

Die Rolle des $G_{\alpha_{i2}}$ -Signalwegs in der pankreatischen β -Zelle

Dissertation

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

vorgelegt von
Dipl.-Pharm. Katarina Barbara Flockerzie
aus Weingarten

Tübingen

2014

Tag der mündlichen Qualifikation:

11.12.2014

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Glukosehomöostase	1
1.2	Physiologie der Langerhans-Inseln	3
1.3	Physiologie der Insulinsekretion	4
1.4	Die Rolle von G-Proteinen in der β -Zell-Funktion	6
1.4.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	6
1.4.2	Aufbau und Funktion von G-Proteinen	7
1.4.3	Die $G\alpha_{i/o}$ -Familie	11
1.4.4	Regulation der Insulinsekretion durch G-Proteine	12
1.5	Globale und konditionale Gendelektion im Mausmodell	16
1.6	Ziel der Arbeit	21
2	Materialien und Methoden	23
2.1	Materialien	23
2.2	Methoden	23
2.2.1	Transgene Mauslinien	23
2.2.1.1	Globale $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse	23
2.2.1.2	Gewebespezifische $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse	24
2.2.1.2.1	Gefloxtte $G\alpha_{i2}$ -Linie	24
2.2.1.2.2	Rip-Cre-transgene Mäuse	24
2.2.2	Genotypisierung	24
2.2.2.1	Gewebebiopsie	24
2.2.2.2	Polymerasekettenreaktion	25
2.2.2.3	Globale $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse	25
2.2.2.4	Konditionale $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse	26
2.2.2.5	Rip-Cre	28
2.2.2.6	Agarosegelelektrophorese	29

2.2.3	Präparation von murinen Inseln.....	30
2.2.4	Western Blot.....	31
2.2.4.1	Gewinnung von Protein	31
2.2.4.2	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford	31
2.2.4.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.2.4.4	Immunoblot.....	33
2.2.5	Histologische Methoden	35
2.2.5.1	Fixierung von Gewebe.....	35
2.2.5.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	36
2.2.5.3	Immunhistochemie	37
2.2.5.4	Quantifizierung histologischer Färbungen	38
2.2.6	Hormonsekretionsexperimente.....	39
2.2.7	Bestimmung des pankreatischen Gesamthormongehalts	40
2.2.8	Analyse des Hormongehaltes.....	41
2.2.8.1	Insulin-ELISA.....	41
2.2.8.2	C-Peptid-Bestimmung	41
2.2.8.3	Glukagon-Radioimmunassay (RIA)	42
2.2.9	Analyse der cAMP-Konzentration in Inseln	42
2.2.10	Fluorometrische Messung der intrazellulären Calciumkonzentration ..	43
2.2.11	<i>In-vivo</i> -Analyse der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tiere	44
2.2.11.1	Gewichtsentwicklung	44
2.2.11.2	Glukosetoleranztest.....	44
2.2.11.3	Bestimmung der peripheren Insulinsensitivität	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Charakterisierung der Glukosehomöostase in globalen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren	47
3.1.1	Expressionsanalyse von G-Proteinen in $G\alpha_{i2}$ -defizienten Langerhans-Inseln.....	47

3.1.1.1	Expression von $G\alpha_{i2}$	47
3.1.1.2	Expressionsanalyse der inhibitorischen G-Proteinuntereinheiten $G\alpha_{i3}$ und $G\alpha_o$	49
3.1.1.3	Expressionsanalyse der G-Proteinuntereinheiten $G\alpha_s$ und $G\alpha_q$	51
3.1.1.4	Expressionslevel der β -Untereinheiten $G\beta_1$ und $G\beta_2$	52
3.1.2	Glukosehomöostase in $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen.....	53
3.1.3	Gesamtinsulin- und Gesamtglukagongehalt $G\alpha_{i2}$ -defizienter Pankreaten.....	54
3.1.4	Morphologische Untersuchung von Langerhans-Inseln $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse.....	56
3.1.5	Hormonsekretion $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse.....	62
3.1.5.1	Glukagonsekretion.....	62
3.1.5.2	Insulinsekretion.....	63
3.1.5.3	Periphere Insulinsensitivität.....	64
3.2	Charakterisierung β -Zell-spezifischer $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse.....	67
3.2.1	Rekombinationsanalyse in $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Mäusen.....	67
3.2.2	$G\alpha_{i2}$ -Proteinexpression in $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Mäusen.....	69
3.2.3	Expressionsanalyse von G-Proteinuntereinheiten in Langerhans-Inseln.....	72
3.2.3.1	Expression der $G\alpha_{i3}$, $G\beta_1$ und $G\beta_2$ -Untereinheiten in $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Inseln...	72
3.2.3.2	Expressionslevel der α -Untereinheiten $G\alpha_o$, $G\alpha_s$ und $G\alpha_q$	73
3.2.4	Morphometrische Untersuchung der $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Inseln.....	75
3.2.5	Glukosehomöostase in $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Mäusen.....	75
3.2.6	Insulinsekretion in Langerhans-Inseln von $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Mäusen.....	79
3.2.6.1	Glukose-induzierte Insulinsekretion.....	79
3.2.6.2	Einfluss hemmender GPCR-Agonisten auf die Insulinsekretion $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Inseln.....	81

3.2.6.3	Einfluss stimulierender GPCR-Agonisten auf die Insulinsekretion $G_{\alpha_{i2}}^{\beta_{\text{cko}}}$ -Inseln	84
3.2.7	Analyse der intrazellulären cAMP-Konzentration in $G_{\alpha_{i2}}^{\beta_{\text{cko}}}$ -Inseln	88
3.2.8	Charakterisierung des Glukose- und L-Arginin-Effektes mit Hilfe der fluorometrischen Einzelzell-Calcium-Messung an β -Zellen ...	90
4	Diskussion	95
4.1	Einfluss des Fehlens der $G_{\alpha_{i2}}$ -Untereinheit auf die Proteinexpression in Langerhans-Inseln globaler und konditionaler $G_{\alpha_{i2}}$ -defizienter Tiere	96
4.2	Die Beteiligung von $G_{\alpha_{i2}}$ an der Glukosehomöostase	99
4.3	Die Rolle von $G_{\alpha_{i2}}$ in der Insulinsekretion	101
4.4	Schlussfolgerung	106
5	Zusammenfassung	108
6	Literaturverzeichnis	110
7	Anhang	129
7.1.1	Antikörper	129
7.1.1.1	Primärantikörper	129
7.1.1.2	Sekundärantikörper	130
7.1.2	Oligonukleotide	130
I.	Eigene Publikationen und Kongressbeiträge	131
II.	Lebenslauf	133
III.	Danksagung	134

Abkürzungen

[Ca] _i	Intrazelluläre Calciumkonzentration	DAPI	4',6-diamidino-2-Phenylindol
[cAMP] _i	Intrazelluläre cAMP-Konzentration	DNS	Desoxyribonukleinsäure
°C	Grad Celsius	dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphat
µg	Mikrogramm	E. coli	<i>Escherichia coli</i>
µl	Mikroliter	ECL	Enhanced Chemolumineszenz
AC	Adenylylzyklase	EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ACA	N-(p-Amylcinnamoyl)anthranilsäure	EGTA	Ethylenglycolbis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ADP	Adenosindiphosphat	EIA	Enzymimmunoassay
ATP	Adenosintriphosphat	ELISA	Enzym-gekoppelter Immunoassay
AK	Antikörper	ER	endoplasmatisches Retikulum
AKT/PKB	Proteinkinase B	ES	embryonale Stammzellen
APS	Ammoniumperoxodisulfat	FCS	fötale Kälberserum
AS	Arachidonsäure	FFA	freie Fettsäure
bp	Basenpaar	fmol	femtomol
BSA	Rinderserumalbumin	g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
c	Konzentration	GDP	Guanosindiphosphat
ca.	circa	GEF	Guaninnukleotid-Austauscher
Ca ²⁺	Calcium-Ion	GIP	Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid
CaCl ₂	Calciumchlorid	GLP-1	Glucagon-like Peptid 1
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	GLUT 2	Glukosetransporter Typ 2
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat	GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid		
Cre	cyclisation recombination		
C-Terminus	Carboxyl-Terminus		
CTX	Choleratoxin		
d	Zelldicke		
d.h.	das heißt		
DAG	Diacylglycerol		

G-Protein	heterotrimeres Guaninnukleotidbindendes Protein	IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
GTP	Guanosintriphosphat	IVC	individuell ventilierte Käfige
GTT	Glukosetoleranztest	K ⁺	Kalium-Ion
G α	α -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine	K _{ATP}	ATP-abhängiger Kaliumkanal
G $\alpha_{i2}^{-/-}$	globale G α_{i2} defiziente Mäuse	KCl	Kaliumchlorid
G $\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$	β -Zell spezifische G α_{i2} -defiziente Mäuse	kDa	Kilodalton
		KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
		KHBS	Krebs-gepufferte HEPES-Lösung
G β	β -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine	Kir6.2	Untereinheit des K _{ATP}
G $\beta\gamma$	Komplex aus G β - und G γ -Untereinheit	ko	knockout, Gen-defiziente Maus
G γ	γ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine	Kon	Kontrolle
h	Stunde	l	Liter
H&E	Hämatoxylin und Eosin	L-VDCC	spannungsgesteuerter L-Typ-Calcium-Kanal
H ₂ O bidest	bidestilliertes Wasser	M	Molar
HBSS	Hanks-gepufferte Salzlösung	mA	Milliampere
HCl	Salzsäure	MgSO ₄	Magnesiumsulfat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure	min	Minute
HRP	Meerrettichperoxidase	ml	Milliliter
IB	Immunoblot	mM	Millimolar
IF	Immunofluoreszenz	mmol/l	Millimol pro Liter
i.p.	intraperitoneal	ms	Millisekunde
IBD	inflammatory bowel disease	n	Anzahl unabhängiger Experimente
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin	NaCl	Natriumchlorid
IHC	Immunhistochemie	NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
		neo	Neomycin-Resistenzkassette
		ng	Nanogramm
		NGS	normales Ziegen-serum
		nm	Nanometer
		N-Terminal	Amino-Terminus
		p	Signifikanzlevel
		PAGE	Polyacrylamid-Gel-elektrophorese

pAKT ₄₇₃	AKT-Phosphorylierung an Serin 473	SDS	Sodiumdodecylsulfat
		sec	Sekunde
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung	SEM	Standardfehler
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	SPF	pathogenfreie Haltungsbedingungen
PCR	Polymerasekettenreaktion	SST	Somatostatin
PFA	Paraformaldehyd	SUR1	Untereinheit des K _{ATP}
pg	Pikogramm	TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
PI3-Kinase	Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K)	TBS	Tris gepufferte Lösung
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat	TN	Tris-NaCl-Puffer
PKA	Proteinkinase A	Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
PKC	Proteinkinase C		
PLC	Phospholipase C	TRP	Transient Receptor Potential
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-monolaurat
PTX	Pertussistoxin	U	Units
RGS	Regulators of G-protein signaling	u.a.	unter anderem
RIA	Radioimmuno-assay	UV	Ultraviolett
Rip	Ratten Insulinpromotor	V	Volt
rpm	Umdrehungen pro Minute	VDCC	spannungsabhängiger Calciumkanal
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> ; Zellkulturmedium	WAT	weißes Fettgewebe
		wt	Wildtyp
RT	Raumtemperatur	z. B.	zum Beispiel
s.	siehe	z. T.	zum Teil

Einbuchstaben-Code der proteinogenen Aminosäuren:

A	Alanin	G	Glycin	M	Methionin	S	Serin
C	Cystein	H	Histidin	N	Asparagin	T	Threonin
D	Aspartat	I	Isoleucin	P	Prolin	V	Valin
E	Glutamat	K	Lysin	Q	Glutamin	W	Tryptophan
F	Phenylalanin	L	Leucin	R	Arginin	Y	Tyrosin

Abbildungen

Abbildung 1.1:	Schema der Glukosehomöostase.....	1
Abbildung 1.2:	Mechanismus der Glukose-induzierten Insulinsekretion	5
Abbildung 1.3:	Aktivierungs- Inaktivierungs-Zyklus der G-Proteine	8
Abbildung 1.4:	Einfluss von GPCRs auf die Insulinsekretion.....	13
Abbildung 1.5:	Cre/loxP-vermittelte Exzision von DNS.....	18
Abbildung 1.6:	Globale und konditionale Deletion im Mausmodell	19
Abbildung 1.7:	Schema zum Ziel der Arbeit.....	22
Abbildung 2.1:	PCR-Strategie zur Analyse der Genotypen sowie der Rekombination in konditionalen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren.....	27
Abbildung 2.2:	Quantifizierung der histologischen Färbungen.....	38
Abbildung 2.3:	Schematischer Ablauf der Hormonsekretionsexperimente.	39
Abbildung 2.4:	Schema des intraperitonealen Glukosetoleranztests	45
Abbildung 3.1:	Expression von $G\alpha_{i2}$ in Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln	48
Abbildung 3.2:	Expression von $G\alpha_{i3}$, in Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln	49
Abbildung 3.3:	Expression von $G\alpha_o$ in Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln.....	50
Abbildung 3.4:	Expression von $G\alpha_s$ und $G\alpha_q$ in Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln	51
Abbildung 3.5:	Expression von $G\beta_1$ und $G\beta_2$ in Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln.....	52
Abbildung 3.6:	Intraperitonealer GTT in Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren.....	53
Abbildung 3.7:	Insulin- und Glukagongehalt in Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Pankreaten.	56
Abbildung 3.8:	Morphologische Untersuchung von Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln ...	58
Abbildung 3.9:	Quantifizierung Insulin- und Glukagon-positiver Zellen in Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln.	60
Abbildung 3.10:	Proliferation von Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln	61
Abbildung 3.11:	Glukagonsekretion isolierter Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln.....	62
Abbildung 3.12:	Insulinsekretion und DNS-Gehalt isolierter Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln.....	63
Abbildung 3.13:	Periphere Insulinsensitivität von Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren basal und nach ad libitum-Fütterung.....	67
Abbildung 3.14:	Rekombinationsanalysen an Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Organen mittels PCR.....	68

Abbildung 3.15:	$G\alpha_{i2}$ -Proteinexpression in Inseln, Hypothalamus und Niere von Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren.	70
Abbildung 3.16:	Untersuchung der Expression von $G\alpha_{i2}$ in Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln	71
Abbildung 3.17:	Expression von $G\alpha_{i3}$, $G\beta_1$ und $G\beta_2$ in Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln	72
Abbildung 3.18:	Untersuchung der Expression von $G\alpha_o$, $G\alpha_s$ und $G\alpha_q$ in Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln.....	74
Abbildung 3.19:	Histologische Untersuchung von Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln....	75
Abbildung 3.20:	Gewichtsentwicklung und basale Blutglukosespiegel (BBG) von Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren.....	76
Abbildung 3.21:	Intraperitonealer Glukosetoleranztest in Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren.....	77
Abbildung 3.22:	Blutglukose- und Plasmainsulinspiegel nüchtern und nach 2 Stunden Zugang zu Futter in Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren	79
Abbildung 3.23:	Gesamtinsulin- und DNS-Gehalt isolierter Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln	80
Abbildung 3.24:	Glukose-induzierte Insulinsekretion isolierter Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln.	81
Abbildung 3.25:	Einfluss von Clonidin und Somatostatin (SST) auf die Insulinsekretion isolierter Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln.....	83
Abbildung 3.26:	Einfluss von Palmitat, L-Arginin und L-Ornithin auf die Insulinsekretion isolierter Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln.....	86
Abbildung 3.27:	Intrazelluläre cAMP-Konzentrationen $[cAMP]_i$ in Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln	89
Abbildung 3.28:	Änderung der intrazellulären Calciumspiegel $[Ca^{2+}]_i$ isolierter Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ - β -Zellen auf verschiedene Stimuli.....	91
Abbildung 3.29:	Einfluss von ACA auf die intrazellulären Calciumspiegel isolierter β -Zellen.....	93
Abbildung 4.1:	Hypothetisches Modell der Beteiligung von $G\alpha_{i2}$ an der L-Arginin induzierten Insulinsekretion.....	106

1 Einleitung

1.1 Glukosehomöostase

Eine lebenswichtige Grundfunktion des Organismus ist die Versorgung der Zellen mit Energie, um die zahlreichen, energieverbrauchenden Prozesse, die ständig im Organismus ablaufen, zu gewährleisten. Dies erfordert die Zufuhr adäquater Energieträger wie Kohlenhydrate, Fette und Proteine. Kohlenhydrate werden bei der Verdauung zu Glukose abgebaut und als solche resorbiert (Mutschler *et al.*, 2007).

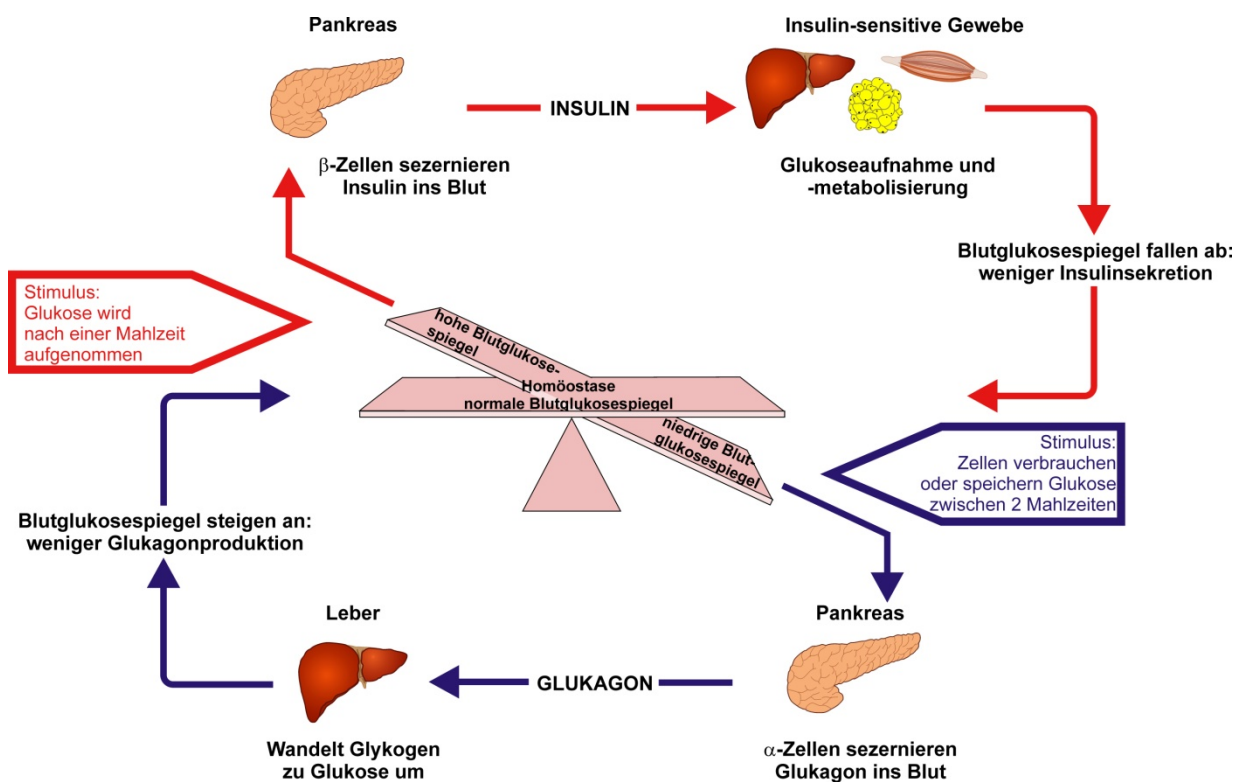


Abbildung 1.1: Schema der Glukosehomöostase. Durch die Balance zwischen Insulin- und Glukagonsekretion werden die Blutglukosespiegel auf einem konstanten Level gehalten (näheres siehe Text, Schema abgeleitet nach Marieb & Hoehn, 2005).

Die Blutglukosespiegel werden in gesunden Individuen normalerweise auf einem Nüchternwert von 3-6 mmol/l konstant gehalten. Das Regelsystem ist dabei in der Lage, auftretende Schwankungen durch Glukoseaufnahme mit der Nahrung, Glukoseverbrauch durch Arbeit oder durch vermehrte Speicherung nachhaltig auszugleichen. Nach einer Mahlzeit wird durch die Erhöhung der Blutglukosespiegel

Insulin aus den β -Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas freigesetzt, welches durch Bindung an den Insulinrezeptor zu einem vermehrten Einbau der Glukosetransportern (Typ 4) in die Plasmamembran Insulin-sensitiver Gewebe führt. Dadurch steigt die Aufnahme von Glukose durch die Leber-, sowie in Muskel- und Fettgewebe und die Blutglukosespiegel sinken. Zusätzlich hemmt Insulin die Glukoneogenese. Einem Abfall der Blutglukosespiegel kann durch Glukagon, dem physiologischen Gegenspieler des Insulins, entgegengewirkt werden. Fallen die Blutglukosespiegel unter den Sollwert, wird Glukagon von den α -Zellen der Langerhans-Inseln sezerniert. Glukagon fördert in der Leber den Abbau der in Form von Glykogen gespeicherten Energiereserven. Außerdem steigert es die hepatogene Glukoneogenese und bewirkt so insgesamt eine Erhöhung der Blutglukosekonzentration. Durch diese Balance zwischen Insulin- und Glukagonsekretion werden die Blutglukosespiegel auf einem konstanten Level gehalten. Eine Entgleisung dieses streng regulierten Gleichgewichts führt zu metabolischen Erkrankungen. Darunter fällt auch die in den westlichen Industrienationen am häufigsten vorkommende Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus. Dieses Krankheitsbild ist ein Sammelbegriff für heterogene Störungen des Stoffwechsels und ist durch die chronische Erhöhung des Blutglukosespiegels charakterisiert. Die Ursache ist entweder ein absoluter oder ein relativer Insulinmangel oder eine Kombination aus beidem. Die wichtigsten Formen sind der Typ-1-Diabetes, an dem 5-10% der Diabetiker in Deutschland leiden, und der Typ-2-Diabetes, dem ca. 90% der Menschen mit Diabetes zuzuordnen sind. Daneben gibt es den Gestationsdiabetes und einige seltene, zahlenmäßig eher unbedeutende Diabetesformen (Kerner & Brückel, 2011). Der Typ-1-Diabetes ist häufig immunologisch vermittelt und führt durch eine β -Zellzerstörung zu einem absoluten Insulinmangel, welcher durch das Insulinmangelsyndrom (typische Symptome: Polyurie, Polydipsie, Ketoazidose und Gewichtsverlust) gekennzeichnet ist. Allein durch eine lebenslange Insulintherapie kann ein Typ-1-Diabetes behandelt werden. Der Typ-2-Diabetes ist die weltweit häufigste Diabetesform und die Zahl der Erkrankungen nimmt stetig zu. Voran geht vielmals eine prädiabetische Phase, die vor allem durch vier Faktoren charakterisiert ist: (abdominelle) Adipositas, Hypertonie, Dyslipidämie und Insulinresistenz. Dieses sogenannte metabolische Syndrom ist sowohl auf exogene Faktoren wie Überernährung und körperliche Inaktivität, als auch auf verschiedene genetische Faktoren zurückzuführen (Alberti *et*

al., 2009; Eckel *et al.*, 2005). Nach und nach kommt es zur Insulinresistenz der peripheren Gewebe, d.h. zu deren Unfähigkeit, die resorbierte Glukose aus dem Blut aufzunehmen (Kerner & Brückel, 2011; Longo, 2012). Zu Krankheitsbeginn kann dies meist durch eine vermehrte Insulinsekretion ausgeglichen werden, so dass die Blutglukosespiegel normal oder nur leicht erhöht sind. Mit der Zeit kommt es zu einer Überbeanspruchung der β -Zellen. Sie sind nicht mehr in der Lage die hohen Sekretionsraten aufrechtzuerhalten und die Insulinfreisetzung nimmt kontinuierlich ab. Daraufhin manifestiert sich der Typ-2-Diabetes in Form von Hyperglykämien. Somit ist eine inadäquate Insulinsekretion mit zahlreichen diabetischen Spätkomplikationen wie Mikro- und Makroangiopathien verbunden (Chillaron *et al.*, 2014; Fonseca *et al.*, 2003).

1.2 Physiologie der Langerhans-Inseln

Unter physiologischen Bedingungen wird die Glukosehomöostase vor allem durch die Peptidhormone Insulin und Glukagon reguliert. Diese werden im endokrinen Teil des Pankreas, den Langerhans-Inseln, gebildet und von dort sezerniert. Das humane Pankreas enthält ca. 1-2 Millionen Inseln, die ungleichmäßig über das gesamte Organ verteilt sind. Sie machen etwa 1-2% des Pankreas aus und bestehen aus 5 verschiedenen, hochspezialisierten Zelltypen: α -Zellen, β -Zellen, δ -Zellen, ε -Zellen und PP-Zellen (Kulkarni, 2004; Prado *et al.*, 2004). ε -Zellen und PP-Zellen sezernieren die Hormone Ghrelin bzw. Pankreatische Polypeptide und stellen nur etwa 1-5% der Inselzellen dar (Wierup *et al.*, 2002). Etwa 10% der Inselzellen sind Somatostatin-produzierende δ -Zellen. Somatostatin ist ein Peptidhormon, das zum einen parakrin die Ausschüttung von Insulin und Glukagon hemmt (Hsu *et al.*, 1991). Zum anderen steuert es im zentralen Nervensystem die Nahrungsaufnahme (Guillermet-Guibert *et al.*, 2005). Glukagon-sezernierende α -Zellen machen ca. 15-30% einer Langerhans-Insel aus. Glukagon stimuliert in der Leber die Glykogenolyse und die Glukoneogenese und führt so zu einer Erhöhung des Blutglukosespiegels. Aufgrund dieser Wirkungen ist es der direkte Gegenspieler des Insulins (Baetens *et al.*, 1979; Lang, 2000). Mit 60-75% der Inselzellen stellen die β -Zellen den größten Teil dar, diese senken durch die Sekretion von Insulin den Blutglukosespiegel (Stefan *et al.*, 1982). Durch die Hauptwirkung des sezernierten Insulins an Muskel und Fettgewebe kommt es zu einer Steigerung der

Glukoseaufnahme in diese Gewebe. Darüber hinaus stimuliert Insulin die Glykogensynthese und hemmt den Glykogenabbau in der Leber. Insgesamt führen diese Schritte zu einem Blutglukoseabfall (Löffler, 2003).

Bei Nagetieren besteht jede Insel aus etwa 2000-4000 Zellen, von denen 5% Somatostatin-produzierende δ -Zellen darstellen. 15-20% der Zellen sind entweder α -Zellen oder PP-Zellen. Die Verteilung der Zelltypen hängt dabei von der Lage der Inseln im Pankreasgewebe ab. Eine größere Häufigkeit der α -Zellen findet man in dem an der Milz angelagerten Teil, welcher sich aus der dorsalen Pankreas-Knospe ableitet und häufig auch als Pankreasschwanz bezeichnet wird. Im Pankreaskopf, welcher nahe am Duodenum liegt und aus der ventralen Pankreas-Knospe entsteht finden sich vermehrt PP-Zellen. Den größten Anteil bilden auch hier mit 70-80% die Insulin-sezernierenden β -Zellen (Kulkarni, 2004).

1.3 Physiologie der Insulinsekretion

Insulin ist ein Peptidhormon, das aus einer A-Kette mit 21 Aminosäuren und einer B-Kette mit 30 Aminosäuren besteht. Die beiden Ketten sind durch zwei Disulfidgruppen miteinander verknüpft. Insulin wird aus Proinsulin nach der Abspaltung des C-Peptids gebildet. Das C-Peptid wird zusammen mit dem Insulinmolekül gespeichert und sezerniert. Insulin wird kontinuierlich freigesetzt. Auch bei niedrigen/basalen Blutglukosespiegeln von ca. 5 mM wird eine geringe Menge an Insulin sezerniert; steigt jedoch die Blutglukosekonzentration über einen Schwellenwert von etwa 10 mM an, führt dies zu einer pulsatilen Freisetzung des Insulins aus intrazellulären Speichergranula.

Wie auch bei vielen anderen Sekretionsprozessen spielen elektrische Signale eine zentrale Rolle bei der Insulinfreisetzung (Dean & Matthews, 1968). Vor allem zwei Arten von Ionenkanälen nehmen essentielle Funktionen bei der Regulation der elektrischen Aktivität von β -Zellen ein. Dies sind ATP-abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) sowie spannungsabhängige Calciumkanäle (VDCC) (Ashcroft & Rorsman, 1989). K_{ATP} -Kanäle setzen sich aus jeweils vier porenbildenden Untereinheiten ($K_{ir6.2}$) und vier Sulfonylharnstoffrezeptoren vom Typ 1 (SUR1) zusammen. Unter basalen Bedingungen sind diese Kaliumkanäle geöffnet, da hier das Verhältnis von ATP zu ADP niedrig ist. Kalium strömt aufgrund des Konzentrationsgradienten aus der Zelle. Das konstante Ausströmen positiv

geladener Kaliumionen trägt zu Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials der β -Zelle bei. Ein Anstieg der Blutglukosekonzentration führt zu einer raschen Aufnahme von Glukose über den Glukosetransporter Typ 2 (GLUT2) in die β -Zelle (Abbildung 1.2).

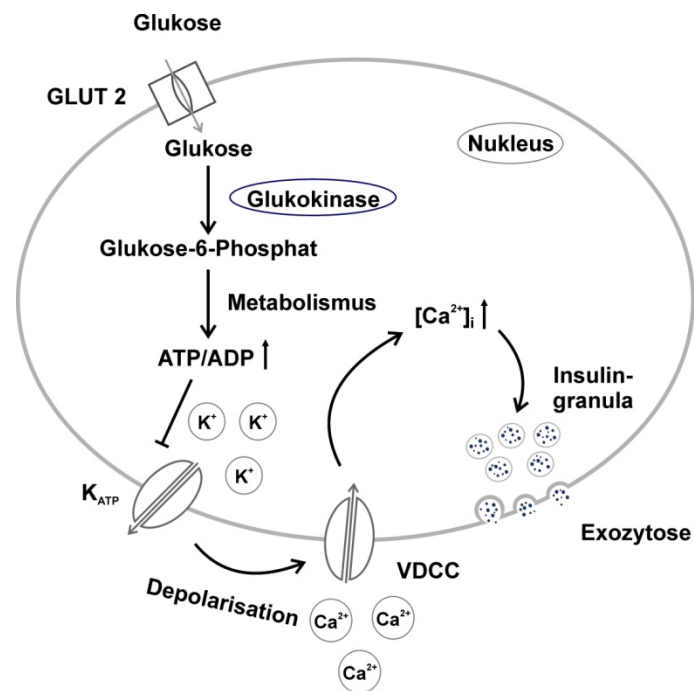


Abbildung 1.2: Mechanismus der Glukose-induzierten Insulinsekretion. Die Aufnahme von Glukose über Glukosetransporter (Typ 2) GLUT 2 Transporter sowie die nachfolgende Metabolisierung resultieren in einer Erhöhung der intrazellulären ATP-Konzentration. Durch das Schließen ATP-abhängiger Kaliumkanäle (K_{ATP}) wird die Zellmembran depolarisiert. Spannungsabhängige Calcium-Kanäle (VDCC) öffnen sich und Ca^{2+} strömt in die Zelle ein. Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ führt zur Exozytose des in Granula gespeicherten Insulins (näheres siehe Text). GLUT 2 - Glukosetransporter Typ 2; ADP - Adenosindiphosphat; ATP - Adenosintriphosphat; ATP/ADP - Verhältnis von Adenosintriphosphat zu Adenosindiphosphat; K_{ATP} - ATP-abhängige Kaliumkanäle; VDCC - spannungsabhängige Calcium-Kanäle; $[Ca^{2+}]_i$ - intrazelluläre Calciumkonzentration; Ca^{2+} - Calciumion; K^+ - Kaliumion.

Dies führt intrazellulär zu einer Steigerung der Stoffwechselaktivität. Die Glukosemoleküle werden durch Glykolyse zu Pyruvat metabolisiert, wobei hier der initiale und gleichzeitig geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Phosphorylierung der Glukose zu Glukose-6-Phosphat darstellt. In den Mitochondrien wird Pyruvat unter Entstehung von ATP im Citratzyklus weiter verstoffwechselt. Es kommt zum Anstieg des intrazellulären ATP/ADP-Quotienten. Die ATP-abhängigen K^+ -Kanäle schließen. Dadurch wird die β -Zelle depolarisiert, spannungsabhängige Calciumkanäle öffnen sich und Calcium strömt vermehrt in die Zelle. Folglich kommt

es zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ und im Rahmen einer elektrosekretorischen Kopplung zur Verschmelzung der insulinhaltigen Speichergranula mit der Plasmamembran und zur Freisetzung von Insulin.

1.4 Die Rolle von G-Proteinen in der β -Zell-Funktion

1.4.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die Kommunikation zwischen verschiedenen Geweben oder einzelnen Zellen innerhalb eines Organismus ist lebenswichtig und auf vielfältige Weise gewährleistet. Dies kann beispielsweise über direkten Kontakt, elektrische Signale oder Signalmoleküle erfolgen (Aplin *et al.*, 1998; Ji *et al.*, 1998; Lee & Juliano, 2004). Die Struktur dieser Signalmoleküle ist sehr unterschiedlich. Es kann sich um Aminosäuren, Steroide, Lipide, Proteine, Peptide, Zucker oder Nukleotide, aber auch lösliche Gase oder Kationen handeln. Außerdem können physikalische Reize oder Umweltreize wie Kälte, Wärme, Licht, Druck und Schmerz, aber auch Geruch und Geschmack wahrgenommen und verarbeitet werden (Kroeze *et al.*, 2003). Viele dieser Signalmoleküle vermitteln ihre Wirkung durch an der Plasmamembran lokalisierte Rezeptoren. Nach der Bindung des extrazellulären Liganden an den Rezeptor erfolgt eine intrazelluläre Weiterleitung wodurch verschiedenste zelluläre Effekte hervorgerufen werden (McKenna & O'Malley, 2001; Parker, 1993). Die größte Gruppe membranständiger Rezeptoren bilden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (**G-protein-coupled receptors**, GPCRs) mit mehr als 1000 kodierenden Genen im Säugetiergenom (Dorsam & Gutkind, 2007; Nürnberg, 2004; Wettschureck & Offermanns, 2005). Der Großteil dieser Rezeptoren wird zu den sensorischen Rezeptoren gezählt, welche an der Geruchs- und Geschmackswahrnehmung beteiligt sind (Ji *et al.*, 1998; Oldham & Hamm, 2008). Etwa 400-500 GPCRs vermitteln Signale von nicht-sensorischen Liganden wie z.B. biogenen Aminen, Aminosäuren, Peptiden, Nukleotiden, Serinproteasen, Fettsäure- oder Phospholipidderivaten (Ji *et al.*, 1998). Für über 140 GPCRs sind die Liganden bis heute nicht bekannt, weshalb sie als sogenannte „Orphan-Rezeptoren“ bezeichnet werden (Levoye *et al.*, 2006).

GPCRs werden auch als heptahelikale Rezeptoren bezeichnet, da sie sieben transmembranäre α -Helixstrukturen haben. Der Aminoterminus ist extrazellulär lokalisiert und kann strukturell variieren. Er ist zusammen mit den extrazellulären

Schleifen sowie Teilen der Transmembranhelices an der Bildung der Ligandenbindungsdomäne beteiligt. Der C-terminale Bereich ist im Zytosol lokalisiert (Ji *et al.*, 1998; Liebmann & Bohmer, 2000; Oldham & Hamm, 2008). Die dreidimensionale Struktur von GPCRs konnte in den letzten Jahren durch Röntgenstrukturanalysen aufgeklärt werden, 2011 gelang es erstmals die Kristallstruktur eines aktiven Liganden-GPCR-G-Protein-Komplexes zu zeigen (Palczewski *et al.*, 2000; Rasmussen *et al.*, 2011; Rasmussen *et al.*, 2007). Hierfür erhielten Brian Kobilka und Robert Lefkowitz 2012 den Nobelpreis für Chemie. GPCRs besitzen selbst keine katalytische Aktivität, sondern vermitteln das Signal durch Liganden-induzierte Konformationsänderung an trimere Guaninnukleotid-bindenden Regulatorproteinen (G-Proteine). G-Proteine sind Enzyme, die als Signaltransduktoren in der Lage sind, Informationen an intrazelluläre Effektoren zu übertragen, die sowohl membranständig als auch zytosolisch lokalisiert sein können (Gudermann *et al.*, 1995; Nürnberg *et al.*, 1995; Wess, 1997). Zu diesen Effektorproteinen zählen z.B. Adenylzyklasen (AC), Phospholipasen A₂, C und D oder Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K). Diese vermitteln das Signal durch die Konzentrationsänderung zellulärer sekundärer Botenstoffe wie z.B. zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Calcium (Ca²⁺), Inositoltrisphosphat (IP₃), Diacylglycerol (DAG) oder Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PI-3,4,5-P₃) (Hamm, 1998; Kurachi & Ishii, 2004; Sunahara *et al.*, 1996; Watts & Neve, 2005).

1.4.2 Aufbau und Funktion von G-Proteinen

Heterotrimere G-Proteine setzen sich aus den drei Untereinheiten G α , G β und G γ zusammen, wobei die G $\beta\gamma$ -Untereinheit unter physiologischen Bedingungen einen undissoziierbaren Komplex bildet (Clapham & Neer, 1997). Die G α -Untereinheit besitzt eine intrinsische enzymatische Aktivität und kann so Guanosintriphosphat (GTP) binden und zu Guanosindiphosphat (GDP) hydrolysieren. Durch Lipidmodifikationen sowohl an G α -, als auch an G $\beta\gamma$ -Untereinheiten können G-Proteine membrangebunden vorliegen, was deren Interaktion mit dem GPCR oder den Effektorproteinen erleichtert. Außer an Plasmamembranen lassen sich G-Proteine auch auf Endomembranen und im Zellkern nachweisen (Gohla *et al.*, 2007a; Gohla *et al.*, 2007b; Marrari *et al.*, 2007; Nürnberg & Ahnert-Hilger, 1996). Nach Bindung eines Liganden an einen GPCR wird zur Weiterleitung des Signals ein

G-Protein aktiviert welches anschließend einen Aktivierungs-Inaktivierungs-Zyklus durchläuft.

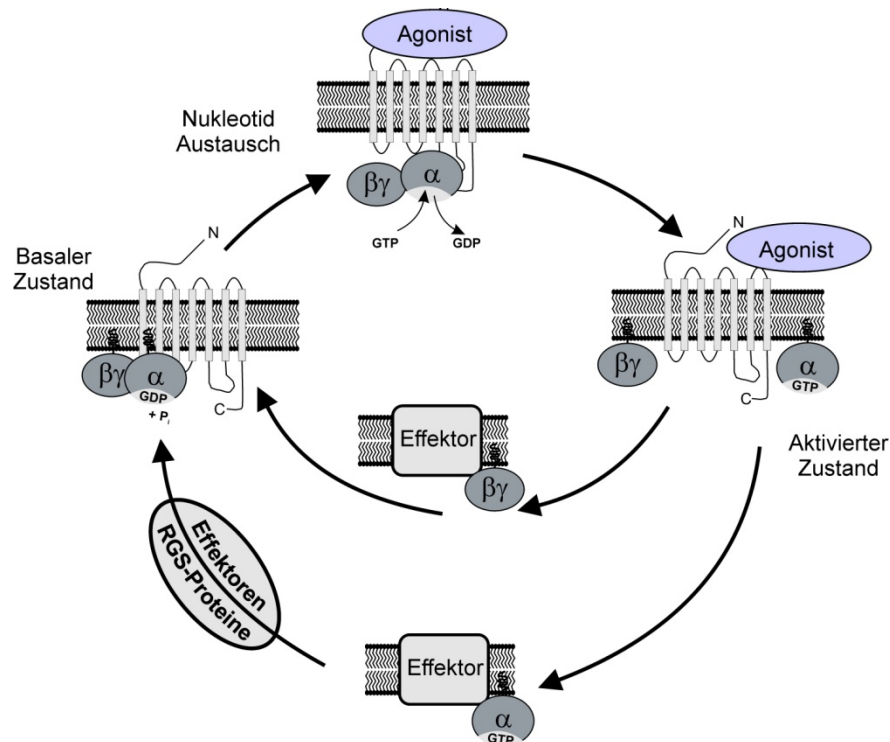


Abbildung 1.3: Aktivierungs- Inaktivierungs-Zyklus der G-Proteine. Der Komplex aus einem 7-Transmembran-Domänen-Rezeptor und dem Agonisten fördert die Freisetzung von GDP aus der α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins. GTP wird in der α -Untereinheit gebunden, wodurch das G-Protein aktiviert wird. Nach der Dissoziation können die GTP- $G\alpha$ -Untereinheit sowie der $G\beta\gamma$ -Komplex verschiedene Effektorproteine modulieren. Die spontane Hydrolyse von GTP zu GDP durch die $G\alpha$ -Untereinheit selbst kann durch verschiedene Effektoren sowie RGS-Proteine beschleunigt werden. Daraufhin reassoziert die GDP-gebundene $G\alpha$ -Untereinheit wieder mit dem $G\beta\gamma$ -Komplex. (Näheres siehe Text, Schema abgeleitet nach Wettchureck & Offermanns, 2005. α - G Protein α -Untereinheit; $\beta\gamma$ - $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins; GDP - Guanosindiphosphat; GTP - Guanosintriphosphat; P_i - anorganisches Phosphat.

Die Aktivität heterotrimerer G-Proteine wird durch die Bindung und Hydrolyse von GTP durch die $G\alpha$ -Untereinheit reguliert, wobei diese nur im GTP-gebundenen Zustand aktiv ist. Im inaktiven GDP-gebundenen Zustand ist die $G\alpha$ -Untereinheit mit dem $G\beta\gamma$ -Komplex als Heterotrimer am GPCR assoziiert. Kommt es zu einer Liganden-induzierten Konformationsänderung des Rezeptors und in der Folge auch des G-Proteins, führt dies zur Öffnung der Guaninnukleotid-Bindungstasche und damit zu einer Freisetzung von GDP aus der $G\alpha$ -Untereinheit. Der aktivierte GPCR wirkt folglich für ein heterotrimeres G-Protein als Guaninnukleotid-Austauscher (**g**uanine nucleotide **e**xchange **f**actor, GEF), indem er die Freisetzung von GDP fördert und den nukleotidfreien Übergangszustand stabilisiert (Oldham & Hamm, 2008). Die nukleotidfreie $G\alpha$ -Untereinheit kann anschließend GTP binden, welches

intrazellulär in wesentlich höheren Konzentrationen als GDP vorliegt. Hierdurch ausgelöst durchläuft die $G\alpha$ -Untereinheit eine erneute Konformationsänderung. Nachfolgend dissoziiert das G-Protein in seine zwei funktionellen Einheiten, die GTP-gebundene $G\alpha$ -Untereinheit und das $G\beta\gamma$ -Dimer (Gilman, 1987; Lambright *et al.*, 1996). Diese können unabhängig voneinander mit ihren jeweiligen Effektoren interagieren und deren Funktionen modulieren. Im letzten Schritt des Zyklus kommt es zur Hydrolyse von GTP zu GDP durch die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit und damit zur Beendigung der Signaltransduktion. Nach der Reassoziierung der $G\alpha$ -Untereinheit mit dem $G\beta\gamma$ -Dimer an dem Rezeptor kann der Aktivierungs-Inaktivierungs-Zyklus erneut durchlaufen werden. Ein Agonist-besetzter Rezeptor kann mehrere G-Proteine aktivieren und somit eine Signalverstärkung induzieren (Nürnberg, 1997). Die Signaldauer ist limitiert durch die GTP-gebundene $G\alpha$ -Untereinheit. Darüber hinaus können auch **G**T**P**ase aktivierende **P**roteine (GAPs) die Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit modulieren. GAPs umfassen beispielsweise Effektor-Proteine wie Phospholipase $C\beta$, Phosphodiesterasen und RGS-Proteine (**r**egulator of **G** protein **s**ignaling). Deren Aktivität kann zur Beendigung eines Signals nach Entfernung des Stimulus führen oder beispielsweise als Rückkopplungsinhibitor ein Signal vermindern (Ross & Wilkie, 2000). Zudem kann die Signaldauer verkürzt werden, indem der G-Protein-Übergangszustand durch die Beschleunigung der GTP-Hydrolyse stabilisiert wird (De Vries *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu kann die heterogene Familie der AGS-Proteine (**a**ctivators of **G**-protein mediated **s**ignaling) G-Proteine unabhängig von einer Rezeptorstimulation aktivieren (Blumer & Lanier, 2014).

Für die Analyse von G_i - und G_s -Protein-vermittelten Signaltransduktionen haben sich zwei bakterielle Exotoxine als wertvolle Werkzeuge erwiesen. Pertussistoxin (PTX), das Exotoxin von *Bordetella pertussis*, katalysiert an einem C-terminalen Cystein-Rest aller $G\alpha_i$ -Proteine, mit Ausnahme von $G\alpha_z$ die Ribosylierung von Adenosindiphosphat (ADP) und führt zu einer funktionellen Entkopplung des G-Proteins vom Rezeptor (Bokoch *et al.*, 1983; Nürnberg, 1997). Eine konstitutive Aktivierung von $G\alpha_s$ -Proteinen kann durch das Exotoxin von *Vibrio cholerae* erzielt werden. Cholera-toxin führt zur Blockade der GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit indem es diese an einem Argininrest ADP-ribosyliert (Zhang *et al.*, 1997). G-Proteine werden im humanen Genom durch Gene für 16 α , 5 β - und 12 γ -Untereinheiten kodiert. Die 16 verschiedenen Gene für $G\alpha$ kodieren bisher für 23 $G\alpha$ -Untereinheiten

mit einem Molekulargewicht zwischen 39 und 45 kDa (Nürnberg *et al.*, 1995). Basierend auf ihrer Sequenzhomologie können die $G\alpha$ -Proteine in vier Subfamilien, $G\alpha_s$, $G\alpha_i$ ($G\alpha_{i/o}$), $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12/13}$ eingeteilt werden (Downes & Gautam, 1999; Simon *et al.*, 1991; Wilkie & Yokoyama, 1994). Für alle 4 Klassen der $G\alpha$ -Untereinheiten wurden inzwischen zelluläre Effektoren beschrieben. Fast 20 Jahre nach der Identifizierung der Adenylylzyklasen wurde ein GTP-bindendes Protein entdeckt, welches diese zu stimulieren vermag und deshalb als $G\alpha_s$ (*stimulatory regulator of adenylyl cyclase G protein*) bezeichnet wurde (Pfeuffer, 1977; Ross & Gilman, 1977). Es existieren 4 Spleißvarianten des $G\alpha_s$ -Gens, welche ubiquitär exprimiert werden und deren zahlreiche Funktionen bereits umfassend beschrieben wurden. Eine homozygote Inaktivierung des $G\alpha_s$ -Gens in Mäusen führt zur frühen embryonalen Letalität. Heterozygote Mäuse weisen eine Vielzahl unterschiedlicher Störungen auf, welche häufig zum Versterben der Tiere führen (Yu *et al.*, 1998). Die Familie der $G\alpha_q$ -Proteine umfasst 4 Mitglieder. $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ sind nahezu ubiquitär exprimiert, wohingegen die Expression von $G\alpha_{14}$ auf Niere, Lunge, Leber und Testes beschränkt ist und $G\alpha_{15}$ bisher nur in hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden konnte (Amatruda *et al.*, 1991; Wilkie *et al.*, 1991). Sie alle vermitteln eine rezeptorabhängige Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und die Bildung der sekundären Botenstoffe Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) (Rhee, 2001). $G\alpha_q$ -defiziente Mäuse zeigen eine gestörte motorische Koordination, eine verlängerte Blutungszeit sowie diverse Malformationen (Offermanns *et al.*, 1997). Eine weitere wichtige zelluläre Funktion der $G\alpha_{q/11}$ -Proteinfamilie ist die Aktivierung von Rho-spezifischen Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (Gohla *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2003). Die beiden Mitglieder $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ der $G\alpha_{12/13}$ -Familie werden in geringen Mengen ubiquitär exprimiert und werden oft von Rezeptoren aktiviert die auch an $G\alpha_{q/11}$ koppeln (Strathmann & Simon, 1990). Die Familie der $G\alpha_{i/o}$ -Proteine wird in Abschnitt 1.4.3 beschrieben.

Die $G\beta\gamma$ -Dimere bilden unter physiologischen Bedingungen einen undissoziierbaren Komplex aus einer $G\beta$ - und einer $G\gamma$ -Untereinheit und sind somit als eine funktionelle Einheit anzusehen (Clapham & Neer, 1997; Sodek *et al.*, 1996). Die mittlerweile 5 (einschließlich Spleißvarianten 7) charakterisierten $G\beta$ -Isoformen besitzen ein Molekulargewicht von 35-39 kDa und weisen mit 78–88% (für $G\beta_{1-4}$) eine relativ hohe Sequenzidentität auf, wohingegen sich die zentralnervös exprimierte Isoform $G\beta_5$ mit

50% Sequenzhomologie sowohl strukturell als auch funktionell von den übrigen unterscheidet (Clapham & Neer, 1997; Maier *et al.*, 2000; Smrcka, 2008). Von den mit 6-8 kDa deutlich kleineren $G\gamma$ -Isoformen, welche mit 27-76% Sequenzidentität eine hohe Diversität aufweisen, wurden bislang 12 Familienmitglieder beschrieben. Somit ergibt sich eine hohe Anzahl potentieller Kombinationen an $G\beta\gamma$ -Dimeren (Schwindinger & Robishaw, 2001). Der $G\beta\gamma$ -Komplex spielt eine wichtige Rolle bei der Rezeptor-induzierten Regulation des Nukleotidaustausches im G-Protein, in dem er die spontane Freisetzung von GDP aus der α -Untereinheit behindert und deren Affinität zum GPCR erhöht (Hamm, 1998; Sprang, 1997). Nachdem lange Zeit angenommen wurde, dass der $G\beta\gamma$ -Komplex nur an der Aktivierung/Inaktivierung sowie der Membranassoziation der $G\alpha$ -Untereinheit beteiligt ist, wurden inzwischen jedoch zahlreiche eigene Effektoren von $G\beta\gamma$ -Komplexen beschrieben (Sternweis, 1986; Vanderbeld & Kelly, 2000). Beispielsweise stellen G-Protein-regulierte, einwärts gleichgerichtete Kaliumkanäle, bestimmte Isoformen der Adenylylzyklase und Phospholipase C, Phospholipase A_2 sowie spannungsgesteuerte Calciumkanäle, $PI3K\beta$ und $PI3K\gamma$ Effektoren der $G\beta\gamma$ -Untereinheit dar (Exton, 1996; Kim *et al.*, 1989; Sunahara *et al.*, 1996; Vanhaesebroeck *et al.*, 2001; Wickman *et al.*, 1998). Die $G\beta\gamma$ -vermittelten Signale werden entweder durch Rekrutierung zytosolischer Proteine durch den membrangebundenen $G\beta\gamma$ -Komplex an die Plasmamembran oder durch eine allosterische Aktivierung vermittelt. Allerdings ist bislang über die Rezeptor-Spezifität $G\beta\gamma$ -Komplex-vermittelter Signale wenig bekannt (Cabrera-Vera *et al.*, 2003). Da die zelluläre Expression von $G\alpha_i$ und $G\alpha_o$ -Proteinen jedoch relativ hoch ist, führt die Aktivierung von $G\alpha_i$ -gekoppelten Rezeptoren zur Freisetzung vergleichsweise großer Mengen an $G\beta\gamma$. Somit stellen diese die wichtigsten Mediatoren $G\beta\gamma$ -vermittelter Signalwege dar (Wettschureck & Offermanns, 2005).

1.4.3 Die $G\alpha_{i/o}$ -Familie

Die Unterfamilie mit den zahlenmäßig meisten Vertretern bildet die $G\alpha_i$ -Familie. Hierzu gehören die α -Untereinheiten $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_{o1}$, $G\alpha_{o2}$, $G\alpha_z$, $G\alpha_{gust}$, $G\alpha_{t-r}$ und $G\alpha_{t-c}$. Der Name der $G\alpha_i$ -Familie leitet sich insbesondere von der Fähigkeit der $G\alpha_{i1}$ -, $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Isoformen ab, Rezeptor-vermittelt diverse Isoformen der Adenylylzyklase zu inhibieren. $G\alpha_i$ steht eigentlich für inhibitorisches G-Protein (Sunahara *et al.*, 1996; Wettschureck & Offermanns, 2005). $G\alpha_z$ ist das einzige

G-Protein der $G\alpha_i$ -Familie welches kein PTX Substrat darstellt. Es wird vor allem neuronal und in Thrombozyten exprimiert (Spicher *et al.*, 1988). Untersuchungen an $G\alpha_2$ -defizienten Mäusen weisen auf dessen Rolle in der Thrombozytenaktivierung und der Signaltransduktion verschiedener Neurotransmitter im zentralen Nervensystem hin (Yang *et al.*, 2000). Das sensorische G-Protein Gustducin ($G\alpha_{gust}$) vermittelt die Geschmacksrichtungen bitter und süß (Wong *et al.*, 1996). Nach Aktivierung des Licht-sensitiven GPCRs Rhodopsin führt Transducin ($G\alpha_{t-r}$, $G\alpha_{t-c}$) zur Weiterleitung des Signals durch die Aktivierung einer cGMP-abhängigen Phosphodiesterase (Arshavsky *et al.*, 2002). Die Expression der beiden $G\alpha_o$ -Spleißvarianten, $G\alpha_{o1}$ und $G\alpha_{o2}$, beschränkt sich vor allem auf das zentrale und periphere Nervensystem, endokrines Gewebe und Kardiomyozyten (Jiang & Bajpayee, 2009). Die prädominante und ubiquitär exprimierte $G\alpha_i$ Isoform ist $G\alpha_{i2}$. Vorwiegend in neuronalem Gewebe konnte $G\alpha_{i1}$, vor allem in nicht-neuronalen Geweben $G\alpha_{i3}$ nachgewiesen werden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit (89-95% Aminosäuresequenzidentität) der drei $G\alpha_i$ -Isoformen besteht die Möglichkeit, dass diese, sollte eine der drei Isoformen fehlen, für die Funktion der jeweils anderen kompensieren. Daher kann eine Redundanz nicht ausgeschlossen werden. Zahlreiche Befunde in $G\alpha_i$ -defizienten Mauslinien zeigten jedoch, dass $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Proteine trotz ihrer hohen Aminosäuresequenzähnlichkeit unterschiedliche und nicht redundante Funktionen besitzen (Ezan *et al.*, 2013; Gohla *et al.*, 2007a). Beispielsweise ist $G\alpha_{i2}$, jedoch nicht $G\alpha_{i3}$ an der C5a induzierten Chemotaxis von Makrophagen beteiligt (Wiege *et al.*, 2012).

1.4.4 Regulation der Insulinsekretion durch G-Proteine

Insulin ist für den Glukosestoffwechsel essentiell, weswegen seine Freisetzung aus den β -Zellen engmaschig kontrolliert wird. Obwohl Glukose der Hauptmediator der Insulinsekretion ist, kann diese zusätzlich durch weitere Faktoren sowohl positiv als auch negativ moduliert werden. Ziel dieser Hormone, freien Fettsäuren, Neuropeptide und Neurotransmitter ist es, die Insulinsekretion ideal an physiologische Anforderungen anzupassen (Lang, 1999; Sharp, 1996). An der Schnittstelle zwischen diesen im Organismus zirkulierenden Faktoren und der Insulinsekretion stehen GPCRs. Ihre Wirkung entfalten sie dabei unter anderem direkt an den pankreatischen β -Zellen, wodurch sie auf diese Weise die

Insulinsekretion beeinflussen. Murine Langerhans-Inseln exprimieren mindestens 28 der insgesamt 392 verschiedenen GPCRs teilweise in hoher Dichte (Regard *et al.*, 2007; Vassilatis *et al.*, 2003). Für einen Teil dieser Rezeptoren konnte die physiologische Beteiligung an der Insulinsekretion bereits gezeigt werden. So hemmt beispielsweise Adrenalin G_{α_i} -vermittelt über α_2 -Adrenorezeptoren die Insulinsekretion. Wohingegen das aus L-Zellen sezernierte Glukagon-like-Peptide-1 die Insulinsekretion durch Aktivierung G_{α_s} -gekoppelter GPCRs stimuliert (siehe Abbildung 1.4).

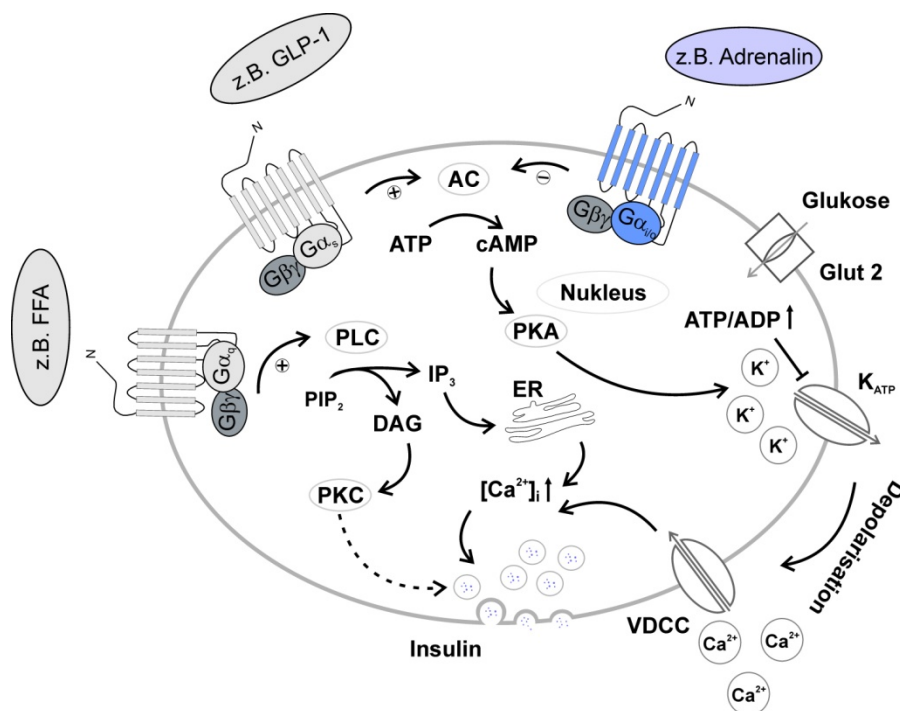


Abbildung 1.4: Einfluss von GPCRs auf die Insulinsekretion. Die Glukose-induzierte Insulinsekretion kann durch verschiedene G-Protein-gekoppelte Signalwege sowohl positiv als auch negativ reguliert werden. Generell führt die Aktivierung $G_{s/q}$ -vermittelter Signalwege zu einer Verstärkung der Insulinsekretion, während der Aktivierung $G_{i/o}$ -vermittelter Signalwege bislang eine Verminderung der Insulinsekretion zugesprochen wurde. Nähere Erläuterungen siehe Text. GLUT 2 - Glukosetransporter Typ 2; ADP - Adenosindiphosphat; ATP - Adenosintriphosphat; ATP/ADP - Verhältnis von Adenosintriphosphat zu Adenosindiphosphat; cAMP - zyklisches Adenosinmonophosphat; AC - Adenylylzyklase K_{ATP} - ATP-abhängige Kaliumkanäle; PKA - Proteinkinase A; PKC - Proteinkinase C; PLC - Phospholipase C; IP_3 - Inositoltrisphosphat; PIP_2 - Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; DAG - Diacylglycerol; VDCC - spannungsabhängige Calcium-Kanäle; $[Ca^{2+}]_i$ - intrazelluläre Calciumkonzentration; Ca^{2+} - Calciumion; K^+ - Kaliumion.

Fettsäuren steigern durch Bindung an G_{α_q} -gekoppelte Rezeptoren ebenfalls die Insulinsekretion. Für andere GPCRs wiederum existieren potentielle Liganden deren Beteiligung an der Insulinsekretion bereits bekannt ist, deren Rezeptoren oder exakte

physiologische Bedeutung bisher aber nicht genauer untersucht wurde. Außerdem gibt es eine Reihe sogenannter Orphan-Rezeptoren, deren Expression bereits auf der β -Zelle gezeigt wurde, die jeweiligen an der Insulinsekretion beteiligten Liganden allerdings noch unbekannt sind (Regard *et al.*, 2007). Entscheidend für die Insulinsekretion ist immer ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Neben Glukose tragen G-Protein-vermittelte Signalwege entscheidend zu einer Steigerung oder Hemmung der Insulinsekretion bei. Die Signalweiterleitung über $G\alpha_q$ -Proteine führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Diese hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). DAG wiederum aktiviert seinerseits die Proteinkinase C und IP_3 führt zu Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern (dem endoplasmatischen Retikulum, ER). Die Folge ist eine gesteigerte Insulinsekretion. Über $G\alpha_s$ -gekoppelte Rezeptoren werden Adenylylzyklasen (AC) aktiviert, cAMP wird vermehrt aus ATP gebildet das die Proteinkinase A aktiviert.

$G\alpha_s$ und/oder $G\alpha_{q/11}$ vermittelten Signalwegen wird vor allem eine stimulatorische Wirkung auf die Insulinfreisetzung zugesprochen (Wettschureck & Offermanns, 2005). Potente Stimulatoren der Insulinsekretion stellen die Inkretine dar, welche nach einer Mahlzeit aus L- und K-Zellen des Darms sezerniert werden und die Glukose-induzierte Insulinsekretion potenzieren. Die bedeutendsten Vertreter sind GLP-1 (**G**lucagon-like **P**eptid **1**) und GIP (**G**lukoseabhängiges insulinotropes **P**eptid), welche jeweils durch Bindung an ihre spezifischen $G\alpha_s$ -gekoppelten GPCRs auf der β -Zelle durch Aktivierung der AC zu einer Stimulation der Insulinsekretion führen (Ahren & Filipsson, 1998; Drucker & Nauck, 2006). Darüber hinaus können Inkretine die β -Zell-Proliferation stimulieren und dadurch zu einer Erhöhung der β -Zellmasse führen (Trumper *et al.*, 2001). Die therapeutische Relevanz des Inkretin-Effekts verdeutlichte sich vor einigen Jahren, als mit Exenatid das erste GLP-1-Analogon zur Behandlung des Typ-2-Diabetes zugelassen wurde (Buse *et al.*, 2004). Ebenfalls unter den 28 häufigsten GPCRs in murinen Inseln sind die G_s PCRs P2Y1 und P2Y6 sowie VPAC1 zu nennen, über welche Purine bzw. das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) die Glukose-induzierte Insulinsekretion cAMP-abhängig stimulieren können (Chevassus *et al.*, 2002; Filipsson *et al.*, 2001; Regard *et al.*, 2007). Neben Glukose können im Blut zirkulierende freie Fettsäuren (**free fatty acid**, FFA) die Insulinsekretion beeinflussen. Am besten charakterisiert ist dabei die stimulatorische Wirkung langkettiger FFAs über den G_q PCR GPR40 und den G_s PCR GPR119 (Itoh

et al., 2003; Lauffer *et al.*, 2008). Der Glukagon-Rezeptor, welcher als $G\alpha_s$ -gekoppelt beschrieben wird, ist auf β -Zellen exprimiert und kann so zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration führen. Glukagon kann somit als parakrines Hormon Glukose-abhängig die Insulinsekretion stimulieren (Ahren, 2009; Huypens *et al.*, 2000). Unter den fünf Muskarinrezeptoren ist der $G\alpha_q$ -gekoppelte M_3 -Rezeptor derjenige, welcher für die Stimulation der Insulinsekretion von Bedeutung ist. Dieser ist vor allem an der frühen Phase nach der Nahrungszufuhr von Bedeutung, in der sowohl die Insulin-, als auch die Glukagonsekretion durch eine Aktivierung des *Nervus vagus* stimuliert werden (Ahren *et al.*, 1986; Gautam *et al.*, 2006). Ein weiterer aus Darm und exokrinem Pankreas sezernierter Faktor ist Cholecystokin (CCK), welcher die Insulinsekretion über einen G_qPCR stimuliert (Verspohl & Herrmann, 1996). Außerdem exprimieren murine β -Zellen den $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelten GPR41 und den sowohl $G\alpha_q$ - als auch $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelten GPR43 (Le Poul *et al.*, 2003; Regard *et al.*, 2007). Für diese Rezeptoren wurden kurzkettige FFA als endogene Liganden identifiziert, die genaue Auswirkung auf die Insulinsekretion ist bislang jedoch nicht hinreichend geklärt (Regard *et al.*, 2007).

Die Beteiligung von $G\alpha_{i/o}$ -Proteinen an der Insulinsekretion wurde ursprünglich durch Studien mit PTX an Tieren und Zellen aufgedeckt (Gulbenkian *et al.*, 1968; Toyota *et al.*, 1978). PTX auch als Insel-aktivierendes Protein (IAP) bezeichnet, verringert die Blutglukosespiegel indem es die Insulinsekretion aus den β -Zellen erhöht (Katada & Ui, 1979a; Katada & Ui, 1979b). Diese verstärkte Sekretion kommt durch die Wegnahme der tonischen Hemmung von Neurotransmittern und Hormonen wie Adrenalin, Galanin und Ghrelin zustande (Porte, 1967; Reimer *et al.*, 2003; Schnuerer *et al.*, 1987). Katecholamine beeinflussen die Insulinsekretion, indem sie sowohl als Stimulatoren durch G_s -gekoppelte β_2 -Rezeptoren, als auch als Inhibitoren durch $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte α_2 -Rezeptoren fungieren. Der inhibierende Effekt ist allerdings der dominierende, da die Expression von α_2 -Rezeptoren in den Inseln überwiegt (Regard *et al.*, 2007). Die Wirkungen von Noradrenalin an der pankreatischen β -Zelle beinhalten die Aktivierung von K^+ -Kanälen, die Hemmung der Adenylylzyklasen, die direkte Hemmung der Exozytose sowie die Verzögerung der Wiederbefüllung der Insulinvesikel und die Hemmung der Endozytose (Lang, 1999; McDermott & Sharp, 1993; Seaquist *et al.*, 1994; Sharp, 1996; Zhao *et al.*, 2010b; Zhao *et al.*, 2010c; Zhao *et al.*, 2008). Nur der letztgenannte Effekt von Noradrenalin, wird durch $G\alpha_z$ und nicht über die PTX-sensitiven $G\alpha_i$ - und $G\alpha_o$ -Proteine vermittelt.

Das aus der Epiphyse sezernierte Hormon Melatonin ist ebenfalls an der Insulinsekretion beteiligt. Melatonin vermittelt über seine GPCRs MT1 und MT2 eine inhibitorische Wirkung auf die Insulinsekretion und könnte für deren tageszeitabhängige Regulation verantwortlich sein (Ahren, 2009; Picinato *et al.*, 2002). Für die Peptidhormone Ghrelin (**G**rowth **h**ormone **r**elease **i**nducing) und Galanin wurde ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf die Insulinsekretion nachgewiesen. Diese scheint durch $G_{\alpha_{i/o}}$ -Proteine vermittelt zu werden, wobei für Ghrelin die Beteiligung von $G_{\alpha_{i2}}$ und für Galanin die Beteiligung von $G_{\alpha_{o2}}$ diskutiert wird (Dezaki *et al.*, 2004; Dezaki *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2012). Die inhibierende Wirkung des parakrinen δ -Zell-Hormons Somatostatin auf die Insulinsekretion ist bereits seit vielen Jahren beschrieben (Gerich *et al.*, 1974; Ullrich *et al.*, 1990) und wird hauptsächlich über $G_{\alpha_{o2}}$ -Proteine vermittelt (Wang *et al.*, 2011). Diese $G_{\alpha_{o2}}$ -vermittelte Inhibierung der Insulinsekretion weist ebenfalls auf cAMP-unabhängige Mechanismen hin. Es spielen dabei vornehmlich direkte Einflüsse auf die K_{ATP} -Kanäle, die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle sowie die Exozytose-Prozesse eine Rolle (Tang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011).

1.5 Globale und konditionale Gendeletion im Mausmodell

Häufig werden zur gezielten Funktionsanalyse bestimmter Gene sogenannte Knockoutmodelle genutzt, in denen ein oder mehrere im Focus stehende Gene in einem Organismus bereits auf genomischer Ebene deletiert werden. Es existieren verschiedene Strategien um Gene in Mäusen auszuschalten. Zum einen die globale Knockout-Strategie, bei der das durch genetische Inaktivierung veränderte Gen in die Keimbahn eingebracht wird und so zu dessen Funktionsverlust in allen Zellen der Maus führt. Zum anderen gibt es die Möglichkeit der konditionalen Deletion. Ein dabei häufig genutztes Vorgehen ist der Einsatz des Cre/loxP-Rekombinationssystems: Hierbei kann die Geninaktivierung sowohl gewebe-, als auch zeitspezifisch erfolgen (Gu *et al.*, 1993; Lukowski *et al.*, 2005; Nagy, 2000).

Bei der globalen Deletion wird ein wichtiges Gensegment, meist mehrere Exone des Zielgens in pluripotenten, embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) gezielt entfernt. Das Ziel ist dabei einen frühzeitigen Abbruch der Transkription oder der Translation zu bewirken und dadurch die Genexpression zu verhindern. Diese manipulierten ES-Zellen werden in die Keimbahn eingebracht, wodurch in den Nachkommen das

entsprechende Gen in allen Zellen deletiert ist. Häufig führen diese globalen Nullmutationen zu einer verringerten Lebenserwartung oder sind embryonal letal. Ein weiteres Problem sind die oft komplexen und schwierig zu interpretierenden Phänotypen, da es zu Kompensationsmechanismen kommen kann oder mehrere Gewebe an der Regulation eines physiologischen Vorgangs beteiligt sind. Bei der konstitutiven $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mauslinie wurde eine Neomycin-Resistenzkassette in Exon 3 des *Gnai2*-Genes eingefügt, wodurch die zentrale Struktur für die GTP-Bindung und -Hydrolyse zerstört wird (Rudolph *et al.*, 1995). Diese Tiere sind lebensfähig, zeigen jedoch eine Wachstumsretardierung (Jiang *et al.*, 1997; Rudolph *et al.*, 1995). Zudem führt das Fehlen des $G\alpha_{i2}$ -Proteins zu einem multimorbiden Phänotyp. Das offensichtlichste Krankheitsbild der Mäuse ist eine diffuse, entzündliche Darmerkrankung (*inflammatory bowel disease*, IBD), die der humanen Colitis ulcerosa ähnelt und in deren Folge diese Tiere häufig letale Adenokarzinome entwickeln (Hornquist *et al.*, 1997; Rudolph *et al.*, 1995). Das Auftreten der IBD wird durch die Haltung in individuell ventilierten Käfigen in einem spezifiziert pathogenfreien Bereich reduziert bis vermieden (Wiege *et al.*, 2013). Als Ursache für das Auftreten der IBD wird eine fehlende Suppression der Produktion proinflammatorischer Zytokine durch $G\alpha_{i2}$ -vermittelte Signalwege diskutiert. So ist die IBD in $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren von einer Zunahme der T_H1 -Typ-Zytokine und Interleukin 12 begleitet. Außerdem wurde eine erhöhte Basalproduktion an Interleukin 12 durch antigenpräsentierende Zellen beschrieben (He *et al.*, 2000; Hornquist *et al.*, 1997; Ohman *et al.*, 2000). Ebenfalls ist die B-Zellentwicklung verändert. Dies führt zu einer reduzierten Produktion von antiinflammatorisch-wirkendem Interleukin 10 und einer Verminderung chemotaktischer Signalwege. Des Weiteren zeigen $G\alpha_{i2}$ -defiziente B-Zellen eine verminderte Migration in Lymphknoten (Dalwadi *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2010). Zusätzlich zu den immunologischen Defekten wurden auch Veränderungen im Herz-Kreislaufsystem beschrieben. So fehlt in $G\alpha_{i2}$ -defizienten Kardiomyozyten die muskarinerge inhibitorische Regulation spannungsgesteuerter L-Typ-Calcium-Kanäle (L-VDCC) (Chen *et al.*, 2001). Außerdem führt die Deletion von $G\alpha_{i2}$ zu einer veränderten L-VDCC mRNA-Expression, einer erhöhten Herzfrequenz und einer Neigung zu ventrikulären Arrhythmien (Dizayee *et al.*, 2011; Zuberi *et al.*, 2008; Zuberi *et al.*, 2010). Darüber hinaus scheint $G\alpha_{i2}$ an der kardioprotektiven Funktion von β_2 -adrenergen Rezeptoren beteiligt zu sein (Foerster *et al.*, 2003). Allerdings könnte

jedoch eine funktionelle Kompensation durch eine andere hoch-homologe $G\alpha_i$ -Isoform den Phänotyp der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse maskieren. Dass der Verlust einer $G\alpha_i$ -Isoform zur kompensatorischen Gegenregulation einer anderen $G\alpha_i$ -Isoform führt wurde bereits beschrieben (Rudolph *et al.*, 1996; Wiege *et al.*, 2013; Wiege *et al.*, 2012). Um diese möglichen Kompensationsmechanismen zu umgehen und da speziell die Insulinsekretion und -wirkung durch verschiedenste Zelltypen kontrolliert und beeinflusst wird ist die konditionale Deletion von $G\alpha_{i2}$ mit Hilfe des Cre/loxP-Systems ein geeignetes Mittel um dessen spezifische Funktionen Zell-bezogen zu untersuchen (Abbildung 1.5).

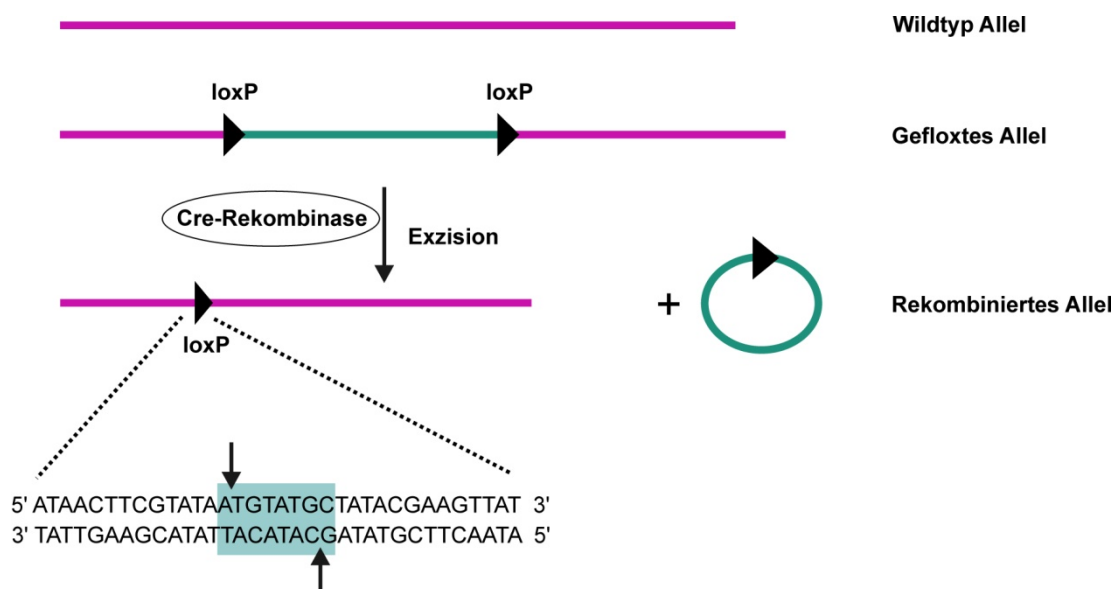


Abbildung 1.5: Cre/loxP-vermittelte Exzision von DNS. Die loxP-Sequenz (schwarze Dreiecke) besteht aus 34 Basenpaaren (bp). Die Rekombination erfolgt an den durch Pfeile markierten Schnittstellen. Diese werden von 2 palindromischen Sequenzen mit einer Länge von jeweils 13 bp flankiert. Die gleichgerichtete Orientierung der loxP-Stellen führt zur Exzision eines zirkulären Produktes. Schema abgeleitet nach Lukowski *et al.*, 2005.

Das Cre/loxP-Rekombinationssystem bedient sich der Cre-Rekombinase (cyclisation recombination) des Bakteriophagen P1. Diese katalysiert die Spaltung und Neuverknüpfung von DNS zwischen zwei spezifischen loxP-Erkennungssequenzen (locus of X-over of P1). Liegt ein Genabschnitt zwischen zwei loxP-Sequenzen, spricht man von einem gefloxted DNS-Segment (flanked by loxP) (Sauer & Henderson, 1988). Die loxP-Sequenzen bestehen aus zwei palindromischen Sequenzen von jeweils 13 Basenpaaren und einem zentralen Element von

8 Basenpaaren, welches die Orientierung der loxP-Sequenz bestimmt. Sind zwei loxP-Sequenzen in gleicher Richtung orientiert, wird der flankierte DNS-Abschnitt herausgeschnitten (Exzision). Die verbleibenden loxP-Enden werden zusammengefügt, wobei eine einzelne loxP-Sequenz auf dem Chromosom zurückbleibt und ein zirkulärer DNS-Abschnitt entsteht, welcher in der Zelle abgebaut wird (Gu *et al.*, 1993; Lukowski *et al.*, 2005; Nagy, 2000). Dass dieses System auch zuverlässig in Säugerzellen funktioniert, wurde vor etwa 20 Jahren klar, als das Cre/loxP-System erstmals zur gewebespezifischen Deletion von Genen herangezogen wurde (Gu *et al.*, 1994). Um solche konditionalen Tiere zu generieren, müssen die loxP-Sequenzen durch homologe Rekombination in das Mausgenom eingebracht werden. Dazu werden in die Introns vor und nach einem (oder mehreren) wichtigen Exon(en) zwei gleichgerichtete loxP-Sequenzen eingebaut. Die Expression dieser geflochten Gene unterscheidet sich nicht vom Wildtyp, da die loxP-Sequenzen in Introns kloniert werden und deshalb bei der Gentranskription herausgeschnitten werden.

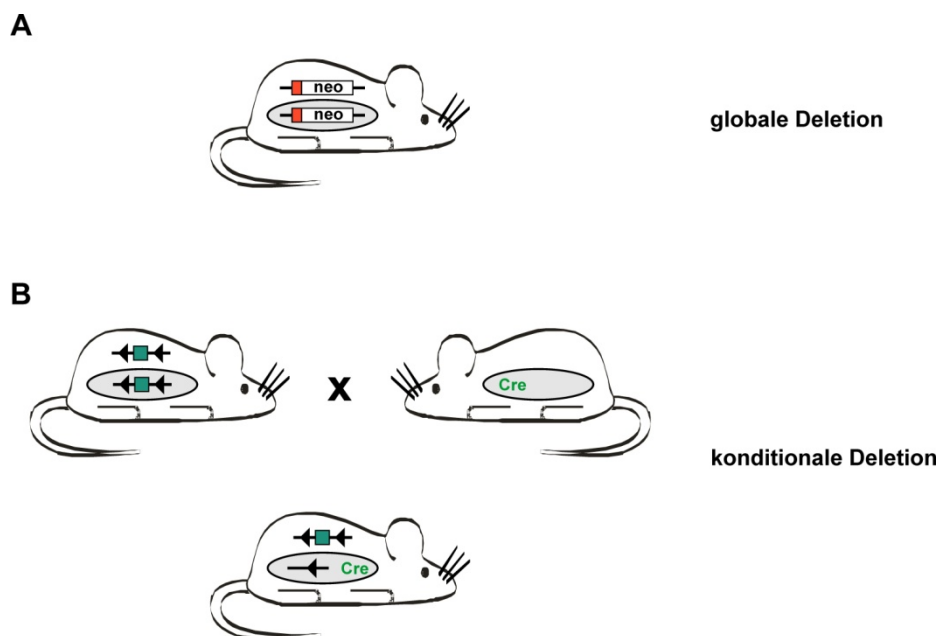


Abbildung 1.6: Globale und konditionale Deletion im Mausmodell. (A) Bei der globalen Deletion eines Gens wird in allen Geweben und Organen ein wichtiges Exon (rotes Rechteck) des Gens unter Verwendung einer Neomycin-Resistenzkassette (neo) entfernt. Die Löschung manifestiert sich bereits in der Keimbahn. (B) Gewebespezifische Deletion eines Gens. Eine Maus mit einem geflochten Gen wird mit einer Maus gekreuzt, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors exprimiert. In dieser Arbeit ist dies der Insulin-Promotor, welcher die Cre-Expression spezifisch in der pankreatischen β -Zelle steuert. Schema abgeleitet nach Lukowski *et al.*, 2005.

Um gewebespezifisch das gefloxtete Gen auszuschalten, wird eine zweite, transgene Mauslinie eingekreuzt, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors exprimiert (Abbildung 1.6). In den Nachkommen wird das Zielgen in allen Geweben ausgeschaltet, in denen die Cre-Rekombinase aktiv ist und es zu einer Exzision des Exons kommt (Gu *et al.*, 1993; Lukowski *et al.*, 2005; Nagy, 2000). Inzwischen ist die Zahl unterschiedlicher transgener Cre-Mauslinien bereits auf über 500 angestiegen. Darüber hinaus können mittlerweile nicht nur gewebe- sondern auch zeitspezifisch Gene mit Hilfe Tamoxifen-induzierbarer Cre-Linien ausgeschaltet werden. Dies trug bereits zu einem genaueren und vor allem zellspezifischen Verständnis verschiedener Genfunktionen bei (Metzger & Chambon, 2001; Nagy *et al.*, 2009).

In dieser Arbeit wurden Tiere verwendet, die die loxP-Stellen vor Exon 2 und nach Exon 4 des *Gnai2*-Genes tragen (Plummer *et al.*, 2012; Sebastian *et al.*, 2013; Ustyugova *et al.*, 2012). Diese wurden mit transgenen Tieren verpaart, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Ratten-Insulin-Promotors (rat insulin promotor) (Rip-Cre) exprimieren (Herrera, 2000). Dies führt zur Deletion von $G\alpha_{i2}$ ausschließlich in den β -Zellen der Langerhans-Inseln, da der Insulin-Promotor nur in diesen Zellen aktiv ist. Somit wird nur in den β -Zellen die Cre-Rekombinase exprimiert wodurch eine Zell-spezifische Rekombination erfolgt.

1.6 Ziel der Arbeit

Um die Energieversorgung des Organismus und damit die Glukosehomöostase konstant zu halten findet ein eng reguliertes Zusammenspiel anaboler und kataboler Stoffwechselprozesse statt. Die Bauchspeicheldrüse bildet zur Aufrechterhaltung des Blutzuckerspiegels zwei wichtige Hormone: Insulin und Glukagon. Für diese Prozesse sind u.a. Signale an GPCRs und deren intrazelluläre Weiterleitung durch G-Proteine von entscheidender Bedeutung. Eine Beteiligung von inhibitorischen G-Proteinen an der Hemmung der Insulinsekretion konnte bereits durch PTX-Studien an Ratten und Mäusen gezeigt werden (Gulbenkian *et al.*, 1968; Toyota *et al.*, 1978; Yajima *et al.*, 1978). Allerdings wurde bisher allen PTX-sensitiven G-Proteinen eine inhibitorische Funktion bei der Freisetzung von Insulin zugeschrieben. Um Isoform-spezifische Rollen zu differenzieren wurden bisher $G\alpha_o$ -defiziente Tiere untersucht. Dabei zeigte sich, dass $G\alpha_o$ einen maßgeblichen Anteil an der Hemmung der Insulinsekretion hat (Tang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011). Die Beteiligung der quantitativ dominanten $G\alpha_{i2}$ -Isoform an der Glukosehomöostase und der Insulinsekretion ist dagegen bisher unzureichend geklärt.

Ziel dieser Arbeit ist es, durch die Charakterisierung von globalen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen sowie Tieren, denen das $G\alpha_{i2}$ -Protein spezifisch in den Insulin-sezernierenden β -Zellen fehlt, auf die funktionelle Beteiligung von $G\alpha_{i2}$ an der Glukosehomöostase sowie der β -Zell-Funktion zu schließen. In beiden Tiermodellen soll anhand von Immunoblotanalysen geklärt werden, ob das Fehlen des $G\alpha_{i2}$ -Proteins in den Inseln bzw. β -Zellen die Expression der verbliebenen $G\alpha$ -Isoformen sowie der $G\beta$ -Untereinheiten beeinflusst. Morphologische Untersuchungen sollen Aufschluss über eine Beteiligung der $G\alpha_{i2}$ -Isoform an der Insel- bzw. β -Zell-Differenzierung geben. Darüber hinaus sollen in beiden Mutanten *in vivo* Glukosetoleranztests durchgeführt werden, um den Effekt der $G\alpha_{i2}$ -Inaktivierung auf die *in vivo* Insulinsekretion und die periphere Insulinsensitivität zu testen. Aufgrund des komplexen Zusammenspiels verschiedener Organsysteme und Regulationsmechanismen zur korrekten Einstellung des Blutzuckers sind globale $G\alpha_{i2}$ -defiziente Tiere jedoch nur bedingt für eine Organ-spezifische Analyse geeignet. Aus diesem Grund sollen *in vitro* Insulinsekretionsexperimente mit verschiedenen Stimuli (u.a. Glukose, Fettsäuren, Aminosäuren) an β -Zell-spezifischen Mutanten

durchgeführt werden, um $G\alpha_{i2}$ -gekoppelte Signalwege in den Insulin-sezernierenden Zellen aufzudecken. Diese Zielsetzung ist in Abbildung 1.7 schematisch dargestellt.

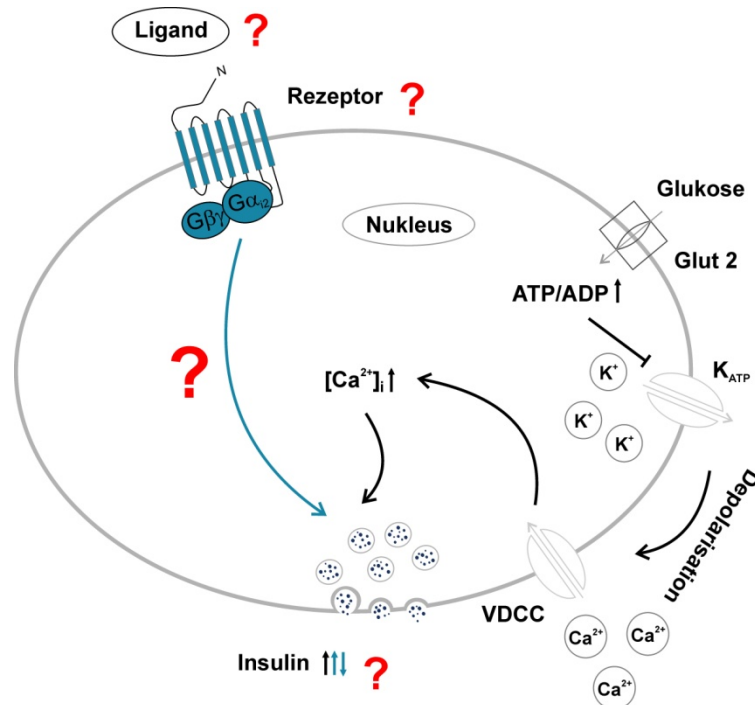


Abbildung 1.7: Schema zum Ziel der Arbeit. Die Beteiligung von $G\alpha_{i2}$ -gekoppelter Rezeptoren und des G-Proteins an der Insulinsekretion aus pankreatischen β -Zellen soll an zwei verschiedenen Mausmodellen untersucht werden. Dabei sollen sowohl mögliche Liganden und Rezeptoren, als auch intrazelluläre und/oder membranständige Effektoren der G-Protein Untereinheiten untersucht werden. GLUT 2 - Glukosetransporter Typ 2; ADP - Adenosindiphosphat; ATP - Adenosintriphosphat; ATP/ADP – Verhältnis von Adenosintriphosphat zu Adenosindiphosphat; K_{ATP} - ATP-abhängige Kaliumkanäle; VDCC - spannungsabhängige Calcium-Kanäle; $[Ca^{2+}]_i$ - intrazelluläre Calciumkonzentration; Ca^{2+} - Calciumion; K^+ - Kaliumion.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Sämtliche Einwegmaterialien wie Pipettenspitzen, Spritzen, Kanülen, Reaktionsgefäße, Stripetten, Kryoröhrchen und Petrischalen wurden von den Firmen Becton-Dickinson GmbH (Heidelberg), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) oder Eppendorf AG (Hamburg) erworben. Medien und Medienzusätze wurden bei PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich bezogen. Die für Puffer verwendeten Chemikalien, sowie Aktivatoren und Inhibitoren wurden in höchster Reinheit (*pro Analyse*) bei den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe), VWR International GmbH (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) erworben.

2.2 Methoden

2.2.1 Transgene Mauslinien

Die in dieser Arbeit analysierten Mäuse waren Inzuchttiere auf einem C57BL/6 Hintergrund. Die Mäuse wurden im spezifiziert pathogenfreien Bereich (SPF) der Tierversuchsanlage der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen gezüchtet. Die Haltung der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tiere erfolgte in individuell ventilierten Käfigen (IVC). Es wurde ein jeweils zwölfständiger Tag-Nacht-Rhythmus eingehalten und die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Trinkwasser.

Alle tierexperimentellen Arbeiten waren durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Anzeigen: AZ vom 21.09.2011 und 07.01.2014, Genehmigungen: PH1/11 und PH1/13)

2.2.1.1 Globale $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse

Für die Zucht der globalen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse (Rudolph *et al.*, 1995) wurden jeweils heterozygote Elterntiere verpaart um homozygote $G\alpha_{i2}$ -defiziente Tiere ($G\alpha_{i2}^{-/-}$) und Wildtyp-Geschwistertiere (wt) als Kontrollen zu erhalten.

2.2.1.2 Gewebespezifische $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse

2.2.1.2.1 Gefloخته $G\alpha_{i2}$ -Linie

Tiere, welche die loxP-Erkennungsstellen vor Exon 2 und nach Exon 4 tragen, wodurch es nach Rekombination zur Deletion von Exon 2, 3 und 4 kommt (AS 40-155), wurden bereits beschrieben (Plummer *et al.*, 2012; Sebastian *et al.*, 2013; Ustyugova *et al.*, 2012). Diese Tiere wurden uns von Prof. Dr. L. Birnbaumer (National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina, USA) zur Verfügung gestellt. Zur Generierung β -Zell-spezifischer $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse wurden gefloخته $G\alpha_{i2}$ -Mäuse mit heterozygoten Rip-Cre-Tieren (s. 2.2.1.2.2) verpaart. Die aus diesen Verpaarungen entstandenen Versuchstiere ($G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$) weisen eine β -Zell-spezifische Deletion von $G\alpha_{i2}$ auf (Genotyp: $G\alpha_{i2}^{\text{fl/fl}}$; Rip-Cre^{+tg}). Als Kontrollen (Kon) wurden Geschwistertiere oder Tiere im selben Alter verwendet, die ebenfalls das Transgen trugen, für das $G\alpha_{i2}$ -Gen aber entweder wildtyp oder heterozygot waren (Genotyp: $G\alpha_{i2}^{+/+}$; Rip-Cre^{+tg} bzw. $G\alpha_{i2}^{+/fl}$; Rip-Cre^{+tg}).

2.2.1.2.2 Rip-Cre-transgene Mäuse

Die transgenen Rip-Cre Tiere exprimieren die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Insulin Promotors der Ratte (*rat insulin promotor*), der etwa ab Tag 9,5 der Embryonalentwicklung angeschaltet wird (Sander & German, 1997). Die Generierung und Beschreibung dieser Linie erfolgte zuvor (Herrera, 2000). Die Tiere waren ein Geschenk von Prof. Dr. P. Herrera (Université de Genève, Faculté de Médecine, Genf, Schweiz).

2.2.2 Genotypisierung

2.2.2.1 Gewebebiopsie

DNS-Lysepuffer	500 mM KCl
	100 mM Tris/HCl pH 8,3
	1% (v/v) Tween 20
	1% (v/v) Triton X-100
	500 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K

Die bei der Markierung der Jungtiere gewonnenen Ohr- bzw. Zehenbiopsien wurden zur routinemäßigen Genotypisierung der Mäuse eingesetzt. Zur Isolation von genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNS) wurde das Gewebe durch Zugabe von 50 µl Lysepuffer bei 55°C über Nacht lysiert und am folgenden Tag zur Inaktivierung der Proteinase K 15 min bei 95°C inkubiert. Proteinase K sorgt als Serinprotease, im Überschuss eingesetzt, für den Abbau der Zellproteine. Zur Entfernung von Haaren und restlichem Gewebe wurden die Proben zentrifugiert (17000 x g, 1 min, RT), der Überstand abgenommen und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 Polymerasekettenreaktion

Für die PCR-Analyse (**p**olymerase-**c**hain-**r**eaction) wurden 1-2 µl des aus der Gewebebiopsie gewonnenen DNS-Lysates eingesetzt. Die PCR ist ein Verfahren, bei dem durch zyklisches Durchlaufen verschiedener Temperaturen bestimmte Nukleinsäuresequenzen, die in einem Gemisch von Nukleinsäuren vorliegen, selektiv vermehrt werden. Es werden mindestens zwei Oligonukleotidprimer benötigt, die an den 5'→3'-Strang (vorwärts Primer) bzw. an den 3'→5'-Strang (rückwärts Primer) der zu amplifizierenden DNS binden. Außer den spezifischen Primern und der DNS werden Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) sowie eine DNS-Polymerase benötigt. Während der PCR werden 3 Temperaturwechsel jeweils 34-37 x wiederholt (PCR-Zyklen). Im ersten Schritt bei 94°C wird die doppelsträngige DNS denaturiert und in 2 Einzelstränge geteilt. Im zweiten Schritt lagern sich die Primer an ihre komplementäre Sequenz der Template-DNS an. Dieser Schritt erfolgt in der Regel zwischen 50 und 65°C und ist unter anderem von den Primersequenzen abhängig. Im dritten Schritt erfolgt bei 72°C die Elongation, hierbei wird der komplementäre DNS-Strang synthetisiert indem die Polymerase Nukleotide an die Primer anlagert. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAxcel Systems, einem automatisierten, multikapillaren Gelelektrophoresesystem, analysiert.

2.2.2.3 Globale $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse

Für die Genotypisierung der globalen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tiere sind jeweils zwei vorwärts und zwei rückwärts Primer erforderlich. Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Substanz	Stock	Menge
TopTaq Mastermix Kit	2 x	12,5 µl
Primer i2wtF	10 µM	0,5 µl
Primer i2wtR	10 µM	0,5 µl
Primer i2koF	10 µM	0,5 µl
Primer i2koR	10 µM	0,5 µl
H ₂ O bidest		9,5 µl
DNS		1,0 µl

Das TopTaq-Mastermix Kit (Qiagen GmbH) enthält eine thermostabile DNS-Polymerase und dNTPs. Dazu wurden die Primer sowie bidestilliertes Wasser (H₂O bidest) gegeben und anschließend 24 µl dieses Gemisches zu 1 µl des DNS-Lysates gegeben. Die PCR wurde mit folgendem Programm in einem Eppendorf PCR-Thermoblock (Mastercycler gradient, Eppendorf AG) durchgeführt:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94°C	3 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	32 x
Primer-Anlagerung	60°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Ende	8°C	∞	

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAxcel Systems, einem automatisierten, multikapillaren Gelelektrophoresesystem, analysiert. Für Wildtyptiere erhält man ein 803 bp langes PCR-Produkt, für $G_{\alpha_{i2}}$ -defiziente Tiere ein 509 bp langes. In heterozygoten Tieren können beide PCR-Produkte detektiert werden.

2.2.2.4 Konditionale $G_{\alpha_{i2}}$ -defiziente Mäuse

Zur Genotypisierung der β -Zell-spezifischen $G_{\alpha_{i2}}$ -defizienten Tiere ($G_{\alpha_{i2}}^{\beta\text{cko}}$) wurde die DNS aus einer Ohrlochbiopsie gewonnen. Zum Nachweis der gewebespezifischen Deletion wurden den Tieren verschiedene Organe entnommen. Dazu wurden die Mäuse mit CO₂ betäubt, anschließend durch zervikale Dislokation

getötet, der Brustkorb und die Bauchhöhle mit einer chirurgischen Schere eröffnet und Leber, Niere und Herz entnommen. Zur Gewinnung von Muskelgewebe wurden die Oberschenkelmuskeln freipräpariert und entnommen. Zur Entnahme des Gehirns wurde die Schädeldecke mit einer Schere eröffnet und der Hypothalamus freipräpariert. Die Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert oder sofort weiterverwendet. Die Isolation der DNS aus den Gewebeproben sowie die nachfolgenden Wasch- und Elutionsvorgänge erfolgten gemäß des Herstellerprotokolls des Isolate I Genomic DNS-Kits (Bioline GmbH). Verwendet wurden dazu die im Kit enthaltenen Puffer und Säulchen. Zunächst wurden zu den Gewebeproben $400\ \mu\text{l}$ Lysepuffer und $25\ \mu\text{l}$ Proteinase K gegeben und über Nacht in einem Thermoblock bei 50°C inkubiert. Danach wurde dem Inkubationsansatz $200\ \mu\text{l}$ Bindepuffer hinzugefügt. Der komplette Ansatz wurde auf ein im Kit enthaltenes Säulchen gegeben. Im folgenden Zentrifugationsschritt band die DNS selektiv an die Glasfasern des Säulchens. Anschließend wurden zwei Waschschrte durchgeführt, $200\ \mu\text{l}$ Elutionspuffer zugegeben und die DNS von der Säule eluiert. Die Konzentration der DNS im Eluat wurde spektralfotometrisch vermessen (NanoDrop lite, PEQLAB Biotechnologie GmbH) und zur Analyse mittels PCR eingesetzt.

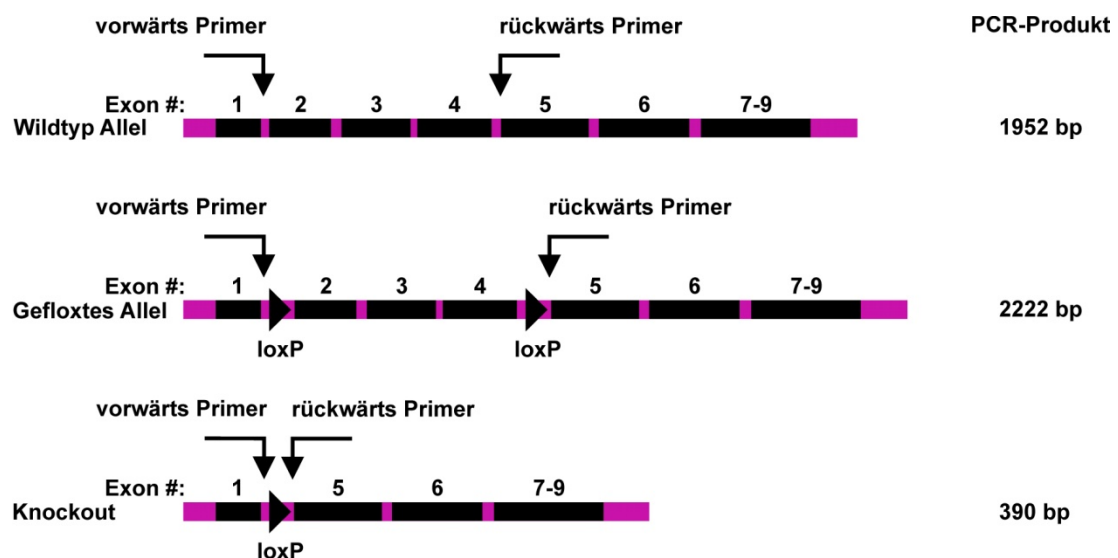


Abbildung 2.1: PCR-Strategie zur Analyse der Genotypen sowie der Rekombination in konditionalen $G\alpha_{12}$ -defizienten Tieren. Die Bindungsstellen für die Primer liegen vor bzw. hinter den jeweiligen loxP-Stellen (schwarze Dreiecke). Die Längen der PCR-Produkte betragen 1952 bp (Wildtyp Allel) bzw. 2222 bp (gefloxtes Allel) und 390 bp (nach Rekombination).

Durch die Lage der Primerbindungsstellen erhält man ein PCR-Produkt von 1952 bp vom Wildtypallel. Aufgrund der Tatsache, dass die Primer vor und hinter den loxP-Erkennungsstellen binden, ergibt sich für gefloxt Allele ein entsprechend größeres Produkt von 2222 bp. Wird in einem Gewebe die Cre-Rekombinase exprimiert und kommt es zur Exzision des geflochten DNS-Abschnitts, so erhält man ein kleineres PCR-Produkt von 390 bp (Abbildung 2.1).

Es wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

Substanz	Stock	Menge
Multiplex Kit	2 x	12,5 µl
Primer i2floxF2	10 µM	0,5 µl
Primer i2floxR	10 µM	0,5 µl
Coral Load	10 x	2,5 µl
H ₂ O bidest		7,0 µl
DNS		2,0 µl bzw. 50 ng

Die PCR wurde in einem Thermoblock (Mastercycler gradient, Eppendorf AG) gemäß folgendem Programm durchgeführt:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94°C	15 min	
Denaturierung	94°C	3 min	34 x
Primer-Anlagerung	55°C	90 sec	
Elongation	72°C	2 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Ende	8°C	∞	

Die PCR-Produkte wurden entweder mit Hilfe des QIAxcel Systems oder durch Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.2.2.5 Rip-Cre

Zum Nachweis des Transgens in den Rip-Cre-Tieren wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Substanz	Stock	Menge
Multiplex Kit	2 x	12,5 µl
Primer RipF	10 µM	0,5 µl
Primer RipR	10 µM	0,5 µl
H ₂ O bidest		9,5 µl
DNS		2,0 µl

Die PCR wurde mit einem Thermoblock (Mastercycler gradient, Eppendorf AG) gemäß folgendem Programm durchgeführt:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94°C	15 min	
Denaturierung	94°C	3 min	36 x
Primer-Anlagerung	60°C	90 sec	
Elongation	72°C	2 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Ende	8°C	∞	

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAxcel Systems analysiert. In transgenen Tieren kann ein PCR-Produkt von 350 bp nachgewiesen werden.

2.2.2.6 Agarosegelelektrophorese

1 x TAE 40 mM Tris/HCl pH 8,4
 20 mM Essigsäure
 1 mM EDTA

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können die negativ geladenen Nukleinsäurestränge entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Konzentration der Agarose betrug 0,8% in 1 x TAE-Puffer. Zur Größenbestimmung und zur Zuordnung der Nukleinsäurefragmente wurde bei der elektrophoretischen Trennung ein geeigneter Größenstandard (DNS Ladder, PEQLAB Biotechnologie GmbH) mit aufgetrennt. Um die DNS-Fragmente visualisieren zu können, wurde dem Gel Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 5 µg/ml zugesetzt. Dieser

Farbstoff interkaliert in die DNS und fluoresziert im UV-Licht orange. Die PCR-Produkte wurden direkt auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese bei einer elektrischen Spannung von 100 V durchgeführt. Die Ergebnisse der elektrophoretischen Trennungen wurden unter UV-Licht mit Hilfe des Luminescent Image Analyzer VersaDoc™ MP-4000 System (Bio-Rad Laboratories GmbH) dokumentiert.

2.2.3 Präparation von murinen Inseln

Kollagenaselösung 1,9 U/ml Kollagenase
 1,25 mM CaCl₂
 in HBSS

Die Präparation der Inseln erfolgte wie zuvor beschrieben (Leiss *et al.*, 2011). Nach der Tötung durch zervikale Dislokation und Eröffnung der Bauchhöhle mittels einer Schere wurde der Gallengang (*ductus choledochus*) freipräpariert und die *papilla vateri* mit einer chirurgischen Klemme verschlossen. Nachfolgend wurden 2 ml Kollagenaselösung mit Hilfe einer 1 ml Insulinspritze in den Gallengang injiziert, hierbei verteilt sich die Kollagenaselösung durch den *ductus pancreaticus* retrograd im Pankreas. Das Pankreas wurde freipräpariert, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 37°C im Wasserbad 10 min verdaut. Durch Zugabe von 9 ml eiskaltem HBSS-Puffer und intensivem Schütteln wurden die Inseln vom exokrinen Teil des Pankreas abgelöst und 2 min auf Eis inkubiert, bis sich die Inseln absetzten. Der Überstand wurde abgenommen und durch frischen HBSS-Puffer ersetzt. Anschließend wurden die Inseln unter dem Mikroskop gepickt und 3 Waschschrinen in frischem HBSS-Puffer unterzogen. Je nach Fragestellung wurden die Inseln entweder sofort für die Proteingewinnung oder die Rekombinationsanalyse weiterverwendet (siehe 2.2.4.1 und 2.2.4.2) oder über Nacht kultiviert (siehe 2.2.6).

2.2.4 Western Blot

2.2.4.1 Gewinnung von Protein

SDS-Lysepuffer	21 mM Tris/HCl pH 8,3 0,67% SDS 283 mM 2-Mercaptoethanol 0,2 mM PMSF
TN-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 7,5 2,5 mM EDTA 100 mM NaCl 0,2 mM PMSF

Um aus isolierten Inseln Protein zu gewinnen (s. 2.2.3) wurden diese gezählt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (1000 x g, 20 sec, RT), der Überstand abgenommen und verworfen. Die Lyse erfolgte anschließend in 0,8 µl SDS-Lysepuffer pro Insel. Nieren- Leber-, Muskel- und Hypothalamusgewebe wurden mit einem Teflonpottter in SDS-Lysepuffer, das Fettgewebe in TN-Puffer auf Eis, homogenisiert. Anschließend wurden die Lysate nochmals zentrifugiert (8000 x g, 10 min, RT bzw. 4°C), der Überstand abgenommen und in Aliquots bis zur Analyse mittels Western Blot bei -80°C aufbewahrt.

2.2.4.2 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung der Zelllysate erfolgte mittels der Methode nach Bradford. Diese Methode nutzt die Eigenschaft des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie Brilliant Blau G-250, durch Interaktion mittels hydrophoben und ionischen Wechselwirkungen mit Proteinen das Absorptionsmaximum zu verschieben. Die hierbei auftretende Farbveränderung kann photometrisch erfasst werden. Ein Reaktionsansatz von 25 µl wurde mit 225 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad Laboratories GmbH) gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Proteingehalt wurde im Vergleich zu einer BSA-Standardkurve bekannter Konzentration durch Messen der Extinktion bei 630 nm mit einem Mikroplatten-Photometer (Tecan Deutschland GmbH) bestimmt.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

4 x Lämmli-Probenpuffer	250 mM Tris/HCl pH 6,8 40% Glycerol 23% 2-Mercaptoethanol 4% SDS 0,08% Bromphenolblau
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris/Base 192 mM Glycin 0,1% SDS
Trenngel für 12% Gele	12% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 375 mM Tris/HCl pH 8,8 2 mM SDS 0,1% APS 0,07% TEMED
Sammelgel für 12% Gele	4% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 125 mM Tris/HCl pH 6,8 0,9 mM SDS 0,07% APS 0,1% TEMED
Trenngel für UREA-Gele	6 M Harnstoff 9% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 375 mM Tris/HCl pH 8,8 3,5 mM SDS 0,025% APS 0,025% TEMED

Sammelgel für UREA-Gele	3% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 111 mM Tris/HCl pH 6,8 3 mM SDS 0,1% APS 0,1% TEMED
--------------------------------	--

Um Proteine entsprechend ihrer relativen Molekülmasse aufzutrennen, wurde ein denaturierendes, diskontinuierliches Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System verwendet (Laemmli, 1970). SDS denaturiert als anionisches Detergenz Proteine und verleiht diesen eine negative Ladung, so dass sie unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung und Faltung entsprechend ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld aufgetrennt werden können. Die Konzentrierung der Proteine erfolgte im großporigen Sammelgel, die Auftrennung in einem Trenngel, welches eine kleinere Porengröße aufweist. Zur Analyse der G_s und G_q -Proteine wurden 12%ige-SDS-Gele, zur Analyse der G_i - und G_o -Proteine wurden, um diese besser aufzutrennen, 6 M Harnstoffgele verwendet. Harnstoff denaturiert Proteine durch Spaltung von Wasserstoffbrücken, wodurch die Aggregation von Proteinen verhindert und somit deren Konformität standardisiert wird. Die Organlysate wurden mit 4 x Lämmli-Probenpuffer versetzt, so dass dieser in einfacher Konzentration vorlag. Da die aus Inseln gewonnene Proteinmenge gering war, wurde auf eine Proteinbestimmung verzichtet und jeweils 20 μ l Zelllysate pro Probe geladen. Im Normalfall wurden 20 μ l der Insellysate, 16 μ g der Hypothalamuslysate, 20 μ g der Nierenlysate, 30 μ g der WAT-Lysate sowie jeweils 90 μ g der Leber- und Skelettmuskellysate auf die Gele aufgetragen und die Proteine durch Elektrophorese in SDS-PAGE-Laufpuffer bei einer kontinuierlichen Spannung von 100 V aufgetrennt.

2.2.4.4 Immunoblot

Anodenpuffer I	300 mM Tris/Base 40% Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris/Base 40% Methanol

Kathodenpuffer	25 mM Tris 40 mM Glycin 10% Methanol
Ponceau S-Lösung	0,1% Ponceau S 5% Essigsäure
TBS-T	50 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl 0,1% Tween-20
Blockpuffer	5% Magermilchpulver/TBS-T
Antikörperverdünnungs- lösung	5% BSA/TBS-T

Um Proteine mittels spezifischer Antikörper nachweisen zu können, müssen diese zunächst auf einer PVDF-Membran immobilisiert werden. Durch Anlegen eines elektrischen Stromes wandern die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Oberfläche der Membran. Zum Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem Gel wurde ein Semi-Dry-Transfer-System verwendet. Für den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran wurde ein Stapel aus Filterpapier, Membran und Gel in folgender Reihenfolge aufgebaut und ein Strom von 60 mA für eine Stunde angelegt: Anode, sechs Filterpapiere mit Anodenpuffer I, drei Filterpapiere mit Anodenpuffer II, Membran, Gel, neun Filterpapiere mit Kathodenpuffer, Kathode. Anschließend wurden die Proteine mit Ponceau S-Lösung, welches reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine bindet angefärbt, mit H₂O demin. wieder entfärbt und unspezifische Antikörperbindungsstellen durch Inkubation in Blockpuffer für eine Stunde auf dem Schüttler abgesättigt. Es folgten drei Waschschrte in TBS-T (jeweils zehn Minuten), bevor die Membran mit den spezifischen Antikörpern in Antikörperverdünnungslösung über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Nach drei weiteren Waschschrten in 1,5% Magermilchpulver in TBS-T (jeweils zehn Minuten), wurde die Membran nachfolgend mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (1 h, RT). Um überschüssig gebundenen Antikörper zu entfernen, folgten erneut drei TBS-T-Waschschrte (jeweils zehn Minuten). Die

Detektion erfolgte mittels Chemolumineszenz. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert Luminol wodurch Lichtsignale erzeugt werden. Hierfür wurde eine 1:1 Mischung von Lösung A und B aus dem ECL-Kit (ECL Western Blotting Detection System, GE Healthcare GmbH) auf die Membran gegeben und für eine Minute inkubiert. Die Detektion und Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer CCD-Kamera am Versa-Doc Luminescent Image Analyzer VersaDoc™ MP-4000 System oder durch Auflegen eines Chemolumineszenz-sensitiven Röntgenfilms. Die Semiquantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe der Image Lab Software (Bio-Rad Laboratories GmbH).

2.2.5 Histologische Methoden

PBS, pH 7,4	135 mM NaCl 3 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
Paraformaldehydlösung	4% (m/v) Paraformaldehyd/PBS
Sukroselösung	20 bzw. 30% (m/v) Saccharose/PBS

2.2.5.1 Fixierung von Gewebe

Die Tiere wurden mit CO₂ betäubt, anschließend durch zervikale Dislokation getötet und die Bauchhöhle mit einer chirurgischen Schere eröffnet. Nach Freipräparation des *ductus choledochus* wurde die *papilla vateri* mit einer chirurgischen Klemme verschlossen und 2 ml 4%ige Paraformaldehydlösung (PFA) retrograd über den *ductus choledochus* und die Verbindung zum *ductus pancreaticus* in das Pankreas injiziert. Das fixierte Gewebe wurde vorsichtig heraus präpariert und in 14 ml 4% PFA auf einem Rollenmischer über Nacht bei RT inkubiert. Nach drei Waschschrinen mit PBS (je 1,5 h) wurde das fixierte Pankreasgewebe in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 60%, 70%, 80%, 90%) dehydriert wobei die Inkubationszeiten jeweils 1,5 h (50%, 60%, 70%) bzw. 1 h (80%, 90%) betragen. Die Dehydrierung wurde durch Inkubationen in 100% Ethanol (3 x 20 min), einer Ethanol/Toluol-Mischung (1:1) (30 min) und 3 Wechseln in 100% Toluol (jeweils 20 min) komplettiert. Das fixierte dehydrierte Pankreasgewebe wurde in eine Einbettkassette

überführt und 3 x jeweils für einen Tag in geschmolzenem Paraffin inkubiert. Abschließend wurde das Gewebe in geschmolzenes Paraffin eingebettet und nach der Aushärtung auf Eis bis zur Anfertigung von Serienschnitten mit Hilfe eines Mikrotoms bei RT gelagert.

Zur Analyse des fixierten Gewebes wurden 8 µm dicke Serienschnitte an einem Rotationsmikrotom (Microm HM355S, Fischer Scientific GmbH) angefertigt und zur Streckung in ein Wasserbad überführt. Die Schnitte wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgezogen, bei 37°C über Nacht getrocknet und bis zur Färbung bei RT aufbewahrt.

Für histologische Untersuchungen an Kryoschnitten wurde das Gewebe wie oben beschrieben fixiert und im Anschluss an die 3 Waschschritte in PBS zur Kryoprotektion in eine 20%ige Sukroselösung (4°C) überführt. Nach dem Absetzen des Gewebes wurde die Sukrosekonzentration auf 30% erhöht und wiederum bis zum Absetzen des Gewebes bei 4°C inkubiert. Das fixierte, kryoprotektierte Pankreasgewebe wurde mit NEG-50 Einbettmedium überschichtet, bei -80°C langsam eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Von dem eingebetteten Gewebe wurden an einem Kryotom (2800 Frigocut E Reichert-Jung) 6 µm dicke Serienschnitte angefertigt, diese auf Superfrost-Plus-Objektträger aufgezogen, anschließend drei Stunden bei RT getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin Färbung (H&E-Färbung) können verschiedene Gewebestrukturen unterschieden werden. In Pankreasschnitten können die Inseln gut vom exokrinen Anteil unterschieden werden. Es wurden jeweils die ersten Objektträger jeder Serie mittels H&E-Färbung angefärbt. Die Paraffinschnitte wurden in 100% Toluol entparaffinisiert (2 x 10 min), anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 100, 90%, 70%, 50%) rehydriert (jeweils 5 min) und abschließend in Leitungswasser (5 min) inkubiert, bevor sie für 10 Sekunden in Hämatoxylin-Lösung überführt wurden. Hierbei werden saure Moleküle, wie z.B. Kerne, angefärbt. Die blau-violette Färbung erzielt man durch einen pH-Wert-Wechsel, indem die Schnitte zuerst durch zwei Wechsel in Leitungswasser (jeweils 2 min) und dann durch 0,1% Ammoniumhydroxid (1 min) gezogen werden. Nach einem kurzen Waschschritt in Leitungswasser (5 min) folgte die Färbung mit Eosin-Lösung für

4 min. Dies führt zu einer rötlich-pinken Färbung von Zytoplasma und Kollagen. Überschüssige Färbelösung wurde durch fünf Wechsel in Leitungswasser entfernt. Abschließend wurden die Schnitte in 80% Ethanol (45 sec) inkubiert, in 100% Ethanol (3 min) und Toluol (5 min) dehydriert und mit Einschlußmittel eingedeckt. Die H&E-Färbung der Kryoschnitte erfolgte analog. Die Entparaffinisierung sowie die Rehydrierung entfielen und die Färbung startete mit der 5 minütigen Inkubation in Leitungswasser.

2.2.5.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) bietet die Möglichkeit zelluläre Proteine mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion zu visualisieren. In dieser Arbeit wurde die indirekte Immunhistochemie angewandt, bei der das zu detektierende Protein mittels eines primären Antikörpers markiert wird und die Visualisierung mit Hilfe eines Sekundärantikörpers erfolgt. Dieser ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Somit kann der Antigen-Antikörper-Komplex nach Anregung mit einer entsprechenden Wellenlänge mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 Meta, Carl Zeiss AG) oder einem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager M1, Carl Zeiss AG) sichtbar gemacht werden. Für die IHC an Paraffinschnitten wurden diese wie zuvor beschrieben entparaffinisiert, rehydriert und in PBS inkubiert (5 min). Die Entparaffinisierung sowie die Rehydrierung entfielen bei den Kryoschnitten, die Färbung startete mit der 5 minütigen Inkubation in PBS. Für eine bessere Antikörperbindung folgte ein Permeabilisierungsschritt in 0,3% Triton-X-100/PBS (30 min). Nach drei weiteren PBS-Waschschritten (jeweils 5 min) wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet und nochmals in PBS (3 x 5 min) gewaschen. Im Falle der Färbung des nukleären Proteins PCNA wurde anstatt des Permeabilisierungsschrittes eine Antigendemaskierung durchgeführt. Hierdurch kann eine durch den Fixierungsprozess möglicherweise verlorengegangene Immunreaktivität zumindest teilweise wieder hergestellt werden. Dazu wurden die entparaffinisierten und rehydrierten Schnitte in einer Citrat-haltigen Demaskierungslösung (DAKO) für 3,5 Minuten bei 800 Watt in einem Mikrowellengerät aufgekocht. Es folgte eine 4-minütige Inkubation bei 360 Watt, eine 5-minütige Abkühlphase, ein erneutes Aufkochen bei 800 Watt (1,5 min) sowie eine weitere 4-minütige Inkubation bei 360 Watt. Im Anschluss an eine 20-minütige Abkühlphase folgten drei TBST-T- und ein TBS-Waschschritt (jeweils 2 min) bevor

die Schnitte mit einem Fettstift umrandet, nochmals dreimal mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen wurden (jeweils 2 min). In beiden Fällen folgte die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit 5% NGS/PBS. Die entsprechende Primärantikörperbindung erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer, die am folgenden Tag für 1 h bei RT abgeschlossen wurde. Anschließend folgten erneut drei Waschschrte in PBS (jeweils 5 min) bevor die Schnitte mit den fluoreszenzmarkierten, sekundären Antikörpern für 1 h bei RT inkubiert wurden. Überschüssig gebundener Antikörper wurde mit PBS abgewaschen und die Schnitte abschließend in Roti® Mount FluorCare DAPI eingedeckt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzen zu verringern. Gleichzeitig interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff DAPI in die DNS, welche dadurch im UV-Bereich sichtbar gemacht werden kann. Die Aushärtung erfolgte im Dunkeln bei 4°C.

2.2.5.4 Quantifizierung histologischer Färbungen

Zur Analyse der H&E-Färbungen wurden alle Inseln mit einem inversen Mikroskop (Nikon Eclipse TE2000-U, Nikon GmbH) fotografiert. Zur Quantifizierung wurde die *open source* Software ImageJ des National Institutes of Health verwendet. Alle Kerne jeder Insel wurden ausgezählt und die Inselfläche bestimmt. Mit Hilfe eines Größenstandards konnten die Pixel in μm umgerechnet werden.

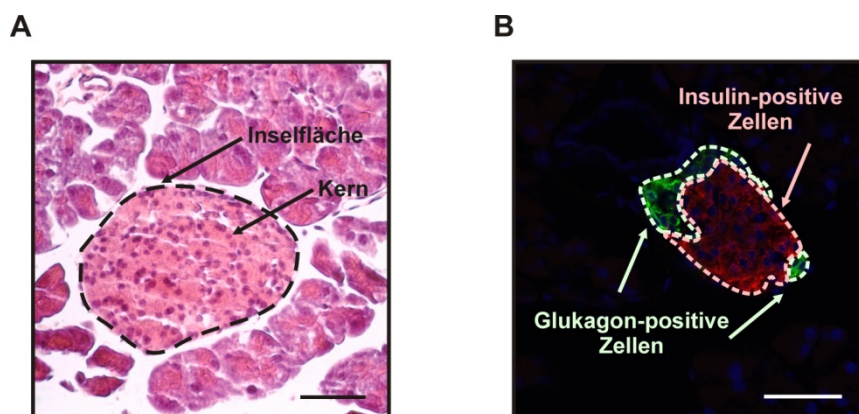


Abbildung 2.2: Quantifizierung der histologischen Färbungen. (A) H&E-Färbung des Pankreas. Die Anzahl der Kerne wurde ausgezählt, sowie die Inselfläche ausgemessen. (B) Immunhistochemische Färbung von Glukagon (grün) und Insulin (rot). Es wurde jeweils die Fläche der Insulin- und Glukagon-positiven Zellen ausgemessen. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 50 μm .

Die Immunfluoreszenzaufnahmen von Insulin und Glukagon wurden mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 Meta, Carl Zeiss AG) aufgenommen. Zur Analyse der Gesamtfläche Insulin- und Glukagon-positiver Zellen wurden diese mit der zugehörigen Software (LSM 5 Image Examiner, Carl Zeiss AG) per Hand vermessen (Abbildung 2.2). Im Falle der Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln wurde alle 250 μm eine Serie von jeweils fünf 6 μm Schnitten angefertigt und der erste Objektträger jeder Serie H&E-gefärbt. Es wurden alle Inseln fotografiert (Axio Imager M1, Carl Zeiss AG) und die Anzahl der Kerne mit Hilfe eines automatisierten Messprogrammes (Axiovision Autmess, Carl Zeiss AG) gezählt sowie die Inselfläche vermessen.

2.2.6 Hormonsekretionsexperimente

Krebs-gepufferte HEPES-Lösung (KHBS), pH 7,40-7,45	120 mM NaCl
	4,7 mM KCl
	2,5 mM CaCl_2
	1 mM KH_2PO_4
	1,2 mM MgSO_4
	10 mM HEPES
	20 mM NaHCO_3
	0,5 mg/ml BSA

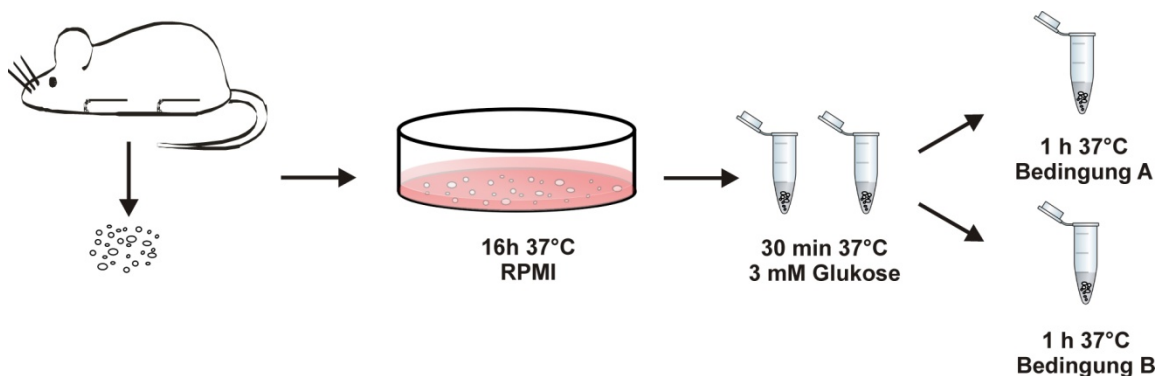


Abbildung 2.3: Schematischer Ablauf der Hormonsekretionsexperimente. Nach Isolierung der Inseln aus der Maus (s. 2.2.3) wurden diese für 16 h in RPMI-Medium kultiviert. Die Inseln werden in Gruppen zu jeweils 10 Stück sortiert und 30 Minuten bei 3 mM Glukose inkubiert. Es folgte 1 h Stunde Inkubation zu den jeweiligen Versuchsbedingungen (nähere Erklärungen im Text).

Die wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben isolierten Inseln wurden über Nacht in Kulturmedium (RPMI; 10% FCS; 1% Penicillin/Streptavidin) in einer 35 mm

Zellkulturschale bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Die Inseln wurden in Gruppen zu je 10 (Insulinsekretion) oder 20 (Glukagonsekretion) Stück sortiert und in 3 mM (Insulinsekretion) bzw. 5 mM Glukose (Glukagonsekretion) in 200 µl KHBS in einer feuchten Kammer im Brutschrank für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ equilibriert (Salehi *et al.*, 1999). Nach der Sedimentation der Inseln wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen, bevor die Inseln mit verschiedenen Glukosekonzentrationen und Testsubstanzen in 200 µl KHBS für 60 min unter den oben genannten Bedingungen im Brutschrank inkubiert wurden. Zur Kontrolle wurden an jedem Versuchstag auch Ansätze mit 3 mM bzw. 16 mM Glukose ohne den Zusatz von Testsubstanzen mitgeführt. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und bis zur Analyse mittels RIA oder ELISA bei -20°C gelagert. Zur nachfolgenden Bestimmung des Gesamthormongehaltes wurden die Inseln aus den Hormonsekretionsexperimenten mit 200 µl eiskaltem salzsaurem Ethanol (1,5% HCl/70% Ethanol) versetzt. Als Testsubstanzen wurden verwendet: 1 µM Clonidin (Langer *et al.*, 1983), 100 nM Somatostatin (Wang *et al.*, 2011), 200 µM Palmitat (Ayvaz *et al.*, 2002), sowie 10 mM L-Arginin und L-Ornithin (Blachier *et al.*, 1989b).

Zur Analyse des DNS-Gehaltes wurden die Inseln aus den Hormonsekretionsexperimenten mit 200 µl Lysepuffer eines kommerziellen Kitsystems (Bioline GmbH) versetzt und über Nacht bei 50°C verdaut. Die Isolierung erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll. Die DNS wurde mit 20 µl Elutionspuffer von der Membran gefällt und spektralfotometrisch vermessen (NanoDrop lite, PEQLAB Biotechnologie GmbH). Die Menge an sezerniertem Insulin kann dann auf den DNS-Gehalt bezogen werden (Schulz *et al.*, 2013).

2.2.7 Bestimmung des pankreatischen Gesamthormongehalts

Zur Bestimmung des pankreatischen Gesamthormongehaltes wurden die Tiere mittels CO₂ betäubt, anschließend durch zervikale Dislokation getötet, das Peritoneum geöffnet und das gesamte Pankreas vorsichtig freipräpariert, entnommen und gewogen. Nach Zugabe von 7,5 ml salzsaurem Ethanol (1,5% HCl/70% Ethanol) wurde das Gewebe mit einem Teflonpotter auf Eis homogenisiert und für 24 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Homogenate abzentrifugiert (7000 x g; 20min; 4°C), 2 ml vom Überstand abgenommen und bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

2.2.8 Analyse des Hormongehaltes

2.2.8.1 Insulin-ELISA

Zur Bestimmung der Insulinkonzentration wurde ein ultrasensitiver Maus-Insulin-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers (Merckodia). Verwendet wurde 10 µl Plasma bzw. 25 µl der in KHBS verdünnten Proben aus den Hormonsekretionsexperimenten und Insulingehaltsbestimmungen. Das Prinzip eines ELISAs basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei in diesem Fall ein enzymatischer, zweiseitiger Immunoassay mit Festphase verwendet wurde. In der direkten Sandwichtechnik sind zwei monoklonale Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen im Insulinmolekül gerichtet. Während der Inkubation reagiert das Insulin in der Probe mit den anti-Insulin-Antikörpern im Peroxidase-Konjugat und den anti-Insulin-Antikörpern, welche auf der Mikrotiterplatte gebunden sind. Durch Waschen werden die ungebundenen, enzymatisch gekennzeichneten Antikörper entfernt und das gebundene Konjugat wird durch Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin sichtbar gemacht. Durch Zugabe von Säure wird die Reaktion gestoppt und der kolorimetrische Endpunkt kann nun spektrophotometrisch bei 450 nm mit einem Mikroplatten-Fotometer (Tecan Deutschland GmbH) abgelesen werden. Die Daten wurden mit Microsoft Excel analysiert.

2.2.8.2 C-Peptid-Bestimmung

Zur Analyse der C-Peptidspiegel wurde das *mouse metabolic magentic bead panel kit* (Merck Millipore, USA) verwendet. Die Methode beruht auf der Luminex[®] xMAP[®] Technologie. Dabei dienen magnetische Mikrosphären als Festphase für die biochemische Nachweisreaktion. Diese waren mit einem Fluoreszenz-Farbstoff und den spezifischen Antikörpern gegen das C-Peptid markiert. Eine definierte Menge der Mikrosphären wurden mit 10 µl der Plasmaprobe inkubiert. Anschließend wurde der Antigen-Antikörper-Komplex durch die Bindung eines zweiten, biotinylierten Detektionsantikörpers und einem Streptavidin-Phycoerythin-Konjugat vervollständigt. Die Quantifizierung des Analyten erfolgt durch Laserdetektion an einem BioPlex 2000 System (Bio-Rad Laboratories GmbH).

2.2.8.3 Glukagon-Radioimmunassay (RIA)

Die Bestimmung der Glukagonkonzentration erfolgte mittels eines Radioimmunassays (*Rat Glucagon RIA*, Merck Millipore, USA). Hierbei wird eine feste Konzentration eines radioaktiv markierten Tracer-Antigens (^{125}I -Glukagon) mit einer festen Menge an Antiserum inkubiert, so dass das zu bestimmende Antigen in der Probe mit dem markierten Antigen um die konstante Anzahl an Antikörperbindungsstellen konkurriert. Je höher die Konzentration in der Probe ist, desto weniger markiertes Antigen kann gebunden und nach der Fällung des Antigen-Antikörper Komplexes detektiert werden. 100 μl in KHBS verdünnte Probe aus den Glukagonsekretionsexperimenten und Glukagongehaltsbestimmungen wurde mit 100 μl des Glukagonantikörpers für 22 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 100 μl des radioaktiv markierten Glukagons zugegeben und erneut für 22 h bei 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde ein Präzipitationsreagenz zugegeben welches den Antigen-Antikörper-Komplex präzipitiert. Der Komplex wurde abzentrifugiert (2000 x g, 20 min, 4°C), der Überstand dekantiert und die Radioaktivität des Pellets mit einem Gamma-Counter (Beckelson Coulter) am zentralen Isotopenlabor der Universität Tübingen vermessen.

2.2.9 Analyse der cAMP-Konzentration in Inseln

Zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration in Inseln wurden diese wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, isoliert und über Nacht kultiviert. Analog zu den Hormonsekretionsexperimenten wurden die Inseln in Gruppen zu jeweils 10 Inseln sortiert und für 30 min in 200 μl KHBS mit 3 mM Glukose und 1 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), einem Phosphodiesterase-Hemmstoff in einer feuchten Kammer im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 equilibriert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen, bevor die Inseln mit verschiedenen Glukosekonzentrationen und Testsubstanzen in 200 μl KHBS/1 mM IBMX für 15 min unter den oben genannten Bedingungen im Brutschrank inkubiert wurden. Der Überstand wurde wiederum vorsichtig abgenommen und die Inseln in flüssigen Sickstoff schockgefroren. Zur Analyse des intrazellulären cAMP-Gehalts wurde ein cAMP Enzymimmunassay (EIA) (cAMP Direct Biotrak EIA RPN2251, GE Healthcare) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll. Zur Lyse wurden die gefrorenen Inseln mit 200 μl des im Kit enthaltenen Lysepuffers 1B für 10 min bei 1400 rpm auf einem Thermoschüttler (Grant Instruments) inkubiert. Die

Werden zu kurz aufeinander folgenden Zeitpunkten Fluoreszenzmessungen bei jeweils 340 und 380 nm durchgeführt, kann das Verhältnis der beiden Fluoreszenzintensitäten F_{340} und F_{380} berechnet werden, welches nur noch von der intrazellulären Calciumkonzentration abhängig und damit zu dieser direkt proportional ist. Für die Calciummessungen wurden isolierte, vereinzelt β -Zellen verwendet. Die isolierten Inseln (Kapitel 2.2.3) wurden direkt nach dem letzten Waschschrift zentrifugiert (800 x g, 2 min, 4°C), der Überstand abgenommen und durch Zugabe von 2 ml Trypsin bei 37°C 5 min verdaut und anschließend mit der Pipette zu Einzelzellen dispergiert. Nach Zugabe von 9 ml eiskaltem RPMI-1640-Medium wurden die Zellen abzentrifugiert (800 x g, 2 min, 4°C) und der Überstand vorsichtig abgenommen, anschließend wurde das Zellpellet in 100 μ l RPMI-1640-Medium resuspendiert und jeweils 20 μ l der Zellsuspension auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen ausgesetzt und für mindestens 4 h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) in RPMI-1640-Medium kultiviert. Die Zellen wurden mit 4 μ M Fura-2 in 5 mM Glukose/KHBS für 45 min bei 37°C 5% CO₂ beladen, bevor die Messung bei einer konstanten Perfusion von 0,8 ml/min erfolgte. Um einen konstanten Ausgangswert zu bekommen wurden die Zellen für 4 min mit 5 mM Glukose perfundiert, bevor die jeweiligen Testsubstanzen zugegeben wurden. Verwendet wurde ein inverses Fluoreszenzmikroskop und ein 10x Luftobjektiv. Die Fluoreszenzen wurden alle 1000 ms abwechselnd bei 340 nm und 380 nm angeregt und das emittierte Licht bei 510 nm von einer CCD-Kamera erfasst (Till Photonics GmbH). Die Berechnung der Fluoreszenzratio F_{340}/F_{380} erfolgte abzüglich der Hintergrundfluoreszenz.

2.2.11 *In-vivo*-Analyse der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tiere

2.2.11.1 Gewichtsentwicklung

Zur Untersuchung der Gewichtsentwicklung wurden männliche $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ - und Geschwisterkontrolltiere nach dem Absetzen regelmäßig gewogen. Bis zu einem Alter von ca. 26 Wochen erfolgte das Wiegen wöchentlich, danach im Abstand von 2 Wochen.

2.2.11.2 Glukosetoleranztest

Um die Glukoseverwertung der Tiere zu bestimmen wurden GTTs an zuvor gefasteten Mäusen durchgeführt. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

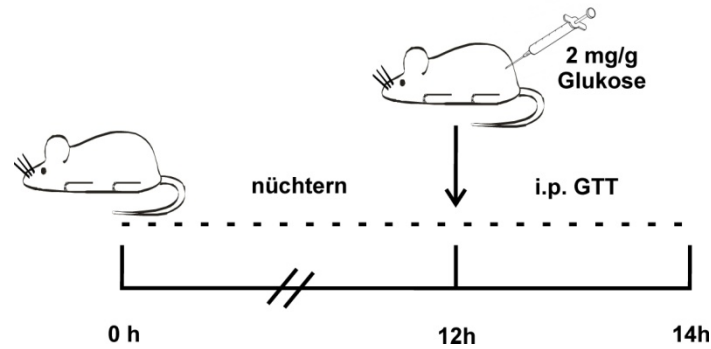


Abbildung 2.4: Schema des intraperitonealen Glukosetoleranztests. Die Tiere wurden über Nacht für 12 Stunden nüchtern gesetzt und die basalen Blutzucker- und Plasmainsulinwerte bestimmt. Es folgte eine intraperitoneale Injektion von 2 mg/g Körpergewicht Glukose und der Verlauf der Blutzuckerspiegel sowie der Plasmainsulinpiegel über 120 Minuten aufgezeichnet.

Den Tieren wurde nach einer 12-stündigen Fastenperiode 2 mg/g Körpergewicht Glukose (Glucosteril 20%, Fresenius Kabi) intraperitoneal (i.p.) appliziert. Die Blutglukosespiegel wurden basal und während des Glukosetoleranztests jeweils 15, 30, 60 und 120 min nach der Glukoseapplikation mittels eines Blutglukosemessgerätes (Contour, Bayer Healthcare) bestimmt. Für die Analyse der Plasmainsulinpiegel wurde Blut aus der amputierten Schwanzspitze in einer heparinisierten Microvette aufgefangen und auf Eis gelagert. Die Blutproben wurden anschließend zentrifugiert (2000 x g, 10 min, 4°C), das Plasma vorsichtig abgenommen, mit 1 µl 15 µM Aprotinin versetzt und bis zu Analyse bei -80°C gelagert. Die Tiere hatten während des gesamten Versuchsablaufes freien Zugang zu Wasser.

2.2.11.3 Bestimmung der peripheren Insulinsensitivität

Um die Glukoseaufnahme in den Insulin-abhängigen Geweben der globalen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tiere genauer zu untersuchen wurde der intrazelluläre Insulinsignalweg analysiert. Hierbei spielt die Phosphorylierung der Proteinkinase B/AKT eine entscheidende Rolle und kann deshalb als direktes Korrelat für den Signalweg genutzt werden. Wiederum wurden die Tiere über Nacht für 12 Stunden gefastet und anschließend die basalen Blutglukose- und Plasmainsulinpiegel bestimmt (siehe Glukosetoleranztest 2.2.11.2). Danach wurde den Tieren für 2 Stunden der Zugang zum gewohnten Futter ermöglicht. Nach genau 2 Stunden wurden wiederum die Blutglukose- und Plasmainsulinpiegel bestimmt. Für die anschließende Analyse der AKT-Phosphorylierung wurden die Mäuse mit CO_2 betäubt, anschließend durch

zervikale Dislokation getötet, die Organe entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Die Proteingewinnung erfolgte gemäß Kapitel 2.2.4.1.

3 Ergebnisse

Auf der Basis von PTX-Studien in Ratten und Mäusen wurde allen PTX-sensitiven G-Proteinen (Untereinheiten $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_{o1}$, $G\alpha_{o2}$, $G\alpha_{gust}$, $G\alpha_{t-r}$ und $G\alpha_{t-c}$) eine Beteiligung an der Hemmung der Insulinsekretion zugeschrieben (Gulbenkian *et al.*, 1968; Toyota *et al.*, 1978; Yajima *et al.*, 1978). Allerdings zeigen Analysen $G\alpha_o$ -defizienter Tiere, dass $G\alpha_o$ die an der Hemmung maßgeblich beteiligte Isoform ist (Tang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011). Die funktionelle Beteiligung der quantitativ dominanten $G\alpha_{i2}$ -Isoform an der Insulinsekretion ist dagegen bisher unklar.

3.1 Charakterisierung der Glukosehomöostase in globalen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren

Um die Rolle der $G\alpha_{i2}$ -Isoform in den pankreatischen Langerhans-Inseln und den Insulin-abhängigen Geweben zu charakterisieren wurden zunächst konstitutive $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse analysiert.

3.1.1 Expressionsanalyse von G-Proteinen in $G\alpha_{i2}$ -defizienten Langerhans-Inseln

Das Expressionsmuster heterotrimerer G-Proteine in Inseln ist gut dokumentiert. Jedoch kann die Deletion eines essentiellen G-Proteins das Gleichgewicht in einer Zelle stören und unter Umständen die Expression von Vertretern derselben Subfamilie oder anderer Subfamilien verändern. Deshalb wurde vorab die Expression verschiedener G-Proteine in Langerhans-Inseln charakterisiert.

3.1.1.1 Expression von $G\alpha_{i2}$

Zunächst wurde die Expression der im Fokus stehenden $G\alpha_{i2}$ -Isoform in Wildtyp- und $G\alpha_{i2}$ -defizienten Insellysaten mittels Immunoblot und Immunfluoreszenzfärbung untersucht (Abbildung 3.1).

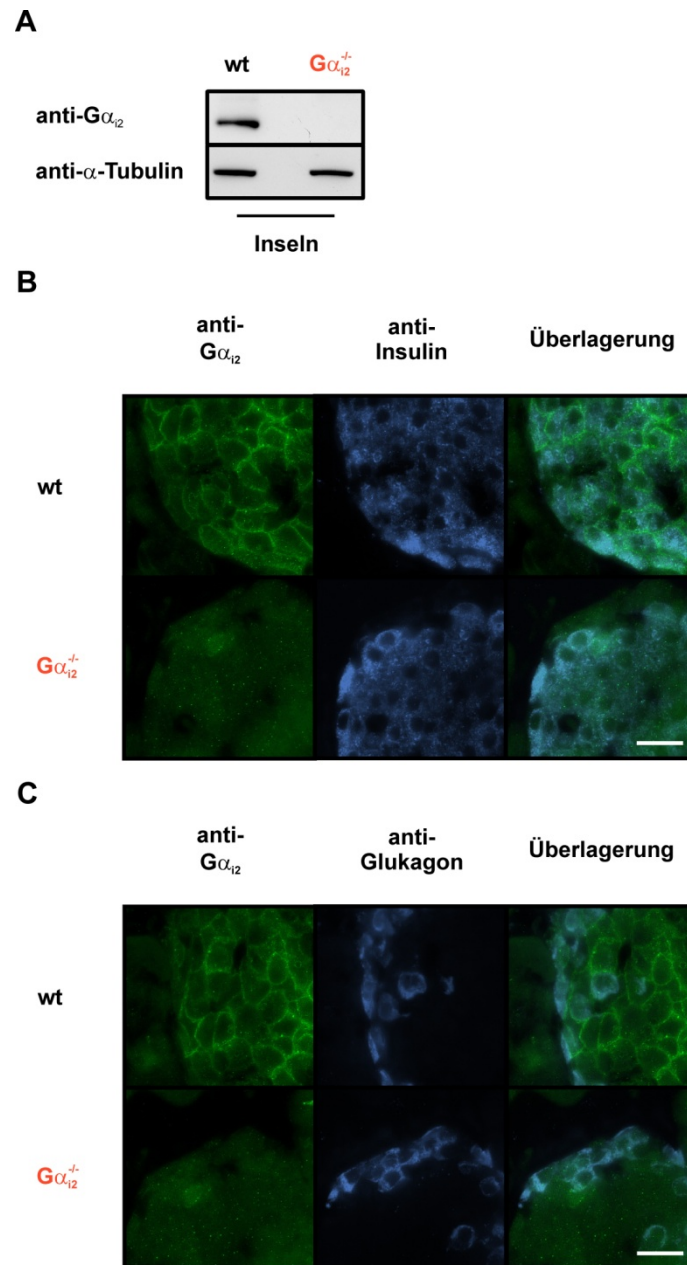


Abbildung 3.1: Expression von $G\alpha_{i2}$ in Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln. (A) Immunoblotanalyse isolierter Inseln von Wildtyp- (wt) und $G\alpha_{i2}$ -defizienten- ($G\alpha_{i2}^{-/-}$) Mäusen. Die Ladungsverteilung wurde durch die Detektion von α -Tubulin überprüft. Das $G\alpha_{i2}$ -Protein kann in wt-Lysaten detektiert werden, nicht aber in $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln. (B, C) Immunfluoreszenzfärbungen von Wildtyp- (wt) und $G\alpha_{i2}$ -defizienten ($G\alpha_{i2}^{-/-}$)-Inseln. Hierfür wurden 6 μm Kryoschnitte von Wildtyp- (wt) und $G\alpha_{i2}$ -defizienten ($G\alpha_{i2}^{-/-}$)-paraformaldehydfixierten Pankreaten mit spezifischen Antikörpern gegen $G\alpha_{i2}$ (grün), Insulin (B) bzw. Glukagon (C) (jeweils blau) gefärbt. Eine Überlagerung von $G\alpha_{i2}$, Insulin bzw. Glukagon ist nur in wt-Inseln erkennbar (Überlagerung). Das $G\alpha_{i2}$ -Protein kann in $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln nicht detektiert werden. Die Maßstabsbalken entsprechen 20 μm .

Mit Hilfe eines Antikörpers gegen die $G\alpha_{i2}$ -Isoform wurde die Expression des $G\alpha_{i2}$ -Proteins in Wildtyp- und $G\alpha_{i2}$ -defizienten-Insellysaten untersucht. In wt-Inseln ist das $G\alpha_{i2}$ -Protein ubiquitär nachweisbar, während den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen das $G\alpha_{i2}$ -Protein in den Inseln fehlt (Abbildung 3.1A). Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigen eine

Akkumulation von $G\alpha_{i2}$ im Bereich der Membran sowohl in Insulin-positiven β -Zellen als auch in Glukagon-positiven α -Zellen in Kryoschnitten von wt-Inseln. In $G\alpha_{i2}$ -defizienten Inseln kann das $G\alpha_{i2}$ -Protein nicht detektiert werden und eine Kolokalisation ist weder mit β -Zellen noch mit α -Zellen erkennbar.

3.1.1.2 Expressionsanalyse der inhibitorischen G-Proteinuntereinheiten $G\alpha_{i3}$ und $G\alpha_o$

$G\alpha_i$ -Isoformen haben in unterschiedlichen Zellen und Geweben teilweise überlappende Funktionen, übernehmen aber auch Isoform-spezifische Rollen (Wiege *et al.*, 2013; Wiege *et al.*, 2012). Gerade aufgrund redundanter Funktionen besteht die Gefahr, dass das Fehlen einer Isoform zur Kompensation durch eine verwandte Isoform führt. Da das $G\alpha_{i3}$ -Protein, nach $G\alpha_{i1}$, die in den Inseln exprimierte $G\alpha$ -Untereinheit mit der größten Aminosäuresequenzhomologie zu $G\alpha_{i2}$ ist, wurde dessen Expression mittels Immunoblotanalyse überprüft (Abbildung 3.2). Da $G\alpha_{i1}$ in den Inseln kaum nachzuweisen war, wurde hier auf eine Quantifizierung verzichtet.

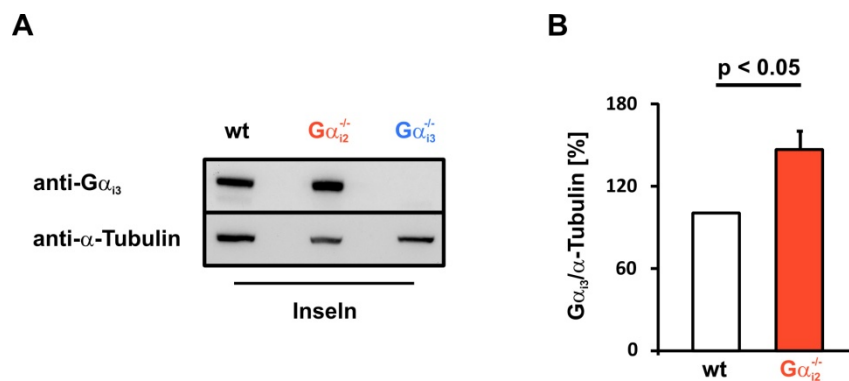


Abbildung 3.2: Expression von $G\alpha_{i3}$ in Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln. Repräsentativer Immunoblot isolierter Inseln von Wildtyp- (wt), $G\alpha_{i2}$ -defizienten- ($G\alpha_{i2}^{-/-}$) und $G\alpha_{i3}$ -defizienten ($G\alpha_{i3}^{-/-}$) Mäusen. Die Antikörperspezifität wird durch das Fehlen einer Bande in den $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Inseln gezeigt. Die Überprüfung der Ladungsmenge erfolgte mit α -Tubulin (A). (B) Statistische Auswertung der $G\alpha_{i3}$ -Expression in Inseln von Wildtyp- und $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren (n = 5-6 Tiere; mindestens 3 unabhängige Einzelerperimente pro Tier). In $G\alpha_{i2}$ -defizienten Inseln kommt es zu einer Hochregulation des $G\alpha_{i3}$ -Proteins um 50%. Die Proteinmenge der Wildtyp-Inseln wurde jeweils auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM.

Durch das Fehlen der $G\alpha_{i2}$ -Untereinheit kommt es zu einer signifikanten Hochregulation der $G\alpha_{i3}$ -Untereinheit etwa um den Faktor 1,5 in $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln (wt 100%; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ 146 ± 14,3%). Möglicherweise könnte die Hochregulation des $G\alpha_{i3}$ -

Proteins zu einer zumindest teilweisen Kompensation des $G\alpha_{i2}$ -Verlustes führen. Neben den drei $G\alpha_i$ -Isoformen sind auch $G\alpha_o$ -Proteine in den Inseln exprimiert. Für $G\alpha_{o2}$ wurde bereits gezeigt, dass diese für die Hemmung der Insulinsekretion wichtig sind (Tang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011). Da bereits eine Hochregulation der $G\alpha_{i3}$ -Isoform in den Inseln detektiert werden konnte, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass das Fehlen der quantitativ dominanten $G\alpha_{i2}$ -Isoform zu einer Verschiebung des Expressionsmuster der $G\alpha_o$ -Splicevarianten führt. Deshalb wurde auch für $G\alpha_o$ -Proteine eine Expressionsanalyse mittels Immunoblotanalysen durchgeführt (Abbildung 3.3).

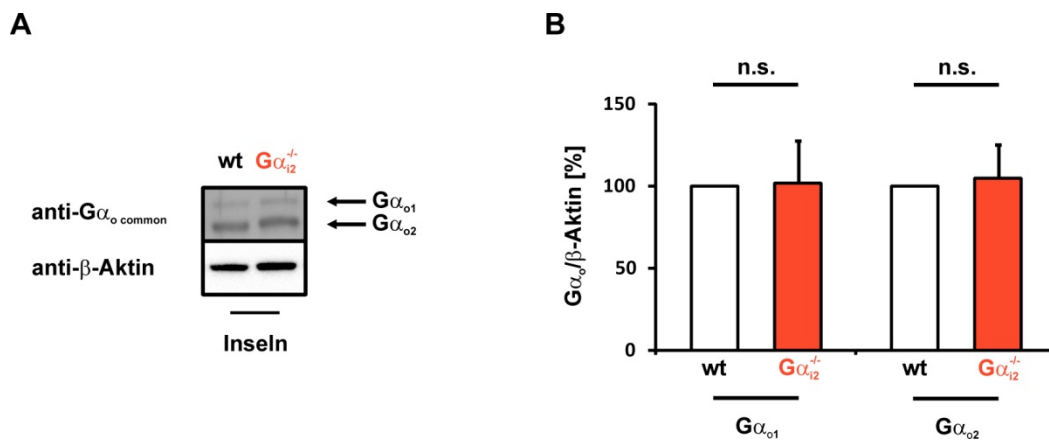


Abbildung 3.3: Expression von $G\alpha_o$ in Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln. (A) Repräsentativer Immunoblot von Insellysaten isoliert aus wt und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen inkubiert mit $G\alpha_o$ -spezifischen Antikörpern. Die Überprüfung der Ladungsmenge erfolgte mit β -Aktin. (B) Statistische Quantifizierung der $G\alpha_o$ -Expressionslevel in Inseln. Eine Hochregulation der $G\alpha_o$ -Isoformen ist nicht erkennbar (Leiss *et al.*, 2014).

Die Expression von $G\alpha_{o1}$ (wt 100%; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $102 \pm 25,8\%$) und $G\alpha_{o2}$ (wt 100%; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $105 \pm 20,5\%$), ($n = 7-8$ Tiere) ist in wt und $G\alpha_{i2}$ -defizienten Inseln vergleichbar. Es wurden pro Tier mindestens drei unabhängige Einzelerperimente durchgeführt. Die Expressionsanalysen der $G\alpha_{i0}$ -Isoformen ergab somit einzig für $G\alpha_{i3}$ eine Hochregulation.

3.1.1.3 Expressionsanalyse der G-Proteinuntereinheiten $G\alpha_s$ und $G\alpha_q$

Da auch $G\alpha_s$ - und $G\alpha_q$ -Proteine in Langerhans-Inseln exprimiert werden, wurden Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln auf Veränderungen in der Expression dieser Proteine untersucht (Abbildung 3.4).

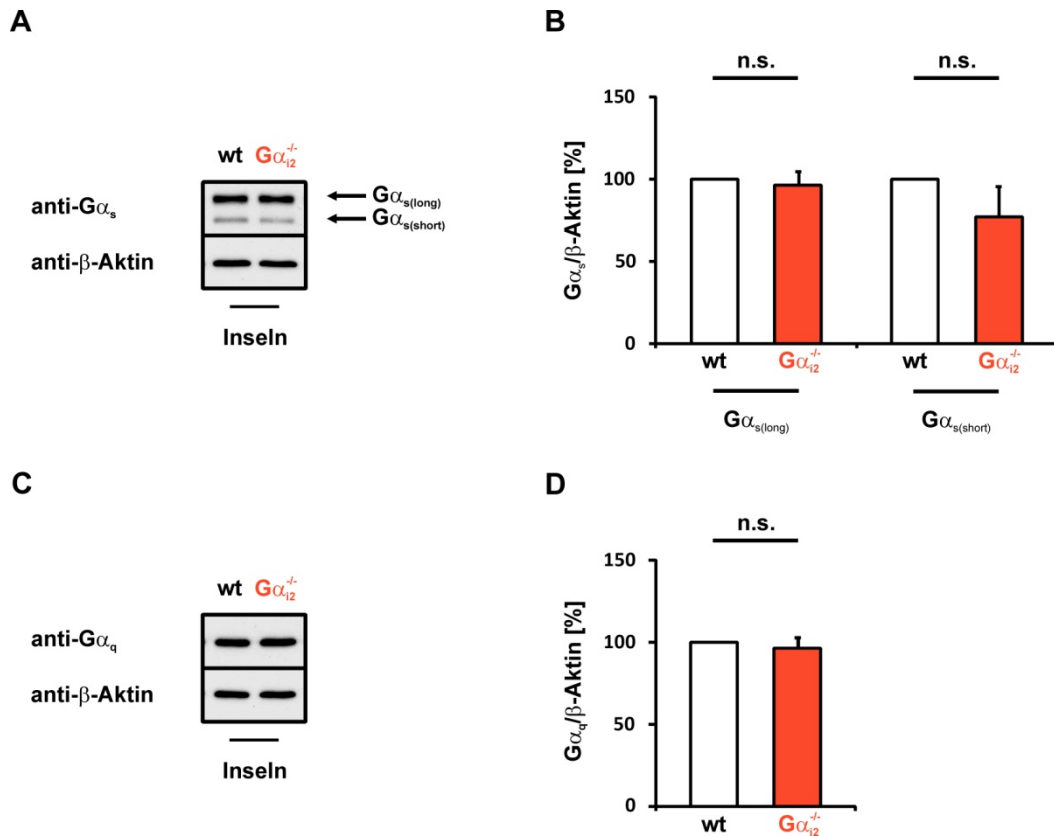


Abbildung 3.4: Expression von $G\alpha_s$ und $G\alpha_q$ in Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln. (A) Gezeigt ist ein exemplarischer Immunoblot von wt und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln inkubiert mit $G\alpha_s$ -spezifischen Antikörpern. Sowohl $G\alpha_{s(long)}$ als auch $G\alpha_{s(short)}$ sind detektierbar, eine Veränderung des Expressionsmusters in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln verglichen zum wt ist nicht erkennbar (B). $G\alpha_q$ -Proteinexpression (C) und statistische Quantifizierung (D) in Lysaten isolierter wt und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln. Die $G\alpha_q$ -Expression in wt und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln unterscheidet sich nicht. Die Überprüfung der Ladungsmenge erfolgte mit β -Aktin. Für die Quantifizierung wurde die Proteinmenge in den Wildtyp-Inseln jeweils auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM (Leiss *et al.*, 2014).

Die Expression der beiden $G\alpha_s$ -Isoformen $G\alpha_{s(long)}$ (wt 100%; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $96 \pm 8,9\%$) und $G\alpha_{s(short)}$ (wt 100%; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $77 \pm 19,0\%$) sowie der $G\alpha_q$ -Isoform (wt 100%; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $96 \pm 6,9\%$) (jeweils $n = 6$ Tiere) ist in wt und $G\alpha_{i2}$ -defizienten Inseln vergleichbar. Es wurden pro Tier mindestens drei unabhängige Einzelerperimente durchgeführt. Die Expressionsanalysen der $G\alpha$ -Isoformen ergab somit einzig für $G\alpha_{i3}$ eine signifikante Hochregulation.

3.1.1.4 Expressionslevel der β -Untereinheiten $G\beta_1$ und $G\beta_2$

G-Proteine bilden Heterotrimeren bestehend aus einer $G\alpha$ -Untereinheit sowie einem $G\beta\gamma$ -Komplex. Sowohl die $G\alpha$ -Untereinheit als auch der $G\beta\gamma$ -Komplex können eigene Effektoren in der Zelle aktivieren oder inhibieren und auf diese Weise an unterschiedlichen intrazellulären Signalwegen beteiligt sein. Neben einer Hochregulation der $G\alpha$ -Untereinheiten ist es daher von entscheidender Bedeutung die Expression der $G\beta$ -Untereinheiten zu analysieren. Bisher wurden fünf β -Untereinheiten beschrieben, von denen $G\beta_1$ und $G\beta_2$ ubiquitär und quantitativ dominant exprimiert werden. Eine unveränderte Expression von $G\beta\gamma$ -Dimeren trotz Fehlens der $G\alpha$ -Isoform könnte zu freien, ungebundenen und damit daueraktiven $G\beta\gamma$ -Komplexen führen. Diese könnten in der Zelle zu einer Überaktivierung $G\beta\gamma$ -abhängiger Signalwege führen. Darüber hinaus geben die $G\beta$ -Proteinlevel Aufschluss über das Ausmaß der möglichen $G\alpha_{i3}$ -Kompensation. Um die Expression der $G\beta$ -Untereinheiten zu analysieren wurden Immunoblots lysierter Inseln mit spezifischen Antikörpern gegen $G\beta$ -Untereinheiten durchgeführt und die beiden β -Untereinheiten $G\beta_1$ und $G\beta_2$ quantifiziert (Abbildung 3.5).

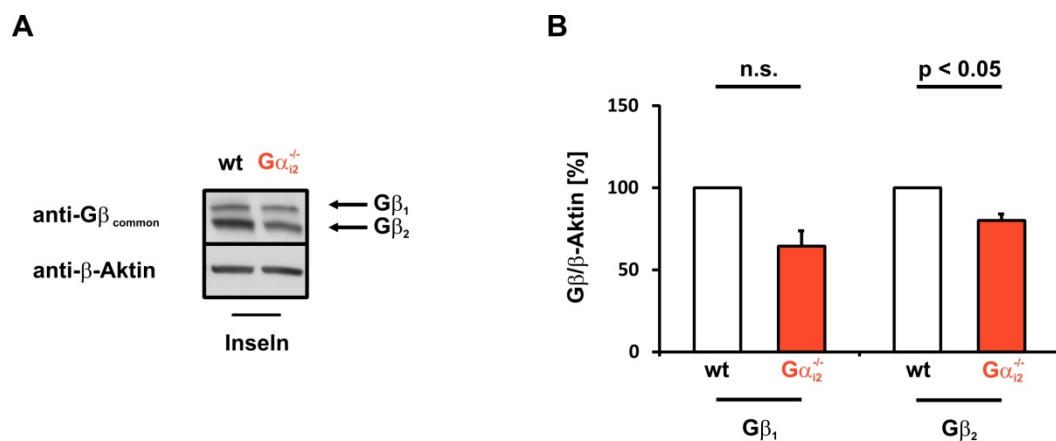


Abbildung 3.5: Expression von $G\beta_1$ und $G\beta_2$ in Wildtyp- und $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Inseln. Repräsentativer Immunoblot isolierter Insellysate von wt und $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Mäusen. Die Überprüfung der Ladungsmenge erfolgte mit α -Tubulin (A). (B) Statistische Auswertung der $G\beta$ -Expression in Insellysaten von Wildtyp- und $G\alpha_{12}$ -defizienten Tieren ($n = 3-4$ Tiere; mindestens 3 unabhängige Einzelerperimente pro Tier). In $G\alpha_{12}$ -defizienten Inseln kommt es zu einer verminderten Expression von $G\beta_1$ und $G\beta_2$. Die Proteinmenge der Wildtyp-Inseln wurde jeweils auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM (Leiss *et al.*, 2014).

Der Verlust des $G\alpha_{i2}$ -Proteins führt zu einer Reduktion von $G\beta_1$ um ca. 36% (wt 100%; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $64 \pm 9,6\%$) sowie zu einer signifikanten Reduktion von $G\beta_2$ um 20% (wt 100%; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $80 \pm 4,2\%$). Damit sind freie, ungebundene und daueraktive $G\beta\gamma$ -Komplexe wenig wahrscheinlich. Trotz erhöhter $G\alpha_{i3}$ -Proteinspiegel ist eine $G\alpha_{i2}$ -Kompensation durch $G\alpha_{i3}$ aufgrund verminderter $G\beta$ -Proteinlevel ebenfalls wenig wahrscheinlich.

3.1.2 Glukosehomöostase in $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen

Aufgrund zahlreicher PTX-Studien ist zu vermuten, dass sowohl $G\alpha_i$ als auch $G\alpha_o$ -Proteine an der Hemmung der Insulinsekretion beteiligt sind. Dennoch kann durch die Verwendung von PTX nicht auf Isoform-spezifische Funktionen rückgeschlossen werden. Um die Auswirkungen des Fehlens der $G\alpha_{i2}$ -Untereinheit auf die Glukosehomöostase zu untersuchen und zu überprüfen, ob $G\alpha_{i2}$ analog zu $G\alpha_o$ an der Hemmung der Insulinsekretion beteiligt ist, wurde *in vivo* ein intraperitonealer Glukosetoleranztest durchgeführt (Abbildung 3.6). Dieser kann Hinweise auf eine veränderte Glukoseverwertung oder Insulinsekretion geben (Andrikopoulos *et al.*, 2008).

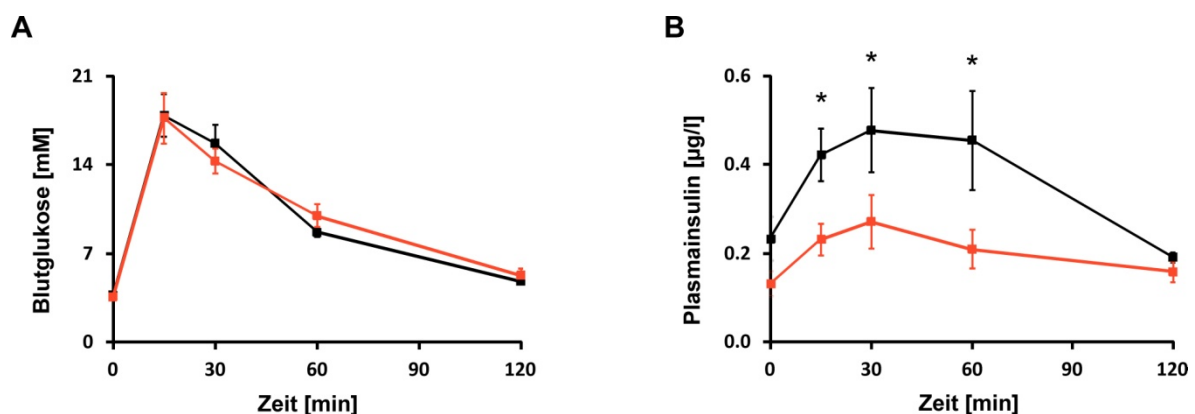


Abbildung 3.6: Intraperitonealer Glukosetoleranztest in Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren. Die basalen Blutglukose- und Plasmainsulinpiegel von Wildtyp- (■) und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ (■) Tieren wurden nach 12 Stunden fasten bestimmt. Den Tieren wurden anschließend 2 mg Glukose pro g Körpergewicht intraperitoneal appliziert und die Blutglukose (A)- und Plasmainsulinpiegel (B) nach 15, 30, 60 und 120 Minuten gemessen. Die Plasmainsulinpiegel in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren sind deutlich reduziert, wohingegen die Blutglukosespiegel sich nicht unterscheiden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 4-20 männlichen Tieren im Alter von 8-10 Wochen. (*: $p < 0,05$). Die Daten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Veronika Leiss und Frau Prof. Schürmann (DifE) zur Verfügung gestellt (Leiss *et al.*, 2014).

Die basalen Blutglukosespiegel von Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren unterscheiden sich nicht (wt $3,7 \pm 0,3$ mM; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $3,6 \pm 0,2$ mM; $n = 18-20$). Während der ersten 15 Minuten nach Glukoseapplikation zeigten die Blutglukosewerte beider Gruppen einen Anstieg auf $17,9 \pm 1,1$ mM (wt; $n = 8$) und $17,7 \pm 2,0$ mM ($G\alpha_{i2}^{-/-}$; $n = 8$). Nach 30 (wt $15,7 \pm 1,5$ mM; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $14,3 \pm 1,0$ mM; jeweils $n = 8$) und 60 Minuten (wt $8,7 \pm 0,4$ mM; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $10,0 \pm 0,9$ mM; jeweils $n = 8$) ließ sich eine Gegenregulation erkennen und 2 Stunden nach der Glukosegabe erreichte die Blutglukosekonzentration fast wieder basale Werte (wt $4,8 \pm 0,1$ mM; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $5,3 \pm 0,5$ mM; jeweils $n = 8$). Im nüchternen Zustand zeigten die Plasmainsulinspiegel von $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren leicht verminderte Werte (wt $0,23 \pm 0,05$ $\mu\text{g/l}$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $0,13 \pm 0,03$ $\mu\text{g/l}$; $n = 18-20$), die Unterschiede erreichten allerdings keine statistische Signifikanz. Nach der Glukoseapplikation stiegen die Plasmainsulinspiegel an (wt $0,42 \pm 0,06$ $\mu\text{g/l}$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $0,23 \pm 0,04$ $\mu\text{g/l}$; jeweils $n = 8$) und erreichten in beiden Gruppen nach 60 Minuten ihr Maximum (wt $0,48 \pm 0,10$ $\mu\text{g/l}$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $0,27 \pm 0,06$ $\mu\text{g/l}$; jeweils $n = 8$). Danach gingen die Plasmainsulinspiegel zurück (wt $0,45 \pm 0,11$ $\mu\text{g/l}$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $0,21 \pm 0,04$ $\mu\text{g/l}$ nach 60 Minuten; jeweils $n = 8$) und waren nach 120 Minuten wieder auf Basalniveau (wt $0,19 \pm 0,01$ $\mu\text{g/l}$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $0,16 \pm 0,02$ $\mu\text{g/l}$; jeweils $n = 8$). Zwischen 15 und 60 Minuten sind die Plasmainsulinspiegel der $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tiere statistisch signifikant niedriger als die der Wildtyp-Tiere. Die Ursachen hierfür sind unklar und könnten unter anderem in einer verminderten Insulinsekretion aufgrund eines niedrigeren Hormongehaltes oder eines Sekretionsdefekts, aber auch einer veränderten peripheren Insulinsensitivität begründet sein.

3.1.3 Gesamtinsulin- und Gesamtglukagongehalt $G\alpha_{i2}$ -defizienter Pankreaten

Um Veränderungen im Insulin- und Glukagongehalt zu überprüfen, wurden diese zunächst in den Pankreaten sowie den isolierten Inseln aus 10-13 Wochen alten Tieren durch essigsaurer Extraktion isoliert und mittels Insulin-ELISA bzw. Glukagon-RIA bestimmt (Abbildung 3.7).

Sowohl das Körper- (wt $25,6 \pm 0,6$ g; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $23,9 \pm 0,6$ g) als auch das Pankreasgewicht (wt $374,8 \pm 19,8$ mg; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $311,1 \pm 13,7$ mg) $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tiere unterschied sich signifikant von denen der Wildtyp-Tiere. Die Normalisierung auf das Körpergewicht ließ jedoch keine Unterschiede erkennen, da das verringerte

Pankreasgewicht dem verringerten Körpergewicht angepasst war (wt $14,6 \pm 0,7$ mg/g; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $13,3 \pm 0,7$ mg/g). Die Menge des aus den Pankreaten extrahierten Insulins unterschied sich nicht zwischen den beiden Genotypen (wt $39,0 \pm 3,0$ μ g; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $32,4 \pm 2,8$ μ g) auch nicht normalisiert auf Körper- (wt $1,53 \pm 0,12$ μ g/g; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $1,36 \pm 0,12$ μ g/g) bzw. Pankreasgewicht (wt $106,6 \pm 9,2$ ng/mg; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $107,3 \pm 0,7$ ng/mg).

Im Gegensatz zu diesen Resultaten zeigte die Analyse des Glukagongehaltes ein gegenteiliges Bild. Die Glukagonmenge bezogen auf Körper- (wt $46,9 \pm 6,1$ ng/g; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $30,6 \pm 2,4$ ng/g) bzw. Pankreasgewicht (wt $3,13 \pm 0,36$ ng/mg; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $2,56 \pm 0,28$ ng/mg) war in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren signifikant reduziert, ebenso wie die Gesamtglukagonmenge (wt $1,18 \pm 0,13$ μ g; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $0,73 \pm 0,06$ μ g).

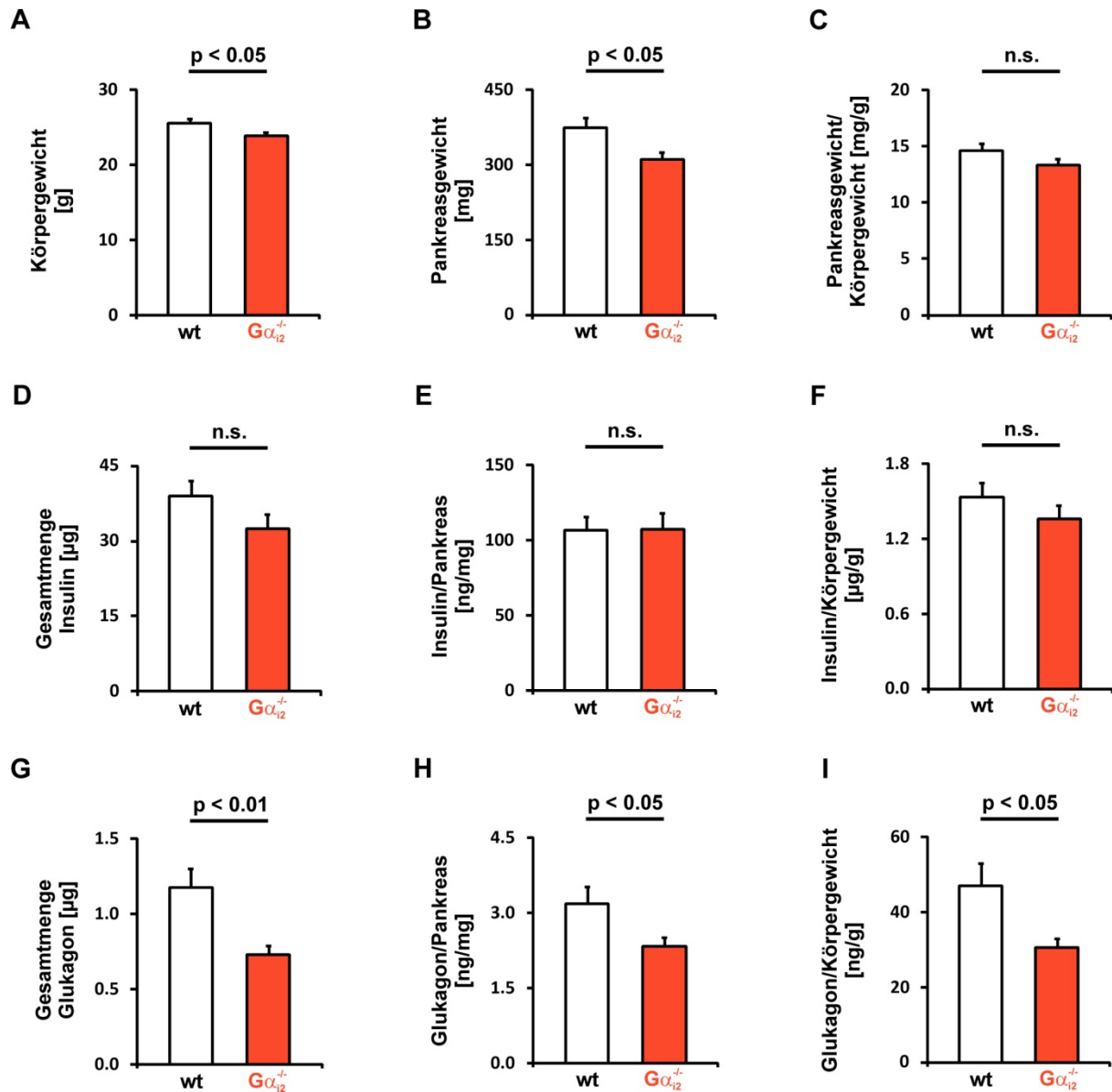


Abbildung 3.7: Insulin- und Glukagongehalt in Wildtyp- und $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Pankreaten. (A-C) Körper- und Pankreasgewichte sind in den $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Tieren signifikant reduziert. (D) Die Gesamtinsulinmenge auch normalisiert auf (F) das Körper- bzw. (E) Pankreasgewicht unterscheidet sich nicht von wt-Mäusen. (H, I) In $G\alpha_{12}$ -defizienten Tieren ist die Menge an Glukagon pro Körper- bzw. Pankreasgewicht um 27% bzw. 35% verringert, (G) die Gesamtglukagonmenge um 31%. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von jeweils $n = 12-14$ Tieren.

3.1.4 Morphologische Untersuchung von Langerhans-Inseln $G\alpha_{12}$ -defizienter Mäuse

Die verminderte Glukagonmenge der $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Pankreaten könnte möglicherweise morphologische Ursachen haben. Deshalb wurden histologische Untersuchungen an Wildtyp- und $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Pankreasschnitten durchgeführt. Dazu wurde ausschließlich die

Anzahl der Kerne sowie die Größe der Inseln quantifiziert, da Insulin und Glukagon dort produziert und sezerniert werden (Abbildung 3.8).

Es wurden jeweils die ersten Objektträger von Serienschnitten des gesamten Pankreas mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und die Inseln fotografiert und ausgewertet.

Die durchschnittliche Inselfläche (wt $9,9 \times 10^3 \pm 0,3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $8,1 \times 10^3 \pm 0,3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) sowie die Anzahl der Kerne (wt $123 \pm 3,8$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $99 \pm 3,4$) waren um jeweils 18% in $G\alpha_{i2}$ -defizienten Inseln signifikant verringert. Die berechnete Zellgröße (Flächenwert) unterschied sich nicht (wt $80,8 \pm 2,0 \mu\text{m}^2$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $80,3 \pm 1,2 \mu\text{m}^2$). Da die Anzahl der Kerne mit der Zellzahl gleichzusetzen ist, zeigten diese Ergebnisse, dass die Reduktion von Fläche und Kernen eine Hypoplasie der Inseln vermuten lässt, nicht jedoch eine Hypotrophie, da die Zellgröße unverändert war. Um die Hypoplasie weiter zu charakterisieren, wurde die prozentuale Verteilung der Inseln in verschiedenen Größengruppen analysiert (Abbildung 3.8).

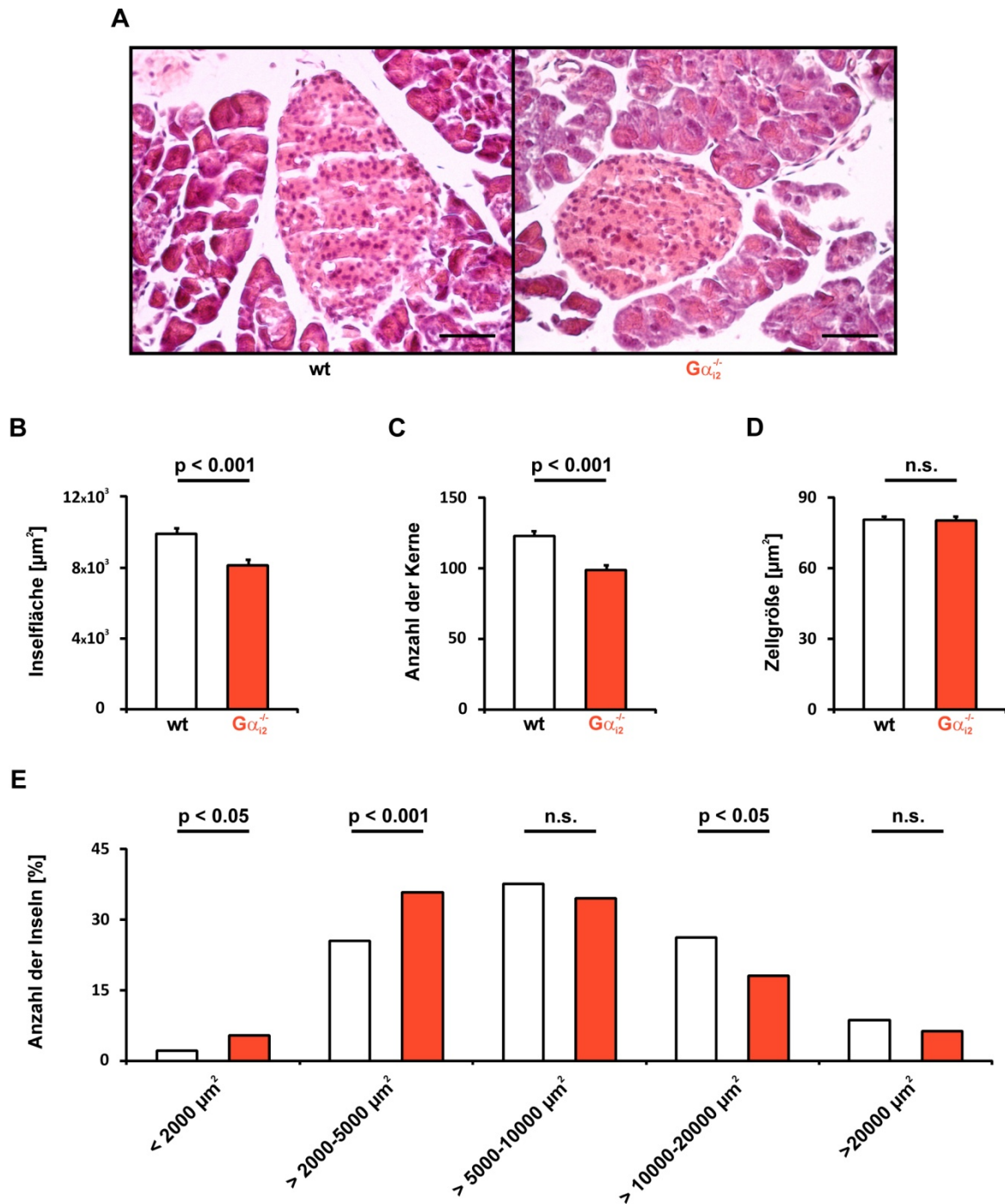


Abbildung 3.8: Morphologische Untersuchung von Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln. (A) Lichtmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Inseln in Hämatoxylin und Eosin gefärbten 8 μm Paraffinschnitten von Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Pankreaten. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm . Die durchschnittliche Inselfläche (B) und die Anzahl der Kerne (C) sind in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln um 18% reduziert, die Zellgröße (D) unterscheidet sich nicht. (E) In $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen ist die Anzahl kleinerer Inseln erhöht und die Anzahl größerer Inseln reduziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von 539 (wt) und 515 ($G\alpha_{i2}^{-/-}$) Inseln + SEM. Es wurde das komplette Pankreas von jeweils drei 6-9 Wochen alten Tieren pro Genotyp ausgezählt.

In der Gruppe kleiner als 2000 μm^2 (wt 2,2%; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ 5,4%) und zwischen 2000 μm^2 und 5000 μm^2 war die Anzahl der $G\alpha_{i2}$ -defizienter Inseln größer als die der Wildtyp-

Inseln (wt 25,4%; $G_{\alpha_{i2}^{-/-}}$ 35,7%). Die Anzahl mittelgroßer ($5000 \mu\text{m}^2$ und $10000 \mu\text{m}^2$) Inseln war in beiden Genotypen gleich (wt 37,6%; $G_{\alpha_{i2}^{-/-}}$ 34,6%). Wildtyp-Mäuse wiesen signifikant mehr große Inseln ($10000 \mu\text{m}^2$ und $20000 \mu\text{m}^2$) auf (wt 26,2%; $G_{\alpha_{i2}^{-/-}}$ 18,0%), wohingegen wt- und $G_{\alpha_{i2}^{-/-}}$ -Mäuse gleichviele Inseln größer als $20000 \mu\text{m}^2$ hatten (wt 8,5%; $G_{\alpha_{i2}^{-/-}}$ 6,2%). Somit kommt der Größenunterschied durch eine erhöhte Anzahl kleinerer Inseln und einer entsprechend reduzierten Anzahl größerer Inseln zustande. Die Ursache der verminderten Inselgröße könnte entweder unspezifisch in einer Reduktion aller Inselzelltypen, oder spezifisch nur einzelner Zelltypen liegen. Da α - und β -Zellen mit einem Anteil von 80-90% den Großteil der Langerhans-Inseln ausmachen, wurde die Zusammensetzung der Inseln hinsichtlich dieser beiden Zelltypen analysiert (Kulkarni, 2004). Dazu wurden Insulin- und Glukagon-gefärbte Inseln quantifiziert, um den Anteil von α - und β -Zellen an der Inselgesamtläche zu bestimmen (Abbildung 3.9). Bei der Auswertung wurde der Anteil an Zellen die weder α - noch β -Zellen sind vernachlässigt. Die Gesamtinselfläche wurde auf 100% gesetzt und die Fläche der α - und β -Zellen anteilig berechnet.

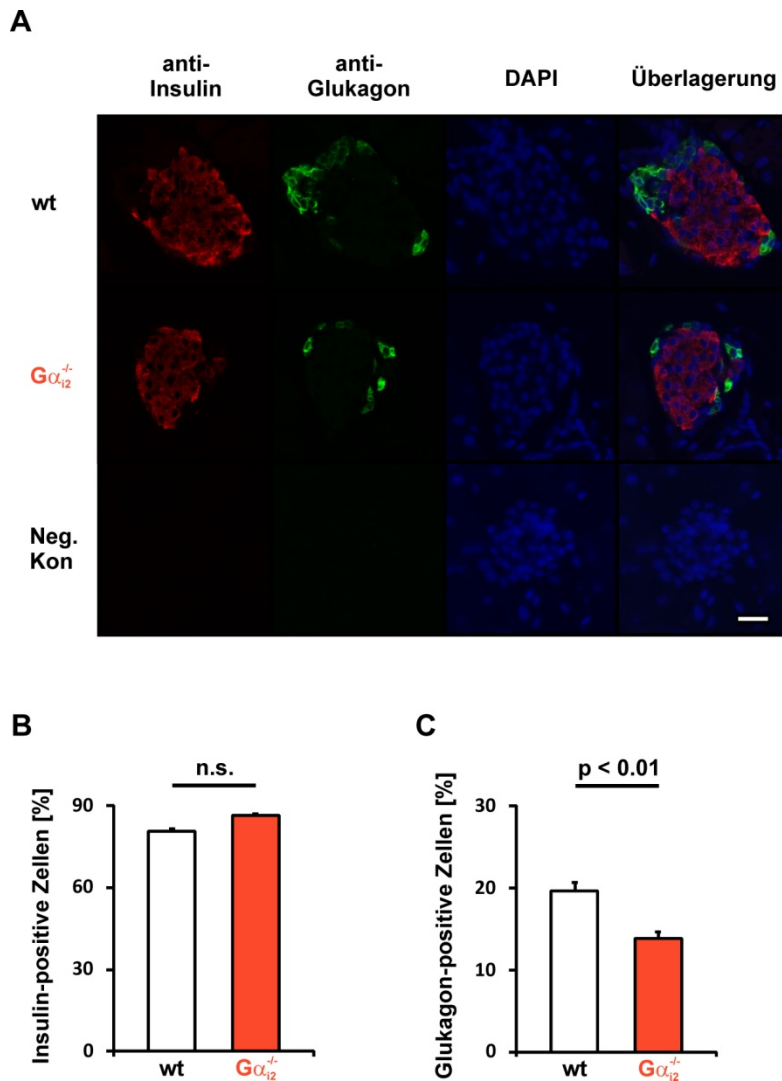


Abbildung 3.9: Quantifizierung Insulin- und Glukagon-positiver Zellen in Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln. (A) Repräsentative Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen mit primären Antikörpern gegen Insulin (rot) und Glukagon (grün) in 8 μm Paraffinschnitten. Die Darstellung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Rechts dargestellt ist die Überlagerung aller Kanäle. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm . (B) Die Fläche der Insulin-positiven Zellen unterscheidet sich nicht in Inseln von Wildtyp und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln, wohingegen die Fläche der Glukagon-positiven Zellen in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln um 30% verringert ist. Die Gesamtfläche der Insulin- und Glukagon-positiven Zellen wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 242 (wt) und 216 ($G\alpha_{i2}^{-/-}$) Inseln von jeweils 3 Tieren pro Genotyp + SEM.

Der Anteil von Insulin-positiven β -Zellen an der Gesamtfläche unterschied sich nicht in $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln von Wildtyp-Inseln (wt $80 \pm 1,1$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $86 \pm 0,9$), während der Anteil Glukagon-positiver α -Zellen in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln signifikant um 30% reduziert war (wt $20 \pm 1,1$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $13 \pm 0,9$).

Die verringerte Inselfläche bzw. der verminderte Anteil der Glukagon-positiven α -Zellen könnte durch Veränderungen der Proliferation von Inselzellen zustande kommen. Deshalb wurde die Proliferation in Wildtyp und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln von mit Hilfe

des Proliferationsmarkers PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) untersucht (Abbildung 3.10).

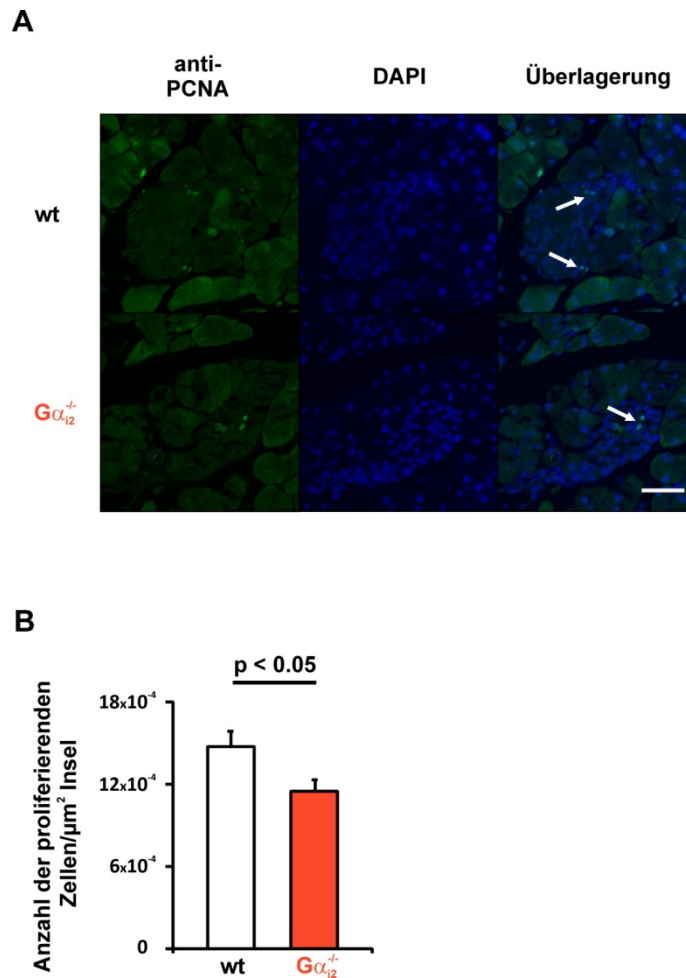


Abbildung 3.10: Proliferation von Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln. (A) Repräsentative Aufnahmen von PCNA-Färbungen (grün) in $8 \mu\text{m}$ Paraffinschnitten. Die weißen Pfeile weisen auf PCNA-positive Kerne hin. Der Maßstabsbalken entspricht $50 \mu\text{m}$. (B) Die Anzahl der proliferierenden Zellen pro Inselfläche ist in $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln verglichen mit Wildtyp-Inseln um 22% verringert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 148 (wt) und 146 ($G\alpha_{i2}^{-/-}$) Inseln von jeweils 3 Tieren pro Genotyp + SEM.

In $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln waren signifikant weniger PCNA-positive Kerne nachweisbar (wt $14,7 \times 10^{-4} \pm 1,2 \times 10^{-4}$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $11,4 \times 10^{-4} \pm 0,8 \times 10^{-4}$). Insgesamt entsprach dies einer Reduktion um 22 % und weist auf einen Proliferationsdefekt der $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln hin, durch den der verringerte Glukagongehalt (Abbildung 3.7G-I) zustande kommen könnte.

3.1.5 Hormonsekretion $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse

Die verringerte Anzahl Glukagon-positiver Zellen könnten die Balance zwischen Glukagon- und Insulinsekretion in $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren beeinflussen. Zudem könnte die Hormonsekretion generell aufgrund der morphologischen Unterschiede beeinträchtigt sein. Statische Hormonsekretionsexperimente an isolierten Inseln stellen eine geeignete Methode dar, um die Sekretionsfähigkeit der Inseln *in vitro* zu analysieren.

3.1.5.1 Glukagonsekretion

$G\alpha_{i2}$ -defiziente Inseln haben durchschnittlich etwa 30% weniger Glukagon-positive α -Zellen. Aus diesem Grund wurde die Glukagonsekretion an isolierten Inseln analysiert (Abbildung 3.11). Außerdem kann Glukagon als parakrines Hormon die Insulinsekretion beeinflussen (Kawai *et al.*, 1995).

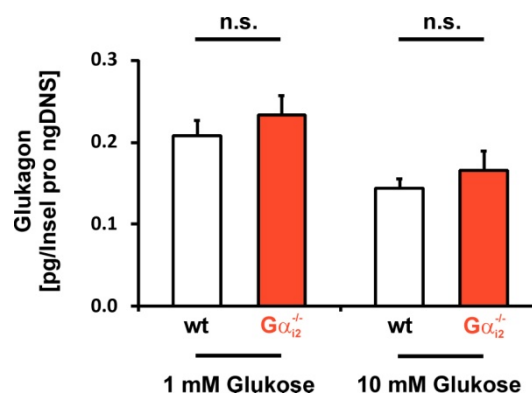


Abbildung 3.11: Glukagonsekretion isolierter Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln. Bei 1 mM Glukose kommt es in isolierten Inseln zur Sekretion von Glukagon, die bei 10 mM Glukosekonzentrationen gehemmt wird. Weder bei 1 mM, noch bei 10 mM sind Unterschiede zwischen Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln detektierbar. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 41-44 Messungen.

Als Gegenspieler von Insulin wird Glukagon vermehrt bei niedrigen Blutglukosekonzentrationen ausgeschüttet, höhere Blutglukosespiegel unterdrücken die Glukagonsekretion (Gromada *et al.*, 2007). Die Glukagonsekretion isolierter Inseln bezogen auf den DNS-Gehalt war nach einer Stunde bei 1 mM Glukose (wt 0,21 ± 0,02 pg/Insel; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ 0,23 ± 0,02 pg/Insel) und 10 mM Glukose (wt 0,14 ± 0,01 pg/Insel; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ 0,17 ± 0,02 pg/Insel) nicht unterschiedlich zwischen Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln. Eine verringerte Insulinsekretion aufgrund veränderter

Glukagonsekretion und damit einhergehende verminderte Plasmainsulinspiegel scheinen deshalb unwahrscheinlich.

3.1.5.2 Insulinsekretion

PTX-behandelte Inseln sezernieren massiv Insulin nach einem Glukosestimulus, da es zu einem Verlust der Hemmung durch $G_{i/o}$ -Proteine kommt. Um die Beteiligung des $G_{\alpha_{i2}}$ -Proteins an der Hemmung der Insulinsekretion zu untersuchen, wurde die Glukose-induzierte Insulinsekretion $G_{\alpha_{i2}}$ -defizienter Inseln analysiert (Abbildung 3.12).

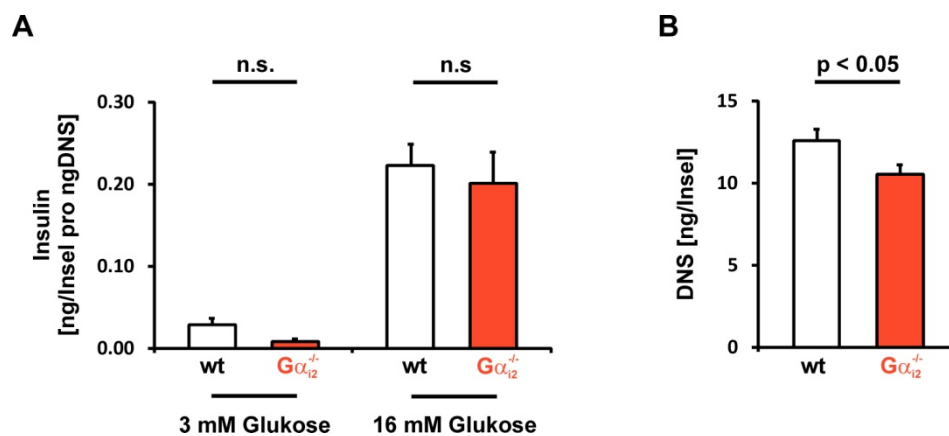


Abbildung 3.12: Insulinsekretion und DNS-Gehalt isolierter Wildtyp- und $G_{\alpha_{i2}}^{-/-}$ -Inseln. (A) Weder bei Niedrig- (3 mM) noch bei Hochglukose (16 mM) sind Unterschiede in der Glukose-induzierten Insulinsekretion von isolierten Wildtyp- und $G_{\alpha_{i2}}^{-/-}$ -Inseln messbar. Die Insulinsekretion wurde auf den DNS-Gehalt der Inseln bezogen da dieser in den $G_{\alpha_{i2}}^{-/-}$ -Inseln signifikant verringert war (B). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 14-71 Messungen.

Da $G_{\alpha_{i2}}^{-/-}$ -Inseln kleiner sind wurde zunächst der Gesamt-DNS-Gehalt bestimmt (wt 12,6 ng/Insel \pm 0,7; $G_{\alpha_{i2}}^{-/-}$ 10,6 ng/Insel \pm 0,6), um anschließend Menge an sezerniertem Insulin auf diesen normalisieren zu können. Die signifikant verringerte DNS-Menge der $G_{\alpha_{i2}}$ -defizienten Inseln deckte sich mit den Befunden der geringeren Inselfläche (Abbildung 3.8). Bei Niedrigglukose (3 mM) sezernierten sowohl Wildtyp als auch $G_{\alpha_{i2}}^{-/-}$ -Inseln nur eine geringe Menge Insulin (wt 0,028 \pm 0,009; $G_{\alpha_{i2}}^{-/-}$ 0,009 \pm 0,002). Die Zugabe von 16 mM Glukose resultierte in einem Anstieg der Sekretionsrate. Auch hier unterschied sich die dabei sezernierte Insulinmenge nicht zwischen $G_{\alpha_{i2}}^{-/-}$ -Inseln und Wildtyp-Inseln (wt 0,223 \pm 0,026; $G_{\alpha_{i2}}^{-/-}$ 0,201 \pm 0,039).

Die Glukose-induzierte Insulinsekretion *in vitro* wird durch das Fehlen des $G\alpha_{i2}$ -Proteins nicht beeinflusst.

3.1.5.3 Periphere Insulinsensitivität

Neben einer gestörten Insulinsekretion der β -Zellen könnte eine verbesserte periphere Insulinsensitivität Insulin-abhängiger Gewebe wie Skelettmuskel oder Fettgewebe die Ursache für die signifikant verringerten Plasmainsulinspiegel sein. Insulin führt nach Bindung an den Rezeptor zur Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktion. Dabei werden Phosphatgruppen übertragen und auf diese Weise Proteine unter anderem über den Phosphoinositid-3-Kinase/AKT-Signalweg aktiviert. Die Menge des phosphorylierten AKTs wird dabei zur Quantifizierung des Signalweges in insulinsensitiven Geweben wie Leber-, Muskel- und Fettgewebe herangezogen (Abbildung 3.13); (Le Roith & Zick, 2001; Shao *et al.*, 2000).

Im GTT wurde den Tieren ein Glukosebolus intraperitoneal verabreicht. Durch Glukose allein wird nur ein geringer Teil der Gesamtmenge an Insulin sezerniert. Durch weitere Nahrungsbestandteile, vor allem durch Fette und Aminosäuren, kann die Insulinsekretion *per se* erheblich gesteigert werden (Floyd *et al.*, 1966; Itoh *et al.*, 2003). Um zu überprüfen, inwieweit der Zusatz von Nahrungsbestandteilen die Insulinsekretion bzw. die Blutglukosespiegel in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren beeinflusst, wurden Blutglukose- und Plasmainsulinspiegel nach zwei-stündiger Futteraufnahme (53% Kohlehydrate, 36% Protein, 11% Fett) analysiert. Wiederum unterschieden sich die basalen Blutglukose- und Plasmainsulinspiegel nach 12 Stunden fasten nicht (wt $2,9 \pm 0,2$ mM; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $3,4 \pm 0,2$ mM) (wt $0,39 \pm 0,08$ $\mu\text{g/l}$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $0,25 \pm 0,06$ $\mu\text{g/l}$). Zwar führte die freie Nahrungsaufnahme in beiden Genotypen zu einem Anstieg der Blutglukosespiegel, jedoch war dieser in den $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren um 24% reduziert (wt $8,0 \pm 0,3$ mM; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $6,1 \pm 0,3$ mM). Die Erhöhung der Plasmainsulinspiegel fiel in beiden Gruppen gleichermaßen aus (wt $2,75 \pm 0,34$ $\mu\text{g/l}$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $2,71 \pm 0,34$ $\mu\text{g/l}$).

Diese Ergebnisse in Kombination mit den Ergebnissen aus dem GTT (s. 3.1.2) weisen auf eine verbesserte periphere Insulinsensitivität der $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tiere hin: In $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren sind die Blutglukosespiegel trotz signifikant niedrigerer Plasmainsulinspiegel unverändert. Gleiche Plasmainsulinspiegel haben dagegen signifikant niedrigere Blutglukosespiegel zur Folge.

Um die Insulinsensitivität von Leber, Skelettmuskel und Fettgewebe zu untersuchen, wurde die AKT-Phosphorylierung in diesen Geweben quantifiziert. Das p-AKT/AKT-Verhältnis war in Leber (wt $0,04 \pm 0,02$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $0,07 \pm 0,02$), Muskel (wt $0,28 \pm 0,07$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $0,27 \pm 0,11$) und weißem Fettgewebe (wt $0,77 \pm 0,17$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $0,56 \pm 0,10$), im gefasteten Zustand nicht unterschiedlich und nahm nach der Nahrungsaufnahme in allen Geweben zu. Im Skelettmuskel (wt $0,65 \pm 0,17$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $0,67 \pm 0,18$), sowie in der Leber (wt $0,61 \pm 0,21$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $0,45 \pm 0,1$), waren keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren messbar. Im weißen Fettgewebe dagegen, war das p-AKT/AKT-Verhältnis in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren signifikant erhöht verglichen zu den Wildtyp-Geschwistern (wt $1,53 \pm 0,10$; $G\alpha_{i2}^{-/-}$ $2,27 \pm 0,27$). Diese Ergebnisse weisen auf eine verbesserte Insulinsensitivität des weißen Fettgewebes hin. Es bleibt jedoch zu klären, ob nicht weitere Parameter zu der verbesserten Glukosetoleranz beitragen, da das $G\alpha_{i2}$ -Protein in den globalen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren im gesamten Organismus fehlt.

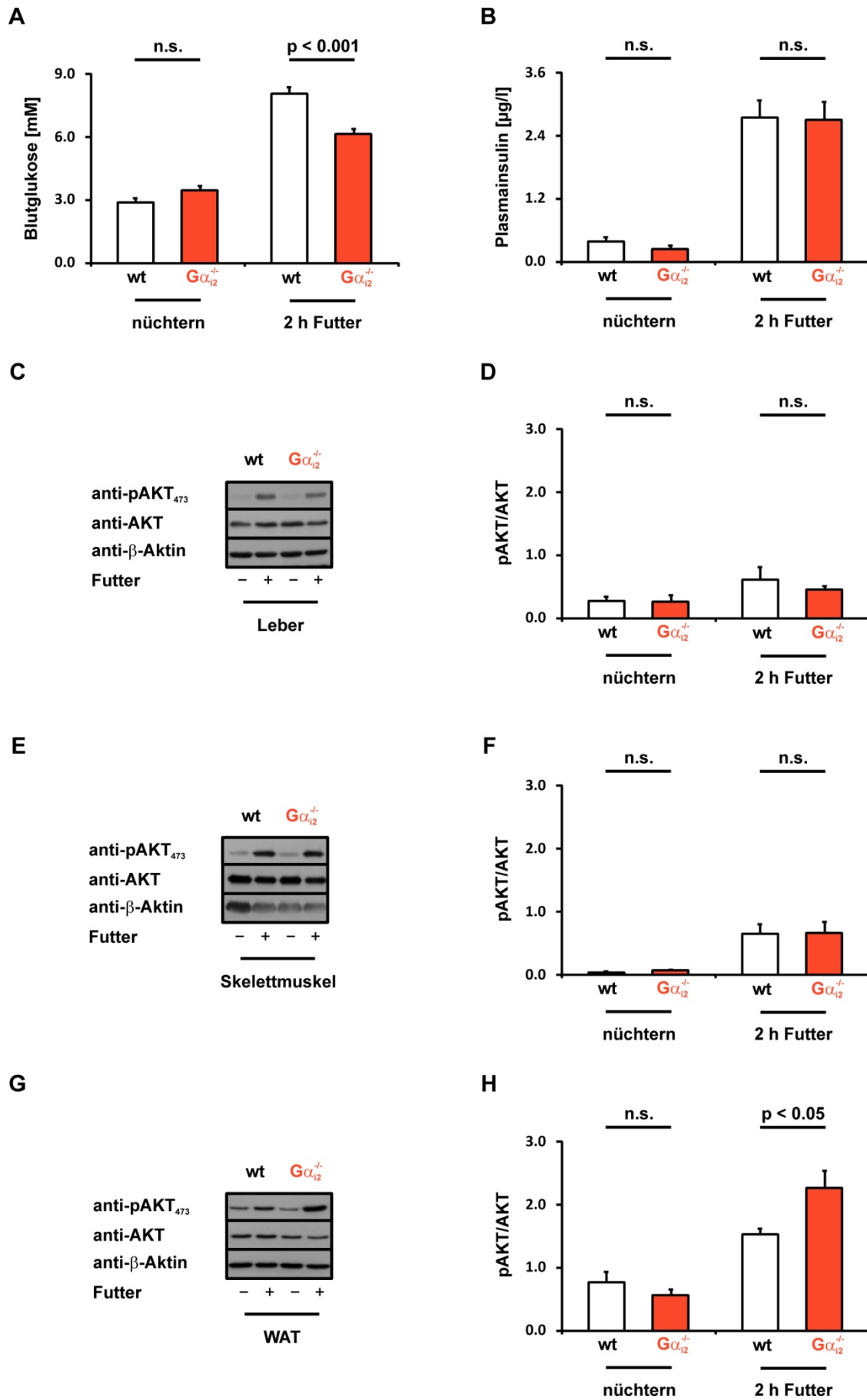


Abbildung 3.13: Periphere Insulinsensitivität von Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren basal und nach ad libitum-Fütterung. Blutglukose (A)- und Plasmainsulinspiegel (B) von Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen nach 12 Stunden fasten (jeweils links) und 2 Stunden freiem Zugang zu Futter (jeweils rechts). Im nüchternen, basalen Zustand unterschieden sich diese Parameter der beiden Genotypen nicht. Die Blutglukosespiegel der $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäuse waren nach 2 Stunden Zugang zu Futter signifikant reduziert, während sich die Plasmainsulinspiegel nicht unterschieden (B). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 11 männlichen Tieren im Alter von 26-28 Wochen. (C) Repräsentativer Immunoblot von Leberlysaten. (D) Die AKT-Phosphorylierung in der Leber unterschied sich nach 2 Stunden Zugang zum Futter nicht zwischen Wildtyp- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen. (E) Repräsentativer Immunoblot von Skelettmuskellysaten. (F) Nach 2 Stunden Zugang zum Futter war die ATK-Phosphorylierung im Skelettmuskel von $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen nicht unterschiedlich von der in Wildtyp-Mäusen. (G) Beispielhafter Immunoblot des weißen Fettgewebes (WAT). (H) Im weißen Fettgewebe war die AKT-Phosphorylierung nach 2 Stunden Zugang zum Futter in $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen um 33% erhöht verglichen mit den wt-Tieren. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM von jeweils n = 8 Tieren; mindestens drei unabhängige Einzelexperimente pro Tier. Die Daten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Veronika Leiss zur Verfügung gestellt.

3.2 Charakterisierung β -Zell-spezifischer $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse

Da den globalen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren das $G\alpha_{i2}$ -Protein im gesamten Organismus fehlt, ist es schwierig, die organspezifischen Funktionen genauer zu charakterisieren. Besonders auf eine β -Zell-spezifische Rolle des $G\alpha_{i2}$ -Proteins können deshalb nur sehr schwer Rückschlüsse gezogen werden. Deshalb wurden konditionale β -Zell-spezifische $G\alpha_{i2}$ -defiziente Tiere generiert ($G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$), um die Rolle von $G\alpha_{i2}$ in der β -Zelle genauer untersuchen zu können.

3.2.1 Rekombinationsanalyse in $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Mäusen

β -Zell-spezifische $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse ($G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$) wurden durch Verpaarung von Mäusen, deren *Gnai2*-Gen vor Exon 2 und nach Exon 4 eine loxP-Seite enthält ($G\alpha_{i2}^{\text{fl/fl}}$) mit Tieren, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Ratten Insulin Promotors exprimieren (Rip-Cre^{+tg}) generiert (Genotyp: $G\alpha_{i2}^{\text{fl/fl}}$; Rip-Cre^{+tg}). Als Kontrollen (Kon) wurden Geschwistertiere oder Tiere im selben Alter verwendet, die ebenfalls das Transgen trugen, da bereits ein Einfluss des Transgens auf die Glukosehomöostase beschrieben wurde (Lee *et al.*, 2006). Die Kontrollen waren für das $G\alpha_{i2}$ -Gen aber entweder wildtyp oder heterozygot (Genotyp: $G\alpha_{i2}^{+/+}$; Rip-Cre^{+tg} bzw. $G\alpha_{i2}^{+/fl}$; Rip-Cre^{+tg}).

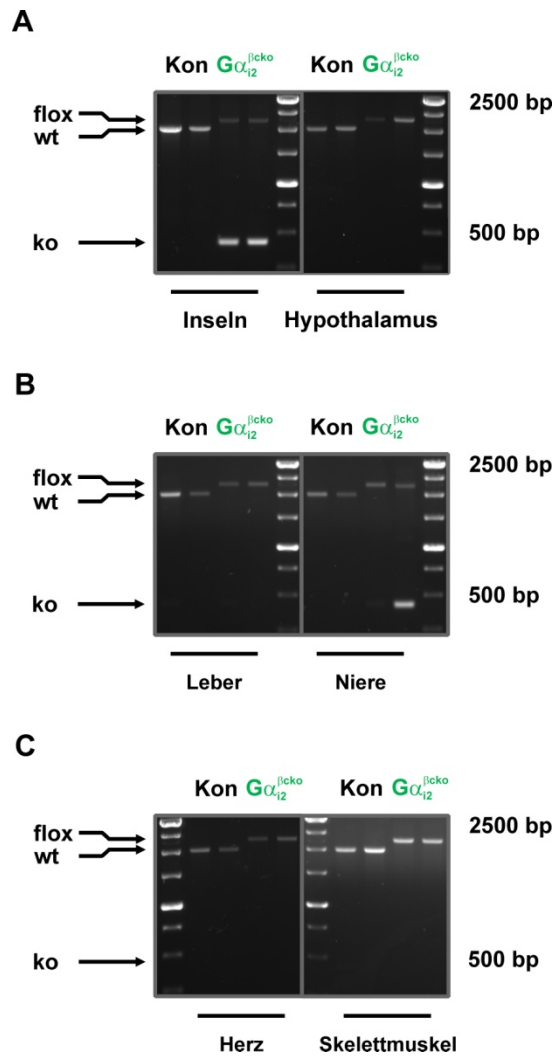


Abbildung 3.14: Rekombinationsanalysen an Kontroll- und $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Organen mittels PCR. Dargestellt ist die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus der Analyse von (A) Inseln und Hypothalamus, (B) Leber und Niere sowie (C) Herz und Skelettmuskel. In allen Organen der $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Tiere wird das größere PCR-Produkt von 2222 bp (flox) amplifiziert, in den Kontrollorganen ein 1952 bp (wt) langes PCR-Produkt. In den Inseln der $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Tiere ist zudem ein kleineres PCR-Produkt von 390 bp (ko) detektierbar, welches auf eine Rekombination hinweist.

Um die Effizienz der β -Zell-spezifischen $G\alpha_{12}$ -Deletion zu überprüfen, erfolgte in diesen Mäusen zunächst eine Rekombinationsanalyse mittels PCR. Hierfür wurde genomische DNS aus verschiedenen Organen isoliert und untersucht (Abbildung 3.14). Durch die Wahl der Primerbindungsstellen vor und nach den loxP-Stellen wird für das gefloxtete Allel ein PCR-Produkt von 2222 bp amplifiziert, für das Wildtyp-Allel ein 1952 bp langes. Da die Expression der Cre-Rekombinase durch den Ratten-Insulinpromotor gesteuert wird und somit nur in den β -Zellen vorhanden sein sollte, kommt es in den Inseln der Tiere mit gefloxtetem $G\alpha_{12}$ -Allel zur Amplifikation eines 390 bp langen PCR-Produktes (Abbildung 3.14A links). Da in Inseln neben β -Zellen

weitere Zelltypen existieren, in denen keine Rekombination stattfindet, ist auch das 2222 bp große PCR-Produkt in $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln nachweisbar. Es gibt zwei verschiedene Rip-Cre-Linien, die hinsichtlich ihrer Rekombinationsverhalten im Hypothalamus analysiert wurden und dort zum Teil erhebliche Rekombinationsraten zeigten, was wiederum die Insulinsekretion beeinflussen könnte (Chan & Sherwin, 2012; Wicksteed *et al.*, 2010). Um zu überprüfen, ob es mit der von uns gewählten Rip-Cre-Linie ebenfalls zu einer Rekombination kommt, wurde auch DNS aus dem Hypothalamus der $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tiere isoliert. Eine Rekombination auf DNS-Ebene konnte in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren nicht bestätigt werden (Abbildung 3.14A, rechts). In Leber, Herz und Skelettmuskel fand ebenfalls keine Rekombination statt, allerdings war in der Niere eine schwache Rekombination detektierbar. In keinem der analysierten Gewebe von Kontrolltieren konnte eine Rekombination nachgewiesen werden, so dass von einer β -Zell-spezifischen Deletion ausgegangen werden kann.

3.2.2 $G\alpha_{i2}$ -Proteinexpression in $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Mäusen

Abbildung 3.14 zeigt die erfolgreiche Rekombination auf DNS-Ebene in Inselextrakten von $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren. Allerdings gibt dies noch keinen Aufschluss darüber ob auch die Proteinexpression des $G\alpha_{i2}$ -Proteins in den Inseln unterdrückt ist. Deshalb wurden Immunoblots von Insellysaten aus $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren und Kontrollmäusen durchgeführt. Aufgrund der bereits beschriebenen Rekombination im Hypothalamus und der von uns detektierten Rekombinationsbande in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Nieren wurde darüber hinaus auch in diesen Geweben die $G\alpha_{i2}$ -Expression analysiert (Abbildung 3.15).

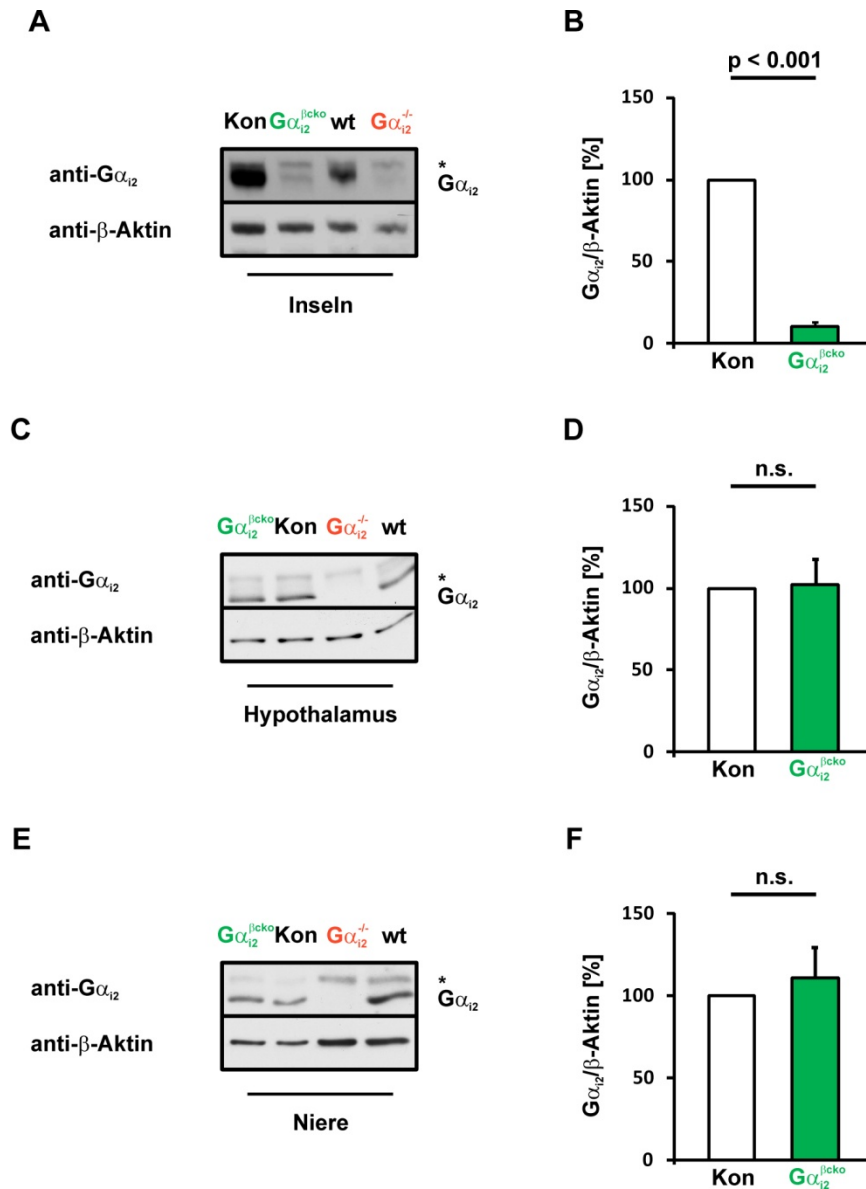


Abbildung 3.15: $G\alpha_{12}$ -Proteinexpression in Inseln, Hypothalamus und Niere von Kontroll- und $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Tieren. $G\alpha_{12}$ kann (A) in Insellysaten, (C) im Hypothalamus und (E) in der Niere von $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -defizienten- ($G\alpha_{12}^{\beta cko}$), Kontroll- (Kon) sowie Wildtyp- (wt) Mäusen detektiert werden. In $G\alpha_{12}$ -defizienten- ($G\alpha_{12}^{-/-}$) Geweben ist keine $G\alpha_{12}$ -Expression nachweisbar. Die Überprüfung der Ladungsmenge erfolgte mit β -Aktin. Statistische Auswertung der Proteinexpression (B) in Insel-, (D) Hypothalamus- und (F) Nierenlysaten von Kontroll- und $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Tieren. Die $G\alpha_{12}$ -Proteinlevel in den Inseln $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Tiere sind um fast 90% reduziert. Die Menge an $G\alpha_{12}$ im Hypothalamus und der Niere der $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Tiere unterscheidet sich nicht von der in den Kontroll-Tieren. Die Proteinmenge in den Kontroll-Organen wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM ($n = 3-4$ Tiere; jeweils mindestens Triplikate). * Die obere Bande weist auf die mögliche $G\alpha_{11}$ -Expression in den Geweben hin (Leiss *et al.*, 2014).

Die Quantifizierung der $G\alpha_{12}$ -Proteinexpression in $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Inseln ergab eine etwa 90%ige Reduktion verglichen mit Kontroll-Inseln (Kon 100%; $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ $11 \pm 4,7\%$). Dies lässt auf eine vollständige Deletion des $G\alpha_{12}$ -Proteins in allen Insulinproduzierenden Zellen schließen. Die $G\alpha_{12}$ -Expression in den Hypothalami der

$G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tiere unterschied sich nicht von der in den Kontroll-Tieren (Kon 100%; $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ $107 \pm 16\%$) und ergänzt die Befunde der DNS-Analyse. Trotz einer schwachen Rekombination auf DNS-Ebene in der Niere, unterschied sich die $G\alpha_{i2}$ -Proteinexpression in $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ - Nieren nicht von Kontroll-Nieren (Kon 100%; $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ $114 \pm 18,6\%$).

Da in den Immunoblotanalysen Gesamtzelllysate aufgetragen und in den Inseln noch geringfügige Mengen an $G\alpha_{i2}$ -Protein detektiert werden konnten, wurde die Expression des $G\alpha_{i2}$ -Proteins in Inseln mittels Immunfluoreszenzfärbungen visualisiert (Abbildung 3.16), um die Expression des $G\alpha_{i2}$ -Proteins auf zellulärer Ebene zu überprüfen. Die Immunfluoreszenzfärbung akkumulierte im Bereich der Membranen und war in allen Zellen der Kontroll-Inseln nachweisbar, wohingegen in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln diese Färbung fast vollständig fehlte. Einzelne, vor allem randständige Inselzellen (weiße Pfeile) wiesen noch eine $G\alpha_{i2}$ -Färbung auf. In der Überlagerung der Messkanäle konnte in Insulin-positiven β -Zellen $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln keine $G\alpha_{i2}$ -Färbung nachgewiesen werden. Dies bestätigte die Befunde der Immunoblot-Analyse.

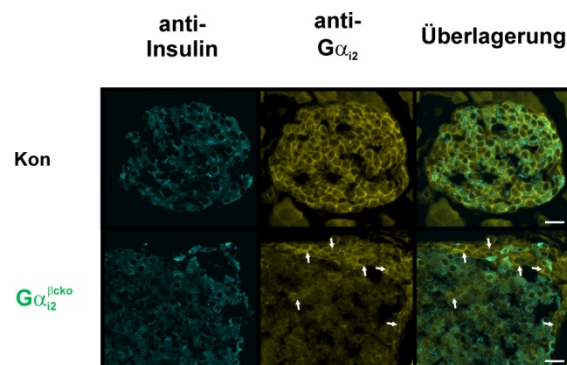


Abbildung 3.16: Untersuchung der Expression von $G\alpha_{i2}$ in Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln. Immunfluoreszenzfärbungen an $6 \mu\text{m}$ Kryoschnitten paraformaldehydfixierter Pankreaten von Kontroll- (Kon) und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Mäusen ($G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$). Diese wurden mit spezifischen Antikörpern gegen $G\alpha_{i2}$ (gelb), Insulin (blau) inkubiert. Rechts dargestellt ist die Überlagerung beider Kanäle. Die Maßstabsbalken entsprechen $40 \mu\text{m}$ (Leiss *et al.*, 2014).

3.2.3 Expressionsanalyse von G-Proteinuntereinheiten in Langerhans-Inseln

3.2.3.1 Expression der $G\alpha_{i3}$, $G\beta_1$ und $G\beta_2$ -Untereinheiten in $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln

Da die Expressionsanalyse von $G\alpha_{i3}$ und $G\beta_1$ und $G\beta_2$ in den Inseln globaler $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tiere Unterschiede verglichen mit Wildtypkontrollen ergab, wurde auch in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln die Expression dieser Proteine analysiert (Abbildung 3.17).

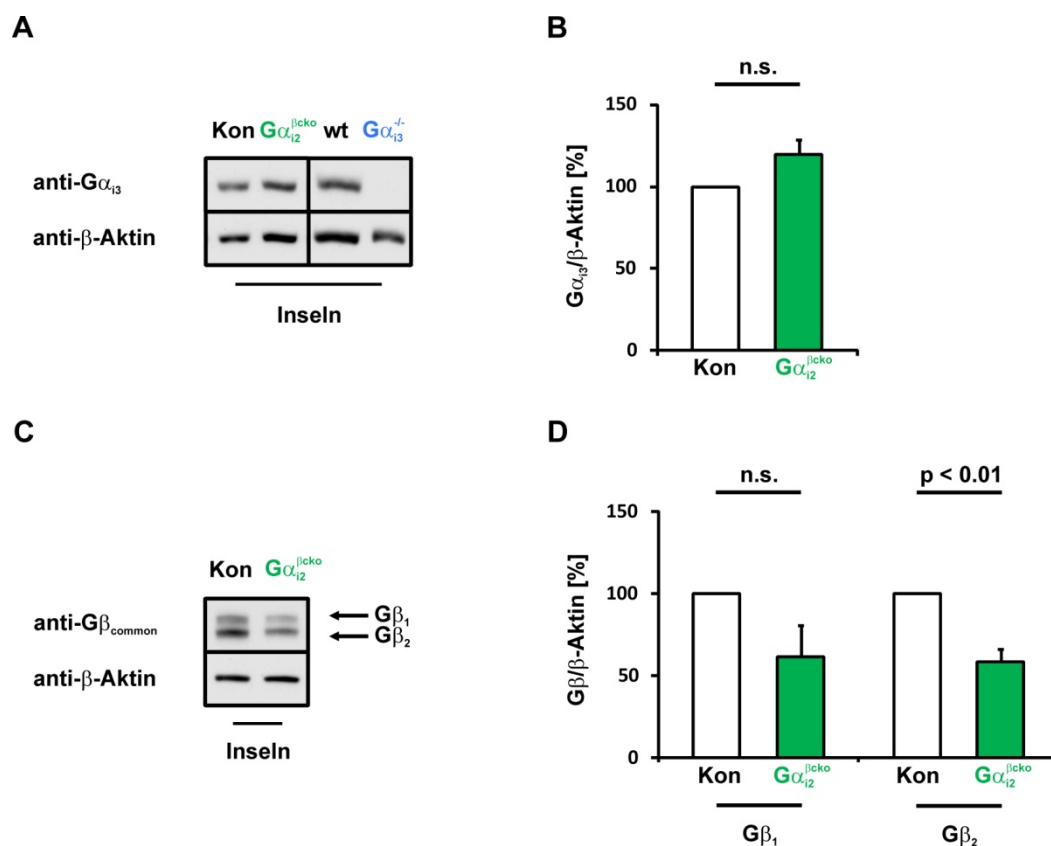


Abbildung 3.17: Expression von $G\alpha_{i3}$, $G\beta_1$ und $G\beta_2$ in Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln. Repräsentative Immunoblots isolierter, lysierter Inseln aus Kontroll- (Kon), $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -defizienten- ($G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$), Wildtyp- (wt) und $G\alpha_{i3}$ -defizienten- ($G\alpha_{i3}^{-/-}$) Mäusen inkubiert mit primären Antikörpern gegen (A) $G\alpha_{i3}$ oder (C) $G\beta_1$ und $G\beta_2$. Die gleiche Ladungsverteilung wurde mit β -Aktin überprüft. Statistische Auswertung der Proteinexpression von (B) $G\alpha_{i3}$ bzw. (D) $G\beta_1$ und $G\beta_2$ in Inseln von Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren. Die Expression von $G\alpha_{i3}$ in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln ist verglichen mit Kontroll-Inseln nicht signifikant verändert, wohingegen die Expression von $G\beta_1$ und $G\beta_2$ in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln um 39 bzw. 42% reduziert sind. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von $n = 3-4$ Tieren; mindestens 3 unabhängige Einzelerperimente pro Tier (Leiss *et al.*, 2014).

Anders als in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren war die Analyse der $G\alpha_{i3}$ -Expression in Inseln von $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren nicht hochreguliert verglichen mit Kontroll-Inseln (Kon 100%;

$G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $119 \pm 12,2\%$). Somit kann ein kompensatorischer Effekt von $G\alpha_{i3}$ in diesen Tieren vernachlässigt werden. Im Gegensatz dazu konnte in den $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Tieren, wie auch schon in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren, eine tendenzielle Reduktion der Proteinexpression von $G\beta_1$ (Kon 100%; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $61 \pm 19,5\%$) und eine signifikante Reduktion von $G\beta_2$ (Kon 100%; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $58 \pm 8,2\%$) nachgewiesen werden, welche bei der Analyse des Phänotyps in Betracht gezogen werden muss.

3.2.3.2 Expressionslevel der α -Untereinheiten $G\alpha_o$, $G\alpha_s$ und $G\alpha_q$

Obwohl für die $G\alpha_{i3}$ -Isoform in $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Inseln keine veränderte Expression detektiert werden konnte, wurden zusätzlich zu $G\alpha_{i3}$ und den β -Untereinheiten die Proteinexpression der $G\alpha_o$ -Proteine, sowie $G\alpha_s$ und $G\alpha_q$ mittels Immunoblots untersucht (Abbildung 3.18).

In Analogie zu den Ergebnissen in den globalen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren ist auch in den $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Inseln die Expression von $G\alpha_{o1}$ (Kon $100 \pm 31,5$; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $115 \pm 3,9$), $G\alpha_{o2}$ (Kon 100%; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $115 \pm 29,0\%$) (mindestens 3 unabhängige Einzelerperimente pro Tier), sowie die lange und die kurze $G\alpha_s$ Isoform (Kon 100%; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $114 \pm 6,2\%$; Kon 100%; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $118 \pm 17,8\%$) und $G\alpha_q$ (Kon 100%; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $110 \pm 7,4\%$) (mindestens 3 unabhängige Einzelerperimente pro Tier) nicht signifikant verändert, verglichen mit der Expression in den Kontroll-Inseln.

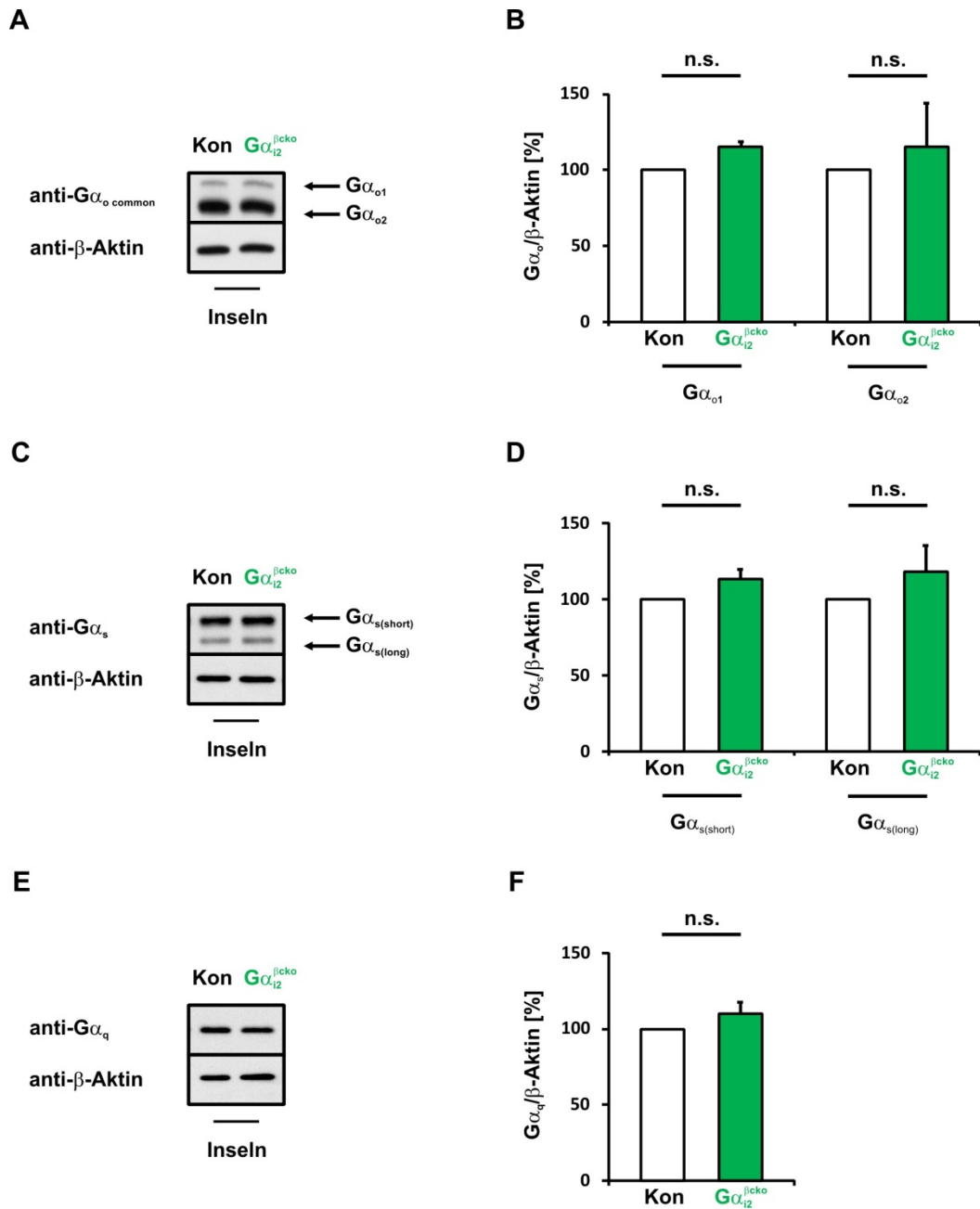


Abbildung 3.18: Untersuchung der Expression von $G\alpha_o$, $G\alpha_s$ und $G\alpha_q$ in Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln. Repräsentative Immunoblots isolierter Inseln jeweils inkubiert mit Antikörpern gegen $G\alpha_{o1/o2}$ (A), $G\alpha_s$ (C) bzw. $G\alpha_q$ (E). Die quantitative Auswertung ergab keine Unterschiede in der Proteinexpression von $G\alpha_{o1/o2}$ (B), $G\alpha_s$ (D) und $G\alpha_q$ (F) in $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ verglichen mit den Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von jeweils 3 Tieren, mindestens 3 unabhängige Einzelerperimente pro Tier (Leiss *et al.*, 2014).

3.2.4 Morphometrische Untersuchung der $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Inseln

Die Analyse der globalen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Inseln ergab eine verringerte Inselfläche. Deshalb wurden die $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Inseln ebenfalls morphometrisch untersucht (Abbildung 3.19).

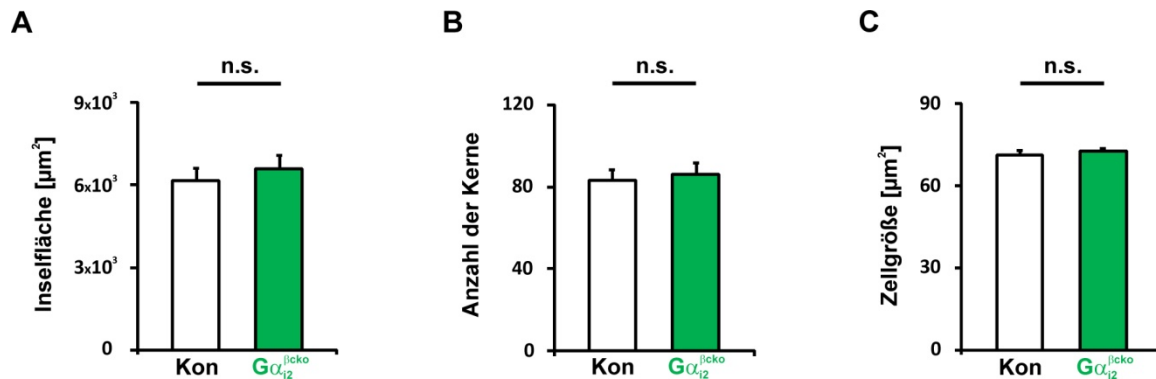


Abbildung 3.19: Histologische Untersuchung von Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Inseln. Weder die Inselfläche (A) noch die Anzahl der Kerne (B) unterscheidet sich in den $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Inseln von den Kontroll-Inseln. Dementsprechend ist auch die berechnete Zellgröße (C) nicht verändert. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 228 (Kon) und 227 ($G\alpha_{i2}^{\beta cko}$) Inseln aus jeweils 3 Tieren im Alter von 6 Wochen (Leiss *et al.*, 2014).

Die Quantifizierung ergab keine Veränderung der durchschnittlichen Inselfläche (Kon $6,2 \times 10^3 \pm 0,5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $6,5 \times 10^3 \pm 0,5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) sowie der Anzahl der Kerne (Kon $83,0 \pm 5,3$; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $86,0 \pm 6,1$) der Inseln $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Tiere. Die berechnete Größe der Inselzellen unterschied sich ebenfalls nicht (Kon $71,2 \pm 1,7 \mu\text{m}^2$; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $72,8 \pm 1,0 \mu\text{m}^2$). Eine Veränderung der Insulinsekretion aufgrund morphologischer Unterschiede kann deshalb ausgeschlossen werden.

3.2.5 Glukosehomöostase in $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Mäusen

Für die globalen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse ist ein vermindertes Körpergewicht beschrieben (Rudolph *et al.*, 1995). Deshalb wurde die Gewichtsentwicklung der $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Tiere untersucht. Außerdem wurden die basalen Blutglukosespiegel dieser Tiere analysiert, um die Auswirkung des Fehlens von $G\alpha_{i2}$ in den β -Zellen auf die basalen Blutzuckerspiegel zu überprüfen (Abbildung 3.20).

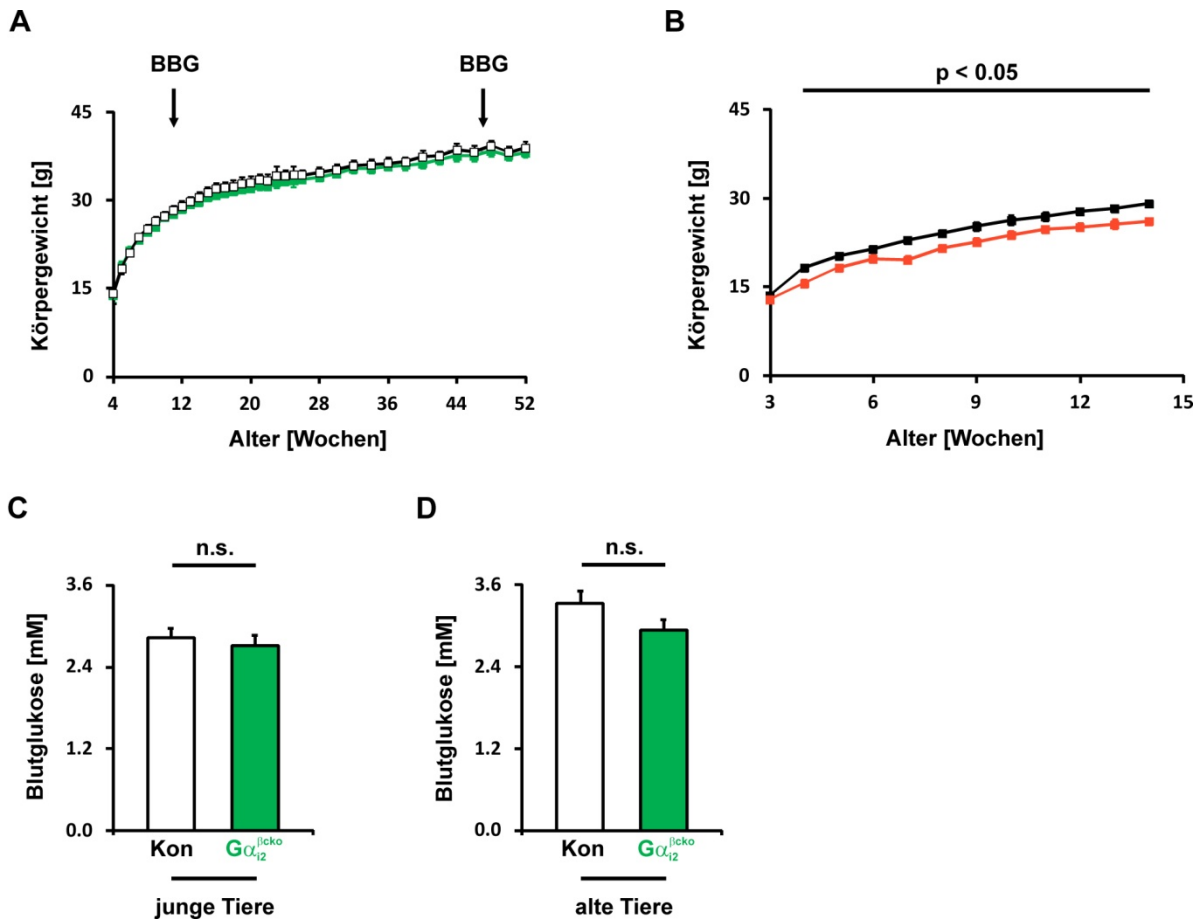


Abbildung 3.20: Gewichtsentwicklung und basale Blutglukosespiegel (BBG) von Kontroll- und $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Tieren. (A) Gewichtsentwicklung von 13-14 männlichen Tieren pro Genotyp. Im Alter von 4-26 Wochen wurden die Tiere wöchentlich, danach 14-tägig gewogen. Es sind keine Unterschiede im Körpergewicht zwischen Kontroll (\square)- und $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Mäusen (\blacksquare) erkennbar. Die Pfeile in (A) bezeichnen die Zeitpunkte der Messung der Blutglukosespiegel aus (B) und (C). (B) Das Körpergewicht der globalen $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Tiere (\blacksquare) war signifikant geringer verglichen mit Wildtyp-Tieren (\blacksquare). Die basalen Blutglukosespiegel von (C) jungen (8-14 Wochen) und (D) älteren (44-50 Wochen) Tieren unterscheiden sich in $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Tieren nicht von den Kontroll-Geschwistern. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Die Gewichtsentwicklungen der Wildtyp- und $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Tiere wurden freundlicherweise von Frau Dr. Veronika Leiss zur Verfügung gestellt (Leiss *et al.*, 2014).

Die Langzeitanalyse des Körpergewichts von insgesamt 27 männlichen Kontroll- und $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Tieren ergab keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Auch offensichtliche Auffälligkeiten, wie z.B. struppiges oder graues Fell, Haarausfall oder gekrümmte Körperhaltung, waren nicht erkennbar. Außerdem verstarb keines der Tiere während des Beobachtungszeitraums von fast einem Jahr. Zweimalig während dieses Zeitraums wurden die basalen Blutglukosespiegel nach 12 Stunden fasten bestimmt. Weder bei den jungen Tieren (Kon $2,8 \pm 0,1$ mM; $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ $2,7 \pm 0,2$ mM), noch bei den älteren Tieren (Kon $3,3 \pm 0,2$ mM; $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ $2,9 \pm 0,2$ mM) unterschieden sich die basalen Blutglukosespiegel von Kontroll- und $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Tieren.

Um die Auswirkungen der β -Zell-spezifischen Deletion von $G\alpha_{i2}$ auf die Plasmainsulin- und Blutglukosespiegel *in vivo* nach Glukoseapplikation zu untersuchen, wurde mit diesen Tieren im Alter von 10 Wochen ein intraperitonealer Glukosetoleranztest durchgeführt (Abbildung 3.21).

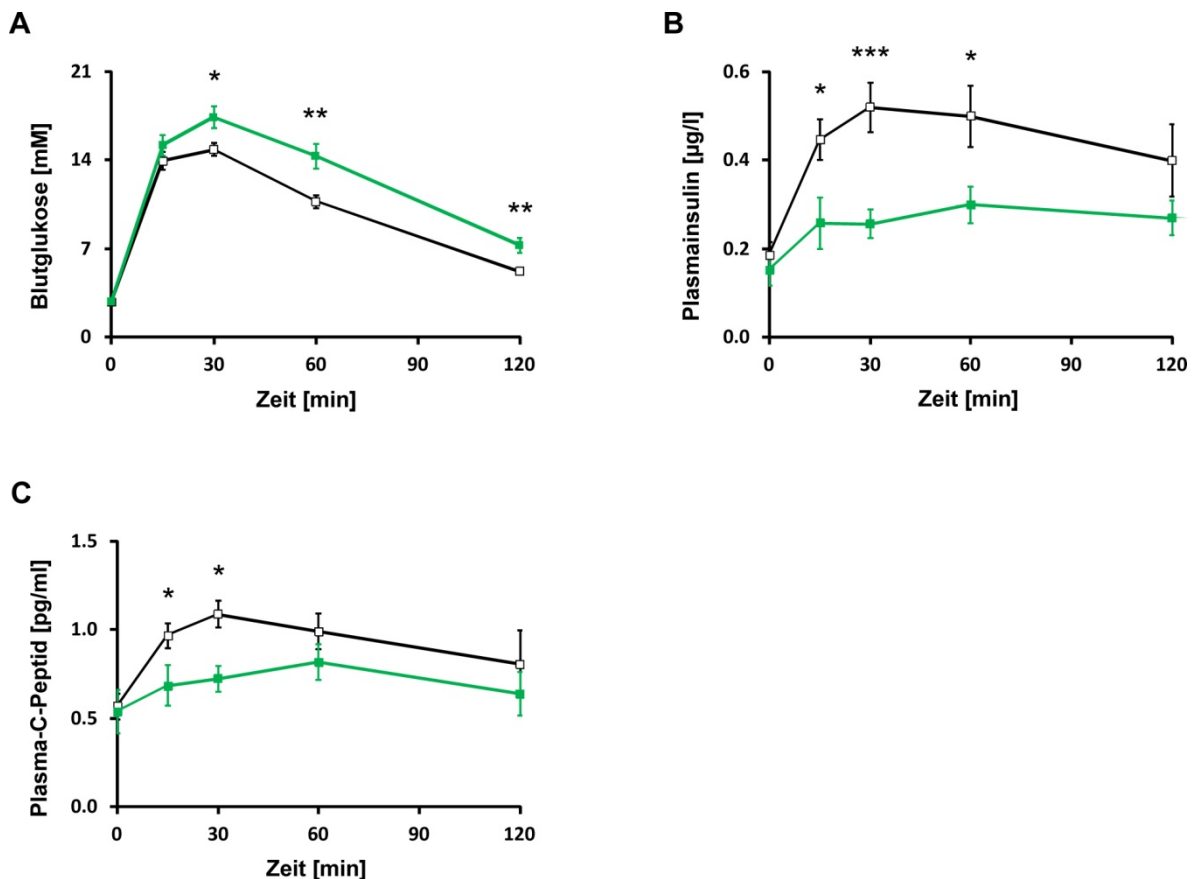


Abbildung 3.21: Intraperitonealer Glukosetoleranztest in Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren. (A) Blutglukose-, (B) Plasmainsulin- und (C) C-Peptidspiegel von Kontroll- (□) und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ - (■) Tieren. Nach 12 Stunden wurden die basalen Blutglukose- und Plasmainsulinwerte bestimmt. Anschließend erhielten die Tiere 2 mg Glukose pro g Körpergewicht intraperitoneal und die Blutglukose, die Plasmainsulinspiegel und -C-Peptidspiegel zu den Zeitpunkten 15, 30, 60 und 120 Minuten wurden bestimmt. Die Blutglukosespiegel waren nach 30, 60 und 120 Minuten signifikant erhöht, die Plasmainsulinspiegel bereits nach 15, 30 und 60 Minuten deutlich reduziert. Die Plasma-C-Peptidspiegel in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren waren nach 15 und 30 Minuten ebenfalls signifikant verringert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 15-17 (Blutglukose) bzw. 8-10 (Plasmainsulin) männlichen Tieren im Alter von 10 Wochen (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$) (Leiss *et al.*, 2014).

Die Blutglukosespiegel nach 12 Stunden fasten (Kon $2,8 \text{ mM} \pm 0,2$; $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ $2,8 \text{ mM} \pm 0,2$) wiesen keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf. Nach der Glukoseapplikation stiegen die Blutglukosespiegel innerhalb von 15 Minuten an (Kon $13,9 \pm 0,7 \text{ mM}$; $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ $15,1 \pm 0,8 \text{ mM}$) und erreichten bei 30 Minuten ihr

Maximum (Kon $14,8 \pm 0,5$ mM; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $17,4 \pm 0,9$ mM). Bereits zu diesem Zeitpunkt lagen die Blutzuckerspiegel der $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Tiere signifikant über den Blutzuckerspiegeln der Kontrolltiere. Trotz sinkender Blutzuckerspiegel nach 60 und 120 Minuten lagen die $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Werte noch immer signifikant über den Kontrollwerten (Kon $10,7 \pm 0,5$ mM; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $14,3 \pm 0,1$ mM; Kon $5,2 \pm 0,3$ mM; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $7,3$ mM $\pm 0,6$).

Die basalen Plasmainsulinspiegel von Kontroll-Tieren und $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Tieren unterschieden sich zwar nicht, sind aber wie in den globalen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren tendenziell niedriger (Kon $0,19$ $\mu\text{g/l} \pm 0,03$; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $0,15$ $\mu\text{g/l} \pm 0,04$). Im Gegensatz zu den $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Tieren erhöhten sich die Insulinspiegel in den Kontroll-Tieren 1 Minuten (Kon $0,45$ $\mu\text{g/l} \pm 0,05$; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $0,26$ $\mu\text{g/l} \pm 0,06$) und 30 Minuten (Kon $0,52$ $\mu\text{g/l} \pm 0,06$; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $0,26$ $\mu\text{g/l} \pm 0,03$) nach der Glukosegabe deutlich, um nach einer Stunde (Kon $0,50$ $\mu\text{g/l} \pm 0,07$; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $0,30$ $\mu\text{g/l} \pm 0,04$) wieder abzusinken. Somit waren während der ersten Stunde des Glukosetoleranztests die Plasmainsulinspiegel der $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Tiere um ca. 40-50% geringer als in den Kontroll-Tieren. Erst zwei Stunden nach der Glukoseapplikation waren die Unterschiede nicht mehr statistisch signifikant (Kon $0,40$ $\mu\text{g/l} \pm 0,08$; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $0,27$ $\mu\text{g/l} \pm 0,04$). Die Plasma-C-Peptidspiegel verliefen synchron zu den Plasmainsulinspiegeln (basal: Kon $0,57$ pg/ml $\pm 0,07$; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $0,54$ pg/ml $\pm 0,12$) und waren nach 15 und 30 min ebenfalls signifikant reduziert (15 min: Kon $0,96$ pg/ml $\pm 0,07$; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $0,68$ pg/ml $\pm 0,11$; 30 min: Kon $1,09$ pg/ml $\pm 0,08$; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $0,72$ pg/ml $\pm 0,07$). Nach einer und zwei Stunden unterschieden sich die Plasma-C-Peptidspiegel nicht mehr zwischen Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Tieren (60 min: Kon $0,99$ pg/ml $\pm 0,10$; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $0,82$ pg/ml $\pm 0,10$; 120 min: Kon $0,81$ pg/ml $\pm 0,19$; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $0,64$ pg/ml $\pm 0,12$). Die generell höheren C-Peptidkonzentrationen in $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ - und Kontroll-Tieren basieren auf einer längeren Plasmahalbwertszeit des C-Peptids im Vergleich zur Insulinhalbwertszeit (Polonsky *et al.*, 1984). Die β -Zell-spezifische Deletion des $G\alpha_{i2}$ -Proteins führt zu einer verschlechterten Glukosetoleranz aufgrund einer verringerten Insulinsekretion und stützt die Hypothese, dass $G\alpha_{i2}$ an der Insulinsekretion beteiligt ist. Wie in den globalen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren (Abbildung 3.13) wurde auch in den $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Tieren der Einfluss weiterer Nahrungsbestandteile auf die Insulinsekretion *in vivo* untersucht (Abbildung 3.22).

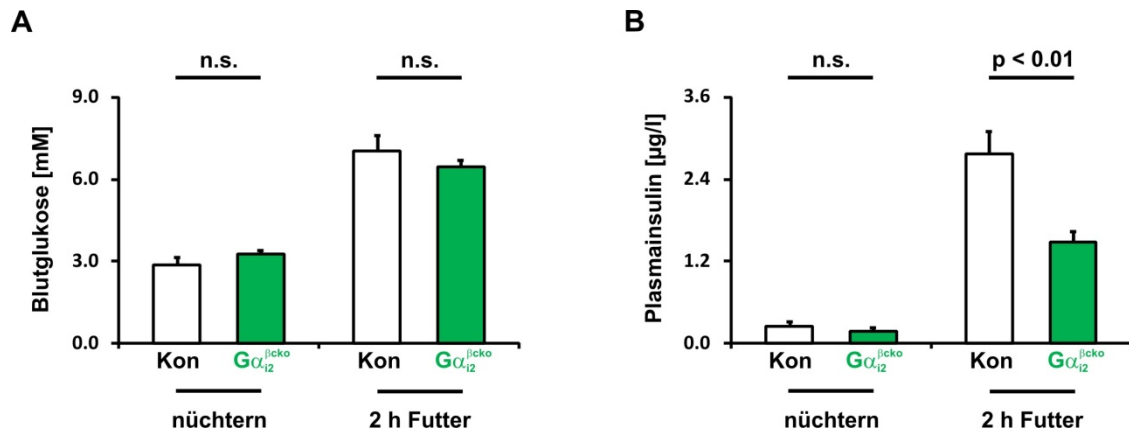


Abbildung 3.22: Blutglukose- und Plasmainsulinspiegel nüchtern und nach 2 Stunden Zugang zu Futter in Kontroll- und $G\alpha_{12}^{\betacko}$ -Tieren. Blutglukose (A)- und Plasmainsulinspiegel (B) nach 12 Stunden fasten (jeweils links) und 2 Stunden freiem Zugang zu Futter (jeweils rechts). Im nüchternen Zustand unterscheiden sich beide Parameter nicht zwischen den Gruppen, 2 Stunden nach der Futtergabe sind die Blutglukosespiegel ebenfalls nicht unterschiedlich, während die Plasmainsulinspiegel in den $G\alpha_{12}^{\betacko}$ -Tieren um etwa 46% niedriger sind als in den Kontroll-Tieren. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 6-8 männlichen Tieren im Alter von 26-28 Wochen.

Die basalen Werte beider untersuchten Parameter unterschieden sich nach 12 Stunden fasten nicht (Kon $2,8 \pm 0,3$ mM; $G\alpha_{12}^{\betacko}$ $3,2 \pm 0,1$ mM) (Kon $0,25 \pm 0,07$ $\mu\text{g/l}$; $G\alpha_{12}^{\betacko}$ $0,17 \pm 0,06$ $\mu\text{g/l}$). Nach 2 Stunden freiem Zugang zum gewohnten Futter stiegen die Blutglukosespiegel in beiden Gruppen gleichermaßen an (Kon $7,0 \pm 0,6$ mM; $G\alpha_{12}^{\betacko}$ $6,5 \pm 0,2$ mM). Die Erhöhung des Plasmainsulinspiegels als Antwort auf die Nahrungszufuhr fiel in den $G\alpha_{12}^{\betacko}$ -Tieren um 46% geringer aus als in den Kontroll-Tieren (Kon $2,76 \pm 0,35$ $\mu\text{g/l}$; $G\alpha_{12}^{\betacko}$ $1,48 \pm 0,16$ $\mu\text{g/l}$). Im Gegensatz zu den globalen $G\alpha_{12}$ -defizienten Tieren sind in den $G\alpha_{12}^{\betacko}$ -Tieren die Plasmainsulinspiegel nach 2 Stunden freiem Zugang zu Futter signifikant erniedrigt. Dieser Befund deutet ebenfalls auf einen Insulinsekretionsdefekt in $G\alpha_{12}$ -defizienten Inseln hin.

3.2.6 Insulinsekretion in Langerhans-Inseln von $G\alpha_{12}^{\betacko}$ -Mäusen

3.2.6.1 Glukose-induzierte Insulinsekretion

Die verminderten Plasmainsulinspiegel der $G\alpha_{12}^{\betacko}$ -Tiere in den Glukosetoleranztests sowie nach *ad libitum* Fütterung, lassen auf eine verminderte Insulinsekretion vermuten. Um dies gezielt zu untersuchen, wurde die Insulinsekretion an isolierten Inseln untersucht. Die Messung der Insulinsekretion an isolierten Inseln mit Stimulanzien wie Glukose, aber auch positiven und negativen Modulatoren wie Palmitat, L-Arginin, Clonidin oder Somatostatin ist ein adäquates

Verfahren um deren Wirkungen *in vitro* zu untersuchen (Nolan & O'Dowd, 2009), da hier systemische Einflüsse außen vor bleiben. Um zu überprüfen, ob sich die isolierten Inseln der analysierten Genotypen im Gesamtinsulin- und Gesamt-DNS-Gehalt unterscheiden, wurden zunächst diese Parameter bestimmt (Abbildung 3.23).

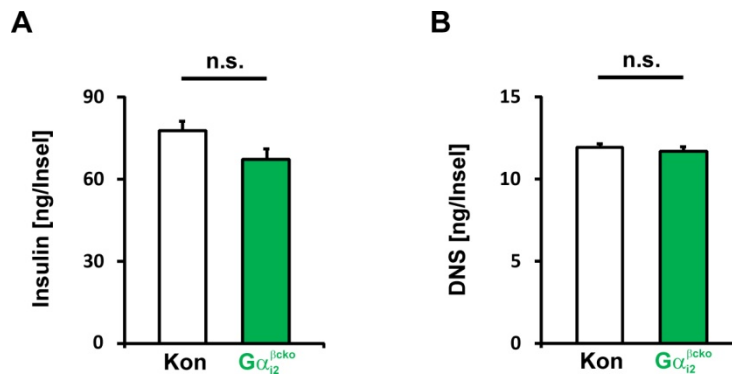


Abbildung 3.23: Gesamtinsulin- und DNS-Gehalt isolierter Kontroll- und $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Inseln. Weder der Gesamtinsulin (A) noch der Gesamt-DNS-Gehalt (B) isolierter Inseln unterschied sich zwischen Kontroll- und $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 42-48 (Insulingehalt) bzw. 49-71 (DNS-Gehalt) Messungen aus jeweils n = 8 Tieren (Leiss *et al.*, 2014).

$G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Inseln wiesen weder im Insulingehalt (Kon $72,9 \pm 3,4$ ng/Insel; $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ $68,3 \pm 3,9$ ng/Insel) noch im DNS-Gehalt (Kon $11,9 \pm 0,2$ ng/Insel; $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ $11,7 \pm 0,3$ μ g/Insel) Unterschiede zu Kontroll-Inseln auf. Diese Ergebnisse unterstreichen die unveränderte Morphologie der $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Inseln (Abbildung 3.19). Für die folgenden Insulinsekretionsexperimente kann daher von gleichen morphologischen Voraussetzungen ausgegangen werden und die Menge an sezerniertem Insulin pro Insel berechnet werden (Abbildung 3.24).

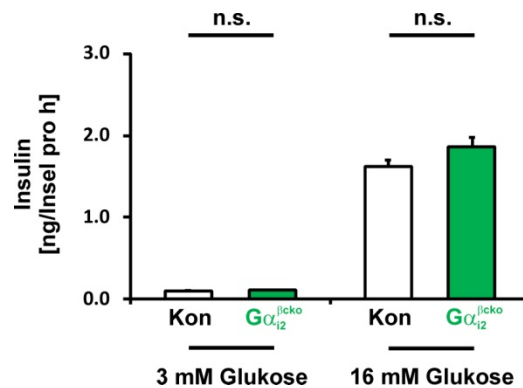


Abbildung 3.24: Glukose-induzierte Insulinsekretion isolierter Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\betacko}$ -Inseln. Weder bei 3 mM noch bei 16 mM Glukose waren Unterschiede in der zwischen Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\betacko}$ -Inseln messbar. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 59-72 Messungen (Leiss *et al.*, 2014).

Bei 3 mM Glukose war die sezernierte Menge an Insulin pro Stunde aus isolierten Inseln erwartungsgemäß sehr gering (Kon $0,10 \pm 0,01$ ng/Insel; $G\alpha_{i2}^{\betacko}$ $0,11 \pm 0,01$ ng/Insel), da bei dieser Glukosekonzentration die β -Zelle elektrisch inaktiv und das Membranpotential konstant im negativen Bereich von -70 mV oder niedriger (Rorsman *et al.*, 2012) liegt. Die Inkubation der Inseln mit Hochglukose (16 mM) führt zu einer Freisetzung von Insulin aus intrazellulären Speichergranula ins Medium. Die Menge an sezerniertem Insulin pro Insel pro Stunde auf den Glukosestimulus unterschied sich nicht zwischen $G\alpha_{i2}^{\betacko}$ -Inseln und Kontroll-Inseln (Kon $1,62 \pm 0,09$ ng/Insel; $G\alpha_{i2}^{\betacko}$ $1,86 \pm 0,12$ ng/Insel). Somit sind die Plasmakonzentrationsunterschiede von Insulin im GTT nicht auf Unterschiede in der Glukose-induzierten Insulinsekretion begründet.

3.2.6.2 Einfluss hemmender GPCR-Agonisten auf die Insulinsekretion

$G\alpha_{i2}^{\betacko}$ -Inseln

Da die Glukose-induzierte Insulinsekretion an isolierten Inseln β -Zell-spezifischer $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse keine Unterschiede zu den Kontrollen ergab wurden weitere Regulatoren der Insulinsekretion *in vitro* getestet. Aufgrund der PTX-Daten geht man von einer inhibitorischen Beteiligung der $G\alpha_{i/o}$ -Proteinfamilie an der Insulinsekretion aus (Wettschureck & Offermanns, 2005). Deshalb wurden mit Clonidin und Somatostatin zunächst Substanzen getestet, die Agonisten an GPCRs darstellen, deren Aktivierung eine inhibitorischen Wirkung auf die Insulinsekretion zur Folge hat (Abbildung 3.25).

Der Einfluss der inhibitorischen Agonisten wurde auch bei niedrigen Glukosekonzentrationen untersucht. Generell hemmen Clonidin und Somatostatin nur in Anwesenheit von hohen Glukosekonzentrationen die Insulinsekretion. Der Einfluss dieser beiden Agonisten bei niedrigen Glukosekonzentrationen ist in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Einfluss von Clonidin und Somatostatin (SST) auf die Insulinsekretion von isolierten Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Inseln bei 3 mM Glukose.

Substanz	Kontrolle			$G\alpha_{i2}^{\beta cko}$			p
	Insulinsekretion			Insulinsekretion			
	[ng/Insel]	SEM	n	[ng/Insel]	SEM	n	
3 mM Glukose	0,10	± 0,01	60	0,11	± 0,01	59	n.s.
1 µM Clonidin	0,11	± 0,03	15	0,07	± 0,02	13	n.s.
100 nM SST	0,14	± 0,04	10	0,10	± 0,02	8	n.s.

Bei Niedrigglukose waren keine Unterschiede in der Insulinsekretion pro Stunde durch die Zugabe von Agonisten an inhibierenden GPCRs messbar. Die Effekte dieser Substanzen in Anwesenheit von 16 mM Glukose sind in Abbildung 3.25 dargestellt.

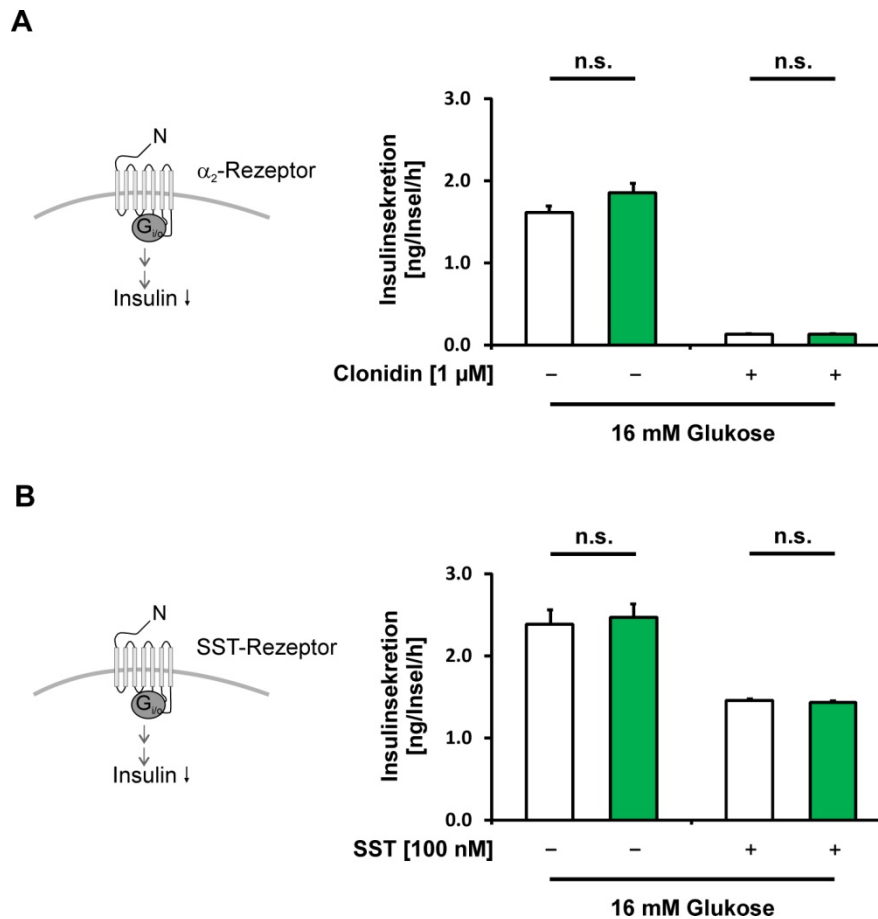


Abbildung 3.25: Einfluss von Clonidin und Somatostatin (SST) auf die Insulinsekretion isolierter Kontroll- und $G_{\alpha_{12}^{\beta\text{cko}}}$ -Inseln. Clonidin (A) hemmt die Glukose-induzierte Insulinsekretion nahezu vollständig und gleichermaßen in isolierten Kontroll- und $G_{\alpha_{12}^{\beta\text{cko}}}$ -Inseln. Somatostatin (B) führt zu einer etwa 40%igen Verringerung der Insulinsekretion in beiden Gruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 14-72 (Clonidin) bzw. 10 (SST) Messungen (Leiss *et al.*, 2014).

Clonidin ist ein Agonist am adrenergen α_2 -Rezeptor, der über $G_{\alpha_{i0}}$ -Proteine signalisiert (Kukkonen *et al.*, 1997). Endogener Ligand ist primär Noradrenalin, das aus sympathischen efferenten Neuronen freigesetzt wird und die Insulinsekretion mit am stärksten hemmt (Angel & Langer, 1988; Fagerholm *et al.*, 2008).

Die Zugabe von 1 μM Clonidin führte innerhalb einer Stunde unter den gegebenen Versuchsbedingungen zu einer Reduktion der Glukose-induzierten Insulinsekretion (Kon $0,11 \pm 0,03$ ng/Insel; $G_{\alpha_{12}^{\beta\text{cko}}}$ $0,13 \pm 0,01$ ng/Insel), die den Werten bei einer basalen Glukoseexposition von 3 mM entsprechen. Die Insulinwerte bei 16 mM entsprechen den bereits in Abbildung 3.24 gezeigten Werten. Somit ist das Ausmaß der Clonidin-induzierten Hemmung in $G_{\alpha_{12}^{\beta\text{cko}}}$ -Mäusen unverändert möglich.

Ein weiterer Ligand von β -Zell-GPCRs mit einem hemmenden Einfluss auf die Insulinsekretion ist Somatostatin. Somatostatin wird unter anderem auch als parakrines Hormon aus den δ -Zellen der Langerhans-Inseln sezerniert (Hsu *et al.*, 1991). Somatostatin reduzierte die Glukose-induzierte Insulinsekretion innerhalb einer Stunde um 39% in den Kontroll-Inseln ($2,36 \pm 0,19$ ng/Insel auf $1,45 \pm 0,03$ ng/Insel) bzw. 42% in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln ($2,48 \pm 0,16$ ng/Insel auf $1,43 \pm 0,03$ ng/Insel) (Abbildung 3.25). Auch hier sind keine Unterschiede zwischen Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln detektierbar. Ein parakriner Einfluss durch Somatostatin kann somit aufgrund dieser Resultate ebenfalls ausgeschlossen werden.

Die Clonidin- und Somatostatin-induzierte Hemmung der Insulinsekretion wurde durch das Fehlen von $G\alpha_{i2}$ nicht beeinflusst. Dies legt die Hypothese nahe, dass $G\alpha_{i2}$ nicht an der Hemmung sondern an der Stimulation der Insulinsekretion in β -Zellen beteiligt sein könnte.

3.2.6.3 Einfluss stimulierender GPCR-Agonisten auf die Insulinsekretion

$G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln

Einerseits war die Wirkung der inhibitorischen GPCR-Agonisten Clonidin und Somatostatin auf die Insulinsekretion isolierter Inseln von Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Mäusen unverändert. Andererseits weisen die reduzierten Plasmainsulinspiegel der *in vivo* Versuche vielmehr auf eine stimulatorische Beteiligung von $G\alpha_{i2}$ an der Insulinsekretion hin. Folglich wurden nun Liganden getestet, die Agonisten an GPCRs darstellen und die Potenzierung der Insulinsekretion stimulieren (Abbildung 3.26).

Der Einfluss der stimulatorischen Agonisten wurde sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Glukosekonzentrationen untersucht. Generell können Palmitat, L-Arginin- und L-Ornithin nur in Anwesenheit von hohen Glukosekonzentrationen die Insulinsekretion stimulieren. Die Wirkung der getesteten Substanzen auf die Insulinsekretion bei niedrigen Glukosekonzentrationen ist in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Einfluss verschiedener GPCR-Agonisten auf die Insulinsekretion von isolierten Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Inseln bei 3 mM Glukose (Leiss et al., 2014).

Substanz	Kontrolle			$G\alpha_{i2}^{\beta cko}$			p
	Insulinsekretion			Insulinsekretion			
	[ng/Insel]	SEM	n	[ng/Insel]	SEM	n	
200 μ M Palmitat	0,24	\pm 0.05	4	0.34	\pm 0.02	3	n.s.
10 mM L-Arginin	0,09	\pm 0,03	8	0,20	\pm 0,10	15	n.s.
10 mM L-Ornithin	0,10	\pm 0,01	7	0,08	\pm 0,05	7	n.s.

Bei Niedrigglukose waren keine Unterschiede in der Insulinsekretion pro Stunde durch die Zugabe von Palmitat, L-Arginin- und L-Ornithin messbar. Diese Ergebnisse decken sich mit den fehlenden Unterschieden in den basalen Blutglukosespiegeln in $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Tieren verglichen mit den Kontroll-Tieren (Abbildung 3.20, Abbildung 3.21, Abbildung 3.22).

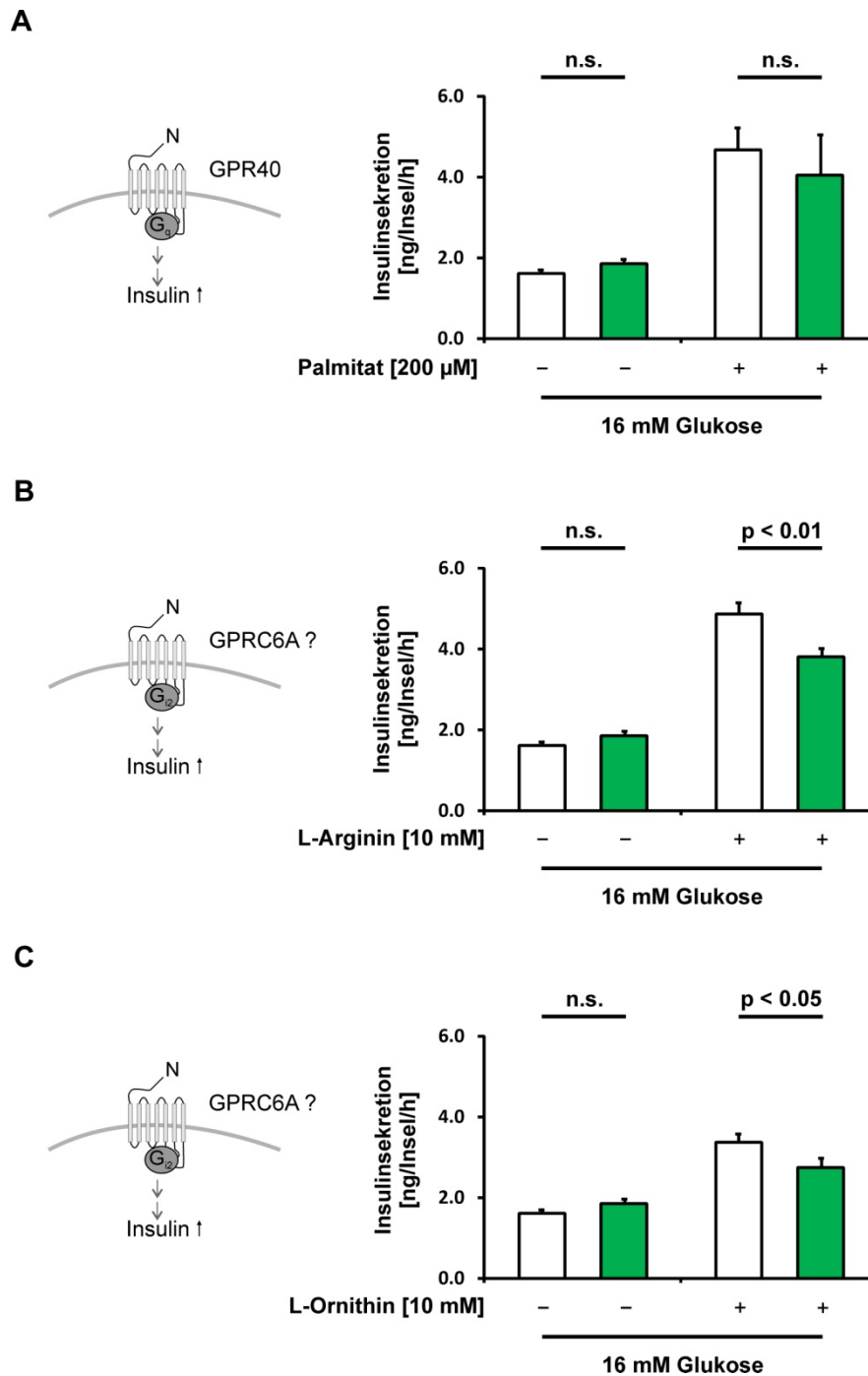


Abbildung 3.26: Einfluss von Palmitat, L-Arginin und L-Ornithin auf die Insulinsekretion isolierter Kontroll- und $G_{\alpha_{12}}^{\beta_{cko}}$ -Inseln. (A) Palmitat steigert die Glukose-induzierte Insulinsekretion gleichermaßen in isolierten Kontroll- und $G_{\alpha_{12}}^{\beta_{cko}}$ -Inseln. Durch die basischen Aminosäuren (B) L-Arginin und (C) L-Ornithin lässt sich die Insulinsekretion ebenfalls steigern. Der Anstieg ist in den $G_{\alpha_{12}}^{\beta_{cko}}$ -Inseln jeweils um ca. 20% reduziert verglichen mit den Kontroll-Inseln. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 10-72 (Palmitat), 17-72 (L-Arginin) bzw. 9-72 (L-Ornithin) Messungen. Die Palmitat-Daten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Veronika Leiss zur Verfügung gestellt (Leiss *et al.*, 2014).

Als langkettige Fettsäure führt Palmitat zu einer Verstärkung der Glukose-induzierten Insulinsekretion. Palmitat bindet an einen $G_{q/11}$ -gekoppelten GPCR (Briscoe *et al.*,

2003; Warnotte *et al.*, 1994). Der Zusatz von 200 μ M Palmitat führte zu einer deutlichen Erhöhung der Glukose-induzierten Insulinsekretion sowohl in isolierten Inseln von Kontroll- als auch von $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Tieren (Kon $4,69 \pm 0,56$ ng/Insel; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $4,05 \pm 1,02$ ng/Insel). Ein Unterschied zwischen beiden Genotypen war jedoch nicht festzustellen.

Weitere Aktivatoren der Glukose-induzierten Insulinsekretion sind basische Aminosäuren. L-Arginin ist eine proteinogene Aminosäure deren Wirkung als Insulinsekretagogum schon vor über 40 Jahren beschrieben wurde, wobei der genaue Mechanismus immer noch diskutiert wird (Floyd *et al.*, 1966; Pi *et al.*, 2012). Neuere Studien vermuten die Beteiligung eines GPCRs an der L-Arginin-vermittelten Steigerung der Insulinsekretion (Pi *et al.*, 2012). Liganden an diesem GPCR der C-Familie, GPRC6A, sind neben L-Arginin auch weitere basische Aminosäuren wie L-Ornithin, L-Lysin sowie extrazelluläre Kationen (Pi *et al.*, 2005; Wellendorph *et al.*, 2005). Die Glukose-induzierte Insulinsekretion konnte in den Kontroll-Inseln unter den gewählten *in vitro* Bedingungen durch L-Arginin um den Faktor 3, in den $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Inseln nur um den Faktor 2 gesteigert werden (Kon $4,87 \pm 0,30$ ng/Insel; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $3,81 \pm 0,21$ ng/Insel). Somit war die L-Arginin-induzierte Insulinsekretion war in $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Inseln signifikant reduziert, was auf eine Beteiligung von $G\alpha_{i2}$ an der Stimulation der Insulinsekretion hindeutet.

Als weitere Substanz wurde L-Ornithin, eine weitere basische Aminosäure und ebenfalls Agonist am GPRC6A, getestet. L-Ornithin führt wie L-Arginin zu einer Steigerung der Glukose-induzierten Insulinsekretion (Malaisse *et al.*, 1989). Die Zugabe von 10 mM L-Ornithin führte unter den gewählten Versuchsbedingungen zu einer Verdopplung der Glukose-induzierten Insulinsekretion in den Kontroll-Inseln (Kon $3,38 \pm 0,21$ ng/Insel; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $2,75 \pm 0,24$ ng/Insel). Wie auch durch L-Arginin war die Steigerung durch L-Ornithin in den $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Inseln geringer und betrug nur das 1,5-fache. Zusammengefasst kann man festhalten, dass sowohl die L-Arginin- als auch die L-Ornithin-induzierte Insulinsekretion waren in $G\alpha_{i2}$ -defizienten Inseln signifikant verringert.

Diese Ergebnisse lassen eine Beteiligung von $G\alpha_{i2}$ an diesen Signalwegen vermuten und deuten erstmals überraschenderweise auf eine stimulatorische Funktion von $G\alpha_{i2}$ in den β -Zellen hin.

3.2.7 Analyse der intrazellulären cAMP-Konzentration in $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln

Die Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration kann in Inseln als Indikator der GPCR- bzw. G-Protein-Aktivität herangezogen werden (Ammon & Müller, 1984). Da $G\alpha_{s/q}$ und $G\alpha_i$ eine entgegengesetzte Wirkung auf die Adenylylzyklase besitzen, könnte es durch das Fehlen von $G\alpha_{i2}$ zu erhöhten cAMP-Spiegeln kommen, da die tonisch inhibierende Wirkung von $G\alpha_{i2}$ wegfällt und so die stimulatorische Wirkung von $G\alpha_{s/q}$ -Proteinen überwiegt (Wettschureck & Offermanns, 2005). Aus diesem Grund und um eine Auswirkung verschiedener Glukosekonzentrationen sowie von L-Arginin und Clonidin auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration zu untersuchen, wurde diese an isolierten Inseln unter verschiedenen Bedingungen untersucht (Abbildung 3.27). Forskolin führt als Stimulator der Adenylylzyklasen (Hanoune & Defer, 2001) in Anwesenheit von Hochglukose zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln (Kon $512,4 \pm 72,8$ fmol/10 Inseln; $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ $752,4 \pm 9,3$ fmol/10 Inseln). Dieser Anstieg fällt in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln um etwa 30% höher aus als in den Kontroll-Inseln. Die Zugabe von $1 \mu\text{M}$ des α_2 -Agonisten Clonidin bewirkt eine ca. 70%ige Reduktion der Forskolin-Stimulation (Kon $143,6 \pm 25,5$ fmol/10 Inseln; $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ $287,2 \pm 78,3$ fmol/10 Inseln).

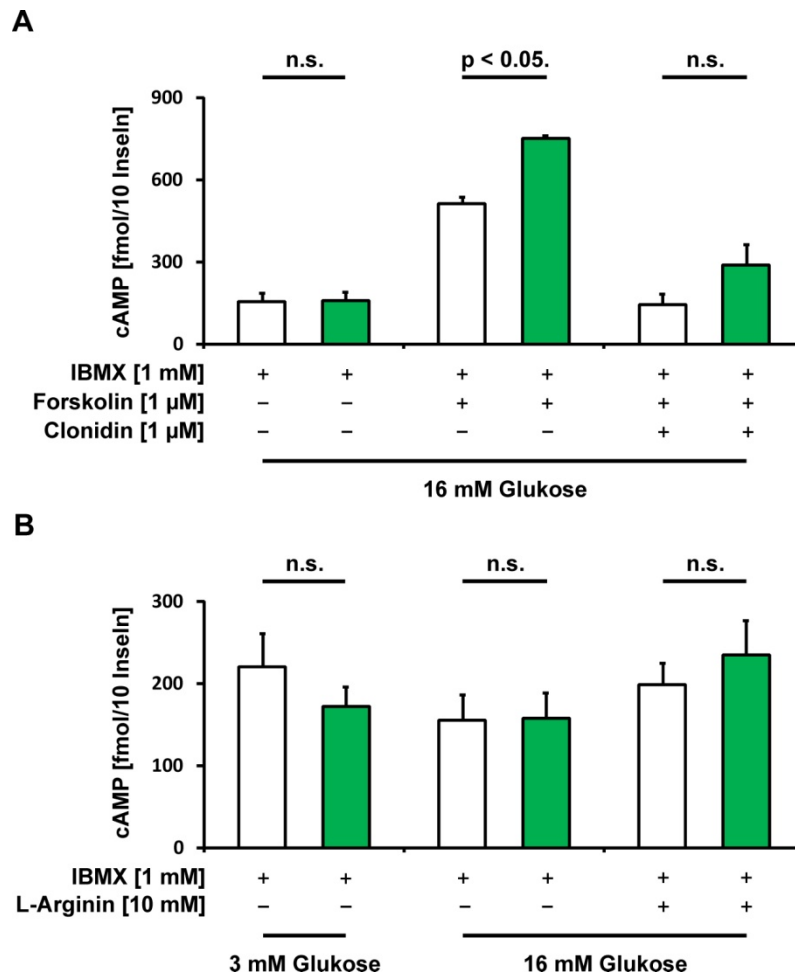


Abbildung 3.27: Intrazelluläre cAMP-Konzentrationen $[cAMP]_i$ in Kontroll- und $G_{\alpha_{i2}}^{\beta_{cko}}$ -Inseln. (A) Die $[cAMP]_i$ unterscheidet sich zwischen Kontroll- und $G_{\alpha_{i2}}^{\beta_{cko}}$ -Inseln nicht. Die Steigerung der $[cAMP]_i$ durch Forskolin fällt in den Kontroll-Inseln um ca. 30% geringer aus als in $G_{\alpha_{i2}}^{\beta_{cko}}$ -Inseln. Zugabe von Clonidin hemmt diese Steigerung in beiden Gruppen (n = 4-16). (B) Weder mit 3 mM noch mit 16 mM Glukose sind Unterschiede zwischen Kontroll- und $G_{\alpha_{i2}}^{\beta_{cko}}$ -Inseln messbar, auch die Zugabe von L-Arginin beeinflusst die $[cAMP]_i$ nicht (n = 13-22).

Die Erhöhung der Glukose-Konzentration im Probenpuffer von 3 mM (Kon $220,7 \pm 40,6$ fmol/10 Inseln; $G_{\alpha_{i2}}^{\beta_{cko}}$ $172,2 \pm 24,9$ fmol/10 Inseln) auf 16 mM (Kon $155,6 \pm 31,1$ fmol/10 Inseln; $G_{\alpha_{i2}}^{\beta_{cko}}$ $157,6 \pm 31,4$ fmol/10 Inseln) bewirkt weder eine Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration, noch lassen sich Unterschiede zwischen Kontroll- und $G_{\alpha_{i2}}^{\beta_{cko}}$ -Inseln detektieren. Auch der Zusatz von L-Arginin in Anwesenheit von Hochglukose beeinflusst in diesem Versuch die intrazellulären cAMP-Konzentration nicht (Kon $198,7 \pm 26,6$ fmol/10 Inseln; $G_{\alpha_{i2}}^{\beta_{cko}}$ $253,7 \pm 42,0$ fmol/10 Inseln).

Die Deletion von $G_{\alpha_{i2}}$ hatte keinen Einfluss auf die intrazellulären cAMP-Spiegel. Ein direkter Einfluss von $G_{\alpha_{i2}}$ auf Adenylylzyklasen ist daher unwahrscheinlich.

3.2.8 Charakterisierung des Glukose- und L-Arginin-Effektes mit Hilfe der fluorometrischen Einzelzell-Calcium-Messung an β -Zellen

Für den Insulinsekretionsprozess ist die elektrische Aktivität der β -Zelle entscheidend. Ziel der Zelle ist es, über eine durch spannungsabhängige Calcium-Kanäle gesteuerte Zunahme der freien intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ einen Sekretionsstimulus zu erzeugen, der zur Ausschüttung von Insulin führt (Rorsman *et al.*, 2000). Da die vorangegangenen Ergebnisse eine verringerte Insulinsekretion in $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren *in vivo*, sowie auf L-Arginin *in vitro* ergaben, wurden Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ an isolierten β -Zellen aus Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren durchgeführt. Eine Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ ist darüber hinaus ein geeignetes Korrelat für die intrazelluläre Aktivität der β -Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Wirkungen verschiedener Stimuli auf die $[Ca^{2+}]_i$ in fluorometrischen Einzelzell-Calcium-Messungen analysiert (Abbildung 3.28 und Abbildung 3.29).

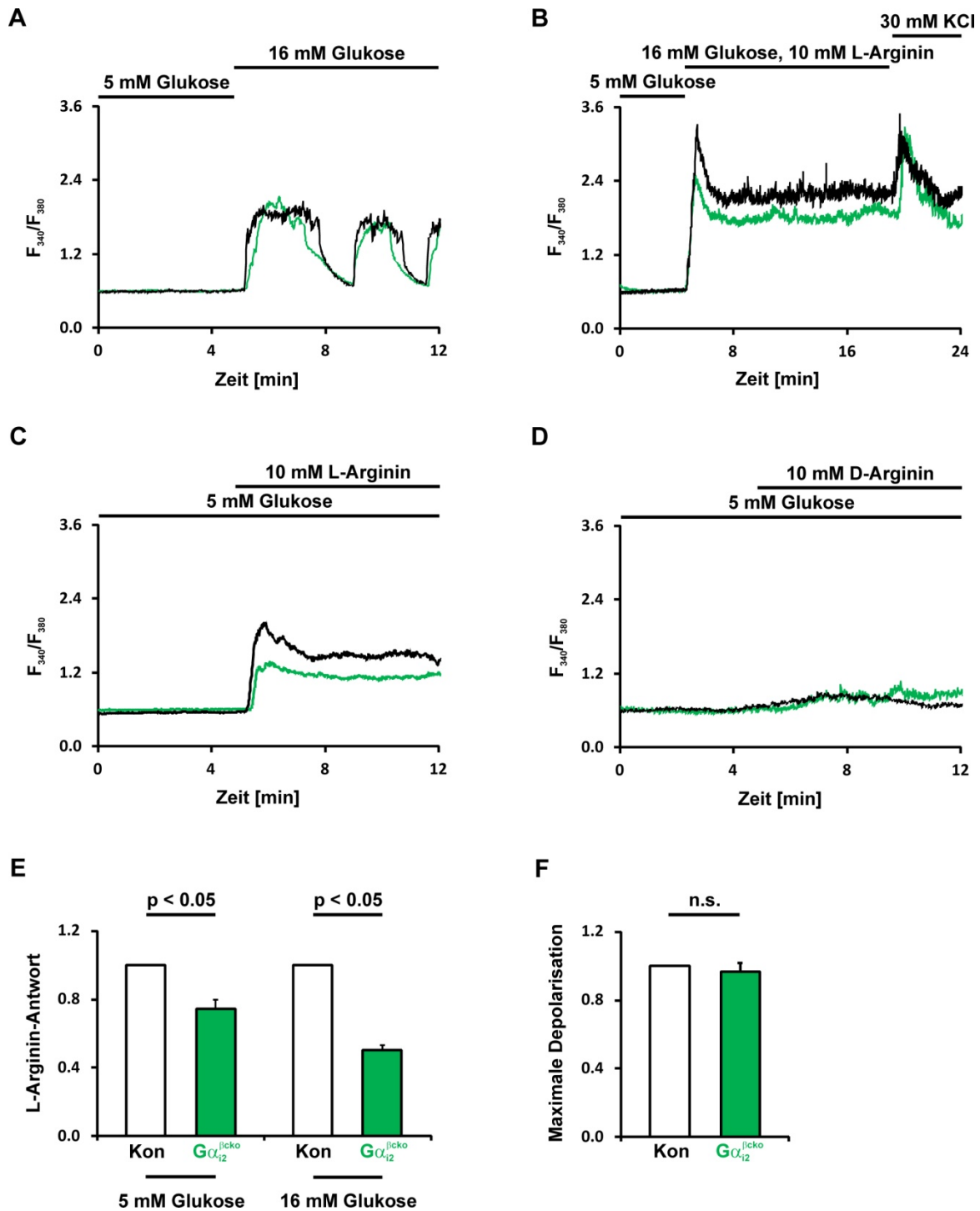


Abbildung 3.28: Änderung der intrazellulären Calciumspiegel $[Ca^{2+}]_i$ isolierter Kontroll- und $G\alpha_{12}^{\beta\text{cko}}$ - β -Zellen auf verschiedene Stimuli. Die Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ sind durch die Änderung des Fluoreszenzintensitätsgradienten F_{340}/F_{380} Fura-2-beladener isolierter pankreatischer β -Zellen dargestellt. (A) Bei 5 mM Glukose sind keine Unterschiede im $[Ca^{2+}]_i$ messbar (A-D, 0-4 min). Die durch 16 mM Glukose vermittelte Antwort der $[Ca^{2+}]_i$ fällt in Kontroll- und $G\alpha_{12}^{\beta\text{cko}}$ -Zellen gleichermaßen aus. (B) Die Zugabe von 10 mM L-Arginin führt zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, welcher sowohl bei Hochglukose, als auch (C) bei Niedrigglukose in den $G\alpha_{12}^{\beta\text{cko}}$ -Zellen verglichen mit Kontroll-Zellen reduziert ist. (D) 10 mM D-Arginin führt weder in Kontroll- noch in $G\alpha_{12}^{\beta\text{cko}}$ -Zellen zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Einzelexperiment von 160-734 Zellen. (E) Die Antwort auf L-Arginin ist in den $G\alpha_{12}^{\beta\text{cko}}$ -Zellen verglichen mit Kontroll-Zellen verringert. (B, F) Die maximale Depolarisation durch 30 mM KCl unterscheidet sich zwischen Kontroll- und $G\alpha_{12}^{\beta\text{cko}}$ -Zellen nicht (Kon—; $G\alpha_{12}^{\beta\text{cko}}$ —) (Leiss et al., 2014).

Bei allen Messungen wurden die Zellen zunächst konstant gegenüber 5 mM Glukose exponiert, um so den basalen, inaktiven Zustand der Zelle zu erfassen. Gleichzeitig wurden nur Zellen in die Auswertung eingeschlossen, die bei 5 mM Glukose inaktiv waren. Die $[Ca^{2+}]_i$ lag hierbei auf einem konstanten Niveau und unterschied sich nicht zwischen Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Tieren. Die Perfusion der Zellen mit 16 mM Glukose rief erwartungsgemäß einen schnellen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in den β -Zellen sowie konstante Calcium-Oszillationen hervor, die in Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Zellen vergleichbar waren (Abbildung 3.28A). Wiederum wurden ausschließlich Zellen verwendet, die mit einer Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ auf den Stimulus reagierten. Die Zugabe von 10 mM L-Arginin in Anwesenheit von 5 mM Glukose resultierte in einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in β -Zellen von Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Tieren. Dieser Anstieg war jedoch in den $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Zellen signifikant reduziert, verglichen mit den Kontroll-Zellen (Abbildung 3.28C). Die simultane Anwesenheit von 10 mM L-Arginin und 16 mM Glukose bewirkte ebenfalls eine rasche Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$, die dann auf einem hohen Niveau bestehen blieb (Abbildung 3.28B). Auch unter diesen Bedingungen war die $[Ca^{2+}]_i$ in den $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Zellen verglichen mit den Kontroll-Zellen reduziert. Um diese Unterschiede statistisch darzustellen, wurde der Einfluss von 10 mM L-Arginin auf das Ausmaß der Amplitude bei 5 mM Glukose (Kon 1,00; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $0,75 \pm 0,05$) und 16 mM Glukose (Kon 1,00; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $0,50 \pm 0,03$) berechnet, wobei die Werte der Kontrollen jeweils auf 1 gesetzt wurden (Abbildung 3.28E). Diese Resultate zeigten, dass die $[Ca^{2+}]_i$ in $G\alpha_{i2}$ -defizienten β -Zellen in Anwesenheit von L-Arginin reduziert ist und sind somit im Einklang mit den Ergebnissen der Hormonsekretionsexperimente. Die verringerte Ca^{2+} -Antwort der $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ - β -Zellen könnte die verringerte L-Arginin-induzierte Insulinsekretion erklären. In Kontrollexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass die Zugabe des Enantiomers D-Arginin in Anwesenheit von 5 mM Glukose keinen Einfluss auf die $[Ca^{2+}]_i$ hatte (Abbildung 3.28D). Außerdem führte die Depolarisation der β -Zellen durch die Zugabe von 30 mM KCl zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (Kon 1,00; $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ $0,97 \pm 0,05$) sowohl in Kontroll- als auch in $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ - β -Zellen (Abbildung 3.28B und F).

Die Beteiligung von K_{ATP} -Kanälen und VDCCs an der Glukose-induzierten Insulinsekretion ist gut etabliert. Jedoch sind weitere Ionenkanäle in den β -Zellen exprimiert (Düfer, 2012) die einen Beitrag zur Glukose-induzierten Insulinsekretion leisten und durch G-Proteine reguliert werden können. Hierzu gehören TRP-Kanäle

(Transient Receptor Potential) (Colsoul *et al.*, 2011; Islam, 2011; Klose *et al.*, 2011). Ein Zusammenspiel mit heterotrimeren G-Proteinen könnte sowohl durch die Interaktion eines Mitglieds der TRP-Kanalfamilie mit der $G\alpha$ -Untereinheit oder aber der $G\beta\gamma$ -Untereinheit zustande kommen (Jeon *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2012). Aus diesem Grund wurde der Einfluss von N-(p-Amylcinnamoyl)anthranilsäure (ACA) auf die $[Ca^{2+}]_i$ analysiert (Abbildung 3.29). ACA ist ein Inhibitor diverser TRP-Kanäle, aber auch ein Inhibitor der Phospholipase A_2 (Harteneck *et al.*, 2007).

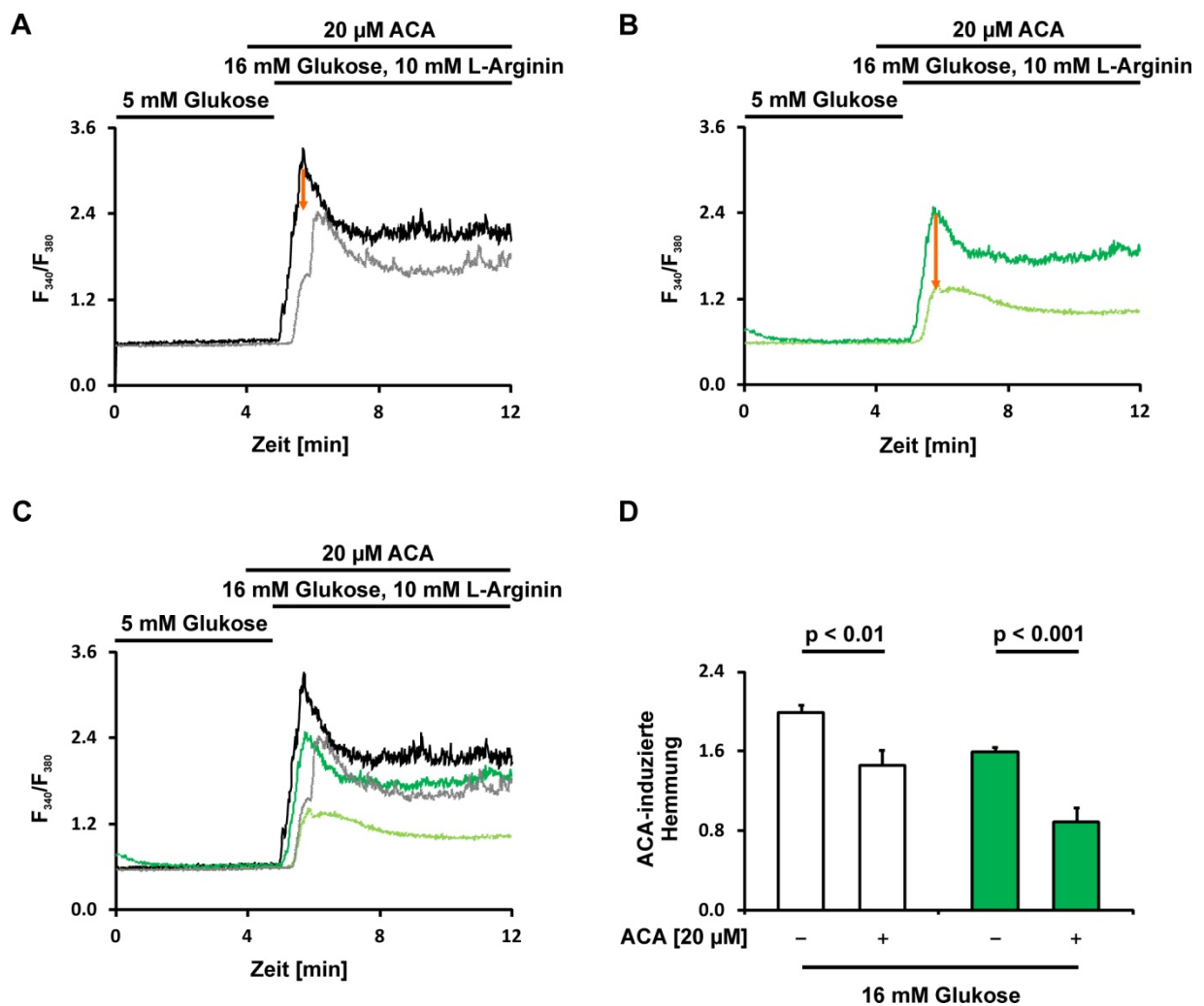


Abbildung 3.29: Einfluss von ACA auf die intrazellulären Calciumspiegel isolierter β -Zellen. Dargestellt ist die Änderung der Fluoreszenzintensitätsgradienten F_{340}/F_{380} Fura-2-beladener isolierter pankreatischer β -Zellen, von (A) Kontroll- und (B) $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Tieren nach der Zugabe von 20 μM ACA und 10 mM L-Arginin in Anwesenheit von 16 mM Glukose (graue, bzw. hellgrüne Kurve). Die Zellen wurden jeweils mit 20 μM ACA für 1 min präinkubiert. Die Reduktion der $[Ca^{2+}]_i$ durch ACA fällt in den $G\alpha_{12}^{\beta cko}$ -Zellen deutlich stärker aus als in den Kontroll-Zellen (orangene Pfeile in A und B). Die (A) schwarze und (B) grüne Kurve stellt den Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ ohne ACA dar (Kurven aus Abbildung 3.28C). (C) Zur Veranschaulichung des Effektes sind alle Kurven aus A und B in einem Graphen sowie (D) das Ausmaß der Amplituden gezeigt. Dargestellt ist jeweils (A-C) ein repräsentatives Einzelexperiment von 519-691 Zellen, sowie (D) die Mittelwerte der Amplituden + SEM.

Durch den Zusatz von 20 μM ACA in Anwesenheit von Hochglukose und L-Arginin verringerte sich die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Zellen (Kon $1,46 \pm 0,16$; $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ $0,89 \pm 0,15$). Die ACA-induzierte Hemmung fiel in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Zellen deutlich höher aus (44%) als in den Kontroll-Zellen (27%). Somit könnten TRP-Kanäle an der verringerten Insulin-Antwort auf L-Arginin in den $G\alpha_{i2}$ -defizienten β -Zellen beteiligt sein, aber auch PLA_2 in den Effekt involviert sein.

4 Diskussion

Die Balance zwischen Energie-/Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch ist sehr komplex; gleichwohl ist insbesondere das Hormon Insulin der wichtigste Regulator des Energiehaushalts. Obwohl bekannt ist, dass Glukose der entscheidende Regulator der Insulinsekretion ist, tragen weitere Faktoren positiv wie negativ zur Modulation der Insulinsekretion bei. Letztere rücken immer mehr in den Fokus. Viele solcher Faktoren vermitteln ihre Wirkung durch Interaktion mit GPCRs auf der β -Zelle, die als Signaltransduktoren das Signal an intrazelluläre Effektoren weitergeben.

Die positive Modulation der Glukose-induzierten Insulinsekretion wurde bislang meist Liganden von G_s - und G_q -gekoppelten Rezeptoren zugeschrieben. Im Gegensatz dazu wurde für die Aktivierung von G_i - und G_o -gekoppelten Rezeptoren eine Hemmung der Insulinsekretion assoziiert (Wettschureck & Offermanns, 2005). Diesen Erkenntnissen liegen frühe Studien mit PTX an Tieren und Zellen zu Grunde. PTX senkt die Blutglukosespiegel, indem es die Insulinsekretion aus den β -Zellen steigert (Gulbenkian *et al.*, 1968; Toyota *et al.*, 1978; Yajima *et al.*, 1978). Eine Überexpression der S1 Untereinheit des PTX in β -Zellen und der damit verbundenen Inaktivierung sämtlicher $G_{i/o}$ -Proteinaktivität führte in Mäusen zu einer Hyperinsulinämie (Regard *et al.*, 2007). Diese Befunde mit PTX als einem Paninhibitor der G_{α_i} - und G_{α_o} -Untereinheiten ließen darauf schließen, dass alle $G_{\alpha_{i/o}}$ -Proteine gleichermaßen an der Hemmung der Insulinsekretion beteiligt sind. In den letzten Jahren rückte die $G_{\alpha_{o2}}$ -Untereinheit als verantwortliche G_{α} -Untereinheit der $G_{\alpha_{i/o}}$ -Familie für die negative Regulation der Insulinsekretion in den Vordergrund (Wang *et al.*, 2011). In β -Zellen G_{α_o} -defizienter Inseln ist die Anzahl Insulin-haltiger Vesikel, die an die Plasmamembran andocken, erhöht. Die Folge ist eine gesteigerte Glukose-induzierte Insulinsekretion. Ebenfalls wurde, durch die Analyse G_{α_o} -defizienter Tiere, die Hemmung der Insulinsekretion durch Galanin und Somatostatin als durch $G_{\alpha_{o2}}$ -vermittelt identifiziert (Tang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2010a). Die Insulinsekretion $G_{\alpha_{o2}}$ -defizienter Inseln konnte durch PTX nicht zusätzlich gesteigert werden. Diese Daten lassen vermuten, dass ausschließlich $G_{\alpha_{o2}}$ für die PTX-induzierte Insulinsekretion verantwortlich ist. In den β -Zellen des Pankreas wird jedoch auch $G_{\alpha_{i2}}$ in relativ großen Mengen exprimiert. Seine Rolle bei der Insulinsekretion ist bislang noch nicht genauer untersucht. In der

vorliegenden Arbeit sollte durch die Analysen zweier verschiedener $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mausmodelle die β -Zell-spezifische Rolle von $G\alpha_{i2}$ untersucht werden. Es wurden sowohl globale $G\alpha_{i2}$ -defiziente Tiere ($G\alpha_{i2}^{-/-}$), die bereits vor fast 20 Jahren erstmals beschrieben wurden (Rudolph *et al.*, 1995), als auch β -Zell-spezifische $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse ($G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$) analysiert. Für die Generierung der β -Zell-spezifischen Knockouts wurden gefloxt $G\alpha_{i2}$ -Mäuse mit heterozygoten Rip-Cre-Tieren verpaart (Herrera, 2000; Plummer *et al.*, 2012). Die erfolgreiche Deletion der $G\alpha_{i2}$ -Isoform in den Inseln konnte spezifisch auf DNS- und Proteinebene, nicht jedoch in anderen Organen nachgewiesen werden. Trotz der leichten Rekombination auf genomischer Ebene in der Niere konnte eine Veränderung des $G\alpha_{i2}$ -Proteinlevels nicht nachgewiesen werden. Auch eine Deletion des $G\alpha_{i2}$ -Proteins im Hypothalamus, wie bereits für andere Rip-Cre-Linien beschrieben, konnte in unseren $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren nicht bestätigt werden (Wicksteed *et al.*, 2010). Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass der beobachtete Phänotyp aufgrund zentralnervöser Veränderungen zustande kommt. Aufgrund der Tatsache, dass in transgenen Rip-Cre-Mäusen durch das Transgen *per se* die Glukosehomöostase beeinflusst wird (Lee *et al.*, 2006), wurden in allen Experimenten in denen β -Zell-spezifische Knockouts untersucht wurden, Kontrollen mit dem Genotyp $G\alpha_{i2}^{+/+}; \text{Rip-Cre}^{+/tg}$ bzw. $G\alpha_{i2}^{+/fl}; \text{Rip-Cre}^{+/tg}$ mitgeführt. Während $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tiere sowohl in konventioneller als auch unter IVC-Haltung ein verringertes Körpergewicht aufweisen (Rudolph *et al.*, 1995), unterschieden sich die $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tiere im Gegensatz dazu in ihrer Gewichtsentwicklung zu keinem Zeitpunkt von der Kontrollgruppe. Somit ist das Fehlen des $G\alpha_{i2}$ -Proteins in der β -Zelle wahrscheinlich nicht die Ursache für das verringerte Gewicht in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren.

4.1 Einfluss des Fehlens der $G\alpha_{i2}$ -Untereinheit auf die Proteinexpression in Langerhans-Inseln globaler und konditionaler $G\alpha_{i2}$ -defizienter Tiere

In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von $G\alpha_{i2}$ in den Langerhans-Inseln mittels Immunoblot und Immunhistochemie nachgewiesen werden. Die immunhistochemischen Färbungen zeigen darüber hinaus, dass das $G\alpha_{i2}$ -Protein sowohl in β -Zellen als auch in α -Zellen exprimiert wird und konnten somit bereits veröffentlichte Untersuchungen an murinen Pankreasgewebe und Zelllinien

bestätigen (Konrad *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1991; Sharp, 1996; Wang *et al.*, 2011).

Während globalen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren in den Inseln das $G\alpha_{i2}$ -Protein komplett im Inselapparat fehlt, war in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln die Proteinmenge von $G\alpha_{i2}$ um fast 90% reduziert. Die immunhistochemischen Färbungen zeigten, dass die verbleibende $G\alpha_{i2}$ -Expression dabei auf Insulin-negative und damit nicht- β -Zellen beschränkt ist.

Die ubiquitäre Deletion der $G\alpha_{i2}$ -Untereinheit führt in vielen Geweben zu einer kompensatorischen Hochregulation des $G\alpha_{i3}$ -Proteins (Gohla *et al.*, 2007b; Köhler *et al.*, 2014; Novakovic, 2013; Wiege *et al.*, 2013; Wiege *et al.*, 2012). Auch in den Inseln der $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tiere ist die Expression der $G\alpha_{i3}$ -Isoform um das 1,5-fache erhöht. Eine vergleichbare Hochregulation konnte hingegen in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln nicht beobachtet werden. Somit kann eine von vornherein kompensatorische Funktion des $G\alpha_{i3}$ -Proteins in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren ausgeschlossen werden. Die fehlende Hochregulation könnte auf eine spätere Inaktivierung des *Gnai2*-Gens während der Embryogenese in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren zurückzuführen sein. In Rip-Cre-Linien wird die Cre-Rekombinase erstmals ab Tag E9.5 exprimiert und erst ab diesem Zeitpunkt erfolgt die Rekombination. Bis E9.5 wird das $G\alpha_{i2}$ -Protein wie in wt-Tieren exprimiert und ist somit während der frühen Embryogenese noch vorhanden. In den globalen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren fehlt das $G\alpha_{i2}$ -Protein von Anfang an.

Da G-Proteine Heterotrimere bilden, korreliert die Menge der $G\alpha$ -Untereinheiten mit der Menge an $G\beta\gamma$ (Tang *et al.*, 2012; Valenzuela *et al.*, 1997). Ein wichtiger Faktor für das stöchiometrische Gleichgewicht zwischen $G\alpha$ und $G\beta$ ist die Stabilität der $G\alpha$ -Untereinheiten durch $G\beta$ (Krumins & Gilman, 2006). Das Fehlen von $G\alpha$ -Untereinheiten führt in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln zu einer signifikanten Abnahme der $G\beta_2$ -Untereinheit sowie einer tendenziellen Abnahme der $G\beta_1$ -Untereinheit (β_1 35%, β_2 20%). In den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln ist diese Reduktion der $G\beta$ -Expression sogar noch stärker ausgeprägt (β_1 40%, β_2 40%). Erhöhte $G\alpha_{i3}$ -Level (45%) wurden nur in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren beobachtet, was parallel auch höhere $G\beta$ -Level erfordert um funktionsfähige heterotrimere G-Proteine bilden und stabilisieren zu können. Dies erklärt, warum die Abnahme der $G\beta$ -Proteinmenge in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln stärker ausfiel als in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln. Da in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln trotz einer Hochregulation der $G\alpha_{i3}$ -Proteine die $G\beta$ -Level reduziert waren, ist davon auszugehen, dass $G\alpha_{i3}$ das Fehlen des $G\alpha_{i2}$ -Proteins nicht vollständig kompensieren kann. Im Besonderen die

reduzierte G β -Proteinmenge könnte maßgeblich die Funktionalität der β -Zellen in beiden Mausmodellen beeinflussen und sich auf den beobachteten Phänotyp dieser Tiere auswirken. Nach Aktivierung der heterotrimeren G-Proteine werden sowohl von der α -Untereinheit als auch vom G $\beta\gamma$ -Dimer Effektorproteine aktiviert oder inhibiert. Bereits durch Studien an β -Zelllinien ist ein inhibitorischer Einfluss des G $\beta\gamma$ -Dimers auf die Insulinsekretion gezeigt (Zhang *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2010c). Der G $\beta\gamma$ -Effekt könnte durch die Inhibierung der LVA-T-Typ-Calciumkanäle (*low-voltage activated*) zustande kommen (Wolfe *et al.*, 2003). Allerdings ist die Expression dieser Kanäle in murinen β -Zellen fraglich (Rorsman, 1988; Vignali *et al.*, 2006). Jedoch ist das Ausmaß dieses Effekts sowie die Auswirkung einer 20-40%igen Reduktion der G β -Proteinmenge, wie sie in den verwendeten Tiermodellen beobachtet wurde, noch nicht bekannt.

Da G α_o -Proteine an der negativen Regulation der Insulinsekretion beteiligt und die am stärksten homologen Isoformen nach G α_{i1} und G α_{i3} zu G α_{i2} sind, wurde die Expression dieser Proteine in den Inseln der verwendeten G α_{i2} -defizienten Mausmodelle ebenfalls überprüft (Tang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2010a). Weder in den Inseln der globalen, noch in denen der gewebespezifischen G α_{i2} -defizienten Tiere konnte eine veränderte Expression der beiden G α_o -Isoformen G α_{o1} und G α_{o2} nachgewiesen werden. Eine übermäßige Aktivierung G α_o -gekoppelter Signalwege ist deshalb unwahrscheinlich.

Neben G α_o -Proteinen wurde auch die Expression der G α_q - und G α_s -Proteine untersucht. Durch diese Expressionsanalysen konnten keine Unterschiede in der Proteinmenge der G α_q -Untereinheiten detektiert werden. Besonders G α_s - und G α_i -gekoppelte Signalwege werden als entgegengesetzte Signalwege beschrieben, da G α_i -Proteine die Adenylylzyklase hemmen, wohingegen G α_s -Proteine selbige stimulieren (Wettschureck & Offermanns, 2005). Die G α_s -Proteinspiegel waren weder in globalen, noch in gewebespezifischen G α_{i2} -defizienten Inseln verändert. Zudem unterschieden sich weder bei Niedrig- noch bei Hochglukose die intrazellulären cAMP-Konzentrationen. Dies spricht gegen einen überschießenden Effekt G α_s -vermittelter Signalwege.

Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass der in den G α_{i2} -defizienten Tieren beobachtete Phänotyp nicht auf eine veränderte Expression der G α_{i3} -, G α_o -, G α_s und G α_q -Isoformen zurückzuführen ist. Aufgrund der Tatsache, dass globale und

β -Zell-spezifische $G\alpha_{i2}$ -defiziente Tiere *in vivo* überlappende phänotypische Veränderungen aufweisen, kompensiert das hochregulierte $G\alpha_{i3}$ -Protein das Fehlen der $G\alpha_{i2}$ -Isoform wahrscheinlich nicht. Jedoch sollten die veränderten $G\beta$ -Proteinmengen durchaus in beiden Mausmodellen bei der Beurteilung der Ergebnisse in Betracht gezogen werden.

4.2 Die Beteiligung von $G\alpha_{i2}$ an der Glukosehomöostase

Im intraperitonealen Glukosetoleranztest wurden sowohl in den globalen, als auch in den β -Zell-spezifischen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren signifikant verminderte Plasmainsulinspiegel gemessen. Verglichen mit den Geschwister-Kontrollen waren die Blutglukosespiegel in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren unverändert, in den $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Tieren dagegen erhöht. Verringerte Plasmainsulinspiegel können sowohl durch Veränderungen in der Glukoseverwertung als auch der Insulinsekretion verursacht werden (Andrikopoulos *et al.*, 2008). Betrachtet man die globalen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tiere, wäre hier das Zusammenspiel beider Komponenten möglich, da das $G\alpha_{i2}$ -Protein in allen Geweben fehlt. Die Proteinkinase B welche auch ihrem Gennamen entsprechend als AKT bezeichnet wird, ist entscheidend für die Insulin-stimulierte Glukoseaufnahme (Jiang *et al.*, 2003). Das Ausmaß der AKT-Phosphorylierung an Serin 473 kann daher als Marker für die Insulinwirkung in insulinsensitiven Geweben herangezogen werden (Turinsky & Damrau-Abney, 1999). Während in der Leber sowie im Skelettmuskel die AKT-Phosphorylierung in wt und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren vergleichbar war, war die AKT-Phosphorylierung im weißen Fettgewebe der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tiere signifikant erhöht nachdem die Tiere 2 Stunden Zugang zu Futter hatten. Eine gesteigerte Glukoseaufnahme ins weiße Fettgewebe könnte vielleicht die unveränderten Blutglukosespiegel trotz niedrigerer Plasmainsulinspiegel nach dem Glukosebolus erklären. Verglichen mit den anderen insulinsensitiven Organen nimmt das WAT allerdings nur einen geringeren Teil der verfügbaren Glukose auf, weswegen diese verbesserte Insulinwirkung wahrscheinlich nicht die einzige Ursache für die unveränderten Blutglukosespiegel ist (Minokoshi *et al.*, 2003). In den $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Mäusen waren bei niedrigeren Plasmainsulinspiegeln die Blutzuckerspiegel nach 30, 60 und 120 Minuten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht. In den $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Tieren unterschieden sich die peripheren Gewebe nicht bezüglich der $G\alpha_{i2}$ -Expression von den Kontrollen, hier beispielsweise gezeigt

für Niere und Hypothalamus auf Proteinebene, sowie für Skelettmuskel und Fettgewebe auf genomischer DNS-Ebene. Da es sich bei diesen Tieren um eine β -Zell-spezifische $G\alpha_{i2}$ -Deletion handelt sprechen die erhobenen Daten deshalb für einen β -Zell-spezifischen Phänotyp und sind auf eine veränderte Insulinsekretion zurückzuführen. Analog zum Glukosetoleranztest unterschieden sich in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren die basalen Plasmainsulinwerte ebenso wenig wie die Blutglukosespiegel nach 2 Stunden Zugang zum Futter von den Kontrollen. Allerdings waren wiederum die Insulinspiegel in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren nach 2 Stunden signifikant reduziert. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die verringerten Plasmainsulinspiegel hauptsächlich durch das Fehlen von $G\alpha_{i2}$ in den β -Zellen verursacht werden. Dies kommt sowohl durch eine Glukose-stimulierte, als auch durch eine durch Nahrungsbestandteile bedingte Insulinsekretion zustande.

$G\alpha_i$ -Proteine, aber auch $G\beta\gamma$ -Komplexe aktivierter $G\alpha_i$ -Proteine regulieren das Zellwachstum und die Zellproliferation (Cho & Kehrl, 2008; Crespo *et al.*, 1994; Dhanasekaran *et al.*, 1998). Eine Quantifizierung $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln ergab signifikant kleinere Inseln bei unveränderter Zellgröße. Da gleichzeitig signifikant weniger PCNA-positive Kerne in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln detektierbar waren, sprechen diese Befunde für eine gestörte Proliferation. Dies korrelierte mit einer verringerten, durchschnittlichen Insel-DNS-Menge. Weder der DNS-Gehalt noch der Insulingehalt der $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln unterschied sich von den Kontrollen. Auch die morphometrischen Analysen wiesen keinerlei Veränderungen in der Größe der Inseln auf. Mit ein Grund könnte der Zeitpunkt der Deletion des $G\alpha_{i2}$ -Proteins sein. Während es in den globalen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren von Anfang an in allen Zellen fehlt und so schon die frühe Entwicklung der Inseln beeinflussen könnte, kommt es in den β -Zell-spezifischen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Embryonen etwa ab Tag E9,5 zur Anschaltung des Insulinpromotors und so zur Deletion von $G\alpha_{i2}$ (Sander & German, 1997).

$G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln waren nicht nur insgesamt kleiner, sondern hatten auch signifikant weniger α -Zellen. Dies beeinflusste allerdings nicht die *in vitro* Glukagonsekretion. Geringfügige Unterschiede in der Sekretionsrate könnten allerdings auch schwierig zu detektieren sein. Trotz des signifikant reduzierten Körper- und Pankreasgewichts ist die Menge an pankreatischem Gesamtglukagon normalisiert auf Körper- bzw. Pankreasgewicht in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren signifikant reduziert. Dies korrelierte mit dem verringerten Anteil an α -Zellen. Die Deletion von $G\alpha_{i2}$ beeinflusste die physiologische

Wirkung des Glukagons daher nicht. Auch eine Veränderung der Insulinsekretion aufgrund einer veränderten Glukagonsekretion konnte somit ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurde zwar eine Stimulation der Insulinsekretion durch Glukagon *in vitro* beschrieben, jedoch ist die physiologische Bedeutung noch nicht ausreichend geklärt (Huypens *et al.*, 2000; Kieffer *et al.*, 1996). Hinzu kommt, dass β -Zell-spezifischer und globaler Knockout denselben Phänotyp aufwiesen. Da in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren $G\alpha_{i2}$ spezifisch in den β -Zellen ausgeschaltet wurde sollte dies die Glukagonsekretion *per se* nicht beeinflussen. Außerdem hatten $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren sowohl signifikant niedrigere Plasmainsulin- als auch Plasma-C-Peptidspiegel. Ein Defekt bereits bei der Insulinsynthese kann dadurch ausgeschlossen werden und bestätigt erneut die Hypothese eines Sekretionsdefekts.

4.3 Die Rolle von $G\alpha_{i2}$ in der Insulinsekretion

Die gewonnenen *in vivo* Ergebnisse (niedrigere Plasmainsulin- und Plasma-C-Peptidspiegel) deuten auf eine verringerte Insulinsekretion durch das Fehlen von $G\alpha_{i2}$ in den β -Zellen hin. Um die Ursache hierfür genauer zu untersuchen, wurden verschiedene *in vitro* Untersuchungen an isolierten Inseln und β -Zellen von $G\alpha_{i2}^{-/-}$ und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tieren durchgeführt. Die Glukose-induzierte Insulinsekretion *per se* isolierter Inseln unterschied sich weder unter Niedrig- noch unter Hochglukose in beiden $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mausmodellen von den Kontrollgruppen. Wegen der reduzierten Inselgröße wurde die Insulinsekretion der $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln auf deren DNS-Gehalt bezogen. Die reine Glukose-induzierte Antwort der Inseln scheint demnach nicht der Grund für die verringerten Insulinspiegel im Glukosetoleranztest zu sein. Glukose allein ist aber nicht der einzige Stimulus der Insulinsekretion. *In vivo* spielen zusätzlich viele weitere Faktoren, wie beispielsweise Fettsäuren, Aminosäuren, GLP-1, Noradrenalin oder Somatostatin eine Rolle. Um die Auswirkung dieser Faktoren möglichst isoliert in den $G\alpha_{i2}$ -Mutanten zu analysieren, wurden neben Glukose bekannte Agonisten an GPCRs *in vitro* getestet. Da auf Basis der PTX-Analysen von einer negativen Regulation der Insulinsekretion durch $G\alpha_{i/o}$ -Proteine ausgegangen wurde, wurden Clonidin und Somatostatin als inhibitorisch-wirkende Substanzen getestet. Clonidin inhibiert die Insulinsekretion durch Agonisierung des adrenergen α_2 -Rezeptors. Die adrenerg-vermittelte Wirkung kommt durch Aktivierung des α_{2A} -Subtyps zustande (Hu *et al.*, 2005; Regard *et al.*,

2007; Savontaus *et al.*, 2008; Schulz & Hasselblatt, 1989). Die Clonidin-induzierte Hemmung der Insulinsekretion war trotz des Fehlens der $G\alpha_{i2}$ -Isoform in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln unverändert. Ähnlich wie Clonidin wirkt Somatostatin ebenfalls inhibitorisch auf die Insulinsekretion. Die Wirkung wird in murinen β -Zellen vor allem über den G-Protein-gekoppelten Somatostatinrezeptor Subtyp 5 vermittelt (Braun, 2014). Die Somatostatinwirkung ist in den $G\alpha_{i2}$ -defizienten β -Zellen unbeeinflusst. Dies bestätigte, dass die Hemmung der Insulinsekretion unabhängig von $G\alpha_{i2}$ -Proteinen und die Somatostatin-vermittelte Hemmung der Insulinfreisetzung ausschließlich über $G\alpha_{o2}$ erfolgt (Wang *et al.*, 2011). Die Clonidin- und Somatostatinversuche schließen eine Beteiligung der $G\alpha_{i2}$ -Proteine an der Hemmung der Insulinsekretion aus. Diese Befunde werden zudem durch Studien an $G\alpha_o$ -Mäusen gestützt. $G\alpha_{o2}$ -defiziente Mäuse imitieren die mittels PTX erhobenen Befunde und $G\alpha_o$ scheint alleinig für die Hemmung der Insulinsekretion verantwortlich zu sein. Hinzu kommt, dass die Plasmainsulinspiegel der $G\alpha_{i2}$ -Mutanten signifikant reduziert waren. Auch dies spricht gegen einen hemmenden Einfluss der $G\alpha_{i2}$ -Proteine auf die Insulinfreisetzung. Vielmehr liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die $G\alpha_{i2}$ -Isoform die Insulinsekretion stimuliert.

Deshalb wurden potenzierend wirkende GPCR-Agonisten *in vitro* getestet. Durch Lipide aktivierte β -Zell-GPCRs waren in den letzten Jahren im Fokus der Diabetes-Forschung. Chronisch erhöhte Werte von freien Fettsäuren im Plasma können sich negativ auf die β -Zell-Funktion auswirken und zu einer Verringerung der Insulinsekretion sowie gesteigerter β -Zell-Apoptose führen (McGarry, 2002). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass der als $G\alpha_q$ -gekoppelt beschriebene GPR40 an der durch Fettsäuren-vermittelten Potenzierung der Insulinsekretion beteiligt ist (Itoh *et al.*, 2003). Palmitat stellt neben anderen lang- und mittelkettigen Fettsäuren einen Agonisten an diesem Rezeptor dar (Itoh *et al.*, 2003). Auch eine Beteiligung von cAMP wurde jedoch nicht ausgeschlossen (Itoh *et al.*, 2003). Nach Stimulation mit Palmitat zeigten sich dagegen keine Unterschiede in der Menge des sezernierten Insulins zwischen Kontroll- und $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln. Dies macht eine Beteiligung von $G\alpha_{i2}$ an der Palmitat-vermittelten Insulinsekretion unwahrscheinlich. Diese Befunde decken sich mit dem fehlenden Effekt von PTX auf die GPR40-vermittelte Insulinsekretion (Itoh *et al.*, 2003; Kebede *et al.*, 2009). Neben den Fettsäuren sind mit Aminosäuren weitere Nahrungsbestandteile an der Insulinsekretion beteiligt

(Floyd *et al.*, 1966). Sowohl die Mischung aller 20 proteinogenen Aminosäuren als auch einzelne Aminosäuren wie L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, Glycin, L-Glutamat, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, sowie nicht proteinogene Aminosäuren wie L-Ornithin können die Glukose-stimulierte Insulinsekretion potenzieren (Malaisse *et al.*, 1989; Malaisse *et al.*, 1984; Malaisse *et al.*, 1980; Pagliara *et al.*, 1974; Sener *et al.*, 1985; Sener & Malaisse, 2002). Die genauen Mechanismen der Aminosäure-stimulierten Insulinsekretion sind komplex und bislang nicht ausreichend geklärt und umfassen sowohl transkriptionelle als auch mitochondriale Effekte (Newsholme *et al.*, 2007; Zhang & Li, 2013). Untersuchungen an perfundierten Ratten-Inseln zeigten in den 1970-er Jahren, dass viele Aminosäuren die Insulinsekretion nur in Gegenwart von Glukose stimulieren können (Pace *et al.*, 1975; Pagliara *et al.*, 1974). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die Zugabe von Aminosäuren bei Niedrigglukose hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Insulinsekretion. Die Behandlung isolierter Inseln mit den basischen Aminosäuren L-Arginin sowie L-Ornithin führte in den Inseln der $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tiere in Gegenwart von Hochglukose zu einer signifikant verringerten Reaktion. Somit könnte die verminderte Insulinfreisetzung während der Glukosetoleranztests in einem Defekt der Aminosäure-potenziierten Insulinsekretion begründet sein. Vor einigen Jahren wurde mit GPRC6A ein GPCR-Mitglied der C-Familie deorphanisiert, dessen Liganden neben L-Arginin auch weitere basische Aminosäuren wie L-Ornithin und L-Lysin sowie extrazelluläre Kationen sind (Pi *et al.*, 2005; Wellendorph *et al.*, 2005). Der GPRC6A gehört zu den am stärksten in β -Zellen exprimierten GPCRs (Pi *et al.*, 2008; Pi *et al.*, 2011; Regard *et al.*, 2007). Unsere Daten deuten darauf hin, dass $G\alpha_{i2}$ -Proteine maßgeblich an der L-Arginin- und L-Ornithin-vermittelten Insulinsekretion beteiligt sind. Verschiedene Studien zeigten eine Beteiligung von $G\alpha_q$, aber auch PTX-sensitiven $G\alpha_{i/o}$ -Proteinen sowie die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ an den nachgeschalteten Signalwegen von GPRC6A (Christiansen *et al.*, 2007; Oya *et al.*, 2013; Pi *et al.*, 2005; Pi *et al.*, 2010). Da die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ den entscheidenden Trigger für die Verschmelzung der Insulinvesikel mit der Plasmamembran und somit der Insulinsekretion darstellt, wurde der Effekt von L-Arginin auf die $[Ca^{2+}]_i$ untersucht. Die Calcium-Antwort auf L-Arginin war in den β -Zellen der $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Tiere sowohl bei Niedrig- als auch bei Hochglukose verringert, wobei sich die allein durch Glukose hervorgerufene Antwort nicht unterschied. Dies lässt den Schluss zu, dass die

verringerten $[Ca^{2+}]_i$ in den β -Zellen zu einer reduzierten Insulinsekretion der $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Inseln führen. Es konnte somit ein direkter Zusammenhang zwischen L-Arginin, $G\alpha_{i2}$ -Proteinen und der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hergestellt werden. Der Wegfall von $G\alpha_{i2}$ -Proteinen führte zu niedrigeren Ca^{2+} -Antworten in den β -Zellen auf eine L-Arginin-Stimulation.

Der Mechanismus über welchen basische Aminosäuren wie L-Arginin und L-Ornithin zu einer Verstärkung der Insulinsekretion führen wird kontrovers diskutiert (Smith *et al.*, 1997). Der L-Arginin-Metabolismus scheint dabei jedoch keine Rolle zu spielen, da auch nicht-metabolisierbare basische Aminosäuren einen Effekt zeigen (Blachier *et al.*, 1989a; Blachier *et al.*, 1989b; Smith *et al.*, 1997). Hinzu kommt, dass L-Ornithin bereits ein Abbauprodukt von L-Arginin darstellt und denselben Effekt auf die Insulinsekretion in den $G\alpha_{i2}$ -defizienten- β -Zellen zeigt. Dies schließt auch eine Beteiligung Stickstoffmonoxid-vermittelter Signalwege aus. Eine aufgrund der positiven Ladung ausgelöste Depolarisation der β -Zelle ohne Beteiligung von GPCRs ist aufgrund der D-Arginin Befunde ebenfalls auszuschließen. Als sicher gilt die Beteiligung eines kationischen Aminosäuretransporters (Smith *et al.*, 1997). Dieser nicht-Rezeptor-vermittelte Mechanismus der L-Arginin Wirkung scheint jedoch nur einen Teil der Gesamtwirkung darzustellen. Der übrige Teil entfällt dabei wahrscheinlich auf die Aktivierung des GPRC6A (Pi *et al.*, 2012). Dies erklärt auch, warum die Stimulation durch L-Arginin und L-Ornithin nicht vollständig aufgehoben, sondern nur um ca. 20% reduziert ist. Dennoch war eine reduzierte Insulinfreisetzung die Folge und spiegelte sich zudem in niedrigeren Plasmainsulinspiegeln wieder. Zwar fiel isoliert betrachtet die Reduktion in den Insulinsekretionsexperimenten geringer aus als die verringerten Plasmainsulinspiegel im Glukosetoleranztest. Möglicherweise kommt es aber *in vivo* zu einem additiven Effekt verschiedener Aminosäuren und anderer bisher noch unbekannter Faktoren. Es ist durchaus denkbar, dass all diese Faktoren zusammengenommen einen viel größeren Effekt *in vivo* haben als isoliert *in vitro* betrachtet.

Obwohl L-Typ Calciumkanäle hauptsächlich für den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in den β -Zellen verantwortlich sind, werden noch weitere Calciumkanäle exprimiert (Düfer, 2012). R-Typ-Calciumkanäle sind für die zweite Phase der Insulinsekretion essentiell und sind auch bei längerer Stimulation wichtig (Colsoul *et al.*, 2011; Jing *et al.*, 2005). Auch TRP-Kanäle sind in Inseln exprimiert. In der vorliegenden Arbeit zeigte ein Inhibitor der Phospholipase A_2 sowie diverser TRP-Kanäle,

N-(p-Amylcinnamoyl)anthranilsäure (ACA), einen wesentlich stärkeren Effekt auf die $[Ca^{2+}]_i$ in den β -Zellen $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Tiere als in Kontroll-Zellen. Diese Ergebnisse könnten verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnten diese Befunde durch eine ACA-induzierte Hemmung der Phospholipase A_2 zustande kommen. Phospholipase A_2 führt zu einem Anstieg der intrazellulären Arachidonsäurespiegel. Die Glukose-stimulierte Insulinsekretion kann durch Arachidonsäure gesteigert werden (Konrad *et al.*, 1992) indem Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum freigesetzt wird (Wolf *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1986). In Retina- und Herzzellen konnte eine Aktivierung der Phospholipase A_2 durch $G\beta\gamma$ -Untereinheiten gezeigt werden (Jelsema & Axelrod, 1987; Kim *et al.*, 1989). In den $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ β -Zellen sind die $G\beta$ -Proteinspiegel erniedrigt wodurch weniger Phospholipase A_2 aktiviert, weniger Arachidonsäure gebildet und deshalb weniger Insulin sezerniert wird. Da der ACA-Effekt in den $G\alpha_{i2}$ -defizienten β -Zellen verstärkt war, könnte dies auf eine kompensatorisch erhöhte Phospholipase A_2 -Expression hindeuten. Da aber dennoch eine Hemmung der Insulinsekretion in den $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Mäusen beobachtet wurde, ist die Kompensation möglicherweise unzureichend. Auch eine teilweise Verschleierung des eigentlichen Phänotyps wäre denkbar.

Zum anderen könnten TRP-Kanäle am Wirkmechanismus beteiligt sein. Eine direkte Aktivierung von TRPC4, einem nicht-selektiven, Ca^{2+} -permeablen Kationenkanal, durch $G\alpha_{i2}$ -Proteine ist beschrieben (Jeon *et al.*, 2012; Jeon *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2012). TRPC4 wurde in murinen Inseln nachgewiesen (Colsoul *et al.*, 2011). Durch die Deletion des $G\alpha_{i2}$ -Proteins fehlt die Aktivierung des TRPC4 nach L-Arginin-induzierter Stimulation. Dadurch kommt es zu niedrigeren $[Ca^{2+}]_i$ und folglich wird weniger Insulin sezerniert. Wiederum könnte der beobachtete stärkere ACA-Effekt in den $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ darauf hinweisen, dass in den $G\alpha_{i2}$ -defizienten β -Zellen eine kompensatorische Hochregulation des TRPC4 stattfindet. Durch die Inhibition mit ACA kann dieser Kompensationsmechanismus nicht mehr greifen und die Reduktion in der Calcium-Antwort fällt in den $G\alpha_{i2}$ -defizienten β -Zellen entsprechend stärker aus als in den Kontrollen. Interessanterweise könnte auch hier die Hochregulation von TRPC4 den vollständigen $G\alpha_{i2}$ -Phänotyp maskieren. Ob es in den $G\alpha_{i2}^{\beta cko}$ -Inseln tatsächlich zu einer Kompensation durch Phospholipase A_2 und/oder TRPC4 kommt muss allerdings in weiteren Analysen geklärt werden.

4.4 Schlussfolgerung

Die Analyse zweier verschiedener $G\alpha_{i2}$ -Mutationsmodelle zeigte erstmals eine stimulatorische Beteiligung von $G\alpha_{i2}$ an der Insulinsekretion. Basische Aminosäuren, wie L-Arginin und L-Ornithin potenzieren die Glukose-induzierte-Insulinsekretion in Abhängigkeit von $G\alpha_{i2}$. Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten könnte eine $G\alpha_{i2}$ -vermittelte Stimulation der Insulinsekretion nach folgendem Modell erfolgen:

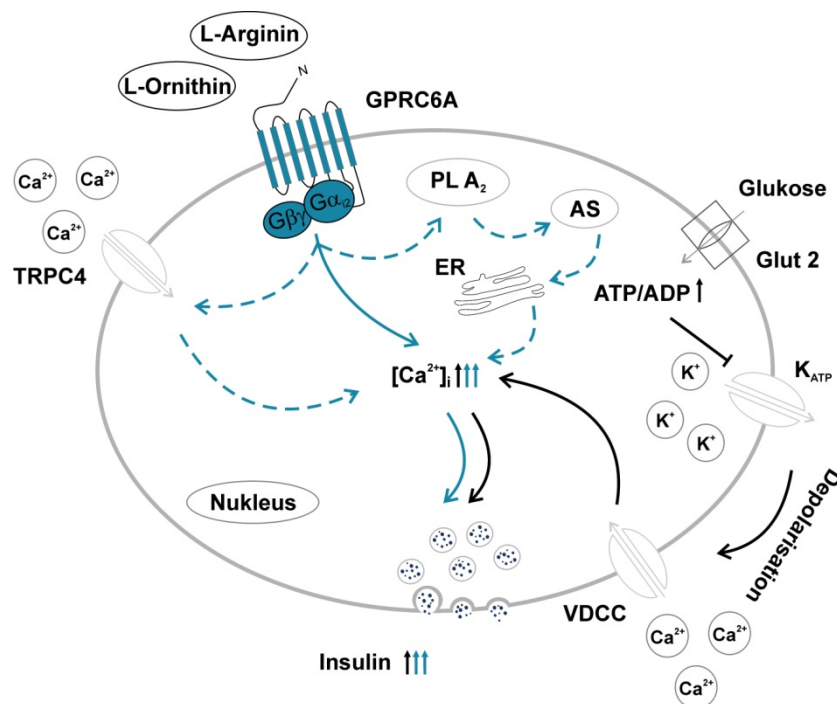


Abbildung 4.1: Hypothetisches Modell der Beteiligung von $G\alpha_{i2}$ an der L-Arginin induzierten Insulinsekretion. Eine Aktivierung des $G\alpha_{i2}$ -gekoppelten GPRC6A durch L-Arginin könnte zu einer Stimulation von TRPC4 und/oder Phospholipase A_2 (PLA_2) führen. Beide Wege resultieren in einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und steigern die Glukose-induzierte Insulinsekretion (weitere Erläuterungen siehe Text). GLUT 2 - Glukosetransporter Typ 2; ADP - Adenosindiphosphat; ATP - Adenosintriphosphat; ATP/ADP – Verhältnis von Adenosintriphosphat zu Adenosindiphosphat; K_{ATP} - ATP-abhängige Kaliumkanäle; VDCC - spannungsabhängige Calcium-Kanäle; $[Ca^{2+}]_i$ - intrazelluläre Calciumkonzentration; Ca^{2+} - Calciumion; K^+ - Kaliumion; PLA_2 - Phospholipase A_2 ; AS - Arachidonsäure; ER - endoplasmatisches Retikulum; TRPC4 - Ca^{2+} -permeabler Kationenkanal der TRP-Familie Subtyp 4; GPRC6A - G-Protein gekoppelter Rezeptor der C-Familie Gruppe 6 Mitglied A.

Möglicherweise könnte GPRC6A an dieser $G\alpha_{i2}$ -gekoppelten Signaltransduktion beteiligt sein. Das Fehlen des $G\alpha_{i2}$ -Proteins führt zu einer verminderten L-Arginin- sowie L-Ornithin-induzierten Insulinsekretion. Es bleibt offen, ob diese Effekte alleine die verringerten Plasmainsulinspiegel der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tiere im Glukosetoleranztest verursachen oder noch weitere bisher unbekannte Faktoren eine

Rolle spielen. Weitere $G_{\alpha_{i2}}$ -gekoppelte GPCRs könnten zu dem *in vivo* beobachteten Effekt beitragen. Auch die Beteiligung von TRP-Kanälen und/oder Phospholipase A_2 an der $G_{\alpha_{i2}}$ -vermittelten Signaltransduktion in den β -Zellen ist nicht vollständig geklärt, könnte aber durch Analysen an geeigneten *in vitro*-Modellen genauer aufgeschlüsselt werden.

5 Zusammenfassung

Die Langerhansschen Inselzellen sind Zellagglomerate im endokrinen Teil des Pankreas. Sie erkennen Schwankungen des Blutzuckerspiegels und regulieren diesen bei Abweichungen durch die gezielte Freisetzung der antagonistischen Hormone Insulin und Glukagon. Im hyperglykämischen Zustand sezernieren β -Zellen Insulin, um den Blutzucker zu senken. Die exakten Mechanismen, die zur Sekretion von Insulin führen, sind zum Teil noch ungeklärt. Neben einer spannungsabhängigen Aktivierung von Calciumkanälen führt auch die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und zur Ausschüttung von Insulin aus den β -Zellen. Durch G-Proteine werden diese Signale intrazellulär weitergeleitet.

Allen PTX-sensitiven G-Proteinen wurde bisher eine Beteiligung an der Hemmung der Insulinsekretion zugeschrieben (Gulbenkian *et al.*, 1968; Toyota *et al.*, 1978; Yajima *et al.*, 1978). Durch die Charakterisierung $G\alpha_o$ -defizienter Mäuse ist $G\alpha_{o2}$ für die Hemmung maßgeblich verantwortlich (Tang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011). Die funktionelle Beteiligung der quantitativ dominanten $G\alpha_{i2}$ -Isoform an der Insulinsekretion blieb allerdings bisher ungeklärt.

Um die genaue Funktion der $G\alpha_{i2}$ -Isoform in den β -Zellen aufzuschlüsseln, wurden mit Hilfe des Cre-loxP Rekombinationssystems β -Zell-spezifische $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse ($G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$) generiert und parallel zu globalen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren analysiert. Mit dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass $G\alpha_{i2}$ in den β -Zellen die Insulinsekretion stimuliert.

Eine sehr frühe Deletion des $G\alpha_{i2}$ -Proteins führte zu Störungen in der Inseldifferenzierung die sich in einer geringeren Inselgröße in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren manifestierten. Durch das spezifische Ausschalten des *Gnai2*-Gens in den β -Zellen zu einem späteren Zeitpunkt während der Embryogenese konnte dieser Phänotyp vermieden werden. Ebenso war eine möglicherweise kompensatorische Hochregulation der $G\alpha_{i3}$ -Isoform in den $G\alpha_{i2}^{\beta\text{cko}}$ -Inseln nicht wie in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Inseln zu beobachten. Dagegen war in beiden Mutationsmodellen eine verminderte $G\beta$ -Proteinexpression detektierbar.

Das Fehlen des $G\alpha_{i2}$ -Proteins führte *in vitro* zu einer Verringerung der physiologischen Stimulation der Insulinfreisetzung durch L-Arginin bzw. L-Ornithin,

indem eine Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration auf Kontroll-Niveau nicht mehr möglich war.

In beiden Mausmodellen war zudem im Glukosetoleranztest *in vivo* eine deutlich verminderte Insulinsekretion zu beobachten, die periphere Insulinsensitivität war in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Tieren im Fettgewebe leicht verbessert.

Insgesamt zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten, dass $G\alpha_{i2}$ maßgeblich als positiver Regulator an der Insulinsekretion beteiligt ist und grenzen damit die Funktion des $G\alpha_{i2}$ -Proteins deutlich von der bisher allen PTX-sensitiven Proteinen zugeschriebenen Rolle ab.

6 Literaturverzeichnis

Ahren B (2009). Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. *Nature reviews. Drug discovery* **8**: 369-385.

Ahren B., Filipsson K (1998). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide stimulates insulin secretion in a glucose-dependent manner in vivo. *Annals of the New York Academy of Sciences* **865**: 466-470.

Ahren B., Taborsky GJ, Jr., Porte D, Jr. (1986). Neuropeptidergic versus cholinergic and adrenergic regulation of islet hormone secretion. *Diabetologia* **29**: 827-836.

Alberti KGMM., Eckel RH., Grundy SM., Zimmet PZ., Cleeman JI., Donato KA., Fruchart J-C., James WPT., Loria CM., Smith SC (2009). Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **120**: 1640-1645.

Amatruda TT, 3rd., Steele DA., Slepak VZ., Simon MI (1991). G α_{16} , a G protein α subunit specifically expressed in hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 5587-5591.

Ammon HP., Müller AB (1984). Effect of forskolin on islet cyclic AMP, insulin secretion, blood glucose and intravenous glucose tolerance in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **326**: 364-367.

Andrikopoulos S., Blair AR., Deluca N., Fam BC., Proietto J (2008). Evaluating the glucose tolerance test in mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **295**: E1323-1332.

Aplin AE., Howe A., Alahari SK., Juliano RL (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacological reviews* **50**: 197-263.

Arshavsky VY., Lamb TD., Pugh EN, Jr. (2002). G proteins and phototransduction. *Annual review of physiology* **64**: 153-187.

Ashcroft FM., Rorsman P (1989). Electrophysiology of the pancreatic β -cell. *Progress in biophysics and molecular biology* **54**: 87-143.

Ayvaz G., Balos Toruner F., Karakoc A., Yetkin I., Cakir N., Arslan M (2002). Acute and chronic effects of different concentrations of free fatty acids on the insulin secreting function of islets. *Diabetes & metabolism* **28**: 3S7-12; discussion 13S108-112.

Baetens D., Malaisse-Lagae F., Perrelet A., Orci L (1979). Endocrine pancreas: three-dimensional reconstruction shows two types of islets of langerhans. *Science (New York, N.Y.)* **206**: 1323-1325.

Blachier F., Leclercq-Meyer V., Marchand J., Woussen-Colle MC., Mathias PC., Sener A., Malaisse WJ (1989a). Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Functional response of islets to L-arginine and L-ornithine. *Biochimica et biophysica acta* **1013**: 144-151.

Blachier F., Mourtada A., Sener A., Malaisse WJ (1989b). Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Uptake of metabolized and nonmetabolized cationic amino acids by pancreatic islets. *Endocrinology* **124**: 134-141.

Blumer JB., Lanier SM (2014). Activators of G protein signaling exhibit broad functionality and define a distinct core signaling triad. *Molecular pharmacology* **85**: 388-396.

Bokoch GM., Katada T., Northup JK., Hewlett EL., Gilman AG (1983). Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *The Journal of biological chemistry* **258**: 2072-2075.

Braun M (2014). The Somatostatin Receptor in Human Pancreatic β -Cells. *Vitamins and hormones* **95**: 165-193.

Briscoe CP., Tadayyon M., Andrews JL., Benson WG., Chambers JK., Eilert MM., Ellis C., Elshourbagy NA., Goetz AS., Minnick DT., Murdock PR., Sauls HR, Jr., Shabon U., Spinage LD., Strum JC., Szekeres PG., Tan KB., Way JM., Ignar DM., Wilson S., Muir AI (2003). The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *The Journal of biological chemistry* **278**: 11303-11311.

Buse JB., Henry RR., Han J., Kim DD., Fineman MS., Baron AD (2004). Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in sulfonylurea-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes care* **27**: 2628-2635.

Cabrera-Vera TM., Vanhauwe J., Thomas TO., Medkova M., Preininger A., Mazzone MR., Hamm HE (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocrine reviews* **24**: 765-781.

Chan O., Sherwin RS (2012). Hypothalamic regulation of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* **61**: 564-565.

Chen F., Spicher K., Jiang M., Birnbaumer L., Wetzel GT (2001). Lack of muscarinic regulation of Ca^{2+} channels in $G_{i2\alpha}$ gene knockout mouse hearts. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **280**: H1989-1995.

Chevassus H., Roig A., Belloc C., Lajoix AD., Broca C., Manteghetti M., Petit P (2002). P2Y receptor activation enhances insulin release from pancreatic β -cells by triggering the cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **366**: 464-469.

Chillaron JJ., Flores Le-Roux JA., Benaiges D., Pedro-Botet J (2014). Type 1 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular risk. *Metabolism: clinical and experimental* **63**: 181-187.

Cho H., Kehrl JH (2008). Beyond the plasma membrane: new Functions for heterotrimeric G-protein signaling in asymmetric and symmetric cell division. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **7**: 573-577.

Christiansen B., Hansen KB., Wellendorph P., Brauner-Osborne H (2007). Pharmacological characterization of mouse GPRC6A, an L- α -amino-acid receptor modulated by divalent cations. *British journal of pharmacology* **150**: 798-807.

Clapham DE., Neer EJ (1997). G protein $\beta\gamma$ subunits. *Annual review of pharmacology and toxicology* **37**: 167-203.

Colsohl B., Vennekens R., Nilius B (2011). Transient receptor potential cation channels in pancreatic β cells. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **161**: 87-110.

Crespo P., Xu N., Simonds WF., Gutkind JS (1994). Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* **369**: 418-420.

Dalwadi H., Wei B., Schrage M., Spicher K., Su TT., Birnbaumer L., Rawlings DJ., Braun J (2003). B cell developmental requirement for the *Gai2* gene. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **170**: 1707-1715.

De Vries L., Zheng B., Fischer T., Elenko E., Farquhar MG (2000). The regulator of G protein signaling family. *Annual review of pharmacology and toxicology* **40**: 235-271.

Dean PM., Matthews EK (1968). Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature* **219**: 389-390.

Dezaki K., Hosoda H., Kakei M., Hashiguchi S., Watanabe M., Kangawa K., Yada T (2004). Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca^{2+} signaling in β -cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes* **53**: 3142-3151.

Dezaki K., Kakei M., Yada T (2007). Ghrelin uses $G\alpha_{i2}$ and activates voltage-dependent K^+ channels to attenuate glucose-induced Ca^{2+} signaling and insulin release in islet β -cells: novel signal transduction of ghrelin. *Diabetes* **56**: 2319-2327.

Dhanasekaran N., Tsim ST., Dermott JM., Onesime D (1998). Regulation of cell proliferation by G proteins. *Oncogene* **17**: 1383-1394.

Dizayee S., Kaestner S., Kuck F., Hein P., Klein C., Piekorz RP., Meszaros J., Matthes J., Nürnberg B., Herzig S (2011). $G\alpha_{i2}$ - and $G\alpha_{i3}$ -specific regulation of voltage-dependent L-type calcium channels in cardiomyocytes. *PloS one* **6**: e24979.

Dorsam RT., Gutkind JS (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature reviews. Cancer* **7**: 79-94.

Downes GB., Gautam N (1999). The G protein subunit gene families. *Genomics* **62**: 544-552.

Drucker DJ., Nauck MA (2006). The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* **368**: 1696-1705.

Düfer M (2012). Determination of β -cell function: ion channel function in β cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **933**: 203-217.

Eckel RH., Grundy SM., Zimmet PZ (2005). The metabolic syndrome. *Lancet* **365**: 1415-1428.

Exton JH (1996). Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annual review of pharmacology and toxicology* **36**: 481-509.

Ezan J., Lasvaux L., Gezer A., Novakovic A., May-Simera H., Belotti E., Lhoumeau AC., Birnbaumer L., Beer-Hammer S., Borg JP., Le Bivic A., Nürnberg B., Sans N., Montcouquiol M (2013). Primary cilium migration depends on G-protein signalling control of subapical cytoskeleton. *Nature cell biology* **15**: 1107-1115.

Filipsson K., Kvist-Reimer M., Ahren B (2001). The neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and islet function. *Diabetes* **50**: 1959-1969.

Floyd JC, Jr., Fajans SS., Conn JW., Knopf RF., Rull J (1966). Stimulation of insulin secretion by amino acids. *The Journal of clinical investigation* **45**: 1487-1502.

Foerster K., Groner F., Matthes J., Koch WJ., Birnbaumer L., Herzig S (2003). Cardioprotection specific for the G protein G_{12} in chronic adrenergic signaling through β_2 -adrenoceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 14475-14480.

Fonseca VA., Kendall DM., Sobel BE (2003). Insulin resistance syndrome. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* **9**: 567-569; author reply 569.

Gautam D., Han SJ., Hamdan FF., Jeon J., Li B., Li JH., Cui Y., Mears D., Lu H., Deng C., Heard T., Wess J (2006). A critical role for β cell M_3 muscarinic acetylcholine receptors in regulating insulin release and blood glucose homeostasis in vivo. *Cell metabolism* **3**: 449-461.

Gerich JE., Lorenzi M., Schneider V., Forsham PH (1974). Effect of somatostatin on plasma glucose and insulin responses to glucagon and tolbutamide in man. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **39**: 1057-1060.

Gilman AG (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annual review of biochemistry* **56**: 615-649.

- Gohla A., Klement K., Nürnberg B (2007a). The heterotrimeric G protein G_{i3} regulates hepatic autophagy downstream of the insulin receptor. *Autophagy* **3**: 393-395.
- Gohla A., Klement K., Piekorz RP., Pexa K., vom Dahl S., Spicher K., Dreval V., Haussinger D., Birnbaumer L., Nürnberg B (2007b). An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein G_{i3} in the antiautophagic action of insulin in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 3003-3008.
- Gohla A., Offermanns S., Wilkie TM., Schultz G (1999). Differential involvement of G α_{12} and G α_{13} in receptor-mediated stress fiber formation. *The Journal of biological chemistry* **274**: 17901-17907.
- Gromada J., Franklin I., Wollheim CB (2007). α -cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocrine reviews* **28**: 84-116.
- Gu H., Marth JD., Orban PC., Mossmann H., Rajewsky K (1994). Deletion of a DNA polymerase β gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science (New York, N.Y.)* **265**: 103-106.
- Gu H., Zou YR., Rajewsky K (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* **73**: 1155-1164.
- Gudermann T., Nürnberg B., Schultz G (1995). Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **73**: 51-63.
- Guillermet-Guibert J., Lahlou H., Cordelier P., Bousquet C., Pyronnet S., Susini C (2005). Physiology of somatostatin receptors. *Journal of endocrinological investigation* **28**: 5-9.
- Gulbenkian A., Schobert L., Nixon., Tabachnick, II (1968). Metabolic effects of pertussis sensitization in mice and rats. *Endocrinology* **83**: 885-892.
- Hamm HE (1998). The many faces of G protein signaling. *The Journal of biological chemistry* **273**: 669-672.
- Han SB., Moratz C., Huang NN., Kelsall B., Cho H., Shi CS., Schwartz O., Kehrl JH (2005). *Rgs1* and *Gnai2* regulate the entrance of B lymphocytes into lymph nodes and B cell motility within lymph node follicles. *Immunity* **22**: 343-354.
- Hanoune J., Defer N (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annual review of pharmacology and toxicology* **41**: 145-174.
- Harteneck C., Frenzel H., Kraft R (2007). N-(p-amylcinnamoyl)anthranilic acid (ACA): a phospholipase A₂ inhibitor and TRP channel blocker. *Cardiovascular drug reviews* **25**: 61-75.

- He J., Gurunathan S., Iwasaki A., Ash-Shaheed B., Kelsall BL (2000). Primary role for Gi protein signaling in the regulation of interleukin 12 production and the induction of T helper cell type 1 responses. *The Journal of experimental medicine* **191**: 1605-1610.
- Herrera PL (2000). Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development (Cambridge, England)* **127**: 2317-2322.
- Hornquist CE., Lu X., Rogers-Fani PM., Rudolph U., Shappell S., Birnbaumer L., Harriman GR (1997). $G\alpha_{i2}$ -deficient mice with colitis exhibit a local increase in memory $CD4^+$ T cells and proinflammatory Th1-type cytokines. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **158**: 1068-1077.
- Hsu WH., Xiang HD., Rajan AS., Kunze DL., Boyd AE, 3rd (1991). Somatostatin inhibits insulin secretion by a G-protein-mediated decrease in Ca^{2+} entry through voltage-dependent Ca^{2+} channels in the β cell. *The Journal of biological chemistry* **266**: 837-843.
- Hu X., Friedman D., Hill S., Caprioli R., Nicholson W., Powers AC., Hunter L., Limbird LE (2005). Proteomic exploration of pancreatic islets in mice null for the α_{2A} adrenergic receptor. *Journal of molecular endocrinology* **35**: 73-88.
- Huypens P., Ling Z., Pipeleers D., Schuit F (2000). Glucagon receptors on human islet cells contribute to glucose competence of insulin release. *Diabetologia* **43**: 1012-1019.
- Hwang IY., Park C., Harrison KA., Huang NN., Kehrl JH (2010). Variations in *Gnai2* and *Rgs1* expression affect chemokine receptor signaling and the organization of secondary lymphoid organs. *Genes and immunity* **11**: 384-396.
- Islam MS (2011). TRP channels of islets. *Advances in experimental medicine and biology* **704**: 811-830.
- 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 β cells through GPR40. *Nature* **422**: 173-176.
- Jelsema CL., Axelrod J (1987). Stimulation of phospholipase A_2 activity in bovine rod outer segments by the $\beta\gamma$ subunits of transducin and its inhibition by the α subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 3623-3627.
- Jeon JP., Hong C., Park EJ., Jeon JH., Cho NH., Kim IG., Choe H., Muallem S., Kim HJ., So I (2012). Selective $G\alpha_i$ subunits as novel direct activators of transient receptor potential canonical (TRPC)4 and TRPC5 channels. *The Journal of biological chemistry* **287**: 17029-17039.

- Jeon JP., Lee KP., Park EJ., Sung TS., Kim BJ., Jeon JH., So I (2008). The specific activation of TRPC4 by G_i protein subtype. *Biochemical and biophysical research communications* **377**: 538-543.
- Ji TH., Grossmann M., Ji I (1998). G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *The Journal of biological chemistry* **273**: 17299-17302.
- Jiang M., Bajpayee NS (2009). Molecular mechanisms of go signaling. *Neuro-Signals* **17**: 23-41.
- Jiang M., Boulay G., Spicher K., Peyton MJ., Brabet P., Birnbaumer L., Rudolph U (1997). Inactivation of the G α_{i2} and G α_o genes by homologous recombination. *Receptors & channels* **5**: 187-192.
- Jiang ZY., Zhou QL., Coleman KA., Chouinard M., Boese Q., Czech MP (2003). Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 7569-7574.
- Jing X., Li DQ., Olofsson CS., Salehi A., Surve VV., Caballero J., Ivarsson R., Lundquist I., Pereverzev A., Schneider T., Rorsman P., Renstrom E (2005). Ca_v2.3 calcium channels control second-phase insulin release. *The Journal of clinical investigation* **115**: 146-154.
- Katada T., Ui M (1979a). Effect of in vivo pretreatment of rats with a new protein purified from Bordetella pertussis on in vitro secretion of insulin: role of calcium. *Endocrinology* **104**: 1822-1827.
- Katada T., Ui M (1979b). Islet-activating protein. Enhanced insulin secretion and cyclic AMP accumulation in pancreatic islets due to activation of native calcium ionophores. *The Journal of biological chemistry* **254**: 469-479.
- Kawai K., Yokota C., Ohashi S., Watanabe Y., Yamashita K (1995). Evidence that glucagon stimulates insulin secretion through its own receptor in rats. *Diabetologia* **38**: 274-276.
- Kebede MA., Alquier T., Latour MG., Poitout V (2009). Lipid receptors and islet function: therapeutic implications? *Diabetes, obesity & metabolism* **11 Suppl 4**: 10-20.
- Kerner W., Brückel J (2011). Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie und Stoffwechsel* **6**: 107-110.
- Kieffer TJ., Heller RS., Unson CG., Weir GC., Habener JF (1996). Distribution of glucagon receptors on hormone-specific endocrine cells of rat pancreatic islets. *Endocrinology* **137**: 5119-5125.
- Kim D., Lewis DL., Graziadei L., Neer EJ., Bar-Sagi D., Clapham DE (1989). G-protein $\beta\gamma$ -subunits activate the cardiac muscarinic K⁺-channel via phospholipase A₂. *Nature* **337**: 557-560.

- Kim H., Kim J., Jeon JP., Myeong J., Wie J., Hong C., Kim HJ., Jeon JH., So I (2012). The roles of G proteins in the activation of TRPC4 and TRPC5 transient receptor potential channels. *Channels (Austin, Tex.)* **6**: 333-343.
- Klose C., Straub I., Riehle M., Ranta F., Krautwurst D., Ullrich S., Meyerhof W., Harteneck C (2011). Fenamates as TRP channel blockers: mefenamic acid selectively blocks TRPM3. *British journal of pharmacology* **162**: 1757-1769.
- Köhler D., Devanathan V., Bernardo de Oliveira Franz C., Eldh T., Novakovic A., Roth JM., Granja T., Birnbaumer L., Rosenberger P., Beer-Hammer S., Nurnberg B (2014). Galphai2- and Galphai3-deficient mice display opposite severity of myocardial ischemia reperfusion injury. *PloS one* **9**: e98325.
- Konrad RJ., Jolly YC., Major C., Wolf BA (1992). Inhibition of phospholipase A₂ and insulin secretion in pancreatic islets. *Biochimica et biophysica acta* **1135**: 215-220.
- Konrad RJ., Young RA., Record RD., Smith RM., Butkerait P., Manning D., Jarett L., Wolf BA (1995). The heterotrimeric G-protein G_i is localized to the insulin secretory granules of β -cells and is involved in insulin exocytosis. *The Journal of biological chemistry* **270**: 12869-12876.
- Kroeze WK., Sheffler DJ., Roth BL (2003). G-protein-coupled receptors at a glance. *Journal of cell science* **116**: 4867-4869.
- Krumins AM., Gilman AG (2006). Targeted knockdown of G protein subunits selectively prevents receptor-mediated modulation of effectors and reveals complex changes in non-targeted signaling proteins. *The Journal of biological chemistry* **281**: 10250-10262.
- Kukkonen JP., Huifang G., Jansson CC., Wurster S., Cockcroft V., Savola JM., Akerman KE (1997). Different apparent modes of inhibition of alpha2A-adrenoceptor by alpha2-adrenoceptor antagonists. *European journal of pharmacology* **335**: 99-105.
- Kulkarni RN (2004). The islet β -cell. *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**: 365-371.
- Kurachi Y., Ishii M (2004). Cell signal control of the G protein-gated potassium channel and its subcellular localization. *The Journal of physiology* **554**: 285-294.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lambright DG., Sondek J., Böhm A., Skiba NP., Hamm HE., Sigler PB (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* **379**: 311-319.
- Lang F (2000). *Basiswissen Physiologie : mit 43 Tabellen*. edn. Springer: Berlin.
- Lang J (1999). Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *European journal of biochemistry / FEBS* **259**: 3-17.

- Langer J., Panten U., Zielmann S (1983). Effects of alpha-adrenoceptor antagonists on clonidine-induced inhibition of insulin secretion by isolated pancreatic islets. *British journal of pharmacology* **79**: 415-420.
- Lauffer L., Iakoubov R., Brubaker PL (2008). GPR119: "double-dipping" for better glycemic control. *Endocrinology* **149**: 2035-2037.
- Le Poul E., Loison C., Struyf S., Springael J-Y., Lannoy V., Decobecq M-E., Brezillon S., Dupriez V., Vassart G., Van Damme J., Parmentier M., Detheux M (2003). Functional Characterization of Human Receptors for Short Chain Fatty Acids and Their Role in Polymorphonuclear Cell Activation. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 25481-25489.
- Le Roith D., Zick Y (2001). Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes care* **24**: 588-597.
- Lee JW., Juliano R (2004). Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Molecules and cells* **17**: 188-202.
- Lee JY., Ristow M., Lin X., White MF., Magnuson MA., Hennighausen L (2006). RIP-Cre revisited, evidence for impairments of pancreatic β -cell function. *The Journal of biological chemistry* **281**: 2649-2653.
- Leiss V., Flockerzie K., Novakovic A., Rath M., Schönsiegel A., Birnbaumer L., Schürmann A., Harteneck C., Nürnberg B (2014). Insulin secretion stimulated by arginine and its metabolite ornithine depends on $G\alpha_{i2}$. DOI: 10.1152/ajpendo.00337.2014.
- Leiss V., Friebe A., Welling A., Hofmann F., Lukowski R (2011). Cyclic GMP kinase I modulates glucagon release from pancreatic α -cells. *Diabetes* **60**: 148-156.
- Leopoldt D., Harteneck C., Nürnberg B (1997). G proteins endogenously expressed in Sf 9 cells: interactions with mammalian histamine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **356**: 216-224.
- Levoye A., Dam J., Ayoub MA., Guillaume JL., Jockers R (2006). Do orphan G-protein-coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers. *EMBO reports* **7**: 1094-1098.
- Liebmann C., Bohmer FD (2000). Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signaling. *Current medicinal chemistry* **7**: 911-943.
- Löffler G (2003). *Biochemie und Pathobiochemie : mit 218 Tabellen*. 7., völlig neu bearb. Aufl. edn. Springer: Berlin.
- Longo DL (2012). *Harrison's principles of internal medicine*. edn. McGraw-Hill: New York.

Lukowski R., Weber S., Weinmeister P., Feil S., Feil R (2005). Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-Signalwegs in der Maus. *BIOspektrum* **3**: 287-290.

Maier U., Babich A., Macrez N., Leopoldt D., Gierschik P., Illenberger D., Nürnberg B (2000). G $\beta_5\gamma_2$ is a highly selective activator of phospholipid-dependent enzymes. *The Journal of biological chemistry* **275**: 13746-13754.

Malaisse WJ., Blachier F., Mourtada A., Camara J., Albor A., Valverde I., Sener A (1989). Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release: metabolism of L-arginine and L-ornithine in tumoral islet cells. *Molecular and cellular endocrinology* **67**: 81-91.

Malaisse WJ., Malaisse-Lagae F., Sener A (1984). The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release metabolic interaction of L-asparagine and L-leucine in pancreatic islets. *Biochimica et biophysica acta* **797**: 194-202.

Malaisse WJ., Sener A., Carpinelli AR., Anjaneyulu K., Lebrun P., Herchuelz A., Christophe J (1980). The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XLVI. Physiological role of L-glutamine as a fuel for pancreatic islets. *Molecular and cellular endocrinology* **20**: 171-189.

Marieb EN., Hoehn K (2005). *Human Anatomy and Physiology*. edn, vol. 7 edition. Pearson.

Marrari Y., Crouthamel M., Irannejad R., Wedegaertner PB (2007). Assembly and trafficking of heterotrimeric G proteins. *Biochemistry* **46**: 7665-7677.

McDermott AM., Sharp GW (1993). Inhibition of insulin secretion: a fail-safe system. *Cellular signalling* **5**: 229-234.

McGarry JD (2002). Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* **51**: 7-18.

McKenna NJ., O'Malley BW (2001). Nuclear receptors, coregulators, ligands, and selective receptor modulators: making sense of the patchwork quilt. *Annals of the New York Academy of Sciences* **949**: 3-5.

Metzger D., Chambon P (2001). Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods (San Diego, Calif.)* **24**: 71-80.

Minokoshi Y., Kahn CR., Kahn BB (2003). Tissue-specific ablation of the GLUT4 glucose transporter or the insulin receptor challenges assumptions about insulin action and glucose homeostasis. *The Journal of biological chemistry* **278**: 33609-33612.

Mutschler E., Schaible H-G., Vaupel P (2007). *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen : 140 Tabellen*. 6., völlig überarb. und erw. Aufl. edn. Wiss. Verl.-Ges.: Stuttgart.

- Nagy A (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* **26**: 99-109.
- Nagy A., Mar L., Watts G (2009). Creation and use of a cre recombinase transgenic database. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **530**: 365-378.
- Newsholme P., Bender K., Kiely A., Brennan L (2007). Amino acid metabolism, insulin secretion and diabetes. *Biochemical Society transactions* **35**: 1180-1186.
- Nolan AL., O'Dowd JF (2009). The measurement of insulin secretion from isolated rodent islets of Langerhans. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **560**: 43-51.
- Novakovic A (2013). Expression und Funktion von G α i-Proteinen in Entzündungszellen.
- Nürnberg B (2004). Classification and functional properties of G proteins. The nature reviews drug discovery GPCR questionnaire participants. In: The state of GPCR research in 2004. . *Nature reviews. Drug discovery* **3**: 575-626.
- Nürnberg B (1997). Pertussis toxin as a Cell Biology Tool. . In: *Aktories, K.(Ed.), Bacterial toxins. Chapman & Hall, London.*
- Nürnberg B., Ahnert-Hilger G (1996). Potential roles of heterotrimeric G proteins of the endomembrane system. *FEBS letters* **389**: 61-65.
- Nürnberg B., Gudermann T., Schultz G (1995). Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **73**: 123-132.
- Offermanns S., Hashimoto K., Watanabe M., Sun W., Kurihara H., Thompson RF., Inoue Y., Kano M., Simon MI (1997). Impaired motor coordination and persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking G α_q . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 14089-14094.
- Ohman L., Franzen L., Rudolph U., Harriman GR., Hultgren Hornquist E (2000). Immune activation in the intestinal mucosa before the onset of colitis in G α_{i2} -deficient mice. *Scandinavian journal of immunology* **52**: 80-90.
- Oldham WM., Hamm HE (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**: 60-71.
- Oya M., Kitaguchi T., Pais R., Reimann F., Gribble F., Tsuboi T (2013). The G protein-coupled receptor family C group 6 subtype A (GPC6A) receptor is involved in amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *The Journal of biological chemistry* **288**: 4513-4521.
- Pace CS., Stillings SN., Hover BA., Matschinsky FM (1975). Electrical and secretory manifestations of glucose and amino acid interactions in rat pancreatic islets. *Diabetes* **24**: 489-496.

Pagliari AS., Stillings SN., Hover B., Martin DM., Matschinsky FM (1974). Glucose modulation of amino acid-induced glucagon and insulin release in the isolated perfused rat pancreas. *The Journal of clinical investigation* **54**: 819-832.

Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke CA., Motoshima H., Fox BA., Le Trong I., Teller DC., Okada T., Stenkamp RE., Yamamoto M., Miyano M (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science (New York, N.Y.)* **289**: 739-745.

Parker MG (1993). Steroid and related receptors. *Current opinion in cell biology* **5**: 499-504.

Pfeuffer T (1977). GTP-binding proteins in membranes and the control of adenylate cyclase activity. *The Journal of biological chemistry* **252**: 7224-7234.

Pi M., Chen L., Huang MZ., Zhu W., Ringhofer B., Luo J., Christenson L., Li B., Zhang J., Jackson PD., Faber P., Brunden KR., Harrington JJ., Quarles LD (2008). GPRC6A null mice exhibit osteopenia, feminization and metabolic syndrome. *PLoS one* **3**: e3858.

Pi M., Faber P., Ekema G., Jackson PD., Ting A., Wang N., Fontilla-Poole M., Mays RW., Brunden KR., Harrington JJ., Quarles LD (2005). Identification of a novel extracellular cation-sensing G-protein-coupled receptor. *The Journal of biological chemistry* **280**: 40201-40209.

Pi M., Parrill AL., Quarles LD (2010). GPRC6A mediates the non-genomic effects of steroids. *The Journal of biological chemistry* **285**: 39953-39964.

Pi M., Wu Y., Lenchik NI., Gerling I., Quarles LD (2012). GPRC6A mediates the effects of L-arginine on insulin secretion in mouse pancreatic islets. *Endocrinology* **153**: 4608-4615.

Pi M., Wu Y., Quarles LD (2011). GPRC6A mediates responses to osteocalcin in β -cells in vitro and pancreas in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **26**: 1680-1683.

Picinato MC., Haber EP., Carpinelli AR., Cipolla-Neto J (2002). Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *Journal of pineal research* **33**: 172-177.

Plummer NW., Spicher K., Malphurs J., Akiyama H., Abramowitz J., Nürnberg B., Birnbaumer L (2012). Development of the mammalian axial skeleton requires signaling through the $G\alpha_i$ subfamily of heterotrimeric G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 21366-21371.

Polonsky KS., Pugh W., Jaspan JB., Cohen DM., Karrison T., Tager HS., Rubenstein AH (1984). C-peptide and insulin secretion. Relationship between peripheral concentrations of C-peptide and insulin and their secretion rates in the dog. *The Journal of clinical investigation* **74**: 1821-1829.

- Porte D, Jr. (1967). A receptor mechanism for the inhibition of insulin release by epinephrine in man. *The Journal of clinical investigation* **46**: 86-94.
- Prado CL., Pugh-Bernard AE., Elghazi L., Sosa-Pineda B., Sussel L (2004). Ghrelin cells replace insulin-producing β cells in two mouse models of pancreas development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 2924-2929.
- Rasmussen SG., Choi HJ., Fung JJ., Pardon E., Casarosa P., Chae PS., Devree BT., Rosenbaum DM., Thian FS., Kobilka TS., Schnapp A., Konetzki I., Sunahara RK., Gellman SH., Pautsch A., Steyaert J., Weis WI., Kobilka BK (2011). Structure of a nanobody-stabilized active state of the β_2 adrenoceptor. *Nature* **469**: 175-180.
- Rasmussen SG., Choi HJ., Rosenbaum DM., Kobilka TS., Thian FS., Edwards PC., Burghammer M., Ratnala VR., Sanishvili R., Fischetti RF., Schertler GF., Weis WI., Kobilka BK (2007). Crystal structure of the human β_2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**: 383-387.
- Regard JB., Kataoka H., Cano DA., Camerer E., Yin L., Zheng YW., Scanlan TS., Hebrok M., Coughlin SR (2007). Probing cell type-specific functions of Gi in vivo identifies GPCR regulators of insulin secretion. *The Journal of clinical investigation* **117**: 4034-4043.
- Reimer MK., Pacini G., Ahren B (2003). Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology* **144**: 916-921.
- Rhee SG (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annual review of biochemistry* **70**: 281-312.
- Rorsman P (1988). Two types of Ca^{2+} currents with different sensitivities to organic Ca^{2+} channel antagonists in guinea pig pancreatic α_2 cells. *The Journal of general physiology* **91**: 243-254.
- Rorsman P., Braun M., Zhang Q (2012). Regulation of calcium in pancreatic α - and β -cells in health and disease. *Cell calcium* **51**: 300-308.
- Rorsman P., Eliasson L., Renstrom E., Gromada J., Barg S., Gopel S (2000). The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* **15**: 72-77.
- Ross EM., Gilman AG (1977). Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. *The Journal of biological chemistry* **252**: 6966-6969.
- Ross EM., Wilkie TM (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annual review of biochemistry* **69**: 795-827.
- Rudolph U., Finegold MJ., Rich SS., Harriman GR., Srinivasan Y., Brabet P., Boulay G., Bradley A., Birnbaumer L (1995). Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in $G\alpha_{i2}$ -deficient mice. *Nature genetics* **10**: 143-150.

- Rudolph U., Spicher K., Birnbaumer L (1996). Adenylyl cyclase inhibition and altered G protein subunit expression and ADP-ribosylation patterns in tissues and cells from $G_{i2\alpha-/-}$ mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 3209-3214.
- Salehi A., Chen D., Hakanson R., Nordin G., Lundquist I (1999). Gastrectomy induces impaired insulin and glucagon secretion: evidence for a gastro-insular axis in mice. *The Journal of physiology* **514 (Pt 2)**: 579-591.
- Sander M., German MS (1997). The β cell transcription factors and development of the pancreas. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **75**: 327-340.
- Sauer B., Henderson N (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 5166-5170.
- Savontaus E., Fagerholm V., Rahkonen O., Scheinin M (2008). Reduced blood glucose levels, increased insulin levels and improved glucose tolerance in α_{2A} -adrenoceptor knockout mice. *European journal of pharmacology* **578**: 359-364.
- Schmidt A., Hescheler J., Offermanns S., Spicher K., Hinsch KD., Klinz FJ., Codina J., Birnbaumer L., Gausepohl H., Frank R., et al. (1991). Involvement of pertussis toxin-sensitive G-proteins in the hormonal inhibition of dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} currents in an insulin-secreting cell line (RINm5F). *The Journal of biological chemistry* **266**: 18025-18033.
- Schnuerer EM., McDonald TJ., Dupre J (1987). Inhibition of insulin release by galanin and gastrin-releasing peptide in the anaesthetized rat. *Regulatory peptides* **18**: 307-320.
- Schulz A., Hasselblatt A (1989). Dual action of clonidine on insulin release: suppression, but stimulation when α_2 -adrenoceptors are blocked. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **340**: 712-714.
- Schulz N., Kluth O., Jastroch M., Schürmann A (2013). Minor role of mitochondrial respiration for fatty-acid induced insulin secretion. *International journal of molecular sciences* **14**: 18989-18998.
- Schwindinger WF., Robishaw JD (2001). Heterotrimeric G-protein $\beta\gamma$ -dimers in growth and differentiation. *Oncogene* **20**: 1653-1660.
- Seaquist ER., Walseth TF., Redmon JB., Robertson RP (1994). G-protein regulation of insulin secretion. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **123**: 338-345.
- Sebastian S., Ang R., Abramowitz J., Weinstein LS., Chen M., Ludwig A., Birnbaumer L., Tinker A (2013). The in vivo regulation of heart rate in the murine sinoatrial node by stimulatory and inhibitory heterotrimeric G proteins. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **305**: R435-442.

- Sener A., Dunlop ME., Gomis R., Mathias PC., Malaisse-Lagae F., Malaisse WJ (1985). Role of transglutaminase in insulin release. Study with glycine and sarcosine methylesters. *Endocrinology* **117**: 237-242.
- Sener A., Malaisse WJ (2002). The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release. Insulinotropic action of L-alanine. *Biochimica et biophysica acta* **1573**: 100-104.
- Shao J., Yamashita H., Qiao L., Friedman JE (2000). Decreased Akt kinase activity and insulin resistance in C57BL/KsJ-Leprdb/db mice. *The Journal of endocrinology* **167**: 107-115.
- Sharp GW (1996). Mechanisms of inhibition of insulin release. *The American journal of physiology* **271**: C1781-1799.
- Shen Y., Rampino MA., Carroll RC., Nawy S (2012). G-protein-mediated inhibition of the Trp channel TRPM1 requires the G $\beta\gamma$ dimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 8752-8757.
- Simon MI., Strathmann MP., Gautam N (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science (New York, N.Y.)* **252**: 802-808.
- Smith PA., Sakura H., Coles B., Gummerson N., Proks P., Ashcroft FM (1997). Electrogenic arginine transport mediates stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic β -cells. *The Journal of physiology* **499 (Pt 3)**: 625-635.
- Smrcka AV (2008). G protein $\beta\gamma$ subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**: 2191-2214.
- Sondek J., Bohm A., Lambright DG., Hamm HE., Sigler PB (1996). Crystal structure of a G-protein $\beta\gamma$ dimer at 2.1Å resolution. *Nature* **379**: 369-374.
- Spicher K., Hinsch KD., Gausepohl H., Frank R., Rosenthal W., Schultz G (1988). Immunochemical detection of the α -subunit of the G-protein, G $_z$, in membranes and cytosols of mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* **157**: 883-890.
- Sprang SR (1997). G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annual review of biochemistry* **66**: 639-678.
- Stefan Y., Orci L., Malaisse-Lagae F., Perrelet A., Patel Y., Unger RH (1982). Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes* **31**: 694-700.
- Sternweis PC (1986). The purified alpha subunits of G $_o$ and G $_i$ from bovine brain require $\beta\gamma$ for association with phospholipid vesicles. *The Journal of biological chemistry* **261**: 631-637.
- Strathmann M., Simon MI (1990). G protein diversity: a distinct class of α subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 9113-9117.

Sunahara RK., Dessauer CW., Gilman AG (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annual review of pharmacology and toxicology* **36**: 461-480.

Suzuki N., Nakamura S., Mano H., Kozasa T (2003). $G\alpha_{12}$ activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 733-738.

Tang G., Wang Y., Park S., Bajpayee NS., Vi D., Nagaoka Y., Birnbaumer L., Jiang M (2012). G_{o2} G protein mediates galanin inhibitory effects on insulin release from pancreatic β cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 2636-2641.

Toyota T., Kakizaki M., Kimura K., Yajima M., Okamoto T., Ui M (1978). Islet activating protein (IAP) derived from the culture supernatant fluid of Bordetella pertussis: effect on spontaneous diabetic rats. *Diabetologia* **14**: 319-323.

Trumper A., Trumper K., Trusheim H., Arnold R., Goke B., Horsch D (2001). Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for β (INS-1) cells by pleiotropic signaling. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **15**: 1559-1570.

Turinsky J., Damrau-Abney A (1999). Akt kinases and 2-deoxyglucose uptake in rat skeletal muscles in vivo: study with insulin and exercise. *The American journal of physiology* **276**: R277-282.

Ullrich S., Prentki M., Wollheim CB (1990). Somatostatin inhibition of Ca^{2+} -induced insulin secretion in permeabilized HIT-T15 cells. *The Biochemical journal* **270**: 273-276.

Ustyugova IV., Zhi L., Abramowitz J., Birnbaumer L., Wu MX (2012). IEX-1 deficiency protects against colonic cancer. *Molecular cancer research : MCR* **10**: 760-767.

Valenzuela D., Han X., Mende U., Fankhauser C., Mashimo H., Huang P., Pfeiffer J., Neer EJ., Fishman MC (1997). $G\alpha_o$ is necessary for muscarinic regulation of Ca^{2+} channels in mouse heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 1727-1732.

Vanderbeld B., Kelly GM (2000). New thoughts on the role of the $\beta\gamma$ subunit in G-protein signal transduction. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **78**: 537-550.

Vanhaesebroeck B., Leervers SJ., Ahmadi K., Timms J., Katso R., Driscoll PC., Woscholski R., Parker PJ., Waterfield MD (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annual review of biochemistry* **70**: 535-602.

Vassilatis DK., Hohmann JG., Zeng H., Li F., Ranchalis JE., Mortrud MT., Brown A., Rodriguez SS., Weller JR., Wright AC., Bergmann JE., Gaitanaris GA (2003). The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 4903-4908.

- Verspohl EJ., Herrmann K (1996). Involvement of G proteins in the effect of carbachol and cholecystokinin in rat pancreatic islets. *The American journal of physiology* **271**: E65-72.
- Vignali S., Leiss V., Karl R., Hofmann F., Welling A (2006). Characterization of voltage-dependent sodium and calcium channels in mouse pancreatic A- and B-cells. *The Journal of physiology* **572**: 691-706.
- Wang Y., Park S., Bajpayee NS., Nagaoka Y., Boulay G., Birnbaumer L., Jiang M (2011). Augmented glucose-induced insulin release in mice lacking $G_{\alpha_{i2}}$, but not $G_{\alpha_{i1}}$ or G_i proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 1693-1698.
- Warnotte C., Gilon P., Nenquin M., Henquin JC (1994). Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids. A study of palmitate effects in mouse β -cells. *Diabetes* **43**: 703-711.
- Watts VJ., Neve KA (2005). Sensitization of adenylate cyclase by $G_{\alpha_{i10}}$ -coupled receptors. *Pharmacology & therapeutics* **106**: 405-421.
- Wellendorph P., Hansen KB., Balsgaard A., Greenwood JR., Egebjerg J., Brauner-Osborne H (2005). Deorphanization of GPRC6A: a promiscuous L- α -amino acid receptor with preference for basic amino acids. *Molecular pharmacology* **67**: 589-597.
- Wess J (1997). G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **11**: 346-354.
- Wettschureck N., Offermanns S (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological reviews* **85**: 1159-1204.
- Wickman K., Nemeč J., Gendler SJ., Clapham DE (1998). Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron* **20**: 103-114.
- Wicksteed B., Brissova M., Yan W., Opland DM., Plank JL., Reinert RB., Dickson LM., Tamarina NA., Philipson LH., Shostak A., Bernal-Mizrachi E., Elghazi L., Roe MW., Labosky PA., Myers MG, Jr., Gannon M., Powers AC., Dempsey PJ (2010). Conditional gene targeting in mouse pancreatic β -cells: analysis of ectopic Cre transgene expression in the brain. *Diabetes* **59**: 3090-3098.
- Wiege K., Ali SR., Gewecke B., Novakovic A., Konrad FM., Pexa K., Beer-Hammer S., Reutershan J., Piekorz RP., Schmidt RE., Nürnberg B., Gessner JE (2013). $G_{\alpha_{i2}}$ is the essential G_{α_i} protein in immune complex-induced lung disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **190**: 324-333.
- Wiege K., Le DD., Syed SN., Ali SR., Novakovic A., Beer-Hammer S., Piekorz RP., Schmidt RE., Nürnberg B., Gessner JE (2012). Defective macrophage migration in $G_{\alpha_{i2}}$ - but not $G_{\alpha_{i3}}$ -deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **189**: 980-987.

- Wierup N., Svensson H., Mulder H., Sundler F (2002). The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regulatory peptides* **107**: 63-69.
- Wilkie TM., Scherle PA., Strathmann MP., Slepak VZ., Simon MI (1991). Characterization of G-protein α subunits in the G_q class: expression in murine tissues and in stromal and hematopoietic cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 10049-10053.
- Wilkie TM., Yokoyama S (1994). Evolution of the G protein α subunit multigene family. *Society of General Physiologists series* **49**: 249-270.
- Wolf BA., Pasquale SM., Turk J (1991). Free fatty acid accumulation in secretagogue-stimulated pancreatic islets and effects of arachidonate on depolarization-induced insulin secretion. *Biochemistry* **30**: 6372-6379.
- Wolf BA., Turk J., Sherman WR., McDaniel ML (1986). Intracellular Ca^{2+} mobilization by arachidonic acid. Comparison with myo-inositol 1,4,5-trisphosphate in isolated pancreatic islets. *The Journal of biological chemistry* **261**: 3501-3511.
- Wolfe JT., Wang H., Howard J., Garrison JC., Barrett PQ (2003). T-type calcium channel regulation by specific G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* **424**: 209-213.
- Wong GT., Gannon KS., Margolskee RF (1996). Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature* **381**: 796-800.
- Yajima M., Takahashi I., Kurokawa S., Nakase Y., Ui M (1978). Purification, characterization and biological activity of islets activating protein (IAP) from the supernatant fluids of Bordetella pertussis cultures [proceedings]. *Japanese journal of medical science & biology* **31**: 174-177.
- Yang J., Wu J., Kowalska MA., Dalvi A., Prevost N., O'Brien PJ., Manning D., Poncz M., Lucki I., Blendy JA., Brass LF (2000). Loss of signaling through the G protein, G_z , results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 9984-9989.
- Yu S., Yu D., Lee E., Eckhaus M., Lee R., Corria Z., Accili D., Westphal H., Weinstein LS (1998). Variable and tissue-specific hormone resistance in heterotrimeric G_s protein α -subunit ($G_{s\alpha}$) knockout mice is due to tissue-specific imprinting of the $G_{s\alpha}$ gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 8715-8720.
- Zhang GF., Patton WA., Moss J., Vaughan M (1997). Cholera toxin: mechanism of action and potential use in vaccine development. In: *Aktories, K.(Ed.), Bacterial toxins. Chapman & Hall, London*: 1-13.
- Zhang H., Yasrebi-Nejad H., Lang J (1998). G-protein $\beta\gamma$ -binding domains regulate insulin exocytosis in clonal pancreatic β -cells. *FEBS letters* **424**: 202-206.

- Zhang T., Li C (2013). Mechanisms of amino acid-stimulated insulin secretion in congenital hyperinsulinism. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **45**: 36-43.
- Zhao A., Ohara-Imaizumi M., Brissova M., Benninger RK., Xu Y., Hao Y., Abramowitz J., Boulay G., Powers AC., Piston D., Jiang M., Nagamatsu S., Birnbaumer L., Gu G (2010a). $G\alpha_o$ represses insulin secretion by reducing vesicular docking in pancreatic β -cells. *Diabetes* **59**: 2522-2529.
- Zhao Y., Fang Q., Straub SG., Lindau M., Sharp GW (2010b). Hormonal inhibition of endocytosis: novel roles for noradrenaline and G protein G_z . *The Journal of physiology* **588**: 3499-3509.
- Zhao Y., Fang Q., Straub SG., Lindau M., Sharp GW (2010c). Noradrenaline inhibits exocytosis via the G protein $\beta\gamma$ subunit and refilling of the readily releasable granule pool via the $\alpha_{i1/2}$ subunit. *The Journal of physiology* **588**: 3485-3498.
- Zhao Y., Fang Q., Straub SG., Sharp GW (2008). Both G_i and G_o heterotrimeric G proteins are required to exert the full effect of norepinephrine on the β -cell K_{ATP} channel. *The Journal of biological chemistry* **283**: 5306-5316.
- Zuberi Z., Birnbaumer L., Tinker A (2008). The role of inhibitory heterotrimeric G proteins in the control of in vivo heart rate dynamics. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **295**: R1822-1830.
- Zuberi Z., Nobles M., Sebastian S., Dyson A., Lim SY., Breckenridge R., Birnbaumer L., Tinker A (2010). Absence of the inhibitory G-protein $G\alpha_{i2}$ predisposes to ventricular cardiac arrhythmia. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology* **3**: 391-400.

7 Anhang

7.1.1 Antikörper

7.1.1.1 Primärantikörper

Tabelle 7.1: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper.

Antikörper	Spezies	Verwendung (Verdünnung)	Quelle
Anti- α -Tubulin	Maus	IB (1:4000)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Anti- β -Aktin	Maus	IB (1:4000- 1:40000)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Anti-G α_{i2}	Kaninchen	IB (1:5000-20000) IF (1:500)	(Wiege <i>et al.</i> , 2012)
Anti-G α_{i3}	Kaninchen	IB (1:5000-8000)	(Gohla <i>et al.</i> , 2007b)
Anti-G α_q	Kaninchen	IB: (1:1000)	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg
Anti-G α_s	Kaninchen	IB (1:1000)	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg
Anti-G β_{common}	Kaninchen	IB (1:5000-8000)	(Leopoldt <i>et al.</i> , 1997)
Anti-Glukagon	Maus	IF (1:2000)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Anti-Insulin	Meerschweinchen	IF (1:3000)	DAKO, Hamburg
Anti-Akt	Kaninchen	IB (1-2500-1:5000)	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-p-Akt ₄₇₃	Kaninchen	IB: (1:500)	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-PCNA	Maus	IF (1:1000)	Abcam, Cambridge, UK

7.1.1.2 Sekundärantikörper

Tabelle 7.2: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Verwendung (Verdünnung)	Quelle
Anti-Maus IgG HRP-konjugiert	Kaninchen	IB (1:2000)	DAKO, Hamburg
Anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert	Ziege	IB (1:2000)	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-Kaninchen IgG AlexaFluor® 488-konjugiert	Ziege	IF (1:200)	Invitrogen™ Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Anti-Meerschweinchen Cy3-konjugiert	Ziege	IF (1:200)	Jackson Immuno Research Lab., West Grove, USA
Anti-Maus IgG Cy2-konjugiert	Ziege	IF (1:200)	Jackson Immuno Research Lab., West Grove, USA
Anti-Maus IgG AlexaFluor® 633-konjugiert	Ziege	IF (1:200)	Invitrogen™ Life Technologies GmbH, Karlsruhe

7.1.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers, Ulm bezogen.

Tabelle 7.3: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.

Mauslinie	Primer	Sequenz	PCR-Produkt
$G\alpha_{i2}$	i2wtF	5'-gat cat cca tga aga tgg cta ctc aga ag-3'	wt: 805 bp ko: 509 bp
	i2wtR	5'-ccc ctc tca ctc ttg att tcc tac tga cac-3'	
	i2koF	5'-cag gat cat cca tga aga tgg cta c-3'	
	i2koR	5'-gca ctc aaa ccg agg act tac aga ac-3'	
$G\alpha_{i2}$ flox	i2floxR	5'-ggc tat gat ccc aaa act ccc cg-3'	wt: 1952 flox: 2222 ko: 390
	i2floxF2	5'-gtg gta agc ctg tgt ttg tga gag-3'	
Rip-Cre	RipF RipR	5'-taa ggc taa gta gag gtg t-3' 5'-tcc atg gtg ata caa ggg ac-3'	tg: 350

I. Eigene Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Leiss V., Flockerzie K., Novakovic A., Rath M., Schönsiegel A., Birnbaumer L., Schürmann A., Harteneck C., Nürnberg B (2014). Insulin secretion stimulated by arginine and its metabolite ornithine depends on $G_{\alpha_{i2}}$. DOI: 10.1152/ajpendo.00337.2014

Sausbier U., Dullin C., Missbach-Guentner J., Kabagema C., Flockerzie K., Kuscher GM., Stuehmer W., Neuhuber W., Ruth P., Alves F., Sausbier M (2011). Osteopenia due to enhanced cathepsin K release by BK channel ablation in osteoclasts. PloS one 6: e21168.

Kongressbeiträge

Leiss V., Flockerzie K., Birnbaumer, L., Schürmann A., Nürnberg B. Pancreatic β -cell $G_{\alpha_{i2}}$ stimulates insulin secretion, 03/2014, DGPT Jahrestagung, Hannover, Deutschland (Poster)

Leiss V., Flockerzie K., Schürmann A., Nürnberg B. G_{α_i} proteins as regulators of glucose homeostasis. Prediabetes, Diabetes, and Secondary Complications, 04/2013, Dife-Symposium, Nuthetal, Deutschland (Poster)

Leiss V., Flockerzie K., Lösle, M., Birnbaumer, L., Schürmann A., Nürnberg B. Role of islet $G_{\alpha_{i2}}$ in regulating glucose homeostasis, 03/2013, DGPT Jahrestagung, Halle, Deutschland (Vortrag)

Leiss V., Flockerzie K., Lösle, M., Birnbaumer, L., Schürmann A., Nürnberg B. Role of islet $G_{\alpha_{i2}}$ in the regulation of glucose homeostasis, Keystone Symposia Diabetes New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment, 02/2013, Keystone, Colorado, USA (Vortrag & Poster)

Leiss V., Flockerzie K., Schürmann A., Nürnberg B. $G\alpha_i$ proteins are involved in the regulation of glucose homeostasis, EMBO|EMBL Symposium Diabetes and Obesity, 09/2012, Heidelberg, Deutschland (Poster)

Flockerzie K., Leiss V., Nürnberg B. The role of the $G\alpha_{i2}$ -signalling pathway in the pancreatic β -cell. Joint Meeting of the IRTG 1302 and IRTG 880, 05/2012, Schloss Maurach, Uhdingen-Mühlhofen, Deutschland (Vortrag & Poster)

Leiss V., Flockerzie K., Schürmann A., Nürnberg B. $G\alpha_{i2}$ proteins are negative regulators of glucose homeostasis, 03/2012, DGPT Jahrestagung, Dresden, Deutschland (Vortrag)

Leiss V., Flockerzie K., Schürmann A., Nürnberg B. Role of the heterotrimeric $G\alpha_{i2}$ protein in glucose homeostasis, 10/2011, 36th European Symposium on Hormones and Cell Regulation, Mont Ste Odile, Frankreich (Poster)

Flockerzie K., Leiss V., Nürnberg B. The role of the $G\alpha_{i2}/PI3K\ \gamma$ signalling pathway in the pancreatic β -cell. Spring Retreat GRK1302, 03/2011, Blaubeuren, Deutschland (Vortrag)

Flockerzie K., Kurig B., Shymanets A., Bohnacker T., Prajwal, Wymann M., Nürnberg B. Assigning isoform-specificity within class IB Phosphoinositide 3-kinase γ signaling. International DFG-Meeting Functional compartmentalization of PIP_2 -signaling, 09/2010, Schloss Reisenburg, Günzburg, Deutschland (Poster)

II. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der elektronischen Fassung aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

III. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg möchte ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, seine Betreuung, sowie für zahlreiche Anregungen und Diskussionen danken.

Herrn Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff danke ich für seine Bereitschaft, die vorliegende Arbeit am Fachbereich Biochemie der Eberhard Karls Universität Tübingen zu vertreten.

JProf. Dr. Robert Lukowski und Prof. Dr. Dirk Schwarzer danke ich, dass sie sich als Prüfer zur Verfügung gestellt haben.

Mein weiterer Dank gilt:

Ganz besonders Dr. Veronika Leiss, die mich jederzeit vorbehaltlos unterstützt und so maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat. Von ihrem umfassenden Wissen hat sie so viel an mich weitergegeben. Danke dafür, sowie für das kritische Lesen meiner Arbeit und für so viele lustige Stunden im und außerhalb des LMB. Ich habe in Dir nicht nur eine tolle Betreuerin, sondern auch eine Freundin gefunden.

Dr. Ana Novakovic für die Hilfsbereitschaft im Labor, die vielen fachlichen und fachfremden Diskussionen, die interessanten Emails und ihre Freundschaft.

PD Dr. Sandra Beer-Hammer für die Bereitschaft meine Arbeit Korrektur zu lesen.

Dr. Barbara Reichenbach für die Einführung in molekularbiologische und zellbiologische Arbeitstechniken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft bei auftretenden Fragen und Problemen.

Meinen Freundinnen Dr. Lea Bleier für ihr immer offenes Ohr und die guten Tipps, Kerstin Beier für die lustigen Samstagnachmittage, Jule Kirschmer für die (Lauf-) Treffen und Gespräche, Ariane Büschgen für die langjährige Freundschaft.

Meinen Eltern für Ihre Liebe und bedingungslose Unterstützung. Danke, dass ihr uns Kinder zu eigenständigen Menschen erzogen und immer das Gefühl gegeben habt das Wichtigste zu sein! Simon und Miri ihr seid die besten Geschwister der Welt!

Tobias Kudlacek für seine Liebe und sein Verständnis, die ermutigenden Worte nach einem langen Tag. Danke für die gemeinsamen Jahre und die schönen Momente mit Dir!