1742, 1997
31. Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB: Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130:167-178, 1992
32. Lortz S, Gurgul-Convey E, Lenzen S, Tiedge M: Importance of mitochondrial superoxide dismutase expression in insulin-producing cells for the toxicity of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines. *Diabetologia* 48:1541-1548, 2005
33. Gurgul E, Lortz S, Tiedge M, Jorns A, Lenzen S: Mitochondrial catalase overexpression protects insulin-producing cells against toxicity of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines. *Diabetes* 53:2271-2280, 2004
34. Claiborne A: Catalase activity In *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* RA G, Ed. Boca Raton, FL, CRC Press, 1985, p. 283-284
35. Cornu M, Modi H, Kawamori D, Kulkarni RN, Joffraud M, Thorens B: Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) increases beta-cell glucose competence and proliferation by translational induction of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) expression. *J Biol Chem*
36. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63, 1983

37. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F: Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13:795-808, 1992
38. Rosenkranz AR, Schmaldienst S, Stuhlmeier KM, Chen W, Knapp W, Zlabinger GJ: A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *J Immunol Methods* 156:39-45, 1992
39. Belousov VV, Fradkov AF, Lukyanov KA, Staroverov DB, Shakhbazov KS, Terskikh AV, Lukyanov S: Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* 3:281-286, 2006
40. de Hoop MJ, Ab G: Import of proteins into peroxisomes and other microbodies. *Biochem J* 286 (Pt 3):657-669, 1992
41. Subramani S: Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu Rev Cell Biol* 9:445-478, 1993
42. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D: Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72:9873-9880, 1998
43. Sastry L, Johnson T, Hobson MJ, Smucker B, Cornetta K: Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods. *Gene Ther* 9:1155-1162, 2002
44. Wanders RJ, Waterham HR: Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* 75:295-332, 2006
45. Reddy JK, Mannaerts GP: Peroxisomal lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 14:343-370, 1994
46. Akesson B, Lundquist I: Nitric oxide and hydroperoxide affect islet hormone release and Ca(2+) efflux. *Endocrine* 11:99-107, 1999
47. Maechler P, Jornot L, Wollheim CB: Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 274:27905-27913, 1999
48. Morgan D, Oliveira-Emilio HR, Keane D, Hirata AE, Santos da Rocha M, Bordin S, Curi R, Newsholme P, Carpinelli AR: Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. *Diabetologia* 50:359-369, 2007
49. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H: High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49:1939-1945, 2000
50. Lambertucci RH, Hirabara SM, Silveira Ldos R, Levada-Pires AC, Curi R, Pithon-Curi TC: Palmitate increases superoxide production through mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidase activity in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol* 216:796-804, 2008

FIGURES

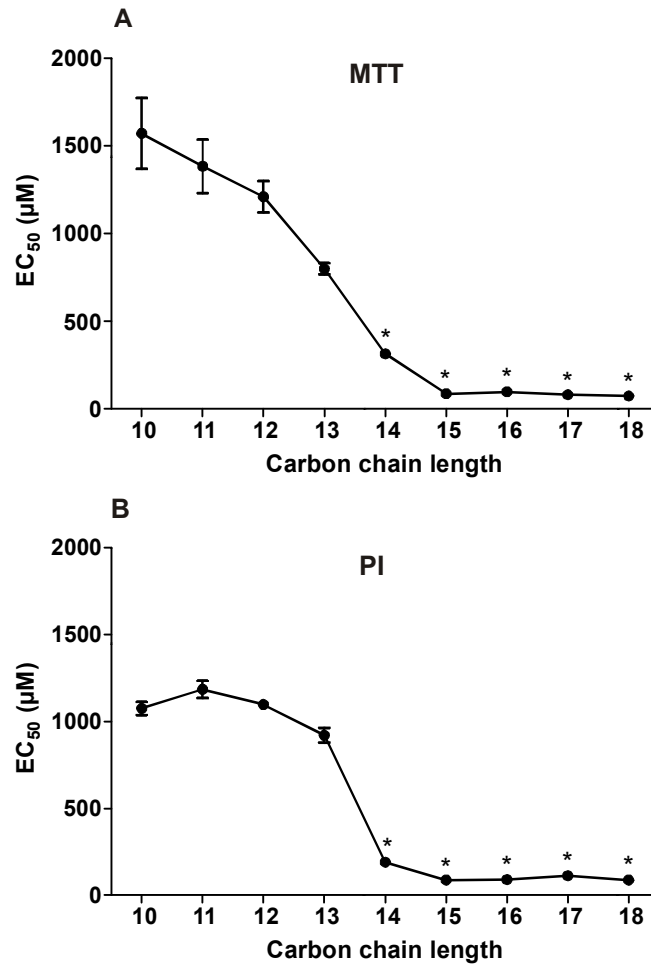


Fig. 1 Toxicity of saturated non-esterified fatty acids (NEFAs) according to chain length (C10:0-C18:0) in RINm5F insulin-producing cells

Cells were incubated for 24 h with saturated NEFAs of different chain lengths (10 µM – 2000 µM) and viability was determined by MTT assay (A) or propidium iodide staining (B). EC₅₀ values were calculated by nonlinear regression analysis. Data are means ± SEM from 4-6 individual experiments. *p < 0.01 as compared to C10:0, C11:0, C12:0, or C13:0. Other comparisons were not significant (ANOVA/Tukey's test for multiple comparisons).

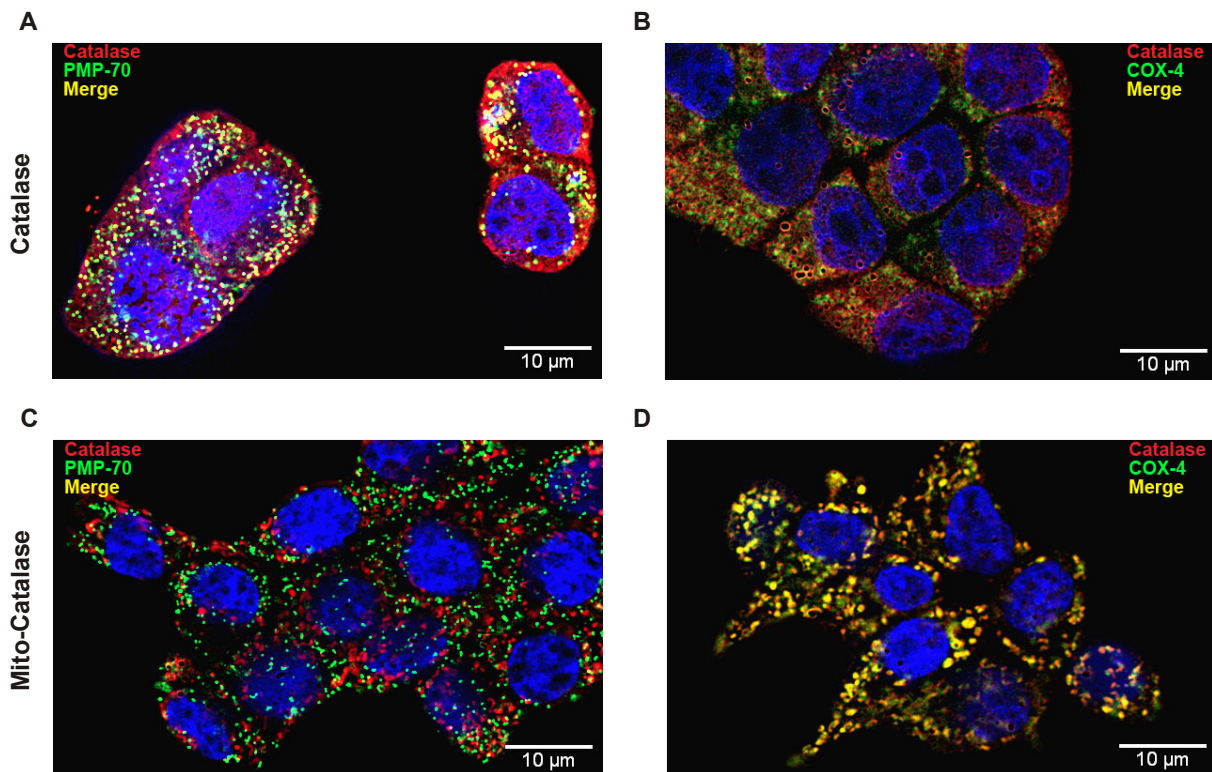


Fig. 2 Immunocytochemical staining for catalase, peroxisomes, and mitochondria in catalase or mito-catalase overexpressing RINm5F insulin-producing cells

RINm5F insulin-producing cells that overexpressed catalase in the cytosol (Catalase, A and B) or in the mitochondria (Mito-Catalase, C and D) were seeded overnight on collagen-coated coverslips. After fixation with 4% paraformaldehyde, the cells were stained for catalase (red) and for the peroxisomal membrane protein 70 (PMP-70 green) or the mitochondrial respiratory chain enzyme cytochrome c-oxidase IV (COX-4 green) followed by nuclear counterstaining with DAPI (blue).

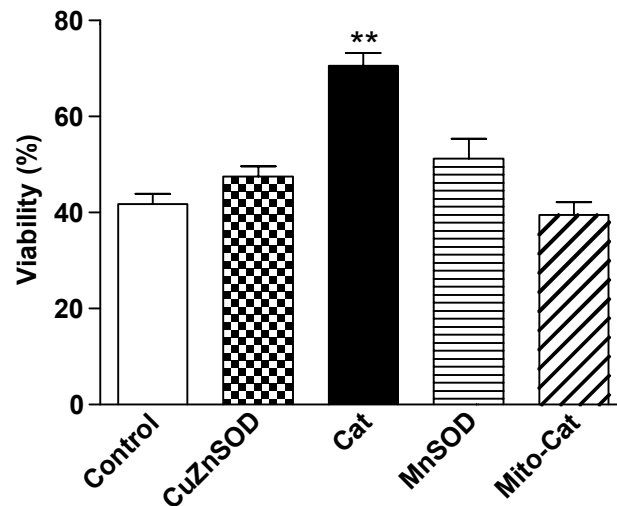


Fig. 3 Palmitic acid toxicity in RINm5F insulin-producing cells that overexpress different antioxidative enzymes

RINm5F cells that stably overexpressed the cytosolic antioxidative enzymes copper zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) and catalase (Cat) or the mitochondrial antioxidative enzymes manganese superoxide dismutase (MnSOD) and catalase with a mitochondrial leader sequence (Mito-Cat) were incubated with palmitic acid (100 μ M) for 24 h; viability was determined by MTT assay. Mock-transfected RINm5F cells served as controls; untreated cells were set as 100% viability. Data are means \pm SEM from five individual experiments. ** $p < 0.01$ as compared to control cells (ANOVA/Dunnett's test for multiple comparisons).

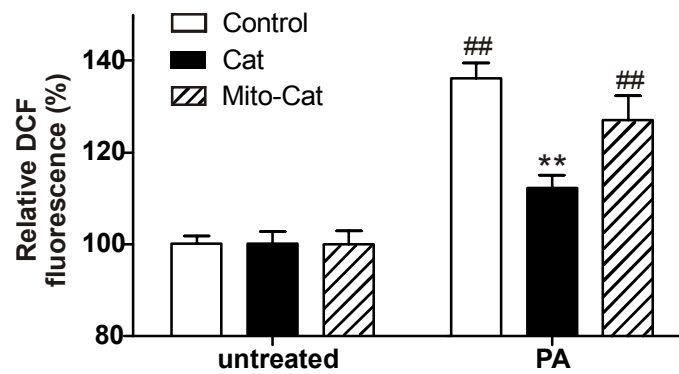


Fig. 4 Palmitic acid-induces production of reactive oxygen species in RINm5F insulin-producing cells that overexpress catalase in the cytosol (Cat) or in the mitochondria (Mito-Cat)

To determine ROS generation, cells were loaded with 10 μM of DCF-DA dye for 30 min and then cultured with 100 μM palmitic acid (PA) for 24 h. DCF fluorescence was measured after 24 h and normalized to that of untreated cells. Data are means \pm SEM from seven individual experiments. $##p < 0.01$ as compared with untreated cells (t-test, unpaired, two-tailed); $**p < 0.01$ as compared with control cells (ANOVA/Dunnett's test for multiple comparisons).

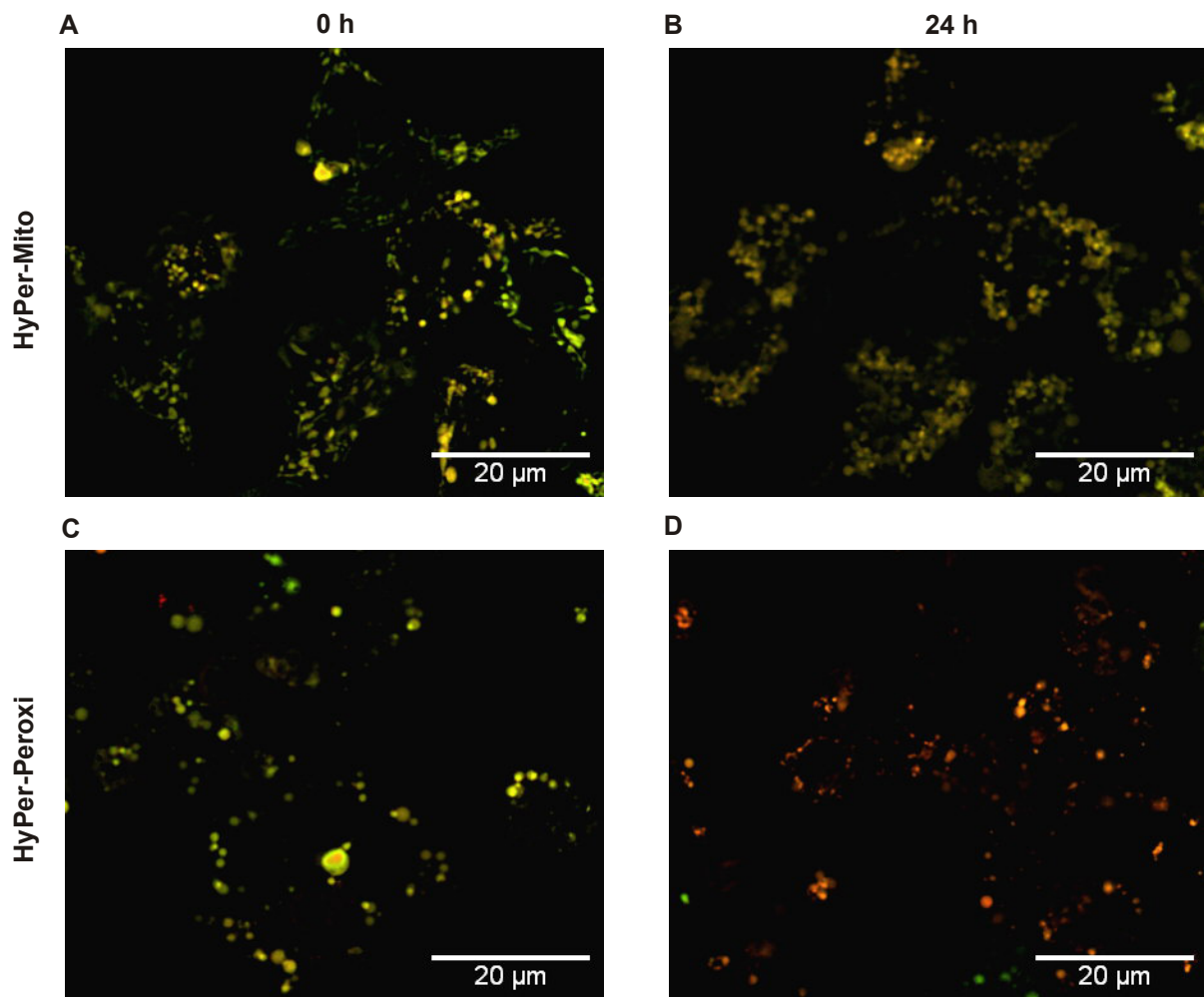


Fig. 5 Live cell fluorescence microscopy for detection of H₂O₂ in RINm5F insulin-producing cells using the H₂O₂ sensor proteins HyPer-Mito and HyPer-Peroxi
Cells that stably expressed the H₂O₂ sensor protein HyPer in the mitochondria (HyPer-Mito A and B) or peroxisomes (HyPer-Peroxi C and D) were incubated with 100 μM palmitic acid for 24 h. Shown are representative images at 0 h (A and C) and 24 h (B and D). Fluorescence at 504/520 nm is depicted in red and fluorescence at 427/520 nm is shown in green. Increased H₂O₂ generation is indicated by a color change from green to yellow to red.

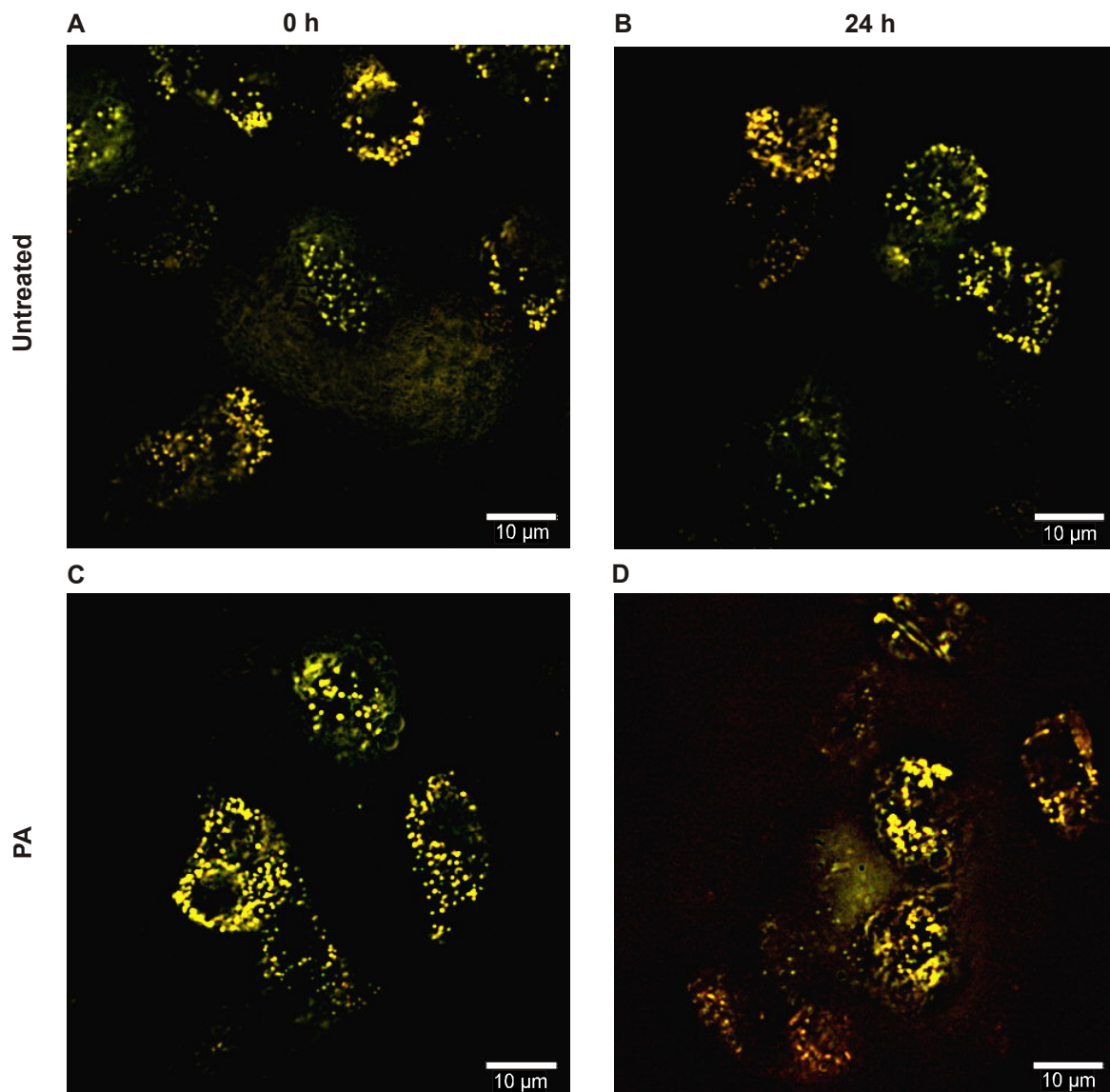


Fig. 6 Live cell fluorescence microscopy for detection of H_2O_2 in primary rat islet cells using the H_2O_2 sensor protein HyPer-Peroxi

Primary rat islet cells were infected with HyPer-Peroxi lentivirus at a MOI of 10. Islet cells which expressed the H_2O_2 sensor protein HyPer in peroxisomes (HyPer-Peroxi) were incubated with 500 μM palmitic acid (PA) for 24 h (C and D). Shown are representative images at 0 h (A and C) and 24 h (B and D). Fluorescence at 504/520 nm is depicted in red and fluorescence at 427/520 nm is shown in green. Increased H_2O_2 generation is indicated by a color change from green to yellow to red.

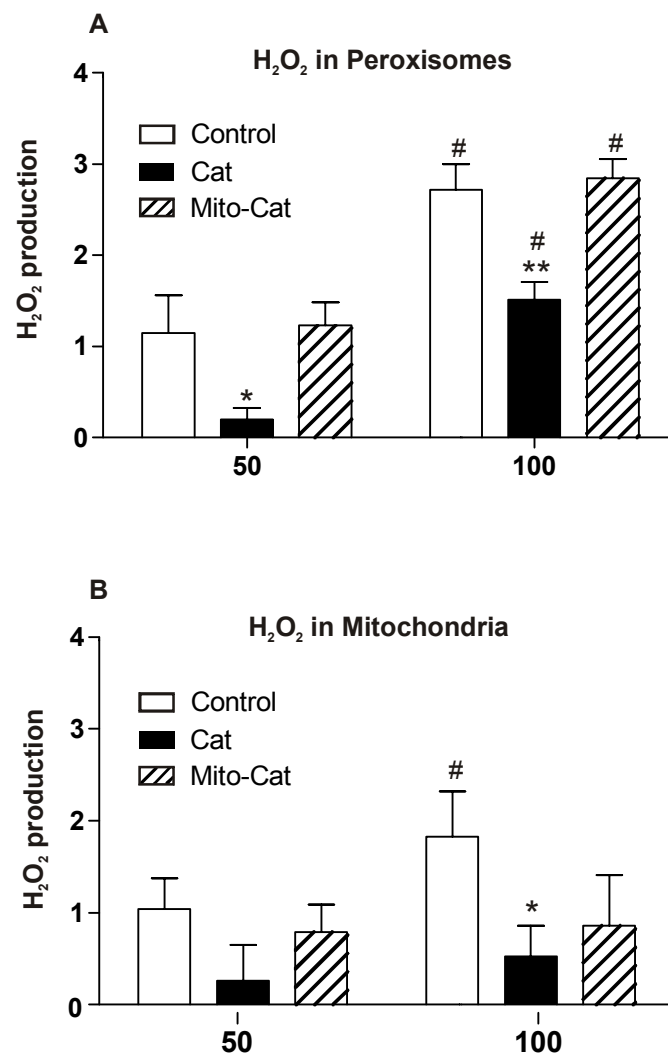


Fig. 7 Localization of H₂O₂ production in RINm5F insulin-producing cells after palmitic acid treatment

Cells that stably expressed the H₂O₂ sensor protein HyPer in peroxisomes (A) or mitochondria (B) and catalase in the cytosol (Cat) or mitochondria (Mito-Cat) were treated with 50 or 100 μM palmitic acid (PA) for 24 h. The fluorescence ratio, which is an indicator of H₂O₂ production, was measured spectrofluorometrically. Shown are the changes in the fluorescence ratios after 24 h normalized to the fluorescence ratios of untreated cells. Data are means ± SEM from 10 individual experiments. #p < 0.05, ##p < 0.01 vs. untreated cells (0 μM PA), *p < 0.05, **p < 0.01 vs. control cells (ANOVA/Dunnett's test for multiple comparisons).

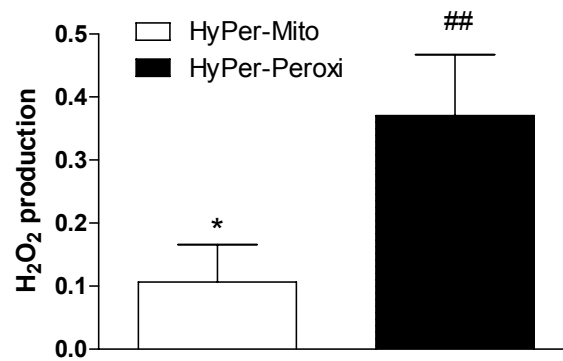


Fig. 8 Localization of H₂O₂ production in INS-1E insulin-producing cells after palmitic acid treatment

Cells that stably expressed the H₂O₂ sensor protein HyPer in the peroxisomes or the mitochondria were treated with 500 μ M palmitic acid for 24 h. The fluorescence ratio, which is an indicator of H₂O₂ production, was measured spectrofluorometrically. Shown are the changes in the fluorescence ratios after 24 h normalized to the fluorescence ratios of untreated cells. Data are means \pm SEM from 14 individual experiments. * $p < 0.05$ vs. HyPer-Peroxi; ## < 0.01 vs. untreated cells (t-test, unpaired, two-tailed).

SUPPLEMENTAL DATA**Table S1 Antibodies for immunocytochemical staining**

Primary Antibody	Working Dilution	Source	Secondary Antibody	Working Dilution	Source
PMP-70, rabbit	1:1000	Molecular Probes, Karlsruhe, Germany	Anti-rabbit-FITC	1:500	Dianova, Hamburg, Germany
PMP-70, rabbit	1:1000	Molecular Probes, Karlsruhe, Germany	Anti-rabbit-Cy5	1:500	Dianova, Hamburg, Germany
Catalase, mouse	1:100	Abnova, Heidelberg, Germany	Anti-mouse-Cy5	1:200	Dianova, Hamburg, Germany
Cytochrome-c oxidase IV, mouse	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	Anti-mouse-FITC	1:500	Dianova, Hamburg, Germany
Catalase, rabbit	1:100	Rockland, Gilbertsville, USA	Anti-rabbit-Cy5	1:200	Dianova, Hamburg, Germany
Insulin, guinea pig	1:100	Abcam, Cambridge, UK	Anti-guinea pig-Cy5	1:200	Dianova, Hamburg, Germany

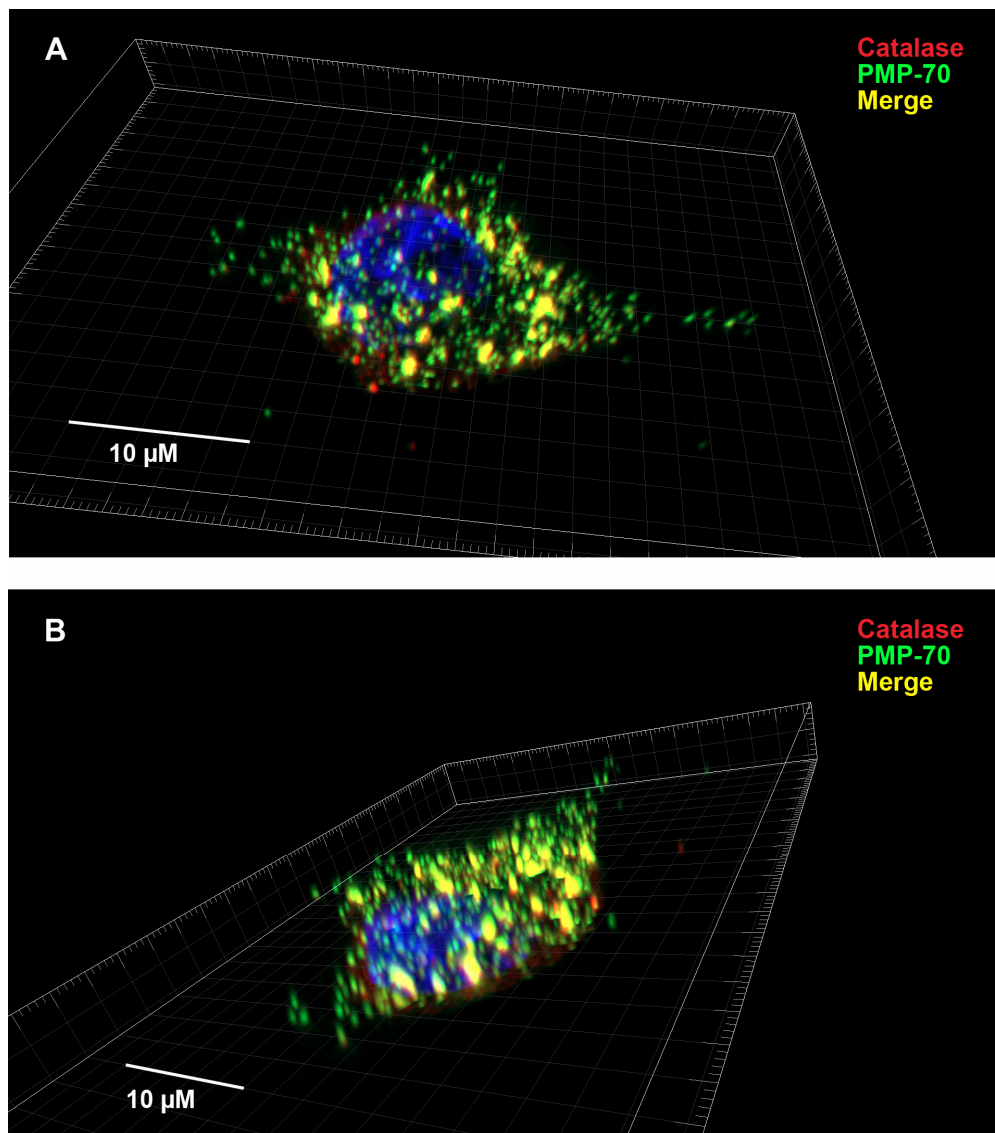


Fig. S1 3D imaging of the immunocytochemical staining for catalase and peroxisomes in catalase overexpressing RINm5F insulin-producing cells

RINm5F insulin-producing cells that overexpressed catalase in the cytosol were seeded overnight on collagen-coated coverslips. After fixation with 4% paraformaldehyde, the cells were stained for catalase (red) and for the peroxisomal membrane protein 70 (PMP-70 green) followed by nuclear counterstaining with DAPI (blue). Images were generated using Imaris software (Bitplane, Zurich, Switzerland) from 20 z-layers (0.2 μm spacing). Shown were two views from different angles (A and B).

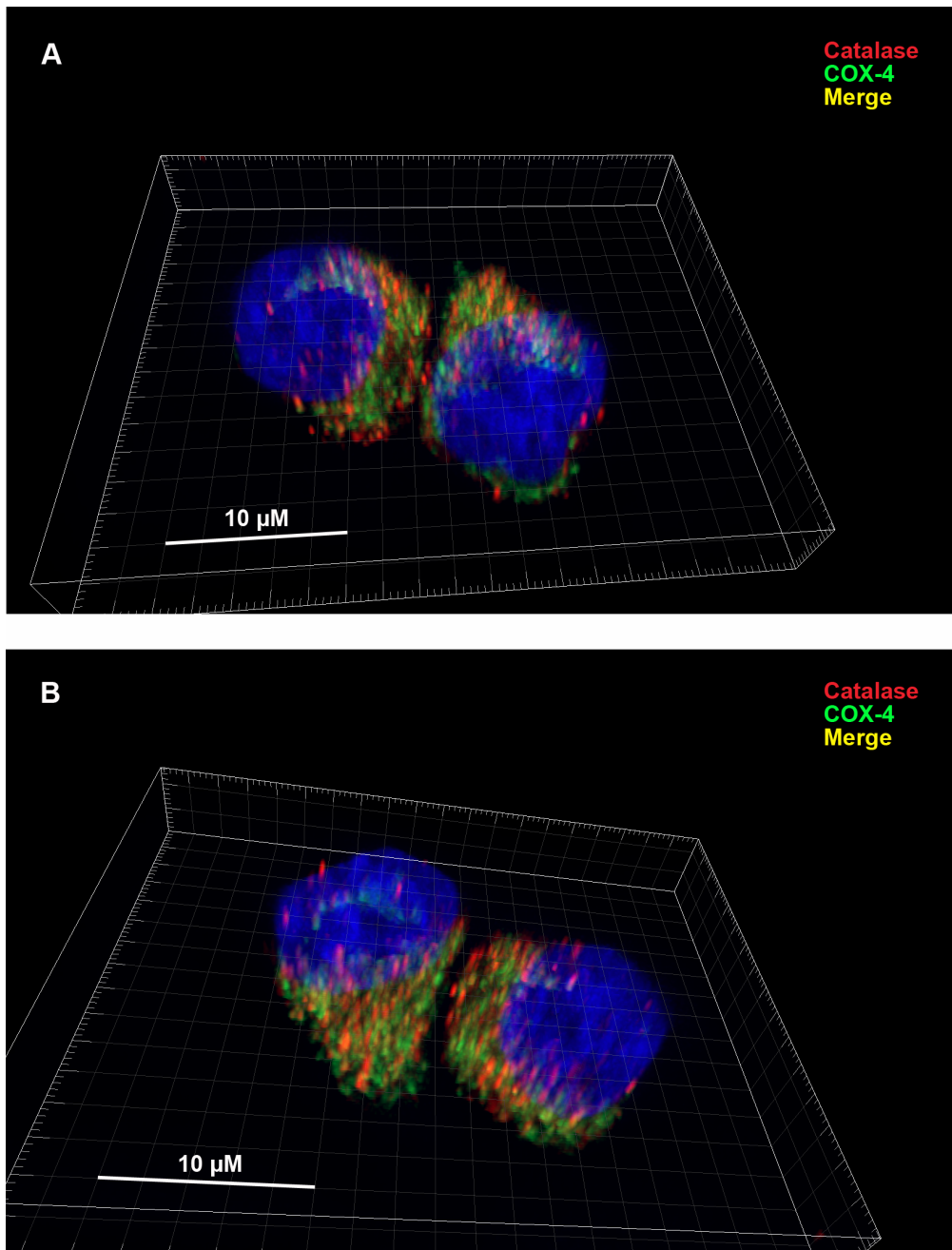


Fig. S2 3D imaging of the immunocytochemical staining for catalase and mitochondria in catalase overexpressing RINm5F insulin-producing cells

RINm5F insulin-producing cells that overexpressed catalase in the cytosol were seeded overnight on collagen-coated coverslips. After fixation with 4% paraformaldehyde, the cells were stained for catalase (red) and for the mitochondrial respiratory chain enzyme cytochrome c-oxidase IV (COX-4 green) followed by nuclear counterstaining with DAPI (blue). Images were generated using Imaris software (Bitplane, Zurich, Switzerland) from 20 z-layers (0.2 μm spacing). Shown were two views from different angles (A and B).

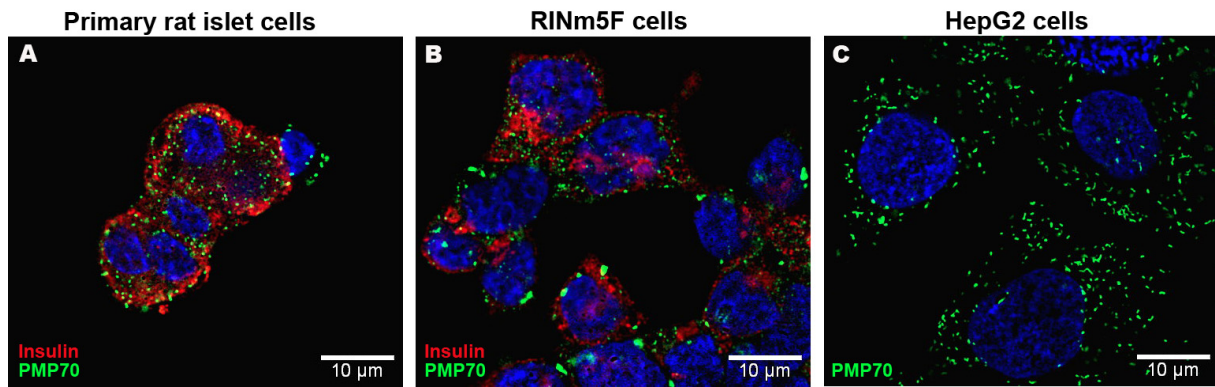


Fig. S3 Immunocytochemical staining for insulin and peroxisomes in primary rat islet cells, RINm5F insulin-producing cells, and HepG2 cells

Primary rat islet cells (A), RINm5F insulin-producing cells (B), and HepG2 cells (C) were seeded overnight on collagen-coated coverslips. After fixation with 4% paraformaldehyde, the cells were stained for insulin (red, only rat islet cells and RINm5F cells) and for the peroxisomal membrane protein 70 (green), followed by nuclear counterstaining with DAPI (blue).

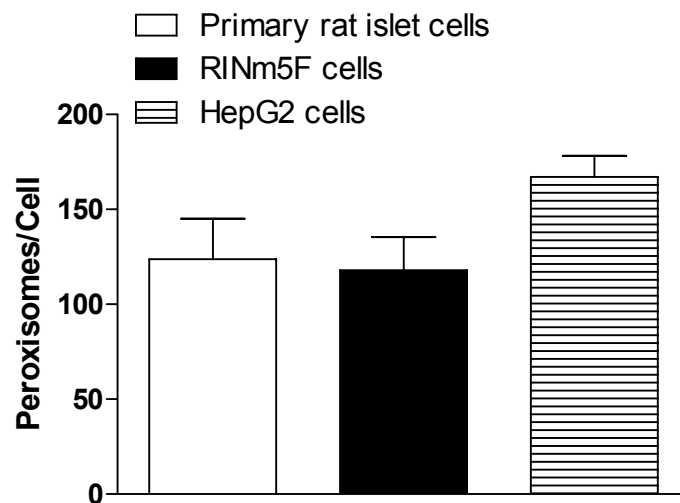


Fig. S4 Peroxisome density in insulin-producing or hepatoma cells

To quantify the number of peroxisomes, they were counted from 5-8 images of PMP-70 immunofluorescence staining and the peroxisome number per cell of primary rat islet cells, RINm5F cells and HepG2 cells was calculated. The peroxisome number was determined by image analysis software Imaris (Bitplane, Zurich, Switzerland).

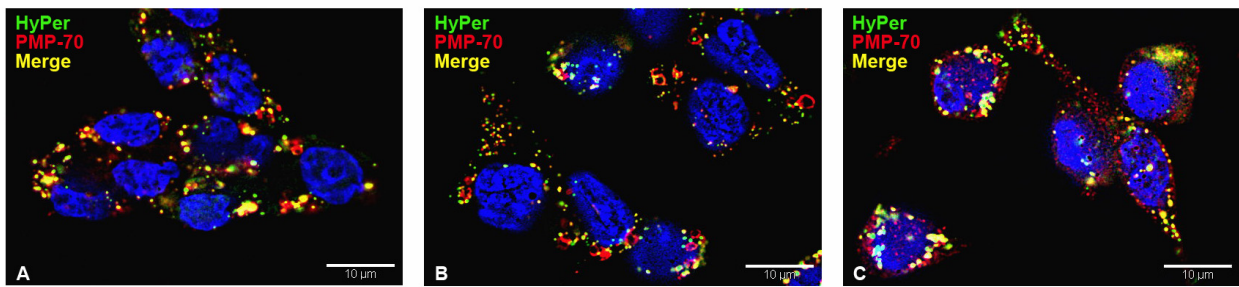


Fig. S5 Immunocytochemical staining for peroxisomes in RINm5F insulin-producing cells overexpressing HyPer-Peroxi

RINm5F insulin-producing cells overexpressing the hydrogen peroxide sensitive protein HyPer in the peroxisomes were seeded overnight on collagen coated coverslips. After fixation with 4% paraformaldehyde the cells were stained for the peroxisomal membrane protein 70 (PMP-70 red) following nuclear counterstaining with DAPI (blue). The HyPer protein in the peroxisomes was detected through excitation at 504 nm and emission at 520 nm (HyPer green). Shown are three representative images (A-C) from two different cell preparations. Scale bar 10 μm .

A specific fluorescence probe for hydrogen peroxide detection in peroxisomes

Running title: Hydrogen peroxide detection in peroxisomes

Wiebke Gehrman, Matthias Elsner

Institute of Clinical Biochemistry, Hannover Medical School, 30623 Hannover, Germany

Key words: *HyPer, beta-oxidation, peroxisome*

Address correspondence and reprint requests to:

Matthias Elsner
Institute of Clinical Biochemistry
Hannover Medical School
30623 Hannover
Germany
Telephone: + 49/511/5323765
Fax: + 49/511/5323584
elsner.matthias@mh-hannover.de

Abstract

Hydrogen peroxide is an important mediator in cell signaling and cell death. Apart from the mitochondrion the peroxisome is the most important cellular site for the generation and scavenging of hydrogen peroxide. Peroxisomes contain various oxidases e.g. for the metabolism of long-chain fatty acids, polyamines, and for the oxidation of urate, which form hydrogen peroxide. Current chemical probes for the detection of hydrogen peroxide lack specificity and the possibility of compartment specific measurement. To overcome these disadvantages Belousov et al. (2006) developed the novel hydrogen peroxide sensitive fluorescent protein HyPer. In the present study the HyPer protein was fused with the PTS1 tag for a specific hydrogen peroxide detection in the peroxisomes. The localization of the HyPer protein in the peroxisomes was confirmed by immunofluorescence and the functionality by fluorescence microscopy and flow cytometry analyses. The presented HyPer-Peroxi fluorescent protein is a valuable tool for studying hydrogen peroxide generation within the peroxisomes.

Introduction

With the rapid growth of interest in free radicals in biology there is a need for identification of specific reactive oxygen species at distinct subcellular locations. Among biologically relevant reactive oxygen species (ROS) hydrogen peroxide has the greatest stability and intracellular concentration. The cellular effects of hydrogen peroxide depend on the concentration, in lower concentrations around 10^{-8} M hydrogen peroxide can induce proliferation, when the concentration rises it causes growth arrest and finally induces apoptosis (10^{-4} M) [1]. Cellular damage is associated with initiation and progression of many diseases, including neurodegenerative disorders, diabetes, atherosclerosis, and cancer [2]. As hydrogen peroxide is generated by many compartmentalised enzymes there is a need for tools, which recognize local variations in the hydrogen peroxide concentration. The chemical probe dichlorodihydrofluorescein (DCFH₂) is the commonest probe used to detect hydrogen peroxide [3], but this fluorescent dye lacks the possibility to discriminate between different reactive oxygen species and their intracellular site of formation.

To overcome these disadvantages Belousov et al. (2006) developed a genetically encoded biosensor for hydrogen peroxide by inserting the circularly permuted yellow fluorescent protein (cpYFP) into the regulatory domain of *E.coli* OxyR, which is specifically sensitive to hydrogen peroxide [4]. This newly designed fluorescent probe called HyPer exhibits two excitation peaks at 420 and 500 nm and one emission peak at 516 nm. Upon exposure to hydrogen peroxide the excitation peak at 420 nm decreased in proportion to the increase in the peak at 500 nm [5].

Besides the mitochondrion the peroxisome is the main intracellular site where hydrogen peroxide is both generated and scavenged. Peroxisomes contain various acyl-CoA oxidases for the metabolism of long-chain fatty acids, polyamine oxidase for the metabolism of *N*-acetyl spermine/spermidine or urate oxidase for the oxidation of urate [6]. In rat liver, for example, peroxisomal oxidase activity accounts for about 20% of total oxygen consumption

[7]. To prevent oxidative damage by free radicals derived from hydrogen peroxide the peroxisome contains catalase, which is a marker enzyme for the peroxisome [8]. To analyze the generation and scavenging of hydrogen peroxide it is important to have a compartment specific probe for hydrogen peroxide detection. In the present study we therefore fused the cDNA coding for HyPer with the PTS1 (peroxisomal targeting sequence 1) to target this protein to the peroxisome and measured hydrogen peroxide in living cells.

Methods

Tissue culture of insulin-producing and hepatoma cells

RINm5F insulin-producing cells were cultured in RPMI 1640 medium, supplemented with 10 mM glucose, 10% (v/v) fetal calf serum (Biowest, Nuaille, France), penicillin, and streptomycin in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂ as described previously [9]. The RINm5F cell clone overexpressing catalase (RINm5F-Cat) was generated as described previously and the expression was analyzed by enzyme activity measurement [10].

MH-7777A hepatoma cells were cultured in DMEM medium, supplemented with 25 mM glucose, 10% (v/v) fetal calf serum, 4 mM L-glutamine, 10 nM insulin (Sigma, St. Louis, MO, USA), 10 μM dexamethasone (Sigma, St. Louis, MO, USA), penicillin, and streptomycin in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂.

Cloning of HyPer vectors

For *in vivo* analyses of cytosolic hydrogen peroxide generation, the cDNA of the hydrogen peroxide-sensitive fluorescent HyPer protein [5] was subcloned from the pHyPer-dCyto (Evrogen, Moscow, Russia) into the lentiviral transfer plasmid pLenti6/V5-MCS (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Therefore HyPer-dCyto cDNA was amplified using Phusion proofreading polymerase (NEB, Frankfurt, Germany) and composite primer (Hyper-Cyto-XbaI-fw (5' TATCTAGACGCCACCATGGAGATGGCAA 3') and Hyper-Cyto-Bsp119I-rv (5' GCTTCGAATTAAACCGCCTGTTTTAAACTT 3')) to introduce restriction site for XbaI and Bsp119I. After digestion the HyPer-dCyto cDNA was ligated to the corresponding restriction site of the pLenti6/V5-MCS plasmid. To construct the expression vector for the HyPer-Peroxi protein that allowed detection of peroxisome-generated hydrogen peroxide, the peroxisome target sequence 1 (PTS1) [11, 12] was fused to the 3' end of the HyPer cDNA by PCR using composite Primer (HyPer-PTS1-XbaI-fw (5' TATCTAGACGCCACCATGGAGATGGCAA 3') and HyPer-PTS1-Bsp119I-rv (5' GCTTCGAATTACAGCTTG-

GAAACCGCCTGTTTTAAAAC 3')) and the pHyper-dCyto plasmid as template. Then, the HyPer-Peroxi cDNA was subcloned into the XbaI/Bsp119I site of the pLenti6/V5-MCS plasmid.

Preparation of lentiviruses

To express the HyPer-Cyto and HyPer-Peroxi protein in the insulin producing RINm5F cell line, lentivirus was prepared according to Zufferey *et al.* [13]. 5×10^6 293FT cells were transfected with the packaging plasmid pPAX2 (37.5 μ g), the envelope plasmid pcDNA-MDG (7.5 μ g), and the transfer plasmids pLenti6/V5-MCS-HyPer-Cyto or pLenti6/V5-MCS-HyPer-Peroxi (25 μ g) by calcium phosphate precipitation. The virus particles were harvested from the culture medium 48 h later and purified by ultracentrifugation (70,000 g, 2 h). The virus titers (3 to 5×10^7 infectious particles) were quantified by a Taqman qPCR assay as described elsewhere [14].

Lentiviral transduction

The RINm5F, RINm5F-Cat, and the MH-7777A cell lines were infected with HyPer-Cyto or HyPer-Peroxi lentivirus with a MOI of 10. The cells were selected for HyPer expression using blasticidin (1 μ mol/L).

Analyses of hydrogen peroxide generation by HyPer proteins

RINm5F cells (2×10^5) that overexpressed HyPer-Cyto or HyPer-Peroxi were seeded onto black 24-well glass-bottom plates (Zellkontakt, Nörten-Hardenberg, Germany) and cultured for 24 h. Cells were treated with hydrogen peroxide (100 μ M) and immediately analyzed via fluorescence microscopy. Live cell imaging was performed using a CFP-YFP dual filter (excitation 427 nm and 504 nm / emission 520 nm) with a cell^R/Olympus IX 81 inverted microscope system (Olympus, Hamburg, Germany). CellR software (Olympus, Hamburg, Germany) was used for imaging and analysis.

The changes of the fluorescence ratio (488/530 nm and 404/520 nm) of RINm5F, RINm5F-Cat, and MH7777A cells overexpressing HyPer-Cyto or HyPer-Peroxi were quantified by flow cytometry (LSRII, BD; San Jose, CA USA). For this purpose, the cells were trypsinised and treated with different concentrations of hydrogen peroxide and the fluorescence ratio was analyzed immediately by flow cytometry. For analysis the *FlowJo* software (Tree Star, Ashland, OR USA) was used.

Immunocytochemical staining

For immunocytochemical staining of RINm5F cells overexpressing HyPer-Peroxi, 1×10^5 cells were seeded overnight on collagen coated glass slides and subsequently fixed with 4% paraformaldehyde. After a washing step the cells were permeabilised and blocked with PBS plus 0.2% Triton X-100 and 1% BSA. The slides were incubated with primary antibodies (anti-peroxisomal membrane protein 70, 1:1000, Invitrogen, Karlsruhe, Germany; anti-cytochrome c oxidase IV 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA USA) diluted in PBS with 0.1% Triton X-100 and 0.1% BSA at room temperature for 60 min. Following this step the cells were washed with PBS and incubated with secondary antibodies for 60 min (1:200). Secondary antibodies from donkey were conjugated with Cy5 obtained from Dianova (Hamburg, Germany). For nuclear counterstaining 300 nM DAPI was used for 5 min at room temperature. Finally, the cells were washed and mounted with Mowiol/DABCO (Sigma, St. Louis, MO, USA) anti-photobleaching mounting media. Stained cells were examined on a cell^R/Olympus IX81 inversed microscope (Olympus, Hamburg, Germany) and microscopical images were post-processed with *AutoDeblur* and *AutoVisualize* (Autoquant Imaging, New York, USA).

Results

Intracellular localization of the HyPer protein in RINm5F cells

To proof the intracellular localization of the HyPer protein targeted to the peroxisomes in RINm5F cells, fixed cells were stained for the peroxisomal membrane protein 70 (PMP-70) or the mitochondrial protein cytochrome oxidase 4 (COX-4). The fluorescence (504/520 nm) of the HyPer protein was clearly detectable as green spots after fixation with paraformaldehyde. Staining of the peroxisomes (PMP-70) showed a distinct co-localization with the HyPer-Peroxi protein (Fig. 1A). By contrast the HyPer-Peroxi protein showed no co-localization with the mitochondria (Fig. 1B).

Fluorescence ratio changes of insulin-producing and hepatoma cells expressing the hydrogen peroxide sensitive protein HyPer either in the cytosol or in the peroxisomes

To analyze if the novel constructed HyPer protein targeted to the peroxisomes (HyPer-Peroxi) is able to detect hydrogen peroxide, the changes of the fluorescence ratio were analyzed via live cell fluorescence microscopy dependent on hydrogen peroxide treatment and compared to the cytosolically located HyPer protein (HyPer-Cyto). Untreated RINm5F-HyPer-Cyto and RINm5F-HyPer-Peroxi cells showed a strong yellow fluorescence resulting from an overlay of the fluorescence at 504/520 nm (red) and the fluorescence at 427/520 nm (green). When the HyPer protein was overexpressed in the cytosol, the fluorescence signal was homogenously distributed over the cell, whereas the fluorescence signal of the HyPer-Peroxi protein appeared dot-like (Fig. 2). After short treatment with hydrogen peroxide (100 μ M) the fluorescence at 427/520 nm decreased and the fluorescence at 504/520 nm increased which results in a strong fluorescence shift towards red. The fluorescence shift was comparable in the cytosol and in the peroxisomes, which indicates that the new HyPer-Peroxi protein was able to detect hydrogen peroxide.

Relative quantification of hydrogen peroxide with the HyPer protein through measurement of the fluorescence ratio via flow cytometry

To analyze if the sensitivity of the HyPer-Peroxi protein is comparable to that of the cytosolically located protein, the cells were treated with different concentrations of hydrogen peroxide and the fluorescence ratio changes were measured immediately by flow cytometry. Both proteins showed a comparable increase of the fluorescence ratio with increasing hydrogen peroxide concentrations (Fig. 3). The fluorescence ratio of the HyPer-Cyto and the HyPer-Peroxi protein increased strongly in a hydrogen peroxide concentration range from 10 – 75 μM . When the cells were treated with 100 μM hydrogen peroxide a plateau was reached independent of the subcellular localization (Fig. 3A). Additional overexpression of catalase, which converts hydrogen peroxide to molecular oxygen and water, in the RINm5F-HyPer-Cyto or the RINm5F-HyPer-Peroxi cells resulted in a weaker increase of the fluorescence ratio both in the cytosol and in the peroxisomes (Fig. 3 A). The suitability of the HyPer-Peroxi protein as a hydrogen peroxide indicator was analyzed also in the hepatoma cell line MH-7777A. Comparable to RINm5F cells the fluorescence ratio of the HyPer-Peroxi protein in MH-7777A cells correlated with hydrogen peroxide concentrations similar to the HyPer-Cyto protein (Fig. 3 B). But in the MH-7777A cells the fluorescence ratio increase was weaker than in RINm5F cells because of the higher endogenous level of catalase expression.

Discussion

Hydrogen peroxide plays important roles in many biological processes in many organisms, from relatively simple bacteria to complex multicellular plants and animals [2, 15]. Clearly a major obstacle in studying the roles of hydrogen peroxide in biology has been the lack of widely available specific tools and methodologies. Fluorescence chemical dyes like DCF allow sensitive measurement of hydrogen peroxide formation in cells, but often lack specificity [3, 16]. Recently, Belousov and colleagues developed the hydrogen peroxide specific fluorescent sensor protein HyPer [5]. This specific probe is a fusion protein of OxyR, a reversible oxidizable *E. coli* protein [4], and cpYFP that transfers the conformational changes of the OxyR after oxidation by hydrogen peroxide into a fluorescence shift. The ratiometric measurement of the fluorescence signals enables the readout independent of the amount of protein expressed. The HyPer protein demonstrates submicromolar affinity to hydrogen peroxide and at the same time it is insensitive to other oxidants [5]. Another disadvantage of common chemical dyes is the lack of intracellular compartment specific ROS detection. However, HyPer gives as a protein the opportunity of specific targeting and expression in distinct compartments.

In the present study the HyPer protein was fused to the PTS1 tag (HyPer-Peroxi) for specific peroxisomal expression confirmed by immunostaining.

The functionality of the HyPer-Peroxi protein was analyzed by fluorescence microscopy and flow cytometry after hydrogen peroxide treatment. The sensitivity of HyPer-Peroxi was comparable to that of the cytosolically located HyPer protein indicating that hydrogen peroxide could be detected in the same concentration range in the peroxisomes as in the cytosol. Overexpression of catalase in the RINm5F-HyPer-Peroxi cells reduced the hydrogen peroxide dependent changes of the fluorescence ratio, which indicates that the HyPer-Peroxi protein specifically detects hydrogen peroxide.

Peroxisomes are involved in a variety of important cellular functions, e.g. detoxification or metabolism, in eukaryotic cells [17]. The oxidases, which participate in these processes, transfer hydrogen from their respective substrates to molecular oxygen yielding hydrogen peroxide [18]. An organelle specific quantitative measurement of hydrogen peroxide could be of importance for the analysis of the oxidase-activities and their involved pathways. For example, the breakdown of fatty acids does not only take place in the mitochondria, another important organelle for the metabolism of fatty acids are also the peroxisomes [17]. During the beta-oxidation in the peroxisomes potentially cytotoxic hydrogen peroxide is generated by the acyl-CoA oxidases whereas during mitochondrial beta-oxidation the hydrogen is transferred by the acyl-CoA dehydrogenases to NAD^+ or FAD. Therefore the measurement of peroxisomally generated hydrogen peroxide is of interest for studying the mechanisms of ROS mediated lipotoxicity [19, 20]

Oxidative stress in general plays an important role in many diseases like cancer, diabetes, atherosclerosis, and neurodegenerative diseases [21]. Although the peroxisome is a major organelle for oxidative metabolism it is typically not in the scientific focus. With the HyPer-Peroxi fluorescent protein presented herein we offer a valuable tool for studying hydrogen peroxide generation within the peroxisomes in cellular disease model systems.

Acknowledgements

The skillful technical assistance of Maren Böger and Martin Wirth is gratefully acknowledged.

Declaration of interest

This work was supported by the European Union (Integrated Project EuroDia LSHM-CT-2006-518153 in the Framework Program 6 [FP6] of the European Community) and by the Christian-Hagedorn-Grant of the German Diabetes Association. The authors report no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- [1] Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:722-728.
- [2] Veal EA, Day AM, Morgan BA. (2007). Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* 26:1-14.
- [3] Wardman P. (2007). Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med* 43:995-1022.
- [4] Aslund F, Zheng M, Beckwith J, Storz G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6161-6165.
- [5] Belousov VV, Fradkov AF, Lukyanov KA, Staroverov DB, Shakhbazov KS, Terskikh AV, Lukyanov S. (2006). Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* 3:281-286.
- [6] Schrader M, Fahimi HD. (2004). Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* 122:383-393.
- [7] Reddy JK, Mannaerts GP. (1994). Peroxisomal lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 14:343-370.
- [8] Dansen TB, Wirtz KW. (2001). The peroxisome in oxidative stress. *IUBMB Life* 51:223-230.
- [9] Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. (1997). Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46:1733-1742.
- [10] Gurgul E, Lortz S, Tiedge M, Jorns A, Lenzen S. (2004). Mitochondrial catalase overexpression protects insulin-producing cells against toxicity of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines. *Diabetes* 53:2271-2280.
- [11] de Hoop MJ, Ab G. (1992). Import of proteins into peroxisomes and other microbodies. *Biochem J* 286 (Pt 3):657-669.
- [12] Subramani S. (1993). Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu Rev Cell Biol* 9:445-478.
- [13] Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72:9873-9880.
- [14] Sastry L, Johnson T, Hobson MJ, Smucker B, Cornetta K. (2002). Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods. *Gene Ther* 9:1155-1162.
- [15] Scandalios JG. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38:995-1014.
- [16] Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. (2004). Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R431-444.
- [17] Wanders RJ, Waterham HR. (2006). Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* 75:295-332.
- [18] Angermuller S, Islinger M, Volkl A. (2009). Peroxisomes and reactive oxygen species, a lasting challenge. *Histochem Cell Biol* 131:459-463.
- [19] Carlsson C, Borg LA, Welsh N. (1999). Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology* 140:3422-3428.
- [20] Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 52:1-8.
- [21] Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.

Figures

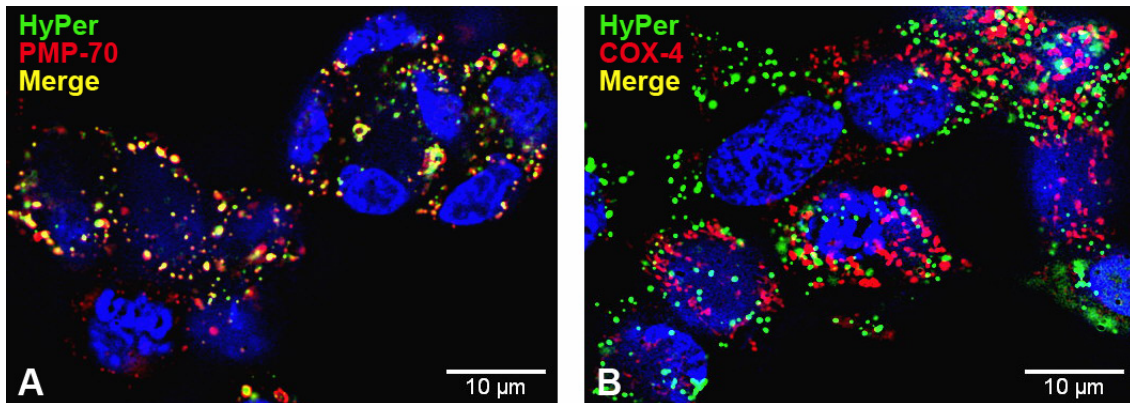


Figure 1. Immunocytochemical staining for peroxisomes and mitochondria in HyPer-Peroxi overexpressing RINm5F cells

RINm5F insulin-producing cells overexpressing the hydrogen peroxide sensitive protein HyPer in the peroxisomes were seeded overnight on collagen coated coverslips. After fixation with 4% paraformaldehyde the cells were stained for the peroxisomal membrane protein 70 (PMP-70 red, A) or the mitochondrial respiratory chain enzyme cytochrome c-oxidase IV (COX-4 red, B) following counterstaining with DAPI (blue). The HyPer protein was detected through excitation at 504 nm and emission at 520 nm (HyPer green).

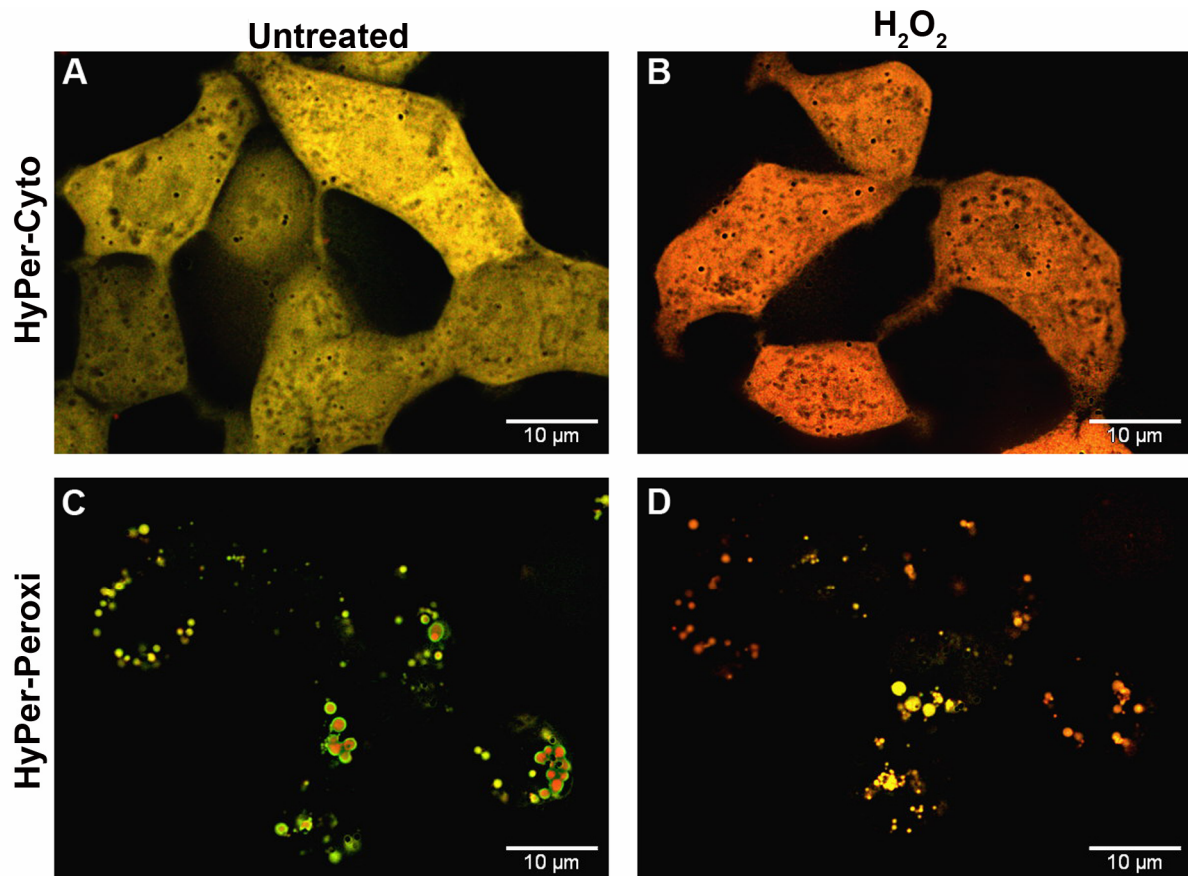


Figure 2. Hydrogen peroxide detection via live cell fluorescence microscopy of RINm5F insulin-producing cells overexpressing HyPer-Cyto or HyPer-Peroxi.

Cells that stably expressed the hydrogen peroxide sensor protein HyPer in the cytosol (HyPer-Cyto) or peroxisomes (HyPer-Peroxi) were treated with 100 μM hydrogen peroxide and images were taken immediately. Shown are representative images of untreated cells (left column) and after exposure to hydrogen peroxide (right column). In the images, the fluorescence at 504/520 nm is depicted in red and the fluorescence at 427/520 nm in green. Increased hydrogen peroxide concentration goes along with a color change from green via yellow towards red.

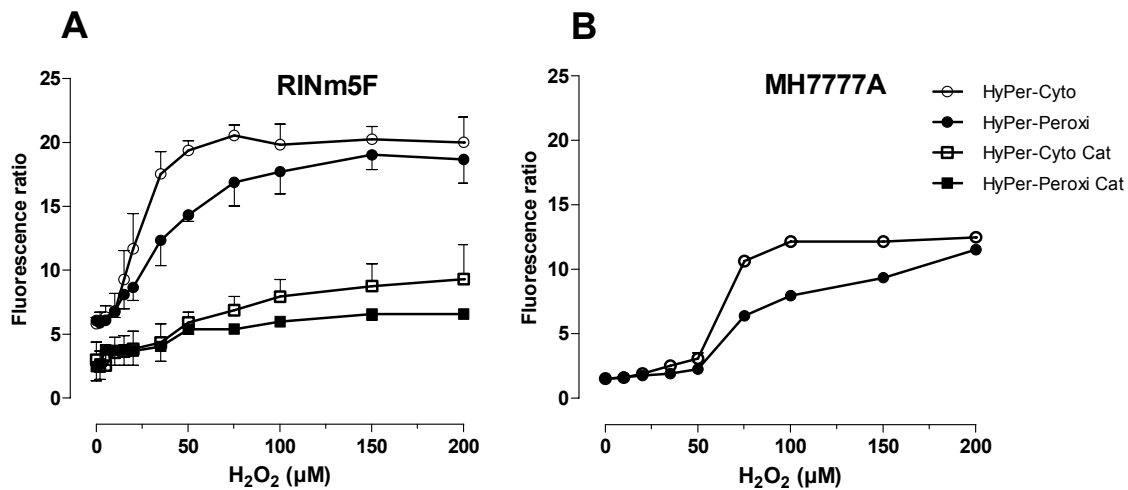


Figure 3. Hydrogen peroxide detection via flow cytometry in HyPer-Cyto and HyPer-Peroxi overexpressing RINm5F, RINm5F-Cat, and MH-7777A cells

RINm5F insulin-producing cells (A, circles), RINm5F cells overexpressing catalase (Cat, A, squares) and MH-7777A cells (B, circles) overexpressing the hydrogen peroxide sensor protein HyPer either in the cytosol (HyPer-Cyto, open) or peroxisomes (HyPer-Peroxi, filled) were treated with different concentrations of hydrogen peroxide immediately before measurement. The fluorescence ratio (488/530 nm / 404/520 nm), which is an indicator for the hydrogen peroxide concentration, was measured by flow cytometry. Shown is the fluorescence ratio change dependent on the hydrogen peroxide concentration. Data are means \pm SEM from two or three individual experiments.

**The antagonism between saturated and unsaturated fatty acids in
ROS mediated lipotoxicity in insulin-producing cells**

Running title: Oleic acid prevents lipotoxicity

Wiebke Gehrman, Wiebke Würdemann, Anne Jörns,

Matthias Elsner, Sigurd Lenzen

Institute of Clinical Biochemistry, Hannover Medical School, 30623 Hannover, Germany.

Address correspondence and reprint requests to:

Prof. Sigurd Lenzen
Institute of Clinical Biochemistry
Hannover Medical School
30623 Hannover
Germany
Telephone: + 49/511/5326525
Fax: + 49/511/5323584
lenzen.sigurd@mh-hannover.de

ABSTRACT

Aims/hypothesis: Elevated levels of non-esterified fatty acids are under suspicion to mediate beta-cell dysfunction and beta-cell loss in type 2 diabetes, a phenomenon known as lipotoxicity. Whereas saturated fatty acids show a strong cytotoxic effect upon insulin-producing cells, unsaturated fatty acids are not toxic and can even protect. Experimental evidence suggests that oxidative stress mediates lipotoxicity. However, the role of unsaturated NEFAs in this mechanism is unclear. Therefore we analysed the NEFA induced ROS formation, with particular regard to the intracellular site.

Methods: The viability of RINm5F insulin-producing cells after NEFA incubation was determined by MTT assay and the morphological changes were observed by electron microscopy. For a compartment specific analysis of NEFA effects the induction of different initiator caspases and of selected ER stress marker genes was determined. The H₂O₂ specific fluorescence probe HyPer allows the detection of NEFA induced H₂O₂ formation in the peroxisomes.

Results: The protective effect of unsaturated NEFAs was chain-length dependent but independent of the number of double bonds. Only oleic acid incubation led to lipid droplet formation, but induced neither an ER stress response nor H₂O₂ generation. Even more, oleic acid prevents palmitic acid H₂O₂ production in the peroxisomes.

Conclusions/interpretation: ER stress and mitochondrial ROS formation seems not to be the origin of lipotoxicity and the protective effect of unsaturated NEFAs. Oleic acid could presumably pave the way for the storage of palmitic acid in lipid droplets, so that it is not available for peroxisomal β -oxidation which would lead to H₂O₂ formation.

Abbreviations

DCF-DA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; EC₅₀, half maximally effective concentration; H₂O₂, hydrogen peroxide; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; NEFA, non-esterified fatty acids; ROS, reactive oxygen species;

INTRODUCTION

The prevalence of type 2 diabetes mellitus increases in parallel to the increasing rate of obesity (1), which is one of the major risk factors for diabetes development and usually accompanied by hyperlipidaemia (2-4). Hyperlipidaemia, in turn, is typically associated with elevated non-esterified fatty acid (NEFA) plasma concentrations, which are supposed to contribute to insulin resistance, impaired insulin secretion due to progressive decline in pancreatic β -cell function and mass, a phenomenon called lipotoxicity (5-7). In vitro studies have shown that long-chain saturated NEFAs can induce apoptosis (Elsner *et al.* in prep.) (8). This has been considered, at least in part, to be mediated by the induction of the unfolded protein response (UPR) (9). However, recent observations indicate that the induction of this ER-stress response may not be exclusively responsible for lipotoxicity (10). Further studies suggest that the generation of ROS during the metabolism of NEFAs can mediate their deleterious action. This concept comprises ROS formation at complex I and III in the electron transport chain as a result of an overloaded mitochondrial fatty acid metabolism (11-13). In a recent study we proposed a new concept in which the β -oxidation of saturated long-chain fatty acids in the peroxisome has been suggested to be responsible for ROS formation and cell death in pancreatic β -cells (Elsner *et al.* in prep.). Interestingly, unsaturated long-chain fatty acids are not toxic. (8; 14). Moreover, unsaturated fatty acids potently antagonized the toxic action of saturated NEFAs (15; 16). Therefore, we analysed in the present study the mechanism of this protective action with special emphasis upon the role of peroxisomal ROS formation.

MATERIAL AND METHODS

Tissue culture of insulin-producing cells

RINm5F insulin-producing cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10 mM glucose, 10% (v/v) fetal calf serum (Biowest, Nuaille, France), penicillin, and streptomycin in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂, as described previously (17). RINm5F cell clones that overexpressed catalase either in the mitochondria or the cytosol and the peroxisomes were generated as described previously (18; 19). Cellular expression of catalase was analysed by enzyme activity measurement.

NEFAs (Sigma, St. Louis, MO, USA) were dissolved in 90% ethanol by heating to 60°C and used at different concentrations in RPMI 1640 (PAN, Aidenbach, Germany) with 1% fetal calf serum and a final NEFA : BSA (MP Biomedicals, Eschwege, Germany) ratio of 1 mM : 2% (20). All untreated wells received the same amount of solvent and BSA. This procedure did not cause a significant decrease in viability in the absence of added fatty acids.

Assessment of cell viability

RINm5F insulin-producing cells were seeded at 2.5×10^4 cells/well in 100 µl culture medium in 96-well plates and allowed to attach for 24 h before they were incubated at 37°C with NEFAs for 24 h. Cell viability was then determined by microplate-based MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Serva, Heidelberg, Germany) (21).

Caspase assay

RINm5F insulin-producing cells were seeded at 1×10^6 cells on 6 cm tissue culture dishes and treated after 24 h with NEFAs. The cells were trypsinized after 24 h exposure to different NEFAs and stained for active caspases with the FITC-conjugated monoclonal active caspase-3 antibody apoptosis kit I (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), the red caspase-8 staining kit, the green caspase-9 staining kit or the green caspase-12 staining kit (PromoKine, Heidelberg, Germany) according to the manufacturers protocol. The cells were

analyzed by flow cytometry at the FL-1 channel (488/527 nm) for active caspase-3, -9, and -12 or at the FL-2 channel (488/575 nm) for active caspase-8. The portion of caspase-negative cells within the untreated cell population was gated and, on the basis of this gate, the portion of cells in which the caspases were activated after NEFA treatment could be determined.

Electron microscopy

Small RINm5F cell pellets treated for 24 h with the different fatty acids were fixed in 2 % para-formaldehyde and 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.3, postfixed in 1 % OsO₄ and finally embedded in Epon (Agar Scientific, Cambridge, UK) for electron microscopic analysis to identify changes in the different cell organelles (22). Thin sections were contrast-stained with saturated solutions of lead citrate and uranyl acetate.

Measurement of ROS by DCF-DA fluorescence

To detect overall oxidative stress, 2.5×10^4 cells were seeded in 96-well black plates and cultured for 24 h. The cells were then pre-incubated with 10 μ M DCF-DA (2, 7-dichlorofluorescein diacetate, Sigma, St. Louis, MO, USA) for 30 min at 37°C. Thereafter, medium containing DCF-DA was replaced with fresh medium with or without NEFAs. After 24 h incubation, the plates were analyzed at 480/520 nm excitation/emission using the fluorescence reader Victor² 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, Wiesbaden, Germany) (23). Thereafter cell viability was determined by MTT assay and DCF fluorescence was normalized to the viability.

Cloning of the HyPer-Peroxi vector

To construct the expression vector for the HyPer-Peroxi protein that allowed detection of peroxisome-generated H₂O₂, the peroxisome target signal 1 (PTS-1) (24; 25) was fused to the 3'-end of the HyPer cDNA by PCR using composite primer (HyPer-PTS1-XbaI-fw (5'-TATCTAGACGCCACCATGGAGATGGCAA-3') and HyPer-PTS1-Bsp119I-rv (5'-GCTTCG-AATTACAGCTTGAAACCGCCTGTTTTAAAAC-3')) and the pHyper-dCyto plasmid as

template. Thereafter, the HyPer-Peroxi cDNA was subcloned into the XbaI/Bsp119I site of the pLenti6/V5-MCS plasmid.

Preparation of lentiviruses

To express the HyPer-Peroxi protein in the insulin-producing RINm5F cell line, lentivirus was prepared (26). 5×10^6 293FT cells were transfected with the packaging plasmid pPAX2 (37.5 μ g), the envelope plasmid pcDNA3-MDG (7.5 μ g), and the transfer plasmid pLenti6/V5-MCS-HyPer-Peroxi (25 μ g) by calcium phosphate precipitation. The virus particles were harvested from the culture medium 48 h later and purified by ultracentrifugation (70,000 g, 2 h). The virus titers ($3\text{-}5 \times 10^7$ infectious particles) were quantified by Taqman qPCR assay as described elsewhere (27).

Lentiviral transduction

The RINm5F-control, RINm5F-Cat, and RINm5F-MitoCat (18) cell lines were infected with HyPer-Peroxi lentivirus at a MOI of 10. The cells were selected for HyPer expression using blasticidin (1 μ mol/L).

Analysis of H₂O₂ generation using HyPer proteins

RINm5F cells (1×10^5) that overexpressed HyPer-Peroxi were seeded onto black 24-well glass-bottom plates (Zellkontakt, Nörten-Hardenberg, Germany). Cells were cultured for 24 h and then exposed to 100 μ M palmitic acid, 100 μ M oleic acid or a mixture of palmitic and oleic acid (100 μ M each) for another 24 h. Live cell imaging was performed using a CFP-YFP dual filter (excitation, 427 nm and 504 nm; emission, 520 nm) with a cell^R/Olympus IX 81 inverted microscope system (Olympus, Hamburg, Germany). CellR software (Olympus, Hamburg, Germany) was used for imaging and analysis.

To determine H₂O₂ production, changes in the fluorescence ratios of RINm5F, RINm5F-Cat and RINm5F-MitoCat cells that overexpressed HyPer-Peroxi were quantified spectrofluorometrically. Those cells were seeded at 2.5×10^4 cells per well onto black 96-well

plates and cultured for 24 h. The fluorescence ratio (excitation 427 nm and 475 nm, emission 520 nm) was measured immediately before and after 24 h treatment with NEFAs.

Statistical Analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were performed using ANOVA plus Dunnett's test for multiple comparisons, unless stated otherwise (Graphpad, San Diego, CA, USA).

RESULTS

Protective effect of unsaturated NEFAs against the toxicity of palmitic acid in insulin-producing cells

Palmitic acid, the physiologically most abundant saturated NEFA, had a strong cytotoxic effect on RINm5F insulin-producing cells, whereas unsaturated fatty acids were not toxic (Fig. 1). Moreover, unsaturated NEFAs showed a protective effect against the toxicity of long-chain saturated NEFAs. The toxicity of saturated NEFAs is known to be chain-length dependent (Elsner *et al.* in prep.). The mechanism of protection is still unknown. Therefore we analysed the structural requirements for the protective effect of unsaturated NEFAs. Unsaturated NEFAs that differ in the number of double bonds, oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), and γ -linolenic acid (C18:3), exhibited only a minimal toxic effect upon insulin-producing cells in comparison to palmitic acid (Fig. 1 A). Nevertheless, all unsaturated C18 NEFAs showed a comparable, significant protection against the toxicity of palmitic acid (C16:0) irrespective of the number of double bonds. In contrast to these non-existing correlations with the number of double bonds on their protective effect there was a clear correlation between chain length and the protective potency of unsaturated NEFAs against palmitic acid induced toxicity (Fig. 1B). Palmitoleic (C16:1) and oleic (C18:1) acid showed a strong protective effect against the toxicity of palmitic acid (200 μ M) with comparable EC_{50} values, of 21 ± 2 μ M for palmitoleic acid and 22 ± 2 μ M for oleic acid. In contrast, the shorter monounsaturated NEFA myristoleic acid (C14:1) had a significantly lower protective effect. Even at a concentration of 200 μ M myristoleic acid, viability raised only to $47 \pm 3\%$. With further shortening of the chain length the protective effect was even more reduced. Hence, the viability reached only $18 \pm 2\%$ after addition of 200 μ M dodecenoic acid (C12:1). In summary, the protective effect against palmitic acid induced toxicity decreased with shortening of the chain length, with oleic and palmitoleic acid providing the greatest protection (Fig. 1B).

To gain insight into the mechanism of lipotoxicity and the protective effect of unsaturated NEFAs in insulin-producing cells pristanic acid, a branched chain saturated NEFA, which is exclusively metabolized by peroxisomal β -oxidation, was used. Pristanic acid, like palmitic acid, also showed a distinct toxic effect on insulin-producing cells ($47 \pm 2\%$ viability at $200 \mu\text{M}$ pristanic acid). Oleic acid protected against pristanic acid induced toxicity in almost the same concentration-dependent manner as against palmitic acid induced toxicity. These results indicate that the toxicity of saturated fatty acids depends upon the metabolism in peroxisomes (Fig. 1C).

The comparison of the toxic effect of palmitic acid with that of the respective non-metabolizable methyl derivative revealed that its metabolism is essential for the toxic action. The viability of RINm5F cells after treatment with $250 \mu\text{M}$ palmitic acid decreased significantly to $12 \pm 1\%$, whereas the viability after incubation with $250 \mu\text{M}$ methyl-palmitic acid was not significantly reduced in comparison to untreated cells (data not shown).

Palmitic acid induced activation of caspase-3

A flow cytometry based caspase-3 assay was performed to determine the cell death mode of lipotoxicity. Caspase-3 was significantly activated in RINm5F insulin-producing cells after 24 h treatment with palmitic acid ($100 \mu\text{M}$) (Fig. 2). By contrast, oleic acid ($100 \mu\text{M}$) did not activate caspase-3. Moreover, oleic acid entirely prevented palmitic acid induced caspase-3 activation.

Ultrastructural alterations of insulin-producing cells treated with palmitic and oleic acid

To obtain information upon the morphological changes induced by NEFAs, an electron microscopy analysis was performed. After a 24 h incubation with palmitic acid ($100 \mu\text{M}$) damage to the rough endoplasmic reticulum (ER) was clearly detectable, while at the same time the mitochondria remained intact (Fig. 3). The cisternae of the ER were elongated and

dilated containing dark deposits. When the cells were incubated with oleic acid (100 μ M), lipid droplets accumulated in the cytoplasm, whereas the ER remained unaffected. Minor accumulation of lipid droplets and damage to the ER were observed when the cells were treated with a mixture of palmitic and oleic acid. There were no mitochondrial alterations detectable under any of the different incubations.

mRNA expression of the ER stress marker genes

To characterize the underlying mechanism of NEFA induced cell death the gene expression of the ER-stress marker genes X-box binding protein 1 (XBP1), the spliced form of the X-box binding protein 1 (XBP1s), CHOP (C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein)-homologous), and the ER chaperone Bip was analysed. Palmitic acid (100 μ M) was able to induce the expression of the ER stress marker genes CHOP and Bip and also splicing of XBP-1 was markedly induced after 12 h palmitic acid incubation, whereas expression of XBP-1 was not affected (Fig. 4). Oleic acid (100 μ M) had no effect on the gene expression of any of the analysed ER stress marker genes. Moreover, it completely prevented the palmitic acid mediated gene induction.

Palmitic acid induced activation of different initiator caspases

To gain a closer insight into the role of different cellular compartments on the NEFA induced apoptosis the activation of death-receptor specific caspase-8, mitochondria specific caspase-9 and ER specific caspase-12 was analysed. Gene expression of ER stress marker genes was elevated after 12 h incubation with palmitic acid, but did not result in an immediate activation of caspase-12. However, the caspases were significantly induced after 18 h with a further increase at 24 h (Fig. 5). Remarkably, the induction of all analysed caspases was not different at any time point, indicating that all caspases could be activated by the same upstream effector.

Oleic acid prevents palmitic acid induced ROS production

ROS generation observed with the DCF assay was increased approximately 7-fold when RINm5F control cells were treated with palmitic acid (100 μ M) in comparison to untreated cells, while palmitic acid incubation of RINm5F cells overexpressing catalase in the cytosol resulted in a merely 2-fold increase in DCF fluorescence (Fig. 6). When catalase was overexpressed in the mitochondria, the ROS production was 4-fold elevated. The decrease of DCF fluorescence by catalase overexpression indicates that H_2O_2 is the main reactive oxygen species formed during incubation with palmitic acid. By contrast ROS generation was only slightly increased after exposure to oleic acid (100 μ M). Moreover, oleic acid was able to prevent palmitic acid induced ROS generation.

Peroxisomal H_2O_2 generation in insulin-producing cells after NEFA exposure

Reduction of DCF by overexpression of catalase suggests that H_2O_2 is generated due to palmitic acid treatment. To get direct evidence for the H_2O_2 formation in a defined subcellular localisation we used RINm5F cells overexpressing the H_2O_2 sensor protein HyPer. The HyPer-Peroxi protein containing the signal peptide sequence for peroxisomal import allows ratiometric measurement of H_2O_2 by fluorescence microscopy in this organelle. In the false coloured images, green staining corresponds to low, yellow to medium, and red to high H_2O_2 concentrations. After 24 h of exposure to palmitic acid (100 μ M), RINm5F-HyPer-Peroxi cells showed a strong shift towards red fluorescence in comparison to untreated cells (Fig. 7A and Fig. 7B), whereas the cells exposed to oleic acid (100 μ M) showed a similar fluorescence signal to that of untreated cells (Fig. 7C). Moreover, oleic acid prevented the strong fluorescence shift towards red observed after palmitic acid treatment (Fig. 7D).

The H_2O_2 generation in the peroxisomes following exposure to NEFAs was quantified spectrofluorometrically. The H_2O_2 concentration after oleic acid treatment was significantly lower than after palmitic acid treatment (Fig. 8). Moreover, as observed with the DCF assay, oleic acid prevented palmitic acid induced H_2O_2 generation. Further evidence that the

peroxisomes were the subcellular site of H₂O₂ formation arises from the fact that only catalase in the cytosol and peroxisomes significantly reduced H₂O₂ formation, whereas overexpression of catalase in the mitochondria had no effect. The mitochondrial H₂O₂ generation observed with the HyPer protein located in the mitochondria showed no significant changes following exposure to palmitic acid, oleic acid or a mixture of both (data not shown).

DISCUSSION

Obesity is the major risk factor for the development of type 2 diabetes mellitus (28; 29) which is usually accompanied by elevated levels of non-esterified fatty acids (NEFAs). NEFAs are under suspicion to mediate beta-cell dysfunction and beta-cell loss (5; 30; 31). However, not only the total concentration of NEFAs is essential for these deleterious effects rather than the ratio of saturated to unsaturated NEFAs (32). In the present study we analysed the protective effect of different unsaturated NEFAs against the toxicity of palmitic acid, the physiologically most abundant saturated fatty acid. According to earlier observations (8) unsaturated fatty acids are able to potently attenuate the ability of saturated fatty acids to induce beta-cell apoptosis, but the molecular mechanisms remain unclear. It has been proposed that increased β -oxidation and oxidative phosphorylation cause lipotoxicity by enhanced formation of reactive oxygen species (ROS) in the mitochondria (12; 13; 33). Therefore we analyzed the ROS formation by a DCF assay in RINm5F cells overexpressing the H_2O_2 detoxifying enzyme catalase either in the mitochondria or the cytosol and the peroxisomes. While palmitic acid led to a pronounced increase of ROS formation the effect of oleic acid was negligible. Moreover, oleic acid was even able to prevent palmitic acid induced ROS formation. The reduced ROS formation in catalase overexpressing cells indicates that H_2O_2 is the deleterious reactive oxygen species. As shown before (Elsner *et al.* in prep.), this effect was much more pronounced when the catalase was overexpressed in the cytosol and the peroxisomes in comparison to a mitochondrial localization of catalase.

NEFAs are not only metabolized through mitochondrial β -oxidation but particularly long-chain NEFAs are substrates for peroxisomal β -oxidation (34; 35). In contrast to mitochondrial β -oxidation, the acyl-CoA oxidases in the peroxisomes form H_2O_2 and not reducing equivalents (36). The H_2O_2 can easily disproportionate by metal-catalyzed fenton reaction to the highly reactive hydroxyl radical (37; 38).

To therefore get direct evidence for H₂O₂ generation in a defined subcellular localization we used the fluorescence probe HyPer. Thereby an increase of the peroxisomal H₂O₂ concentration due to palmitic acid treatment was detectable, which was reduced through an equimolar concentration of oleic acid.

The fact that only long-chain unsaturated NEFAs protects gives further evidence for the involvement of peroxisomal β -oxidation in H₂O₂ formation. This is in accordance with the protective action of oleic acid against the toxicity of the exclusively peroxisomal metabolisable pristanic acid. However, this protective effect is independent of the number of double bonds, indicating that the mechanism does not rely on the scavenging capability of the double bond. Another proposed mechanism for lipotoxicity is the induction of ER stress (9; 39), which ultimately results by activation of CHOP in apoptosis. Palmitic acid induced expression of ER stress marker genes was completely attenuated by oleic acid. From the finding that ER specific caspase-12 was activated to almost the same extent as the other analyzed initiator caspases-8 and -9, we conclude that the ER stress pathway had no prescind impact on lipotoxicity. Furthermore we can conclude from this equal activation including the mitochondrial specific caspase-9 that also not the mitochondria are the major sites for the initiation of oxidative stress in lipotoxicity. This result is in accordance to our recent observation (Elsner *et al.* in prep.) that rather peroxisomal generated H₂O₂ than mitochondrial generated H₂O₂ mediates lipotoxicity.

In contrast to palmitic acid, oleic acid leads to a cytosolic lipid droplet formation due to its more efficient esterification to triglycerides (20). These triglycerides are sequestered in the lipid droplets, which correlates with lipotoxic states such as fatty liver disease, but in pancreatic β -cells it might serve as a cytoprotective mechanism by preventing a cellular rise in toxic free fatty acyl moieties (20; 40). Thus saturated fatty acids are not anymore available for peroxisomal β -oxidation which would lead do H₂O₂ formation. Yeast mutants lacking cytoplasmic lipid droplets are strikingly sensitive to unsaturated fatty acids (40). On the other

hand the desaturation of palmitic acid by stearoyl-CoA-desaturase has shown to protect the MIN6 beta-cell-line by facilitating NEFA esterification (41).

Taken together, palmitic acid induces peroxisomal generation of H_2O_2 resulting in beta-cell apoptosis, whereas oleic acid prevents H_2O_2 formation. ER stress and mitochondrial ROS formation seems not to be the origin of lipotoxicity and the protective effect of unsaturated fatty acids. However, further studies to investigate the consequences of differential channeling of saturated and unsaturated NEFAs into triglycerides or lipid droplets are necessary.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Maren Böger and Martin Wirth for their skillful technical assistance. This work was supported by the European Union (Integrated Project EuroDia LSHM-CT-2006-518153 in the Framework Program 6 [FP6] of the European Community). Part of the work was obtained during MD PhD thesis by W.W.

REFERENCES

1. Roche HM, Phillips C, Gibney MJ: The metabolic syndrome: the crossroads of diet and genetics. *Proc Nutr Soc* 64:371-377, 2005
2. Gordon ES: Non-esterified fatty acids in the blood of obese and lean subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 8:740-747, 1960
3. Sabin MA, De Hora M, Holly JM, Hunt LP, Ford AL, Williams SR, Baker JS, Retallick CJ, Crowne EC, Shield JP: Fasting nonesterified fatty acid profiles in childhood and their relationship with adiposity, insulin sensitivity, and lipid levels. *Pediatrics* 120:e1426-1433, 2007
4. Unger RH: Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 44:863-870, 1995
5. Bergman RN, Ader M: Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 11:351-356, 2000
6. Boden G, Shulman GI: Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 32 Suppl 3:14-23, 2002
7. Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM, Sempoux C, Henquin JC: Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4:32-42, 2008
8. Dhayal S, Welters HJ, Morgan NG: Structural requirements for the cytoprotective actions of mono-unsaturated fatty acids in the pancreatic beta-cell line, BRIN-BD11. *Br J Pharmacol* 153:1718-1727, 2008
9. Kharroubi I, Ladriere L, Cardozo AK, Dogusan Z, Cnop M, Eizirik DL: Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* 145:5087-5096, 2004
10. Lai E, Bikopoulos G, Wheeler MB, Rozakis-Adcock M, Volchuk A: Differential activation of ER stress and apoptosis in response to chronically elevated free fatty acids in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E540-550, 2008
11. Murphy MP: How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417:1-13, 2009
12. Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, Curi R: Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol* 583:9-24, 2007
13. Schonfeld P, Wojtczak L: Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 45:231-241, 2008
14. Newsholme P, Keane D, Welters HJ, Morgan NG: Life and death decisions of the pancreatic beta-cell: the role of fatty acids. *Clin Sci (Lond)* 112:27-42, 2007
15. Eitel K, Staiger H, Brendel MD, Brandhorst D, Bretzel RG, Haring HU, Kellerer M: Different role of saturated and unsaturated fatty acids in beta-cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 299:853-856, 2002
16. Welters HJ, Tadayyon M, Scarpello JH, Smith SA, Morgan NG: Mono-unsaturated fatty acids protect against beta-cell apoptosis induced by saturated fatty acids, serum withdrawal or cytokine exposure. *FEBS Lett* 560:103-108, 2004
17. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S: Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46:1733-1742, 1997

18. Gurgul E, Lortz S, Tiedge M, Jorns A, Lenzen S: Mitochondrial catalase overexpression protects insulin-producing cells against toxicity of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines. *Diabetes* 53:2271-2280, 2004
19. Lortz S, Gurgul-Convey E, Lenzen S, Tiedge M: Importance of mitochondrial superoxide dismutase expression in insulin-producing cells for the toxicity of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines. *Diabetologia* 48:1541-1548, 2005
20. Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Eizirik DL, Pipeleers DG: Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* 50:1771-1777, 2001
21. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63, 1983
22. Naujok O, Francini F, Picton S, Bailey CJ, Lenzen S, Jorns A: Changes in gene expression and morphology of mouse embryonic stem cells on differentiation into insulin-producing cells in vitro and in vivo. *Diabetes Metab Res Rev* 25:464-476, 2009
23. Rosenkranz AR, Schmaldienst S, Stuhlmeier KM, Chen W, Knapp W, Zlabinger GJ: A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *J Immunol Methods* 156:39-45, 1992
24. de Hoop MJ, Ab G: Import of proteins into peroxisomes and other microbodies. *Biochem J* 286 (Pt 3):657-669, 1992
25. Subramani S: Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu Rev Cell Biol* 9:445-478, 1993
26. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D: Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72:9873-9880, 1998
27. Sastry L, Johnson T, Hobson MJ, Smucker B, Cornetta K: Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods. *Gene Ther* 9:1155-1162, 2002
28. Burke JP, Williams K, Gaskill SP, Hazuda HP, Haffner SM, Stern MP: Rapid rise in the incidence of type 2 diabetes from 1987 to 1996: results from the San Antonio Heart Study. *Arch Intern Med* 159:1450-1456, 1999
29. Hull RL, Kodama K, Utzschneider KM, Carr DB, Prigeon RL, Kahn SE: Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. *Diabetologia* 48:1350-1358, 2005
30. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC: Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102-110, 2003
31. Zhou YP, Grill VE: Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J Clin Invest* 93:870-876, 1994
32. Laaksonen DE, Lakka TA, Lakka HM, Nyyssonen K, Rissanen T, Niskanen LK, Salonen JT: Serum fatty acid composition predicts development of impaired fasting glycaemia and diabetes in middle-aged men. *Diabet Med* 19:456-464, 2002
33. Carlsson C, Borg LA, Welsh N: Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology* 140:3422-3428, 1999
34. Kunau WH, Dommes V, Schulz H: beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res* 34:267-342, 1995

35. Wanders RJ, Waterham HR: Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* 75:295-332, 2006
36. Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, Hiltunen JK: Peroxisomal beta-oxidation--a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta* 1763:1413-1426, 2006
37. Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, 2007
38. Lenzen S: Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans* 36:343-347, 2008
39. Diakogiannaki E, Welters HJ, Morgan NG: Differential regulation of the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells exposed to long-chain saturated and monounsaturated fatty acids. *J Endocrinol* 197:553-563, 2008
40. Garbarino J, Padamsee M, Wilcox L, Oelkers PM, D'Ambrosio D, Ruggles KV, Ramsey N, Jabado O, Turkish A, Sturley SL: Sterol and diacylglycerol acyltransferase deficiency triggers fatty acid-mediated cell death. *J Biol Chem* 284:30994-31005, 2009
41. Busch AK, Gurisik E, Cordery DV, Sudlow M, Denyer GS, Laybutt DR, Hughes WE, Biden TJ: Increased fatty acid desaturation and enhanced expression of stearoyl coenzyme A desaturase protects pancreatic beta-cells from lipoapoptosis. *Diabetes* 54:2917-2924, 2005

FIGURES

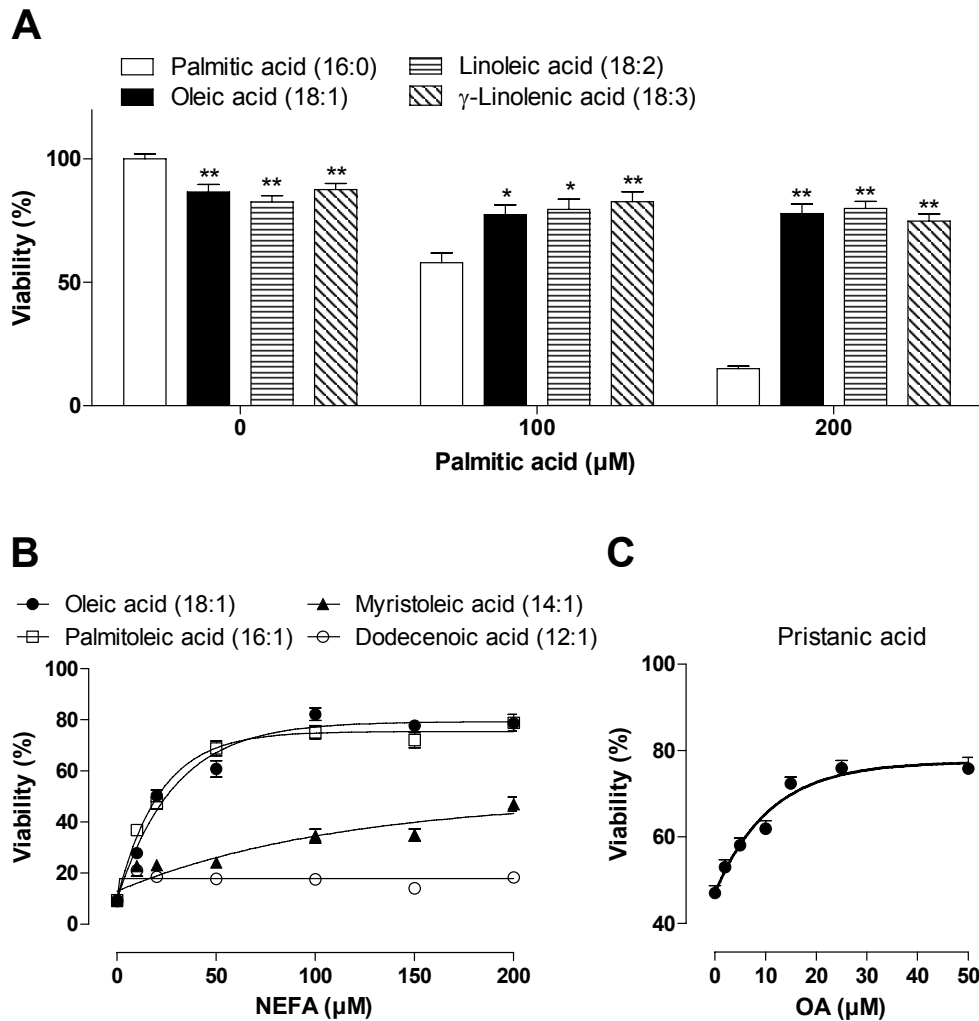


Fig. 1 Protective effect of unsaturated NEFAs against palmitic or pristanic acid induced toxicity in RINm5F insulin-producing cells

(A) RINm5F cells were incubated with 0, 100 or 200 μM palmitic acid and unsaturated NEFAs (100 μM) which differ in the number of double bonds. (B) RINm5F cells were incubated with 200 μM palmitic acid and monounsaturated NEFAs of different chain length. (C) RINm5F cells were incubated with 200 μM pristanic acid and different oleic acid concentrations. Cell viability was determined after 24 h by MTT assay and expressed as a percentage of untreated cells. Data are means \pm SEM from four individual experiments. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ vs. palmitic acid (ANOVA/Dunnett's test for multiple comparisons).

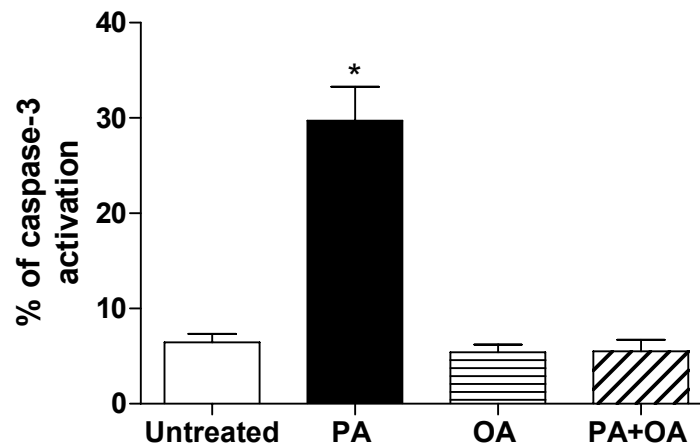


Fig. 2 Caspase-3 activation after exposure to non-estrified fatty acids

RINm5F insulin-producing cells were treated for 24 h with either 100 μ M palmitic acid (PA), 100 μ M oleic acid (OA) or a combination of both (100 μ M each). Afterwards the cells were trypsinized and stained for active caspase-3 with a FITC-labelled antibody. The number of active caspase-3 positive cells was quantified by flow cytometry. Data are means \pm SEM from four individual experiments. * $p < 0.01$ vs. untreated cells (ANOVA/Dunnett's test for multiple comparisons).

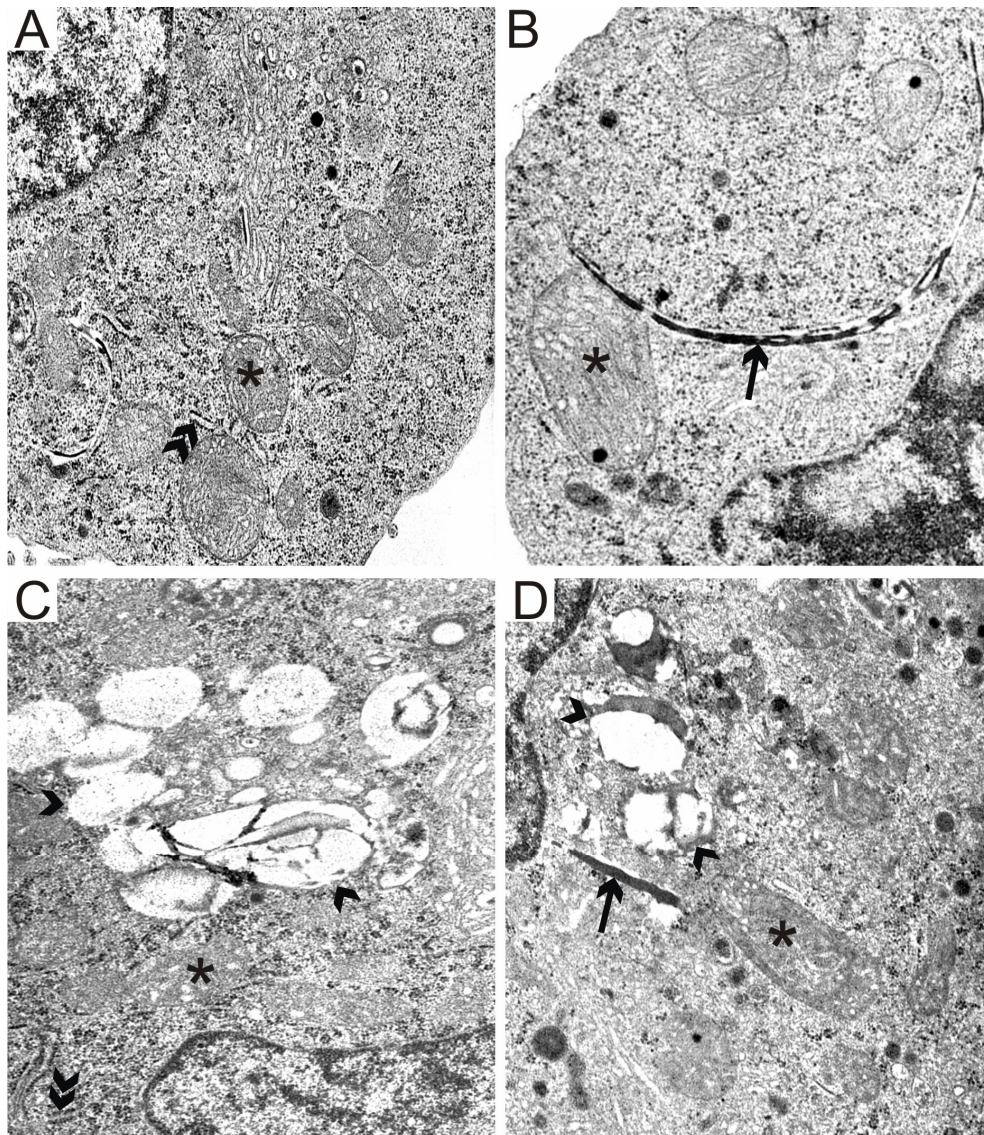


Fig. 3 Ultrastructural alterations of RINm5F cells treated with NEFAs

Shown are representative images of RINm5F insulin-producing cells under control condition (A) and after 24 h incubation with palmitic acid (100 μ M, B), oleic acid (100 μ M, C), or a mixture of palmitic (100 μ M) and oleic acid (100 μ M, D).

➤➤ normally developed rough endoplasmic reticulum, ↙ changes in the rough endoplasmic reticulum, * mitochondria, ▼ lipid droplets

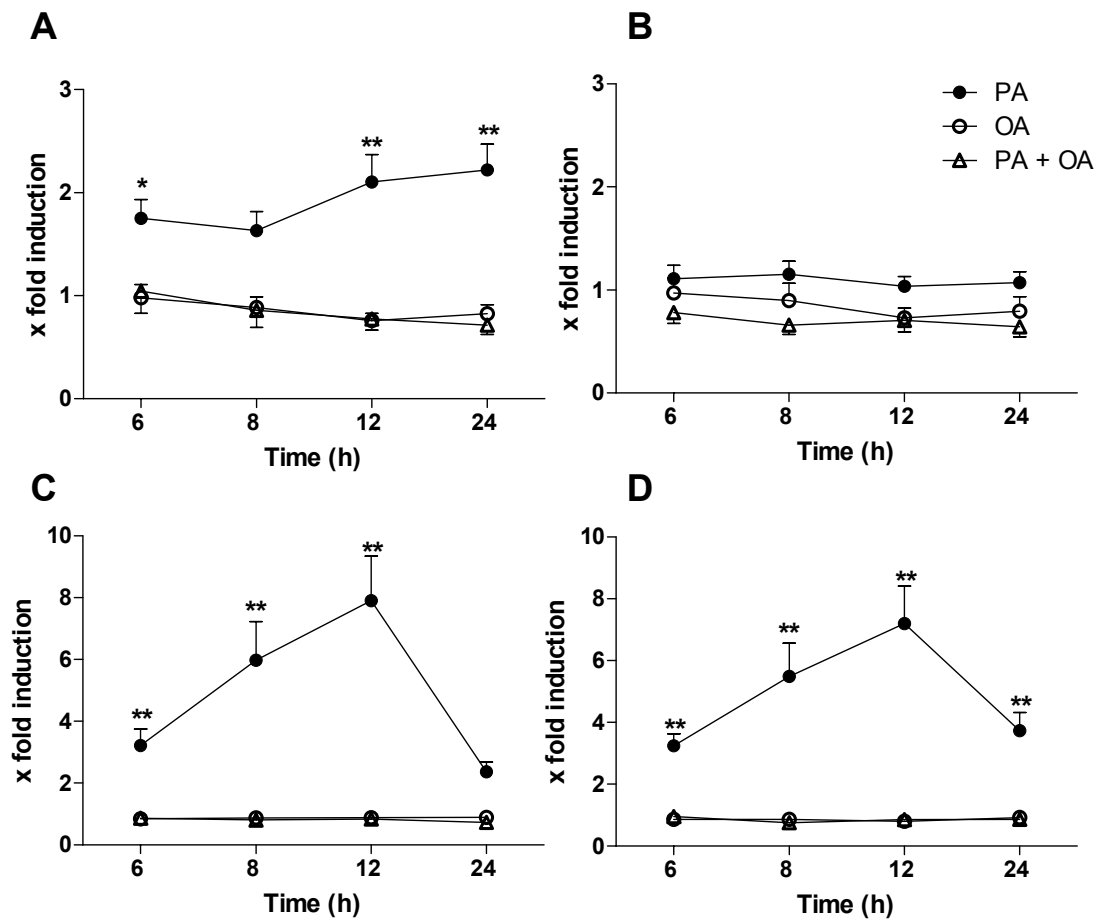


Fig. 4 Gene expression analyses of ER stress marker genes in RINm5F insulin-producing cells after palmitic and oleic acid incubation

mRNA expression of the ER stress marker genes Bip (A), XBP-1 (B), CHOP (C), and XBP-1 spliced (D) in RINm5F cells after 6 – 24 h treatment with NEFAs (100 μ M) was quantified by qPCR. Expression levels were normalized to the expression of the reference gene cyclophilin (peptidylprolyl isomerase A / PPIA) and calculated as x fold induction. Results are means \pm SEM from 4-7 individual experiments. * p <0.05, ** p <0.01 compared with untreated cells (*ANOVA/Dunnett's-test*).

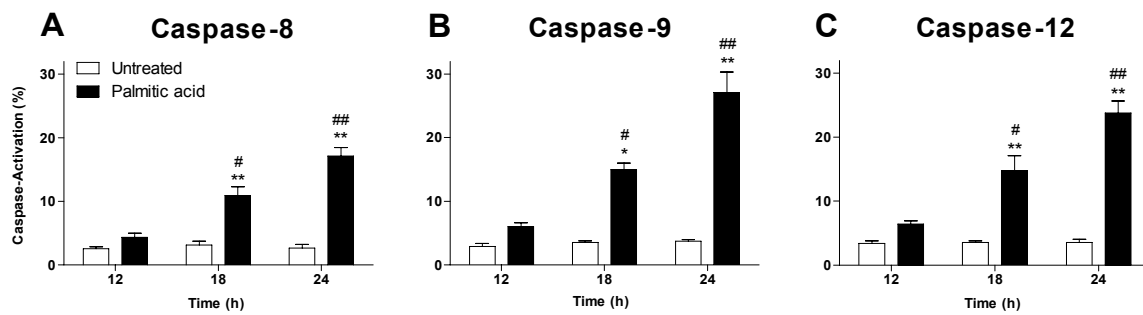


Fig. 5 Activation of initiator caspases in insulin-producing cells by palmitic acid

After 12, 18, and 24 h treatment with 100 μ M palmitic acid activation of caspase-8 (A), -9 (B), and -12 (C) in RINm5F cells was measured by flow cytometry. Data are means \pm SEM from 4-9 individual experiments, * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ as compared to untreated cells (*ANOVA/Dunnett's test*); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ comparison of 12 h vs. 18 h and 18 h vs. 24 h (*ANOVA/Bonferroni's test*).

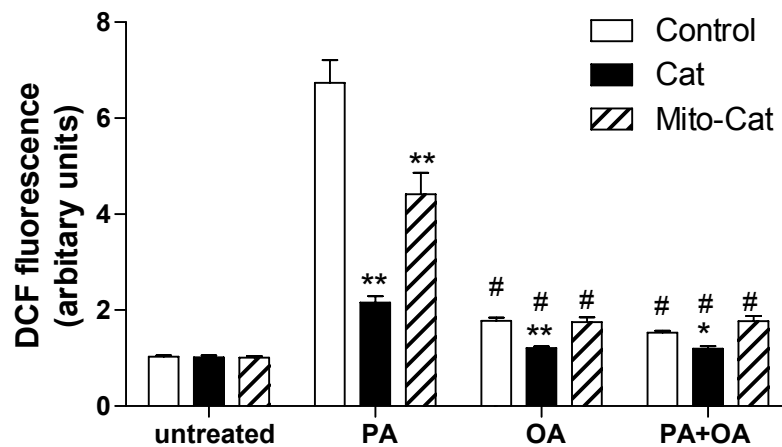


Fig. 6 Palmitic acid induced production of reactive oxygen species in RINm5F insulin-producing cells that overexpress catalase in the cytosol (Cat) or in the mitochondria (Mito-Cat)

To determine ROS generation, cells were loaded with 10 μM of DCF-DA dye for 30 min and then cultured with 100 μM palmitic acid (PA), 100 μM oleic acid (OA) or a mixture of both (each 100 μM) for 24 h. DCF fluorescence was measured after 24 h and normalized to the cell viability determined by MTT assay. Data are means \pm SEM from seven individual experiments. * $p < 0.05$, ** < 0.01 as compared with control cells; # $p < 0.01$ vs. palmitic acid treated cells, (ANOVA/Dunnett's test for multiple comparisons).

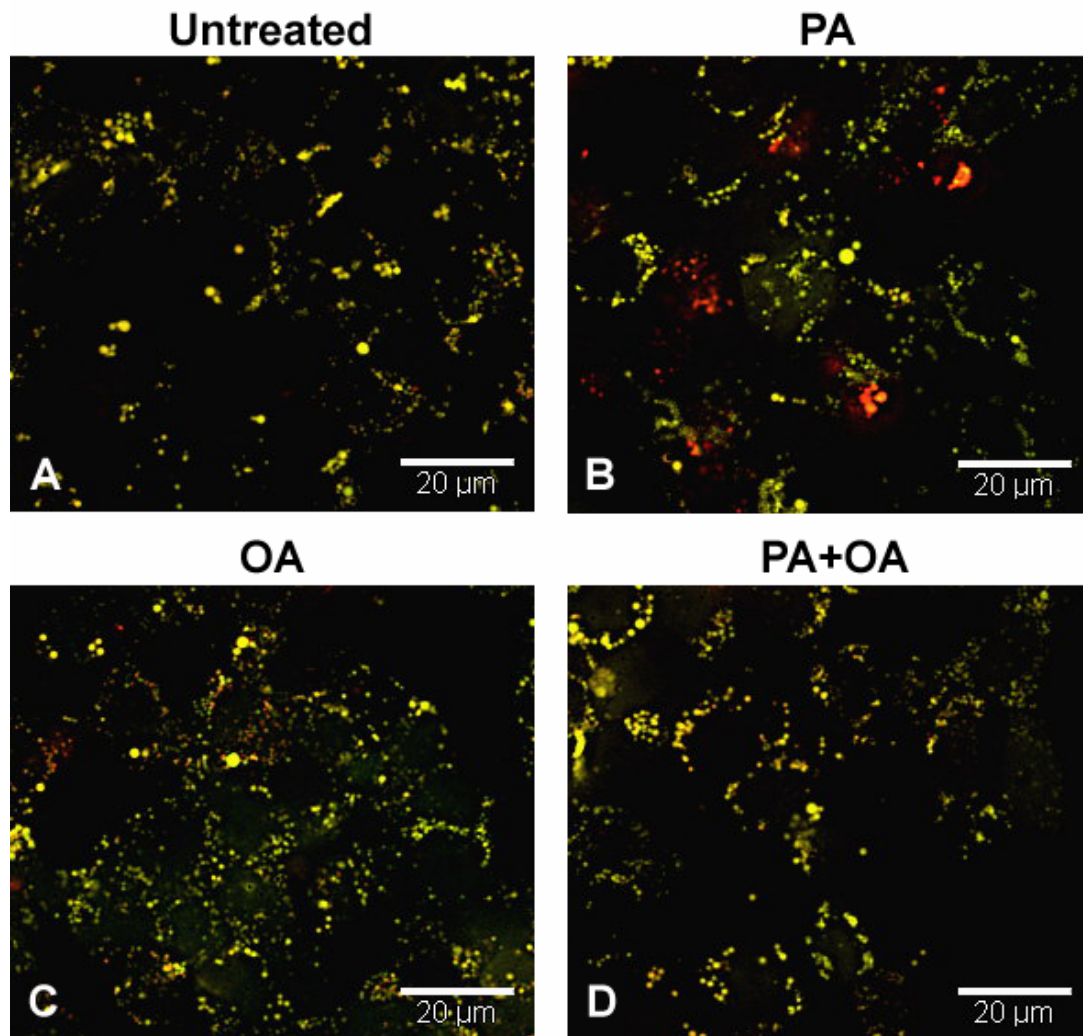


Fig. 7 Live cell fluorescence microscopy for detection of H_2O_2 in RINm5F insulin-producing cells using the H_2O_2 sensor protein HyPer-Peroxi

Cells that stably expressed the H_2O_2 sensor protein HyPer in peroxisomes (HyPer-Peroxi) were incubated for 24 h with 100 μM palmitic acid (B; PA), 100 μM oleic acid (C; OA) or a mixture of both (D; PA+OA, 100 μM each). Shown are representative images after 24 h. Fluorescence at 504/520 nm is depicted in red and fluorescence at 427/520 nm is shown in green. Increased H_2O_2 generation is indicated by a colour change from green to yellow to red.

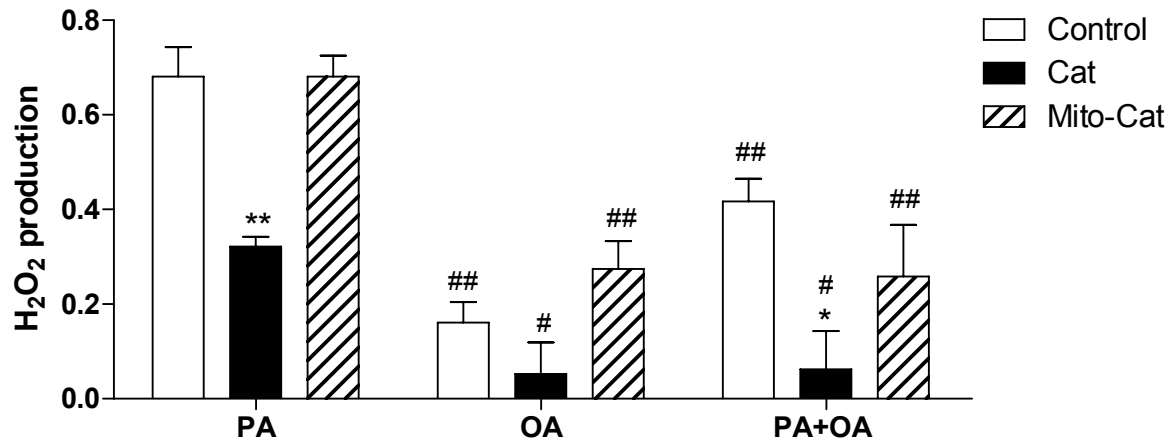


Fig. 8 Peroxisomal H₂O₂ production in RINm5F insulin-producing cells after NEFA treatment

Cells that stably expressed the H₂O₂ sensor protein HyPer in peroxisomes as well as catalase in the cytosol (Cat) or mitochondria (Mito-Cat) were treated with 100 μM palmitic acid (PA), 100 μM oleic acid (OA) or a mixture of palmitic and oleic acid (PA + OA, 100 μM each) for 24 h. The fluorescence ratio (excitation 427 nm and 475 nm, emission 520 nm) indicating the H₂O₂ production was measured after 24 h and normalized to the fluorescence ratio of untreated cells. Data are means ± SEM from ten individual experiments. *p < 0.05, **p < 0.01 vs. control cells, #p < 0.05, ##p < 0.01 vs. palmitic acid treated cells, (ANOVA/Dunnett's test for multiple comparisons).

Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic β -cells

Running title: ROS mediated lipotoxicity

Wiebke Gehrman, Matthias Elsner, Sigurd Lenzen

Institute of Clinical Biochemistry, Hannover Medical School, 30623 Hannover, Germany.

Address correspondence and reprint requests to:

Prof. Sigurd Lenzen
Institute of Clinical Biochemistry
Hannover Medical School
30623 Hannover
Germany
Telephone: + 49/511/5326525
Fax: + 49/511/5323584
lenzen.sigurd@mh-hannover.de

Abstract

Chronically elevated concentrations of non-esterified fatty acids (NEFA) in type 2 diabetes may be involved in β -cell dysfunction and apoptosis. It has been shown that long-chain saturated NEFAs exhibit a strong cytotoxic effect upon insulin-producing cells, while short-chain as well as unsaturated NEFAs are well tolerated. Moreover, long-chain unsaturated NEFAs counteract the toxicity of palmitic acid. ROS formation and gene expression analyses together with viability assays in different β -cell lines revealed that the G-protein coupled receptors 40 and 120 do not mediate lipotoxicity. This is independent from the role, which these receptors, specifically GPR40, play in the potentiation of glucose-induced insulin secretion by saturated and unsaturated long-chain NEFAs. Long-chain NEFAs are not only metabolised in the mitochondria but also in peroxisomes. In contrast to mitochondrial β -oxidation, the acyl-CoA oxidases in the peroxisomes form hydrogen peroxide and not reducing equivalents. Since β -cells lack almost completely catalase they are exceptionally vulnerable by hydrogen peroxide generated in peroxisomes. ROS generation in the respiratory chain is less important because overexpression of catalase and superoxide dismutase in the mitochondria do not provide protection. Thus peroxisomally generated hydrogen peroxide is the likely reactive oxygen species that causes pancreatic β -cell dysfunction and ultimately β -cell death.

Keywords: β -oxidation, G-protein coupled receptors, insulin secretion, mitochondria, non-esterified fatty acids, peroxisomes, reactive oxygen species, type 2 diabetes mellitus

Introduction

Type 2 diabetes mellitus is a complex metabolic disorder with a dramatically increasing prevalence worldwide [1]. This disorder is characterized by peripheral insulin resistance and pancreatic β -cell dysfunction [2,3], resulting in defective glucose-induced insulin secretion [4-6] and ultimately in β -cell loss through apoptosis [7,8]. Hypercaloric Western diets, rich in carbohydrates and saturated fats, are responsible for the manifestation of the metabolic syndrome. This is characterized by dyslipidaemia, hypertension and obesity which precede type 2 diabetes manifestation. Accompanying elevated levels of non-esterified fatty acids (NEFAs) [9] can suppress insulin secretion and cause β -cell dysfunction and loss, a phenomenon referred to as lipotoxicity [10,11]. Though lipotoxicity is subject to intensive research and scientific discussion a conclusive molecular mechanism has not been elucidated.

Structural requirements for lipotoxicity

The effects of non-esterified fatty acids (NEFAs) upon insulin-producing cells are dependent on chain-length and degree of saturation [12]. Saturated long-chain NEFAs, such as the physiologically most abundant saturated NEFA palmitic acid, are highly toxic, while NEFAs with a shorter chain length (C13:0 tridecanoic acid or shorter) are well tolerated by insulin-producing cells (Elsner *et al.* in prep). By contrast, unsaturated NEFAs, irrespective of their chain length, are not toxic. Moreover, unsaturated long-chain NEFAs, like the physiologically most important oleic acid, attenuate the toxic effect of saturated long-chain NEFAs such as palmitic acid. This protective potency decreases with shortening of the chain-length (Elsner *et al.* in prep) [12]. Mono-unsaturated NEFAs with a chain length of C12 or C14 are clearly less protective against palmitic acid induced toxicity than fatty acids with a chain length of \geq C16. Furthermore, the protective potency of long-chain unsaturated NEFAs is not dependent on the number of double bonds; thus oleic (C18:1), linoleic (C18:2) and γ -linolenic acid (C18:3) show a comparable protective effect (Elsner *et al.* in prep). Therefore, the different NEFAs can be subdivided into three different groups, depending upon their effect on β -cell viability:

a) saturated long-chain NEFAs, which are toxic, b) unsaturated long-chain NEFAs, which attenuate the cytotoxic effect of saturated long-chain NEFAs, and c) saturated and unsaturated short-chain NEFAs, which are neither toxic nor protective. These different effects of NEFAs in dependence on their structure are indicative of an involvement of a receptor-mediated signalling cascade. Within the family of G-protein-coupled-receptors (GPR) some are known to bind specifically fatty acids, such as GPR40, GPR41, GPR43, GPR119, and GPR120.

Fatty acid binding receptors

The family of G-protein coupled receptors (GPRs) shares the structural feature of seven transmembrane α -helices. These receptors translate a signal into an intracellular response through heterotrimeric G proteins. These GPRs are expressed in almost all tissues and are activated by a broad variety of ligands, like hormones, neurotransmitters, peptides, proteins, steroids as well as NEFAs. The GPR isoforms 40, 41, 43, 119 and 120 belong to the subset of lipid binding receptors [13,14]. All isoforms have been considered to be expressed in insulin-secreting β -cells, though information about the extent of expression is inconsistent [15]. GPR119 and GPR120 both belong to the rhodopsin (class A) family, which showed only little homology to GPR40, 41 or 43 [14]. GPR119 is mainly expressed in the pancreas and the gastrointestinal tract [16]. However, the fact that this receptor is activated only by fatty acid derivatives such as lysophosphatidylcholine (LPC) and oleoylethanolamide (OEA) [16,17] excludes GPR119 as a mediator for lipotoxicity of saturated long-chain NEFAs.

The GPR120 is a potentially interesting candidate, since it is specifically activated through long-chain NEFAs [18]. Analysis of tissue distribution revealed the highest expression levels in the intestinal tract, though it has been found also in different β -cell lines (Fig. 1) [12,15]. Activation of this receptor isoform by unsaturated long-chain NEFAs, such as α -linolenic acid, results in GLP-1 secretion from the enteroendocrine cell line STC-1, through activation of ERK and PI3 kinase pathways [18]. Interestingly, it has been shown that linolenic acid mediates protection against serum deprivation through GPR120 [19].

The GPR isoforms 40, 41, and 43 are highly homolog but differ in substrate specificity and tissue distribution. GPR41 and GPR43 are specifically activated through short-chain NEFAs, such as propionic acid, butyric acid, and pentanoic acid [13]. Both receptors are expressed to the highest extent in immune cells and in adipose tissue, where they induce leptin production and adipogenesis [20,21]. The expression of both receptors in the pancreas is controversially discussed in the literature [15]. The substrate specificity for short-chain NEFAs, e.g. C2-C5, which are well tolerated by pancreatic β -cells and the lack of protection against saturated long-chain NEFAs (Elsner *et al.* in prep) [22], argue against an involvement of these receptor isoforms in lipotoxicity or cytoprotection of unsaturated NEFAs. GPR40 has been considered to be the most promising candidate among these receptors as a lipotoxicity mediator. It is abundantly expressed in human and rodent islets [23,24] and could also be found in several β -cell lines (Fig. 1) [24]. Saturated and unsaturated medium to long-chain NEFAs (C12-C18) are the preferred ligands of GPR40.

Fatty acids and insulin secretion

Interestingly, these NEFAs also potentiate glucose-induced insulin secretion from pancreatic β -cells through activation of GPR40 (Fig. 2) [24]. Binding of the fatty acids to GPR40 activates the $G_{\alpha q}$ -phospholipase C (PLC) pathway resulting in an increase of cytosolic free $[Ca^{2+}]_i$ through inositol trisphosphate (IP_3) mediated release of Ca^{2+} from endoplasmic reticulum stores [25,26]. In addition, signalling via phospholipase C (PLC) and diacylglycerol (DAG) may contribute to exocytosis of insulin (Fig. 3). A contribution of Ca^{2+} influx through L-type Ca^{2+} channels has been considered [25,26]. The emptying of intracellular Ca^{2+} stores in β -cells can induce a depolarizing current which increases the Ca^{2+} influx through L-type Ca^{2+} channels [27]. The insulinotropic effect of unsaturated fatty acids such as oleic acid is somewhat weaker than saturated fatty acids such as palmitic acid (Fig. 2) [28]. A combination of palmitic acid and oleic acid causes a similar strong insulin secretory response as palmitic acid alone (Fig. 2).

GPR isoforms such as GPR41 and GPR43 as well as GPR119 have a fatty acid binding profile that cannot explain the strong potentiating effect of long-chain saturated and unsaturated NEFAs, though it has been shown that LPC enhances glucose-stimulated insulin secretion via GPR119 mediated stimulation of adenylate cyclase and intracellular cAMP accumulation [16]. Only the GPR40 and the GPR120 receptor, with their characteristic features, classify these fatty acid plasma membrane receptors as crucial mediators of palmitic and oleic acid mediated potentiation of glucose-induced insulin secretion. And in fact, NEFA-mediated potentiating effects are reduced in parallel with a reduction of GPR40 expression [24,29]. The potential role of GPR120 for enhanced insulin secretion, on the other hand, requires further investigation. Long-chain acyl CoA (LC-CoA) esters, which have been considered for some time to play a crucial signalling role in fatty acid mediated potentiation of insulin secretion [30,31], are not central for the effects of NEFAs on insulin secretion. The metabolism of fatty acids is apparently of subordinate importance as site of generation of a specific metabolic signal for fatty acid mediated insulin secretion. It may be possible, however, that metabolites generated within mitochondrial β -oxidation and subsequent citric acid cycle, as assumed for the potentiation of glucose-induced insulin secretion through the amplifying pathway [32-35], contribute in a collaborative fashion to the insulin secretory capacity of fatty acids. In a sense the mechanism of fatty acid potentiation resembles the mechanisms of other potentiators of glucose-induced insulin secretion such as acetylcholine, bombesin or arginine-vasopressin, which mediate their effects via interaction with a receptor in the β -cell plasma membrane coupled to signalling pathways which increase intracellular $[Ca^{2+}]_i$ through mobilisation from the endoplasmic reticulum and increased Ca^{2+} influx through L-type Ca^{2+} channels [25]. In particular in the phase of insulin resistance before diabetes manifestation, when an increased β -cell volume compensates for higher insulin demands of the obese organism, the potentiation of glucose-induced insulin secretion by elevated fatty acid concentrations in the circulation is operative.

GPR40 receptor and lipotoxicity-mediated β -cell dysfunction

The GPR40 receptor has also been considered to mediate lipotoxicity in insulin-secreting cells [36]. However, a number of experimental observations have been made which are not compatible with a central role of the GPR40 receptor in lipotoxicity. (a) The substrate specificity of the GPR40 receptor is not congruent with the pattern of NEFA toxicity. (b) Lipotoxicity is not dependent upon the expression of the GPR40 receptor in insulin-secreting cells. (c) Pancreatic β -cells are damaged also in GPR40 KO mice fed a high fat diet. (d) Small-molecule agonists (e.g. Cpd-B) of GPR40 potentiate glucose-induced insulin secretion in the same way as NEFAs, but are not toxic and do not impair insulin secretion.

In detail: (a) Saturated and unsaturated NEFAs exert completely different effects on β -cell viability. Thus long-chain saturated NEFAs showed a strong cytotoxic effect, whereas unsaturated long-chain NEFAs are well tolerated (Elsner *et al.* in prep) [12,37]. Binding to GPR40 cannot explain these different effects, because both saturated and unsaturated long-chain NEFAs are ligands for GPR40. Another important point is the time course of these effects; enhanced insulin secretion via GPR40 is evident within hours after exposure, whereas toxicity is only obvious after 1-3 days.

(b) GPR40 expression is different in the analysed β -cell lines. The highest expression level was found in MIN6 cells, in INS-1E cells the expression was somewhat lower and completely absent in RINm5F cells (Fig. 1). Interestingly, these cell lines showed also a different sensitivity for palmitic acid-induced toxicity in a MTT viability assay after 24 h treatment. RINm5F cells were by far the most sensitive cells with an EC_{50} value for palmitic acid of $98 \mu\text{M} \pm 5$. For MIN6 and INS-1E cells the EC_{50} values of $993 \mu\text{M} \pm 123$ and $1860 \mu\text{M} \pm 540$ respectively, were significantly higher. Therefore, it is unlikely that GPR40 mediates palmitic acid-induced toxicity, because the receptor is not expressed in the most sensitive RINm5F cells.

(c) Studies with GPR40 knockout mice revealed that GPR40 does not mediate lipotoxicity [29,38]. Thus, it was shown that 3 days of exposure to fatty acids caused a similar inhibition of glucose-induced insulin secretion and reduction of islet insulin content in wild-type and GPR40 knockout mice [38].

(d) In the same study it was shown that a newly discovered GPR40 agonist restored glucose-induced insulin secretion in β -cells from the neonatal streptozotocin-diabetic rats without any toxic effect [38].

β -Oxidation of fatty acids in mitochondria and peroxisomes

Fatty acids are an important energy source. They are broken down to acyl-CoAs mainly by β -oxidation at two different subcellular sites; in the mitochondria and in the peroxisomes of higher eukaryotes including all mammals, while in yeast and plants, peroxisomes are the sole site of β -oxidation. The common mechanism comprises four steps: dehydrogenation, hydration, dehydrogenation again, and finally thiolytic cleavage for both mitochondrial and peroxisomal β -oxidation. Although similar in mechanism, mitochondrial and peroxisomal β -oxidation differ in substrate specificity and function. In mitochondria the β -oxidation is tightly coupled to the production of ATP. The resulting NADH and FADH₂ from the β -oxidation and the following oxidation of acetyl-CoA in the citric acid cycle are used for ATP production in the respiratory chain. Thus the complete break-down of one mol palmitic acid yields 106 mol ATP [39].

Short- and medium-chain (C4-C8) fatty acids are exclusively β -oxidized in the mitochondria, whereas long-chain (C10-C16) fatty acids are β -oxidized in the mitochondria and the peroxisomes (C14-C16). Very long-chain (C17-C24) fatty acids are handled preferentially by peroxisomes [40]. Other specific substrates for peroxisomal metabolism are in particular (a) pristanic acid (2,4,6,10-tetramethylpentadecanoic acid), which is converted by α -oxidation; (b) di- and trihydroxycholestanic acid (c) long-chain dicarboxylic acids, produced by Ω -

oxidation of long-chain monocarboxylic acids; (d) certain polyunsaturated fatty acids, including tetracosahexaenoic acid (C24:6), which undergoes one cycle of β -oxidation in peroxisomes to produce docosahexaenoic acid (C22:6); (e) certain prostaglandins and leukotrienes.

Before metabolic degradation in the mitochondria or peroxisomes, transport through the membrane into the organelles is required. In the case of the mitochondria, long-chain fatty acids enter the mitochondrial matrix space via the carnitine cycle (CPT1/2), whereas short- and medium-chain fatty acids enter directly in their protonated form. Peroxisomal import of fatty acids does not involve the carnitine shuttle but more likely, fatty acids are transported as acyl-CoA via ABC transporter isoforms (D1-D4) [40]. In the peroxisomal membrane two specific acyl-CoA synthetases were identified which are responsible for the esterification of fatty acids [41].

In the first reaction of the mitochondrial β -oxidation acyl-CoA is oxidised by an acyl-CoA dehydrogenase (Fig. 4) resulting in trans- Δ^2 -enoyl-CoA. The electrons of this reaction are transferred to FAD and are used in the respiratory chain for ATP production. A group of four acyl-CoA dehydrogenases with different, but overlapping chain length specificities cooperate to facilitate the complete degradation of all fatty acids that can be metabolised by mitochondrial β -oxidation. The chain length specificities of acyl-CoA dehydrogenases provide the basis for metabolic distinction between short-chain to medium-chain (C6-C9), long-chain (C10-C16), and very-long-chain (>C16).

The enzyme enoyl-CoA hydratase adds in a second reaction water to trans- Δ^2 -enoyl-CoA. The resulting product 3-L-hydroxyacyl-CoA is again oxidised through a specific dehydrogenase, which transfers 2 electrons to NAD^+ . In a final step the acyl-thioester is hydrolysed and shortens on this way the chain by 2 carbon atoms. The acyl-CoA can be further degraded by another β -oxidation cycle and the generated acetyl-CoA can be

metabolised in the citric acid cycle. The drafted mechanism of the reaction cycle for mitochondrial β -oxidation is in general the same as for peroxisomal β -oxidation, although different isoforms of the enzymes are expressed in the peroxisomes. But there is one fundamental difference in the first step of β -oxidation between mitochondrial and peroxisomal β -oxidation. In the mitochondria the electrons are transferred to FAD and in the peroxisomes, O_2 is the electron acceptor, which leads to the formation of hydrogen peroxide (H_2O_2). This reaction is catalysed by specific peroxisomal acyl-CoA oxidase (ACOX) isoforms in the rat and in humans. In the rat, extrahepatic peroxisomes contain two acyl-CoA oxidases, including palmitoyl-CoA oxidase (ACOX1) and pristanoyl-CoA oxidase (ACOX3), whereas liver peroxisomes contain an additional cholestanoyl-CoA oxidase (ACOX2). Rat ACOX1 is active with CoA esters of straight-chain mono and dicarboxylic fatty acids, prostaglandins, very long-chain fatty acids, and xenobiotics, whereas rat ACOX3 is active with 2-methyl-branched-chain acyl-CoAs, such as pristanoyl-CoA, but also handles long and very-long straight-chain acyl-CoAs [42]. Interestingly, human peroxisomes contain only two oxidases; the first one is palmitoyl-CoA oxidase, the counterpart of rat ACOX1, with similar substrate spectrum and molecular characteristics [43]. The second human peroxisomal oxidase uses branched-chain fatty acids as substrate, like pristanoyl-CoA and the CoA esters of cholesterol metabolites, as well as straight-chain acyl-CoAs, including the CoA esters of very long-chain fatty acids and dicarboxylic acids [43].

The task of the peroxisomal β -oxidation is a shortening of long-chain fatty acids which are poor substrates for the mitochondrial β -oxidation. These shortened acyl-CoAs can be released from the peroxisome in a carnitin-dependant manner or as acyl moiety and imported into the mitochondria where they run through β -oxidation for the generation of ATP.

Oxidative stress a cause for lipotoxicity?

Properties of reactive species

According to a rough estimate 1% of oxygen taken up by mammalian tissues is transformed into reactive oxygen species (ROS). These species can be free radicals, with an unpaired electron, e.g. $O_2^{\bullet-}$ (superoxide radical) and OH^{\bullet} (hydroxyl radical), or non-radicals, e.g. H_2O_2 (hydrogen peroxide). The reactivity of these physiological metabolites is vastly different.

H_2O_2 has a relatively long half-life and is therefore among these species the least reactive one. It can oxidise directly cysteine groups within proteins, although it is a weak oxidising agent, which is unable to oxidise directly DNA or lipids [44,45]. The cellular effect of H_2O_2 depends on the concentration. At lower concentrations of around 10^{-8} M H_2O_2 can induce proliferation; when the concentration rises (10^{-4} M) it causes growth arrest and finally apoptosis [46]. Furthermore, H_2O_2 can be transformed in a metal-catalyzed redox-reaction, known as Fenton reaction, to the highly reactive OH^{\bullet} radical [47]. It reacts instantaneously with molecules in its immediate vicinity, which explains its great destructive power. $O_2^{\bullet-}$ itself is considerably less reactive than OH^{\bullet} , but it is an important reactive oxygen species due to the large amount generated through aerobic metabolism.

Mitochondrial ROS generation

The most important intracellular sites of $O_2^{\bullet-}$ generation are complex I and complex III of the mitochondrial respiratory chain [48,49]. The mechanism of $O_2^{\bullet-}$ production by isolated complex I is reasonably well understood. Within the complex I $O_2^{\bullet-}$ can be produced by an electron transfer from the fully reduced FMN to O_2 . The proportion of the FMN that is fully reduced is determined by the $NADH/NAD^+$ ratio [48,50]. Inhibition of the respiratory chain by damage, mutation, ischaemia, loss of cytochrome c or by the build up of NADH due to low ATP demand and subsequent low rate of respiration will increase the $NADH/NAD^+$ ratio and lead to a higher rate of $O_2^{\bullet-}$ formation [51-53].

The other mechanism by which complex I produces large amounts of $O_2^{\bullet-}$ is during reverse electron transport (RET) [51,53]. This occurs when the protonmotive force (Δp) is high, therefore forcing back electrons from hydroquinone into complex I. The $O_2^{\bullet-}$ production by RET at complex I was confirmed in isolated brain, heart, muscle and liver mitochondria under conditions of high Δp with electron supply to the Q pool from succinate, α -glycerophosphate or fatty acid oxidation [53-55]. The complex I site, which produces $O_2^{\bullet-}$ during RET is unclear [50]. The most simple possibility is that RET forces electrons right back through complex I to the FMN, and that the site of $O_2^{\bullet-}$ production is the same during RET as it is for $O_2^{\bullet-}$ production from the reduced FMN in response to an elevated NADH/NAD⁺ ratio [50,53]. A second site of $O_2^{\bullet-}$ formation could be the ubiquinone (Q) binding site in complex I [56].

Complex III, which funnels electrons from the Q pool to cytochrome c, has for a long time been regarded as a source of $O_2^{\bullet-}$ within mitochondria [48,57]. Although complex III can be induced to produce $O_2^{\bullet-}$ from ubisemiquinone in a reaction with O_2 bound to the Q_o site, its production in mitochondria is far lower and negligible compared with the maximal rates of $O_2^{\bullet-}$ production from complex I. Whereas $O_2^{\bullet-}$ generated at complex I is released to the matrix site, it can be released from complex III to both sides of the inner membrane [51,54].

Apart from the induction of electron flux in the electron transport chain by fatty acid metabolism, there are also direct interactions possible between NEFAs and the respiratory chain proteins resulting in an increased $O_2^{\bullet-}$ production [45]. Especially polyunsaturated NEFAs partially inhibit electron transport within complexes I and III, thus facilitating the "electron leak" and enabling one-electron reduction of O_2 to $O_2^{\bullet-}$. According to a current view, respiratory chain complexes interact with each other, thereby forming a supercomplex known as respirasome [58]. An advantage of respirasome formation can be electron channeling to avoid ROS formation [58]. Keeping this in mind, it might be that NEFAs destabilize the respirasome, thereby facilitating ROS production. It has also been demonstrated that NEFAs

can cause detachment of cardiolipin-bound cytochrome c from the outer side of the inner membrane [45,59], thus further impeding electron transport along the respiratory chain and increasing the reduction state of upstream electron carriers, which has been shown to dramatically increase ROS production in rat heart and brain [52].

It has been reported that incorporation of fatty acids into phospholipid model membranes or mitochondrial membranes can alter membrane fluidity [60,61]. Erucic acid for example increases membrane fluidity which is accompanied by an increase of $O_2^{\bullet-}$ production [60]. However, the mechanism by which increased fluidity of the inner membrane lipid core may facilitate the “electron leak” and one-electron reduction of O_2 remains to be elucidated.

In contrast to the NEFA-mediated enhancement of ROS production the protonophoric activity of NEFAs can abolish RET dependent $O_2^{\bullet-}$ generation which has been demonstrated with mitochondria from rat heart and brain [62,63]. This is based on the protonophoric activity (“mild uncoupling”) of NEFAs caused by a cyclic movement of protonated and deprotonated forms of fatty acids across the inner mitochondrial membrane.

Fatty acids as activators of plasma membrane NADPH oxidase

Phagocytic cells of the immune system, such as macrophages, contain a membrane associated enzyme complex, termed NADPH oxidase. This is another source of $O_2^{\bullet-}$ generation. These cells produce $O_2^{\bullet-}$ in order to damage and kill pathogenic organisms. Besides the immune system, NADPH oxidase (isoforms 1-3) is expressed also in various other tissues including pancreatic islets [64]. This enzyme consists of six hetero-subunits, which associate in a stimulus-dependent manner to catalyse the one electron reduction of O_2 to generate $O_2^{\bullet-}$ utilising NADPH as electron donor. Since β -cells have a relatively low pentose phosphate pathway activity NADPH could be generated by malic enzyme catalysed conversion of malate to pyruvate [65]. The two subunits gp91^{phox} and p22^{phox} of NADPH oxidase are integral membrane proteins, which form together with the flavocytochrome b₅₅₈ the catalytic core. The additional subunits, namely p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox}, and the small GTPase Rac, are

required for the regulation and are located in the cytosol during the resting state [66]. Enzyme activation is initiated by p47^{phox} phosphorylation through various protein kinases, e.g. PKC, promoting the subsequent translocation of the cytosolic subunits to the membrane [66,67]. It has been reported that nutrients, such as high levels of glucose and palmitic acid, stimulated aortic smooth and endothelial cell phagocyte-like NADPH oxidase via PKC-dependent activation [67]. Recently, an increased production of the NADPH oxidase components gp91^{phox} and p22^{phox} was demonstrated in β -cells from animal models of type 2 diabetes [68]. p47^{phox} expression was also found in a clonal rat pancreatic β -cell line, BRIN BD11 [65]. In this cell line the protein production of p47^{phox} was elevated after 24 h treatment with palmitic acid, whereas the polyunsaturated NEFA arachidonic acid did not increase p47^{phox} protein production [65]. The increased production and activity of NADPH oxidase by palmitic acid may result in excessive O₂^{•-} production [66]. The precise mechanisms for participation of PKC in the activation of NADPH oxidase and the physiological role of this enzyme in pancreatic β -cells still remain to be fully elucidated.

Peroxisomally generated hydrogen peroxide as mediator of lipotoxicity

NEFA toxicity is strongly structure-dependent, thus only long-chain and very long-chain (>C13) saturated NEFAs exhibit a strong cytotoxic effect upon insulin-producing cells. Experimental evidence revealed that elevated production of reactive oxygen species could mediate NEFA-induced toxicity. When NEFAs enter the cell, they can be metabolised by β -oxidation in two different subcellular compartments as described in detail above. In the mitochondria the break-down of NEFAs is paralleled by an elevated O₂^{•-} formation as a by-product in the respiratory chain. For mitochondrial β -oxidation short-chain NEFAs as well as medium- to long-chain NEFAs serve as substrates. This pathway, therefore, cannot explain the strong cytotoxicity especially of long-chain NEFAs. By contrast, the peroxisomal β -oxidation prefers long-chain and very long-chain NEFAs as substrates, which is in accordance

with their toxicity profile. Additional evidence for the involvement of peroxisomes arises from a viability analysis of insulin-producing RINm5F cells in the presence of pristanic acid, which is exclusively metabolised in the peroxisomes. The toxicity of pristanic acid with an EC_{50} value of $120 \pm 27 \mu\text{M}$ is comparable to that of palmitic acid. This observation prompted us to study the role of oxygen free radicals generated by peroxisomal β -oxidation as mediators of lipotoxicity. In the first step of peroxisomal β -oxidation, FAD-containing acyl-CoA oxidase introduces a double bond at the β -position of the fatty-acyl-CoA ester and the hydrogen atoms are transferred to molecular oxygen to yield H_2O_2 [69], as described in detail above. Remarkably, in rat liver for example, around 20% of total oxygen consumption is accounted for peroxisomal oxidase activity [70], producing 35% of total cellular H_2O_2 [71]. This organelle is therefore one of the main sites in the cell where ROS are both generated and scavenged. Peroxisomes are single-membrane-bound, highly dynamic organelles present in virtually every eukaryotic cell. Immunofluorescence analysis of hepatoma cells (HepG2) and rat β -cells revealed a comparable abundance of peroxisomes in the range of 130 peroxisomes per cell (Elsner *et al.* in prep.). The biogenesis of peroxisomes involves either fission of pre-existing organelles or budding from the endoplasmic reticulum [69]. The peroxisomes contain the enzymes for fatty acid α -oxidation, β -oxidation of long-chain NEFAs, purine catabolism, and biosynthesis of glycerolipids and bile acids [40]. The oxidation of these various substrates is performed by O_2 -consuming oxidases that produce H_2O_2 as a by-product. For the detoxification of H_2O_2 , the oxidoreductase catalase, which has a high turnover rate, is expressed in the peroxisomes of most tissues but not in those of pancreatic β -cells (Fig. 5) [72,73].

To elucidate the role of different reactive oxygen species and their intracellular site of formation, we used RINm5F insulin-producing cells overexpressing various antioxidative enzymes. The H_2O_2 detoxifying enzyme catalase was either overexpressed in the peroxisomes/cytosol or by fusing to the mitochondrial targeting sequence in the mitochondria.

The formation of superoxide radicals was analysed by overexpressing the cytosolic copper zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) or the mitochondrial isoform manganese superoxide dismutase (MnSOD). These enzymes catalyse the conversion of $O_2^{\bullet -}$ into O_2 and H_2O_2 . The latter is degraded by catalase. Experiments with those cells showed that only peroxisomal/cytosolic catalase provided protection against palmitic acid-induced toxicity; mitochondrial catalase was not protective in the MTT viability assay. The SOD isoenzymes MnSOD and CuZnSOD mediated no protection against palmitic acid-induced toxicity, indicating that the formation of superoxide radicals does not play such a crucial a role in lipotoxicity as does the formation of H_2O_2 (Elsner *et al.* in prep). This is supported also by the observation that a combined overexpression of SOD and catalase provided no further protection (unpublished observation). Using the H_2O_2 -sensitive fluorescence protein HyPer as a novel, specific method for detecting H_2O_2 , we clearly identified H_2O_2 as the main reactive oxygen species formed during palmitic acid treatment. To determine the subcellular site of H_2O_2 formation, the HyPer protein was fused to a peroxisome- or a mitochondrion-targeting sequence to allow organelle-specific expression. These experiments showed that peroxisomes were indeed the major site of H_2O_2 formation in insulin-producing cells, whereas the mitochondria were a site of minor contribution (Elsner *et al.* in prep). The detected H_2O_2 formation due to palmitic acid exposure provides experimental evidence that H_2O_2 generated in the first step of peroxisomal β -oxidation is of particular importance in long-chain NEFA mediated toxicity (Fig. 3).

We thus suggest that mitochondrial β -oxidation may not be able to cope with the elevated levels of long-chain NEFAs, such as palmitic acid, that are associated with obesity and type 2 diabetes. This overload results in a larger proportion of fatty acids being metabolised through peroxisomal β -oxidation, thereby leading to an increased formation of toxic H_2O_2 .

Conclusion

While the G-protein coupled receptor GPR40 plays a decisive role in the potentiation of glucose-induced insulin secretion by saturated and unsaturated long-chain NEFAs, GPRs do not mediate lipotoxicity to insulin-secreting cells. Lipotoxicity is ROS mediated. The responsible reactive species is not the $O_2^{\bullet-}$ radical but rather H_2O_2 . Subcellular compartmentation of ROS generation is of crucial importance for lipotoxicity to pancreatic β -cells in diabetes. Even though the ultimate reactive species responsible for β -cell death is likely to be always the highly toxic OH^{\bullet} radical, the initial reactive species responsible for lipotoxicity in type 2 diabetes is H_2O_2 generated in peroxisomal β -oxidation. This is at variance from cytokine-mediated β -cell death in type 1 diabetes where H_2O_2 is formed from the $O_2^{\bullet-}$ radical generated in mitochondrial metabolism that, in conjunction with an interaction with NO^{\bullet} , is responsible for the cytotoxicity [44]. $O_2^{\bullet-}$ radicals generated in mitochondrial metabolism or by NADPH oxidase at the plasma membrane are unlikely to be involved in lipotoxicity. Thus, while peroxisomal stress prevails in lipotoxicity, it is mitochondrial stress in cytokine-mediated toxicity. Both forms of oxidative stress go along with an increased pressure upon protein synthesis and folding, causing an unfolded protein response (UPR) in the pancreatic β -cells [74], which explains ER stress both in lipotoxicity and cytokine-mediated toxicity [75,76]. Mitochondrial and peroxisomal stress as the underlying causes, both characterized by an increased generation of toxic ROS, are responsible in type 1 and type 2 diabetes for β -cell dysfunction and ultimately death of the pancreatic β -cell, which is particularly vulnerable [44] due to its low antioxidative defense status [72,73].

Acknowledgement

The authors' work was supported by grants from the European Union (Integrated Project EuroDia LSHM-CT-2006-518153 and STREP SaveBeta LSHM-CT-2006-036903 in the Framework Program 6 [FP6] of the European Community).

References

1. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; **21**: 1414-1431.
2. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997; **46**: 3-10.
3. DeFronzo RA. Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 1988; **37**: 667-687.
4. Carpentier A, Mittelman SD, Lamarche B, Bergman RN, Giacca A, Lewis GF. Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation. *Am J Physiol* 1999; **276**: E1055-1066.
5. Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, *et al.* A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; **52**: 2461-2474.
6. Paolisso G, Gambardella A, Amato L, *et al.* Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects. *Diabetologia* 1995; **38**: 1295-1299.
7. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; **52**: 102-110.
8. Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM, Sempoux C, Henquin JC. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2008; **10 Suppl 4**: 32-42.
9. Gordon ES. Non-esterified fatty acids in the blood of obese and lean subjects. *Am J Clin Nutr* 1960; **8**: 740-747.
10. Poitout V, Robertson RP. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 2002; **143**: 339-342.
11. Zhou YP, Grill VE. Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J Clin Invest* 1994; **93**: 870-876.
12. Dhayal S, Welters HJ, Morgan NG. Structural requirements for the cytoprotective actions of mono-unsaturated fatty acids in the pancreatic beta-cell line, BRIN-BD11. *Br J Pharmacol* 2008; **153**: 1718-1727.
13. Brown AJ, Jupe S, Briscoe CP. A family of fatty acid binding receptors. *DNA Cell Biol* 2005; **24**: 54-61.
14. Fredriksson R, Hoglund PJ, Gloriam DE, Lagerstrom MC, Schiöth HB. Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Lett* 2003; **554**: 381-388.
15. Kebede MA, Alquier T, Latour MG, Poitout V. Lipid receptors and islet function: therapeutic implications? *Diabetes Obes Metab* 2009; **11 Suppl 4**: 10-20.
16. Soga T, Ohishi T, Matsui T, *et al.* Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **326**: 744-751.
17. Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, *et al.* Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab* 2006; **3**: 167-175.
18. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, *et al.* Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* 2005; **11**: 90-94.
19. Katsuma S, Hatae N, Yano T, *et al.* Free fatty acids inhibit serum deprivation-induced apoptosis through GPR120 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *J Biol Chem* 2005; **280**: 19507-19515.
20. Hong YH, Nishimura Y, Hishikawa D, *et al.* Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology* 2005; **146**: 5092-5099.

21. Xiong Y, Miyamoto N, Shibata K, *et al.* Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 1045-1050.
22. Welters HJ, Tadayyon M, Scarpello JH, Smith SA, Morgan NG. Mono-unsaturated fatty acids protect against beta-cell apoptosis induced by saturated fatty acids, serum withdrawal or cytokine exposure. *FEBS Lett* 2004; **560**: 103-108.
23. Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, *et al.* The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem* 2003; **278**: 11303-11311.
24. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, *et al.* Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 2003; **422**: 173-176.
25. Schnell S, Schaefer M, Schofl C. Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from beta-cells through activation of GPR40. *Mol Cell Endocrinol* 2007; **263**: 173-180.
26. Shapiro H, Shachar S, Sekler I, Hershfinkel M, Walker MD. Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **335**: 97-104.
27. Miura Y, Henquin JC, Gilon P. Emptying of intracellular Ca²⁺ stores stimulates Ca²⁺ entry in mouse pancreatic beta-cells by both direct and indirect mechanisms. *J Physiol* 1997; **503 (Pt 2)**: 387-398.
28. Warnotte C, Nenquin M, Henquin JC. Unbound rather than total concentration and saturation rather than unsaturation determine the potency of fatty acids on insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 1999; **153**: 147-153.
29. Latour MG, Alquier T, Oseid E, *et al.* GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes* 2007; **56**: 1087-1094.
30. Corkey BE, Deeney JT, Yaney GC, Tornheim K, Prentki M. The role of long-chain fatty acyl-CoA esters in beta-cell signal transduction. *J Nutr* 2000; **130**: 299S-304S.
31. Dobbins RL, Chester MW, Daniels MB, McGarry JD, Stein DT. Circulating fatty acids are essential for efficient glucose-stimulated insulin secretion after prolonged fasting in humans. *Diabetes* 1998; **47**: 1613-1618.
32. Henquin JC. ATP-sensitive K⁺ channels may control glucose-induced electrical activity in pancreatic B-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **156**: 769-775.
33. Henquin JC, Ravier MA, Nenquin M, Jonas JC, Gilon P. Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. *Eur J Clin Invest* 2003; **33**: 742-750.
34. Panten U, Rustenbeck I. Fuel-induced amplification of insulin secretion in mouse pancreatic islets exposed to a high sulfonylurea concentration: role of the NADPH/NADP⁺ ratio. *Diabetologia* 2008; **51**: 101-109.
35. Panten U, Schwanstecher M, Wallasch A, Lenzen S. Glucose both inhibits and stimulates insulin secretion from isolated pancreatic islets exposed to maximally effective concentrations of sulfonylureas. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1988; **338**: 459-462.
36. Steneberg P, Rubins N, Bartoov-Shifman R, Walker MD, Edlund H. The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab* 2005; **1**: 245-258.
37. Newsholme P, Keane D, Welters HJ, Morgan NG. Life and death decisions of the pancreatic beta-cell: the role of fatty acids. *Clin Sci (Lond)* 2007; **112**: 27-42.
38. Tan CP, Feng Y, Zhou YP, *et al.* Selective small-molecule agonists of G protein-coupled receptor 40 promote glucose-dependent insulin secretion and reduce blood glucose in mice. *Diabetes* 2008; **57**: 2211-2219.
39. Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem J* 1996; **320**: 345-357.

40. Wanders RJ, Waterham HR. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* 2006; **75**: 295-332.
41. Kunau WH, Dommes V, Schulz H. beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res* 1995; **34**: 267-342.
42. Van Veldhoven PP, Vanhove G, Asselberghs S, Eyssen HJ, Mannaerts GP. Substrate specificities of rat liver peroxisomal acyl-CoA oxidases: palmitoyl-CoA oxidase (inducible acyl-CoA oxidase), pristanoyl-CoA oxidase (non-inducible acyl-CoA oxidase), and trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase. *J Biol Chem* 1992; **267**: 20065-20074.
43. Vanhove GF, Van Veldhoven PP, Fransen M, *et al.* The CoA esters of 2-methyl-branched chain fatty acids and of the bile acid intermediates di- and trihydroxycoprostanic acids are oxidized by one single peroxisomal branched chain acyl-CoA oxidase in human liver and kidney. *J Biol Chem* 1993; **268**: 10335-10344.
44. Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans* 2008; **36**: 343-347.
45. Schönfeld P, Wojtczak L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2008; **45**: 231-241.
46. Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 722-728.
47. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fourth Edition edn: Oxford University Press, 2007.
48. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009; **417**: 1-13.
49. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; **552**: 335-344.
50. Hirst J, King MS, Pryde KR. The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochem Soc Trans* 2008; **36**: 976-980.
51. Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 2004; **279**: 4127-4135.
52. Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J* 2002; **368**: 545-553.
53. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 2002; **80**: 780-787.
54. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002; **277**: 44784-44790.
55. Votyakova TV, Reynolds IJ. DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* 2001; **79**: 266-277.
56. Lambert AJ, Brand MD. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* 2004; **279**: 39414-39420.
57. Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1985; **237**: 408-414.
58. Schagger H. Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* 2001; **52**: 119-128.
59. Di Paola M, Cocco T, Lorusso M. Arachidonic acid causes cytochrome c release from heart mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **277**: 128-133.

60. Gille L, Nohl H. The ubiquinol/bc1 redox couple regulates mitochondrial oxygen radical formation. *Arch Biochem Biophys* 2001; **388**: 34-38.
61. Stillwell W, Jenski LJ, Crump FT, Ehringer W. Effect of docosahexaenoic acid on mouse mitochondrial membrane properties. *Lipids* 1997; **32**: 497-506.
62. Korshunov SS, Korkina OV, Ruuge EK, Skulachev VP, Starkov AA. Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O_2^- and H_2O_2 by mitochondria in the resting state. *FEBS Lett* 1998; **435**: 215-218.
63. Schönfeld P, Wojtczak L. Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1767**: 1032-1040.
64. Oliveira HR, Verlengia R, Carvalho CR, Britto LR, Curi R, Carpinelli AR. Pancreatic beta-cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase. *Diabetes* 2003; **52**: 1457-1463.
65. Morgan D, Oliveira-Emilio HR, Keane D, *et al.* Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. *Diabetologia* 2007; **50**: 359-369.
66. Newsholme P, Morgan D, Rebelato E, *et al.* Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell. *Diabetologia* 2009; **52**: 2489-2498.
67. Inoguchi T, Li P, Umeda F, *et al.* High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000; **49**: 1939-1945.
68. Nakayama M, Inoguchi T, Sonta T, *et al.* Increased expression of NAD(P)H oxidase in islets of animal models of type 2 diabetes and its improvement by an AT1 receptor antagonist. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **332**: 927-933.
69. Dansen TB, Wirtz KW. The peroxisome in oxidative stress. *IUBMB Life* 2001; **51**: 223-230.
70. Reddy JK, Mannaerts GP. Peroxisomal lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 1994; **14**: 343-370.
71. Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1972; **128**: 617-630.
72. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 1997; **46**: 1733-1742.
73. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 1996; **20**: 463-466.
74. Eizirik DL, Cnop M. ER stress in pancreatic beta cells: the thin red line between adaptation and failure. *Sci Signal*; **3**: pe7.
75. Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev* 2008; **29**: 42-61.
76. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 519-529.

Figures

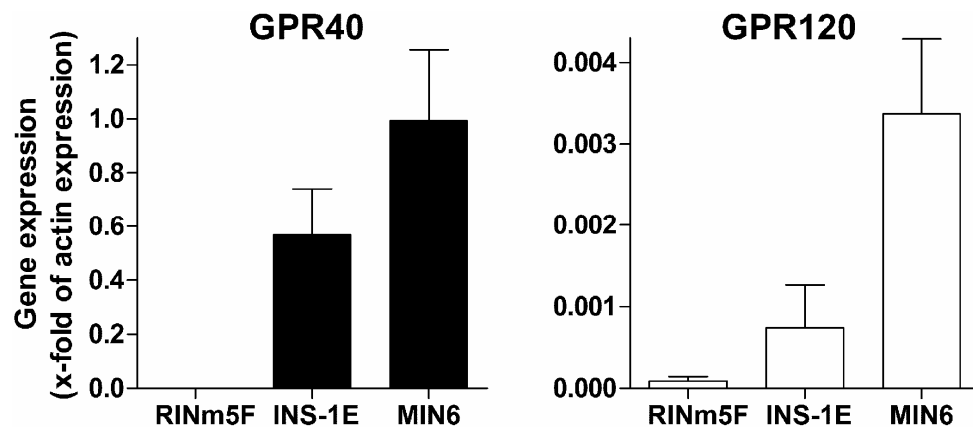


Fig. 1 Gene expression analyses of GPR40 and GPR120 in different insulin-producing cell lines

mRNA expression of GPR40 (black bars) and GPR120 (open bars) in RINm5F, INS-1E, and MIN6 cells was quantified by qPCR. Expression levels were normalized to the expression of the reference gene actin. Results are means \pm SEM from 3-5 individual experiments.

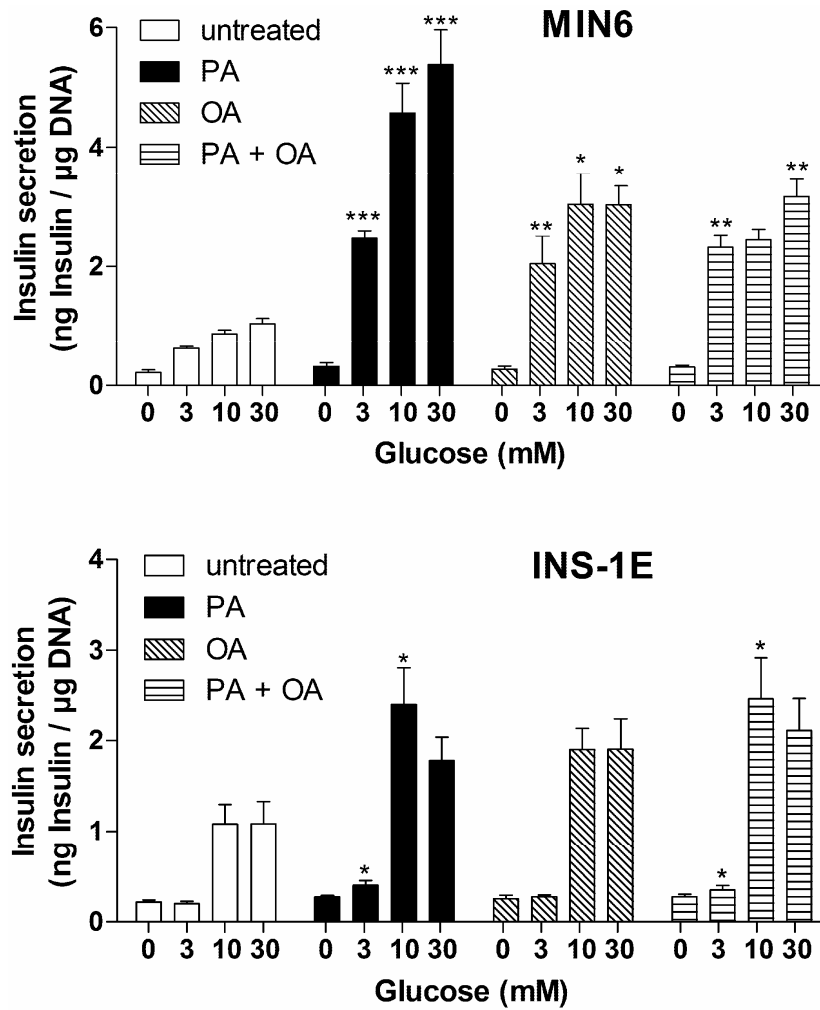


Fig. 2 NEFA-mediated enhancement of glucose-induced insulin secretion

Insulin secretion from MIN6 and INS-1E cells in the presence of different glucose concentrations after a 2 h incubation with 150 μ M of palmitic acid (PA), oleic acid (OA) or a mixture of both (150 μ M PA + 150 μ M OA). Results are means \pm SEM from 4-6 individual experiments; * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 compared with untreated cells (*ANOVA/Dunnett's-test*).

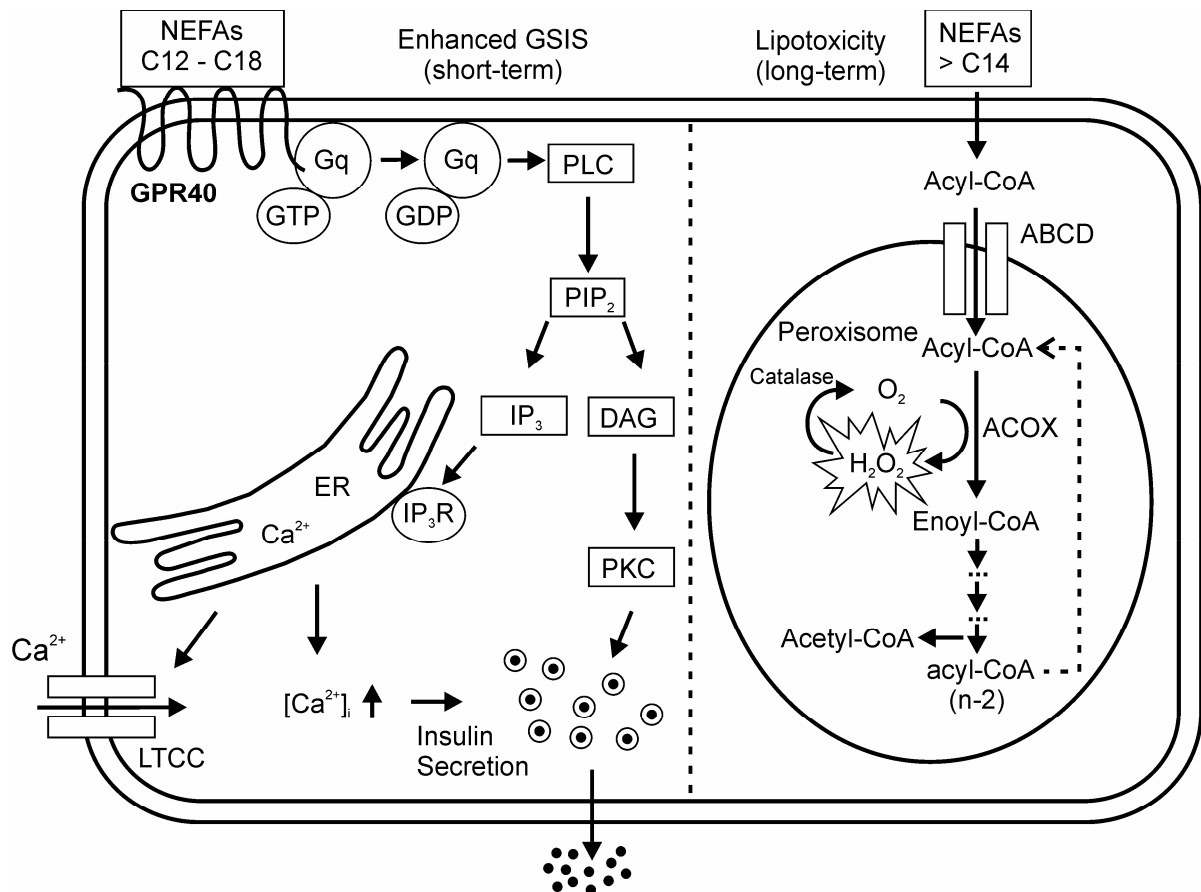


Fig. 3 The short-term effects of NEFAs in comparison with the long-term effects in the pancreatic β -cell

NEFAs exert two different effects on β -cells: the short-term effect is an enhancement of glucose-induced insulin secretion via GPR40 and the long-term effect is the induction of lipotoxicity via an enhancement of peroxisomal metabolism yielding high levels of H₂O₂ ultimately leading to apoptosis.

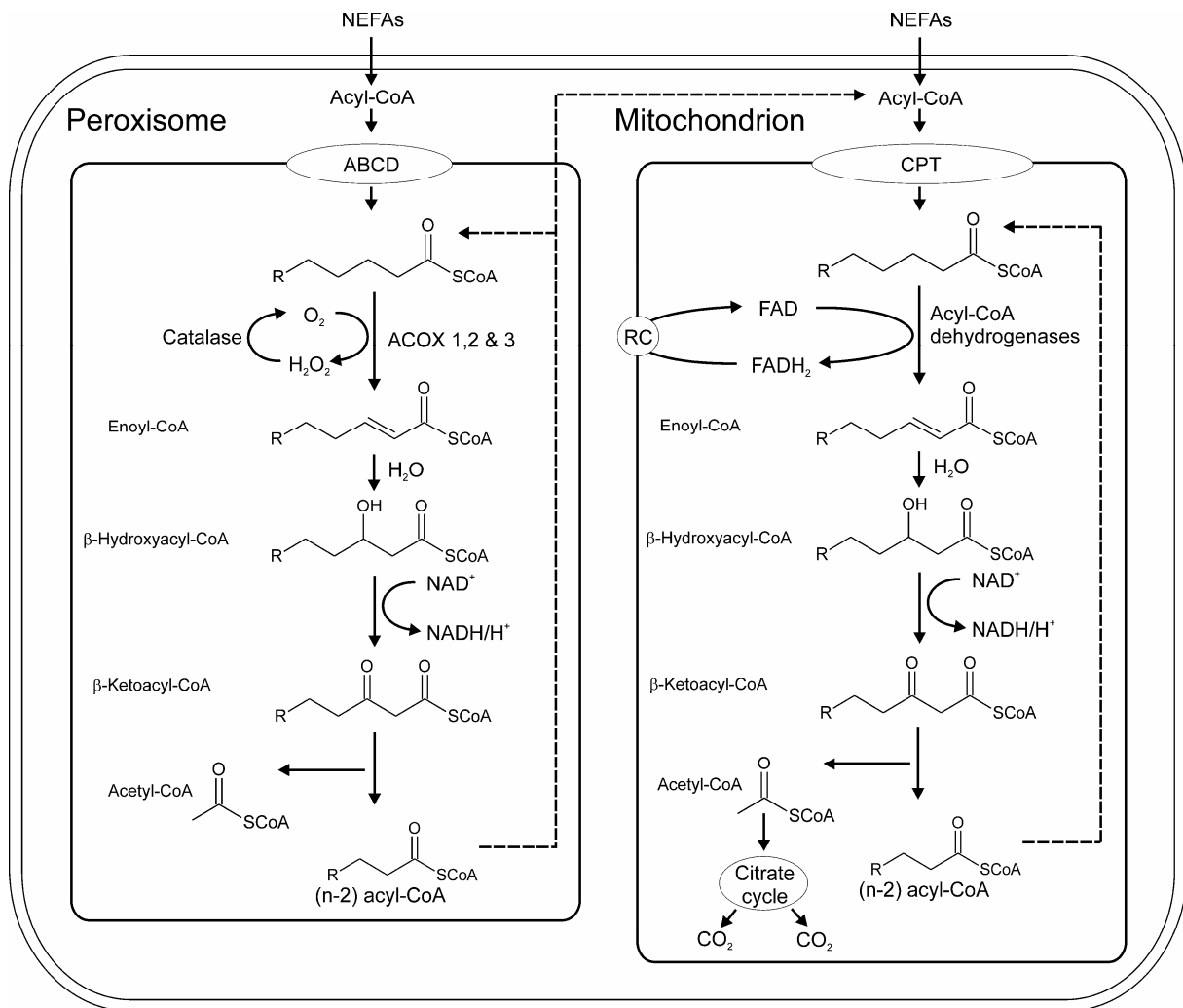


Fig. 4 The peroxisomal β -oxidation in comparison to the mitochondrial β -oxidation

NEFAs are transported into the peroxisome via the ABC-transporters (ABCD), by contrast, they enter the mitochondria in a carnitine-dependent fashion catalyzed by carnitine-palmitoyl-transferase (CPT). The electrons in the first reaction of peroxisomal β -oxidation are transferred by acyl-CoA-oxidases (ACOX) to molecular oxygen, whereas in the mitochondria the acyl-CoA-dehydrogenase reduce FAD to $FADH_2$, which is regenerated in the respiratory chain (RC). The subsequent reactions are similar in both compartments; they are catalyzed by different enzymes with distinct substrate specificities.

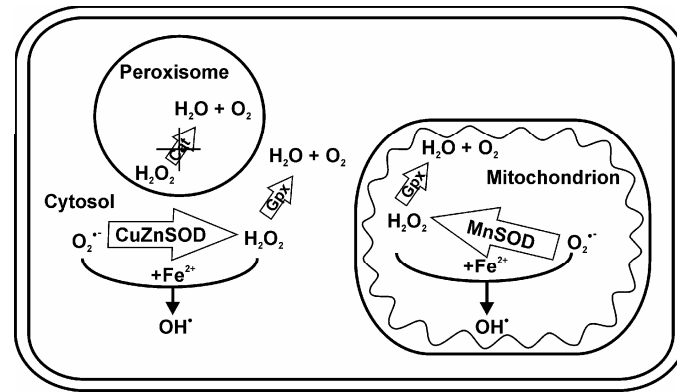


Fig. 5 Antioxidant defence against ROS in the cytosol, mitochondria and peroxisomes of the pancreatic β -cell: imbalance between inactivation of $\text{O}_2^{\bullet-}$ and Hydrogen peroxide (H_2O_2)

H_2O_2 is mainly formed in the peroxisomes as a by-product of the β -oxidation and in the mitochondria or the cytosol as a product of the dismutation of the superoxide radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$) via manganese superoxide dismutase (MnSOD) or copper zinc superoxide dismutase (CuZnSOD), respectively. The detoxification of H_2O_2 is mediated either through glutathione peroxidase (Gpx) in the cytosol and in the mitochondria or through catalase (Cat) in the peroxisomes. If H_2O_2 is not quickly converted into water and oxygen it can react in an iron catalyzed reaction with the superoxide radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$) yielding the highly reactive hydroxyl radical (OH^\bullet). The size of the arrows indicates the expression level of the antioxidant enzymes in the pancreatic β -cell and the cross symbolises the lack of catalase expression in pancreatic β -cells.

3 Diskussion

Der Typ 2 Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, die sowohl durch eine Insulinresistenz der Zielorgane als auch durch eine Sekretionsstörung der insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas charakterisiert ist und zur Hyperglykämie führt. Die weltweit deutliche Zunahme der Patientenzahl mit Typ 2 Diabetes mellitus stellt eine Herausforderung für die Medizin und Forschung dar (King *et al.* 1998; Zimmet *et al.* 2001). Das metabolische Syndrom und Adipositas sind die wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes (Burke *et al.* 1999; Hull *et al.* 2005) und werden normalerweise von erhöhten FFA-Konzentrationen im Serum begleitet (Gordon 1960). Diesen erhöhten FFA-Konzentrationen wird eine toxische Wirkung zugesprochen, die ursächlich für den Verlust der β -Zell-Masse im Krankheitsverlauf ist (Poitout & Robertson 2002). Die molekularen Mechanismen dieser Lipotoxizität sind trotz intensiver Forschung noch weitestgehend unklar. Es gibt experimentelle Hinweise, die auf eine Aktivierung der ER-Stress-Sensoren hindeuten, wobei der initiale Auslöser noch unbekannt ist. Des Weiteren wird eine Beteiligung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren diskutiert. Auch die Induktion von oxidativem Stress wird als möglicher molekularer Mechanismus diskutiert. Für die Prävention und neue therapeutische Ansätze zur Behandlung des Typ 2 Diabetes ist eine Aufklärung der molekularen Pathomechanismen unabdingbar.

3.1 Strukturabhängige Toxizität freier Fettsäuren

Fettsäuren weisen abhängig von ihrer Struktur, wie der Kettenlänge oder dem Sättigungsgrad, ganz unterschiedliche Effekte auf insulinproduzierende Zellen auf. Diese Struktur-Wirkungs-Beziehung wurde zunächst systematisch untersucht. Dafür wurde die Zellvitalität von RINm5F-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit verschiedenen FFAs mittels MTT-Assay oder durch Färbung mit Propidiumiodid bestimmt. Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass langkettige gesättigte FFAs einen stark zytotoxischen Effekt aufweisen, der mit einer Verkürzung der Kettenlänge abnimmt. Mit einem EC_{50} -Wert um die 100 μ M ist die physiologisch bedeutendste gesättigte Fettsäure, Palmitinsäure (C16:0), sehr toxisch für insulinproduzierende Zellen. Wohingegen FFAs mit einer Kettenlänge von C13 (Tridecanonsäure) oder kürzer einen EC_{50} -Wert von über 500 μ M haben und somit keine signifikante Toxizität aufweisen. Der toxische Effekt von Palmitinsäure konnte auch in primären Ratten-Inseldellen gezeigt werden, deren Zellvitalität nach 24stündiger Inkubation signifikant erniedrigt war. Im Gegensatz dazu beeinflussen ungesättigte FFAs unabhängig von ihrer Kettenlänge kaum die Zellvitalität von insulinproduzierenden Zellen. Darüber hinaus sind langkettige ungesättigte FFAs, wie Ölsäure (C18:1) in der Lage, einen protektiven

Effekt gegen die Toxizität von Palmitinsäure zu vermitteln. Dieser Schutz wiederum ist kettenlängenabhängig (Dhayal *et al.* 2008). So sind einfach ungesättigte FFAs mit einer Kettenlänge von C14:1 (Myristoleinsäure) oder C12:1 (Dodecensäure) deutlich weniger protektiv gegenüber einer Palmitinsäure-induzierten Toxizität als FFAs mit einer Kettenlänge von \geq C16:1. Eine Abhängigkeit zu der Anzahl an Doppelbindungen konnte hingegen nicht gefunden werden. So zeigten Ölsäure (C18:1), Linolsäure (C18:2) und γ -Linolensäure (C18:3) eine vergleichbare protektive Kapazität. Diese Ergebnisse ermöglichen eine Einteilung der FFAs in drei unterschiedliche Gruppen (Abb. 5): (a) langkettige gesättigte Fettsäuren, die toxisch sind, (b) langkettige ungesättigte Fettsäuren, die in der Lage sind, diesen toxischen Effekt aufzuheben und (c) kurzkettige gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, die nicht toxisch, aber auch nicht protektiv sind.

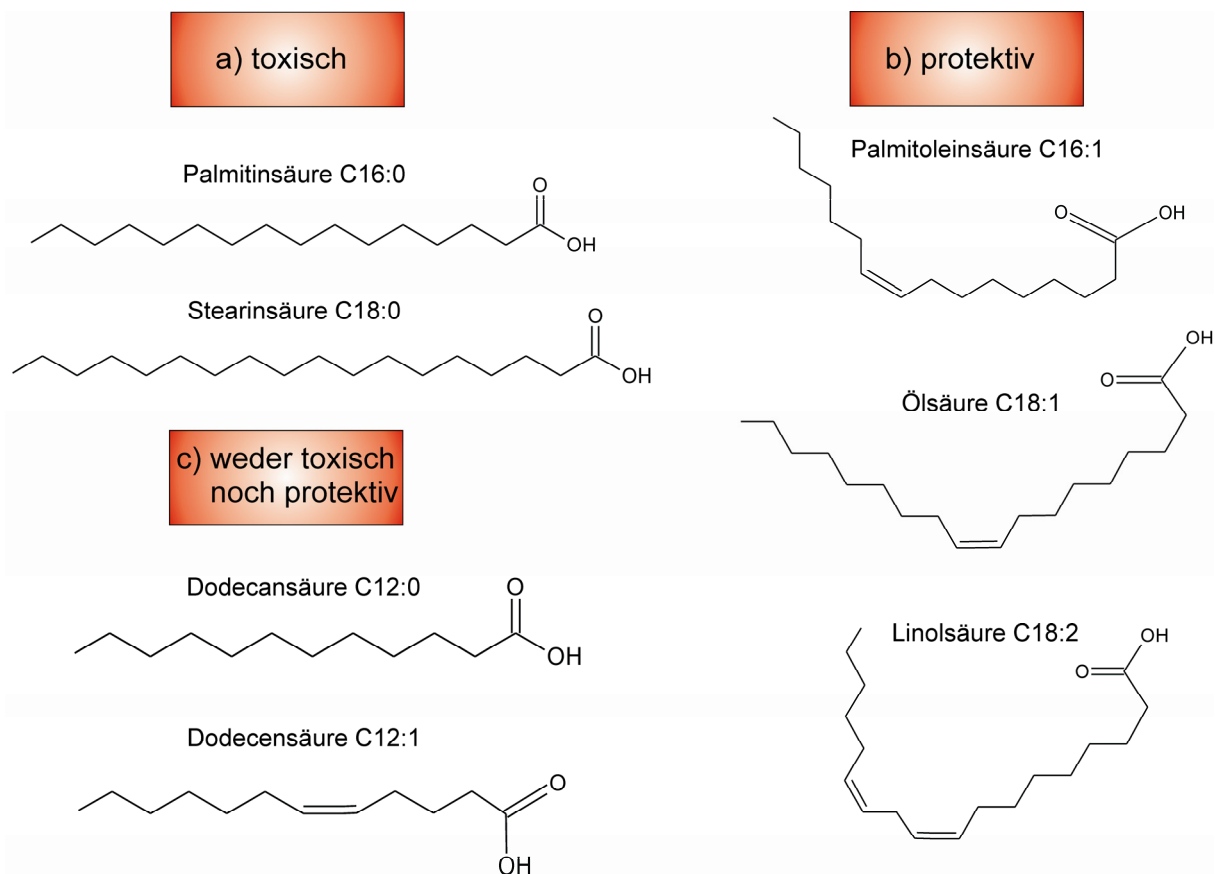


Abb. 5 Strukturformeln einiger analysierter Fettsäuren

Mit Hilfe eines Caspase-3 Assays konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Lipotoxizität um einen apoptotischen Zelltod handelt. Die Aktivierung von Caspase-3 nach Palmitinsäureinkubation konnte durch Ölsäure verhindert werden.

Da gesättigte FFAs toxisch sind, ungesättigte dagegen aber einen protektiven Effekt vermitteln, ist für die Lipotoxizität das Verhältnis von gesättigten FFAs zu ungesättigten

entscheidend. Es gibt Studien, die darauf hinweisen, dass neben einer generell erhöhten Fettsäure-Konzentration im Serum bei Typ 2 Diabetikern auch das Verhältnis von gesättigt zu ungesättigt gestört ist (Laaksonen *et al.* 2002).

Die Experimente zur Analyse des molekularen Mechanismus der Toxizität und des protektiven Effekts wurden hauptsächlich mit Palmitinsäure als toxische Fettsäure und Ölsäure als protektive Fettsäure durchgeführt.

3.2 Die Bedeutung von ER-Stress für die Lipotoxizität

In neueren Studien gibt es Hinweise auf eine lipotoxische β -Zell-Schädigung, die mit der Induktion von ER-Stress einhergeht und schließlich über die Aktivierung von Caspasen zur β -Zell-Apoptose führt. So konnte mittels histologischer (Huang *et al.* 2007; Laybutt *et al.* 2007) und elektronenmikroskopischer (Marchetti *et al.* 2004) Analysen eindeutig ER-Stress in Inseln von Typ 2 Diabetikern nachgewiesen werden. Die Induktion von ER-Stress stellt somit einen möglichen molekularen Mechanismus der Lipotoxizität dar.

Die Translation von Proinsulin findet an Ribosomen der zytosolischen Seite des ERs statt (Dodson & Steiner 1998). Das neu synthetisierte Proinsulin wird im ER unter Ausbildung von zwei Disulfidbrücken in die korrekte dreidimensionale Struktur gefaltet (Dodson & Steiner 1998). Eine erhöhte FFA-Konzentration steigert die Proteinbiosynthese von Insulin und belastet damit auch die Proteinfaltungskapazität im ER. Es wird daher angenommen, dass im ER der β -Zellen durch den chronisch erhöhten Insulinbedarf beim Typ 2 Diabetes fehlgefaltete Proteine akkumulieren (Eizirik & Cnop). So werden schließlich die ER-Stress-Sensoren aktiviert und bei anhaltendem ER-Stress Apoptose induziert. Der Einfluss von FFAs bei diesem Prozess ist unklar. In einigen *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass insbesondere Palmitinsäure zur Aktivierung der UPR führt (Kharroubi *et al.* 2004; Karaskov *et al.* 2006; Diakogiannaki *et al.* 2008). Nach 12stündiger Inkubation mit Palmitinsäure war die Expression der ER-Stress Markergene BiP und CHOP in RINm5F-Zellen signifikant erhöht, wobei eine Induktion des proapoptotischen CHOP zum Zelltod führt. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass XBP-1 durch alternatives *splicing* aktiviert wurde. Die Expression von XBP-1 hingegen war unverändert. Bei einer Inkubation mit Ölsäure war im Gegensatz dazu die Expression ebenso wie das *splicing* der analysierten ER-Stress-Gene unbeeinflusst. Darüber hinaus konnte die Palmitinsäure-vermittelte Aktivierung der ER-Stress-Gene vollständig von Ölsäure verhindert werden. In einer Arbeit von Diakogiannaki *et al.* (2008) konnte gezeigt werden, dass besonders PERK-abhängige Signalwege, inklusive der Phosphorylierung von eIF2 α , durch Palmitinsäure aktiviert werden. Diese FFA vermittelten Effekte belegen eine Induktion von ER-Stress während der Lipotoxizität. In

elektronenmikroskopischen Analysen konnte eine Schädigung des ERs durch Palmitinsäure beobachtet werden. Ölsäure hatte dagegen keinen Einfluss auf die Struktur des ERs. Inwiefern die morphologischen Veränderungen des ERs mit dem ER-Stress zusammenhängen, ist noch unbekannt.

Es gibt experimentelle Hinweise, dass Palmitinsäure, zumindest zum Teil, über eine Depletion des ER- Ca^{2+} -Speichers eine Stress-Antwort auslöst (Kharroubi *et al.* 2004; Cunha *et al.* 2008). Im Gegensatz dazu konnte kürzlich gezeigt werden, dass durch die Überexpression des Chaperons BiP kein protektiver Effekt erzielt werden konnte. Ebenso hatte eine Repression von BiP keine Folgen für die Toxizität von Palmitinsäure (Lai *et al.* 2008). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass ER-Stress wahrscheinlich nicht der Hauptmechanismus der Lipotoxizität ist. Außerdem kann das Modell der ER-Stress-vermittelten Lipotoxizität nicht die Notwendigkeit des Metabolismus von FFAs für deren Toxizität erklären. So sind schwer verstoffwechselbare methylierte Fettsäuren kaum toxisch und führen auch nicht zur Aktivierung der ER-Stress-Sensoren (Newsholme *et al.* 2007; Cunha *et al.* 2008). Die unterschiedlichen Effekte, die kurzkettige und langkettige gesättigte FFAs in Bezug auf die Zellvitalität von insulinproduzierenden Zellen aufweisen, lassen sich auch nicht über eine ER-Stress-vermittelte Lipotoxizität erklären. Um mehr Informationen über die zellulären Kompartimente, die initial bei der Lipotoxizität geschädigt werden, zu erhalten, wurde die Aktivierung der Todes-Rezeptor-spezifischen Caspase-8, der mitochondrialen Caspase-9 und der ER-ständigen Caspase-12 analysiert. Da alle drei Caspasen nach 18 h oder 24 h gleichermaßen durch Palmitinsäure aktiviert wurden, kommt der ER-spezifischen Caspase-12 und somit auch der ER-Stress-Antwort keine besondere Bedeutung bei der Lipotoxizität zu. Die Induktion von ER-Stress ist somit vermutlich nicht der Auslöser der Lipotoxizität, vielmehr wird er wahrscheinlich sekundär durch noch unbekannte FFA-induzierte Faktoren aktiviert.

3.3 Rezeptor-vermittelte Lipotoxizität

Fettsäuren weisen in Abhängigkeit von ihrer Struktur sehr unterschiedliche Effekte in Bezug auf die Vitalität von insulinproduzierenden Zellen auf. Die Induktion von ER-Stress als initiales Ereignis der Toxizität bietet keine Erklärung für diese Divergenz. Die enge Struktur-Wirkungs-Beziehung von FFAs legt die Vermutung einer Rezeptor-vermittelten Signalkaskade nahe. In der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPR) befinden sich einige, die spezifisch von FFAs aktiviert werden, wie GPR40, GPR41, GPR43, GPR119 und GPR120. Bei genauerer Betrachtung der Substratprofile dieser Rezeptoren scheiden einige als Vermittler der Lipotoxizität oder des protektiven Effekts ungesättigter Fettsäuren

aus. So sind GPR41 und GPR43 spezifische Rezeptoren für kurzkettige FFAs mit einer Kettenlänge von C2-C5 (Brown *et al.* 2005). Da sowohl gesättigte als auch ungesättigte kurzkettige FFAs die Vitalität insulinproduzierender Zellen nicht beeinflussen, ist eine Aktivierung dieser Rezeptoren nicht ursächlich für die Lipotoxizität. Ebenso ist die Substratspezifität von GPR119 für Fettsäure-Derivate wie Lysophosphatidylcholin oder Oleoylethanolamid (OEA) (Soga *et al.* 2005; Overton *et al.* 2006) nicht in Übereinstimmung mit dem hier beschriebenen Toxizitätsprofil von FFAs. Eine Beteiligung von GPR119 am lipotoxischen Zelltod kann somit ausgeschlossen werden. Der Rezeptor ist allerdings für die gesteigerte glucoseinduzierte Insulinsekretion nach Behandlung mit Lysophosphatidylcholin in β -Zellen von funktioneller Bedeutung (Soga *et al.* 2005).

Die potentiellen Kandidaten unter den Rezeptoren für die Toxizitätsvermittlung sind GPR40 und GPR120. Beide werden spezifisch von langkettigen gesättigten und ungesättigten FFAs aktiviert. So konnten Meidute Abaraviciene *et al.* (2008) zeigen, dass FFAs über GPR40 die Expression von iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase) steigern und damit zu einer gestörten Insulinsekretion nach einer Langzeit-Inkubation führen. GPR40 wird hauptsächlich im Pankreas exprimiert, während die Expression von GPR120 im Pankreas noch kontrovers diskutiert wird (Kebede *et al.* 2009). Eine Expressionsanalyse beider Rezeptoren zeigte, dass sowohl GPR40 als auch GPR120 in insulinproduzierenden MIN6- und INS-1E-Zellen exprimiert wird. Dabei war das Expressionsniveau von GPR120 niedriger als das von GPR40. Im Gegensatz dazu konnte keiner der beiden Rezeptoren in insulinproduzierenden RINm5F-Zellen detektiert werden. Diese drei β -Zelllinien sind unterschiedlich sensitiv gegenüber der Toxizität von Palmitinsäure. So sind RINm5F-Zellen ca. 10fach sensitiver als MIN6- oder INS-1E-Zellen. Diese inverse Beziehung zwischen der Sensitivität gegenüber Palmitinsäure und der Expression von GPR40 und GPR120 zeigt, dass diese Rezeptoren als Vermittler der Lipotoxizität ausgeschlossen werden können. Trotzdem wurde vermutet, dass diese Rezeptoren für die Protektion durch ungesättigte Fettsäuren von Bedeutung sind. So konnte interessanterweise gezeigt werden, dass Linolsäure über GPR120 einen zytoprotektiven Effekt gegen den Entzug von Serum vermittelt (Katsuma *et al.* 2005). In RINm5F-Zellen ist aber sowohl für Linolsäure als auch für Ölsäure ein protektiver Effekt gegen die Toxizität von Palmitinsäure zu beobachten. GPR120 konnte in diesen Zellen allerdings nicht detektiert werden und kann somit auch nicht verantwortlich für die Protektion sein. Die geringe Expressionsrate in MIN6- und INS-1E-Zellen legt die Vermutung nahe, dass GPR120 auch in diesen Zelllinien keine Bedeutung für die Lipotoxizität oder den schützenden Effekt ungesättigter FFAs hat. Die funktionelle Bedeutung von GPR120 in β -Zellen ist somit noch unklar. In einer enteroendokrinen Maus-Zelllinie konnte nachgewiesen werden, dass GPR120

für die FFA-stimulierte GLP-1 Sekretion verantwortlich ist (Hirasawa *et al.* 2005). FFAs können so mittels GPR120 indirekt über die Freisetzung von GLP-1 die Insulinsekretion beeinflussen.

Der GPR40 ist hauptsächlich für die Verstärkung der glucoseinduzierten Insulinsekretion durch FFAs verantwortlich (Itoh *et al.* 2003; Kebede *et al.* 2009). Um seine Funktionalität in MIN6- und INS-1E-Zellen zu überprüfen, wurde die glucoseinduzierte Insulinsekretion nach kurzzeitiger FFA-Behandlung bestimmt. In beiden Zelllinien waren sowohl Palmitinsäure als auch Ölsäure in der Lage, die Insulinsekretion zu steigern. Beide FFAs zeigten keine signifikanten Unterschiede, wobei Palmitinsäure tendenziell eine höhere verstärkende Wirkung aufwies. Im Gegensatz zur Toxizität war Ölsäure bei der Insulinsekretion nicht in der Lage, die Effekte von Palmitinsäure aufzuheben. Es konnte aber auch keine additive Stimulation der Insulinsekretion nach Inkubation mit beiden FFAs beobachtet werden. In diesem Kontext muss man die insulinsekretionssteigernde Wirkung nach kurzer Inkubationszeit von den zytotoxischen oder zytoprotektiven Langzeiteffekten der FFAs abgrenzen. Es handelt sich dabei um unterschiedliche Phänomene, die durch unterschiedliche Mechanismen hervorgerufen werden. GPR40 hat somit keinen Einfluss auf die Lipotoxizität. Starke Argumente gegen GPR40 als Vermittler der Lipotoxizität lieferten außerdem Studien von Latour *et al.* (2007) und Tan *et al.* (2008) mit GPR40-*knockout*-Mäusen und einem spezifischen GPR40-Agonisten. Dort konnte gezeigt werden, dass eine dreitägige FFA-Exposition sowohl in pankreatischen β -Zellen von GPR40-*knockout*- als auch von Wildtyp-Mäusen zu einem verminderten Insulingehalt und einer Inhibierung der glucoseinduzierten Insulinsekretion führte (Tan *et al.* 2008). Der GPR40-Agonist Cpd-B, der kürzlich entdeckt wurde, war in der Lage, die glucoseinduzierte Insulinsekretion in neonatalen Streptozotizin-induzierten diabetischen Ratten aufrechtzuerhalten. Im Gegensatz zu FFAs führte dieser Agonist aber zu keiner gestörten Insulinsekretion oder Zytotoxizität nach einer Langzeitinkubation (Tan *et al.* 2008). Diese wäre allerdings zu erwarten gewesen, wenn eine verstärkte Aktivierung von GPR40 ursächlich für die Lipotoxizität ist. Auch wenn Studien zeigen, dass GPR40 zum Teil die Protektion durch Ölsäure vermittelt (Zhang *et al.* 2007), ist dies eher unwahrscheinlich, da auch in RINm5F-Zellen ungesättigte FFAs gegen die Toxizität gesättigter FFAs schützen, der Rezeptor aber nicht zu detektieren ist.

Aus den bisherigen Studien lässt sich schlussfolgern, dass die FFA-induzierte GPR40-vermittelte Steigerung der Insulinsekretion zur Kompensation der β -Zelle bei der Insulinresistenz beiträgt (Kebede *et al.* 2009), wohingegen die Lipotoxizität nicht über GPR40 vermittelt wird.

3.4 Spezifische Detektion von H_2O_2 in Peroxisomen

H_2O_2 ist für viele biologische Prozesse in den meisten, wenn nicht gar allen Organismen, von relativ einfachen Bakterien bis hin zu komplexen vielzelligen Pflanzen und Tieren von Bedeutung (Scandalios 2005). Das Fehlen spezifischer Messmethoden stellt bei der Analyse von H_2O_2 ein großes Problem dar. Die Messung der Oxidation des Fluoreszenzfarbstoffs Dichlorofluorescein (DCF) ist zwar sensitiv und wird häufig genutzt, stellt aber keine spezifische Methode zur Bestimmung einzelner reaktiver Sauerstoffspezies dar (Tarpey *et al.* 2004; Wardman 2007). Um diesen Nachteil zu überwinden, wurde das H_2O_2 -spezifische Fluoreszenz-Sensorprotein HyPer von Belousov *et al.* entwickelt. Mit Hilfe dieses Proteins können micromolare H_2O_2 -Konzentrationen spezifisch durch eine ratiometrische Messung der Fluoreszenzen bei 420/520 nm und 500/520 nm detektiert werden (Belousov *et al.* 2006). Ein weiterer wesentlicher Vorteil des HyPer-Proteins ist die Möglichkeit der Detektion in definierten subzellulären Kompartimenten. Neben den Mitochondrien sind die Peroxisomen das wichtigste intrazelluläre Organell, in dem H_2O_2 gebildet und abgebaut wird. Peroxisomen sind hochdynamische Organellen, die von einer einfachen Membran umschlossen sind und in nahezu jeder eukaryotischen Zelle, so auch in β -Zellen, vorkommen. Die Biogenese von Peroxisomen umfasst entweder die Teilung bereits vorhandener Organellen oder eine Abschnürung vom ER (Dansen & Wirtz 2001). Zu den zellulären Aufgaben von Peroxisomen zählen z.B. die Detoxifizierung von ROS und der Metabolismus verschiedener Substrate (Wanders & Waterham 2006). Für diese Funktion enthalten Peroxisomen verschiedenste Oxidasen, wie z.B. die Acyl-CoA-Oxidasen für den Abbau von FFAs, Polyaminoxidase für den Metabolismus von N-acetyl-spermin bzw. -spermidin oder auch die Uratoxidase für die Oxidation von Urat (Schrader & Fahimi 2006). Diese Oxidasen übertragen den Wasserstoff ihrer jeweiligen Substrate auf O_2 , wobei H_2O_2 entsteht (Angermüller *et al.* 2009). Bemerkenswerterweise werden in Peroxisomen der Rattenleber 20% des gesamten Sauerstoffverbrauchs für die Aktivität der verschiedenen Oxidasen genutzt (Reddy & Mannaerts 1994), wobei 35% des gesamten zellulären H_2O_2 entsteht (Boveris *et al.* 1972). Im Gegensatz dazu übertragen mitochondriale Oxidasen den Wasserstoff zumeist auf NAD^+ oder FAD. Um eine oxidative Schädigung durch H_2O_2 zu vermeiden, enthalten Peroxisomen Katalase, das auch als Marker-Enzym für dieses Organell gilt (Dansen & Wirtz 2001). Die β -Zelle nimmt hier durch ihr niedriges Expressionsniveau der Katalase eine Sonderstellung ein (Lenzen *et al.* 1996; Tiedge *et al.* 1997).

Mit Hilfe der *peroxisomal targeting sequence* (PTS) wurde das HyPer-Protein in der vorliegenden Arbeit spezifisch in den Peroxisomen überexprimiert (HyPer-Peroxi), was mittels Immunfluoreszenz gezeigt werden konnte. Eine fluoreszenzmikroskopische und eine

durchflusszytometrische Messung der Fluoreszenzratio nach H_2O_2 -Exposition belegten die Funktionalität dieses Proteins in den Peroxisomen. Die Sensitivität von HyPer-Peroxi ist vergleichbar mit der des zytosolischen HyPer-Proteins. Die Spezifität für H_2O_2 wiederum konnte durch die zusätzliche Überexpression von Katalase und einer damit verbundenen Reduktion der Fluoreszenzratio gezeigt werden.

Das vorgestellte peroxisomale HyPer-Protein bietet somit die Möglichkeit einer sensitiven und spezifischen Detektion von H_2O_2 in den Peroxisomen. Die Expression von HyPer-Proteinen in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten erlaubt eine differenzierte Betrachtung der H_2O_2 -Bildung in diesen Organellen und kann Hinweise auf die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen geben.

3.5 Oxidativer Stress als Ursache der Lipotoxizität

Oxidativer Stress beschreibt das Ungleichgewicht zwischen der ROS-Bildung und dem Abbau durch antioxidative Enzyme. Wobei hohe Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies in den verschiedensten Zelltypen Apoptose induzieren können (Lenzen 2008; Circu & Aw). Bei vielen Krankheiten ist oxidativer Stress von großer Bedeutung, dazu zählen Krebs, Diabetes, Arteriosklerose oder neurodegenerative Krankheiten, wie z.B. Alzheimer oder Parkinson (Droge 2002). Für den lipotoxischen Zelltod beim Typ 2 Diabetes konnten eine Induktion von ER-Stress oder eine rezeptorvermittelte Signalkaskade als initiale Mechanismen bereits ausgeschlossen werden. Ein weiterer molekularer Mechanismus, für den es experimentelle Hinweise gibt, ist die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Fettsäuren (Carlsson *et al.* 1999; Evans *et al.* 2003). Das Mitochondrium ist die quantitativ bedeutendste physiologische Quelle von $\text{O}_2^{\cdot-}$ in höheren Organismen (Chance *et al.* 1979). Wenn der Protonengradient an der inneren mitochondrialen Membran hoch ist, wird O_2 am Komplex I oder III der Elektronentransportkette in verstärktem Maße zu $\text{O}_2^{\cdot-}$ reduziert. Ein hoher Protonengradient ist das Resultat eines gesteigerten Elektroneneinstroms in die Elektronentransportkette und eines niedrigen Verbrauchs von Elektronen. Gleichzeitig werden auch nur wenig Protonen zur ATP-Produktion genutzt, da die ATP-Konzentration hoch ist und nicht ausreichend ADP zur Verfügung steht (Droge 2002). Normalerweise wird in diesem Fall der glykolytische Flux inhibiert, bei einem Überangebot an Nährstoffen, wie Glucose oder FFAs, kann das System überladen werden und so die ROS-Produktion weiter steigern. FFAs können nicht nur indirekt über einen gesteigerten metabolischen Flux die ROS-Produktion in den Mitochondrien steigern, sondern auch direkt über eine Interaktion mit Komplex I und Komplex III (Schönfeld & Wojtczak 2008).

Eine Besonderheit der pankreatischen β -Zellen ist das niedrige Expressionsniveau antioxidativer Enzyme (Lenzen *et al.* 1996; Tiedge *et al.* 1997), wodurch diese besonders empfindlich gegenüber oxidativem Stress sind. Insulinproduzierende RINm5F-Zellen, die verschiedene antioxidative Enzyme überexprimieren, wurden genutzt, um die Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an der Lipotoxizität zu untersuchen. Die physiologische Bedeutung der Katalase liegt aufgrund ihrer niedrigen Substrataffinität in der Entgiftung hoher Konzentrationen von H_2O_2 , das in einer Disproportionierungsreaktion zu O_2 und H_2O abgebaut wird (Halliwell & Gutteridge 2007). Durch die Überexpression von Katalase mit Hilfe des CMV-Promotors konnte diese in den Peroxisomen aber auch im Zytosol überexprimiert werden. Die unphysiologische Expression im Zytosol ist vermutlich durch das hohe Expressionsniveau bedingt. Zusätzlich wurde mit Hilfe einer mitochondrialen *targeting sequence* Katalase im Mitochondrium überexprimiert, um die mitochondriale ROS-Bildung analysieren zu können (Gurgul *et al.* 2004). Die Produktion von $\text{O}_2^{\cdot -}$ wurde mittels Überexpression der zytosolischen Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (CuZnSOD) oder der mitochondrialen Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD) analysiert. Diese Enzyme katalysieren die Reaktion von $\text{O}_2^{\cdot -}$ zu O_2 und H_2O_2 , welches wiederum von Katalase weiter abgebaut wird. Experimente mit diesen Zellen zeigten, dass nur die peroxisomal/zytosolisch lokalisierte Katalase in der Lage war, gegenüber der Toxizität von Palmitinsäure in Vitalitäts-Assays einen protektiven Effekt zu vermitteln. Im Gegensatz dazu bot mitochondrial lokalisierte Katalase keinen Schutz. Die $\text{O}_2^{\cdot -}$ detoxifizierenden Isoenzyme MnSOD und CuZnSOD konnten ebenfalls keinen protektiven Effekt gegen Palmitinsäure vermitteln. Dies deutet daraufhin, dass die Bildung von $\text{O}_2^{\cdot -}$ nicht so entscheidend für die Lipotoxizität ist wie die Bildung von H_2O_2 . Um direkt oxidativen Stress nachzuweisen, wurde die Palmitinsäure-induzierte ROS-Bildung mittels Dichlorofluorescein gemessen. Der Anstieg der ROS-Produktion durch Palmitinsäure konnte wiederum nur durch die peroxisomal/zytosolisch lokalisierte Katalase und nicht durch die mitochondriale Katalase signifikant reduziert werden. Da anscheinend reaktive Sauerstoffspezies während der Lipotoxizität gebildet werden, stellte sich nun die Frage, wo diese generiert werden und um welche reaktive Sauerstoffspezies es sich handelt. Der Schutz durch Katalase deutet auf eine zentrale Rolle von peroxisomal/zytosolisch generiertem H_2O_2 hin.

Peroxisomen sind ein weiteres intrazelluläres Kompartiment, in dem FFAs zu einer gesteigerten ROS-Produktion führen können. Wenn FFAs von der Zelle aufgenommen werden, können sie in Mitochondrien, aber auch in Peroxisomen oxidiert werden (1.3.1). Der Ort des Metabolismus ist strukturbedingt, da sich mitochondriale und peroxisomale Enzyme in ihrer Substratspezifität unterscheiden (Kunau *et al.* 1995). Während kurze und mittellange

FFAs Substrate der mitochondrialen β -Oxidation sind, können lange FFAs sowohl in den Mitochondrien als auch in den Peroxisomen abgebaut werden. Sehr lange FFAs sind wiederum ausschließlich Substrate der peroxisomalen β -Oxidation (Wanders & Waterham 2006). Der Abbau in den Mitochondrien kann von einer erhöhten $O_2^{\cdot-}$ -Bildung als Nebenprodukt der Elektronentransportkette begleitet werden. Im Gegensatz dazu wird im ersten Schritt der peroxisomalen β -Oxidation direkt H_2O_2 generiert (Dansen & Wirtz 2001). Die Acyl-CoA-Oxidase führt eine Doppelbindung an der β -Position des Fettsäure-CoA Esters ein und überträgt das Wasserstoffatom des Substrats direkt auf O_2 . Auch die Toxizität von FFAs ist eng an deren Struktur gekoppelt (3.1), so sind nur langkettige gesättigte FFAs ($>C13$) toxisch für insulinproduzierende Zellen. Dieses Toxizitätsprofil steht in Übereinstimmung mit der Substratspezifität der peroxisomalen β -Oxidation und deutet somit eine Beteiligung dieses Abbauwegs an der Lipotoxizität an. Ein weiteres Indiz liefert der protektive Effekt der peroxisomal/zytosolisch lokalisierten Katalase, die in der Lage ist, das während der β -Oxidation von Fettsäuren gebildete H_2O_2 zu detoxifizieren.

Um die Bildung von H_2O_2 nach Fettsäureinkubation direkt nachzuweisen, wurde das H_2O_2 -sensitive Fluoreszenzprotein HyPer entweder spezifisch in den Mitochondrien (HyPer-Mito) oder den Peroxisomen (HyPer-Peroxi) überexprimiert. Zusätzlich zum HyPer-Protein wurde in den RINm5F-Zellen auch die peroxisomale/zytosolische Katalase oder die mitochondriale Katalase überexprimiert. Nach 24stündiger Inkubation mit Palmitinsäure war die H_2O_2 -Produktion in beiden Kompartimenten erhöht, wobei die H_2O_2 -Produktion in den Peroxisomen tendenziell höher war als in den Mitochondrien. Die Palmitinsäure-induzierte H_2O_2 -Produktion in INS-1E-Zellen war in den Peroxisomen signifikant höher als in den Mitochondrien. Auch in primären Ratten-Inselzellen konnte mit Hilfe von HyPer-Peroxi ein Anstieg der peroxisomalen H_2O_2 -Konzentration fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden. Die Hypothese von peroxisomal gebildetem H_2O_2 als toxisches Agens in der Lipotoxizität wurde weiter unterstützt von dem Befund, dass nur die peroxisomale/zytosolische Katalase in der Lage war, diese H_2O_2 -Produktion in RINm5F-Zellen, sowohl in den Peroxisomen als auch den Mitochondrien, signifikant zu reduzieren. Die Überexpression von Katalase in den Mitochondrien hatte dagegen keine signifikante Reduktion der H_2O_2 -Produktion zur Folge. H_2O_2 als membranpermeable reaktive Sauerstoffspezies (Halliwell & Gutteridge 2007; Lenzen 2008) kann von ihrem Entstehungsort in den Peroxisomen in die Mitochondrien diffundieren, wo es dann von HyPer-Mito detektiert wird. So ist die Quelle der erhöhten H_2O_2 -Konzentration in den Mitochondrien zumindest zum Teil das Peroxisom. Ölsäure als ungesättigte Fettsäure führte

zu einer signifikant niedrigeren H_2O_2 -Produktion in den Peroxisomen als Palmitinsäure. Darüber hinaus konnte Ölsäure die Palmitinsäure-induzierte H_2O_2 -Bildung verhindern. Dies spiegelt die Ergebnisse aus der Vitalitätsbestimmung wieder.

Der protektive Effekt von Ölsäure kann nicht unmittelbar über die peroxisomale β -Oxidation erklärt werden. Allerdings unterscheiden sich die Abbauewege gesättigter und ungesättigter FFAs. So werden zum Abbau ungesättigter FFAs zusätzliche Enzyme, wie Δ^3 , Δ^2 -enoyl-CoA-Isomerase, $\Delta^{3,5}$, $\Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA-Isomerase und 2,4-dienoyl-CoA-Reduktase, benötigt (Kunau *et al.* 1995; Hiltunen & Qin 2000). Möglicherweise könnten diese Enzyme bei der Oxidation ungesättigter FFAs der begrenzende Faktor sein.

Der protektive Effekt von Palmitoleinsäure wird nicht von Etomoxir, einem Carnitin-palmitoyltransferase I Inhibitor, beeinflusst und ist somit unabhängig von der mitochondrialen β -Oxidation (Welters *et al.* 2004). Dies ist in Übereinstimmung mit der Hypothese, dass eine gesteigerte ROS-Produktion als Resultat eines erhöhten mitochondrialen Metabolismus nicht ursächlich für die Lipotoxizität ist.

Im Gegensatz zu Palmitinsäure führt eine Inkubation mit Ölsäure zur Bildung zytosolischer Lipid-Droplets, weil Ölsäure effizienter zu Triglyceriden verestert werden kann (Cnop *et al.* 2001). Diese Triglyceride werden in den Lipid-Droplets gespeichert, ein Phänomen, das mit einem lipotoxischen Status wie bei der Fettleber assoziiert wird. Anscheinend tritt in pankreatischen β -Zellen der gegenteilige Effekt auf. Dort sind die Lipid-Droplets mit einem zytoprotektiven Effekt assoziiert, da so vermutlich der Konzentrationsanstieg von intrazellulären FFAs verhindert wird (Cnop *et al.* 2001; Garbarino *et al.* 2009). Möglicherweise werden in Gegenwart ungesättigter FFAs auch gesättigte FFAs leichter in den Lipid-Droplets gespeichert und stehen somit der peroxisomalen β -Oxidation, die einen Anstieg der H_2O_2 -Konzentration zur Folge hätte, nicht mehr zur Verfügung. Hierfür spricht, dass Hefe-Mutanten, denen zytoplasmatische Lipid-Droplets fehlen, sehr sensitiv gegenüber ungesättigten FFAs sind (Garbarino *et al.* 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Einführung einer Doppelbindung in Palmitinsäure durch die Stearoyl-CoA-Desaturase eine Veresterung erleichtert und so insulinproduzierende MIN6-Zellen schützt (Busch *et al.* 2005). Langkettige Fettsäuren wie Palmitinsäure werden normalerweise sowohl im Mitochondrium als auch im Peroxisom abgebaut. Der mitochondriale Stoffwechsel kann das chronisch gesteigerte Angebot an Metaboliten, wie es beim Typ 2 Diabetes auftritt, aber vermutlich nicht umsetzen. Insbesondere das Überangebot an FFAs wie Palmitinsäure resultiert in einem verstärkten Abbau durch die peroxisomale β -Oxidation, in der gleichzeitig H_2O_2 gebildet wird. Das membranpermeable H_2O_2 verlässt die Peroxisomen, und beeinträchtigt die

Insulinbiosynthese und -sekretion (Zhou & Grill 1994; Akesson & Lundquist 1999; Maechler *et al.* 1999), wie es für insulinproduzierende Zellen nach einer Langzeit-Inkubation mit erhöhten FFA-Konzentrationen gezeigt werden konnte (Newsholme *et al.* 2007).

Der peroxisomale Metabolismus von Fettsäuren und die damit einhergehende Bildung von H_2O_2 stellen ein neues Konzept für den Mechanismus der Lipotoxizität in pankreatischen β -Zellen dar. Aus dieser Hypothese ergeben sich möglicherweise neue Strategien zur Prävention oder Therapie des Typ 2 Diabetes.

4 Zusammenfassung

Adipositas und das metabolische Syndrom sind die wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes mellitus. Die dabei auftretenden chronisch erhöhten Serumkonzentrationen freier Fettsäuren können zunächst eine Dysfunktion der pankreatischen β -Zellen mit einer beeinträchtigten Insulinsekretion verursachen und im weiteren Verlauf zur Apoptose der Zellen führen. Dieses Phänomen wird als Lipotoxizität bezeichnet, dessen molekulare Mechanismen trotz intensiver Forschung noch weitestgehend unklar sind. Daher war es Ziel dieser Dissertation, verschiedene molekulare Mechanismen und ihre Bedeutung für die Lipotoxizität zu untersuchen.

An insulinproduzierenden RINm5F-Zellen konnte gezeigt werden, dass FFAs abhängig von ihrer Struktur unterschiedliche Effekte auf die Zellvitalität haben. So sind langkettige gesättigte Fettsäuren (C14:0 – C18:0) wie Palmitinsäure (C16:0) zytotoxisch. Im Gegensatz dazu sind langkettige ungesättigte Fettsäuren wie Palmitoleinsäure (C16:1) und Ölsäure (C18:1) nicht toxisch, sondern können vielmehr gegen Palmitinsäure-induzierte Toxizität schützen. Dieser protektive Effekt langkettiger ungesättigter FFAs ist nicht abhängig von der Anzahl der Doppelbindungen. So war der Schutz von Linolsäure (C18:2) oder γ -Linolensäure (C18:3) ähnlich dem von Ölsäure. Mit abnehmender Kettenlänge der FFAs sinkt deren Einfluss auf die Zellvitalität. So sind Fettsäuren mit einer Kettenlänge von \leq C12 unabhängig vom Sättigungsgrad weder toxisch noch protektiv.

In zahlreichen vorangegangenen Studien konnte in verschiedenen β -Zelllinien oder primären β -Zellen eine Aktivierung der Expression von Genen, die ER-Stress vermitteln, durch FFAs beobachtet werden. Um dies für das in der vorliegenden Dissertation verwendete Gewebekulturmodell zu verifizieren, wurden Expressionsanalysen der ER-Stress Markergene BiP, CHOP, XBP-1 und XBP-1 *spliced* an RINm5F-Zellen nach Fettsäure-Inkubation durchgeführt. Eine 12stündige Inkubation mit Palmitinsäure steigerte die Expression von BiP und CHOP, sowie den Anteil an XBP-1 *spliced*. Ölsäure hatte hingegen keinen Effekt auf die Genexpression und konnte darüber hinaus die Effekte von Palmitinsäure aufheben. Eine Induktion von CHOP führt zur Apoptose. Um dies näher zu untersuchen, wurde die Aktivierung der Kompartiment-spezifischen Caspasen-8, -9 und -12 bestimmt. Alle Caspasen wurden im zeitlichen Verlauf gleichermaßen durch Palmitinsäure aktiviert. Somit kommt der ER-ständigen Caspase-12 und damit auch der ER-Stress induzierten Apoptose keine besondere Bedeutung bei der Lipotoxizität zu.

Die strenge Struktur-Wirkungsbeziehung von FFAs könnte auf eine Rezeptor-vermittelte Signalkaskade als Auslöser der Lipotoxizität hindeuten. Unter den G-Protein gekoppelten

Rezeptoren entspricht die Substratspezifität von GPR40 und GPR120 am ehesten dem Toxizitätsprofil. Eine Expressionsanalyse der beiden Rezeptoren in drei unterschiedlichen β -Zelllinien ergab, dass sowohl MIN6- als auch INS-1E-Zellen beide Rezeptoren exprimieren. Allerdings war das Expressionsniveau von GPR120 geringer als das von GPR40. In RINm5F-Zellen konnte im Gegensatz dazu weder GPR40 noch GPR120 detektiert werden. Die Sensitivität der drei Zelllinien gegenüber Palmitinsäure ist sehr unterschiedlich. So sind RINm5F-Zellen mit einem EC_{50} -Wert von ca. 100 μ M deutlich sensitiver als MIN6- und INS-1E-Zellen mit 10fach höheren EC_{50} -Werten für Palmitinsäure. Diese inverse Beziehung von Sensitivität und Expression der Rezeptoren belegt, dass diese keine Vermittler der Toxizität sind. Während die physiologische Bedeutung von GPR120 in β -Zellen ungeklärt ist, wird über GPR40 die insulinsekretionsverstärkende Wirkung von FFAs vermittelt. So verstärkten Palmitinsäure und Ölsäure nach 2stündiger Inkubation die glucoseinduzierte Insulinsekretion von MIN6- und INS-1E-Zellen. Die Effekte von FFAs sind von der Inkubationsdauer abhängig. Nach kurzer Inkubation wird die Insulinsekretion gesteigert und nach langer Inkubation führen FFAs abhängig von ihrer Struktur zum Verlust der Zellvitalität oder sind protektiv.

Fettsäuren werden in Mitochondrien und in Peroxisomen über die β -Oxidation abgebaut. In beiden Kompartimenten kann dieser Metabolismus von einer gesteigerten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies begleitet werden. In den Mitochondrien führt ein erhöhter metabolischer Flux zu einem gesteigerten Elektroneneinstrom in die Atmungskette. Dadurch wird O_2 zu einem größeren Anteil in einer Ein-Elektron-Reduktion zum Superoxidradikal ($O_2^{\cdot-}$), einem Nebenprodukt der Atmungskette, reduziert. Im Gegensatz dazu wird in den Peroxisomen im ersten Reaktionsschritt der β -Oxidation H_2O_2 gebildet. Welchen Abbauweg FFAs einschlagen hängt von ihrer Struktur ab, so werden langkettige FFAs bevorzugt im Peroxisom metabolisiert. Ob oxidativer Stress für die Lipotoxizität von Bedeutung ist, wurde mit Hilfe von RINm5F-Zellen, die verschiedene antioxidative Enzyme überexprimieren, analysiert. Nur die zytosolisch/peroxisomal lokalisierte Katalase konnte gegenüber Palmitinsäure-induzierter Toxizität schützen, wohingegen die mitochondriale Katalase keinen zytoprotektiven Effekt aufwies. Ebenso hatten die $O_2^{\cdot-}$ detoxifizierenden Isoenzyme CuZnSOD und MnSOD keinen Einfluss auf die Zellvitalität in Gegenwart von Palmitinsäure. Diese Ergebnisse zeigen, dass H_2O_2 als Produkt der peroxisomalen β -Oxidation von besonderer Bedeutung für die Lipotoxizität ist.

Mit Hilfe des H_2O_2 -sensitiven Fluoreszenzproteins HyPer als neue, spezifische Methode zur Detektion von H_2O_2 , konnte eindeutig H_2O_2 als reaktive Sauerstoffspezies, dessen Bildung durch Palmitinsäure induziert wurde, identifiziert werden. Um das intrazelluläre

Kompartiment der H₂O₂-Bildung zu bestimmen, wurde das HyPer-Protein entweder mit der peroxisomalen oder der mitochondrialen *targeting* Sequenz fusioniert, die eine Organellspezifische Expression ermöglicht. Palmitinsäureinkubationen mit HyPer-exprimierenden Zellen zeigten, dass Peroxisomen tatsächlich eine bedeutende H₂O₂-Quelle in insulinproduzierenden Zellen sind, während die Mitochondrien nur eine untergeordnete Rolle spielen. Eine Inkubation mit Ölsäure hingegen hatte keinen signifikanten Anstieg der intrazellulären H₂O₂-Konzentration zur Folge. Diese Experimente belegen, dass H₂O₂ resultierend aus dem ersten Schritt der peroxisomalen β -Oxidation von besonderer Bedeutung für die FFA-induzierte Toxizität ist. Unklar hingegen ist weiterhin der molekulare Mechanismus des protektiven Effekts ungesättigter FFAs. Eine Akkumulation von Lipid-Droplets im Zytosol, wie sie in elektronenmikroskopischen Analysen nach Behandlung mit Ölsäure beobachtet werden konnte, lässt vermuten, dass Ölsäure dort in Form von Triglyceriden gespeichert wird und der β -Oxidation somit nicht zur Verfügung steht. In Gegenwart von Ölsäure könnte so auch Palmitinsäure verstärkt in diesen Droplets gespeichert werden.

Die Hypothese einer peroxisomal induzierten Lipotoxizität steht in Übereinstimmung mit dem Toxizitätsprofil von Fettsäuren und dem zytoprotektiven Effekt der Katalase. Der hier vorgeschlagene molekulare Mechanismus der Lipotoxizität könnte perspektivisch zu neuen Strategien zum Schutz der β -Zellvitalität in der Manifestationsphase des Typ 2 Diabetes führen.

5 Literaturverzeichnis

- Achenbach, P., Pan, L. & Ziegler, A. G. (2008). Frühdiagnostik bei Typ-1-Diabetes. *Der Diabetologe* 4: 47-58.
- Adams, J. M. & Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326.
- Akerblom, H. K. & Knip, M. (1998). Putative environmental factors in Type 1 diabetes. *Diabetes Metab Rev* 14: 31-67.
- Akesson, B. & Lundquist, I. (1999). Nitric oxide and hydroperoxide affect islet hormone release and Ca(2+) efflux. *Endocrine* 11: 99-107.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. & Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7915-7922.
- Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E. & Starkov, A. A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 70: 200-214.
- Angermuller, S., Islinger, M. & Volkl, A. (2009). Peroxisomes and reactive oxygen species, a lasting challenge. *Histochem Cell Biol* 131: 459-463.
- Antonsson, B. & Martinou, J. C. (2000). The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256: 50-57.
- Ashcroft, F. M. & Rorsman, P. (1990). ATP-sensitive K⁺ channels: a link between B-cell metabolism and insulin secretion. *Biochem Soc Trans* 18: 109-111.
- Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J. & Storz, G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6161-6165.
- Bell, G. I., Kayano, T., Buse, J. B., Burant, C. F., Takeda, J., Lin, D., Fukumoto, H. & Seino, S. (1990). Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 13: 198-208.
- Belousov, V. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Staroverov, D. B., Shakhbazov, K. S., Terskikh, A. V. & Lukyanov, S. (2006). Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* 3: 281-286.
- Boden, G. (1997). Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46: 3-10.
- Boveris, A., Oshino, N. & Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128: 617-630.
- Briscoe, C. P., Tadayyon, M., Andrews, J. L., Benson, W. G., Chambers, J. K., Eilert, M. M., Ellis, C., Elshourbagy, N. A., Goetz, A. S., Minnick, D. T., Murdock, P. R., Sauls, H. R., Jr., Shabon, U., Spinage, L. D., Strum, J. C., Szekeres, P. G., Tan, K. B., Way, J. M., Ignar, D. M., Wilson, S. & Muir, A. I. (2003). The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem* 278: 11303-11311.
- Brown, A. J., Jupe, S. & Briscoe, C. P. (2005). A family of fatty acid binding receptors. *DNA Cell Biol* 24: 54-61.
- Burke, J. P., Williams, K., Gaskill, S. P., Hazuda, H. P., Haffner, S. M. & Stern, M. P. (1999). Rapid rise in the incidence of type 2 diabetes from 1987 to 1996: results from the San Antonio Heart Study. *Arch Intern Med* 159: 1450-1456.
- Busch, A. K., Gurisik, E., Cordero, D. V., Sudlow, M., Denyer, G. S., Laybutt, D. R., Hughes, W. E. & Biden, T. J. (2005). Increased fatty acid desaturation and enhanced expression of stearoyl coenzyme A desaturase protects pancreatic beta-cells from lipoapoptosis. *Diabetes* 54: 2917-2924.
- Butler, A. E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A. & Butler, P. C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 102-110.
- Carlsson, C., Borg, L. A. & Welsh, N. (1999). Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology* 140: 3422-3428.
- Carpentier, A., Mittelman, S. D., Lamarche, B., Bergman, R. N., Giacca, A. & Lewis, G. F. (1999). Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation. *The American journal of physiology* 276: E1055-1066.

- Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. (1979).** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.
- Chen, C., Hosokawa, H., Bumbalo, L. M. & Leahy, J. L. (1994).** Mechanism of compensatory hyperinsulinemia in normoglycemic insulin-resistant spontaneously hypertensive rats. Augmented enzymatic activity of glucokinase in beta-cells. *J Clin Invest* 94: 399-404.
- Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Bottger, A. & David, C. N. (1999).** Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr Biol* 9: 959-962.
- Circu, M. L. & Aw, T. Y. (2010).** Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48: 749-762.
- Clark, A., Wells, C. A., Buley, I. D., Cruickshank, J. K., Vanhegan, R. I., Matthews, D. R., Cooper, G. J., Holman, R. R. & Turner, R. C. (1988).** Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res* 9: 151-159.
- Cnop, M., Hannaert, J. C., Hoorens, A., Eizirik, D. L. & Pipeleers, D. G. (2001).** Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* 50: 1771-1777.
- Corkey, B. E., Deeney, J. T., Yaney, G. C., Tornheim, K. & Prentki, M. (2000).** The role of long-chain fatty acyl-CoA esters in beta-cell signal transduction. *J Nutr* 130: 299S-304S.
- Cunha, D. A., Hekerman, P., Ladriere, L., Bazarra-Castro, A., Ortis, F., Wakeham, M. C., Moore, F., Rasschaert, J., Cardozo, A. K., Bellomo, E., Overbergh, L., Mathieu, C., Lupi, R., Hai, T., Herchuelz, A., Marchetti, P., Rutter, G. A., Eizirik, D. L. & Cnop, M. (2008).** Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. *J Cell Sci* 121: 2308-2318.
- Daneman, D. (2006).** Type 1 diabetes. *Lancet* 367: 847-858.
- Dansen, T. B. & Wirtz, K. W. (2001).** The peroxisome in oxidative stress. *IUBMB Life* 51: 223-230.
- Davidson, H. W., Rhodes, C. J. & Hutton, J. C. (1988).** Intraorganellar calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic beta cell via two distinct site-specific endopeptidases. *Nature* 333: 93-96.
- DeFronzo, R. A. (1988).** Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 37: 667-687.
- Degterev, A., Boyce, M. & Yuan, J. (2003).** A decade of caspases. *Oncogene* 22: 8543-8567.
- Dhayal, S., Welters, H. J. & Morgan, N. G. (2008).** Structural requirements for the cytoprotective actions of mono-unsaturated fatty acids in the pancreatic beta-cell line, BRIN-BD11. *Br J Pharmacol* 153: 1718-1727.
- Di Paola, M., Cocco, T. & Lorusso, M. (2000).** Arachidonic acid causes cytochrome c release from heart mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 277: 128-133.
- Diakogiannaki, E., Welters, H. J. & Morgan, N. G. (2008).** Differential regulation of the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells exposed to long-chain saturated and monounsaturated fatty acids. *J Endocrinol* 197: 553-563.
- Dodson, G. & Steiner, D. (1998).** The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol* 8: 189-194.
- Droge, W. (2002).** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M. & Kaufmann, S. H. (1999).** Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68: 383-424.
- Eaton, S., Bartlett, K. & Pourfarzam, M. (1996).** Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem J* 320 (Pt 2): 345-357.
- Efrat, S., Tal, M. & Lodish, H. F. (1994).** The pancreatic beta-cell glucose sensor. *Trends Biochem Sci* 19: 535-538.
- Eizirik, D. L. & Cnop, M. (2010).** ER stress in pancreatic beta cells: the thin red line between adaptation and failure. *Sci Signal* 3: pe7.
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A. & Grodsky, G. M. (2003).** Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 52: 1-8.
- Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S. & Liang, J. (2005).** Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37: 719-727.

- Filppula, S. A., Sormunen, R. T., Hartig, A., Kunau, W. H. & Hiltunen, J. K. (1995). Changing stereochemistry for a metabolic pathway in vivo. Experiments with the peroxisomal beta-oxidation in yeast. *J Biol Chem* 270: 27453-27457.
- Fredriksson, R., Hoglund, P. J., Gloriam, D. E., Lagerstrom, M. C. & Schioth, H. B. (2003). Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Lett* 554: 381-388.
- Fujiwara, K., Maekawa, F. & Yada, T. (2005). Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca²⁺ signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-type Ca²⁺ channel and link to insulin release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: E670-677.
- Garbarino, J., Padamsee, M., Wilcox, L., Oelkers, P. M., D'Ambrosio, D., Ruggles, K. V., Ramsey, N., Jabado, O., Turkish, A. & Sturley, S. L. (2009). Sterol and diacylglycerol acyltransferase deficiency triggers fatty acid-mediated cell death. *J Biol Chem* 284: 30994-31005.
- Gille, L. & Nohl, H. (2001). The ubiquinol/bc1 redox couple regulates mitochondrial oxygen radical formation. *Arch Biochem Biophys* 388: 34-38.
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E. & Pelicci, P. G. (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 722-728.
- Gloyn, A. L., Weedon, M. N., Owen, K. R., Turner, M. J., Knight, B. A., Hitman, G., Walker, M., Levy, J. C., Sampson, M., Halford, S., McCarthy, M. I., Hattersley, A. T. & Frayling, T. M. (2003). Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 568-572.
- Godsland, I. F., Jeffs, J. A. & Johnston, D. G. (2004). Loss of beta cell function as fasting glucose increases in the non-diabetic range. *Diabetologia* 47: 1157-1166.
- Gordon, E. S. (1960). Non-esterified fatty acids in the blood of obese and lean subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 8: 740-747.
- Grant, S. F., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Manolescu, A., Sainz, J., Helgason, A., Stefansson, H., Emilsson, V., Helgadóttir, A., Styrkarsdóttir, U., Magnusson, K. P., Walters, G. B., Páldóttir, E., Jónsdóttir, T., Gudmundsdóttir, T., Gylfason, A., Saemundsdóttir, J., Wilensky, R. L., Reilly, M. P., Rader, D. J., Bagger, Y., Christiansen, C., Gudnason, V., Sigurdsson, G., Thorsteinsdóttir, U., Gulcher, J. R., Kong, A. & Stefansson, K. (2006). Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 38: 320-323.
- Gurgul, E., Lortz, S., Tiedge, M., Jorns, A. & Lenzen, S. (2004). Mitochondrial catalase overexpression protects insulin-producing cells against toxicity of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines. *Diabetes* 53: 2271-2280.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.
- Hiltunen, J. K. & Qin, Y. (2000). beta-oxidation - strategies for the metabolism of a wide variety of acyl-CoA esters. *Biochim Biophys Acta* 1484: 117-128.
- Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S. & Tsujimoto, G. (2005). Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* 11: 90-94.
- Hirst, J., King, M. S. & Pryde, K. R. (2008). The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochem Soc Trans* 36: 976-980.
- Hong, Y. H., Nishimura, Y., Hishikawa, D., Tsuzuki, H., Miyahara, H., Gotoh, C., Choi, K. C., Feng, D. D., Chen, C., Lee, H. G., Katoh, K., Roh, S. G. & Sasaki, S. (2005). Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology* 146: 5092-5099.
- Huang, C. J., Lin, C. Y., Haataja, L., Gurlo, T., Butler, A. E., Rizza, R. A. & Butler, P. C. (2007). High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated beta-cell apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes. *Diabetes* 56: 2016-2027.
- Hull, R. L., Kodama, K., Utzschneider, K. M., Carr, D. B., Prigeon, R. L. & Kahn, S. E. (2005). Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. *Diabetologia* 48: 1350-1358.

- Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., Tanaka, H., Maruyama, M., Satoh, R., Okubo, S., Kizawa, H., Komatsu, H., Matsumura, F., Noguchi, Y., Shinohara, T., Hinuma, S., Fujisawa, Y. & Fujino, M. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422: 173-176.
- Iynedjian, P. B. (1993). Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem J* 293 (Pt 1): 1-13.
- Jakobs, B. S. & Wanders, R. J. (1995). Fatty acid beta-oxidation in peroxisomes and mitochondria: the first, unequivocal evidence for the involvement of carnitine in shuttling propionyl-CoA from peroxisomes to mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 1035-1041.
- Jetton, T. L., Lausier, J., LaRock, K., Trotman, W. E., Larmie, B., Habibovic, A., Peshavaria, M. & Leahy, J. L. (2005). Mechanisms of compensatory beta-cell growth in insulin-resistant rats: roles of Akt kinase. *Diabetes* 54: 2294-2304.
- Jun, H. S. & Yoon, J. W. (2001). The role of viruses in type I diabetes: two distinct cellular and molecular pathogenic mechanisms of virus-induced diabetes in animals. *Diabetologia* 44: 271-285.
- Karaskov, E., Scott, C., Zhang, L., Teodoro, T., Ravazzola, M. & Volchuk, A. (2006). Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis. *Endocrinology* 147: 3398-3407.
- Kashyap, S., Belfort, R., Gastaldelli, A., Pratipanawatr, T., Berria, R., Pratipanawatr, W., Bajaj, M., Mandarino, L., DeFronzo, R. & Cusi, K. (2003). A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 2461-2474.
- Katsuma, S., Hatae, N., Yano, T., Ruike, Y., Kimura, M., Hirasawa, A. & Tsujimoto, G. (2005). Free fatty acids inhibit serum deprivation-induced apoptosis through GPR120 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *J Biol Chem* 280: 19507-19515.
- Kayano, T., Burant, C. F., Fukumoto, H., Gould, G. W., Fan, Y. S., Eddy, R. L., Byers, M. G., Shows, T. B., Seino, S. & Bell, G. I. (1990). Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J Biol Chem* 265: 13276-13282.
- Kebede, M. A., Alquier, T., Latour, M. G. & Poitout, V. (2009). Lipid receptors and islet function: therapeutic implications? *Diabetes Obes Metab* 11 Suppl 4: 10-20.
- Kharroubi, I., Ladriere, L., Cardozo, A. K., Dogusan, Z., Cnop, M. & Eizirik, D. L. (2004). Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* 145: 5087-5096.
- King, H., Aubert, R. E. & Herman, W. H. (1998). Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21: 1414-1431.
- Korshunov, S. S., Korkina, O. V., Ruuge, E. K., Skulachev, V. P. & Starkov, A. A. (1998). Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O₂⁻ and H₂O₂ by mitochondria in the resting state. *FEBS Lett* 435: 215-218.
- Kotarsky, K., Nilsson, N. E., Flodgren, E., Owman, C. & Olde, B. (2003). A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 301: 406-410.
- Kudin, A. P., Bimpong-Buta, N. Y., Vielhaber, S., Elger, C. E. & Kunz, W. S. (2004). Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 279: 4127-4135.
- Kunau, W. H., Dommes, V. & Schulz, H. (1995). beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res* 34: 267-342.
- Kushnareva, Y., Murphy, A. N. & Andreyev, A. (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J* 368: 545-553.
- Laaksonen, D. E., Lakka, T. A., Lakka, H. M., Nyssonen, K., Rissanen, T., Niskanen, L. K. & Salonen, J. T. (2002). Serum fatty acid composition predicts development of impaired fasting glycaemia and diabetes in middle-aged men. *Diabet Med* 19: 456-464.
- Lai, E., Bikopoulos, G., Wheeler, M. B., Rozakis-Adcock, M. & Volchuk, A. (2008). Differential activation of ER stress and apoptosis in response to chronically elevated free fatty acids in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E540-550.

- Lambert, A. J. & Brand, M. D. (2004). Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* 279: 39414-39420.
- Latour, M. G., Alquier, T., Oseid, E., Tremblay, C., Jetton, T. L., Luo, J., Lin, D. C. & Poirout, V. (2007). GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes* 56: 1087-1094.
- Laybutt, D. R., Preston, A. M., Akerfeldt, M. C., Kench, J. G., Busch, A. K., Biankin, A. V. & Biden, T. J. (2007). Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia* 50: 752-763.
- Leahy, J. L. (2005). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 36: 197-209.
- Lenzen, S. (1990). Hexose recognition mechanisms in pancreatic B-cells. *Biochem Soc Trans* 18: 105-107.
- Lenzen, S. (1992). Glucokinase: signal recognition enzyme for glucose-induced insulin secretion. In Flatt, PR (ed) *Nutrient regulation of insulin secretion* Portland Press, London and Chapel Hill 101-125.
- Lenzen, S. (2008). Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans* 36: 343-347.
- Lenzen, S., Drinkgern, J. & Tiedge, M. (1996). Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 20: 463-466.
- Lenzen, S. & Panten, U. (1988). Signal recognition by pancreatic B-cells. *Biochemical pharmacology* 37: 371-378.
- Lenzen, S. & Tiedge, M. (1994). Regulation of pancreatic B-cell glucokinase and GLUT2 glucose transporter gene expression. *Biochem Soc Trans* 22: 1-6.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489.
- Liu, Y., Fiskum, G. & Schubert, D. (2002a). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 80: 780-787.
- Liu, Y. Q., Jetton, T. L. & Leahy, J. L. (2002b). beta-Cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats. *J Biol Chem* 277: 39163-39168.
- Maechler, P., Jornot, L. & Wollheim, C. B. (1999). Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 274: 27905-27913.
- Marchetti, P., Del Guerra, S., Marselli, L., Lupi, R., Masini, M., Pollera, M., Bugliani, M., Boggi, U., Vistoli, F., Mosca, F. & Del Prato, S. (2004). Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5535-5541.
- Matschinsky, F. M. (2002). Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes* 51 Suppl 3: S394-404.
- Meidute Abaraviciene, S., Lundquist, I., Galvanovskis, J., Flodgren, E., Olde, B. & Salehi, A. (2008). Palmitate-induced beta-cell dysfunction is associated with excessive NO production and is reversed by thiazolidinedione-mediated inhibition of GPR40 transduction mechanisms. *PLoS One* 3: e2182.
- Migliaccio, E., Giorgio, M. & Pelicci, P. G. (2006). Apoptosis and aging: role of p66Shc redox protein. *Antioxid Redox Signal* 8: 600-608.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417: 1-13.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E. & Dixit, V. M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85: 817-827.
- Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273: 2926-2930.
- Newsholme, P., Keane, D., Welters, H. J. & Morgan, N. G. (2007). Life and death decisions of the pancreatic beta-cell: the role of fatty acids. *Clin Sci (Lond)* 112: 27-42.
- Overton, H. A., Babbs, A. J., Doel, S. M., Fyfe, M. C., Gardner, L. S., Griffin, G., Jackson, H. C., Procter, M. J., Rasamison, C. M., Tang-Christensen, M., Widdowson, P. S., Williams, G. M. & Reynet, C. (2006). Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab* 3: 167-175.

- Paolisso, G., Gambardella, A., Amato, L., Tortoriello, R., D'Amore, A., Varricchio, M. & D'Onofrio, F. (1995).** Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects. *Diabetologia* 38: 1295-1299.
- Poirier, Y., Antonenkov, V. D., Glumoff, T. & Hiltunen, J. K. (2006).** Peroxisomal beta-oxidation--a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1413-1426.
- Poitout, V. & Robertson, R. P. (2002).** Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143: 339-342.
- Prentki, M. (1996).** New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur J Endocrinol* 134: 272-286.
- Prentki, M. & Nolan, C. J. (2006).** Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116: 1802-1812.
- Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R. M., Sempoux, C. & Henquin, J. C. (2008).** Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4: 32-42.
- Reddy, J. K. & Mannaerts, G. P. (1994).** Peroxisomal lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 14: 343-370.
- Roche, H. M., Phillips, C. & Gibney, M. J. (2005).** The metabolic syndrome: the crossroads of diet and genetics. *Proc Nutr Soc* 64: 371-377.
- Scandalios, J. G. (2005).** Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38: 995-1014.
- Schagger, H. (2001).** Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* 52: 119-128.
- Schönfeld, P. & Wojtczak, L. (2007).** Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport. *Biochim Biophys Acta* 1767: 1032-1040.
- Schönfeld, P. & Wojtczak, L. (2008).** Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 45: 231-241.
- Schrader, M. & Fahimi, H. D. (2006).** Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1755-1766.
- Shapiro, H., Shachar, S., Sekler, I., Hershfinkel, M. & Walker, M. D. (2005).** Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. *Biochem Biophys Res Commun* 335: 97-104.
- Soga, T., Ohishi, T., Matsui, T., Saito, T., Matsumoto, M., Takasaki, J., Matsumoto, S., Kamohara, M., Hiyama, H., Yoshida, S., Momose, K., Ueda, Y., Matsushime, H., Kobori, M. & Furuichi, K. (2005).** Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 326: 744-751.
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J. & Brand, M. D. (2002).** Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277: 44784-44790.
- Starkov, A. A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B. J., Browne, S. E., Patel, M. S. & Beal, M. F. (2004).** Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci* 24: 7779-7788.
- Steil, G. M., Trivedi, N., Jonas, J. C., Hasenkamp, W. M., Sharma, A., Bonner-Weir, S. & Weir, G. C. (2001).** Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E788-796.
- Stillwell, W., Janski, L. J., Crump, F. T. & Ehringer, W. (1997).** Effect of docosahexaenoic acid on mouse mitochondrial membrane properties. *Lipids* 32: 497-506.
- Su, H. M., Moser, A. B., Moser, H. W. & Watkins, P. A. (2001).** Peroxisomal straight-chain Acyl-CoA oxidase and D-bifunctional protein are essential for the retroconversion step in docosahexaenoic acid synthesis. *J Biol Chem* 276: 38115-38120.
- Swaminath, G. (2008).** Fatty acid binding receptors and their physiological role in type 2 diabetes. *Arch Pharm (Weinheim)* 341: 753-761.
- Tan, C. P., Feng, Y., Zhou, Y. P., Eiermann, G. J., Petrov, A., Zhou, C., Lin, S., Salituro, G., Meinke, P., Mosley, R., Akiyama, T. E., Einstein, M., Kumar, S., Berger, J. P., Mills, S. G., Thornberry, N. A., Yang, L. & Howard, A. D. (2008).** Selective small-molecule agonists of G protein-coupled receptor 40 promote glucose-dependent insulin secretion and reduce blood glucose in mice. *Diabetes* 57: 2211-2219.
- Tarpey, M. M., Wink, D. A. & Grisham, M. B. (2004).** Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R431-444.

- Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T. & Nicholson, D. W. (1997).** A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272: 17907-17911.
- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J. & Lenzen, S. (1997).** Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46: 1733-1742.
- Turrens, J. F. (2003).** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552: 335-344.
- Vamecq, J. & Draye, J. P. (1989).** Pathophysiology of peroxisomal beta-oxidation. *Essays Biochem* 24: 115-225.
- Van Veldhoven, P. P., Vanhove, G., Asselberghs, S., Eyssen, H. J. & Mannaerts, G. P. (1992).** Substrate specificities of rat liver peroxisomal acyl-CoA oxidases: palmitoyl-CoA oxidase (inducible acyl-CoA oxidase), pristanoyl-CoA oxidase (non-inducible acyl-CoA oxidase), and trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase. *J Biol Chem* 267: 20065-20074.
- Visser, W. F., van Roermund, C. W., Ijlst, L., Waterham, H. R. & Wanders, R. J. (2007).** Metabolite transport across the peroxisomal membrane. *Biochem J* 401: 365-375.
- Votyakova, T. V. & Reynolds, I. J. (2001).** DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* 79: 266-277.
- Waldhäusl, W. & Lenzen, S. (2007).** Kohlenhydrat-Stoffwechsel. In Pathophysiologie: Molekulare, zelluläre, systemische Grundlagen von Krankheiten. Wien, Wilhelm Maudrich Verlag 14-11 14-19.
- Wanders, R. J., Vreken, P., Ferdinandusse, S., Jansen, G. A., Waterham, H. R., van Roermund, C. W. & Van Grunsven, E. G. (2001).** Peroxisomal fatty acid alpha- and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochem Soc Trans* 29: 250-267.
- Wanders, R. J. & Waterham, H. R. (2006).** Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* 75: 295-332.
- Wardman, P. (2007).** Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med* 43: 995-1022.
- Welters, H. J., Tadayyon, M., Scarpello, J. H., Smith, S. A. & Morgan, N. G. (2004).** Mono-unsaturated fatty acids protect against beta-cell apoptosis induced by saturated fatty acids, serum withdrawal or cytokine exposure. *FEBS Lett* 560: 103-108.
- Westin, M. A., Alexson, S. E. & Hunt, M. C. (2004).** Molecular cloning and characterization of two mouse peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-regulated peroxisomal acyl-CoA thioesterases. *J Biol Chem* 279: 21841-21848.
- Wyllie, A. H. (1980).** Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556.
- Xiong, Y., Miyamoto, N., Shibata, K., Valasek, M. A., Motoike, T., Kedzierski, R. M. & Yanagisawa, M. (2004).** Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1045-1050.
- Zhang, Y., Xu, M., Zhang, S., Yan, L., Yang, C., Lu, W., Li, Y. & Cheng, H. (2007).** The role of G protein-coupled receptor 40 in lipoapoptosis in mouse beta-cell line NIT-1. *J Mol Endocrinol* 38: 651-661.
- Zhou, Y. P. & Grill, V. E. (1994).** Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J Clin Invest* 93: 870-876.
- Zimmet, P., Alberti, K. G. & Shaw, J. (2001).** Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-787.

6 Publikationen

Teilergebnisse der vorliegenden Dissertation sind bereits veröffentlicht.

Kurzbeiträge:

Gehrmann W., Elsner M., Lenzen S. (2007) Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für die Lipotoxizität in insulinproduzierenden Zellen. *Diabetologie und Stoffwechsel* **16**, Suppl. 1, S28, V64, 42. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Hamburg, 2007

Gehrmann W., Elsner M., Lenzen S. (2007) The role of reactive oxygen species (ROS) for lipotoxicity in insulin producing cells. *Diabetologia* **50**, Suppl. 1, S 175, 409, 43. EASD Annual Meeting, Amsterdam, 2007

Gehrmann W., Elsner M., Jörns A., Lenzen S. (2008) Die Lipotoxizität gesättigter Fettsäuren führt zur Induktion von ER-Stress in insulinproduzierenden Zellen. *Diabetologie und Stoffwechsel* **17**, Suppl. 1, S 34, 90, 43. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, München, 2008

Gehrmann W., Elsner M., Jörns A., Lenzen S. (2008) The importance of free fatty acid binding receptors and ER stress for lipotoxicity in insulin-producing cells. *Diabetologia* **51**, Suppl. 1, S 210, 513, 44. EASD Annual Meeting, Rom, 2008

Gehrmann W., Elsner M., Lenzen S. (2009) Fettsäuren-induzierte Bildung von Wasserstoffperoxid in insulinproduzierenden Zellen. *Diabetologie und Stoffwechsel* **18**, Suppl. 1, S 95, P 276, 44. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Leipzig, 2009

Gehrmann W., Elsner M., Lenzen S. (2009) Fettsäuren-induzierte Bildung von Wasserstoffperoxid in insulinproduzierenden Zellen. Präsentiert auf dem 9. Inselworkshop, Greifswald, 2009

Gehrmann W., Elsner M., Lenzen S. (2009) Fatty acid-induced caspase activation and hydrogen peroxide generation in insulin-producing RINm5F-cells. Präsentiert auf dem EASD Islet Study Group Symposium 2009, Steinschaler Dörfel, Österreich, 2009

Veröffentlichungen:

Gehrmann W, Elsner M, Lenzen S. Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic β -cells. *Diabetes Obes Metab* 2010, Zur Publikation angenommen am 29.04.2010

7 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Wiebke Gehrman
Anschrift: Wallmodenstr. 49
30625 Hannover
Geburtsdatum und -ort: 18. April 1980 in Bremen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1986 – 1990 Grundschule Lahstedt-Gadenstedt
1990 – 1992 Orientierungsstufe Groß Ilsede
1992 – 1996 Realschule Groß Ilsede
1996 – 1999 Robert-Bosch-Gesamtschule Hildesheim
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Abschlussnote: 1,9

Studium

10/1999 – 01/2005 Studium der Biochemie an der Universität Hannover
Abschluss: Diplom-Biochemikerin, Abschlussnote: sehr gut
Diplomarbeit mit dem Thema: „Etablierung eines Vektorsystems basierend auf VP22-Fusionsproteinen zur effizienten viralen Transduktion Langerhans'scher Inseln“ am Institut für Klinische Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover

Promotion

Seit 04/2005 Promotion mit dem Thema: „Die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für die Lipotoxizität in insulinproduzierenden Zellen“ am Institut für Klinische Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover

Forschungsaufenthalt

11/2007

Am Institute of Biomedical and Clinical Science
Peninsula Medical School, Plymouth, U.K.

Die vorliegende Dissertation wurde im April 2005 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. S. Lenzen am Institut für Klinische Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover begonnen und im April 2010 abgeschlossen.

8 Erklärung

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation

**Die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für die Lipotoxizität in
insulinproduzierenden Zellen**

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 14.04.2010

Wiebke Gehrman

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Sigurd Lenzen

danke ich für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, sein außerordentliches persönliches Engagement und sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit. Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. S. Lenzen für seine Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen während der Durchführung der Dissertation.

Herrn Dr. Matthias Elsner

danke ich für die vielen wertvollen Gespräche, die stets hilfreiche Unterstützung bei der wissenschaftlichen Arbeit und die außerordentlich gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Lipotoxizität. Seine stetige Diskussionsbereitschaft hat zu einem großen Anteil zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Allen Doktoranden, Mitarbeitern und Gästen des Institutes für Klinische Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Versuche und das nette Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt Maren Böger, Dr. Heike Schmitt, Martin Kaminski, Ilir Mehmeti, Dr. Sara Langer, Dr. Stephan Lortz, Dr. Ortwin Naujok sowie Martin Wirth, Monika Funck, Jasmin Kresse, Britta Leß, Anke Possler und Ute Sommerfeld für die wertvolle Unterstützung.

Besonders bedanken möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der Promotion uneingeschränkt unterstützt haben.