

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und  
Pharmakogenomik der Universität Tübingen,  
Abteilung für Pharmakologie, Experimentelle Therapie und Toxikologie

Direktor: Professor Dr. Dr. B. Nürnberg

## **Phänotypisierung einer Myf5-Cre medierten Deletion von $G\alpha_{i2}$**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von Florian Brüggemann,  
geb. Kämmler

2023

Dekan: Prof. Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. B. Nürnberg  
2. Berichterstatter: PD Dr. T. Ott

Tag der Disputation: 21.09.2023

# Inhaltsverzeichnis

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	ALLGEMEINE PRINZIPIEN DER ZELLULÄREN KOMMUNIKATION.....	1
1.2	G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN.....	3
1.3	G-PROTEINE .....	5
1.4	KONDITIONALE GENDELETION IM MAUSMODELL.....	8
1.5	GLUKOSEHOMÖOSTASE .....	10
1.5.1	Die Rolle von Insulin und Glukagon.....	10
1.5.2	Die Rolle von Splanchnikusgebiet und peripheren Geweben bei der Blutglukoseregulation .....	13
1.5.3	Diabetes mellitus als Ausdruck einer pathologischen Glukose- homöostase .....	16
1.6	SKELETTMUSKELHOMÖOSTASE .....	18
1.7	DIE FUNKTION VON $G\alpha_i$ -PROTEINEN BEI DER BLUTZUCKER-REGULIERUNG UND IN SKELETTMUSKELZELLEN.....	19
1.8	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	23
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>25</b>
2.1	MATERIAL .....	25
2.2	METHODEN .....	25
2.2.1	Transgene Mauslinie .....	25
2.2.2	Gewebespezifische $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse .....	26
2.2.3	Genotypisierung.....	27
2.2.4	Rekombinationsanalyse .....	28
2.2.5	Gewebeentnahme und Bestimmung von Muskel- und Organgewichten.....	33
2.2.6	Proteinbiochemische Methoden.....	33
2.2.7	Histologische Methoden .....	38
2.2.8	Insulin-ELISA .....	39
2.2.9	<i>In vivo</i> Analyse der Mäuse nach Myf5-Cre vermittelter Deletion von $G\alpha_{i2}$ .....	40
2.2.10	Statistische Methoden .....	41
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>42</b>
3.1	WURFANALYSE.....	42
3.2	GEWICHTSVERLAUF .....	44
3.3	HISTOLOGISCHE SKELETTMUSKELMORPHOLOGIE.....	52
3.4	INTRAPERITONEALER GLUKOSETOLERANZTEST .....	56
3.5	INTRAPERITONEALER INSULINTOLERANZTEST .....	59
3.6	REKOMBINATIONSANALYSE AUF DNS-EBENE .....	60
3.7	EXPRESSIONSANALYSE.....	63

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>66</b>
4.1	GENERIERUNG EINER SKELETTMUSKELSPEZIFISCHEN GENDELETION .....	67
4.2	EINFLUSS EINER MYF5-CRE-MEDIERTEN GENDELETION AUF DIE GLUKOSEHOMÖOSTASE .....	71
4.3	EINFLUSS EINER MYF5-CRE-MEDIERTEN DELETION VON $G_{\alpha 12}$ AUF DAS GESAMTKÖRPERGEWICHT .....	72
4.4	DIE ROLLE VON $G_{\alpha 12}$ BEI DER SKELETTMUSKELHOMÖOSTASE .....	73
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL</b> .....	<b>92</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>93</b>

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1: Aktivierung eines G-Proteins.....	7
Abbildung 2: Generierung einer konditionalen Gendeletion mit Hilfe des Cre-LoxP-Systems .....	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Signaltransduktion durch den Glukagonrezeptor .....	11
Abbildung 4: Von Adipozyten sezernierte Hormone mit Effekt auf die Glukosehomöostase.....	15
Abbildung 5: Intrazelluläre Signalkaskaden im Skelettmuskel nach $G\alpha_{i2}$ -gekoppelter Rezeptoraktivierung .....	20
Abbildung 6: Reproduktionsanalyse nach Verpaarung von $G\alpha_{i2}^{fl/fl}$ (■)- und $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$ (■)- Mäusen .....	43
Abbildung 7: Durchschnittliches Körpergewicht im zeitlichen Verlauf .....	45
Abbildung 8: Divergenz des Körpergewichtes der $G\alpha_{i2}^{fl/fl}$ - und $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$ -Kohorte im zeitlichen Verlauf .....	46
Abbildung 9: Darstellung der entnommenen Muskeln (A) und deren Gewicht im zeitlichen Verlauf (A-E).....	48
Abbildung 10: Darstellung der relativen Muskelmasse im Alter von 20, 31 und 65 Wochen.....	49
Abbildung 11: Darstellung der absoluten Organgewichte im Alter von 20, 31 und 65 Wochen.....	51
Abbildung 12: Tägliche Futtermenge .....	52
Abbildung 13: HE-Färbung von Muskelschnitten der Mm. gastrocnemius und tibialis anterior.....	53
Abbildung 14: Muskelfaserdurchschnitte von M. gastrocnemius und M. tibialis anterior .....	55
Abbildung 15: Intraperitonealer Glukosetoleranztest im Alter von acht bzw. 20 Wochen .....	57
Abbildung 16: Gegenüberstellung des (A) Blutglukose- und (B) Insulinspiegels im intraperitonealen Glukosetoleranztest im Alter von 20 Wochen .....	58
Abbildung 17: Intraperitonealer Insulintoleranztest im Alter von 10 (A&C) bzw. 22 (B&D) Wochen.....	59
Abbildung 18: Rekombinationsanalyse mittels PCR .....	62
Abbildung 19: Expressionsanalyse von $G\alpha_{i2}$ im Skelettmuskel von skelettmuskelspezifisch $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen ( $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$ ) und Kontrolltieren ( $G\alpha_{i2}^{fl/fl}$ ) .....	64

## Abkürzungsverzeichnis

---

%	Prozent	dNTP	Desoxynukleosid-triphosphat
°C	Grad Celsius	dTTP	Desoxythymidin-triphosphat
4EBP1	factor-4E-binding-protein (Faktor 4E-bindendes Protein)	ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Enzymimmunoassay)
5'-AMPK	5'AMP-Kinase	G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
Akt	Aktin	GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
AMP	Adenosinmonophosphat	GDP	Guanosindiphosphat
AMPK	AMP-aktivierte Protein-Kinase	GLUT	Glukosetransporter
APS	Ammoniumperoxidsulfat	GPCR	G-protein-coupled receptor (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
bp	base pair (Basenpaar)	GSK3 $\beta$	Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$
BSA	Bovines Serum Albumin	GTP	Guanosintriphosphat
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion	GTPase	Guanosintriphosphatase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	H <sup>+</sup>	Wasserstoff-Ion
CCD	Charged Coupled Device (ladungsgekoppeltes Gerät)	H <sub>2</sub> O	Wasser
cm	Zentimeter	HCl	Chlorwasserstoff
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid	HDAC4	Histondeacetylase 4
Cre	cyclization recombination enzyme (Zyklisierungs-Rekombinations-Enzym)	HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
dATP	Desoxyadenosin-triphosphat	IGF	Insulin-like growth-factor (Insulinartiger Wachstumsfaktor)
dCTP	Desoxycytidin-triphosphat	IL	Interleukin
dGTP	Desoxyguanosin-triphosphat	IRS	Insulin Rezeptor Substrat
dl	Deziliter	kb	Kilobyte
DNA	Deoxyribonucleic acid	kg	Kilogramm
DNS	Desoxyribonukleinsäure		

## Abkürzungsverzeichnis

---

l	Liter	PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
loxP	locus of X-over P1	PKA	Proteinkinase A
mA	Milli-Ampere	PKB	Proteinkinase B
MAP-Kinase	mitogen activated protein kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)	PKC	Proteinkinase C
MEF2	myocyte enhancer factor 2 (Myozyten-Verstärker Faktor 2)	PMSF	Phenylmethylsulfonyl-fluorid
min	Minute	PTX	Pertussistoxin
ml	Milliliter	RBP-4	Retinol Binding Protein 4 (Retinol-bindendes Protein 4)
mM	Millimolar	RGS	Regulators of G-protein signaling (Regulatoren der G-Protein Signalisierung)
mmol	Millimol	rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
mTOR	mammalian target of rapamycin	s	Sekunde
MuRF	muscle-ring finger (Muskelringfinger)	SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
Myf	Myogener Faktor	SEM	Standard error mean (Standardfehler des Mittelwerts)
n	Stichprobengröße	sh-RNA	short-hairpin-RNA (kurze Haarnadel-RNA)
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion	TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
NFAT	nuclear factor of activated T-cells (Kernfaktor aktivierter T-Zellen)	TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20 (Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20)
nm	Nanometer	TEMED	Tetramethylethylen-diamin
p	Signifikanzniveau	TN Puffer	Tris-NaCl-Puffer
p70s6k	Ribosomale Protein S6 Kinase beta-1	TNF	Tumornekrosefaktor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	U	Unit (Einheit)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)	V	Volt
Pi	Anorganisches Phosphat		

## Abkürzungsverzeichnis

---

Wo	Wochen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol



## 1 Einleitung

### 1.1 Allgemeine Prinzipien der zellulären Kommunikation

Die Fähigkeit auf bestimmte Umweltreize auf zellulärer Ebene reagieren zu können ist für das Überleben von Zellen und schließlich auch Organismen unabdingbar. Alle Zellen besitzen daher Signalsysteme, die es ihnen erlauben, Informationen über extrazelluläre Stimuli zu erhalten und zu verarbeiten um so miteinander zu kommunizieren (Wettschureck & Offermanns, 2005). Dabei werden verschieden Wege der Signalübertragung differenziert. Neben elektrischen (neuronalen) und physikalischen Signalübertragungssystemen ist insbesondere das humorale Signalübertragungssystem von Bedeutung. Die neuronale Signalübertragung ist durch elektrische Aktionspotentiale und deren Ausbreitung entlang der neuronalen Zellmembran charakterisiert (Kandel et al., 2000). Im präsynaptischen Nervenende verursacht das Aktionspotential die Öffnung spannungssensitiver Calciumkanäle und so den Einstrom von Calcium. Calcium induziert dann die Exozytose der synaptischen Vesikel mit darin enthaltenen Neurotransmittern. Diese werden im synaptischen Spalt freigesetzt und können so an postsynaptisch gelegene Rezeptoren binden (Südhof, 2004).

Physikalische Signalübertragungssysteme übersetzen physikalische Stimuli, wie zum Beispiel mechanische Kräfte, über entsprechende auf den Stimulus sensitive Moleküle in der Zellmembran, wie zum Beispiel Integrine oder durch Zug aktivierte Ionenkanäle, in eine zelluläre Antwort (Martino et al., 2018).

Die humoralen Signalübertragungswege bestehen schematisch gesehen aus jeweils einer Senderzelle, welche einen Mediator beziehungsweise Botenstoff sezerniert sowie eine Empfängerzelle, in welcher der Mediator nach Bindung an einen Rezeptor eine Reaktion auslöst. Als Mediatoren kommen zum Beispiel Hormone, Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter in Betracht. Bei dieser Kommunikation sind verschiedene Prinzipien unterscheidbar, dabei reicht das Spektrum von auto- (Senderzelle = Empfängerzelle), juxta- (direkter Zellkontakt zwischen Sender- und Empfängerzelle) und para- (Empfängerzelle in

## Einleitung

---

Senderzellennähe) bis hin zu endokriner (Mediator gelangt über den Kreislauf zur Empfängerzelle) Signalübertragung. Den humoralen Signalübertragungswegen ist gemeinsam, dass durch die Interaktion zwischen Mediator und für diesen Mediator empfindliche Rezeptoren der Empfängerzelle intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt werden. Somit ergeben sich notwendigerweise immer mindestens zwei Elemente der zellulären Signalübertragung: ein Rezeptor und ein Effektor, der das intrazelluläre Signal generiert.

Als Rezeptoren kommen die intrazellulär verorteten Rezeptoren und die sich in der Zellmembran befindlichen Zelloberflächenrezeptoren vor. Erstere sind Angriffsort für solche Mediatormoleküle, die aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften die Zellmembran passieren können und intrazellulär an den Rezeptor binden. Dazu gehören Steroidhormone, Retinoide oder D-Vitamine. Der nach Bindung entstandene Rezeptor-Ligand-Komplex kann über die Bindung an die im Zellkern gelegenen Promotorregionen von Zielgenen die Transkription beeinflussen.

Die Gruppe der Zelloberflächenrezeptoren ist Angriffsort für Signalmoleküle, die aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften die Zellmembran kaum oder gar nicht passieren können. Dazu zählen Liganden-regulierte Ionenkanäle, Rezeptoren mit integraler enzymatischer Aktivität (Enzym-gekoppelte Rezeptoren) und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Liganden-regulierte Ionenkanälen sind transmembranäre Proteine, die über eine Ionen-durchlässige Pore verfügen. Je nach Öffnungszustand der Pore, die durch den Liganden beeinflusst wird, kommt es zum Ionenfluss (Alexander et al., 2021). Rezeptoren mit integraler enzymatischer Aktivität sind dadurch charakterisiert, dass die extrazelluläre Bindung eines Liganden zur Aktivierung des im Cytosol gelegenen Enzyms des Rezeptors führt (Alexander et al., 2017; Hardie, 1991). Die dadurch bewirkte Katalyse bestimmter intrazellulärer Reaktionen bewirkt eine Verschiebung des chemischen Gleichgewichtes hin zum Produkt der Reaktion mit dadurch bewirkter Auslösung weiterer Signalkaskaden. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren werden nach Bindung eines Liganden in ihrer aktiven Konformation stabilisiert. In dieser erfolgt die Bindung von eines oder mehreren intrazellulär gelegenen

Transduktionsmolekülen. Zu dieser Gruppe sind hauptsächlich G-Proteine zu zählen. Diese aktivieren dann Ionenkanäle oder intrazellulär gelegene Enzyme, welche wiederum die Konzentration der sekundären Botenstoffe im Cytosol erhöhen (Kolb et al., 2022).

### 1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die Bedeutung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und somit auch der für diese Arbeit zentralen G-Proteine erschließt sich mit einem Blick auf deren Bedeutung im menschlichen Organismus und der Relevanz für die heutige Pharmakologie. Es sind über 800 GPCR im menschlichen Genom kodiert. Sie stellen damit die größte Familie aller Membranproteine dar und sprechen auf ein breites Spektrum an Liganden an: von Photonen, Protonen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bis hin zu kleinen organischen Molekülen, Neurotransmittern, Peptiden und Glykoproteinen (Kobilka, 2013; Wacker et al., 2017). Über 160 GPCRs sind Ziel von Medikamenten mit Zulassung für den US-amerikanischen Markt (Yang et al., 2021). Bei mehr als einem Drittel aller verfügbaren Medikamente ist das Ziel-Molekül ein GPCR (Sriram & Insel, 2018; Yang et al., 2021). Hierunter fällt eine Vielzahl an Medikamenten, ohne die eine moderne pharmakologische Therapie kaum vorstellbar scheint, unter anderem Opioide, Antihistaminika, Anticholinergika, typische und atypische Antipsychotika, Antihypertensiva und Medikamente gegen Asthma (Wacker et al., 2017). Circa 400 Moleküle, welche aktuell als potentielle Therapeutika erforscht werden, binden an einen GPCR und verdeutlichen so den Stellenwert von GPCRs auch als zukünftige Angriffspunkte der Pharmakotherapie (Lafferty-Whyte et al., 2017).

Alle GPCRs bestehen aus sieben  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen, welche mit alternierenden extra- und intrazellulären Schleifen verbunden sind, weshalb sie auch als 7-Transmembranhelix-Rezeptoren bezeichnet werden (Alexander et al., 2019). Aufbauend auf Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen und Funktion werden GPCRs im aktuell am weitesten verbreiteten Klassifikationssystem in die Superfamilien A-F unterteilt (Kolakowski, 1994). Familie A, auch "rhodopsin-like family" genannt, beinhaltet als größte Superfamilie circa 80 % aller GPCRs, unter

## Einleitung

---

anderem Lichtrezeptoren und olfaktorische Rezeptoren. Familie B, auch „secretin receptor family“ genannt, umschließt ca. 70 Rezeptoren. Familie C umfasst unter anderem GABA-Rezeptoren und Geschmacksrezeptoren. In Familie D sind die fungal mating pheromone Rezeptoren zusammengefasst, Familie E beinhaltet cAMP Rezeptoren und Familie F die frizzled/smoothened Rezeptoren (Hu et al., 2017).

Man kann sich GPCR sehr vereinfacht als oszillierende Moleküle vorstellen, die zwischen aktivierten und inaktivierten Konformationen wechseln. Dabei weist die nicht aktivierte Konformation eine deutlich höhere Stabilität und daher auch überproportional höhere Repräsentanz auf (Granier & Kobilka, 2012). Somit liegt immer ein Teil der GPCRs in aktivierter Konformation vor und schafft hiermit die Grundlage für eine basale, sogenannte konstitutive Aktivität des Rezeptors. Durch Bindung eines Liganden an eine extrazelluläre Bindungsstelle kann diese Aktivität mittels Stabilisierung einer bestimmten Rezeptor-Konformation beeinflusst werden. Agonisten stabilisieren eine aktivierte Konformation während Antagonisten die Bindung eines Agonisten verhindern und somit auch die Stabilisierung einer aktiven Konformation. Inverse Agonisten stabilisieren eine inaktivierte Konformation und senken somit das Aktivitätslevel des Rezeptors unter das Niveau seiner konstitutiven Aktivität (Wooten et al., 2018). In der aktivierten Konformation erfolgt die Bindung und Aktivierung von Transduktoren wie G-Proteinen und anderen Signalmolekülen wie zum Beispiel Arrestin (Hilger et al., 2018). Dabei ist einem GPCR mehr als nur eine einzige aktivierte Konformation möglich. Das ermöglicht eine Signaltransduktion, in welcher die Bindung verschiedener agonistisch wirkender Liganden die Initiierung unterschiedlicher Signalwege durch den gleichen GPCR bewirken kann (Kenakin, 2019). Diese unter dem Begriff des „signalling bias“ (Signalverzerrung) beschriebene Möglichkeit umfasst neben der jeweiligen Aktivierung mehrerer durch den entsprechenden GPCR potenziell aktivierbarer Signalwege auch die Initiierung nur eines Signalweges (Wingler & Lefkowitz, 2020). Zum Beispiel kann nur der Arrestin-Signalweg aktiviert werden, der G-Protein abhängige Signalweg aber nicht (Granier & Kobilka, 2012; Smith et al., 2018). Entgegen früheren

Vorstellungen, nach denen nur „An“ und „Aus“ als möglicher Status eines GPCR gelten kann, ergibt sich somit ein ganzes Spektrum verschiedener Rezeptor-Konformationen. Durch Liganden stabilisiert führen diese jeweils zu einem bestimmten Signalweg und somit zur Aktivierung bestimmter Effektor-Proteine sowie zur Steuerung der Intensität der zellulären Antwort (Wingler & Lefkowitz, 2020). Die Tatsache, dass G-Proteine verschiedener Subfamilien und -klassen an denselben GPCR binden können, verdeutlicht die Variabilität der Signaltransduktion dabei umso mehr (Rosenbaum et al., 2009).

### 1.3 G-Proteine

Die im Fokus dieser Arbeit stehenden G-Proteine sind heterotrimere Proteine aus der Familie der Guanosin triphosphat-(GTP-) Hydrolasen und bestehen aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit (Campbell & Smrcka, 2018). Da die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten nur in denaturierter Form einzeln vorliegen, *in vivo* jedoch immer als  $\beta\gamma$ -Komplex, stellen G-Proteine funktionell Heterodimere dar. Der  $\beta\gamma$ -Komplex rekrutiert sich bei Säugetieren aus einem Repertoire von fünf  $\beta$ -Untereinheiten und zwölf  $\gamma$ -Untereinheiten (Wettschureck & Offermanns, 2005). Die Kombination der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten hat dabei bis auf wenige Ausnahmen keinen Einfluss auf die Fähigkeit der Komplexe, Effektoren zu regulieren (Syrovatkina et al., 2016).

Die  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus einer GTPase-Domäne und einer helikalen Domäne. Die GTPase-Domäne vermittelt die Hydrolyse von Guanosin triphosphat (GTP) zu Guanosindiphosphat (GDP) und anorganischem Phosphat (Pi) (Cabrera-Vera et al., 2003). Sie bietet zudem Bindungsstellen für das  $\beta\gamma$ -Dimer sowie den GPCR und Effektorproteine. Die helikale Domäne besteht aus sechs  $\alpha$ -Helices, welche die Nukleotidbindungstasche abdecken und somit das Nukleotid im Inneren der  $\alpha$ -Untereinheit halten (Syrovatkina et al., 2016).

Basierend auf der Homologie der Aminosäuresequenzen der  $\alpha$ -Untereinheit, welche die fundamentalen Eigenschaften des G-Proteins bestimmt, werden G-Proteine in vier Subfamilien differenziert:  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i/G\alpha_o$ ,  $G\alpha_q/G\alpha_{11}$  und

## Einleitung

---

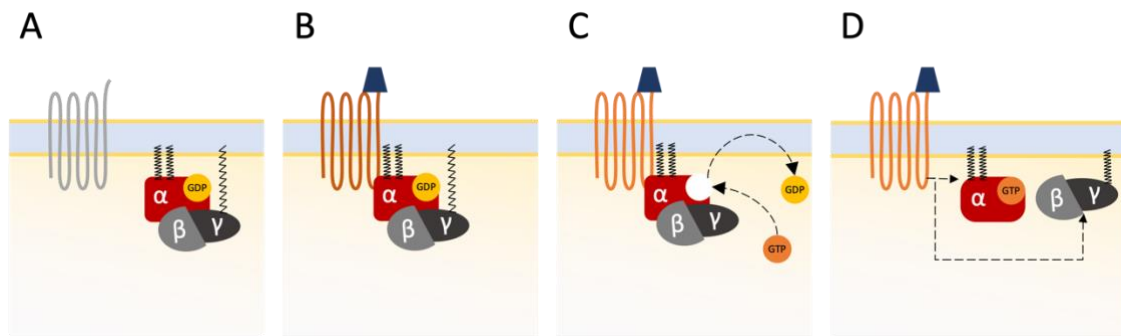
$G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ . Die Proteine der  $G\alpha_i/G\alpha_o$ -Familie sind ubiquitär exprimiert und bis auf  $G\alpha_z$  Pertussistoxin (PTX) -sensitiv. Vor allem die  $G\alpha_i$ -Isoformen  $G\alpha_{i1}$ ,  $G\alpha_{i2}$  und  $G\alpha_{i3}$  inhibieren verschiedene Isoformen der Adenylylzyklase (Sunahara et al., 1996). Aufgrund des ubiquitären Vorkommens und des höheren Expressionsniveaus von  $G\alpha_i/G\alpha_o$  im Vergleich zu den anderen G-Protein-Subfamilien wird zudem die Initiierung der  $\beta\gamma$ -Komplex-vermittelten Signalkaskaden hauptsächlich der  $G\alpha_i/G\alpha_o$ -Aktivierung zugeschrieben (Syrovatkina et al., 2016). G-Proteine der Familie  $G\alpha_q/G\alpha_{11}$  vermitteln Rezeptorwirkungen hauptsächlich über die Aktivierung der  $\beta$ -Isoformen der Phospholipase C. Die Familie der G-Proteine  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  vermittelt unter anderem die Aktivierung der Phospholipase  $A_2$  und des  $Na^+/H^+$ -Austauschers.  $G\alpha_s$ -Proteine werden ebenfalls ubiquitär exprimiert und stellen das Bindeglied zwischen vielen GPCRs und der Aktivierung der Adenylylzyklase dar. Diese wiederum führt zu erhöhten intrazellulären Konzentrationen von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) (Wettschureck & Offermanns, 2005).

Unabhängig von ihrer Einteilung verläuft die Aktivierung der G-Proteine schematisch jeweils gleich (siehe Abb. 1). Die inaktive Form des G-Proteins hat GDP in der Bindungstasche der  $\alpha$ -Untereinheit gebunden, wodurch es zur Assoziation mit der  $\beta\gamma$ -Untereinheit kommt. Die Aktivierung des GPCR durch einen Liganden führt zur Konformationsänderung des Rezeptors, welcher daraufhin einen G-Proteinkomplex bindet (Hilger et al., 2018). Die Bindung an einen GPCR führt zu einer Konformationsänderung der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins. Diese beinhaltet, dass sich der Abstand zwischen GTPase-Domäne und  $\alpha$ -helikaler Domäne derart vergrößert, dass das Nukleotid nicht mehr in der Bindungstasche gehalten wird (Koehl et al., 2018; Van Eps et al., 2011). Es kommt zur Abnahme der Affinität der  $\alpha$ -Untereinheit gegenüber GDP, woraufhin GDP dissoziiert und GTP aufgrund höherer intrazellulärer Konzentrationen und nun auch höherer Affinität zur  $\alpha$ -Untereinheit bindet (Dror et al., 2015; Weis & Kobilka, 2018). Die GTP-Bindung stabilisiert die aktive Konformation der  $\alpha$ -Untereinheit und somit die aktive Form des G-Proteins. Die  $\alpha$ -Untereinheit dissoziiert nach Bindung von GTP sowohl vom GPCR als auch bei nun deutlich

## Einleitung

verringertes Affinität gegenüber der  $\beta\gamma$ -Untereinheit von dieser weg und setzt somit die Effektor-domäne frei (Du et al., 2019). Sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta\gamma$ -Untereinheit interagieren daraufhin mit verschiedenen Effektoren (Wooten et al., 2018).

G-Proteine sind somit Bindeglieder zwischen vielen verschiedenen auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren und ihren intrazellulären Effektor-Enzymen oder Ionenkanälen.



**Abbildung 1: Aktivierung eines G-Proteins**

Das im inaktivierten Zustand vom Rezeptor dissoziiert vorliegende G-Protein (Hilger et al., 2018) hat GDP gebunden (A). Nach Rezeptoraktivierung kommt es zur Bindung des G-Proteins an den Rezeptor (B) und daraufhin zum Austausch von GDP durch GTP (C). Das dadurch aktivierte G-Protein dissoziiert vom Rezeptor und zerfällt in die  $\alpha$ -Untereinheit und den  $\beta\gamma$ -Komplex, welche jeweils wiederum Downstream gelegene Signalwege initiieren (modifiziert nach (Weis & Kobilka, 2018)).

Die G-Protein-vermittelte Änderung des Aktivitätsniveaus eines Effektor-Enzyms führt zu einer Veränderung der intrazellulären Botenstoff- oder Ionenkonzentration und schlussendlich zur Auslösung einer zellulären Antwort auf die initiale Ligandenbindung an den GPCR. Die durch die  $\alpha$ - aber auch  $\beta\gamma$ -Untereinheit ausgelöste Initiierung von Signalkaskaden wird dann beendet, wenn sich die Untereinheiten wieder zu einem Heterotrimer zusammenfinden. Dies tritt ein, sobald das an der  $\alpha$ -Untereinheit gebundene GTP zu GDP hydrolysiert wurde (Knight et al., 2021). Dieser Vorgang wird durch die intrinsische GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit katalysiert (Lambert et al., 2010). Die GTPase-Aktivität wird durch Proteine, die GTPase aktivierend (GAP) wirken,

erhöht. Zur größten Subgruppe der GAP-Aktivatoren mit über 20 bekannten Proteinen gehören die regulators of G-protein signaling (RGS) Proteine. Wie bisher für  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_q/G\alpha_{11}$  und  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  bewiesen, beeinflussen diese Proteine die Dauer der G-Protein-Aktivierung und somit auch die der Signaltransduktion (Kimple et al., 2011; O'Brien et al., 2019).

### 1.4 Konditionale Gendeletion im Mausmodell

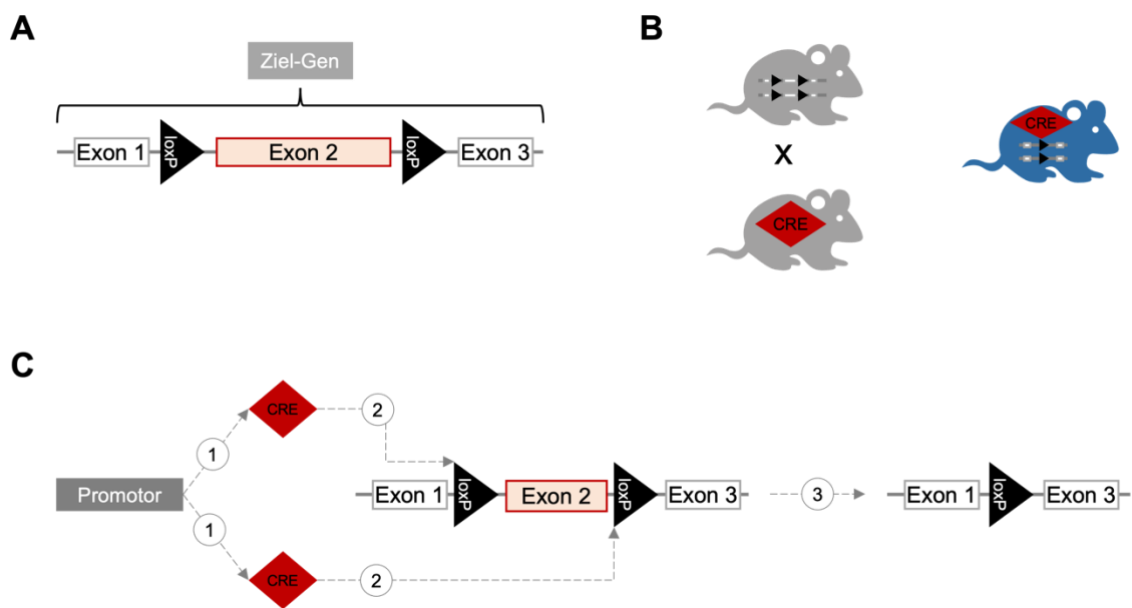
Der Begriff der konditionalen Gendeletion bezeichnet im Gegensatz zu einer globalen Gendeletion, bei dem zu keiner Zeit in keiner Zelle ein bestimmtes Protein exprimiert wird, eine Gendeletion, die lediglich bestimmte Zellen betrifft oder erst ab einem bestimmten Zeitpunkt greift.

Eine Möglichkeit der konditionalen Gendeletion besteht in der Verwendung eines Cre/loxP-Systems (siehe Abb. 2), das bereits seit über 40 Jahren Anwendung findet (Sternberg & Hamilton, 1981). Das Cyclization recombination enzyme (Cre) ist eine Rekombinase des Bakteriophagen P1 (Duyne, 2001). Bei Rekombinasen handelt es sich um Enzyme, die die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA katalysieren. Sie kommen in allen Organismen vor und haben gemeinsam, dass sie an konservierte Erkennungsstellen binden. Dies sind Genomsequenzen, welche im Laufe der Evolution weitgehend unverändert blieben. Im Falle von Cre handelt es sich dabei um eine 34 Basenpaar-lange Erkennungssequenz, die den Namen loxP (locus of X-over of P1) bekommen hat. Sie setzt sich aus einem richtungsgebenden zentralen Element von acht Basenpaaren und zwei flankierenden palindromischen Sequenzen mit jeweils 13 Basenpaaren zusammen (Gierut et al., 2014). Um eine Gendeletion zu ermöglichen, werden gleichgerichtete loxP-Sequenzen in diejenigen Introns eingebracht, welche den zu entfernenden Genabschnitt flankieren sollen. Dies geschieht durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen, welche dann wiederum in die Keimbahn eingebracht werden (Van Duyne, 2001). Eine Exzision des flankierten Genabschnittes findet statt, wenn die Cre-Rekombinase in der Zelle exprimiert wird (Andrusaite & Milling, 2020; Lukowski et al., 2005).



# Einleitung

Die Wahl des Promotors, unter dessen Kontrolle die Expression der Cre-Rekombinase steht, ermöglicht somit die beabsichtigte Gewebe- und/oder zeitliche Spezifität. Wird, wie in dieser Arbeit, die Cre-Rekombinase-Expression unter die Kontrolle des Promotors myogener Faktor 5 (Myf5) gesetzt, sollte eine Rekombination nur in Zellen möglich sein, die Myf5 exprimieren bzw. in denen der Promotor aktiviert wird. Zusätzlich kann die Cre-Rekombinase an ein Fusionsprotein gebunden sein, beispielsweise den humanen Östrogenrezeptor. Erst nach Zugabe eines Östrogenrezeptormodulators wie Tamoxifen wird in diesem Fall die Cre-Rekombinase von dem Fusionsprotein gelöst und kann anschließend in den Kern wandern und die loxP-flankierte Gensequenz entfernen. Dadurch wird der Zeitpunkt der Rekombination und somit die Gendeletion Promotor-unabhängig gesteuert (Davis et al., 2012).



**Abbildung 2: Generierung einer konditionalen Gendeletion mit Hilfe des Cre-LoxP-Systems**

→ Fortsetzung siehe folgende Seite

**(A)** Zur konditionalen Gendeletion mittels Cre/loxP-System werden loxP-Sequenzen, welche den exzidierenden Genabschnitt im Bereich des Ziel-Gens flankieren, in das Genom eingebracht. **(B)** Um eine konditionale Deletion eines Zielgens zu bekommen, müssen dann Mäuse, bei denen das Zielgen von loxP-Sequenzen flankiert ist, mit Mäusen, die eine Cre-Rekombinase exprimieren, verpaart werden. Die im Schema blau dargestellte Maus stellt die Voraussetzung für eine Gen-Deletion dar, da hier das loxP-flankierte Zielgen, sowie die Cre-Rekombinase exprimiert sind. **(C)** Ist der Promotor, unter dessen Kontrolle die Cre-Expression gesetzt wurde, in einer Zelle vorhanden, so wird die Cre-Rekombinase exprimiert **(C1)** und sorgt für die Rekombination durch

*Exzision des gesamten Teilstücks zwischen den loxP-Sequenzen (C2). Das schließlich vorliegende Gen enthält nun lediglich eine loxP-Sequenz und das Zielgen ist um die entsprechende Sequenz verkürzt (C3). Meist führt dies bei der Proteinbiosynthese zu einem vorzeitigen Abbruch.*

### 1.5 Glukosehomöostase

Die Versorgung der Zellen mit Energieträgern und somit die Sicherstellung des Ablaufes der fortwährend intrazellulär ablaufenden, Energie konsumierenden Prozesse ist eine der wichtigsten Aufgaben des Organismus. Als Energieträger spielen Kohlenhydrate neben Fetten und Proteinen eine entscheidende Rolle.

Fast alle mit der Nahrung aufgenommenen Kohlenhydrate müssen vor einer weiteren Verwertung in Glukose umgewandelt werden – umgekehrt kann der menschliche Organismus aus Glukose beinahe jedes Monosaccharid, verschiedene Fettsäuren, Cholesterin, Heteroglykane und nicht-essenzielle proteinogene Aminosäuren synthetisieren (Löffler & Müller, 2014a). Nicht zuletzt spielt Glukose als energiedichtes Molekül bei der Versorgung der Organe mit Energie eine herausragende Rolle und ist im Falle des Gehirns obligatorischer Energielieferant (Dienel, 2018).

Von Glukosehomöostase wird gesprochen, wenn sich der Blutzuckerspiegel unabhängig von Nahrungsaufnahme und Fastenperioden in einem Zielkorridor zwischen etwa vier und sechs mmol/l bewegt. Erreicht wird dies mithilfe eines komplexen Systems verschiedener Hormone und Neuropeptide, welche von Hirn, Darm, Leber-, Muskel- und Fettgewebe sowie dem Pankreas sezerniert werden (Röder et al., 2016). Von zentraler Bedeutung auf hormoneller Ebene ist die Balance zwischen Insulin- und Glukagon-Sekretion.

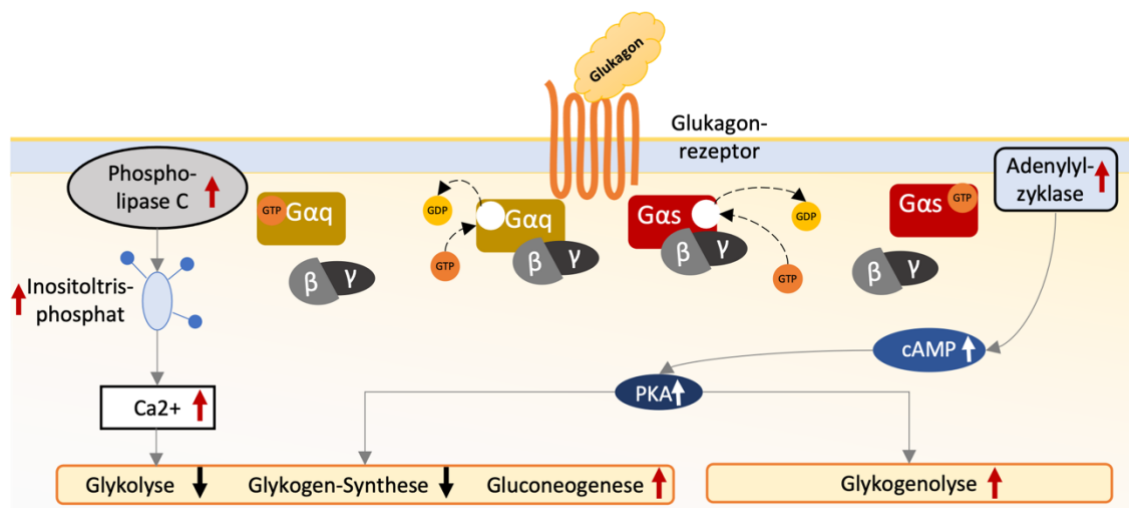
#### 1.5.1 Die Rolle von Insulin und Glukagon

Befindet sich der Organismus in einer Phase der Nahrungskarenz oder verstärkter adrenerger Stimulation, kommt es zur Ausschüttung von Glukagon, einem Peptidhormon aus den  $\alpha$ -Zellen des Pankreas (Unger & Cherrington,

## Einleitung

2012). Glukagon hat seinen Hauptwirkungsort auf den Hepatozyten. Dort bindet das Hormon an einen GPCR, den Glukagonrezeptor, und es kommt zur Aktivierung sowohl eines  $G_{\alpha_s}$ -Proteins als auch eines  $G_{\alpha_q}$ -Proteins (siehe Abb. 3) (Jiang & Zhang, 2003). Ersteres führt zur Stimulation der Adenylylzyklase, somit zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration und konsekutiv zu einer Aktivierung der Glykogenphosphorylase und damit zum Abbau von Glykogen. Darüber hinaus induziert ein cAMP-Anstieg die Gluconeogenese und hemmt die Glykogenolyse sowie die Glykogen-Synthese (Petersen et al., 2017). Eine über die kurzfristige Blutzuckersteigerung hinausgehende Wirkung hat die cAMP-vermittelte Änderung der Genexpression (Sandoval & D'Alessio, 2015). Diese führt zu einer verstärkten Expression von essenziellen Proteinen für die Gluconeogenese bei simultaner Hemmung der Expression der Proteine der Glykolyse (Jiang & Zhang, 2003).

Das aktivierte  $G_{\alpha_q}$ -Protein wiederum aktiviert die Phospholipase C $\beta$  und führt somit darüber zu einem Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Es kommt zu vermehrter Calciumbindung an die Calmodulin-Untereinheit der Phosphorylasekinase und in Folge dessen zu einer Proteinkinase A (PKA)-unabhängigen Aktivierung der Glykogenphosphorylase und dem Abbau von Glykogen zu Glukose-1-Phosphat und somit zum Start der hepatischen Glykogenolyse (Staiger et al., 2014a).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Signaltransduktion durch den Glukagonrezeptor**

## Einleitung

---

*Vermittelt durch ein  $G\alpha_s$ -Protein führt die Bindung von Glukagon an den Glukagonrezeptor zur Aktivierung der Adenylylzyklase und hierüber zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel mit dadurch bedingter Aktivierung der Proteinkinase A. Das ebenfalls über den Glukagonrezeptor aktivierte  $G\alpha_q$ -Protein induziert die Phospholipase C und dadurch die Erhöhung des intrazellulären Calciums. Beide Signalkaskaden führen so schließlich zur Erhöhung der Gluconeogenese bei Reduktion der Glycolyse und Glycogen-Synthese. Nur PKA-abhängig wird die Glycogenolyse erhöht. Abbildung modifiziert nach (Jiang & Zhang, 2003)*

Führt dagegen zum Beispiel die Aufnahme einer Mahlzeit zu einem Anstieg des Blutglukosespiegels, wird vermehrt Insulin aus den  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas ausgeschüttet. Insulin ist das potenteste aller bekannten anabolen Hormone. Produziert wird das aus zwei kovalent verbundenen Peptidketten bestehende Hormon in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas und von dort direkt in den portalvenösen Kreislauf abgegeben. Insulin steuert die Speicherung und Synthese von Fetten, Proteinen und Kohlenhydraten und inhibiert sowohl deren Abbau als auch die Ausschüttung in den Kreislauf (Petersen & Shulman, 2018; Saltiel & Kahn, 2001). Der erste Schritt im Zuge dieser Funktionen besteht in der Regulation der Glukoseaufnahme in Fett- und Muskelzellen. Im Mittelpunkt steht dabei der insulinabhängige Glukosetransporter 4 (GLUT4) (Klip et al., 2019). In Abwesenheit von Insulin zirkuliert dieser langsam zwischen der Plasmamembran und intrazellulären vesikulären Elementen. Insulin stimuliert die Translokation der sich im intrazellulären Pool befindlichen GLUT4 Proteine zur Plasmamembran *via* zielgerichteter Exozytose (Chadt & Al-Hasani, 2020). Dort angekommen erfolgt das Andocken und die Fusion mit der Plasmamembran und konsekutiv die Erhöhung der Rate der aufgenommenen Glukosemoleküle der Zelle, nicht jedoch des einzelnen Transporters (Löffler & Müller, 2014b). Die Signaltransduktionswege hierfür sind komplex. Insulin bindet an den Insulinrezeptor, einem heterotetrameren Zelloberflächenrezeptor, bestehend aus zwei extrazellulären  $\alpha$ -Untereinheiten, die Insulin binden und zwei transmembranären  $\beta$ -Untereinheiten mit Tyrosinkinase-Aktivität (Hubbard, 2013). Der Bindung folgt die Autophosphorylierung der  $\beta$ -Untereinheiten und dadurch die Erhöhung der katalytischen Aktivität der Tyrosinkinase. Im Folgenden werden weitere intrazelluläre Substrate, vor allem aus der Gruppe der

insulin receptor substrate family (IRS), phosphoryliert und damit Phosphatidylinositid-3-Kinase (PI3K) -abhängige (Nürnberg & Beer-Hammer, 2019) und -unabhängige Signalwege initiiert, die die oben beschriebene Translokation der GLUT4-Transporter erwirken (Haeusler et al., 2018; Saltiel, 2021).

In den Hepatozyten ist Insulin direkter Gegenspieler des Glukagons: Nach Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor kommt es zur Aktivierung von Akt und dadurch zur Aktivierung der Phosphodiesterase 3 B (PDE3B), welche die Senkung der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt (Petersen et al., 2017). Der cAMP-Abfall deaktiviert die Glykogenphosphorylase und inhibiert darüber die Glykogenolyse. Zudem induziert Insulin die vermehrte Bildung von Fructose-2,6-Bisphosphat, welches indirekt die Glykolyse-Rate steigert und die Gluconeogenese hemmt. Auf Transkriptionsebene führt Insulin zur Induktion der Glykolyse-Enzyme Glucokinase, Phosphofruktokinase 1 und Pyruvatkinase und zur Repression der Gluconeogenese-Enzyme Pyruvatcarboxylase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Fructose-1,6-Bisphosphatase und Glukose-6-Phosphatase (Sorriento et al., 2021; Staiger et al., 2014b).

### **1.5.2 Die Rolle von Splanchnikusgebiet und peripheren Geweben bei der Blutglukoseregulation**

Der Resorption von Glukose durch den Organismus folgend kommt es zur Aufnahme in die konsumierenden und speichernden Gewebe. Circa ein Drittel wird dabei über die Leber aufgenommen (Winnick et al., 2009), ein weiteres Drittel über das Insulin-sensitive Fett- und Muskelgewebe und schließlich ca. ein Drittel von den nicht Insulin-sensitiven und somit obligat Glukose verstoffwechselnden Geweben. Unter letzteren sind insbesondere das zentrale Nervensystem und die Zellen des Blutkreislaufs zu sehen (Kowalski & Bruce, 2014; Moore et al., 2012).

Das Lebergewebe zeichnet sich in seiner Rolle dahingehend aus, dass es nicht nur Glukose aufnehmen und verstoffwechseln, sondern ebenfalls wieder in den

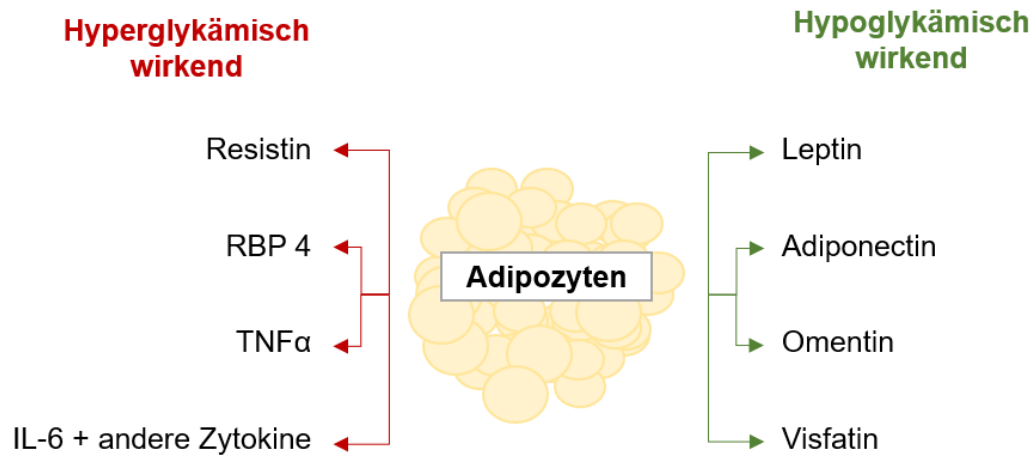
## Einleitung

---

Kreislauf abgeben kann (Hargreaves & Spriet, 2020). So wird im Fastenstatus der Blutglukosespiegel durch die Sekretion von Glukose, gewonnen durch Glykogenolyse oder Gluconeogenese, von der Leber in den Blutkreislauf bestimmt (Chadt & Al-Hasani, 2020). Lediglich die Niere und das Intestinum sind neben der Leber noch zur Gluconeogenese fähig aber nutzen dies in weitaus geringerem Umfang (Mutel et al., 2011; Vallon, 2020). Die Glukoseausschüttung von Hepatozyten wird durch Glukagon gesteuert (siehe Kapitel 1.5.1) und ist im Fall von pathologisch herabgesetzter Insulinsensitivität der peripheren Gewebe heraufgesetzt (Rossi et al., 2018; Unger & Cherrington, 2012). Mögliche Ursache ist dabei die erhöhte Glukagonkonzentration im Blut sowie verzögerte Glukagonsekretionshemmung nach Glukoseaufnahme in Individuen mit eingeschränkter Insulinsensitivität (Færch et al., 2016).

Die peripheren Insulin-sensitiven Geweben bilden das Fett- und Muskelgewebe. Auch hier ist noch einmal eine Abstufung der Glukoseaufnahmekapazität vorzunehmen: lediglich 5 % der oral aufgenommenen Glukose wird von Adipozyten aufgenommen. Skelettmuskeln können hingegen ein Fünftel der gastrointestinal resorbierten Menge aufnehmen und entweder in Form von Glykogen speichern oder aber umgehend verstoffwechseln (Baron et al., 1988). Die Bedeutung von Adipozyten geht allerdings über die akute Aufnahmefähigkeit von Glukose hinaus. In seiner Funktion als endokrines Gewebe sezerniert Fettgewebe sowohl Proteine, welche den Blutglukosespiegel senken, als auch solche, die ihn steigern können (siehe Abb. 4) (Scheja & Heeren, 2019).

## Einleitung



**Abbildung 4: Von Adipozyten sezernierte Hormone mit Effekt auf die Glukosehomöostase**

Adipozyten beeinflussen durch die Sekretion von endokrinen und nicht-endokrinen Proteinen den Blutzuckerspiegel. Während Resistin, Retinol binding protein (RBP) 4, TNF $\alpha$ , Interleukin 6 und andere Zytokine einen hyperglykämischen Effekt haben, zeigen Leptin, Adiponectin, Omentin und Visfatin entgegengesetzte Wirkungen. (Funcke & Scherer, 2019; Rosen & Spiegelman, 2006).

Das bekannteste blutzuckersenkende Hormon ist Leptin. Es steigert die Insulinsensitivität von Leber- und Muskelgewebe. Erklärbar ist dieser Effekt teilweise durch die Leptin-induzierte Reduktion intrazellulärer Lipidkonzentrationen, vermittelt über direkte Aktivierung der AMP-aktivierten Protein-Kinase (AMPK). Hauptsächlich sind aber indirekte Effekte, welche zentralnervös vermittelt sind, Grundlage der Leptin-Wirkung (Friedman, 2019; Minokoshi et al., 2002).

Ebenfalls über Aktivierung der AMP-abhängigen Kinase wirkt Adiponektin in der Leber und im Skelettmuskel Insulin-sensibilisierend. Derart sensibilisierend wirkt auch Omentin, während Visfatin direkt über Bindung und konsekutive Aktivierung am Insulinrezeptor blutzuckersenkende Wirkung zeigt (Funcke & Scherer, 2019).

Die hyperglykämisch wirkenden Proteine, welche von Adipozyten sezerniert werden, verstärken die Insulinresistenz (Rosen & Spiegelman, 2006).

Die Mechanismen, über die eine blutzuckersenkende oder -erhöhende Wirkung durch die jeweiligen Botenstoffe verursacht wird, sind mittlerweile gut erforscht

(Nicholson et al., 2018; Scheja & Heeren, 2019). Dies trifft allerdings noch nicht für alle Signalwege zu, die zur Ausschüttung eben dieser Botenstoffe führen. Zwar sind die Signalwege, welche zu einer Ausschüttung von IL-6, TNF $\alpha$  und anderen hyperglykäm-wirkenden Zytokinen führen, vor dem Hintergrund des inflammatorischen Status, welchen Adipositas darstellt, gut erklärbar. Die Signalwege, welche die Sekretion Blutzuckerspiegel-senkend wirkender Proteine aus den Adipozyten verursachen, entziehen sich allerdings noch weitestgehend der wissenschaftlichen Kenntnis (Recinella et al., 2020).

### **1.5.3 Diabetes mellitus als Ausdruck einer pathologischen Glukosehomöostase**

Eine Störung der Glukosehomöostase manifestiert sich in den meisten Fällen in Form des Diabetes mellitus als Folge relativen oder absoluten Insulinmangels. Ein absoluter Insulinmangel als Kernelement des Diabetes Typ I tritt ein, wenn die  $\beta$ -Zellen des Pankreas nicht in der Lage sind, physiologische Insulinkonzentrationen aufrechtzuerhalten oder mutierte, dysfunktionale Insulinpeptide bilden. Dem voraus geht zumeist eine autoimmun-vermittelte Destruktion der  $\beta$ -Zellen (Skyler et al., 2017). Insulinresistenz hingegen beschreibt die Unzulänglichkeit des Organismus, trotz Vorliegen physiologischer Insulinkonzentrationen ausreichende metabolische Reaktionen zu generieren, um den Blutzucker in physiologischen Konzentrationen zu halten (Samuel & Shulman, 2016). Ist der Organismus nicht in der Lage, die Insulinresistenz durch erhöhte Insulinproduktion und -sekretion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas zu kompensieren, liegt ein relativer Insulinmangel vor. Insulinresistenz und relativer Insulinmangel sind die hauptsächlichen Merkmale des Diabetes mellitus Typ 2 (Leahy, 2005; Roden & Shulman, 2019) und wird nur in den seltensten Fällen durch Rezeptordefekte verursacht. Zumeist ist die Ursache auf Postrezeptorebenen zu finden (Yaribeygi et al., 2019).

Eine Ursache der Insulinresistenz ist eine erhöhte Plasmakonzentration nicht-veresterter Fettsäuren. Sie hat zumeist in einer viszeralen Adipositas ihren



## Einleitung

---

Ursprung, da viszerale Adipozyten aufgrund ihrer hohen  $\beta_2$ - und nur geringen  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptordichte besonders anfällig für die katecholaminvermittelte Lipolyse sind. Nicht veresterte Fettsäuren vermindern die Glukoseaufnahme in die Skelettmuskulatur und erhöhen die hepatische Glukosefreisetzung. Sie wirken zudem lipotoxisch und destruierend auf die  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Savage et al., 2007). Kann der Organismus zunächst noch über eine Steigerung der im Blut befindlichen Insulinkonzentration die Insulinresistenz kompensieren, kommt es im Verlauf zu einer Erschöpfung der  $\beta$ -Zellen (Ohn et al., 2016). Als Folge kommt es zu Hyperglykämie und durch den glukoseinduzierten metabolischen Stress (Glukotoxizität) zu einer Abnahme der Insulinproduktion (Löffler & Müller, 2014b) mit schließlich vollständiger Ausprägung eines Diabetes. Die hier ausgeführte Genese der Insulinresistenz in der erhöhten Plasmakonzentration nicht veresterter Fettsäuren ist exemplarisch für das Zusammenspiel von Übergewicht bzw. Adipositas, definiert durch ein body mass index von  $>25\text{kg/m}^2$  bzw.  $>30\text{kg/m}^2$  und der Entwicklung von Diabetes mellitus Typ 2. Ca. 85 % aller Diabetiker sind übergewichtig (Chait & den Hartigh, 2020) und auch wenn die Pathogenese von Diabetes mellitus Typ 2 komplex ist (Yaribeygi et al., 2019), besteht doch kein Zweifel, dass Übergewicht Insulinresistenz induziert und somit auch Diabetes (Bjerregaard et al., 2018; Kleinert et al., 2018). Insulinresistenz sowie Fettleibigkeit sind zudem neben Hypertension und Dyslipidämie charakterisierend für das metabolische Syndrom (Saklayen, 2018), einem multiplexen Risikofaktor für atherosklerotische Gefäßerkrankungen und der Entwicklung von Diabetes mellitus Typ 2. Bei Vorliegen eines metabolischen Syndroms ist das Risiko, einen Schlaganfall zu erleiden, verdoppelt (Grundy, 2016) und das Risiko für kardiovaskuläre Krankheiten um den Faktor 2,6 gegenüber metabolisch gesunden Patienten erhöht (Mongraw-Chaffin et al., 2018). Gegenüber metabolisch gesunden, normalgewichtigen Patienten ist das Risiko eines übergewichtigen Menschen mit metabolischem Syndrom Diabetes zu entwickeln um den Faktor 7 erhöht (Ärnlöv et al., 2010).

### 1.6 Skelettmuskelhomöostase

Der Skelettmuskel ist ein spezialisiertes Gewebe, welches bis zu 50 % der menschlichen Körpermasse ausmacht (Sartori et al., 2021). Er ist für die Ausführung essenzieller Aufgaben wie Atmung, Fortbewegung und die Aufrechterhaltung des Metabolismus von Nöten (Baskin et al., 2015). Die für die Kontraktion des Skelettmuskels verantwortliche zelluläre Einheit ist die Muskelfaser. Es handelt sich dabei um lange, vielkernige Zellelemente, die durch Fusion einkerniger Zellen (Myoblasten) aus mesenchymalen Muskelprogenitorzellen entstanden sind (Kim et al., 2018). Diese lediglich während der embryonalen Entwicklung mitotisch aktiven Zellen fusionieren, sobald sie reif sind, und bilden Myotuben mit zentral gelegenen Zellkernen sowie im weiteren Verlauf Muskelfasern mit exzentrisch gelegenen Zellkernen aus (Mukund & Subramaniam, 2020). Reife Myoblasten sind nicht mehr teilungsfähig. Werden zusätzliche Myoblasten beziehungsweise Myonuclei benötigt, entstehen diese aus den teilungsfähigen Satellitenzellen, dem Stammzellvorrat des Skelettmuskels, und fusionieren im Anschluss mit der Muskelfaser (Asan, 2015).

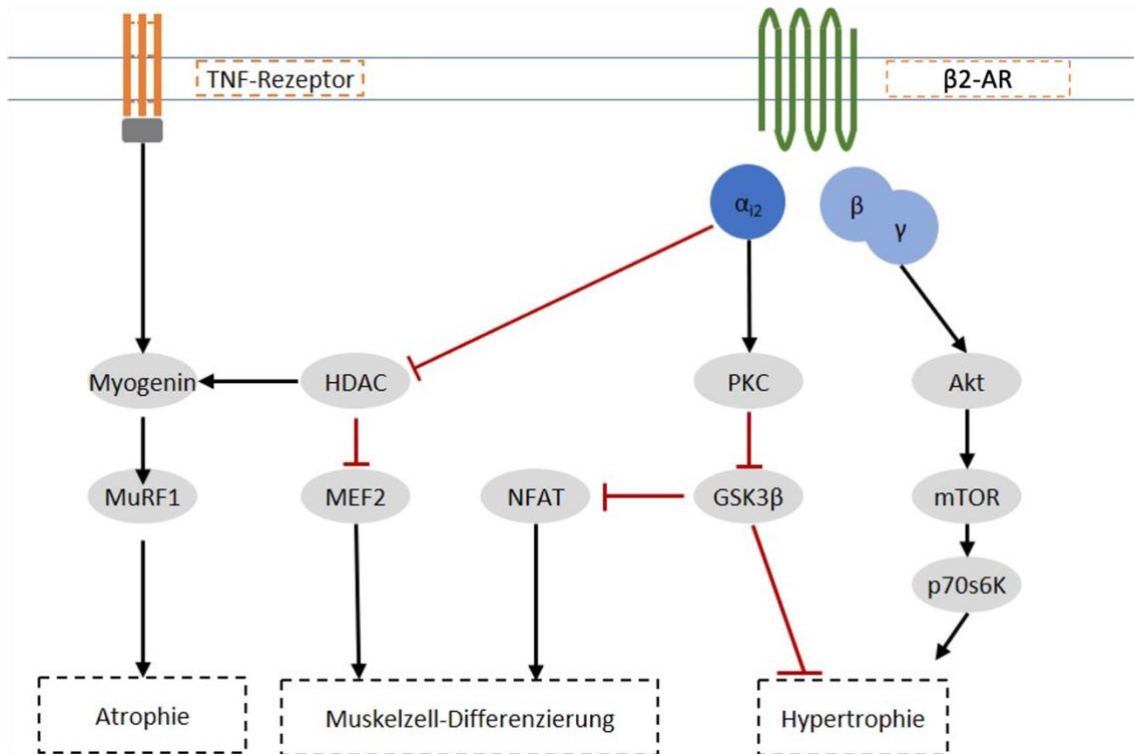
Der Begriff der Skelettmuskelhomöostase beschreibt die Balance zwischen Muskel- und damit vor allem Protein- sowie Zellkernabbau und -aufbau. Sie gewährleistet, dass der Muskel seiner physiologischen Rolle gerecht werden kann. Ein Zuwachs an Muskelmasse und Muskelfasergröße findet in der Entwicklung, nach mechanischer Überlastung oder anaboler hormoneller Stimulation, zum Beispiel durch Testosteron oder  $\beta_2$ -adrenerge Agonisten statt. Eine Abnahme der Muskelmasse und Muskelfasergröße wird durch den Alterungsprozess, Hunger, Tumorleiden, Diabetes, Immobilisation, Denervierung des Muskels oder kataboler hormoneller Stimulation, wie zum Beispiel durch Kortikosteroide, verursacht (Schiaffino et al., 2013). Je nachdem welcher Skelettmuskeltyp vorliegt, fällt die Reaktion auf diese Reize stärker oder schwächer aus. Auf molekularer Ebene von herausragender Bedeutung für die Skelettmuskelhomöostase sind zwei Signalwege: Der Insulin-like growth factor (IGF1)-PI3K-Akt/PKB-mammalian target of rapamycin (mTOR)-Weg als positiver

Regulator für Muskelwachstum (Sartori et al., 2021; Schiaffino & Mammucari, 2011) und der Myostatin-Smad3-Weg als negativer und somit Muskelatrophie-induzierender Regulator. Der hauptsächliche Effekt von mTOR ist die Induktion der Translation von factor-4E-binding-protein (4EBP1) und S6-Kinase (Liu & Sabatini, 2020). Zudem wird die Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) inhibiert, welche im aktiven Zustand den für eine Fusion von Myoblasten mit Myotuben benötigten Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) inhibiert. Die 5'AMP-Kinase (AMPK) agiert als Gegenspieler zu mTOR. Sie fungiert als Sensor für die zelluläre Energiehomöostase und führt im Falle einer Energiedepression der Muskelzelle durch Hypoxie, osmotischen Stress oder andauernder Kontraktion zur Phosphorylierung von mTOR und damit Inhibierung der wachstumsstimulierenden Effekte (Glass, 2003; Herzig & Shaw, 2018).

### **1.7 Die Funktion von G $\alpha_i$ -Proteinen bei der Blutzuckerregulierung und in Skelettmuskelzellen**

G-Proteine der Familie G $\alpha_i$  sind im Organismus ubiquitär zu finden. Es lassen sich drei Isoformen, namentlich G $\alpha_{i1}$ , G $\alpha_{i2}$  und G $\alpha_{i3}$ , unterscheiden. Sie zeigen weitreichende Sequenzhomologie und neben Isoform-spezifischen Funktionen auch Funktionsüberlappungen (Keller et al., 2015; Leiss et al., 2014; Wiege et al., 2013). Die Gene *GNAI1*, *GNAI2* und *GNAI3* kodieren für diese Proteine (Wettschureck & Offermanns, 2005). Im Skelettmuskel ist G $\alpha_{i2}$  von großer Bedeutung. Es begünstigt durch Inhibierung der GSK3 $\beta$  sowohl die Skelettmuskelhypertrophie als auch durch den Wegfall des inhibierenden Einflusses von GSK3 $\beta$  die Skelettmuskeldifferenzierung durch Aktivierung des pro-Differenzierung-steuernden Transkriptionsfaktors NFAT (siehe Abb. 5). Vermittelt wird dies über die Aktivierung der Proteinkinase C (Minetti et al., 2014).

## Einleitung



**Abbildung 5: Intrazelluläre Signalkaskaden im Skelettmuskel nach  $G\alpha_{12}$ -gekoppelter Rezeptoraktivierung**

Eine Aktivierung vom  $\beta_2$ -Adrenorezeptor ( $\beta_2$ -AR) eines  $G\alpha_{12}$ -gekoppelten Rezeptors führt über die Proteinkinase C-vermittelte Hemmung der Glykogensynthasekinase 3 $\beta$  und Aktivierung des Akt-mTOR-Signalweges zu einer Hypertrophie der Muskelzelle und Differenzierung von Satellitenzellen. Über die Hemmung von HDAC wird zudem die TNF $\alpha$ -Rezeptor-vermittelte Muskelzellatrophie herabgesetzt (Minetti et al., 2011; Rodrigues et al., 2019).

Neben der Induktion der Proteinsynthesesteigerung ist  $G\alpha_{12}$  für eine Verbesserung der Regeneration und Satellitenzellendifferenzierung, hauptsächlich vermittelt über NFAT verantwortlich (van der Velden et al., 2008). Die Proteinkinase C-unabhängige Inhibierung von HDAC4 verhindert zudem einen Anstieg von Myogenin und dessen Downstream-Effektor E3-Ubiquitinligase Muscle-Ring Finger (MuRF) 3, einem Atrophie-induzierendem Enzym (Minetti et al., 2011).  $G\alpha_{12}$ -defiziente Mäuse zeigen dementsprechend eine reduzierte lean-body-mass und Muskelgröße bei fehlenden Anzeichen für Immunzellinfiltration, Zelldegeneration oder Fibrose.  $G\alpha_{12}$ -defiziente Satellitenzellen haben eine eingeschränkte Proliferation, Differenzierung und Fusion. *In vivo* stellte sich eine Verminderung der Regenerationsfähigkeit von Muskeln nach Cardiotoxin-

## Einleitung

---

induzierter Verletzung dar (Minetti et al., 2014). GPCRs sind nicht nur in der Muskelhomöostase von großer Bedeutung. Wie bereits in Kapitel 1.5.1 dargelegt, mediiert sowohl  $G_i$ - als auch  $G_s$ - und  $G_q$ -gekoppelte Rezeptoren als Reaktion auf Hormone wie Insulin, Glukagon und diverse Inkretine den Blutzuckerspiegel (Jiang & Zhang, 2003; Riddy et al., 2018; Wess, 2021). Im Verlauf der Evolution entwickelten sich zudem zunehmend GPCRs, die nach der Bindung endogener Metaboliten als Ligand intrazelluläre Signalkaskaden als Reaktion auf den metabolischen Status des Organismus auf den Weg bringen können (Strassheim et al., 2021; Tan et al., 2017; Tonack et al., 2013).

Annahmen bezüglich der Funktion von  $G_i$ -Proteinen wurden häufig auf der Grundlage von Studien, in denen die Aktivierung von  $G_{\alpha_i}$ -Proteinen durch die Applikation von Pertussistoxin (PTX) verhindert wurde, getroffen. PTX ist ein Toxin des Bakteriums *Bordetella pertussis* und katalysiert die ADP-Ribosylierung eines Cystein-Restes der  $\alpha$ -Untereinheit von G-Proteinen der Familie  $G_{i/o}$ . Durch vermutlich sterische Veränderungen wird dadurch die Interaktion der  $G_{\alpha_i}$  – Untereinheit mit dem GPCR verhindert (Campbell & Smrcka, 2018). PTX-basierte Untersuchungen legten nahe, dass im Pankreas exprimierte  $G_i$ -Proteine die Insulinsekretion inhibieren. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zeigte sich nach PTX-Behandlung von  $\beta$ -Zellen eine erhöhte Insulinausschüttung. Somit musste bei PTX-induzierter Erhöhung der Insulinausschüttung von einer durch G-Proteine der Familie  $G_{i/o}$  vermittelten Inhibition der Insulinsekretion ausgegangen werden (Robertson et al., 1991). Es zeigte sich jedoch, dass für diesen Effekt nur  $G_{\alpha_{i2}}$ , nicht aber  $G_{\alpha_{i1}}$  oder eines der drei  $G_i$ -Proteine verantwortlich gemacht werden kann (Wang et al., 2011). Konträr zu früheren Annahmen trägt  $G_{\alpha_{i2}}$  durch die Regulierung L-Ornithin- und L-Arginin-induzierter Insulinsekretion sogar zu erhöhter Insulinausschüttung bei. Sowohl eine  $\beta$ -Zellen-spezifische als auch eine globale  $G_{\alpha_{i2}}$ -Defizienz führen im Glukosetoleranztest *in vivo* zu niedrigeren Plasmainsulinspiegeln als sie beim Wildtyp zu beobachten sind. *In vitro* lässt sich dieser Effekt replizieren, wenn es zur Ko-Stimulation der Zellen mit Glukose und L-Arginin beziehungsweise L-Ornithin kommt. Reine Glukosestimulation führt zu keinen signifikanten Unterschieden. Interessanterweise zeigt sich bei globaler

## Einleitung

---

$G\alpha_{i2}$ -Defizienz im Vergleich zum Wildtyp eine ebenbürtige Glukosetoleranz trotz reduzierter Plasmainsulinspiegel, was Hinweis auf eine verbesserte periphere Insulinsensitivität sein könnte (Leiss et al., 2014). Ob diese allerdings lediglich in dem ebenfalls bei globale  $G\alpha_{i2}$ -Defizienz zu verzeichnendem geringerem Körpergewicht (Leiss et al., 2014; Wang et al., 2011) ihre Ursache findet oder in aktuell noch nicht bekannten metabolischen Funktionen von  $G\alpha_{i2}$  ist noch nicht geklärt.

### 1.8 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase ist von vitaler Bedeutung für den Organismus. Um den Blutzucker im physiologischen Zielkorridor von vier bis sechs mmol/l zu halten ist dabei ein ständiger Informationsaustausch zu dem extrazellulären Energiestatus und zu den Blutzucker-regulierenden Geweben wie Pankreas, Leber und Skelettmuskel notwendig.

G-Proteine sind an vielen Stellen essenzieller Bestandteil dieser Signalkaskaden. Die aus einer  $\alpha$ -Untereinheit und einem  $\beta\gamma$ -Komplex bestehenden funktionellen Dimere werden anhand ihrer  $\alpha$ -Untereinheit charakterisiert. Mit  $G\alpha_{i2}$  soll in dieser Arbeit ein inhibitorisches und ubiquitär im Organismus exprimiertes G-Protein näher beleuchtet werden. Charakterisierungen einer globalen  $G\alpha_{i2}$ -Defizienz in Mäusen konnten neben vielen anderen Funktionen dieses Proteins auch zeigen, dass ein Fehlen von  $G\alpha_{i2}$  zwar keinen Einfluss auf den Blutzuckerspiegel hat, jedoch eine deutliche Reduktion der Insulinspiegel bewirkt, sodass eine verbesserte periphere Insulinsensitivität angenommen werden kann (Leiss et al., 2014). Der Ursprung dessen ist bislang ungeklärt. Möglich erscheint zum einen die Verortung der Ursache im reduzierten Körpergewicht bei globaler Defizienz von  $G\alpha_{i2}$ , dessen Genese allerdings auch noch nicht eruiert wurde. Zum anderen können aber auch in den weiteren an der Glukosehomöostase beteiligten Geweben, sprich Leber, Skelettmuskel- oder Fettgewebe, Gründe für die verbesserte Insulinsensitivität zu finden sein. Dass  $G\alpha_{i2}$  für die Regulierung der Skelettmuskelmasse und -regeneration Bedeutung hat, konnte bereits gezeigt werden (Minetti et al., 2011), ohne jedoch die Auswirkungen einer muskelspezifischen Deaktivierung auf die Glukosetoleranz oder den Plasmainsulinspiegel zu untersuchen.

Mit der Zielstellung einer skelettmuskelspezifischen  $G\alpha_{i2}$ -Ablation wurde daher im Rahmen dieser Arbeit erstmalig der Phänotyp einer Myf5-Cre-mediierten *Gnai2*-Deletion ( $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$ ) bestimmt. Um die Konsequenzen der Gendeletion für die Skelettmuskelhomöostase zu untersuchen, wurde zu dezidierten Alterspunkten die Morphologie und Masse bestimmter Muskeln untersucht. Zum

## Einleitung

---

Zwecke der Charakterisierung möglicher Auswirkungen auf die Glukosehomöostase wurden *in vivo* Glukose- und Insulintoleranztests im Alter von acht beziehungsweise zehn und nochmals im Alter von 20 beziehungsweise 22 Wochen durchgeführt. Zudem erfolgte die Bestimmung des Insulinspiegels im Rahmen des Glukosetoleranztests. Darüber hinaus wurde der Gewichtsverlaufes bis zum Alter von 52 Wochen erfasst. Parallel zu den Untersuchungen der Auswirkung der konditionalen Gendeletion auf den Phänotyp wurden Expressions- und Rekombinationsanalysen durchgeführt, um die beabsichtigte Skelettmuskelspezifität der Myf-5 Cre medierten Gendeletion zu überprüfen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Zur Durchführung der in dieser Arbeit dargelegten Versuche kamen verschiedene Einwegmaterialien wie beispielsweise Pipettenspitzen, Kryoröhrchen oder Reaktionsgefäße zur Verwendung. Bezogen wurden diese von den Firmen Becton-Dickinson GmbH (Heidelberg), Eppendorf AG (Hamburg) oder Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen). Für die Puffer wurden ausschließlich Chemikalien in höchster Reinheit (pro Analyse) genutzt. Diese wurden von den Herstellern Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) erworben.

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Transgene Mauslinie

Die zur Untersuchung der Fragestellung dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden auf einen C57BL6/N Hintergrund in der Tierversuchsanlage der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen mittels Inzuchtverpaarung gezüchtet. Die Haltung erfolgte im spezifisch-pathogen-freien Bereich der Anlage. Bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden bestand für die Tiere freier Zugang zu Trockenfutter und Wasser.

Zu den experimentellen Versuchen herangezogen wurden ausschließlich männliche Tiere. Die hier vorgestellten Daten beziehen sich dementsprechend ebenfalls nur auf männliche Mäuse.

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (AZ 07.01.2014; Genehmigung: PH1/11).

### 2.2.2 Gewebespezifische $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse

#### 2.2.2.1 Gefloخته $G\alpha_{i2}$ -Linie

*Gnai2* wird auf dem Chromosom 9 der Maus exprimiert. Tiere, die vor Exon 2 und nach Exon 4 dieses Chromosoms eine loxP-Erkennungssequenz tragen, wurden bereits beschrieben (Wiege et al; 2013). Die gefloخته  $G\alpha_{i2}$ -Linie wurde uns freundlicherweise von Prof. Lutz Birnbaumer (National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina, USA) zur Verfügung gestellt. Zur Generierung des skelettmuskelspezifischen Verlusts von *Gnai2* wurden gefloخته  $G\alpha_{i2}$ -Mäuse mit heterozygoten transgenen Myf5-Cre Mäusen verpaart. Die Heterozygotie soll dabei verhindern, dass kein alleinig durch die Präsenz des Cre-exprimierenden Transgens im Genom bedingter Phänotyp entsteht. Da das Transgen zufällig im Genom integriert ist, kann die Beeinflussung der Expression endogener Mausgene nicht ausgeschlossen werden und würde bei homozygoten transgenen Tieren eventuell phänotypische Konsequenzen haben. Im Falle eines heterozygot transgenen Tieres soll die Präsenz des Wildtyp-Alleles die unbeeinträchtigte Expression aller Gene ermöglichen und somit die unerwünschten Nebeneffekte der Transgen-Insertion verhindern (Becher et al., 2018; Laboulaye et al., 2018; Schmidt-Supprian & Rajewsky, 2007).

#### 2.2.2.2 Myf5-Cre-transgene Mäuse

Bei den in dieser Arbeit verwendeten transgenen Tieren wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des myogenen Faktors 5 (Myf5) exprimiert. Myf5 bildet zusammen mit MyoD, myogenin und MRF4 die Proteinfamilie der myogenen regulatorischen Faktoren (MRF), gilt als skelettmuskelspezifisch und konnte bisher weder in glatten Muskelzellen noch in Herzmuskelzellen nachgewiesen werden (Graves & Yablonka-Reuveni, 2000). Die Generierung einer Myf5-Cre-Mauslinie wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit beschrieben (Haldar et al., 2007). Myf5 ist essenziell für die Entwicklung der Skelettmuskulatur (Minetti et al; 2014). Daher kommt es bereits während der Embryogenese zur Expression der Cre-Rekombinase in Skelettmuskelvorläuferzellen und damit zur

Rekombination und der konsekutiven Deletion von Exon 2, 3 und 4 im *Gnai2*-Gen. Versuchstiere des Genotyps *Gnai2<sup>fl/fl</sup>*; *Myf5-Cre<sup>+tg</sup>* sollten somit eine skelettmuskelspezifische Deletion des *Gnai2*-Gens aufweisen und werden fortan mit  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$  bezeichnet. Die ebenfalls aus der Verpaarung gefloxter  $G\alpha_{i2}$ -Mäuse mit heterozygoten *Myf5-Cre*-transgenen Mäusen resultierenden Mäuse des Genotyps *Gnai2<sup>fl/fl</sup>* wurden als Geschwisterkontrollen verwendet. Tiere dieses Genotyps werden fortan mit  $G\alpha_{i2}^{fl/fl}$  bezeichnet. Bereits aus der Generierung anderer gewebspezifischer *Cre*-transgener Mäuse mit zunächst als gewebspezifisch vermuteten Promotoren ist bekannt, dass eine mittels *Cre/loxP*-System generierte Gendeletion bezüglich der gewebspezifischen Rekombination eine teilweise nur unzureichende Spezifität und Effektivität aufweisen kann (Andrusaitė & Milling, 2020; Lee et al., 2013). Eine sorgfältige Genotypisierung ist somit essentielle Grundlage zur Rückführung beobachteter Phänotypen auf den als gewebespezifisch postulierten Genotyp (Becher et al., 2018).

### 2.2.3 Genotypisierung

#### DNS-Lysepuffer

500 mM KCl

100 mM Tris/HCl pH 8,3

1 % (v/v) Tween 20

1 % (v/v) Triton X-100

500 µg/ml Proteinase K

Die Genotypisierung erfolgte an Gewebebiopsien des Ohrs, die bei der Markierung der Maus oder vom Schwanzende, die bei den Glukose- und Insulintoleranztestungen anfielen. Das Gewebe wurde hierfür mit 50 µl des DNS-Lysepuffers bei 55°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag folgte die Inaktivierung der Proteinase K durch 15-minütige Inkubation bei 95°C. Durch die

Proteinase K, eine Serinprotease, werden Zellproteine zersetzt und die DNS freigelegt. Die anschließende einminütige Zentrifugation bei 13 000 x g diente dem Absetzen verbliebener Gewebereste und ermöglichte dann das Abnehmen eines klaren Überstands mit DNS-Gehalt. Das Probenmaterial wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.2.4 Rekombinationsanalyse

#### 2.2.4.1 Gewebeentnahme

Für die Rekombinationsanalysen wurden Gewebeproben entnommen. Hierfür wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> betäubt und anschließend durch cervikale Dislokation geopfert. Für den Nachweis der gewebespezifischen Deletion wurden verschiedene Organe entnommen. Neben den Muskeln von Ober- und Unterschenkel, genauer den Musculi quadriceps femoris, gastrocnemius, soleus, plantaris, tibialis anterior, extensor digitorum longus waren dies die Musculi triceps brachii, biceps brachii und pectoralis. Nach Eröffnung des Perikards wurde das Herz entnommen, anschließend das Peritoneum eröffnet und Leber, Niere und Milz herauspräpariert. Sämtliche Muskeln und Organe wurden sofort im Anschluss an die Entnahme gewogen und zur Rekombinationsanalyse verwendet.

#### 2.2.4.2 DNS-Extraktion

Um aus den entnommenen Geweben DNS zu extrahieren, wurde das Isolate II Genomic DNS-Kit von Meridian Bioscience (Cincinnati, USA) verwendet. Das Prinzip des Kits besteht darin, das Gewebe zunächst mittels Proteinase K in Gegenwart chaotroper Salze zu lysieren. Im Anschluss wird das Lysat in Ethanol durch eine Silikat-Membran zentrifugiert. An diese Silikat-Membran bindet die DNS. Durch Waschschriffe werden nun Verunreinigungen wie Salze, Metabolite und zelluläre Komponenten entfernt um abschließend die DNS in einen Elutionspuffer zu fällen. In dieser Form kann die DNS dann analysiert werden.

Bis zur Durchführung der PCR (siehe nachfolgendes Kapitel) wurde die DNS bei -20 °C gelagert.

### 2.2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (polymerase chain reaction) dient der Amplifizierung einer bestimmten DNS-Sequenz, zum Beispiel eines bestimmten Gens oder Exons aus einer Mischung von DNS-Sequenzen. Benötigt zur Durchführung der PCR werden neben der DNS Oligonukleotide von 18 bis 25 Basenpaaren Länge. Diese als Primer fungierenden Oligonukleotide entscheiden darüber, welcher Genabschnitt amplifiziert wird, da sie spezifisch an flankierende Basensequenzen in 5'→3' (Vorwärts-Primer) - oder 3'→5'-Richtung (Rückwärts-Primer) dieses Abschnittes binden. Die Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) dATP, dCTP, dGTP und dTTP sowie eine hitzestabile DNS-Polymerase werden hinzugegeben. Das Prinzip der PCR besteht darin, dass DNS denaturiert wird, sich anschließend Primer an die ihnen komplementären Basensequenzen anlagern und es dann mittels Polymerase und der dNTPs zur Elongation des DNS-Stranges, sowohl vom 5' als auch vom 3' Ende des DNS-Stranges aus, kommt. Wird dieser Zyklus nun oft wiederholt, kommt es zu einem exponentiellen Anstieg der DNS-Menge des amplifizierten Genabschnittes. Durch die Vervielfachung der DNS-Menge erhöht sich die Sensitivität der nachfolgenden Verfahren, die das Ziel haben, die DNS nachzuweisen.

Für die PCR der aus dem Gewebe gewonnenen DNS wurde unter Verwendung des TopTaq-Mastermix Kit (Qiagen GmbH, Deutschland), welches die DNS-Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphate enthielt, folgender Ansatz hergestellt:

Substanz	Stock	Menge
Master Mix	2x	12,5 µl
Primer Gi2LoxR	10 µl	1 µl
Primer Gi2LoxF2neu	10 µl	1 µl

## Material und Methoden

---

H <sub>2</sub> O bidest		10,5 µl
DNS		1 µl

Nun wurde folgender Zyklus im Eppendorf PCR-Thermoblock (Mastercycler gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) durchlaufen:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94 °C	15 min	} 34-mal
Denaturierung	94 °C	3 min	
Primeranlagerung	64 °C	1 min 30s	
Elongation	72 °C	2 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	
Ende	4 °C	∞	

Bei 94°C denaturiert die DNS und liegt dann als Einzelstrang aufgetrennt vor. Bei 64°C binden die Primer an die ihnen komplementäre DNS-Sequenz. Bei 72 °C erfolgt die Elongation, das heißt, zu jedem Einzelstrang wird ein Komplementärstrang durch das Anheften von Nukleotiden durch die Polymerase synthetisiert.

Nach selbem Prinzip aber leicht veränderten Protokollen erfolgte die Genotypisierung. Für die G $\alpha$ <sub>12</sub>-flox PCR wurde das TopTaq-Mastermix Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) mit folgendem Ansatz verwendet:

Substanz	Stock	Menge
Master Mix	2x	12,5 µl
Primer Gi2LoxR	10 µM	0,5 µl
Primer Gi2LoxF	10 µM	0,5 µl
H <sub>2</sub> O bidest		10,5 µl
DNS		1 µl

## Material und Methoden

---

Durchgeführt wurde die PCR nach folgendem Protokoll im Eppendorf PCR-Thermoblock (Mastercycler gradient, Eppendorf AG):

Vorgang	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	} 34-mal
Denaturierung	94 °C	30 s	
Primeranlagerung	60 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	
Ende	4 °C	∞	

Die PCR zum Nachweis der Myf5-Cre Expression wurde unter Verwendung des TopTaq-Mastermix Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach folgendem Ansatz vorbereitet:

Substanz	Stock	Menge
Master Mix	2x	12,5 µl
Primer myfor	20 µM	0,75 µl
Primer myrev	20 µM	0,75 µl
Primer mymut	20 µM	0,75 µl
H <sub>2</sub> O bidest		9,25 µl
DNS		1 µl

Durchgeführt wurde die PCR nach folgendem Protokoll im Eppendorf PCR-Thermoblock (Mastercycler gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland):

Vorgang	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	} 35-mal

## Material und Methoden

---

Denaturierung	94 °C	30 s	
Primeranlagerung	68 °C	1 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	2 min	
Ende	10 °C	∞	

### 2.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese und QIAxcel System

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren, bei dem die negativ geladenen Nukleosinsäurestränge der Größe nach aufgetrennt werden. Die Auftrennung erfolgt dadurch, dass bei angelegter Spannung die negativ geladenen DNS-Fragmente umso schneller durch die Poren des Agarosemolekülgitters dem Plus-Pol entgegenwandern, je kleiner sie sind.

Zur Herstellung des Gels wurden 0,8 % Agarose in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst.

#### 1 x TAE-Puffer

40 mM Tris/HCl pH 8,4

20 mM Essigsäure

1 mM EDTA

Anschließend wurden 5 µl/ml Ethidiumbromid hinzugefügt. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNS und sorgt für eine verstärkte Fluoreszenz dieser nach Anregung mit ultraviolettem Licht, sodass die Stellen des Gels, in denen DNS vorliegt, dann hell aufleuchten. Die PCR-Produkte wurden mit 10 % 10 x CoralLoad PCR-Puffer versetzt und 5 µl auf das Gel geladen. Um einen Größenvergleich zu erhalten und die Nukleinsäure-Fragmente zuordnen zu können, wurden zusätzlich 2,5 µl eines DNS-Größenstandards (GenLadder 1kb, Genaxxon Bio Science, Ulm, Deutschland) aufgetragen.

Dem Gel wurde eine Spannung von 5 bis 10 V/cm für 45-90 min angelegt und somit die dortige Auftrennung des DNS-Gemischs mit den enthaltenen PCR-



Produkten erwirkt. Die Auswertung des Gels erfolgte mit dem Luminescent Image Analyzer VersaDoc™ MP-4000 System (Bio-Rad Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland).

### **2.2.5 Gewebeentnahme und Bestimmung von Muskel- und Organgewichten**

Zur Bestimmung des Muskel- und Organgewichts wurden männliche Mäuse im Alter von 21, 30 bzw. 65 Wochen mit CO<sub>2</sub> betäubt und anschließend durch cervikale Dislokation geopfert. Die zu isolierenden Muskeln und Organe wurden sofort im Anschluss an die Entnahme gewogen. Die zur weiteren Untersuchung bestimmten Gewebe wurden direkt im Anschluss der im Abschnitt 2.2.7.1 dargestellten Behandlung zugeführt.

### **2.2.6 Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.2.6.1 Gewinnung von Organ- und Zell-Lysaten**

Die Gewinnung von Proteinen aus den dafür bestimmten Geweben der geopfert Mäuse begann mit der Homogenisierung von intaktem Gewebe in einem dafür hergestellten SDS Lysepuffer.

#### **SDS Lysepuffer**

21 mM Tris/HCl pH 8,3

0,67 % SDS

283 mM 2-Mercaptoethanol

0,2 mM PMSF

Der nach anschließender Zentrifugation bei 13.000 rpm erhaltene Überstand wurde abpipettiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Da dieses Verfahren für die Proteingewinnung aus Fettgewebe nicht geeignet ist, wurde für dieses Gewebe ein anderes Vorgehen gewählt und hierbei zur

## Material und Methoden

---

Vermeidung von Proteinabbau alle Schritte bei 4 °C durchgeführt. Die Homogenisierung des noch intakten Gewebes erfolgte in dafür hergestelltem TN Puffer.

### **TN Puffer**

20 mM Tris/HCl pH 7,5

0,1 M NaCl

2,5 mM EDTA

0,2 mM PMSF

1 Tablette Protease Inhibitor (Roche, Penzberg, Deutschland)

Nach einminütiger Zentrifugation bei 1.000 rpm erfolgte das Abpipettieren des Überstandes und die Lagerung bei -80 °C.

### **2.2.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Die Quantifizierung der in den Zell-Lysaten enthaltenen Proteine erfolgte nach der Methode von Bradford. Zu diesem Zweck wurden Verdünnungsreihen der Lysate angelegt und ebenso wie ein als Referenz dienender Albumin Standard (entnommen aus dem Micro BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific, Rockford, USA) mit Bradford-Farbstoff (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad-Laboratories, München) versetzt. Das Verhältnis betrug hier 25 µl Probe auf 225 µl des 1:6 verdünnten Farbstoffkonzentrates. Das in der Bradford-Lösung enthaltene Coomassie-Brillant-Blau hat die Eigenschaft, in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Proteinseitenketten Komplexe zu bilden und dabei sein Absorptionsspektrum von einem Maximum bei 450 nm im ungebundenen Zustand hin zu einem Maximum bei 595 nm zu verschieben.

Nach Auftragung des Lysat-Farbstoffgemisches auf eine Mikrotiterplatte erfolgte daher die Messung der optischen Dichte bei 595 nm im Mikroplatten-Photometer (Tecan, Crailsheim, Deutschland) und Auswertung durch Vergleich zur Albumin-Standard-Kurve.

### 2.2.6.3 Urea Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zum Zweck der Auftrennung des im Zell-Lysat enthaltenen Proteingemisches und dem anschließenden Nachweis des  $G_{\alpha 12}$  Proteins wurde eine Urea Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Gelmatrix in Polyacrylamid-haltigen Gelen bewirkt nach Anlegen einer elektrischen Spannung eine Auftrennung der Proteine in Abhängigkeit von der Molekülgröße jedes Proteins. Neben der Molekülgröße dient zudem die elektrische Ladung der Proteine, abhängig insbesondere von deren Seitenkettenladungen, als Grundlage für die Auftrennung in der Elektrophorese (Maizel, 1971). Die Zugabe von Harnstoff als Wasserstoffbrücken-spaltendes und somit denaturierendes Reagenz führt zur Stabilisierung der Konformität und erhöht zudem den friktionellen Koeffizienten sodass die Auflösung des Verfahrens gesteigert wird (Smith, 1984). Aufgrund des über alle 3 Isoformen hinweg beinahe identischen Molekulargewichts von ca. 40 kDa der  $G_i$ -Proteine bei jedoch unterschiedlichen Seitenketten mit unterschiedlicher elektrischer Ladung (Hepler & Gilman, 1992), gelingt eine Auftrennung der Isoformen nur in einem Harnstoffgel.

Vor Beladung des Polyacrylamid-Gels wurden die im Zell-Lysat enthaltenen Proteine so mit  $H_2O$  bidest. und 4-fach konzentrierter Lämmli-Lösung versetzt, dass letztere nur noch 1,5-fach konzentriert vorlag.

#### 4 x Lämmli-Probenpuffer

250 mM Tris/HCl pH 6,8

40 % Glycerol

23 % 2-Mercaptoethanol

4 % SDS

0,08 % Bromphenolblau

20  $\mu$ l dieses Gemisches wurden schließlich in die Taschen des großporigen Sammelgels gegeben. Aufgrund des höheren Acrylamid- und Bisacrylamid-Gehaltes feinporigerer Trenngele erfolgte bei angelegter Spannung von 100 V dann für ca. 2-3 Stunden die eigentliche Elektrophorese.

### **Sammelgel**

3 % Acrylamid/Bisacrylamid (Verhältnis 150:1)

111 mM Tris/HCl pH 6,8

0,1 APS (Ammoniumperoxidsulfat)

0,1 % TEMED

### **Trenngel**

9,26 M Harnstoff

14,1 % Acrylamid/Bisacrylamid (Verhältnis 200:1)

580 mM Tris/Base pH 8,8

0,04 % APS (Ammoniumperoxidsulfat)

0,04 % TEMED

### **2.2.6.4 Immunoblot-Analyse**

Die mittels Urea-PAGE aufgetrennten Proteine müssen, um den Nachweis mittels spezifischer Antikörper zu ermöglichen, vom Gel auf eine Membran transferiert werden. Es wurde zu diesem Zwecke das Semi-Dry-Transfer-System (Towbin et al., 1979) verwendet und folgender Stapel aus Filterpapier, Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membran (Merck Millipore, Molsheim, Frankreich) und Gel aufgebaut: Anode, sechs Filterpapiere gesättigt mit Anodenpuffer I, drei Filterpapiere gesättigt mit Anodenpuffer II, PVDF-Membran, Gel, neun Filterpapiere gesättigt mit Kathodenpuffer, Kathode.

#### **Anodenpuffer I**

300 mM Tris/Base

40 % Methanol

#### **Anodenpuffer II**

25 mM Tris/Base

40 % Methanol

#### **Kathodenpuffer I**

25 mM Tris/HCl

## Material und Methoden

---

40 mM Glycin  
10 % Methanol

Nachdem für eine Stunde Strom der Stärke 60 mA angelegt wurde, erfolgte das Anfärben der Proteine auf der Membran mit Ponceau-S-Lösung. Die reversible Bindung des in dieser Lösung enthaltenen Farbstoffes an Proteine ermöglicht eine erste Kontrolle, ob es im Rahmen der Elektrophorese zu einer Auftrennung der Proteine mit konsekutiver Laufbanden-Bildung kam. Nach Entfernen der Ponceau-S-Lösung mittels H<sub>2</sub>O bidest. wurde die Membran für eine Stunde in einer aus TBS-T und 5%-iger Magermilchpulver-bestehenden Blockpufferlösung inkubiert und somit für eine Absättigung der unspezifischen Antikörperbindungsstellen gesorgt.

### **TBS-T**

50 mM Tris/HCl pH 7,5  
150 mM NaCl  
0,1 % Tween-20

Nach anschließendem Waschen in TBS-T erfolgte die Inkubation in einer mit dem jeweiligen Antikörper versetzten Lösung aus TBS-T und 5 % BSA über Nacht. Neben der Verwendung spezifischer anti-G $\alpha_{i1/i2}$ -Antikörpern wurden zum Zweck des Nachweises der Gesamtproteinladung anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper eingesetzt (Gohla et al., 2007; Leiss et al., 2014; Leopoldt et al., 1997; Rudolph et al., 1995). Am darauffolgenden Tag wurde die Membran nach drei weiteren Waschschritten in 1,5 % Magermilchpulver in TBS-T mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Drei sich anschließende Waschschrritte in TBS-T sorgten für die Entfernung von nicht gebundenen Antikörpern. Die Detektion erfolgte schließlich mittels Chemolumineszenz unter Verwendung des ECL-Kit (ECL Western Blotting Detection System, GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland). Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert das im ECL-Kit enthaltene Luminol, wodurch Lichtsignale erzeugt werden. Nach einminütiger Inkubation der

im Verhältnis 1:1 auf die Membran aufgetragenen Lösungen A und B erfolgte die Auswertung und Dokumentation mit Hilfe einer CCD-Kamera am Versa-Doc Luminescent Image Analyzer VersaDoc™ MP-4000 System (Bio-Rad Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland) und durch Auflegen eines Chemolumineszenz-sensitiven Röntgenfilms. Die semiquantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe der Image Lab Software (Bio-Rad Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland) (Leiss et al., 2020).

### **2.2.7 Histologische Methoden**

#### **2.2.7.1 (Muskel-)Gewebeeinbettung**

Um eine hochqualitative Schnitthanfertigung zu ermöglichen, muss während des Gefrierprozesses die Eiskristallbildung im Muskelgewebe minimiert werden. Eiskristallbildung wird durch einen langsamen Gefrierprozess und hohen Wassergehalt des Gewebes begünstigt. Die Muskeln wurden daher unmittelbar nach der Entnahme mit Tissue-Tek dünn bedeckt und in Isopenthan, welches in einem Metallbecher über flüssigem Stickstoff zuvor auf ca. -70 °C gekühlt wurde, für 10 bis 20 Sekunden gefroren. Anschließend erfolgte die Überführung mittels auf Eis gelagerter Pinzette in ebenfalls vorgekühlte Tubes und die Zwischenlagerung auf Trockeneis, bevor es zur abschließenden Verwahrung bei -80 °C gelagert wurde.

#### **2.2.7.2 Kryotomie**

Aus den gefrorenen und in Tissue-Tek eingebetteten Gewebeproben wurden mit Hilfe des Kryostats der Firma Microm jeweils 8 µm dicke Serienschnitte hergestellt. Dabei wurden pro Muskel vier aufeinander folgende Transversalschnitte auf einen Objektträger gezogen. Der Vorgang der Kryotomie erfolgte bei der für Muskelgewebe optimalen Temperatur von -20 °C. Anschließend erfolgte die Trocknung der Schnitte für zwei Stunden im 37 °C-Inkubator sowie die Verwahrung im -80 °C Gefrierschrank bis zur weiteren Verarbeitung.

### 2.2.7.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine der am häufigsten verwendeten Übersichtsfärbungen. Hämatoxylin färbt in seiner Eigenschaft als basischer Farbstoff basophile beziehungsweise saure Strukturen wie zum Beispiel Nukleinsäuren über eine bisher noch unverstandene Reaktion lila während Eosin als saurer Farbstoff acidophile und somit basische Strukturen, wie zum Beispiel Zellplasmaproteine, rosa anfärbt (Fischer et al., 2008).

Der zu färbende Schnitt wurde auf seinem Objektträger zunächst fünf Minuten in Leitungswasser inkubiert und dann für zehn Sekunden mit Hämatoxylin gefärbt. Die blau-violette Färbung erfolgte anschließend durch Waschschriffe mit Leitungswasser sowie einer einminütigen Inkubation mit dem basischen 0,1%-igen Ammoniumhydroxid und dem dadurch erzielten pH-Wert-Wechsel. Nach weiteren Waschschriffen mit Leitungswasser wurden die Schnitte für 10 min in 0,1%-iger Eosinlösung inkubiert. Es folgten fünf weitere kurze Waschschriffe mit Leitungswasser und anschließend die Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe (80 % und 100 %) und Toluol (100 %). Abschließend wurden die Schnitte mit Einschlusmittel (Roti®Histokit) eingedeckelt und über Nacht getrocknet. Die Lagerung fand bei Raumtemperatur statt.

### 2.2.8 Insulin-ELISA

Zur Insulinkonzentrationsbestimmung in den Plasmaproben des Glukosetoleranztests (siehe Kapitel 2.2.9.3) wurde ein ultra-sensitiver Insulin-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Hersteller-Protokoll (Mercoxia, Uppsala, Schweden). Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, dass zwei unterschiedliche monoklonale Antikörper an das Insulinmolekül binden. Der erste dieser Antikörper ist an die Vertiefung in der Pipettierplatte gebunden. Wird das Plasma aus dieser Platte dann entfernt, verbleiben die Insulinmoleküle somit über den ersten Antikörper an die Pipettierplatte gebunden. Der zweite Antikörper ist Peroxidase-konjugiert

und bindet an anderer Stelle an das Insulinmolekül. Nun wird Substrat für die Peroxidase hinzugegeben und bei einer Längenwelle von 450 nm die Absorption gemessen. Der Schluss von der Absorption auf die Insulinkonzentration erfolgt mit Hilfe einer Kalibratorkurve. Diese bildet die Absorption ab, die bei den Kalibratoren mit fest definierten Insulinmengen entsteht.

### **2.2.9 *In vivo* Analyse der Mäuse nach Myf5-Cre vermittelter Deletion von $G\alpha_{i2}$**

#### **2.2.9.1 Gewichtsentwicklung**

Zur Bestimmung des Körpergewichts und zur Verfolgung der Gewichtsentwicklung wurden männliche  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO-}$  und Geschwisterkontrolltiere, beginnend mit dem Absetzen von den Muttertieren im Alter von circa drei Wochen bis zu einem Alter von 52 Wochen wöchentlich gewogen.

#### **2.2.9.2 Analyse der Futteraufnahme**

Die Quantifizierung der durchschnittlich täglich aufgenommenen Futtermenge erfolgte durch Messung der Differenz zwischen dem Futter zu Beginn des Versuches und des noch vorhandenen Futters nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden. Um eventuelle Anpassungsartefakte zu eliminieren, wurde dabei nur der dritte Tag als relevant angesehen und statistisch ausgewertet.

#### **2.2.9.3 Intraperitonealer Glukosetoleranztest**

Zur Bestimmung der Glukoseverwertung der männlichen Tiere, wurden intraperitoneale Glukosetoleranztests im Alter von acht beziehungsweise 20 Wochen durchgeführt. Um gleiche Ausgangssituationen für alle Versuchstiere zu schaffen, wurden die Tiere zunächst für zwölf Stunden nüchtern gesetzt. Nach Ablauf der zwölf Stunden wurden 1-2 mm des distalen Schwanzendes entfernt, um aus den Schwanzvenen Blut entnehmen zu können, anschließend der Blutzucker (Contour®, Bayer) gemessen, 50  $\mu$ l Blut in ein Lithium-Heparin-



Röhrchen (Microvette CB 300 LH, Sarstedt) abgenommen und 2 g/kg Körpergewicht Glukose intraperitoneal injiziert. Blutzuckermessungen und Blutentnahmen aus der Schwanzvene erfolgten konsekutiv nach 15, 30, 60 und 120 Minuten. Die befüllten Lithium-Heparin-Röhrchen wurden sofort nach der Blutentnahme auf Eis gelagert und im Anschluss an den Versuch bei 4 °C und 1000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand, sprich das Plasma, wurde in Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C bis zur Bestimmung der Insulinkonzentration gelagert.

### **2.2.9.4 Insulintoleranztest**

Jeweils zwei Wochen nach dem Glukosetoleranztest wurden die männlichen Versuchstiere für den Insulintoleranztest verwendet. Nach einer Nüchtern-Periode von vier Stunden, um bei allen Tieren die gleiche Ausgangssituation zu gewährleisten, wurden am distalen Ende 1-2 mm der Schwanzspitze gekappt, um aus den Schwanzvenen einen Tropfen Blut entnehmen zu können, und der basale Blutzucker bestimmt. Anschließend erfolgte die intraperitoneale Verabreichung von 1 U/kg Körpergewicht Normalinsulin. Die Blutzuckerbestimmung fand dann nach jeweils 15, 30, 60 und 120 Minuten statt. Im Anschluss an den Versuch wurde den Mäusen wieder freier Zugang zum Futter gewährt.

### **2.2.10 Statistische Methoden**

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms GraphPad Prism (Version 5.01, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Alle Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  SD (Standard Deviation) aufgeführt. Die Signifikanzlevel wurden mithilfe des Student t-Tests ermittelt. Ausnahme hiervon stellt die Auswertung der Verteilung von Geschlecht und Genotyp in der Wurfanalyse dar. Hier wurde ein zweiseitiger Fisher-Test angewandt.

## 3 Ergebnisse

Global  $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse haben trotz niedrigerer Plasmainsulinspiegel die gleiche Glukosetoleranz wie ihre Geschwisterkontrollen (Leiss et al., 2014). Dies könnte zum einen auf ein niedrigeres Körpergewicht zurückzuführen sein, aber auch durch eine verbesserte Insulinsensitivität der peripheren insulin-abhängigen Gewebe verursacht werden. Die Skelettmuskulatur ist das am stärksten Insulin-sensitive Gewebe (Chadt & Al-Hasani, 2020). Mit dem Ziel die Funktion des  $G\alpha_{i2}$ -Proteins spezifisch im Skelettmuskel hinsichtlich Glukosehomöostase und Skelettmuskelmorphologie zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Mäuse analysiert, welche Myf5-Cre vermittelt einer konditionalen Deletion von *Gnai2* unterworfen waren. Tiere dieses Genotyps werden im Folgenden als  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$  bezeichnet. Die Generierung wurde in Kapitel 2.2.2 beschrieben.

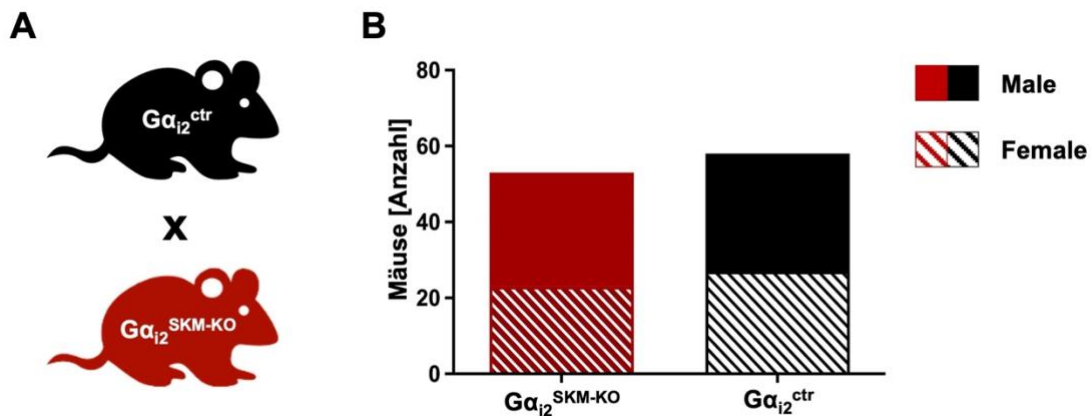
### 3.1 Wurfanalyse

Die in vorhergehenden Arbeiten beschriebene globale Gendeletion von *Gnai2* bewirkte eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte postnatale Letalität von bis zu 50 % bis zum 21. postpartalen Tag (Gohla et al., 2007; Rudolph et al., 1995). Auch wenn in nachfolgenden Arbeiten nachgewiesen werden konnte, dass die Haltung in spezifisch-pathogen-freier (SPF-) Tierhaltung eine deutliche Reduktion der Letalität der  $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tiere mit sich bringt (Wiege et al., 2013), so zeigten sich auch noch nachfolgend Hinweise auf eine am ehesten Lungenfunktions-assoziierte Erhöhung der perinatalen Sterblichkeit (Novacki, 2015). Aufgrund der zentralen Rolle der Skelettmuskeln für den Atmungsprozess ist eine negative Auswirkung einer skelettmuskelspezifischen  $G\alpha_{i2}$ -Defizienz auf die Lungenfunktion und auch auf die peri- und postnatale Sterblichkeit möglich und bedarf daher genauerer Untersuchung. Aus diesem Grund wurden sowohl Wurfgrößen als auch Geschlechter- und Genotypverteilung analysiert. Bei der vorgenommenen Verpaarung jeweils einer Maus des Genotyps *Gnai2<sup>fl/fl</sup>*; Myf5-Cre<sup>+tg</sup> mit einer Maus des Genotyps *Gnai2<sup>fl/fl</sup>* wäre bei fehlender

## Ergebnisse

Auswirkung der Myf5-Cre vermittelten Gendefizienz auf die peri- und postnatale Sterblichkeit eine Gleichverteilung des Nachwuchses vom Genotyp  $Gnai2^{fl/fl}$ ; Myf5-Cre<sup>+tg</sup> und vom Genotyp  $Gnai2^{fl/fl}$  zu beobachten.

Die Mäuse wurden, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, Inzucht-verpaart und der Nachwuchs nach drei Wochen von den Muttertieren getrennt. Nach diesen drei Wochen erfolgte die Markierung der Tiere und die Registrierung von Wurfgröße und Geschlecht. In den Würfen, die im Rahmen der Wurfanalyse betrachtet wurden, konnten zum Zeitpunkt des Absetzens vom Muttertier insgesamt 110 Nachkommen aus insgesamt 14 Würfen (durchschnittlich 7,9 Tiere pro Wurf) gezählt werden. Die durchschnittliche Wurfgröße lag somit im Bereich dessen, was für Mäuse des C57BL/6-Stamms vorbeschrieben ist (Fairless et al., 2012; Silver, 1995). Die Geschlechterverteilung lag bei 47,8 % Weibchen und 52,2 % Männchen und entsprach damit in etwa der zu erwartenden 50 % für das jeweilige Geschlecht. Auch der Blick auf die Verteilung der Genotypen zeigt keine signifikante Abweichung von der zu erwartenden Gleichverteilung der Genotypen: 45,0 % waren  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$ -Mäuse. Den Genotyp  $Gnai2^{fl/fl}$ ; Myf5-Cre<sup>+tg</sup> zeigten 55,0 % der Tiere (siehe Abb. 6).



**Abbildung 6: Reproduktionsanalyse nach Verpaarung von  $G\alpha_{i2}^{fl/fl}$  (■)- und  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$  (■)-Mäusen**

Dargestellt ist das Verpaarungsschema (A) sowie die Geschlechter- und Genotyp-Verteilung vom Nachwuchs (B) nach Verpaarung von  $G\alpha_{i2}^{fl/fl}$  (■)- mit  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$  (■)- Maus (n=110). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Geschlechter- oder Genotyp-Verteilung

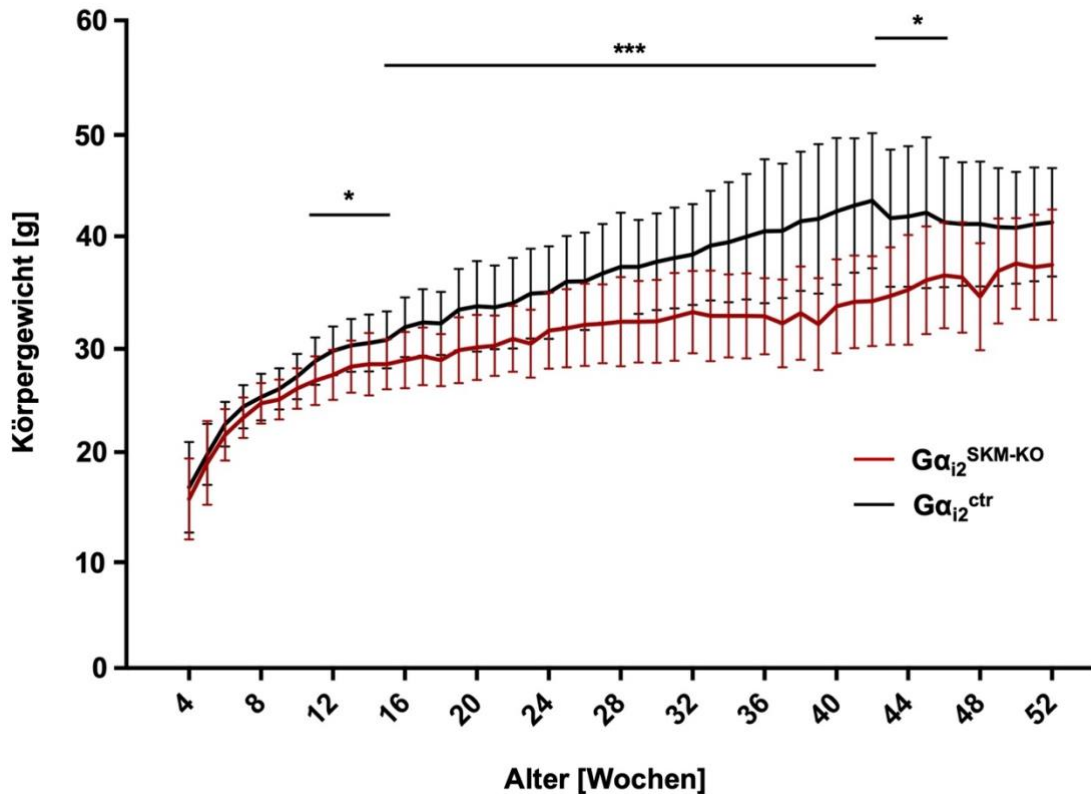
### 3.2 Gewichtsverlauf

Die in der Literatur beschriebene Phänotypisierung nach globaler *Gnai2*-Deletion zeigte eine mit Verlust von  $G\alpha_{i2}$  einhergehende Reduktion des Gesamtkörpergewichtes und der lean-body-mass (Leiss et al., 2014; Minetti et al., 2014). Die vorbeschriebene eingehendere Untersuchung der Musculi gastrocnemius, quadriceps femoris und soleus mündete ebenfalls in der Beobachtung einer Gewichtsreduktion (Minetti et al., 2014). Im Zuge der hier vorliegenden Arbeit wurde daher der Vermutung einer insgesamt signifikant reduzierten Muskelmasse bei dadurch bedingt reduziertem Körpergewicht nachgegangen. Zu diesem Zweck erfolgte sowohl die Messung des Gewichtsverlaufes der Mäuse über einen Zeitraum von circa einem Jahr (siehe Abb. 7) als auch der Vergleich des Gewichts von Muskeln (siehe Abb. 9 und 10) und diverser Organe (siehe Abb. 11) nach Sektion der Tiere.

Das Körpergewicht beider Kohorten vergleichend zeigte sich von Beginn an eine Divergenz. Die Tiere der  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ -Gruppe waren dabei leichter als ihre Geschwisterkontrollen. Eine signifikante Differenz des Körpergewichtes der  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ -Kohorte im Vergleich zur Kontrollgruppe war allerdings erst ab der zehnten Lebenswoche der Tiere zu verzeichnen (siehe Abb. 7 und 8).

Die dann einsetzende Divergenz des Körpergewichtes weitete sich im weiteren zeitlichen Verlauf jedoch sowohl in den absoluten Zahlen als auch in der relativen Sicht beständig aus: Im Alter von zehn Wochen waren die Tiere der  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ -Gruppe durchschnittlich noch lediglich 4 % leichter als die Mäuse der Kontrollgruppe. Zum Zeitpunkt der maximalen Differenz präsentierte sich die Kohorte der  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ -Gruppe im Mittel über 25 % respektive beinahe 10 g leichter im Vergleich zur  $G\alpha_{i2}^{\text{fl/fl}}$ -Gruppe (siehe Abb. 8). Der beständige Zuwachs zu dieser Divergenz erfährt erst zum Zeitpunkt der 42. Lebenswoche mit dann auch sinkender Zahl der in den Versuch einbezogenen Tiere einen Abbruch.

## Ergebnisse



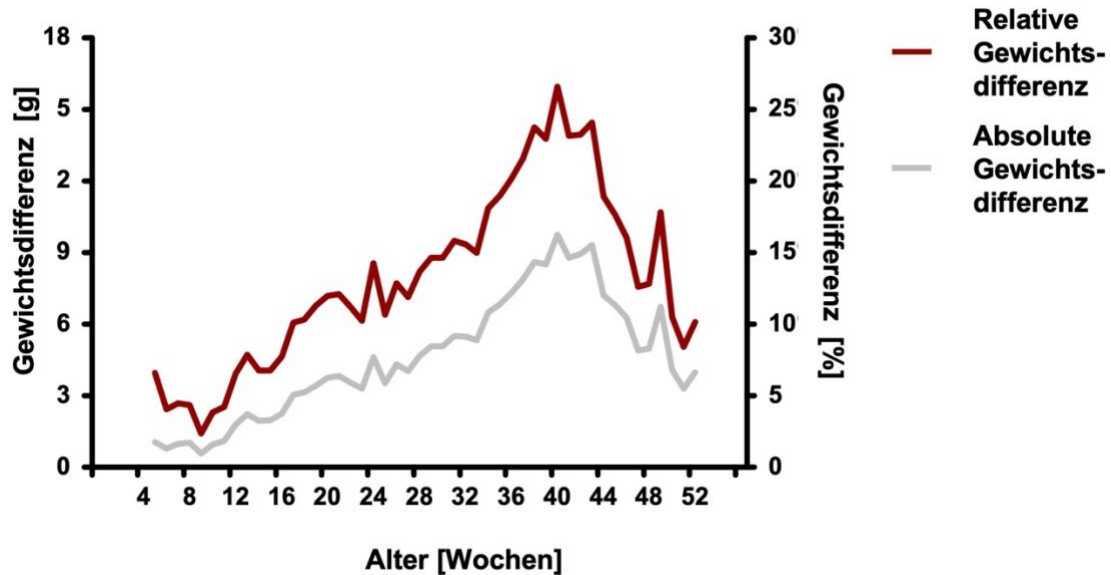
**Abbildung 7: Durchschnittliches Körpergewicht im zeitlichen Verlauf**

Ab einem Alter von drei Wochen wurden die Tiere wöchentlich gewogen. Dargestellt sind die Mittelwerte des Gewichts  $\pm$  SD von jeweils 8 - 44 männlichen Tieren der  $G\alpha_{i2}^{fl/fl}$  (■)- und  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$  (■)-Kohorte. Die Gruppe der  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$  (■)-Tiere zeigte ein durchgängig geringeres Körpergewicht im Vergleich zur  $G\alpha_{i2}^{fl/fl}$  (■)-Gruppe, mit einer Differenz, welche zu verschiedenen Zeitpunkten Signifikanz erreichte. (\* entspricht  $p < 0,05$ , \*\*\* entspricht  $p < 0,001$ )

Wird das Gewicht der geopferten Tiere als konstanter Wert in die statistische Auswertung auch nach ihrem Tod mit einbezogen so stabilisieren sich die Gewichtsunterschiede etwas unter dem Niveau der 42. Woche und führen zu

## Ergebnisse

einem beständigen Signifikanzniveau unter 0,001 bis zum Ende der Messungen nach 52 Wochen.



**Abbildung 8: Divergenz des Körpergewichtes der  $G\alpha_{i2}^{fl/fl}$  - und  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$ -Kohorte im zeitlichen Verlauf**

Dargestellt ist die Differenz der Mittelwerte der  $G\alpha_{i2}^{fl/fl}$  - und  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$ -Kohorte in absoluten Zahlen (---) und relativ (---) zum Körpergewicht der leichteren  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$ -Kohorte. Ab einem Alter von 12 Wochen bis zur 42. Lebenswoche zeigt sich eine fortschreitende Divergenz des Körpergewichtes zwischen den Tieren der  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$ -Kohorte im Vergleich mit der Gruppe der  $G\alpha_{i2}^{fl/fl}$  Tiere.

Als Ursache dieses beträchtlichen Unterschiedes des Körpergewichtes, könnte eine Differenz der Muskelmasse in Betracht kommen.  $G\alpha_{i2}$  ist im Skelettmuskel für die Differenzierung von Satellitenzellen, deren Fusion mit Myotuben sowie der Hypertrophie der Myotuben und somit des Muskels von Bedeutung (Minetti et al., 2011). Eine globale Deletion von *Gnai2* sowie die Ausschaltung des Genes in Satellitenzellen mittels short-hairpin-(sh-)RNA führte in durchgeführten Studien sowohl zu absolut als auch relativ zum Körpergewicht reduzierter Muskelmasse, Defekten in der Regeneration verletzter Muskeln und verringerter lean-body-mass (Minetti et al., 2014). Um mögliche Unterschiede in Bezug auf die

## Ergebnisse

---

Muskelmasse zu detektieren, erfolgte daher von Mäusen im Alter von 20, 31 und 65 Wochen die Entnahme wichtiger Skelettmuskeln und die Bestimmung deren Gewichts. Eine Übersicht über die analysierten Muskeln zeigt Abbildung 9A.

Dabei zeigten sich fast ausschließlich bei den 65 Wochen alten Tieren signifikante Unterschiede im Vergleich der absoluten Muskelmasse. Diese fielen allerdings so deutlich aus, dass auch bei einer kleinen Fallzahl von  $n=6$  im Vergleich mehrerer Muskeln  $p<0,01$  ausfiel (Siehe Abb. 9D). Die in dieser Alterskohorte um 20,6 % niedrigere Muskelmasse aller entnommenen Muskeln der  $G_{\alpha_{i2}}^{\text{SKM-KO}}$ -Tiere im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe wird allerdings durch das deutlich geringere Gesamtkörpergewicht der  $G_{\alpha_{i2}}^{\text{SKM-KO}}$ -Tiere relativiert. So waren die  $G_{\alpha_{i2}}^{\text{SKM-KO}}$ -Tiere im Alter von 65 Wochen im Durchschnitt 8,57 g beziehungsweise bis zu 26,5 % leichter als diejenigen der Kontrollgruppe. Dies bestätigt prinzipiell das Bild des bis einschließlich zur 52. Lebenswoche durchgeführten Vergleiches vom Körpergewicht der  $G_{\alpha_{i2}}^{\text{SKM-KO}}$ -bzw.  $G_{\alpha_{i2}}^{\text{fl/fl}}$ -Gruppe. Allerdings zeigte sich hier zuletzt nur noch eine Differenz von circa 4 Gramm beziehungsweise ca. 10 % zwischen den verglichenen Kohorten mit geringerem Gewicht der  $G_{\alpha_{i2}}^{\text{SKM-KO}}$ -Gruppe (siehe Abb. 8). Die nach Sektion in die Analyse der Muskelmasse einbezogenen Tieren weisen hingegen eine deutlich stärkere Divergenz des Körpergewichtes auf.

# Ergebnisse

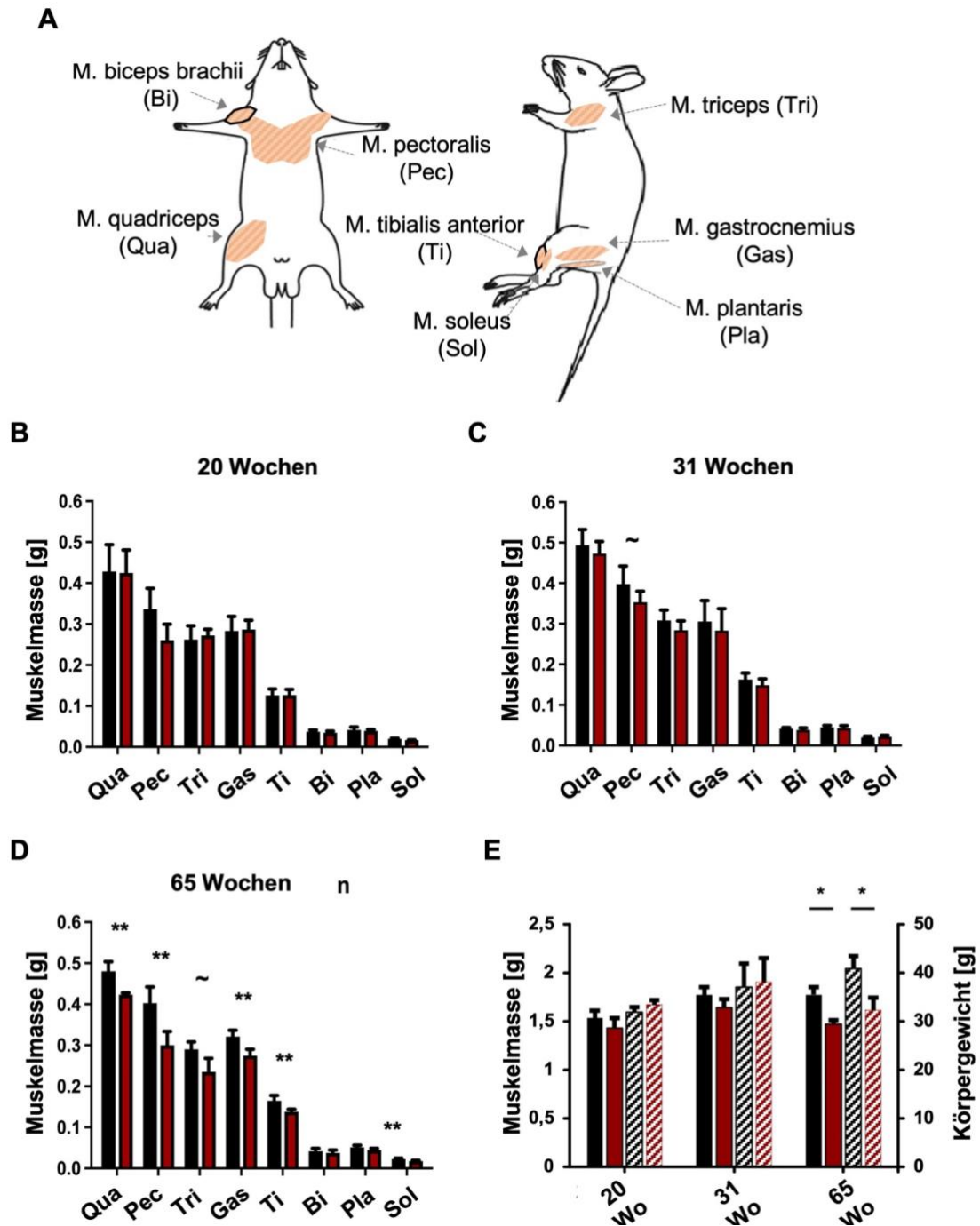


Abbildung 9: Darstellung der entnommenen Muskeln (A) und deren Gewicht im zeitlichen Verlauf (A-E)

(A) Zur Bestimmung des Muskelgewichts wurden die dargestellten Muskeln direkt nach dem Tod der Tiere entnommen und umgehend gewogen.

→ Fortsetzung siehe folgende Seite



## Ergebnisse

(B-D) Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der Muskelarten sowie (E) die Summe der Muskelmasse der einzeln entnommenen Muskeln von jeweils 4-8 männlichen Tieren der  $G\alpha_{i2}^{T/Fl}$  (■)- und  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$  (■)-Kohorte sowie deren durchschnittliches Körpergewicht (jeweils schraffiert). Signifikante Gewichtsunterschiede im Vergleich beider Gruppen zeigten sich dabei ausschließlich im Alter von 65 Wochen. (~:  $p < 0,1$ ; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ )

(Qua – *M. quadriceps femoris*, Pec – *M. pectoralis*, Tri – *M. triceps brachii*, Gas – *M. gastrocnemius*, Ti – *M. tibialis anterior*, Bi – *M. biceps brachii*, Pla – *M. plantaris*, Sol – *M. soleus*)

Folgerichtig lässt sich bei der Ermittlung der Muskelmasse in Relation zum Körpergewicht keine signifikante Differenz nachweisen. Dies gilt sowohl bei Betrachtung aller einzelnen Muskeln als auch in Hinblick auf die Summe aller entnommenen Muskeln (Siehe Abb. 10).

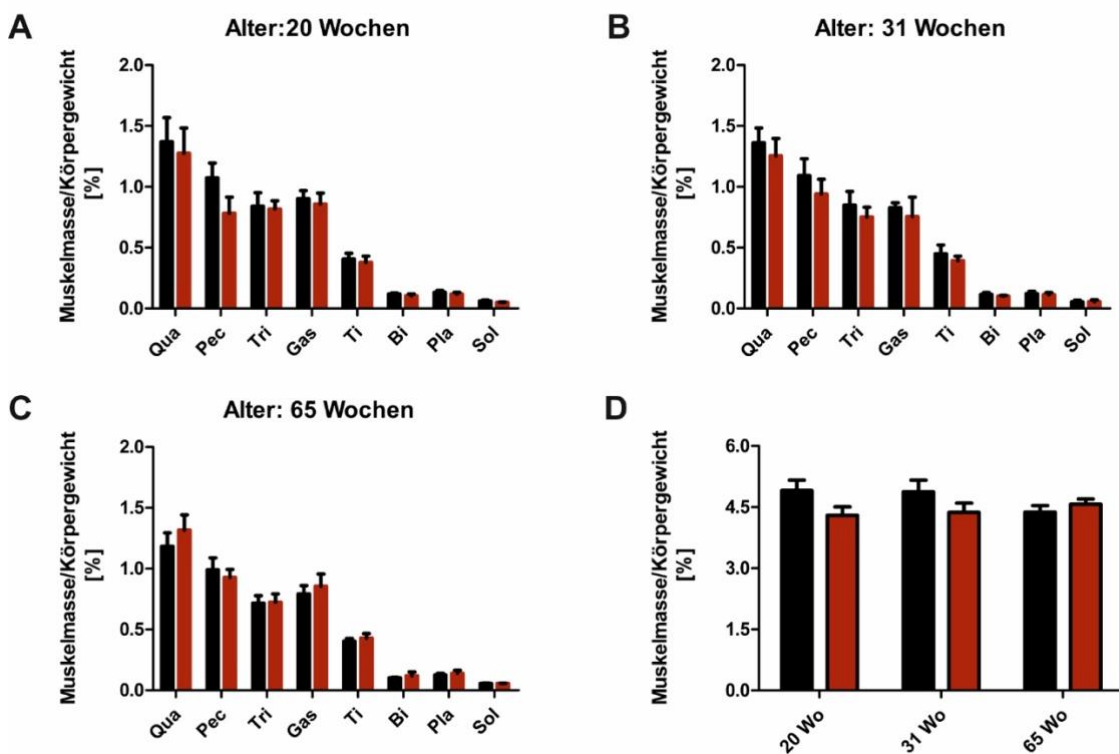


Abbildung 10: Darstellung der relativen Muskelmasse im Alter von 20, 31 und 65 Wochen

→ Fortsetzung siehe folgende Seite

## Ergebnisse

---

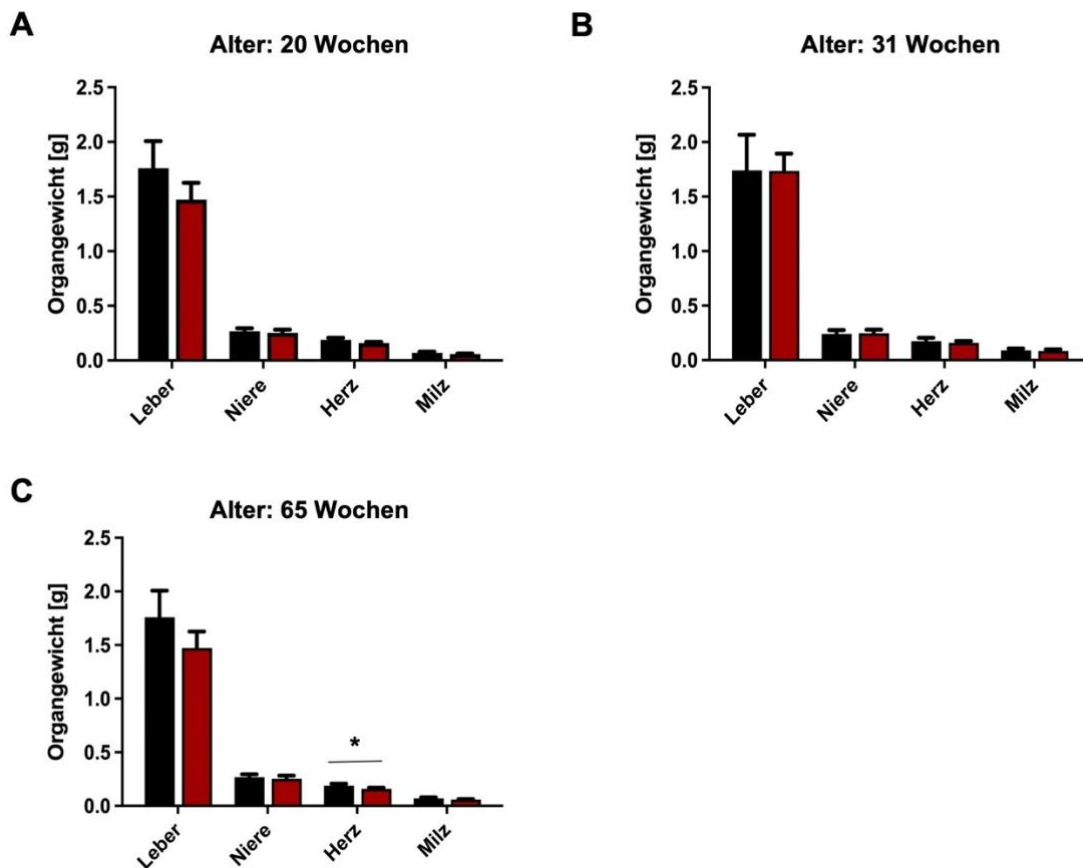
(A-C) Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD des Gewichts einzelner Muskeln normalisiert auf das jeweilige Körpergewicht von jeweils 4-8 männlichen Tieren der  $G_{\alpha_{i2}^{fl/fl}}$  (■)- und  $G_{\alpha_{i2}^{SKM-KO}}$  (■)-Kohorte sowie (D) die Summe des Gewichts aller einzelnen Muskeln in Relation zum Körpergewicht. Während die relative Muskelmasse der  $G_{\alpha_{i2}^{SKM-KO}}$  (■)-Gruppe dabei im Verlauf langsam ansteigt, sinkt diejenige der  $G_{\alpha_{i2}^{fl/fl}}$  (■)-Gruppe, jedoch ohne im direkten Vergleich signifikante Unterschiede zu produzieren

(Qua – *M. quadriceps femoris*, Pec – *M. pectoralis*, Tri – *M. triceps brachii*, Gas – *M. gastrocnemius*, Ti – *M. tibialis anterior*, Bi – *M. biceps brachii*, Pla – *M. plantaris*, Sol – *M. soleus*)

Die Normalisierung der Muskelgewichte auf das Gesamtkörpergewicht führt bei den 65 Wochen alten Tieren der  $G_{\alpha_{i2}^{SKM-KO}}$ -Kohorte aufgrund des geringeren Körpergewichtes im Vergleich zur  $G_{\alpha_{i2}^{fl/fl}}$ -Kohorte zu einer relativ betrachtet höheren Muskelmasse (siehe Abb. 10). Im Gegensatz zur Gesamtkohorte wiesen die im Alter von 20 und 31 Wochen geopfertem  $G_{\alpha_{i2}^{SKM-KO}}$ -Tiere ein höheres Körpergewicht auf als dies bei den geopfertem Mäusen der  $G_{\alpha_{i2}^{fl/fl}}$ -Gruppe der Fall war (siehe Abb. 9). Dementsprechend stellt sich in diesen Altersgruppen in der Kohorte der  $G_{\alpha_{i2}^{SKM-KO}}$ -Tiere im Vergleich zur  $G_{\alpha_{i2}^{fl/fl}}$ -Kohorte sowohl absolut als auch relativ zum Körpergewicht eine tendenziell geringere Muskelmasse dar, allerdings ohne dass die Differenz Signifikanzniveau erreicht.

Neben den Muskeln wurden auch Leber, Niere, Milz und Herz entnommen und gewogen. Hier zeigt sich lediglich bei den Tieren der Kontrollgruppe im Alter von 65 Wochen ein signifikant schwereres Herz (siehe Abb. 11). Bei insgesamt zu vernachlässigender Bedeutung des Herzgewichtes für das Gesamtkörpergewicht, lässt sich anhand der hier bestimmten Organmassen allerdings nicht herleiten, woher die deutliche Differenz im Vergleich des Körpergewichtes beider Gruppen stammt. Eine Bestimmung der Fettgewebssmasse fand im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der erst im späteren Verlauf sich herauskristallisierender Möglichkeit einer dortigen Rekombination nicht statt.

## Ergebnisse

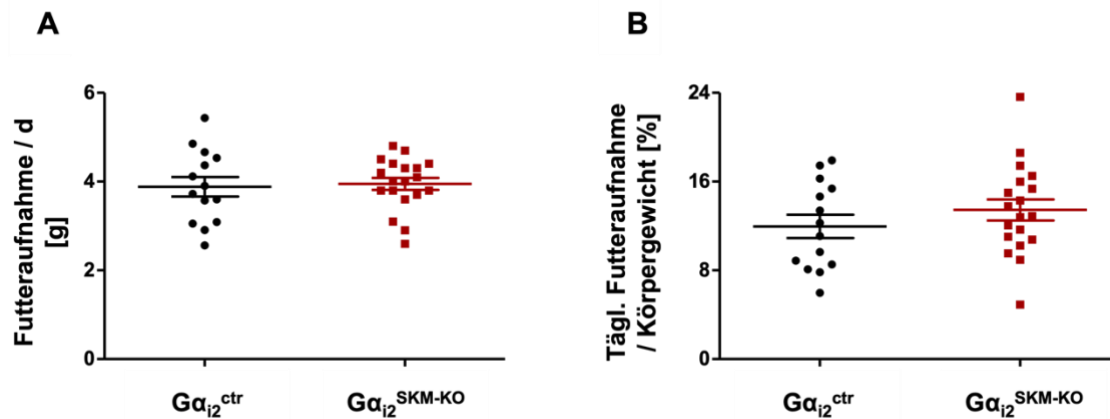


**Abbildung 11: Darstellung der absoluten Organgewichte im Alter von 20, 31 und 65 Wochen**

Zur Bestimmung des Organgewichts wurden die Tiere geopfert, die Organe entnommen und umgehend gewogen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD des Gewichts einzelner Organe von jeweils 4-8 männlichen Tieren der  $G\alpha_{12}^{fl/fl}$  (■)- und  $G\alpha_{12}^{SKM-KO}$  (■)-Kohorte. Eine signifikante Differenz lässt sich lediglich beim Herzgewicht im Alter von 65 Wochen feststellen. ( $p < 0,05$ )

Um zu überprüfen, inwieweit eine herabgesetzte Futtermenge als Ursache für das deutlich niedriger ausfallende Körpergewicht der  $G\alpha_{12}^{SKM-KO}$ -Gruppe in Frage kam, erfolgte die Messung der Futtermenge über einen Zeitraum von drei Tagen bei 24 Wochen alten Tieren. Hier zeigten sich jedoch weder in Hinblick auf die absolut aufgenommene Futtermenge noch nach Betrachtung der Menge in Relation zum Körpergewicht signifikante Unterschiede (siehe Abb. 12). Somit ist von einem reduzierten Aufbau von Körpergewicht trotz identischer Kalorienaufnahme auszugehen.

## Ergebnisse



**Abbildung 12: Tägliche Futtermittelaufnahme**

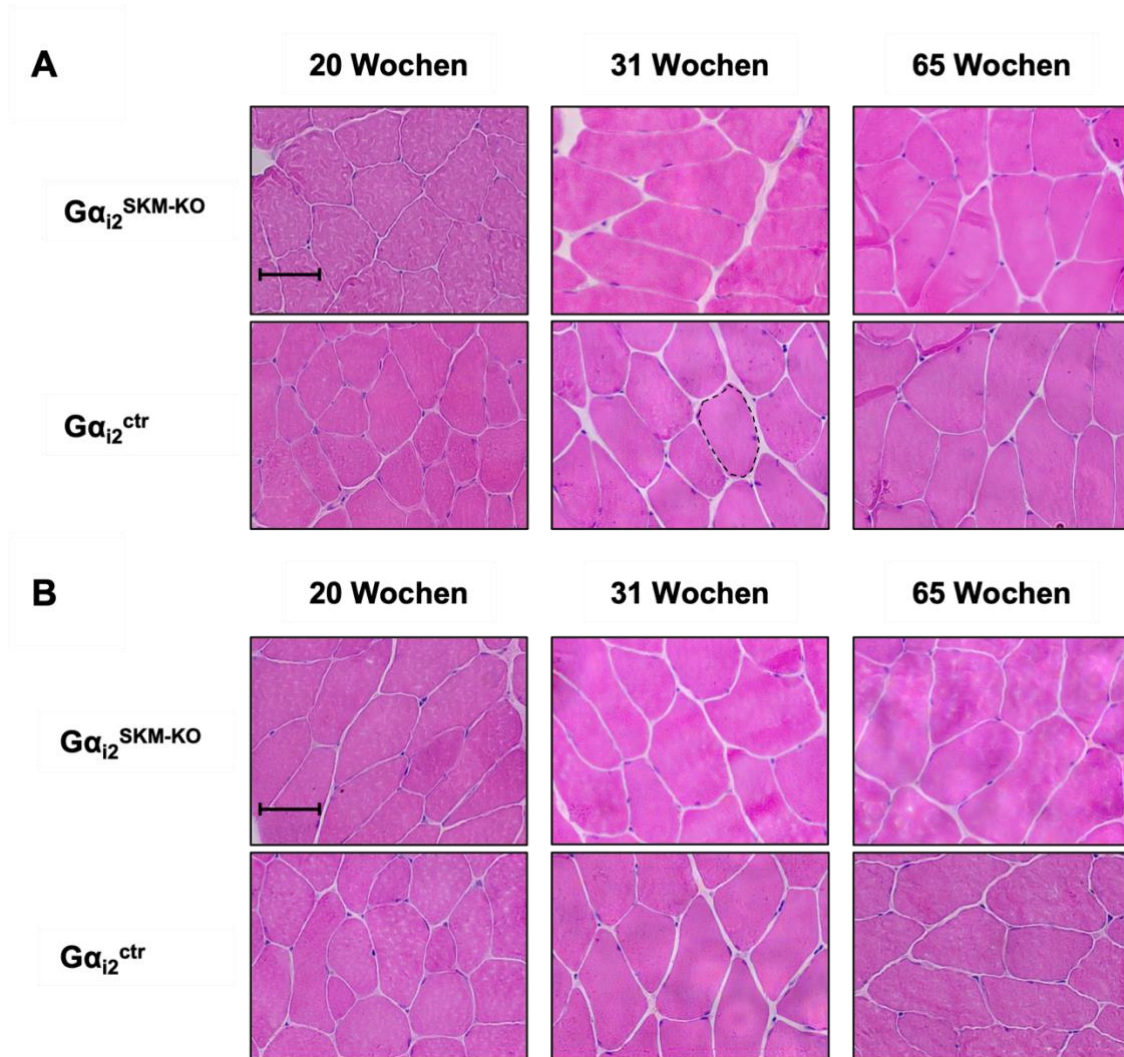
(A) Absolute tägliche Trockenfutteraufnahme von männlichen Tieren der  $G\alpha_{12}^{fl/fl}$  (●)- und  $G\alpha_{12}^{SKM-KO}$  (■)- Kohorte ( $n = 15-19$ ) im Alter von 24 Wochen. Die Messung lief über drei Tage hinweg, anschließend erfolgte die Bildung des täglichen Durchschnittswertes. (B) Relative Futtermittelaufnahme bezogen auf das Körpergewicht. Signifikante Unterschiede zeigten sich weder in der absoluten noch in der zum Körpergewicht relativen Futtermittelaufnahme.

### 3.3 Histologische Skelettmuskelmorphologie

Auch wenn die Myf5-Cre vermittelte Deletion von *Gnai2* lediglich in der Altersgruppe der 65 Wochen alten Mäuse zu einer absolut betrachtet niedrigeren Muskelmasse führte, ergibt sich die Frage nach Konsequenzen der Gendefizienz auf die histologische Morphologie des Skelettmuskels. Für die Erhaltung der durch Skelettmuskeln übernommenen Funktionen ist neben der absoluten Masse der Muskeln, deren Funktionalität von entscheidender Bedeutung. Es besteht die Möglichkeit, dass auch bei relativ zum Körpergewicht unveränderter Skelettmuskelmasse, morphologische Unterschiede einen Hinweis auf verminderte Funktionalität des Skelettmuskels in der Kohorte der  $G\alpha_{12}^{SKM-KO}$ -Tiere bieten. Im Falle einer globalen *Gnai2*-Defizienz zeigten sich in der HE-Färbung zwar keine Hinweise auf augenscheinliche Veränderungen wie Degeneration, Fibrose oder Immunzell-Infiltration, allerdings stellte sich eine Reduktion des Myotubendurchmessers dar (Minetti et al., 2014), welche dementsprechend auch in der Kohorte der  $G\alpha_{12}^{SKM-KO}$ -Mäuse vermutet werden muss. Zur Eruiierung möglicher histologisch ersichtlicher Unterschiede in der Morphologie der Muskeln wurden daher Gefrierschnitte der sofort nach

## Ergebnisse

Entnahme schockgefrorenen Muskeln angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin Übersichtsfärbungen angefertigt (siehe Abb. 13).



**Abbildung 13: HE-Färbung von Muskelschnitten der *Mm. gastrocnemius* und *tibialis anterior***

(A) Dargestellt sind repräsentative HE-gefärbte Querschnitte des *Musculus gastrocnemius* und (B) des *Musculus tibialis anterior* von Tieren im Alter von 20, 31 und 65 Wochen in der 1:40.000 Vergrößerung. Die Morphologie der Muskeln ist in Abwesenheit des  $G\alpha_{i2}$ -Proteins unverändert. Der Maßstab entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

Dabei zeigten sich in den HE-Färbungen zunächst keine offensichtlichen Differenzen. Ausgehend von dieser Beobachtung, welche auch den Ergebnissen

## Ergebnisse

---

nach globaler Deletion von *Gnai2* entspricht (Minetti et al., 2014), wurden die Querschnittsflächen der einzelnen Muskelzellen bestimmt. Auch hier stellten sich keinerlei statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Tieren der  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ -Gruppe dar (siehe Abb. 14A und B). Die im Alter zu erwartende Reduktion der Muskelfaserdurchmesser und somit -querschnittsflächen als Ausdruck einer Muskelhypotrophie (Verdijk et al., 2007) war sowohl in der Kontroll- als auch in der  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ -Gruppe zwischen der 31. und 65. Lebenswoche zu erkennen. Tendenziell fiel diese Reduktion in den Muskeln der Tiere der  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ -Kohorte schwächer aus, was sich auch in der Verteilung der Muskelfaserquerschnittflächen (siehe Abb. 14E) niederschlug: Hier zeigten sich bei den Tieren der Kontrollgruppe ca. 40 % der Muskelfasern mit einem Querschnitt bis maximal  $1500 \mu\text{m}^2$ , während dies bei den  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ -Tieren weniger als 10 % aller Muskelfasern betraf. Eine Signifikanz konnte hier allerdings nicht festgestellt werden.

# Ergebnisse

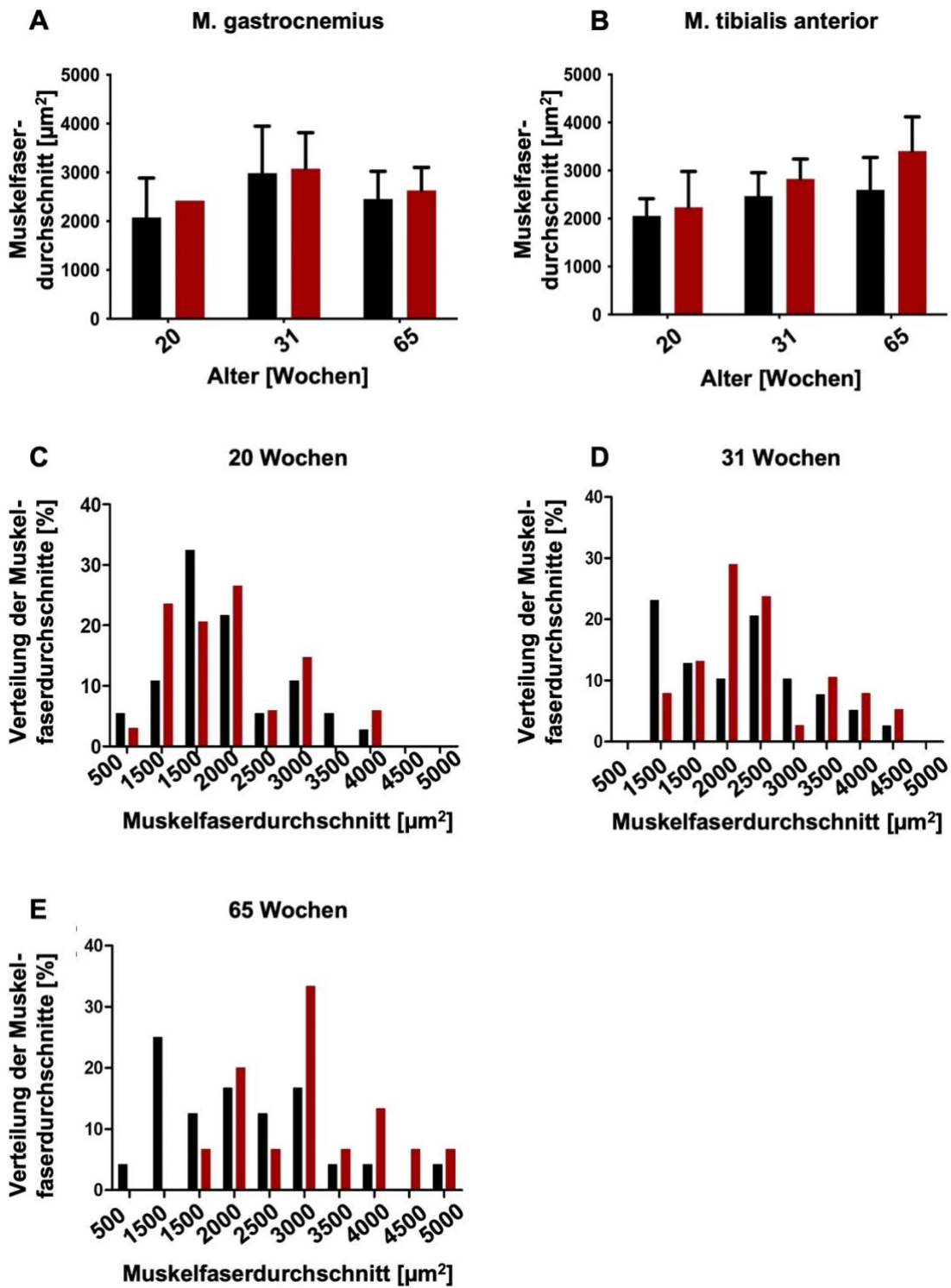


Abbildung 14: Muskelfaserdurchschnitte von *M. gastrocnemius* und *M. tibialis anterior*

→ Fortsetzung siehe folgende Seite

Zur Bestimmung des Muskelfaserdurchmessers wurden jeweils 3-5 männliche Tiere der  $G_{\alpha_{i2}}^{fl/fl}$  (■)- und  $G_{\alpha_{i2}}^{SKM-KO}$  (■)-Kohorte geopfert, die Muskeln entnommen, schockgefroren, acht  $\mu\text{m}$ -dicke Schnitte am Kryotom angefertigt und HE-gefärbt. Abschließend erfolgte die mikroskopische Vermessung der auf horizontaler Schnittebene dargestellten Muskelfasern. Abgebildet sind die Mittelwerte der Muskelfaserdurchmesser [ $\mu\text{m}^2$ ]  $\pm$  SD des (A) *M. gastrocnemius* und (B) *M. tibialis anterior*, sowie (C-E) die Verteilung der Muskelfaserdurchmesser im Altersvergleich der Kohorten. Der Muskelfaserdurchmesser der  $G_{\alpha_{i2}}^{SKM-KO}$  (■)-Gruppe lag dabei durchgehend leicht über dem der  $G_{\alpha_{i2}}^{fl/fl}$  (■)-Gruppe, jedoch ohne signifikante Differenz.

### 3.4 Intraperitonealer Glukosetoleranztest

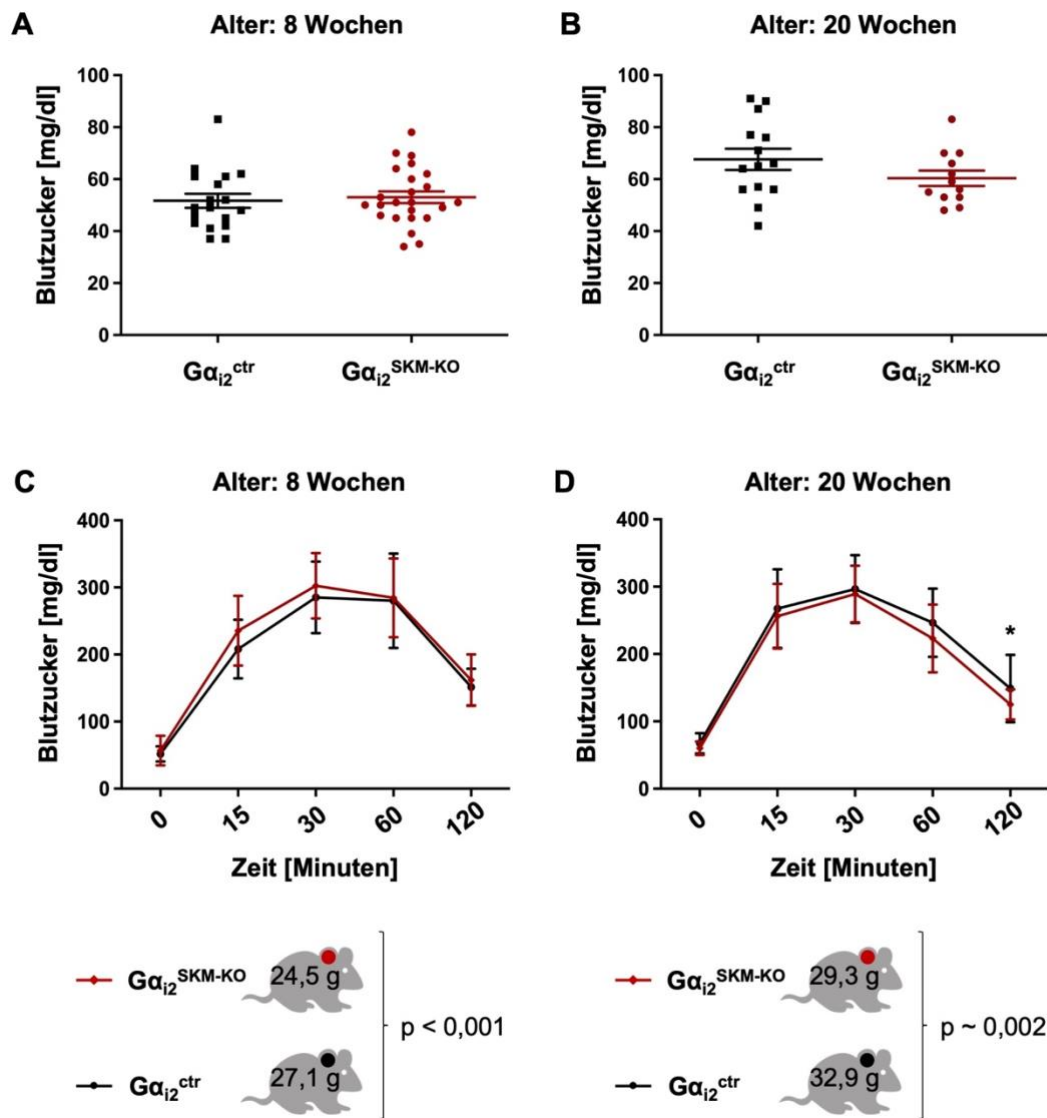
Hinweise darauf, dass eine globale *Gnai2*-Deletion zu einer Veränderung der peripheren Insulinsensitivität und somit zu einer Veränderung der Glukosetoleranz führt, sind in der Literatur bereits beschrieben (Leiss et al., 2014). Aufgrund der zentralen Rolle des Skelettmuskels für die Glukosehomöostase und periphere Insulinsensitivität muss eine direkte Auswirkung einer *Gnai2*-Deletion im Skelettmuskel auf den Blutzuckerspiegel in Betracht gezogen werden. Auch das signifikant geringere Körpergewicht der  $G_{\alpha_{i2}}^{SKM-KO}$ -Tiere könnte als indirekter Faktor zu einer verbesserten Glukosetoleranz führen. Zur Objektivierung dessen und Erfassung möglicher Veränderungen der Glukosetoleranz im Alterungsprozess wurde daher sowohl im Alter von acht als auch im Alter von 20 Wochen ein intraperitonealer Glukosetoleranztest durchgeführt

Sowohl die Höhe des basalen Blutzuckerspiegels nach zwölfstündiger nächtlicher Fastenperiode wie auch der maximale Blutzuckerspiegel nach Glukoseinjektion wiesen zwischen Kontrollgruppe und den  $G_{\alpha_{i2}}^{SKM-KO}$ -Mäusen im jeweiligen Altersvergleich keine signifikante Veränderung auf (siehe Abb. 15). Dabei zeigte sich das Maximum des Blutzuckerspiegels in beiden Kohorten und in beiden Altersstufen 30 min nach intraperitonealer Glukoseinjektion. Dem folgend war ein Abfall des Glukosespiegels zu beobachten, der im Alter von 20 Wochen in der  $G_{\alpha_{i2}}^{SKM-KO}$ -Gruppe zu einem signifikant niedrigeren Blutzuckerspiegel 120 Minuten post injectionem im Vergleich zur  $G_{\alpha_{i2}}^{fl/fl}$ -Gruppe führte ( $p=0,04$ ). Bemerkenswerterweise zeigten sich im Alter von acht Wochen trotz signifikant geringeren Körpergewichts der in den Glukosetoleranztest



## Ergebnisse

einbezogenen Tiere der  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$ -Kohorte keine Unterschiede in der Glukosetoleranz.



**Abbildung 15: Intraperitonealer Glukosetoleranztest im Alter von acht bzw. 20 Wochen**

Die Bestimmung des basalen Blutglukosespiegels erfolgte nach zwölfstündiger Fastenzeit. Den jeweils 12-25 männlichen Tieren der  $G\alpha_{i2}^{fl/fl}$  (■)- bzw.  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$  (■)-Kohorte wurde anschließend 2 g Glukose pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert und die Blutglukose jeweils 15, 30, 60 und 120 min post injectionem erneut gemessen.

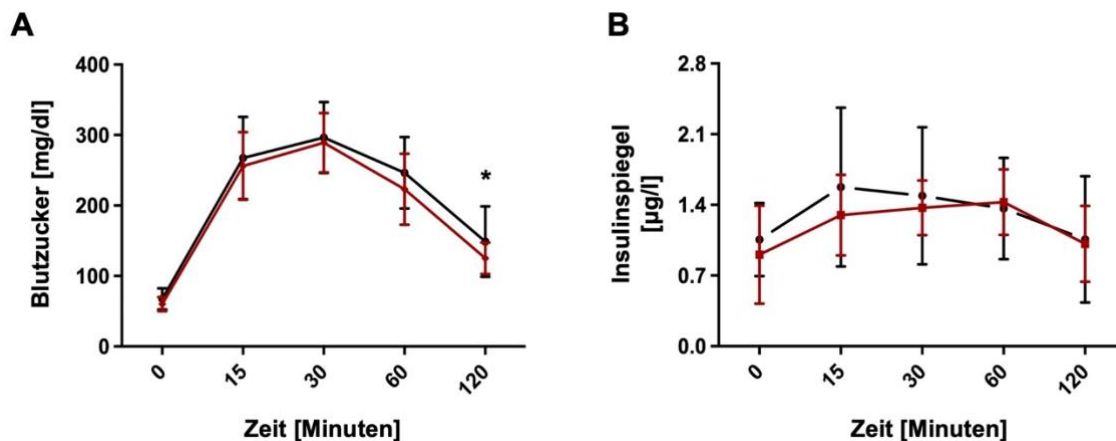
→ Fortsetzung siehe folgende Seite

Abgebildet ist die Verteilung der individuellen Nüchtern-Blutglukosespiegel mit Mittelwerten  $\pm$  SD im Alter von (A) acht sowie (B) 20 Wochen sowie die Mittelwerte  $\pm$  SD der Blutzuckerspiegel der

## Ergebnisse

jeweiligen Kohorte während des Glukosetoleranztests im zeitlichen Verlauf sowohl im Alter von (C) acht als auch (D) 20 Wochen. Es zeigt sich in beiden Gruppen ein Anstieg des Blutzuckerspiegels mit einem Maximum 30 min nach Glukoseinjektion. Im Alter von 20 Wochen ist ein schnellerer Abfall des Blutglukosespiegels der  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$  (■)-Gruppe im Vergleich zur  $G\alpha_{i2}^{fl/fl}$  (■)-Gruppe nach diesem Maximum zu beobachten mit schließlich signifikant niedrigerem Blutzuckerspiegel 120 min post injectionem. (\*:  $p < 0,05$ )

Der im Alter von 20 Wochen beobachtete signifikant niedrigere Blutzuckerspiegel nach 120 min ist dabei nicht mit Unterschieden in der vorliegenden Insulinsekretion erklärbar: Aus dem im Versuchsverlauf den Tieren entnommenen Blutproben wurden Insulinkonzentrationen mittels ELISA bestimmt (siehe Abb. 16). Es zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$ - und  $G\alpha_{i2}^{fl/fl}$ -Gruppe.

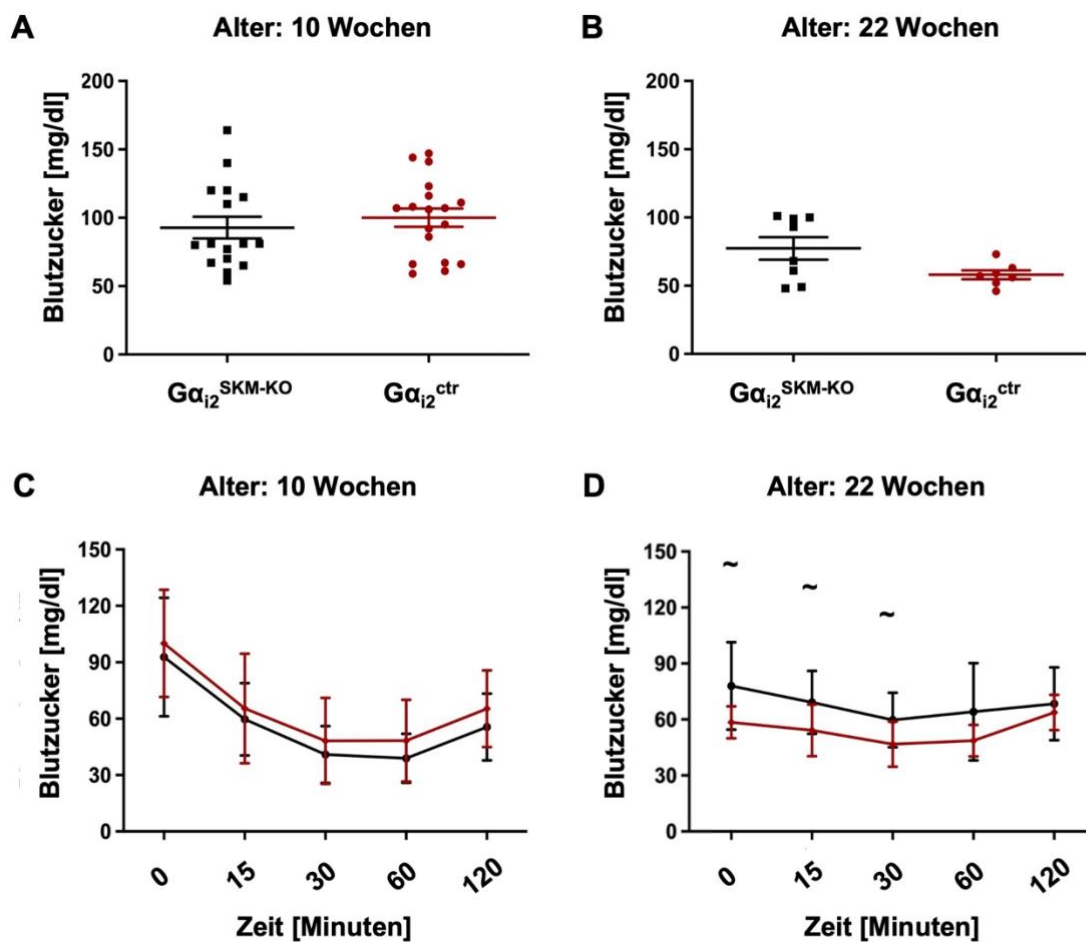


**Abbildung 16: Gegenüberstellung des (A) Blutzucker- und (B) Insulinspiegels im intraperitonealen Glukosetoleranztest im Alter von 20 Wochen**

Die Bestimmung der Blutzucker- und Insulinkonzentrationen erfolgte wie in der vorhergehenden Grafik beschrieben. Die signifikant niedrigeren Blutzuckerspiegel der  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$  (■)-Tiere lassen sich nicht durch einen Unterschied in den Insulinspiegeln erklären: Diese zeigen zu keinem Zeitpunkt im Versuchsverlauf eine signifikante Abweichung der Versuchsgruppen voneinander. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von jeweils 12-25 (A) bzw. 8-9 (B) männlichen Tieren der  $G\alpha_{i2}^{fl/fl}$  (■)- und  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$  (■)-Kohorte (\*:  $p < 0,05$ )

## 3.5 Intraperitonealer Insulintoleranztest

Die im Alter von 20 Wochen leicht verbesserte Glukosetoleranz der  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$ -Kohorte bei unveränderten Insulinspiegeln lässt eine verbesserte Insulinsensitivität dieser Tiere vermuten. Zur weiteren Charakterisierung des metabolischen Phänotyps erfolgten daher im Alter von 10 sowie 22 Wochen intraperitoneale Insulintoleranztests (siehe Abb. 17).



**Abbildung 17: Intraperitonealer Insulintoleranztest im Alter von 10 (A&C) bzw. 22 (B&D) Wochen**

Nach einer Nüchternperiode von vier Stunden wurden von jeweils 7-18 männlichen Tieren der  $G\alpha_{i2}^{fl/fl}$  (■)- und  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$  (■)-Kohorte die basalen Blutglukosespiegel bestimmt und anschließend 0,5 U/kg Körpergewicht Normalinsulin intraperitoneal injiziert.

→ Fortsetzung siehe folgende Seite

## Ergebnisse

---

Jeweils 15, 30, 60 und 120 min post injectionem erfolgte die erneute Messung der Blutglukose. Abgebildet ist die Verteilung der individuellen Nüchtern-Blutglukosespiegel mit Mittelwerten  $\pm$  SD der jeweiligen Kohorte im Alter von (A) zehn sowie (B) 22 Wochen. Dargestellt sind zudem die Mittelwerte  $\pm$  SD der jeweiligen Kohorte im Verlauf des Insulintoleranztest bis einschließlich 120 min post injectionem im Alter von (C) zehn sowie (D) 22 Wochen. Es zeigte sich ein Abfall des Blutglukosespiegels mit einem Minimum nach 60 min ohne signifikanten Unterschied im Blutglukoseprofil zwischen Tieren der  $G\alpha_{i2}^{fl/fl}$  (■)- und  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$  (■)-Gruppe (–:  $p < 0,1$ ).

Nach einer Fastenperiode von vier Stunden wurde die Insulininjektion vorgenommen und der Verlauf des Blutzuckerspiegels in den folgenden zwei Stunden dokumentiert. Auch hier zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bei den zehn Wochen alten Tieren. Im Alter von 22 Wochen zeigte sich lediglich eine leichte Tendenz zu einer verbesserten Insulinsensitivität in der Kohorte der Mäuse mit skelettmuskelspezifischer *Gnai2*-Gendeletion, allerdings ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.

### 3.6 Rekombinationsanalyse auf DNS-Ebene

Die Expression der Cre Rekombinase unter Kontrolle des Myf5 Promotors, ermöglicht die Deletion der von den flox-Sequenzen umrahmten Gensequenzen im *Gnai2*-Gen. Das Gen wird dadurch um die deletierte Anzahl an Basenpaaren, in diesem Fall um 1.832 Basenpaare, verkürzt. Um zu überprüfen, ob das Genstück erfolgreich in den Zellen herausgeschnitten wurde, erfolgte die Durchführung eine PCR mit spezifischen Primern, die die zu deletierende Gensequenz flankierten (siehe Abb. 18A). Als Grundlage für die Rekombinationsanalyse diente genomische DNS aus verschiedenen Geweben der  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$ - und Kontrollmäuse. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abb. 18B). Die Auftrennung beruht dabei auf der unterschiedlichen Länge der Gensequenz von *Gnai2* von Versuchs- und Kontrolltieren: Kommt es zu einer Gendeletion und somit verkürzter Gensequenz, läuft die entsprechende Bande schneller als diejenige des Gens, welches keine Deletion erfahren hat. Grund ist, dass kleine Moleküle, wie das 390 bp lange Genprodukt nach konditionaler Gendeletion, im

## Ergebnisse

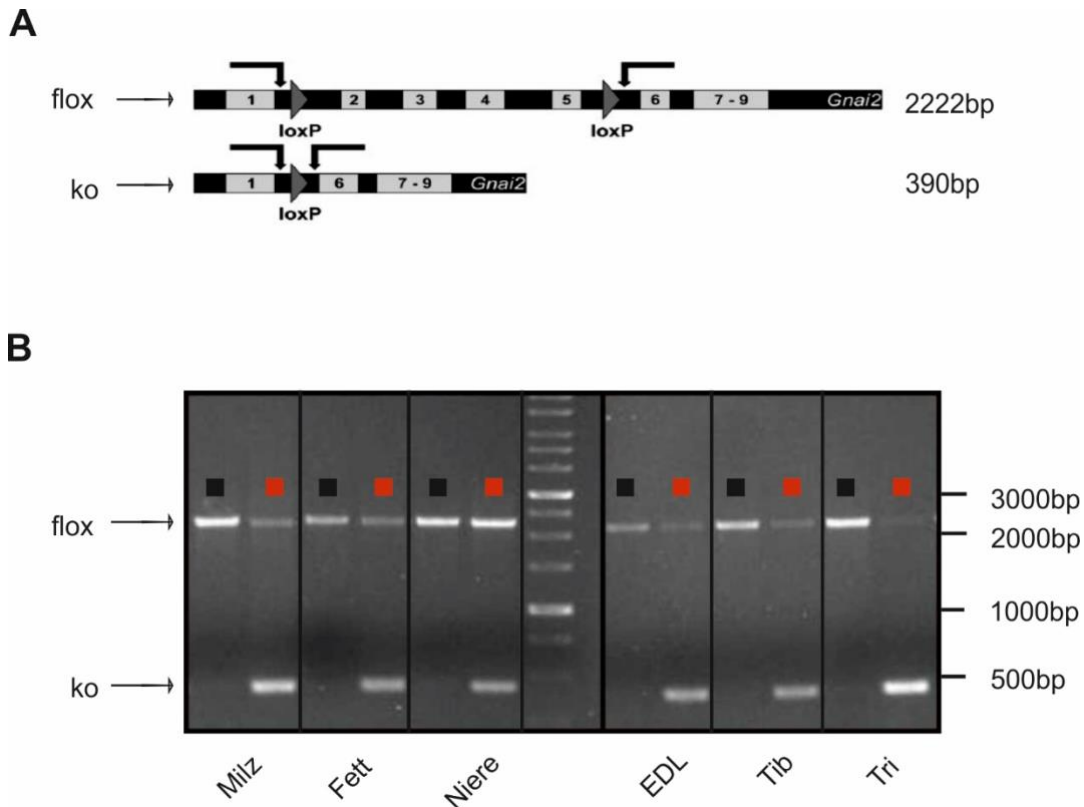
---

Spannungsfeld schneller wandern als größere Moleküle, wie die 2222 bp lange Gensequenz der Kontrolltiere.

Erwartungsgemäß zeigte sich in allen Geweben der  $G_{\alpha_{i2}}^{fl/fl}$ -Mäuse keine Rekombination. In Skelettmuskelgeweben der Tiere mit konditionaler Gendeletion zeigte sich hingegen jeweils ein PCR-Produkt mit einer Größe von 390 Basenpaaren, die in keiner entsprechenden Gewebeprobe der Kontrollen detektiert werden konnte. Folglich kam es in den Muskelgeweben der  $G_{\alpha_{i2}}^{SKM-KO}$ -Mäuse zu einer Rekombination beziehungsweise Gendeletion. Neben der Rekombinationsbande war in allen analysierten Geweben der  $G_{\alpha_{i2}}^{SKM-KO}$ -Mäuse auch der Nachweis eines 2200 bp-großen PCR-Produkts möglich. Es ließ sich somit, wenn auch schwächer als bei den  $G_{\alpha_{i2}}^{fl/fl}$ -Mäusen, ebenfalls eine Bande abgrenzen, welche das vollständige gefloxtete Gen in den Muskelgeweben der  $G_{\alpha_{i2}}^{SKM-KO}$ -Mäuse anzeigte. Aufgrund der Tatsache, dass das Muskelgewebe nicht ausschließlich aus Skelettmuskelzellen besteht, sondern auch Zellen anderer Zellreihen wie zum Beispiel Fibroblasten, Endothelzellen, Schwann'sche Zellen oder Adipozyten enthalten sind, würde man keine 100%-ige Rekombination im Muskelgewebe erwarten. Inwieweit die ausbleibende Rekombination darüber hinausgeht, was durch das Vorhandensein nicht-muskulärer Zellen erklärbar ist, kann aufgrund fehlender Möglichkeit, von der Quantität der PCR-Produkte auf die Quantität im Lysat des untersuchten Gewebes zu schließen, nicht abschließend festgestellt werden.

Auch in den nicht-muskulären Geweben zeigte sich bei allen  $G_{\alpha_{i2}}^{SKM-KO}$ -Mäusen durchgehend eine Rekombination, obwohl von eben dieser nicht auszugehen war. Die für das vollständige gefloxtete Gen *Gnai2* stehende Bande in Fett, Milz und Niere in Geweben von  $G_{\alpha_{i2}}^{SKM-KO}$ -Mäusen wies in ihrer deutlichen Abgrenzbarkeit zwar auf eine unvollständige Rekombination in diesen Geweben hin (Siehe Abb. 18B). Erwartet wurde bei der angenommenen skelettmuskelspezifischen Gendeletion von  $G_{\alpha_{i2}}$  aber eine vollständig ausbleibende Rekombination in den nicht-muskulären Geweben.

## Ergebnisse



**Abbildung 18: Rekombinationsanalyse mittels PCR**

(A) Dargestellt ist das gefloxtete *Gnai2*-Gen vor und nach Exzision der loxP-flankierten Gensequenz sowie (B) eine repräsentative Gelelektrophoreseaufnahme nach Auftrennung der PCR-Produkte von Milz, Fett und Niere sowie den Muskeln *M. extensor digitorum longus* (EDL), *M. tibialis anterior* (Tib) und *M. triceps brachii* (Tri) jeweils einer männlichen  $G\alpha_{i2}^{f/fi}$  (■)- und  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$  (■)-Maus im Alter von 24 Wochen.

Zusammenfassend ist somit von einer im Vergleich zu muskulärem Gewebe schwächeren, aber klar nachweisbaren Rekombination auch in nicht-muskulärem Gewebe auszugehen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass auch im Skelettmuskelgewebe von  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$ -Mäusen keine vollständige Rekombination stattfand.

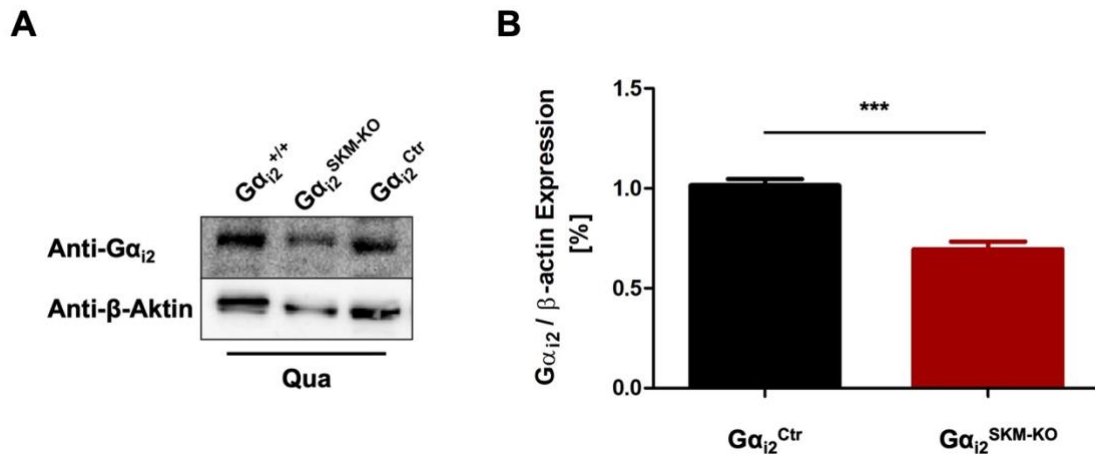
### 3.7 Expressionsanalyse

Um phänotypische Auswirkungen einer gewebespezifischen Gendeletion dem von der Deletion betroffenen Gewebe zuordnen zu können ist der Nachweis der fehlenden Expression des Genproduktes unumgänglich. Unter der Annahme einer Skelettmuskelspezifität der Myf5-Cre mediierter *Gnai2*-Gendeletion wurde die Expressionsanalyse in der hier vorliegenden Arbeit lediglich am Skelettmuskel durchgeführt.

Zur Quantifizierung ob und gegebenenfalls in welchem Maße die Expression des G-Proteins im Skelettmuskelgewebe nach Myf5-Cre mediierter Gendeletion abgenommen hatte, wurden unter Verwendung eines  $G\alpha_{i1/i2}$ -spezifischen Antikörpers Immunoblots angefertigt (Leopoldt et al., 1997; Wiege et al., 2012). Diese wiesen zwar eine signifikante Reduktion des Expressionslevels nach: Um circa 30 % vermindert zeigte sich das Vorkommen von  $G\alpha_{i2}$  im M. quadriceps femoris der  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ -Tiere im Vergleich zu der Kontrollgruppe (siehe Abb. 19).

Damit nachgewiesen wurde allerdings auch eine weiterhin in relevanter Menge erfolgte Expression des  $G\alpha_{i2}$ -Proteins. Zu bedenken ist an dieser Stelle, dass hier keine reine Skelettmuskel-Präparation als Grundlage für die Expressionsanalyse diente, sondern das unter anderem auch Blutgefäße, intramuskuläre Adipozyten und Bindegewebe enthaltene Lysat des kompletten M. quadriceps femoris. Eine Quantifizierung dieser nicht-muskulären Zellen und Gewebe in Relation zur Masse der Skelettmuskelzellen erfolgte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit nicht. Ausgehend von in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen kann aber von durchschnittlich 8 % Bindegewebsanteil (McKee et al., 2019) und ca. 3 % Fettgewebeanteil ausgegangen (Addison et al., 2014) werden. Der Anteil von Gefäß- und Nervenzellen wurde noch nie quantifiziert, wird aber sicherlich nicht über 5 % liegen.

## Ergebnisse



**Abbildung 19: Expressionsanalyse von  $G\alpha_{12}$  im Skelettmuskel von skelettmuskelspezifisch  $G\alpha_{12}$ -defizienten Mäusen ( $G\alpha_{12}^{SKM-KO}$ ) und Kontrolltieren ( $G\alpha_{12}^{fl/fl}$ )**

**A:** Repräsentative Darstellung einer Immunoblot-Analyse des homogenisierten M. quadriceps femoris von männlichen  $G\alpha_{12}^{SKM-KO}$ - und  $G\alpha_{12}^{fl/fl}$ -Mäusen. Als Ladungskontrolle wurde  $\beta$ -Aktin nachgewiesen. **B:** Abgebildet ist die in Relation zum  $\beta$ -Aktin gesetzte Menge des  $G\alpha_{12}$ -Proteins im Muskelgewebe des M. quadriceps femoris von  $G\alpha_{12}^{SKM-KO}$  (■)- und  $G\alpha_{12}^{fl/fl}$  (■)-Mäusen (jeweils  $n=5$ )  $\pm$  SD. Es zeigte sich eine um circa 30 % verminderte Expression des Proteins im Muskel der  $G\alpha_{12}^{SKM-KO}$  (■) -Tiere. (\*\*\*) entspricht  $p < 0,001$

Auch bei großzügiger Schätzung des Anteiles nicht-muskulärer Zellen am untersuchten Gewebelysat muss bei lediglich um 30 % verminderter  $G\alpha_{12}$ -Expression zusammenfassend bilanziert werden, dass die Myf5-Cre-medierte Deletion von *Gnai2* nur eine unvollständige Depletion von  $G\alpha_{12}$  in den Skelettmuskelzellen bewirkte.

Der Nachweis einer möglichst vollständig stattgefundenen und skelettmuskelspezifischen Rekombination auf DNS-Ebene wurde somit ebenso wenig wie eine vollständig ausbleibende Expression von  $G\alpha_{12}$  nachgewiesen. Die Rückführung der Ergebnisse der Phänotypisierung auf eine skelettmuskelspezifische Deletion von *Gnai2* ist somit nicht möglich. Da die im Rahmen dieser Arbeit zur Überprüfung der beabsichtigten Skelettmuskelspezifität einer Myf5-Cre medierten Gendeletion durchgeführte Rekombinationsanalyse jedoch ebenso wie die in diesem Kapitel dargestellte



## Ergebnisse

---

Expressionsanalyse parallel bzw. teilweise deutlich nachgelagert zu den Phänotypisierungs-Versuchen durchgeführt wurden, kam diese abschließende Erkenntnis erst nach Abschluss der Versuche zur Charakterisierung des Phänotyps.

### 4 Diskussion

Die Aufrechterhaltung des physiologischen Gleichgewichtes, sei es bezüglich des Glukosestoffwechsels, des Zellumsatzes oder aber weiterer Prozesse, erfordert einen beständigen Informationsfluss zwischen Geweben. An der Schnittstelle von extrazellulär gelegenem Botenstoff zu intrazellulären Effektoren stehen Rezeptoren und durch diese aktivierte Signalproteine im Mittelpunkt. Bei ersteren handelt es sich häufig um GPCR, welche die Aktivierung von G-Proteinen bewirken können. Diese wiederum lassen sich in vier Familien unterteilen, von denen die  $G\alpha_i$ -Familie eine ebensolche darstellt. Die  $G\alpha_{i2}$ -Isoform ist ein Mitglied der  $G\alpha_i$ -Familie und als ubiquitär exprimiertes Signaltransduktor-Protein an zahlreichen Prozessen im Körper maßgeblich beteiligt. Nachgewiesenermaßen ist  $G\alpha_{i2}$  unabdingbare Voraussetzung für das Hören (Beer-Hammer et al., 2018), eines der zentralen Signaltransduktor-Proteine in der kardiovaskulären Regulation (Lian et al., 2018; Wang et al., 2018) und involviert in die Plättchenaggregation (Kahner et al., 2006). Die Ausschaltung des für dieses G-Protein kodierenden Genes resultiert in massiven Einschränkungen zahlreicher Körperfunktionen. So führt  $G\alpha_{i2}$ -Defizienz zu verminderter Immunkompetenz (Kehrl, 2016; Offermanns & Simon, 1998; van den Bos et al., 2020; Wiege et al., 2012), der Ausbildung von Colitis ulcerosa (Li et al., 2019) und Kolonkarzinomen (Rudolph et al., 1995), einer herabgesetzten fettfreien Körpermasse (Minetti et al., 2011), einer erhöhten Lipolyse mit konsekutiv gesteigertem Energieumsatz und geringerem Risiko von Diät-induziertem Übergewicht (Leiss et al., 2020) sowie einer reduzierten Insulinausschüttung im Glukosetoleranztest (Leiss et al., 2014). Bemerkenswerterweise führt letzteres jedoch nicht zu einer nachweisbaren Verschlechterung der Glukosetoleranz (Leiss et al., 2014), sodass sich die Frage nach der Ursache der verbesserten peripheren Insulinsensitivität stellt. Als zentrale Gewebe in der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase spielen neben dem Pankreas der Skelettmuskel, die Leber und das Fettgewebe eine entscheidende Rolle. Für die hier vorliegende Arbeit wurde daher unter Annahme

einer skelettmuskelspezifischen Gendeletion die Auswirkung einer Myf5-Cre mediierten Deletion des für  $G\alpha_{i2}$  kodierenden Gens auf die Glukosehomöostase untersucht. Es wurde zudem untersucht, ob sich die nach Myf5-Cre vermittelte Gendeletion bereits im Vorfeld dieser Arbeit nach globaler Gendeletion zu beobachtenden Effekte auf den Skelettmuskel und die Körpermasse bestätigen. Hier zeigte sich eine reduzierte Muskelmasse bei insgesamt reduziertem Körpergewicht (Minetti et al., 2014). Nach Auswertung der Ergebnisse der Rekombinationsanalyse muss allerdings konstatiert werden, dass die beabsichtigte Skelettmuskelspezifität der konditionalen Gendeletion genauso wenig erreicht wurde wie eine vollständige Deletion des für  $G\alpha_{i2}$  kodierenden Gens in den Skelettmuskelzellen. Die Ergebnisse der Phänotypisierung sind dementsprechend vor diesem Hintergrund zu bewerten.

### 4.1 Generierung einer skelettmuskelspezifischen Gendeletion

Die konditionale Deletion von *Gnai2* wurde durch Verpaarung von Mäusen, die vor dem Exon 2 und nach dem Exon 4 auf Chromosom 9 eine loxP-Erkennungssequenz tragen, mit Tieren, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle von Myf5 exprimieren, angestrebt.

Myf5 gilt als skelettmuskelspezifisches Protein und wird in Mäusen ab dem 8. embryonalen Tag exprimiert (Ott et al., 1991). Genau wie die weiteren Mitglieder der Proteinfamilie der myogenen regulatorischen Faktoren (MRF) MyoD, myogenin und MRF4 kann Myf5 nicht in ausgereiften Zellen der glatten Muskulatur oder Herzmuskelzellen nachgewiesen werden (Graves & Yablonka-Reuveni, 2000; Le Ricousse-Roussanne et al., 2007). Myf5 determiniert das Schicksal von Stammzellen durch Festlegung auf die Differenzierung zu Skelettmuskelzellen bzw. deren Vorläufern. Der Annahme, dass Myf5 in allen Skelettmuskelzellen exprimiert wird, wurde bereits vor längerem mit der Hypothese widersprochen, dass es mindestens zwei Skelettmuskellinien gebe, von denen eine Myf5-unabhängig sei und somit einer Myf5-Cre vermittelten Elimination entkommen kann (Gensch et al., 2008; Haldar et al., 2008). Dem wurde zunächst noch entgegengesetzt, dass die nach Myf5-Cre kontrollierter

## Diskussion

---

Ablation verbliebenen Muskelzellen lediglich Ausdruck einer unvollständigen Penetration der Ablation sind (Comai et al., 2014). Mittlerweile konnte aber durch die Transkriptom-Analyse von Mäusen in der embryonalen Entwicklung ein weiterer Beleg für die Existenz eines Myf5-unabhängigen und MyoD-abhängigen Myogenese-Weges erbracht werden (Cao et al., 2019). Eine unvollständige Myf5-Cre-medierte Rekombination in den Skelettmuskelzellen scheint somit auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten Mausmodell plausibel zu sein.

In der Rekombinationsanalyse zeigte sich dann auch eine zwar deutliche, aber unvollständige Rekombination im Vergleich der Muskeln der  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$ -Tiere mit denen der  $G\alpha_{i2}^{fl/fl}$ -Gruppe. Eine exakte Quantifizierung der Rekombinationsrate kann aber aufgrund des in dieser Arbeit verwendeten PCR-Protokolls nicht vorgenommen werden. Dieses ist zur Detektion von DNS-Molekülen gut geeignet, nur eingeschränkt aber zu einem Vergleich der Quantität unterschiedlicher PCR Produkte in der Ausgangslösung (Alvarez et al., 2007). Ursächlich dafür ist insbesondere die Tatsache, dass die Produktquantität erst nach Ablauf aller Zyklen gemessen wird. Nicht auszuschließende kleine Unterschiede in der Amplifizierungseffizienz der Proben können aber aufgrund des exponentiellen Charakters der PCR zu großen Unterschieden in der endgültigen Produktquantität führen. Eine deutlich bessere Möglichkeit der Quantifizierung von Unterschieden in der Rekombination ist daher die Nutzung von Echtzeit-PCR-Verfahren, welche mit fluoreszierenden Farbstoffen arbeiten und die Messung der DNS-Menge zu jedem Zeitpunkt der PCR erlauben.

Die Expressionsanalyse der Skelettmuskulatur zeigte eine zwar signifikante, aber dennoch nur um circa 30 % verminderte Expression von  $G\alpha_{i2}$  im exemplarisch genauer untersuchten M. quadriceps femoris. Dies sprach für eine unvollständige Ablation des Proteins mit entsprechender Verminderung des im Falle einer kompletten Gendefizienz zu erwartenden Effekts einer *Gnai2*-Deletion im Skelettmuskel. Teilweise relativiert werden muss diese Aussage lediglich, da es sich bei den analysierten Gewebeproben immer um eine Mischung verschiedener Zellen gehandelt hat. So kann, von in der Literatur vorbeschriebenen CT- und MR-graphischen Untersuchungen menschlicher

## Diskussion

---

Muskeln ausgehend, ein Anteil nicht muskulären Gewebes von mindestens 4-12 % innerhalb des Muskelgewebes angenommen werden, abhängig vom Muskel und zunehmend mit dem Alter des Individuums (Farrow et al., 2021; Overend et al., 1992). Auch unter großzügiger Berücksichtigung dieses Effektes kann aber nicht von einer vollständigen oder auch nur über 50-prozentigen Rekombination in den Skelettmuskelzellen ausgegangen werden. Eine genaue Quantifizierung der Penetranz der Gendeletion erfordert hier die Untersuchung von Skelettmuskelfasern, welche isoliert von anderen Zelltypen wurden (Anderson et al., 2012). Alternativ besteht die Möglichkeit der Analyse von Myotuben, welche aus zuvor gewonnenen Satellitenzellen der Tiere gezüchtet wurden (Musarò & Barberi, 2010). Neben den Methoden, die zur Expressionsanalyse in dieser Arbeit Anwendung gefunden haben, sollten dann auch immunhistochemische Färbungen zur Darstellung des Effektes der skelettmuskelspezifischen *Gnai2*-Deletion durchgeführt werden.

In den nicht-muskulären Geweben zeigte sich in der  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$ -Gruppe ebenfalls eine, wenn auch im Vergleich zum Muskelgewebe vermutlich schwächer ausfallende, Rekombination (siehe Abbildung 18). Wäre dies alleinig auf eine Verunreinigung der Proben mit Skelettmuskelzellen zurückzuführen, so ergäbe sich hieraus keine Konsequenz für die Interpretation der Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente. Während die auf Rekombination hinweisende Bande in der Gelelektrophorese der Nieren-DNS noch etwas schwächer als die dem unveränderten Genomstrang zugehörige Bande dieses Gewebes erscheint, stellen sich sowohl beim Fett- als auch beim Milzgewebe mindestens gleich, wenn nicht sogar stärker ausgeprägte  $G\alpha_{i2}$ -Defizienz anzeigende Banden in der elektrophoretischen Auftrennung des Genmaterials von  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$ -Mäusen dar. Hier müsste dementsprechend eine massive Verunreinigung vorliegen, sollte das die Ursache des Sachverhaltes sein. Diese ist durch die Methodik der Gewebeproben- und DNS-Gewinnung jedoch praktisch ausgeschlossen. Somit muss von einer Rekombination in nicht-muskulären Zelllinien ausgegangen werden. Ursächlich dafür könnte einerseits eine Expression von *Myf5* in nicht-muskulären Zellen sein. Beschrieben wurde

## Diskussion

---

das Hervorgehen von braunem Fettgewebe aus Myf5-exprimierenden Vorläufern, insbesondere in perirenaln Depots von braunem Fettgewebe (Sanchez-Gurmaches & Guertin, 2014; Seale et al., 2008; Timmons et al., 2007). Entgegen früherer Meinungen, wonach weder aus weißen Fettgewebszellen hervorgegangene braune Fettgewebszellen noch weiße Fettgewebszellen selbst Myf5 exprimieren (Seale et al., 2008), konnte in den vergangenen Jahren gezeigt werden, dass auch in weißen Fettdepots Myf5-exprimierende Adipozyten in erheblichem Umfang zu finden sind. Die Verteilung zwischen Myf5-negativen und -positiven Adipozyten ist dabei von Geschlecht und anatomischer Lokalität des Depots abhängig (Sanchez-Gurmaches & Guertin, 2014; Ye et al., 2019). Eine mögliche Ursache für das Vorhandensein einer Rekombination in den nicht-muskulären Geweben ist somit das Vorkommen von Myf5-positiven Adipozyten mit entsprechender Myf5-Cre vermittelter *Gnai2*-Deletion. In der Literatur beschrieben ist zudem die Expression von Myf5 in weiteren Geweben. Sowohl in Leber, als auch in Lunge, Nieren, Herz und Gastrointestinaltrakt ließ sich Myf5 nachweisen (Hou et al., 2015). Weiterhin muss auch die Möglichkeit einer Promotor-unabhängigen spontanen Rekombination, wie sie wiederholt im Rahmen der Beschreibung konditionaler Gendelektionen beschrieben wurde, in Betracht gezogen werden (Andrusaite & Milling, 2020; Becher et al., 2018; Song & Palmiter, 2018).

Unabhängig von der genauen Ursache muss zusammenfassend konstatiert werden, dass zum einen die Rekombination im Muskelgewebe unvollständig ist und dementsprechend auch nur eine partielle  $G\alpha_{i2}$ -Depletion im Skelettmuskel zu verzeichnen ist. Effekte, die erst bei vollständig ausbleibender Expression auftreten würden, entzogen sich somit der Beobachtung. Zum anderen findet auch in den nicht-muskulären Geweben eine Rekombination statt. Dabei ist mit dem Fettgewebe auch ein Gewebe betroffen, welches ebenso wie der Skelettmuskel maßgeblich an der Regulation des Energiehaushalts und des Körpergewichts beteiligt ist. Auch wenn keine Expressionsanalyse durchgeführt wurde, muss von einem relevanten Einfluss der Rekombination auf die Expression ausgegangen werden. Der Einfluss dessen auf die Ergebnisse der im

Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche lässt sich nur erahnen. So ist sowohl eine Verstärkung von Effekten der Deletion von *Gnai2* im Skelettmuskel als auch eine Kompensation denkbar.

Die Untersuchung einer rein auf die Skelettmuskulatur beschränkten Deletion von *Gnai2* erfordert somit die Generierung eines Mausmodells, welches statt Myf-5 einen muskelspezifischen Promotor, wie zum Beispiel Myf6/Mrf4 austauscht (Mobley et al., 2020). Die Muskelspezifität, welche in der Literatur weitestgehend unbestritten Myf5 zugeordnet wird, kann anhand der Analyse in dieser Arbeit so leider nicht bestätigt werden.

### **4.2 Einfluss einer Myf5-Cre-medierten Gendeletion auf die Glukosehomöostase**

Globale *Gnai2*-Defizienz führt trotz reduzierter Plasmainsulinspiegel zu keiner Erhöhung der Plasmaglukosespiegel, sodass das Fehlen von  $G\alpha_{i2}$  in den Blutglukose-verstoffwechselnden Geweben eine kompensatorische Wirkung im Sinne einer verbesserten peripheren Insulinsensitivität haben muss (Leiss et al., 2014). Auch in der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ -Gruppe, zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe trotz vergleichbarer Insulinspiegel reduzierte Blutglukosespiegel im Glukosetoleranztest - allerdings erst 120 Minuten nach intraperitonealer Glukoseinjektion und lediglich in der Altersgruppe der 20 Wochen alte Tiere. Im Insulintoleranztest wurde sogar lediglich ein Trend hin zur verbesserten Insulinsensitivität sichtbar ( $p < 0,1$ ).

Mit nachgewiesener Rekombination in nicht-muskulären Geweben ist die Rückführung der Versuchsergebnisse nach Myf5-Cre vermittelter *Gnai2*-Deletion auf das Skelettmuskelgewebe nicht möglich. Insbesondere das Fettgewebe mit hier nachgewiesenermaßen stattgehabter Rekombination und anzunehmender reduzierter  $G\alpha_{i2}$ -Expression kommt als weiterer Einfluss in Frage. Bislang ist die Literatur zur Konsequenz einer adipozytenspezifischen Deletion von *Gnai2* zwar uneinheitlich. So führte eine unter der Kontrolle von Adiponektin stehende Cre-

vermittelte *Gnai2*-Deletion zu einer verbesserten Insulinsensitivität sowie gesteigerter Glukosetoleranz (Leiss et al., 2020). In einem anderen Mausmodell führte die adipozytenspezifische *Gnai2*-Deletion hingegen zu einer verringerten Glukosetoleranz sowie eingeschränkten Glukosehomöostase während bei selektiver Aktivierung von  $G\alpha_{i2}$  in den Adipozyten sich die Glukosehomöostase verbesserte (Wang et al., 2020). Dennoch ist von einer Konsequenz einer anzunehmenden Reduktion der  $G\alpha_{i2}$ -Expressionslevel im Fettgewebe für die Glukosehomöostase auszugehen. Der Vermutung, dass eine Defizienz von  $G\alpha_{i2}$  im Skelettmuskel einen Beitrag zur verbesserten Glukosetoleranz leistet, kann somit anhand des hier vorgestellten Mausmodells nicht wissenschaftlich fundiert nachgegangen werden.

### **4.3 Einfluss einer Myf5-Cre-medierten Deletion von $G\alpha_{i2}$ auf das Gesamtkörpergewicht**

In der hier vorliegenden Arbeit konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen nach globaler *Gnai2*-Deletion (Leiss et al., 2014) ein signifikanter Einfluss einer Myf5-Cre-medierten Deletion von  $G\alpha_{i2}$  auf das Körpergewicht nachgewiesen werden. Mäuse der  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ -Gruppe waren über lange Phasen hinweg mehr als 15 % leichter als Tiere der  $G\alpha_{i2}^{\text{fl/fl}}$ -Gruppe. Allerdings lässt sich lediglich ein Teil der Gewichts Differenz durch die Auswirkung der Deletion von *Gnai2* im Skelettmuskel erklären. So zeigte sich im Alter von 65 Wochen zwar ein um 20 % reduziertes Muskelgewicht der  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ -Tiere. Doch selbst wenn von einem Anteil der Muskelmasse von 50 % am Gesamtkörpergewicht ausgegangen wird (Minetti et al., 2014) und angenommen wird, dass sich das Verhältnis der Muskelmasse aller entnommenen Muskeln in der  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ - und  $G\alpha_{i2}^{\text{fl/fl}}$ -Gruppe zueinander extrapolieren lässt, erklärt dies nicht einmal die Hälfte der bis zu 25 % betragenden Differenz des Gesamtkörpergewichts. Zudem zeigten sich signifikante Unterschiede in der Skelettmuskelmasse erst in der Gruppe der 65 Wochen alten Tiere, während eine signifikante Körpergewichtsdifferenz bereits ab der zehnten Woche zu beobachten war.



Die Gewichte von Milz, Leber, Nieren und Herz zeigten mit Ausnahme vom Herz keine signifikanten Unterschiede und erklären weniger als 1,5 % der Körpergewichtsdifferenz. Nicht gewogen wurde jedoch das Fettgewebe. Hier liegt in Anbetracht der nachgewiesenen Rekombination eine plausible Ursache für die Differenz im Körpergewicht. Unterstützung für diese Hypothese ergibt sich dadurch, dass bei Mäusen mit adipozytenspezifischer Deletion von *Gnai2* eine Abschwächung der alimentär bedingten Adipositas mit geringerer Körperfettmasse, kleineren Adipozyten und höherem Energieverbrauch zu beobachten war (Leiss et al., 2020). Dass trotz geringerem Körpergewicht der  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ -Tiere diese bezüglich der aufgenommenen Futterquantität und somit Kalorienzahl in nichts der Kontrollgruppe nachstanden, überraschte auch im Rahmen dieser Arbeit und könnte durch einen höheren Energieverbrauch aufgrund einer Gendeletion von *Gnai2* in Adipozyten bedingt sein.

#### 4.4 Die Rolle von $G\alpha_{i2}$ bei der Skelettmuskelhomöostase

In der hier vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die absolute Muskelmasse der  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ -Tiere im Vergleich zu der  $G\alpha_{i2}^{\text{fl/fl}}$ -Kohorte im Alter von 65 Wochen signifikant reduziert ist. Die Differenz betrug dabei durchschnittlich 20 %. Im Gegensatz zur vorbeschriebenen globalen Gendeletion (Minetti et al., 2014), zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied im Alter von 20 beziehungsweise 31 (hier ist  $p = 0,12$ ) Wochen. Somit ist von einer Reduktion der Muskelmasse erst im Stadium der Seneszenz auszugehen, Seneszenz manifestiert sich im Skelettmuskel unter anderem durch eine Reduktion der Querschnittsfläche von Muskelfasern (McMahon et al., 2014). In unserer Untersuchung zeigte sich die entsprechende Reduktion im Intervall zwischen der 31. und 65. Lebenswoche.

Abweichend vom Phänotyp nach globaler *Gnai2*-Deletion zeigte sich zudem die zum Körpergewicht der Tiere ins Verhältnis gesetzte Muskelmasse in keiner Altersgruppe der  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ -Kohorte signifikant reduziert. Die im Alter von 65

## Diskussion

---

Wochen signifikant geringere absolute Muskelmasse der  $G\alpha_{i2}^{SKM-KO}$ -Gruppe relativiert sich aufgrund des um ca. 25 % geringeren Gesamtkörpergewichtes im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Aussage eines signifikanten Effektes der Myf5-Cre-medierten *Gnai2*-Deletion auf die Skelettmuskelmasse ist dessen ungeachtet zulässig, da die Skelettmuskelmasse nur eine schwache Korrelation mit dem Körpergewicht hat und zahlreiche Studien nahelegen, dass ein adipöser Gesamtzustand nicht mit einer erhöhten absoluten Skelettmuskelmasse im Vergleich zu einem schlanken Körpertyp einhergeht (Kim et al., 2018; Pourhassan et al., 2014; Pourhassan et al., 2017).

Eine konkrete Ursache für die im Vergleich zur globalen *Gnai2*-Deletion erst so viel später einsetzende Divergenz der Muskelmasse und die im Gegensatz zur vorbeschriebenen globalen Gendeletion nicht zu beobachtenden Unterschiede der Muskelfaserdurchmesser (Minetti et al., 2014) konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden. Bei unvollständiger Rekombination im Skelettmuskel mit lediglich um 30 % verminderter Expression von  $G\alpha_{i2}$  muss jedoch mit einer kompensatorischen Möglichkeit der verbliebenen  $G\alpha_{i2}$ -Proteine gerechnet werden. Auch ist ein Einfluss der offensichtlichen Rekombination in nicht-muskulären Geweben möglich. Es muss somit konstatiert werden, dass das untersuchte Mausmodell keine hinreichende Grundlage zur Aufklärung der Funktion von  $G\alpha_{i2}$  im Skelettmuskel leistet.

### 5 Zusammenfassung

G-Proteine sind an vielen Stellen essenzieller Bestandteil der Signalkaskade zur Übermittlung extrazellulärer Stimuli an intrazelluläre Effektoren. Die aus einer  $\alpha$ -Untereinheit und einem  $\beta\gamma$ -Komplex bestehenden funktionellen Dimere werden anhand ihrer  $\alpha$ -Untereinheit charakterisiert. In der hier vorliegenden Arbeit wurde mit  $G\alpha_{i2}$  ein inhibitorisches, ubiquitär im Organismus exprimiertes G-Protein näher beleuchtet. Die Funktion dieses Proteins eruiierend wurde bereits in vergangenen Arbeiten anhand einer globalen Gendeletion in der Maus gezeigt, dass es zur Satellitenzellendifferenzierung und dem Skelettmuskelaufbau beiträgt. Ebenfalls wurde nachgewiesen, dass ein Fehlen von  $G\alpha_{i2}$  zwar keinen Einfluss auf den Blutzuckerspiegel hat, jedoch eine deutliche Reduktion der Insulinspiegel bewirkt. Der zumindest partielle Ursprung der hieraus ableitbar verbesserten Insulinsensitivität wird im Skelettmuskelgewebe vermutet. Der Beweis hierfür steht jedoch bisher aus. Mit der Zielstellung einer skelettmuskelspezifischen  $G\alpha_{i2}$ -Ablation wurde daher im Rahmen dieser Arbeit erstmalig der Phänotyp einer *Myf5-Cre*-medierten *Gnai2*-Deletion ( $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ ) bestimmt.

Die dabei gesammelten Versuchsergebnisse standen der erwarteten Eindeutigkeit jedoch deutlich nach. In der Charakterisierung der Glukosetoleranz zeigte sich in der Kohorte der  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ -Tiere lediglich in der Altersgruppe der 20 Wochen alten Mäusen eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verbesserte Toleranz. Die nach globaler *Gnai2*-Deletion beschriebene verbesserte Insulinsensitivität (Leiss et al., 2014) erreichte in keiner Altersgruppe das Signifikanzniveau. Der Einfluss des Genotyps auf die Skelettmuskelhomöostase war ebenfalls weniger deutlich als nach den in der Literatur beschriebenen Auswirkungen einer globalen *Gnai2*-Deletion zu erwarten war. Lediglich in der Altersgruppe der 65 Wochen alten Tiere zeigte sich eine signifikante Reduktion der Skelettmuskelmasse der  $G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ -Gruppe. Dessen ungeachtet konnten hoch-signifikante Unterschiede im Vergleich des Körpergewichtes demonstriert werden. So zeigte sich die Gruppe der

## Zusammenfassung

---

$G\alpha_{i2}^{\text{SKM-KO}}$ -Tiere über lange Strecken über 10 % und bis maximal 25 % leichter als die Kontrollgruppe ( $G\alpha_{i2}^{\text{fl/fl}}$ ). Eine Differenz der Muskelmassen als alleinige Ursache dafür scheidet nach dem Vergleich der Muskelmasse beider Kohorten allerdings aus. Bei fehlender Quantifizierung der Fettmasse konnte somit nur ein Teil der Gewichtsdifferenz erklärt werden.

Diesen Ergebnissen der Phänotypisierung steht ein nicht minder unerwartetes Resultat der Rekombinations- und Expressionsanalyse gegenüber. So zeigte die Überprüfung der erwarteten Spezifität der Gendeletion auf das Skelettmuskelgewebe neben einer unvollständigen Rekombination im Skelettmuskelgewebe mit nachfolgend nur um 30 % verminderter  $G\alpha_{i2}$ -Expression auch eine Rekombination in nicht-muskulärem Gewebe wie Niere-, Milz- und Fettgewebe. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass mögliche Effekte einer skelettmuskelspezifischen  $G\alpha_{i2}$ -Defizienz sich aufgrund der nur unzureichend reduzierten Expression im hier beschriebenen Mausmodell nicht demaskierten. Ferner muss angenommen werden, dass die auch in nicht-muskulären Geweben nachgewiesene Rekombination sowohl mögliche Effekte der Deletion von *Gnai2* im Skelettmuskel durch konträre Effekte einer entsprechenden *Gnai2*-Deletion in nicht-muskulären Geweben maskiert, wie zum Beispiel bezüglich der unerwartet schwachen Verbesserung der Glukosetoleranz, als auch durch synergistische Effekte verstärkt, wie zum Beispiel bezüglich des deutlichen Gewichtsunterschiedes.

Insbesondere der in der Literatur beschriebene Nachweis von Myf5 in Adipozyten des braunen, beigen und weißen Fettgewebes und die daraus erklärbare Deletion von *Gnai2* auch im Fettgewebe überführen den Sachverhalt der beabsichtigten skelettmuskelspezifischen Defizienz in den einer Pan-Gewebe Defizienz von  $G\alpha_{i2}$  und lassen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse nicht mehr auf eine skelettmuskelspezifische Funktion von  $G\alpha_{i2}$  zurückführen.

### 6 Literaturverzeichnis

- Addison, O., Marcus, R. L., LaStayo, P. C., & Ryan, A. S. (2014). Intermuscular Fat: A Review of the Consequences and Causes [Review]. *International Journal of Endocrinology*, 2014, 11, Article 309570. <https://doi.org/10.1155/2014/309570>
- Alexander, S. P., Fabbro, D., Kelly, E., Marrion, N. V., Peters, J. A., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Southan, C., Davies, J. A., & Collaborators, C. (2017). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: Catalytic receptors. *British Journal of Pharmacology*, 174(S1), S225-S271. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/bph.13876>
- Alexander, S. P. H., Christopoulos, A., Davenport, A. P., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Southan, C., Davies, J. A., & Collaborators, C. (2019). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: G protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology*, 176(S1), S21-S141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/bph.14748>
- Alexander, S. P. H., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Striessnig, J., Kelly, E., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Southan, C., Davies, J. A., Aldrich, R. W., Attali, B., Baggetta, A. M., Becirovic, E., Biel, M., Bill, R. M., Catterall, W. A., . . . Zhu, M. (2021). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2021/22: Ion channels. *British Journal of Pharmacology*, 178(S1), S157-S245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/bph.15539>
- Alvarez, M. J., Vila-Ortiz, G. J., Salibe, M. C., Podhajcer, O. L., & Pitossi, F. J. (2007). Model based analysis of real-time PCR data from DNA binding dye protocols. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 85. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-85>
- Anderson, J. E., Wozniak, A. C., & Mizunoya, W. (2012). Single Muscle-Fiber Isolation and Culture for Cellular, Molecular, Pharmacological, and Evolutionary Studies. In J. X. DiMario (Ed.), *Myogenesis: Methods and Protocols* (pp. 85-102). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-343-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-343-1_6)
- Andrusaite, A., & Milling, S. (2020). Should we be more cre-tical? A cautionary tale of recombination. *Immunology*, 159(2), 131-132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/imm.13170>
- Ärnlöv, J., Sundström, J., Ingelsson, E., & Lind, L. (2010). Impact of BMI and the Metabolic Syndrome on the Risk of Diabetes in Middle-Aged Men. *Diabetes Care*, 34(1), 61-65. <https://doi.org/10.2337/dc10-0955>
- Asan, E. (2015). *Taschenlehrbuch Histologie* (5., vollständig überarbeitete Auflage ed.). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-003-124637>
- Baron, A. D., Brechtel, G., Wallace, P., & Edelman, S. V. (1988). Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in

- humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 255(6), E769-E774. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1988.255.6.E769>
- Baskin, K. K., Winders, B. R., & Olson, E. N. (2015). Muscle as a “mediator” of systemic metabolism. *Cell metabolism*, 21(2), 237-248.
- Becher, B., Waisman, A., & Lu, L.-F. (2018). Conditional Gene-Targeting in Mice: Problems and Solutions. *Immunity*, 48(5), 835-836. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.05.002>
- Beer-Hammer, S., Lee, S. C., Mauriac, S. A., Leiss, V., Groh, I. A. M., Novakovic, A., Piekorz, R. P., Bucher, K., Chen, C., Ni, K., Singer, W., Harasztosi, C., Schimmang, T., Zimmermann, U., Pfeffer, K., Birnbaumer, L., Forge, A., Montcouquiol, M., Knipper, M., . . . Rüttiger, L. (2018). Gαi Proteins are Indispensable for Hearing. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47(4), 1509-1532. <https://doi.org/10.1159/000490867>
- Bjerregaard, L. G., Jensen, B. W., Ångquist, L., Osler, M., Sørensen, T. I., & Baker, J. L. (2018). Change in overweight from childhood to early adulthood and risk of type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine*.
- Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R., & Hamm, H. E. (2003). Insights into G Protein Structure, Function, and Regulation. *Endocrine Reviews*, 24(6), 765-781. <https://doi.org/10.1210/er.2000-0026>
- Campbell, A. P., & Smrcka, A. V. (2018). Targeting G protein-coupled receptor signalling by blocking G proteins. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(11), 789-803. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.135>
- Cao, J., Spielmann, M., Qiu, X., Huang, X., Ibrahim, D. M., Hill, A. J., Zhang, F., Mundlos, S., Christiansen, L., Steemers, F. J., Trapnell, C., & Shendure, J. (2019). The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature*, 566(7745), 496-502. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0969-x>
- Chadt, A., & Al-Hasani, H. (2020). Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 472(9), 1273-1298. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02417-x>
- Chait, A., & den Hartigh, L. J. (2020). Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease [Review]. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00022>
- Comai, G., Sambasivan, R., Gopalakrishnan, S., & Tajbakhsh, S. (2014). Variations in the Efficiency of Lineage Marking and Ablation Confound Distinctions between Myogenic Cell Populations. *Developmental cell*, 31(5), 654-667. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.005>
- Davis, J., Maillet, M., Miano, J. M., & Molkenin, J. D. (2012). Lost in Transgenesis. *Circulation Research*, 111(6), 761-777. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.262717>
- Dienel, G. A. (2018). Brain Glucose Metabolism: Integration of Energetics with Function. *Physiological Reviews*, 99(1), 949-1045. <https://doi.org/10.1152/physrev.00062.2017>

- Dror, R. O., Mildorf, T. J., Hilger, D., Manglik, A., Borhani, D. W., Arlow, D. H., Philippsen, A., Villanueva, N., Yang, Z., Lerch, M. T., Hubbell, W. L., Kobilka, B. K., Sunahara, R. K., & Shaw, D. E. (2015). Structural basis for nucleotide exchange in heterotrimeric G proteins. *Science*, *348*(6241), 1361-1365. <https://doi.org/doi:10.1126/science.aaa5264>
- Du, Y., Duc, N. M., Rasmussen, S. G. F., Hilger, D., Kubiak, X., Wang, L., Bohon, J., Kim, H. R., Wegrecki, M., Asuru, A., Jeong, K. M., Lee, J., Chance, M. R., Lodowski, D. T., Kobilka, B. K., & Chung, K. Y. (2019). Assembly of a GPCR-G Protein Complex. *Cell*, *177*(5), 1232-1242.e1211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.022>
- Duyne, G. D. V. (2001). A Structural View of Cre-loxP Site-Specific Recombination. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, *30*(1), 87-104. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.30.1.87>
- Færch, K., Vistisen, D., Pacini, G., Torekov, S. S., Johansen, N. B., Witte, D. R., Jonsson, A., Pedersen, O., Hansen, T., Lauritzen, T., Jørgensen, M. E., Ahrén, B., & Holst, J. J. (2016). Insulin Resistance Is Accompanied by Increased Fasting Glucagon and Delayed Glucagon Suppression in Individuals With Normal and Impaired Glucose Regulation. *Diabetes*, *65*(11), 3473-3481. <https://doi.org/10.2337/db16-0240>
- Fairless, A. H., Dow, H. C., Kreibich, A. S., Torre, M., Kuruvilla, M., Gordon, E., Morton, E. A., Tan, J., Berrettini, W. H., Li, H., Abel, T., & Brodtkin, E. S. (2012). Sociability and brain development in BALB/cJ and C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research*, *228*(2), 299-310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.12.001>
- Farrow, M., Biglands, J., Tanner, S. F., Clegg, A., Brown, L., Hensor, E. M. A., O'Connor, P., Emery, P., & Tan, A. L. (2021). The effect of ageing on skeletal muscle as assessed by quantitative MR imaging: an association with frailty and muscle strength. *Aging Clinical and Experimental Research*, *33*(2), 291-301. <https://doi.org/10.1007/s40520-020-01530-2>
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2008*(5), pdb.prot4986. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>
- Friedman, J. M. (2019). Leptin and the endocrine control of energy balance. *Nature Metabolism*, *1*(8), 754-764. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0095-y>
- Funcke, J. B., & Scherer, P. E. (2019). Beyond adiponectin and leptin: adipose tissue-derived mediators of inter-organ communication. *J Lipid Res*, *60*(10), 1648-1684. <https://doi.org/10.1194/jlr.R094060>
- Gensch, N., Borchardt, T., Schneider, A., Riethmacher, D., & Braun, T. (2008). Different autonomous myogenic cell populations revealed by ablation of Myf5-expressing cells during mouse embryogenesis. *Development*, *135*(9), 1597-1604. <https://doi.org/10.1242/dev.019331>
- Gierut, J. J., Jacks, T. E., & Haigis, K. M. (2014). Strategies to Achieve Conditional Gene Mutation in Mice. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2014*(4), pdb.top069807. <https://doi.org/10.1101/pdb.top069807>

- Glass, D. J. (2003). Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends in Molecular Medicine*, 9(8), 344-350. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(03\)00138-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00138-2)
- Gohla, A., Klement, K., Piekorz, R. P., Pexa, K., vom Dahl, S., Spicher, K., Dreval, V., Häussinger, D., Birnbaumer, L., & Nürnberg, B. (2007). An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein G<sub>i3</sub> in the antiautophagic action of insulin in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(8), 3003-3008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611434104>
- Granier, S., & Kobilka, B. (2012). A new era of GPCR structural and chemical biology. *Nature Chemical Biology*, 8(8), 670-673. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1025>
- Graves, D. C., & Yablonka-Reuveni, Z. (2000). Vascular Smooth Muscle Cells Spontaneously Adopt a Skeletal Muscle Phenotype: A Unique Myf5–/MyoD+ Myogenic Program. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 48(9), 1173-1193. <https://doi.org/10.1177/002215540004800902>
- Grundy, S. M. (2016). Metabolic syndrome update. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 26(4), 364-373. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tcm.2015.10.004>
- Haeusler, R. A., McGraw, T. E., & Accili, D. (2018). Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(1), 31-44. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89>
- Haldar, M., Hancock, J. D., Coffin, C. M., Lessnick, S. L., & Capecchi, M. R. (2007). A Conditional Mouse Model of Synovial Sarcoma: Insights into a Myogenic Origin. *Cancer Cell*, 11(4), 375-388. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.01.016>
- Haldar, M., Karan, G., Tvrdik, P., & Capecchi, M. R. (2008). Two cell lineages, myf5 and myf5-independent, participate in mouse skeletal myogenesis. *Developmental cell*, 14(3), 437-445. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.01.002>
- Hardie, D. G. (1991). Cell Surface Receptors — Signal Transduction. In *Biochemical Messengers: Hormones, neurotransmitters and growth factors* (pp. 147-189). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-3108-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-011-3108-7_7)
- Hargreaves, M., & Spriet, L. L. (2020). Skeletal muscle energy metabolism during exercise. *Nature Metabolism*, 2(9), 817-828. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0251-4>
- Hepler, J. R., & Gilman, A. G. (1992). G proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(10), 383-387. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0968-0004\(92\)90005-T](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0968-0004(92)90005-T)
- Herzig, S., & Shaw, R. J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(2), 121-135. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.95>
- Hilger, D., Masureel, M., & Kobilka, B. K. (2018). Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(1), 4-12. <https://doi.org/10.1038/s41594-017-0011-7>



- Hou, G. Y., Zhou, H. L., Cao, T., Xun, W. J., Wang, D. J., Shi, L. G., Guan, S., Wang, D. F., & Li, M. (2015). Expression and variation of Myf5 and MyoD1 genes in different tissues of Wuzhishan pigs. *Genetics and Molecular Research*, 14(2), 3729-3735. <https://doi.org/10.4238/2015.April.17.22>
- Hu, G.-M., Mai, T.-L., & Chen, C.-M. (2017). Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution. *Scientific Reports*, 7(1), 15495. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15707-9>
- Hubbard, S. R. (2013). The Insulin Receptor: Both a Prototypical and Atypical Receptor Tyrosine Kinase. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3), Article a008946. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008946>
- Jiang, G., & Zhang, B. B. (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 284(4), E671-E678. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00492.2002>
- Kahner, B. N., Shankar, H., Murugappan, S., Prasad, G. L., & Kunapuli, S. P. (2006). Nucleotide receptor signaling in platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(11), 2317-2326. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02192.x>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S., Hudspeth, A. J., & Mack, S. (2000). *Principles of neural science* (Vol. 4). McGraw-hill New York.
- Kehrl, J. H. (2016). The impact of RGS and other G-protein regulatory proteins on Gai-mediated signaling in immunity. *Biochemical Pharmacology*, 114, 40-52. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.04.005>
- Keller, K., Maass, M., Dizayee, S., Leiss, V., Annala, S., Köth, J., Seemann, W. K., Müller-Ehmsen, J., Mohr, K., Nürnberg, B., Engelhardt, S., Herzig, S., Birnbaumer, L., & Matthes, J. (2015). Lack of G $\alpha_{i2}$  leads to dilative cardiomyopathy and increased mortality in  $\beta$ 1-adrenoceptor overexpressing mice. *Cardiovascular Research*, 108(3), 348-356. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv235>
- Kenakin, T. (2019). Biased Receptor Signaling in Drug Discovery. *Pharmacological Reviews*, 71(2), 267-315. <https://doi.org/10.1124/pr.118.016790>
- Kim, G., Lee, S.-E., Jun, J. E., Lee, Y.-B., Ahn, J., Bae, J. C., Jin, S.-M., Hur, K. Y., Jee, J. H., Lee, M.-K., & Kim, J. H. (2018). Increase in relative skeletal muscle mass over time and its inverse association with metabolic syndrome development: a 7-year retrospective cohort study. *Cardiovascular Diabetology*, 17(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0659-2>
- Kimple, A. J., Bosch, D. E., Giguère, P. M., & Siderovski, D. P. (2011). Regulators of G-Protein Signaling and Their G $\alpha$  Substrates: Promises and Challenges in Their Use as Drug Discovery Targets. *Pharmacological Reviews*, 63(3), 728-749. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003038>
- Kleinert, M., Clemmensen, C., Hofmann, S. M., Moore, M. C., Renner, S., Woods, S. C., Huypens, P., Beckers, J., de Angelis, M. H., Schurmann,

## Literaturverzeichnis

---

- A., Bakhti, M., Klingenspor, M., Heiman, M., Cherrington, A. D., Ristow, M., Lickert, H., Wolf, E., Havel, P. J., Muller, T. D., & Tschop, M. H. (2018). Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(3), 140-162. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.161>
- Klip, A., McGraw, T. E., & James, D. E. (2019). Thirty sweet years of GLUT4. *Journal of Biological Chemistry*, 294(30), 11369-11381. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.008351>
- Knight, K. M., Ghosh, S., Campbell, S. L., Lefevre, T. J., Olsen, R. H. J., Smrcka, A. V., Valentin, N. H., Yin, G., Vaidehi, N., & Dohlman, H. G. (2021). A universal allosteric mechanism for G protein activation. *Molecular Cell*, 81(7), 1384-1396.e1386. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.02.002>
- Kobilka, B. (2013). The Structural Basis of G-Protein-Coupled Receptor Signaling (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 52(25), 6380-6388. <https://doi.org/10.1002/anie.201302116>
- Koehl, A., Hu, H., Maeda, S., Zhang, Y., Qu, Q., Paggi, J. M., Latorraca, N. R., Hilger, D., Dawson, R., Matile, H., Schertler, G. F. X., Granier, S., Weis, W. I., Dror, R. O., Manglik, A., Skiniotis, G., & Kobilka, B. K. (2018). Structure of the  $\mu$ -opioid receptor–Gi protein complex. *Nature*, 558(7711), 547-552. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0219-7>
- Kolakowski, L. F. (1994). GCRDB - A G-Protein-coupled receptor database. *Receptors & Channels*, 2(1), 1-7. <Go to ISI>://WOS:A1994NT28300001
- Kolb, P., Kenakin, T., Alexander, S. P. H., Bermudez, M., Bohn, L. M., Breinholt, C. S., Bouvier, M., Hill, S. J., Kostenis, E., Martemyanov, K. A., Neubig, R. R., Onaran, H. O., Rajagopal, S., Roth, B. L., Selent, J., Shukla, A. K., Sommer, M. E., & Gloriam, D. E. (2022). Community guidelines for GPCR ligand bias: IUPHAR review 32. *British Journal of Pharmacology*, 179(14), 3651-3674. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/bph.15811>
- Kowalski, G. M., & Bruce, C. R. (2014). The regulation of glucose metabolism: implications and considerations for the assessment of glucose homeostasis in rodents. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 307(10), E859-E871. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00165.2014>
- Laboulaye, M. A., Duan, X., Qiao, M., Whitney, I. E., & Sanes, J. R. (2018). Mapping Transgene Insertion Sites Reveals Complex Interactions Between Mouse Transgenes and Neighboring Endogenous Genes [Original Research]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00385>
- Lafferty-Whyte, K., Mormeneo, D., & del Fresno Marimon, M. (2017). Trial watch: Opportunities and challenges of the 2016 target landscape [Article]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16, 10+. <https://link.gale.com/apps/doc/A475291155/HRCA?u=anon~43e6f59&sid=googleScholar&xid=938f7e42>
- Lambert, N. A., Johnston, C. A., Cappell, S. D., Kuravi, S., Kimple, A. J., Willard, F. S., & Siderovski, D. P. (2010). Regulators of G-protein Signaling accelerate GPCR signaling kinetics and govern sensitivity solely by accelerating GTPase activity. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences*, 107(15), 7066-7071.  
<https://doi.org/doi:10.1073/pnas.0912934107>
- Le Ricousse-Roussanne, S., Larghero, J., Zini, J.-M., Barateau, V., Foubert, P., Uzan, G., Liu, X., Lacassagne, M.-N., Ternaux, B., Robert, I., Benbunan, M., Vilquin, J.-T., Vauchez, K., Tobelem, G., & Marolleau, J.-P. (2007). Ex vivo generation of mature and functional human smooth muscle cells differentiated from skeletal myoblasts. *Experimental Cell Research*, 313(7), 1337-1346.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.01.022>
- Leahy, J. L. (2005). Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Archives of Medical Research*, 36(3), 197-209.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.01.003>
- Lee, K. Y., Russell, S. J., Ussar, S., Boucher, J., Vernochet, C., Mori, M. A., Smyth, G., Rourk, M., Cederquist, C., Rosen, E. D., Kahn, B. B., & Kahn, C. R. (2013). Lessons on Conditional Gene Targeting in Mouse Adipose Tissue. *Diabetes*, 62(3), 864-874. <https://doi.org/10.2337/db12-1089>
- Leiss, V., Flockerzie, K., Novakovic, A., Rath, M., Schönsiegel, A., Birnbaumer, L., Schürmann, A., Harteneck, C., & Nürnberg, B. (2014). Insulin secretion stimulated by l-arginine and its metabolite l-ornithine depends on G $\alpha$ (i2). *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 307(9), E800-E812.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00337.2014>
- Leiss, V., Schönsiegel, A., Gnad, T., Kerner, J., Kaur, J., Sartorius, T., Machann, J., Schick, F., Birnbaumer, L., Häring, H.-U., Pfeifer, A., & Nürnberg, B. (2020). Lack of G $\alpha$ i2 proteins in adipocytes attenuates diet-induced obesity. *Molecular Metabolism*, 40, 101029.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101029>
- 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(2), 216-224. <https://doi.org/10.1007/PL00005044>
- Li, Z.-W., Sun, B., Gong, T., Guo, S., Zhang, J., Wang, J., Sugawara, A., Jiang, M., Yan, J., Gurary, A., Zheng, X., Gao, B., Xiao, S.-Y., Chen, W., Ma, C., Farrar, C., Zhu, C., Chan, O. T. M., Xin, C., . . . Chu, W.-M. (2019). GNAI1 and GNAI3 Reduce Colitis-Associated Tumorigenesis in Mice by Blocking IL6 Signaling and Down-regulating Expression of GNAI2. *Gastroenterology*, 156(8), 2297-2312.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.02.040>
- Lian, X., Beer-Hammer, S., König, G. M., Kostenis, E., Nürnberg, B., & Gollasch, M. (2018). RXFP1 Receptor Activation by Relaxin-2 Induces Vascular Relaxation in Mice via a G $\alpha$ i2-Protein/PI3K $\beta$ / $\gamma$ /Nitric Oxide-Coupled Pathway [Original Research]. *Frontiers in Physiology*, 9.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01234>
- Liu, G. Y., & Sabatini, D. M. (2020). mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(4), 183-203. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y>

- Löffler, G., & Müller, M. (2014a). Kohlenhydrate, Lipide, Aminosäuren und Nucleotide – Bausteine des Lebens. In P. C. Heinrich, M. Müller, & L. Graeve (Eds.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (pp. 26-53). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_3)
- Löffler, G., & Müller, M. (2014b). Mechanismen der Glucosehomöostase. In P. C. Heinrich, M. Müller, & L. Graeve (Eds.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (pp. 199-213). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_15)
- Lukowski, R., Weber, S., Weinmeister, P., Feil, S., & Feil, R. (2005). Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-Signalwegs in der Maus. *BIOSpektrum*, 11(3), 287-290.
- Maizel, J. V. (1971). 5 - Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Viral Proteins. In K. Maramorosch & H. Koprowski (Eds.), *Methods in Virology* (Vol. 5, pp. 179-246). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-470205-9.50011-3>
- Martino, F., Perestrelo, A. R., Vinarský, V., Pagliari, S., & Forte, G. (2018). Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function [Review]. *Frontiers in Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00824>
- McKee, T. J., Perlman, G., Morris, M., & Komarova, S. V. (2019). Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 9(1), 10542-10542. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46896-0>
- McMahon, C. D., Chai, R., Radley-Crabb, H. G., Watson, T., Matthews, K. G., Sheard, P. W., Soffe, Z., Grounds, M. D., & Shavlakadze, T. (2014). Lifelong exercise and locally produced insulin-like growth factor-1 (IGF-1) have a modest influence on reducing age-related muscle wasting in mice. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 24(6), e423-435. <https://doi.org/10.1111/sms.12200>
- Minetti, G. C., Feige, J. N., Bombard, F., Heier, A., Morvan, F., Nürnberg, B., Leiss, V., Birnbaumer, L., Glass, D. J., & Fornaro, M. (2014). Gα<sub>i2</sub> Signaling Is Required for Skeletal Muscle Growth, Regeneration, and Satellite Cell Proliferation and Differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 34(4), 619-630. <https://doi.org/10.1128/MCB.00957-13>
- Minetti, G. C., Feige, J. N., Rosenstiel, A., Bombard, F., Meier, V., Werner, A., Bassilana, F., Sailer, A. W., Kahle, P., Lambert, C., Glass, D. J., & Fornaro, M. (2011). Gα<sub>i2</sub> Signaling Promotes Skeletal Muscle Hypertrophy, Myoblast Differentiation, and Muscle Regeneration. *Science Signaling*, 4(201), ra80-ra80. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002038>
- Minokoshi, Y., Kim, Y.-B., Peroni, O. D., Fryer, L. G. D., Müller, C., Carling, D., & Kahn, B. B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, 415(6869), 339-343. <https://doi.org/10.1038/415339a>
- Mobley, C. B., Vechetti, I. J., Jr., Valentino, T. R., & McCarthy, J. J. (2020). CORP: Using transgenic mice to study skeletal muscle physiology.

- Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985), 128(5), 1227-1239.  
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00021.2020>
- Mongraw-Chaffin, M., Foster, M. C., Anderson, C. A. M., Burke, G. L., Haq, N., Kalyani, R. R., Ouyang, P., Sibley, C. T., Tracy, R., Woodward, M., & Vaidya, D. (2018). Metabolically Healthy Obesity, Transition to Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Risk. *Journal of the American College of Cardiology*, 71(17), 1857-1865.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.02.055>
- Moore, M. C., Coate, K. C., Winnick, J. J., An, Z., & Cherrington, A. D. (2012). Regulation of Hepatic Glucose Uptake and Storage In Vivo. *Advances in Nutrition*, 3(3), 286-294. <https://doi.org/10.3945/an.112.002089>
- Mukund, K., & Subramaniam, S. (2020). Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *WIREs Systems Biology and Medicine*, 12(1), e1462.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>
- Musarò, A., & Barberi, L. (2010). Isolation and Culture of Mouse Satellite Cells. In A. Ward & D. Tosh (Eds.), *Mouse Cell Culture: Methods and Protocols* (pp. 101-111). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-019-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-019-5_8)
- Mutel, E., Gautier-Stein, A., Abdul-Wahed, A., Amigó-Correig, M., Zitoun, C., Stefanutti, A., Houberdon, I., Tourette, J.-A., Mithieux, G., & Rajas, F. (2011). Control of Blood Glucose in the Absence of Hepatic Glucose Production During Prolonged Fasting in Mice. *Induction of Renal and Intestinal Gluconeogenesis by Glucagon*, 60(12), 3121-3131.  
<https://doi.org/10.2337/db11-0571>
- Nicholson, T., Church, C., Baker, D. J., & Jones, S. W. (2018). The role of adipokines in skeletal muscle inflammation and insulin sensitivity. *Journal of Inflammation*, 15(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12950-018-0185-8>
- Novacki. (2015). Die Rolle von Gai-Proteinen für die murine Lungenfunktion. *Medizinische Dissertation, Universität Tübingen*.
- Nürnberg, B., & Beer-Hammer, S. (2019). Function, Regulation and Biological Roles of PI3K $\gamma$  Variants. *Biomolecules*, 9(9), 427.  
<https://doi.org/10.3390/biom9090427>
- O'Brien, J. B., Wilkinson, J. C., & Roman, D. L. (2019). Regulator of G-protein signaling (RGS) proteins as drug targets: Progress and future potentials. *Journal of Biological Chemistry*, 294(49), 18571-18585.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.007060>
- Offermanns, S., & Simon, M. I. (1998). Genetic analysis of mammalian G-protein signalling [Review Article]. *Oncogene*, 17, 1375.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202173>
- Ohn, J. H., Kwak, S. H., Cho, Y. M., Lim, S., Jang, H. C., Park, K. S., & Cho, N. H. (2016). 10-year trajectory of  $\beta$ -cell function and insulin sensitivity in the development of type 2 diabetes: a community-based prospective cohort study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 4(1), 27-34.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(15\)00336-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2213-8587(15)00336-8)
- Ott, M. O., Bober, E., Lyons, G., Arnold, H., & Buckingham, M. (1991). Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of

- skeletal muscle in the mouse embryo. *Development*, 111(4), 1097-1107. <https://dev.biologists.org/content/develop/111/4/1097.full.pdf>
- Overend, T. J., Cunningham, D. A., Paterson, D. H., & Lefcoe, M. S. (1992). Thigh composition in young and elderly men determined by computed tomography. *Clin Physiol*, 12(6), 629-640. <https://doi.org/10.1111/j.1475-097x.1992.tb00366.x>
- Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological Reviews*, 98(4), 2133-2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
- Petersen, M. C., Vatner, D. F., & Shulman, G. I. (2017). Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(10), 572-587. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.80>
- Pourhassan, M., Bosity-Westphal, A., Schautz, B., Braun, W., Glüer, C.-C., & Müller, M. J. (2014). Impact of body composition during weight change on resting energy expenditure and homeostasis model assessment index in overweight nonsmoking adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99(4), 779-791. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.071829>
- Pourhassan, M., Glüer, C. C., Pick, P., Tigges, W., & Müller, M. J. (2017). Impact of weight loss-associated changes in detailed body composition as assessed by whole-body MRI on plasma insulin levels and homeostasis model assessment index. *European Journal of Clinical Nutrition*, 71(2), 212-218. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2016.189>
- Recinella, L., Orlando, G., Ferrante, C., Chiavaroli, A., Brunetti, L., & Leone, S. (2020). Adipokines: New Potential Therapeutic Target for Obesity and Metabolic, Rheumatic, and Cardiovascular Diseases [Review]. *Frontiers in Physiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.578966>
- Riddy, D. M., Delerive, P., Summers, R. J., Sexton, P. M., & Langmead, C. J. (2018). G Protein-Coupled Receptors Targeting Insulin Resistance, Obesity, and Type 2 Diabetes Mellitus. *Pharmacological Reviews*, 70(1), 39-67. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014373>
- Robertson, R. P., Seaquist, E. R., & Walseth, T. F. (1991). G Proteins and Modulation of Insulin Secretion. *Diabetes*, 40(1), 1-6. <https://doi.org/10.2337/diab.40.1.1>
- Roden, M., & Shulman, G. I. (2019). The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature*, 576(7785), 51-60. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1797-8>
- Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(3), e219. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.6>
- Rodrigues, A. C. Z., Messi, M. L., Wang, Z.-M., Abba, M. C., Pereyra, A., Birbrair, A., Zhang, T., O'Meara, M., Kwan, P., Lopez, E. I. S., Willis, M. S., Mintz, A., Files, D. C., Furdui, C., Oppenheim, R. W., & Delbono, O. (2019). The sympathetic nervous system regulates skeletal muscle motor innervation and acetylcholine receptor stability. *Acta Physiologica*, 225(3), e13195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/apha.13195>
- Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, 444(7121), 847-853. <https://doi.org/10.1038/nature05483>

- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, *459*(7245), 356-363. <https://doi.org/10.1038/nature08144>
- Rossi, M., Zhu, L., McMillin, S. M., Pydi, S. P., Jain, S., Wang, L., Cui, Y., Lee, R. J., Cohen, A. H., Kaneto, H., Birnbaum, M. J., Ma, Y., Rotman, Y., Liu, J., Cyphert, T. J., Finkel, T., McGuinness, O. P., & Wess, J. (2018). Hepatic G<sub>i</sub> signaling regulates whole-body glucose homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation*, *128*(2), 746-759. <https://doi.org/10.1172/JCI94505>
- Rudolph, U., Finegold, M. J., Rich, S. S., Harriman, G. R., 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*(2), 143-150. <https://doi.org/10.1038/ng0695-143>
- Saklayen, M. G. (2018). The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Current Hypertension Reports*, *20*(2), 12. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>
- Saltiel, A. R. (2021). Insulin signaling in health and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *131*(1). <https://doi.org/10.1172/JCI142241>
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism [10.1038/414799a]. *Nature*, *414*(6865), 799-806. <http://dx.doi.org/10.1038/414799a>
- Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2016). The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *The Journal of Clinical Investigation*, *126*(1), 12-22.
- Sanchez-Gurmaches, J., & Guertin, D. A. (2014). Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nature Communications*, *5*(1), 4099. <https://doi.org/10.1038/ncomms5099>
- Sandoval, D. A., & D'Alessio, D. A. (2015). Physiology of Proglucagon Peptides: Role of Glucagon and GLP-1 in Health and Disease. *Physiological Reviews*, *95*(2), 513-548. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2014>
- Sartori, R., Romanello, V., & Sandri, M. (2021). Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease. *Nature Communications*, *12*(1), 330. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20123-1>
- Savage, D. B., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2007). Disordered Lipid Metabolism and the Pathogenesis of Insulin Resistance. *Physiological Reviews*, *87*(2), 507-520. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2006>
- Scheja, L., & Heeren, J. (2019). The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nature Reviews Endocrinology*, *15*(9), 507-524. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0230-6>
- Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B., & Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS Journal*, *280*(17), 4294-4314. <https://doi.org/10.1111/febs.12253>
- Schiaffino, S., & Mammucari, C. (2011). Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skeletal Muscle*, *1*, 4-4. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-4>

- Schmidt-Supprian, M., & Rajewsky, K. (2007). Vagaries of conditional gene targeting. *Nature Immunology*, 8(7), 665-668. <https://doi.org/10.1038/ni0707-665>
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Rudnicki, M. A., Beier, D. R., & Spiegelman, B. M. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, 454(7207), 961-967. <https://doi.org/10.1038/nature07182>
- Silver, L. M. (1995). *Mouse genetics: concepts and applications*. Oxford University Press.
- Skyler, J. S., Bakris, G. L., Bonifacio, E., Darsow, T., Eckel, R. H., Groop, L., Groop, P.-H., Handelsman, Y., Insel, R. A., Mathieu, C., McElvaine, A. T., Palmer, J. P., Pugliese, A., Schatz, D. A., Sosenko, J. M., Wilding, J. P. H., & Ratner, R. E. (2017). Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. *Diabetes*, 66(2), 241-255. <https://doi.org/10.2337/db16-0806>
- Smith, B. J. (1984). Acetic Acid-Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In J. M. Walker (Ed.), *Proteins* (pp. 63-73). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-062-8:63>
- Smith, J. S., Lefkowitz, R. J., & Rajagopal, S. (2018). Biased signalling: from simple switches to allosteric microprocessors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(4), 243-260. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.229>
- Song, A. J., & Palmiter, R. D. (2018). Detecting and Avoiding Problems When Using the Cre-lox System. *Trends in Genetics*, 34(5), 333-340. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.12.008>
- Sorriento, D., Rusciano, M. R., Visco, V., Fiordelisi, A., Cerasuolo, F. A., Poggio, P., Ciccarelli, M., & Iaccarino, G. (2021). The Metabolic Role of GRK2 in Insulin Resistance and Associated Conditions. *Cells*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/cells10010167>
- Sriram, K., & Insel, P. A. (2018). G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Molecular Pharmacology*, 93(4), 251-258. <https://doi.org/10.1124/mol.117.111062>
- Staiger, H., Stefan, N., Kellerer, M., & Häring, H.-U. (2014a). Glucagon und Katecholamine – Gegenspieler des Insulins. In P. C. Heinrich, M. Müller, & L. Graeve (Eds.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (pp. 458-465). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3\\_37](https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_37)
- Staiger, H., Stefan, N., Kellerer, M., & Häring, H.-U. (2014b). Insulin – das wichtigste anabole Hormon. In P. C. Heinrich, M. Müller, & L. Graeve (Eds.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (pp. 442-457). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3\\_36](https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_36)
- Sternberg, N., & Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*, 150(4), 467-486. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90375-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90375-2)
- Strassheim, D., Sullivan, T., Irwin, D. C., Gerasimovskaya, E., Lahm, T., Klemm, D. J., Dempsey, E. C., Stenmark, K. R., & Karoor, V. (2021).



- Metabolite G-Protein Coupled Receptors in Cardio-Metabolic Diseases. *Cells*, 10(12), 3347. <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/12/3347>
- Südhof, T. C. (2004). THE SYNAPTIC VESICLE CYCLE. *Annual Review of Neuroscience*, 27(1), 509-547. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412>
- Sunahara, Dessauer, & Gilman. (1996). Complexity and Diversity of Mammalian Adenylyl Cyclases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36(1), 461-480. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.36.040196.002333>
- Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R., & Huang, X.-Y. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *Journal of molecular biology*, 428(19), 3850-3868. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.002>
- Tan, J. K., McKenzie, C., Mariño, E., Macia, L., & Mackay, C. R. (2017). Metabolite-Sensing G Protein–Coupled Receptors—Facilitators of Diet-Related Immune Regulation. *Annual Review of Immunology*, 35(1), 371-402. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052235>
- Timmons, J. A., Wennmalm, K., Larsson, O., Walden, T. B., Lassmann, T., Petrovic, N., Hamilton, D. L., Gimeno, R. E., Wahlestedt, C., Baar, K., Nedergaard, J., & Cannon, B. (2007). Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11), 4401-4406. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610615104>
- Tonack, S., Tang, C., & Offermanns, S. (2013). Endogenous metabolites as ligands for G protein-coupled receptors modulating risk factors for metabolic and cardiovascular disease. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 304(4), H501-H513. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00641.2012>
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350-4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Unger, R. H., & Cherrington, A. D. (2012). Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(1), 4-12. <https://doi.org/10.1172/JCI60016>
- Vallon, V. (2020). Glucose transporters in the kidney in health and disease. *Pflügers Arch*, 472(9), 1345-1370. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02361-w>
- van den Bos, E., Ambrosy, B., Horsthemke, M., Walbaum, S., Bachg, A. C., Wettschureck, N., Innamorati, G., Wilkie, T. M., & Hanley, P. J. (2020). Knockout mouse models reveal the contributions of G protein subunits to complement C5a receptor–mediated chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, 295(22), 7726-7742. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011984>
- van der Velden, J. L. J., Schols, A. M. W. J., Willems, J., Kelders, M. C. J. M., & Langen, R. C. J. (2008). Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Suppresses Myogenic Differentiation through Negative Regulation of NFATc3.

## Literaturverzeichnis

---

- Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 358-366.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M707812200>
- Van Duynes, G. D. (2001). A structural view of cre-loxp site-specific recombination. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 30, 87-104.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.30.1.87>
- Van Eps, N., Preininger, A. M., Alexander, N., Kaya, A. I., Meier, S., Meiler, J., Hamm, H. E., & Hubbell, W. L. (2011). Interaction of a G protein with an activated receptor opens the interdomain interface in the alpha subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(23), 9420-9424. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105810108>
- Verdijk, L. B., Koopman, R., Schaart, G., Meijer, K., Savelberg, H. H. C. M., & Loon, L. J. C. v. (2007). Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 292(1), E151-E157.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00278.2006>
- Wacker, D., Stevens, R. C., & Roth, B. L. (2017). How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell*, 170(3), 414-427.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.009>
- Wang, J., Gareri, C., & Rockman, H. A. (2018). G-Protein–Coupled Receptors in Heart Disease. *Circulation Research*, 123(6), 716-735.  
<https://doi.org/doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.311403>
- Wang, L., Pydi, S. P., Zhu, L., Barella, L. F., Cui, Y., Gavriloa, O., Bence, K. K., Vernochet, C., & Wess, J. (2020). Adipocyte Gi signaling is essential for maintaining whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Nature Communications*, 11(1), 2995. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16756-x>
- Wang, Y., Park, S., Bajpayee, N. S., Nagaoka, Y., Boulay, G., Birnbaumer, L., & Jiang, M. (2011). Augmented glucose-induced insulin release in mice lacking G(o2), but not G(o1) or G(i) proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), 1693-1698. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018903108>
- Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2018). The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. In R. D. Kornberg (Ed.), *Annual Review of Biochemistry*, Vol 87 (Vol. 87, pp. 897-919). Annual Reviews.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033910>
- Wess, J. (2021). In Vivo Metabolic Roles of G Proteins of the Gi Family Studied With Novel Mouse Models. *Endocrinology*, 163(1).  
<https://doi.org/10.1210/endocr/bqab245>
- Wettschureck, N., & Offermanns, S. (2005). Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiological Reviews*, 85(4), 1159-1204.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2005>
- Wiege, K., Ali, S. R., Gewecke, B., Novakovic, A., Konrad, F. M., Pexa, K., Beer-Hammer, S., Reutershan, J., Piekorz, R. P., Schmidt, R. E., Nürnberg, B., & Gessner, J. E. (2013). Gα<sub>12</sub> Is the Essential Gα<sub>i</sub> Protein in Immune Complex–Induced Lung Disease. *The Journal of Immunology*, 190(1), 324-333. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201398>

- Wiege, K., Le, D. D., Syed, S. N., Ali, S. R., Novakovic, A., Beer-Hammer, S., Piekorz, R. P., Schmidt, R. E., Nürnberg, B., & Gessner, J. E. (2012). Defective Macrophage Migration in  $G\alpha_{i2}$ - but Not  $G\alpha_{i3}$ -Deficient Mice. *The Journal of Immunology*, 189(2), 980-987. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200891>
- Wingler, L. M., & Lefkowitz, R. J. (2020). Conformational Basis of G Protein-Coupled Receptor Signaling Versatility. *Trends in Cell Biology*, 30(9), 736-747. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.06.002>
- Winnick, J., An, Z., Moore, M., Ramnanan, C., Farmer, B., Shiota, M., & Cherrington, A. (2009). A physiological increase in the hepatic glycogen level does not affect the response of net hepatic glucose uptake to insulin. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 297, E358-E366. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00043.2009>
- Wooten, D., Christopoulos, A., Marti-Solano, M., Babu, M. M., & Sexton, P. M. (2018). Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(10), 638-653. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0049-3>
- Yang, D., Zhou, Q., Labroska, V., Qin, S., Darbalaei, S., Wu, Y., Yuliantie, E., Xie, L., Tao, H., Cheng, J., Liu, Q., Zhao, S., Shui, W., Jiang, Y., & Wang, M.-W. (2021). G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 7. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00435-w>
- Yaribeygi, H., Farrokhi, F. R., Butler, A. E., & Sahebkar, A. (2019). Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8152-8161. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcp.27603>
- Ye, M., Ruan, C.-C., Fu, M., Xu, L., Chen, D., Zhu, M., Zhu, D., & Gao, P. (2019). Developmental and functional characteristics of the thoracic aorta perivascular adipocyte. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(4), 777-789. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2970-1>

### 7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie und experimentelle Therapie Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Nürnberg durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Nürnberg, Leiter des Instituts für Pharmakologie und experimentelle Therapie Tübingen und Frau Dr. rer. nat. Veronika Leiss.

Sämtliche Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt. Die Immunoblots wurden mit Unterstützung durch Renate Riehle durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Lüneburg, den 29.11.2022

### 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich herzlichst all jenen danken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg für die hervorragende Betreuung, die vielen Anregungen bezüglich Konzeption der Versuche und Interpretation der Ergebnisse sowie die rasche und konstruktive Korrektur des Manuskriptes trotz langwierigem Verschriftlichungsprozess.

Zudem möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Dr. Veronika Leiss für die unermüdliche Hilfsbereitschaft sowie auch in schwierigen Phasen positive und wissenschaftlich konstruktive Unterstützung bedanken. Ohne dies wäre ein Gelingen der Arbeit nicht möglich gewesen.

Ferner möchte ich mich bei Frau Renate Riehle für die geduldige Einführung in die Laborarbeit und praktische Unterstützung insbesondere bei der Erstellung der Immunoblots bedanken.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und ausgezeichnete Zusammenarbeit bedanken.

Bei meinem Vater möchte ich mich für all die Unterstützung bedanken, die ich seit meiner Kindheit erfahren durfte und die ein Studium erst möglich machten. Der Gedanke an ihn und sein diszipliniertes Arbeitsethos half mir nicht zuletzt in der Erarbeitung dieser Doktorarbeit.

Bei meiner Familie und insbesondere meiner Frau möchte ich mich für das Vertrauen in meine Fähigkeiten, die Unterstützung in allen Phasen der Dissertation und das Verständnis für die familiären Entbehrungen, die die Erstellung dieser Arbeit mit sich brachte, bedanken.