

Aus dem

Department für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
und Pharmakogenomik der Universität Tübingen

Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie
und Toxikologie

**Identifizierung der Rolle des inhibitorischen $G\alpha_{i3}$ -Proteins
in Adipozyten mit Hilfe Adipozyten-spezifischer *Gnai3*-
defizienter Mäuse**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Kerner, Johannes Vincent

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. B. Nürnberg

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Jumpertz-von Schwartzberg

Tag der Disputation: 23.05.2024

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Übergewicht und Adipositas	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Ätiologie und Epidemiologie.....	2
1.1.3	Gesundheitliche Folgen	3
1.2	Einteilung und Funktion der Fettgewebedepots.....	4
1.2.1	Weißes Fettgewebe	4
1.2.1.1	Viszerales Fettdepot	5
1.2.1.2	Subkutanes Fettdepot.....	6
1.2.2	Braunes Fettgewebe	7
1.2.3	Beiges Fettgewebe	8
1.3	Grundlagen zellulärer Kommunikation.....	8
1.3.1	Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion durch GPCRs.....	9
1.3.2	G-Proteine als Signaltransduktoren	10
1.3.3	Klassifikation und Funktion von G-Proteinen	13
1.3.4	Die Subfamilie der $G\alpha_i$ -Proteine	14
1.3.5	Funktion der $G\alpha_i$ -Proteine in Adipozyten	15
1.4	Genome Editing zur Funktionsanalyse einzelner Gene.....	18
1.4.1	Konditionale Gendeletion mit Hilfe des Cre-/LoxP-Systems.....	19
1.4.2	Adipozyten-spezifische <i>Gnai3</i> -Deletion mit Hilfe des Cre-/LoxP- Systems	20
2	Zielsetzung	22
3	Materialien & Methoden.....	24
3.1	Materialien	24
3.2	Methoden	24

3.2.1	Transgene Mauslinie.....	24
3.2.2	Generierung von Adipozyten-spezifischen <i>Gnai3</i> -defizienten Versuchstieren	25
3.2.3	Tamoxifen-Injektion und Umstellung auf Spezialdiät.....	25
3.2.4	Entnahme von Gewebe	26
3.2.5	Genotypisierung und Rekombinationsanalysen.....	27
3.2.5.1	Gewebebiopsie	27
3.2.5.2	Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion.....	27
3.2.5.3	Nachweis des <i>Gnai3</i> -Genabschnittes.....	28
3.2.5.4	Nachweis des Transgens in <i>Adipoq</i> -Cre-Mäusen.....	29
3.2.6	Immunoblot	30
3.2.6.1	Proteinextraktion	30
3.2.6.2	Proteinbestimmung nach Bradford	30
3.2.6.3	Proteinfällung	31
3.2.6.4	Gelelektrophorese.....	32
3.2.6.5	Western Blot	32
3.2.6.6	Immundetektion	33
3.2.7	Histologie	34
3.2.7.1	Gewebefixierung und Anfertigung von Gewebeschnitten	34
3.2.7.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	35
3.2.7.3	Öl-Rot-Färbung.....	36
3.2.8	Glukosetoleranztest	36
3.2.9	Insulin-ELISA	37
3.2.10	Insulintoleranztest.....	38
3.2.11	Genexpression ausgewählter Adipozytokine	38
3.2.11.1	RNA-Extraktion aus dem Fettgewebe.....	39

3.2.11.2	Qualifizierung der extrahierten RNA	40
3.2.11.3	Transkription in cDNA	40
3.2.11.4	Quantifizierung der cDNA mittels qPCR	41
3.2.12	cAMP-Assay	42
3.2.13	Triglycerid-Assay	43
3.2.14	Glycerin-Assay	44
3.2.15	Sauerstoffverbrauch.....	44
3.2.16	Statistische Auswertung.....	44
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Verifizierung der Adipozyten-spezifischen <i>Gnai3</i> -Deletion auf Genomebene	46
4.2	Expression der inhibitorischen G-Proteinuntereinheiten $G\alpha_{i1-3}$ im Fettgewebe	47
4.2.1	Expressionsanalysen von $G\alpha_{i3}$	48
4.2.2	Expressionsanalysen von $G\alpha_{i1}$ und $G\alpha_{i2}$	50
4.3	Gewichtszunahme der <i>Gnai3</i> ^{ako} - und ctrl-Tiere	51
4.4	Fettmassen der <i>Gnai3</i> ^{ako} - und ctrl-Tiere	53
4.5	Adipozytenmorphologie im weißen Fettgewebe	55
4.5.1	Durchschnittliche Adipozytengrößen	55
4.5.2	Adipozytenfrequenz	57
4.6	Einfluss der <i>Gnai3</i> -Deletion auf den Fettstoffwechsel der Leber.....	59
4.7	Einfluss der <i>Gnai3</i> -Deletion auf die Genexpression von Adipozytokinen.....	61
4.7.1	Adipokine	61
4.7.2	Proinflammatorische Mediatoren	62
4.8	Einfluss der <i>Gnai3</i> -Deletion auf die Glukosehomöostase.....	63
4.8.1	Glukosetoleranz der <i>Gnai3</i> ^{ako} - und ctrl-Tiere	63

4.8.1.1	Glukosetoleranz der 8-Wochen-alten <i>Gnai3</i> ^{ako} - und ctrl-Tiere.....	64
4.8.1.2	Glukosetoleranz der 26-Wochen-alten <i>Gnai3</i> ^{ako} - und ctrl-Tiere.....	65
4.8.2	Insulinsensitivität.....	67
4.9	Intrazelluläre cAMP-Konzentrationen im Fettgewebe.....	68
4.10	Einfluss der <i>Gnai3</i> -Deletion auf den Lipidmetabolismus	70
4.10.1	Glyceringehalt im Fettgewebe	71
4.10.2	Triglyceridgehalt im Fettgewebe	73
4.11	Sauerstoffverbrauch.....	73
5	Diskussion	75
5.1	Einfluss der Adipozyten-spezifischen <i>Gnai3</i> -Deletion auf die Expression der G α_i -Proteine im Fettgewebe	76
5.2	Die Beteiligung von G α_{i3} an der Glukosehomöostase	77
5.3	Effekt der G α_{i3} -Deletion auf die Funktion von weißen Adipozyten ..	79
5.4	Die Rolle von G α_{i3} im braunen Fettgewebe	80
5.5	Limitationen der Studie	84
6	Schlussfolgerung	85
7	Zusammenfassung	88
8	Literaturverzeichnis	90
9	Anhang	106
9.1	Antikörper.....	106
9.1.1	Primärantikörper	106
9.1.2	Sekundärantikörper.....	106
9.2	Oligonukleotide	106
I.	Erklärung zum Eigenanteil	107
II.	Veröffentlichungen	109
III.	Danksagung	110

Abbildungen

Abbildung 1.1:	Aktivierungs-Inaktivierungs-Zyklus der G-Proteine.	11
Abbildung 1.2:	G-Protein-vermittelte Steuerung des Metabolismus in Adipozyten.	16
Abbildung 1.3:	Schematische Darstellung des Adipozyten-spezifischen <i>Gnai3</i> -Knockouts.....	20
Abbildung 2.1:	Schematische Darstellung der Zielsetzung des Projektes.	23
Abbildung 3.1:	Schematisierter zeitlicher Ablauf von Tamoxifen-Injektion und der Umstellung auf Kontroll- bzw. Hochfettdiät.	25
Abbildung 3.2:	Schematischer Ablauf des i.p. Glukosetoleranztestes.	37
Abbildung 3.3:	Schematischer Ablauf des i.p. Insulintoleranztestes.	38
Abbildung 4.1:	Schematische Darstellung des <i>Gnai3</i> -Gens und der Primerstrategie zur Detektion des Knockout-Allels.	46
Abbildung 4.2:	<i>Gnai3</i> -Expressionsanalyse an unterschiedlichen Gewebeproben einer <i>Gnai3^{ako}</i> - und ctrl-Maus.	47
Abbildung 4.3:	$G\alpha_{i3}$ -Expression im WAT und BAT von <i>Gnai3^{ako}</i> - und ctrl-Tieren.	49
Abbildung 4.4:	Expressionsanalysen von $G\alpha_{i1}$ und $G\alpha_{i2}$ im Fettgewebe von <i>Gnai3^{ako}</i> - und ctrl-Tieren.....	51
Abbildung 4.5:	Gewichtsentwicklung von <i>Gnai3^{ako}</i> - und ctrl-Tieren unter CD und HFD.....	52
Abbildung 4.6:	Fettdepotmassen von <i>Gnai3^{ako}</i> und ctrl-Tieren.	54
Abbildung 4.7:	Morphologie und durchschnittliche Zellgröße der weißen Adipozyten von <i>Gnai3^{ako}</i> - und ctrl-Tieren.....	56
Abbildung 4.8:	Adipozytenfrequenz im WAT der <i>Gnai3^{ako}</i> - und ctrl-Tiere...	58
Abbildung 4.9:	Lebermorphologie und -triglyceridgehalt von <i>Gnai3^{ako}_{HFD}</i> - und ctrl _{HFD} -Tieren.	60

Abbildung 4.10:	mRNA-Expression ausgewählter Adipokine im WAT von <i>Gnai3</i> ^{ako} _{HFD} - und ctrl _{HFD} -Tieren.....	62
Abbildung 4.11:	mRNA-Expression ausgewählter proinflammatorischer Mediatoren im WAT von <i>Gnai3</i> ^{ako} _{HFD} - und ctrl _{HFD} -Tieren. ...	63
Abbildung 4.12:	Glukosetoleranz der 8-Wochen-alten <i>Gnai3</i> ^{ako} - und ctrl-Tiere.	64
Abbildung 4.13:	Glukosetoleranz der 26-Wochen-alten <i>Gnai3</i> ^{ako} - und ctrl-Tiere.	67
Abbildung 4.14:	Insulinsensitivität von <i>Gnai3</i> ^{ako} _{HFD} - und ctrl _{HFD} -Tieren.	68
Abbildung 4.15:	Intrazelluläre cAMP-Konzentrationen im Fettgewebe von <i>Gnai3</i> ^{ako} - und ctrl-Tieren.	69
Abbildung 4.16:	<i>Ex vivo</i> Glyceringehalt im Fettgewebe der <i>Gnai3</i> ^{ako} - und ctrl-Tiere.	72
Abbildung 4.17:	Triglyceridgehalt im Fettgewebe von <i>Gnai3</i> ^{ako} _{HFD} - und ctrl _{HFD} -Tieren.	73
Abbildung 4.18:	Gesamtsauerstoffverbrauch der <i>Gnai3</i> ^{ako} - und ctrl-Tiere....	74
Abbildung 6.1:	Schematische Darstellung der G α_{i3} -bedingten Veränderungen im WAT.....	85
Abbildung 6.2:	Schematische Darstellung der G α_{i3} -bedingten Veränderungen im BAT.....	86
Abbildung 6.3:	Hypothetisches Modell zur Beteiligung von G α_{i3} an der Funktion brauner Adipozyten.	87

Tabellen

Tabelle 1:	Gewichtsklassifikation beim Menschen anhand des Body-Mass-Indexes	1
Tabelle 2:	Zusammensetzung der unterschiedlichen Diäten.....	26

Abkürzungen

α	alpha	ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assays
AC	Adenylylcyclase		
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase	EPAC	Exchange protein directly activated by cAMP
AGS	Activators of G-protein mediated signaling	ER	Estrogenrezeptor
APS	Ammoniumperoxodisulfat	ES	Embryonale Stammzelle
AS	Aminosäuren	FFA	Freie Fettsäure
ASC	Adipose-derived stem cell	G α	α -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine
ATGL	Adipozyten-Triglycerid-Lipase	G $\beta\gamma$	Komplex aus G β - und G γ -Untereinheit
ATP	Adenosintriphosphat	Gap	GTPase-activating protein
BAT	Braunes Fettgewebe	GAP	GTPase-aktivierendes Protein
BMI	Body-Mass-Index	GBA	G α -binding and -activating
BSA	Bovines Serumalbumin	GDI	Guanine-nucleotide dissociation inhibitor
Btk	Bruton-Tyrosinkinase	GDP	Guanosindiphosphat
c	Konzentration	GEF	Guanine-nucleotide exchange factor
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	GLUT4	Glukosetransporter Typ 4
CBBG	Coomassie-Brillant-Blau G	GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
CD	Kontrolldiät	GPR	Gamma-glutamyl phosphate reductase
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	G-Proteine	heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein
Cre	Cyclization recombination	GTP	Guanosintriphosphat
CREB	cAMP response element-binding protein	GTT	Glukosetoleranztest
CRP	C-reaktives Protein	gWAT	gonadales weißes Fettgewebe
C-Terminus	Carboxyl-Terminus	HCl	Chlorwasserstoff
DAG	Diacylglycerol	HFD	Hochfettdiät
ddH ₂ O	double-distilled water	HRP	Horseradish peroxidase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	HSL	Hormonsensitive Lipase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	HSP90	Hitzeschockprotein 90
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	i.p.	intraperitoneal
dsDNA	doppelsträngige DNA		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
EIA	Enzyme immunoassay		

IBMX	1mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin	PVDF	Polyvinylidenfluorid
IFN	Interferon	qPCR	quantitative Polymerasenkettenreaktion
IL	Interleukin	Rap	Repressor/Activator site binding Protein
IP3	Inositoltrisphosphat	RGS	Regulators of G protein signaling
ITT	Insulintoleranztest	Ric-8	Resistance to inhibitors of cholinesterase-8
iWAT	inguinales weißes Fettgewebe	RNA	Ribonukleinsäure
JNK	Januskinase	rpm	Revolutions per minute
kDa	Kilodalton	RT	Raumtemperatur
KG	Körpergewicht	SD	Standarddiät
loxP	locus of x-over P1	SDS	Natriumlaurylsulfat
MCP-1	Monocyte-Attractant-Protein 1	SNAP- α	N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein Alpha
NaCl	Natriumchlorid	SPF	spezifiziert pathogenfreien Bereich
NAFLD	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung	ssDNA	single strand-DNA
NASH	Nichtalkoholischen Steatohepatitis	sWAT	Subkutanes Fettdepot
NP-40	Nonidet P40	TBS	Tris-buffered saline
N-Terminus	Amino-Terminus	TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
OHT	4-Hydroxytamoxifen	TEMED	Tetramethylethylendiamin
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor	TG	Triglycerid
PBS	Phosphate Buffered Saline	THQ	Taille-Hüft-Quotient
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor γ -co-activator 1 α	TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase	TNF- α	Tumornekrosefaktor α
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat	TOF	Turnover Frequency
PKA	Proteinkinase A	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
PKC	Proteinkinase C	UCP1	Uncoupling Protein 1
PLC	Phospholipase C	VAT	Viszerales Fettdepot
PLC β	Phospholipase C β	WAT	Weißes Fettgewebe
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	λ	Wellenlänge
PPAR- γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor gamma	μ m	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Übergewicht und Adipositas

1.1.1 Definition

Übergewicht (Präadipositas) und Adipositas zählen zu den größten gesundheitlichen Herausforderungen der heutigen Zeit. Beide Begriffe bezeichnen eine exzessive Akkumulation von Fett, die im Laufe der Zeit zu einer gesundheitlichen Beeinträchtigung der betroffenen Personen führt (Schienkiewitz *et al.*, 2017). Die bekannteste Messgröße zur Objektivierung von Präadipositas und Adipositas ist der Body-Mass-Index (BMI). Er ist definiert als der Quotient aus dem Körpergewicht in Kilogramm (kg) und der Körpergröße in Metern (m) zum Quadrat (Ofei, 2005). Zur Einordnung des BMI bei Erwachsenen finden folgende Kategorien Anwendung:

Tabelle 1: Gewichtsklassifikation beim Menschen anhand des Body-Mass-Indexes

BMI [kg/m ²]	Ernährungszustand
< 18,5	Untergewicht
18,5 – 24,9	Normalgewicht
25 – 29,9	Übergewicht (Präadipositas)
30 – 34,9	Adipositas Grad I
35 – 39,9	Adipositas Grad II
≥ 40	Adipositas Grad III

Die Einteilung in unterschiedliche Schweregrade ist klinisch von Bedeutung, da das Ausmaß der Fettleibigkeit eng mit der Morbidität und Mortalität der Betroffenen korreliert und damit die Grundlage für eine individuelle Therapieauswahl bildet (Hauner, 2018; Weir & Jan, 2021). Da der BMI eine Vielzahl von wichtigen prädiktiven Faktoren wie beispielsweise Alter, Geschlecht, Herkunft und vor allem die Verteilung der Fettdepots nicht mitberücksichtigt, werden insbesondere bei forschungsbasierten Fragestellungen häufig der Hüftumfang oder der Taille-Hüft-Quotient (THQ) unter der Berücksichtigung ethnischer Normwerte hinzugezogen (Purnell, 2000; Hruby & Hu, 2015). Ein Taillenumfang von ≥ 80 cm bei Frauen bzw. ≥ 94 cm bei Männern spricht bei Verwendung europäischer Normwerte für eine intraabdominelle

Fettakkumulation, die das Risiko Folgeerkrankungen zu erleiden, deutlich erhöht (Organization, 2011).

1.1.2 Ätiologie und Epidemiologie

Die Zahl der Präadipösen und Adipösen hat sich in den letzten 30 Jahren weltweit verdoppelt, in einigen Ländern sogar verdreifacht. So waren im Jahr 2016 knapp 60% der adulten europäischen Bevölkerung präadipös und ungefähr 25% adipös. Auch die Anzahl der präadipösen Kinder und Jugendlichen hat sich in dieser Zeit deutlich erhöht. Die Prävalenz ist von nur 4% im Jahr 1975 auf mehr als 30% im Jahr 2016 gestiegen (Organization, 2022). Prognosen für das Jahr 2030 zeigen, dass sich der Anteil präadipöser und adipöser Erwachsener weiter erhöhen könnte (Kelly *et al.*, 2008; Finkelstein *et al.*, 2012). Trotz umfangreicher Forschung in den letzten Jahrzehnten sind die dieser Entwicklung zugrundeliegenden Ursachen nur teilweise verstanden. Als Hauptursache wird ein zunehmendes Ungleichgewicht von Kalorienzufuhr und Kalorienverbrauch angesehen. Die Industrialisierung und das damit verbundene Wirtschaftswachstum führten zu einer Kombination aus einem sinkenden Kalorienverbrauch, bedingt durch den Umstand, dass berufliche Tätigkeiten überwiegend im Sitzen ausgeführt werden konnten, und einer steigenden Kalorienzufuhr aufgrund der ubiquitären Verbreitung hochkalorischer Lebensmittel (Hruby & Hu, 2015). Ist die Zufuhr höher als der Verbrauch, entsteht ein Energieüberschuss, der überwiegend im Fettgewebe gespeichert wird (Hill *et al.*, 2012). Initial kommt es dort zu einer Hypertrophie der bereits vorhandenen Adipozyten. Bei der Überschreitung einer kritischen Zellgröße kann es zu einer Rekrutierung von Präadipozyten und somit zu einer Hyperplasie des Fettgewebes kommen (Hiort *et al.*, 2010). Die starken geographischen und geschlechtsabhängigen Unterschiede in der Prävalenz von Adipositas lassen vermuten, dass zusätzlich individuelle Faktoren wie Genetik, Ethnie und das sozioökonomische bzw. soziokulturelle Milieu eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Adipositas spielen (Hruby & Hu, 2015).

1.1.3 Gesundheitliche Folgen

Bereits seit über 2000 Jahren ist bekannt, dass Präadipositas und Adipositas die Morbidität und Mortalität negativ beeinflussen (Bray, 1990; Haslam, 2016). Ursächlich hierfür sind eine Vielzahl von direkten und indirekten Störungen der körperlichen und seelischen Homöostase. Zu den direkten, auf einer erhöhten Fettmasse beruhenden Folgen zählen psychosoziale Dysfunktionen, das Schlafapnoe-Syndrom und die Arthrose. Andere, indirekte Komorbiditäten treten als metabolische Konsequenz hypertrophierter Adipozyten auf. Hierzu zählen unter anderem Gallenblasenerkrankungen, Brust-, Darm-, Nierenkarzinome und insbesondere das metabolische Syndrom, welches als Risikofaktor für zahlreiche kardiovaskuläre Erkrankungen gilt (Bray, 2004; Abdelaal *et al.*, 2017). Die Definition des metabolischen Syndroms ist uneinheitlich und hat sich in den letzten Jahren wiederholt geändert. Im Allgemeinen beschreibt es das Zusammentreffen von stammbetonter Adipositas, Dyslipoproteinämie, essenzieller Hypertonie und einer Glukosetoleranzstörung (Alberti *et al.*, 2005). Die Pathophysiologie hinter der Entstehung des metabolischen Syndroms ist komplex und noch nicht abschließend geklärt. Als gesichert gilt, dass das hypertrophierte und/oder hyperplastische Fettgewebe als endokrines Organ vermehrt freie Fettsäuren und zahlreiche pathophysiologisch wirksame Peptide (siehe 1.2.1.1) sezerniert (Rochlani *et al.*, 2017). Im Rahmen des metabolischen Syndroms kommt es häufig zu einer Beteiligung der Leber in Form einer nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD). Die NAFLD umfasst ein breites Spektrum von Lebererkrankungen, die mit einer vermehrten Fettspeicherung assoziiert sind (Lipidakkumulation in mehr als 5 % der Hepatozyten). Es werden die alleinige Steatosis von der nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) und der Fettleberzirrhose unterschieden. Die Pathogenese der NAFLD ist bisher unzureichend verstanden. Als gesichert gilt, dass es primär zu einer vermehrten Speicherung von Triglyceriden und freien Fettsäuren in den Hepatozyten sowie einer gesteigerten Lipogenese in der Leber kommt (Rau *et al.*, 2017).

1.2 Einteilung und Funktion der Fettgewebedepots

Die steigende Prävalenz von Adipositas und ihren assoziierten Komorbiditäten begründete in den letzten Jahrzehnten ein zunehmendes Interesse daran, den Aufbau und die Funktion der Fettgewebe zu erforschen (Kurlander *et al.*, 1956; Luong *et al.*, 2019). Lange Zeit wurde bei Säugetieren nur zwischen weißem (WAT) und braunem (BAT) Fettgewebe differenziert, die sich in anatomischer Lokalisation, Morphologie und Funktion unterscheiden (Park *et al.*, 2014). Neuere Studien konnten ferner die Existenz einer dritten Gewebeart, dem „brown-like“ oder „beigen“ Fettgewebe beweisen, welches eine Intermediärstellung zwischen WAT und BAT einnimmt (Young *et al.*, 1984; Cousin *et al.*, 1992).

1.2.1 Weißes Fettgewebe

Das WAT ist ein sehr dynamisches und anpassungsfähiges Organ. Seine Hauptfunktion besteht darin, überschüssige, freie Fettsäuren zu speichern und diese bei Bedarf für die Energiegewinnung zur Verfügung zu stellen. In Phasen der Überernährung führt ein Energieüberschuss zu einer Hypertrophie und Hyperplasie der Adipozyten, wodurch der Anteil am Gesamtkörpergewicht zwischen 3% bei Spitzensportlern und 70% bei fettleibigen Menschen variieren kann (Parlee *et al.*, 2014). Daneben fungiert es als zentrale regulatorische Einheit des Energiestoffwechsels. Zu den metabolischen Funktionen zählen unter anderem die Lipogenese, Fettsäureoxidation und die Lipolyse (Torres *et al.*, 2016). Die Regulation dieser Stoffwechselfunktionen erfolgt unter anderem durch die Sekretion von fettgewebsspezifischen Peptiden, Proteinen und Zytokinen, die zur Gruppe der Adipokine zusammengefasst werden (Flier *et al.*, 1987; Wronska & Kmiec, 2012). Adipokine weisen eine hohe Diversität in ihrer chemischen Struktur und vielfältige physiologische Funktionen auf. Zu diesen Funktionen zählen unter anderem die Regulation inflammatorischer Prozesse durch klassische Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α), die Interleukine (IL) 1, 4, 6, 8, 10 und 13 sowie das Monocyte-Attractant-Protein 1 (MCP-1), die Regulation des Energiestoffwechsels (Leptin), des Kohlenhydratstoffwechsels (Adiponectin, Resistin, Visfatin) sowie die Blutdruckregulation (Angiotensinogen) (Esteve Ràfols, 2014). Darüber hinaus dient das Fettgewebe der thermischen Isolation

des Körpers und dem Schutz vor mechanischer Schädigung (Wronska & Kmiec, 2012). Fettgewebe setzt sich aus einer großen Anzahl unterschiedlichster Zellen zusammen. Den prädominierenden Zelltyp bilden die weißen Adipozyten, die sich als rundliche Zelle präsentieren und einen einzelnen, unilokulären Lipidtropfen enthalten, welcher der Speicherung freier Fettsäuren dient und über 90% des Zellvolumens einnimmt. Der Zellkern, die Mitochondrien und alle weiteren Zellbestandteile verteilen sich im verbleibenden Zellvolumen (Desruisseaux *et al.*, 2007; Stecco *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2016). Der Durchmesser variiert je nach Lipidgehalt zwischen 30 µm und 130 µm (Wronska & Kmiec, 2012). Neben den weißen Adipozyten sind Fettstammzellen (adipose-derived stem cells, ASCs), Fibroblasten/Fibrozyten, Nervengewebe, Stroma-Gefäßzellen und Immunzellen nachweisbar (Kershaw & Flier, 2004; Berry *et al.*, 2013). Das WAT lässt sich in Form von lokalisierten Depots über den gesamten Körper verteilt finden. Aufgrund anatomischer, zellulärer, molekularer, physiologischer und prognostischer Eigenheiten unterscheidet man die viszeralen Fettdepots, die sich in der Bauchhöhle um die inneren Organe verteilen, von den subkutanen Fettdepots, die sich an mehreren Stellen unter der Haut befinden (Zwick *et al.*, 2018). Unter pathologischen Bedingungen kann es zusätzlich zu einer ektopen, intraparenchymalen Akkumulation von Fett in Organen wie der Leber, den Muskeln, dem Pankreas oder den Blutgefäßen kommen (Britton & Fox, 2011).

1.2.1.1 Viszerales Fettdepot

Das viszerale Depot (VAT) macht abhängig vom Alter und Geschlecht einen Anteil von 5-20% an der Gesamtfettmasse aus und wird zum Großteil durch das omentale und mesenteriale Fettgewebe gebildet. Kleinere Depots lassen sich im Mediastinum und um spezifische Organe wie Herz (epikardial), Magen (epigastral), Nieren (perirenal), Gonaden (perigonadal, gWAT) und Blutgefäße (perivaskulär) finden (Ibrahim, 2010; Shuster *et al.*, 2012). Eine viszerale Fettakkumulation wird mit zahlreichen pathologischen Zuständen wie einem gestörten Glukose- und Fettstoffwechsel, einer erhöhten Prädisposition für ausgewählte Karzinome und einem erhöhten kardiovaskulären Risiko in Verbindung gebracht (Shuster *et al.*, 2012). Darüber hinaus weisen

hospitalisierte Betroffene ein höheres Risiko für postoperative Komplikationen und eine höhere Mortalitätsrate auf (Tsujinaka *et al.*, 2008). Als Ursache wird eine gesteigerte Sekretion von pathophysiologisch-wirksamen Peptiden angesehen. Hierzu zählen insbesondere freie Fettsäuren (FFAs) und die Adipokine IL-1, IL-6, TNF- α und Resistin. Andere Adipokine, denen eine protektive Rolle zugeschrieben wird, korrelieren negativ mit der Masse an VAT (Reneau *et al.*, 2018). Die vermehrte Sekretion von FFAs durch das VAT beruht auf mehreren Ursachen: Viszerale Adipozyten weisen bereits basal eine höhere lipolytische Aktivität als andere Adipozytenarten auf. Verstärkt wird dies durch eine spezielle Rezeptorausstattung, die sie sensitiver gegenüber der Katecholamin-induzierten Lipolyse macht (Arner *et al.*, 1990; Hellmér *et al.*, 1992). Außerdem weisen die Adipozyten des viszeralen Fettgewebes eine verringerte postprandiale Absorptionsfähigkeit für FFAs auf (Mårin *et al.*, 1992; Misra & Vikram, 2003). Durch ihre anatomische Lokalisation drainiert das venöse Blut über das Portalvenensystem direkt in die Leber. Die sezernierten FFAs und Adipokine können so hepatische Immunmechanismen modulieren, die unter anderem zu einer gesteigerten Sekretion des Akut-Phase-Proteins CRP führen (Heinrich *et al.*, 1990; Mårin *et al.*, 1992).

1.2.1.2 Subkutanes Fettdepot

Mit einem Anteil von 80% wird der Großteil des Körperfettes durch das subkutane Depot (sWAT) gebildet (Arner, 1997). Es lässt sich überwiegend in der femoglutalen Region (inguinales weißes Fettgewebe, iWAT), dem Rücken und der vorderen Bauchwand finden. Im Vergleich zum VAT korreliert die iWAT-Masse weniger stark mit der Entwicklung metabolischer Erkrankungen (Porter *et al.*, 2009). Einige Autoren schreiben dem sWAT sogar eine protektive Wirkung bei der Entwicklung von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 zu (Snijder *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 2008; Mittal, 2019). Verantwortlich für die konträren Effekte sind insbesondere Unterschiede in der Sekretion von FFAs und Adipokinen. Die verminderte FFA-Sekretion beruht auf einer höheren Speicherkapazität der sWAT-Adipozyten für FFAs und Triglyceride (TG) in der postprandialen Phase und einer geringeren Sensibilität für die Katecholamin-induzierte Lipolyse (Arner *et al.*, 1990; Hellmér *et al.*, 1992). Zu den Adipokinen,

die überwiegend vom sWAT sezerniert werden, zählen Leptin, das an der Vermittlung des Sättigungsgefühls beteiligt ist und Adiponektin, dem eine gefäßprotektive, anti-atherosklerotische und anti-diabetogene Wirkung zugeschrieben wird (Wajchenberg, 2000; Reneau *et al.*, 2018). Proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , CRP und IL-6 hingegen werden nur in geringen Mengen sezerniert. Durch die geringere Zytokinsekretion und die Drainage des venösen Blutes über den Systemkreislauf fällt der immunstimulierende Effekt auf die Leber kleiner aus (Ibrahim, 2010). Darüber hinaus ist insbesondere das subkutane weiße Fettgewebe dazu imstande, in gewisser Weise eine morphologische und funktionelle trans-Differenzierung zu durchlaufen (WAT Browning) und dem braunen Fettgewebe ähnliche Funktionen zu übernehmen (Wu *et al.*, 2012).

1.2.2 Braunes Fettgewebe

Das braune Fettgewebe (BAT) dient primär dazu, aus gespeicherten Energiereserven Wärme abzuleiten und damit einer Unterkühlung des Körpers entgegenzuwirken. Dieser Prozess wird als zitterfreie Thermogenese bezeichnet und spielt insbesondere für Neugeborene eine wichtige Rolle, da diese aufgrund des schlechten Verhältnisses von Körperoberfläche zu Volumen dazu tendieren, ihre Körperwärme schnell an die Umgebung abzugeben. Außerdem fehlt ihnen, anders als Erwachsenen, eine suffiziente Skelettmuskulatur und damit die Möglichkeit der muskulären Thermogenese, die entscheidend an der Aufrechterhaltung der Körperkerntemperatur beteiligt ist (Lidell, 2019). Aus diesem Grund lassen sich größere Depots braunen Fettgewebes besonders in Nagetieren und kleinen Säugetieren nachweisen. Typische Lokalisationen sind der obere Rückenbereich (interscapular), die perirenale Region und die Herzregion (periaortal). Morphologisch zeichnen sich braune Adipozyten durch zahlreiche kleine, dicht gepackte Vakuolen aus, die reich an Mitochondrien sind. Die vielen Mitochondrien sind für die typische Farbe der Zellen verantwortlich. Innerhalb der Mitochondrienmembran lässt sich das Transmembranprotein Thermogenin (Uncoupling Protein 1, UCP1) nachweisen. Das BAT ist stark vaskularisiert und wird durch ein dichtes Netzwerk sympathischer Nerven innerviert. Die Aktivierung der Thermogenese im BAT kann durch

unterschiedliche Signale initialisiert werden. Zu den wichtigsten Initiatoren zählt die Kälteeinwirkung, durch die vermehrt Norepinephrin freigesetzt wird, welches durch Bindung an β_3 -adrenerge Rezeptoren auf den Zellmembranen der braunen Adipozyten G-Protein-vermittelt zu einer Aktivierung des cAMP-Proteinkinase A-Signalweges (siehe 1.3.4.) führt. Die Proteinkinase A aktiviert Enzyme, die an der Hydrolyse von Triglyceriden, Diglyceriden und Monoglyceriden zu FFAs beteiligt sind. Die FFAs werden von den Mitochondrien importiert, binden dort an UCP1 und aktivieren dieses. Die FFAs werden oxidiert wodurch es zu einem Protonenfluss entlang der inneren Mitochondrienmembran kommt und Hitze erzeugt wird (Cannon & Nedergaard, 2004; Mulya & Kirwan, 2016).

1.2.3 Beiges Fettgewebe

Bereits im Jahr 1984 wurden innerhalb des weißen Fettgewebes Zellen beschrieben, die vergleichbare morphologische, strukturelle und funktionelle Eigenschaften wie klassische braune Adipozyten aufweisen. Hierzu zählen zentrale Zellkerne, multilokuläre Lipidvakuolen, viele Mitochondrien, die Expression hoher Level von UCP1 sowie das Ansprechen auf Kälteexposition. Im Gegensatz zu braunen Adipozyten sind sie nicht als eigenständige Depots über den Körper verteilt, sondern vereinzelt innerhalb des weißen Fettgewebes und hier insbesondere in der Leistengegend auffindbar (Young *et al.*, 1984; Wu *et al.*, 2012; Mulya & Kirwan, 2016). Derzeit existieren zwei Theorien, die das Auftreten neu gebildeter „beiger“ Adipozyten erklären sollen. Das Vorläufermodell besagt, dass sich die beigen Adipozyten bei Kälteexposition unter dem Einfluss von Irisin aus Präadipozyten entwickeln, während das Interkonversionsmodell von einer trans-Differenzierung bereits ausgereifter weißer Adipozyten ausgeht. Unabhängig davon, welche der beiden Theorien korrekt ist, unterstreichen beide die hohe Plastizität von Adipozyten und das therapeutische Potenzial im Hinblick auf Prävention der Entwicklung von Adipositas und den assoziierten Komorbiditäten (Herz & Kiefer, 2019).

1.3 Grundlagen zellulärer Kommunikation

Im Laufe der Evolution hat sich ein Großteil der Lebewesen zu mehrzelligen Organismen entwickelt, die sich aus unterschiedlich spezialisierten Einzelzellen

zusammensetzen. Um eine koordinierte Zusammenarbeit dieser Einzelzellen zu erreichen, hat sich eine Vielzahl von Kommunikationswegen entwickelt. Ausgangspunkt der interzellulären Kommunikation ist die Freisetzung eines Signalstoffes durch eine Senderzelle. Diese Signalmoleküle können in ihrer chemischen Struktur sehr unterschiedlich sein (Heinrich *et al.*, 2014). So zählen Proteine, kleine Peptide, Aminosäuren, Nukleotide, Steroide, Retinoide, Fettsäurederivate und sogar gelöste Gase wie Stickoxid und Kohlenmonoxid zu den bekanntesten Vertretern (Alberts, 2002). Der ausgesandte Mediator kann nur von Zellen erkannt werden, die einen passenden Rezeptor besitzen. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu einer intrazellulären Signalkaskade (Signaltransduktion), die in ihrem Endpunkt zu einer biologischen Antwort der Zielzelle führt. Abhängig von dem Weg, den der Mediator nutzt, um seine Zielzelle zu erreichen, wird zwischen auto-, para-, juxta- und endokriner Signalübermittlung unterschieden (Buselmaier, 2009).

1.3.1 Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion durch GPCRs

Die größte Gruppe der Membranrezeptoren in Eukaryoten stellen die G-Proteingekoppelten Rezeptoren (G-protein-coupled receptors, GPCRs) dar. Neben ihrer physiologischen Funktion als Ligandenrezeptoren für Hormone und Neurotransmitter haben sie sich in den letzten Jahren zum häufigsten Angriffspunkt für Medikamente entwickelt (Manglik & Kruse, 2017). Geschätzt entfalten zwischen 30 und 50% der Medikamente ihre therapeutische Wirkung über die Interaktion mit GPCRs. Diese GPCR-Medikamente zielen dabei auf ca. 80 Rezeptoren ab, was nur zehn Prozent der im menschlichen Genom codierten GPCRs entspricht (Fang *et al.*, 2015). Die Fülle an GPCRs und ihre vielfältigen Rollen im Stoffwechsel machen eine genaue Identifizierung und Klassifizierung unerlässlich. Ein häufig verwendetes Klassifikationssystem auf Grundlage der Aminosäuresequenz und Funktionshomologie stellt das GRAFS-Klassifikationssystem dar. Die Abkürzung steht dabei für die fünf Hauptfamilien Glutamat, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/taste2 und Sekretin (Fredriksson *et al.*, 2003). Die größte Subfamilie bildet mit einem Anteil von ca. 80% die Rhodopsin-Familie (Rosenbaum *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2017). Strukturell setzen sich alle GPCRs aus sieben trans-membranösen α -Helices, die durch drei alternierende

intra- und extrazelluläre Schleifen voneinander getrennt werden, einem extrazellulären N- und einem intrazellulären C-Terminus zusammen (Oldham & Hamm, 2008). Die Struktur der transmembranösen α -Helices ist mit einer Länge von 20-27 Aminosäuren (AS) dabei weitestgehend konstant. Deutlich variabler sind der N-Terminus mit einer Länge von 7–595 AS, der C-Terminus (12–359 AS) und die Schleifen (5–230 AS), durch welche die einzelnen Rezeptoren ihre spezifischen Eigenschaften erhalten (Ji *et al.*, 1998). Da GPCRs selbst keine katalytische Aktivität besitzen, sind sie auf Signaltransduktoren angewiesen, die in der Lage sind, Signale an intrazelluläre Effektoren zu übertragen (Weis & Kobilka, 2018).

1.3.2 G-Proteine als Signaltransduktoren

Die Rolle übernehmen unter anderem die heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteine (G-Proteine). Sie sind aus drei mit α , β und γ bezeichneten Untereinheiten aufgebaut. Im Humangenom konnten bisher 16 verschiedene Gene für die α -, fünf für die β - und zwölf für die γ -Untereinheit nachgewiesen werden. Durch variable Assemblierung der einzelnen Untereinheiten entstehen G-Proteine mit unterschiedlichen Funktionen (Rassow *et al.*, 2016). Die α -Untereinheit ($G\alpha$) ist für die Bindung des Guaninnukleotids verantwortlich. Sie setzt sich aus zwei Domänen zusammen: einer Ras-like Domäne, die enzymatisch an der Hydrolyse von Guanosin triphosphat (GTP) beteiligt ist, und einer helikalen Domäne, die unter anderem durch ihre strukturelle Diversität für die variable Rezeptor- und Effektoraffinität der einzelnen $G\alpha$ -Subfamilien verantwortlich ist. Zwischen diesen beiden Domänen ist die Bindungstasche für das Guaninnukleotid lokalisiert (Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Duc *et al.*, 2015). Die β - und γ -Untereinheit bilden strukturell und funktionell einen nicht-dissoziierbaren Komplex ($G\beta\gamma$) und sind über einen Lipidanker der γ -Untereinheit in der Zellmembran verankert. Wie auch $G\alpha$ kann die $\beta\gamma$ -Untereinheit nachgeschaltete Effektoren modulieren. Zu den Interaktionspartnern zählen unter anderem die Adenylylcyclasen, Phospholipase C sowie Kalium- und Calciumkanäle. G-Proteine fungieren als binärer Schalter, dessen Aktivität durch das gebundene Guaninnukleotid reguliert wird. Die Bindung eines Agonisten an einen GPCR führt zu einer Konformationsänderung, wodurch eine hochaffine Bindungsstelle

für das G-Protein geschaffen wird. Das G-Protein kann nachfolgend einen Aktivierungs-Inaktivierungs-Zyklus durchlaufen (Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Rassow *et al.*, 2016). Im inaktiven Zustand bilden $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ ein Heterotrimer, das über mehrere Lipidanker mit der inneren Zellmembran in Verbindung steht. Neben dieser Lokalisation konnten G-Proteine auch auf verschiedenen intrazellulären Strukturen wie Endomembranen, dem Zytoskelett, den Mitochondrien und dem Zellkern nachgewiesen werden (Nürnberg & Ahnert-Hilger, 1996; Nair *et al.*, 2017).

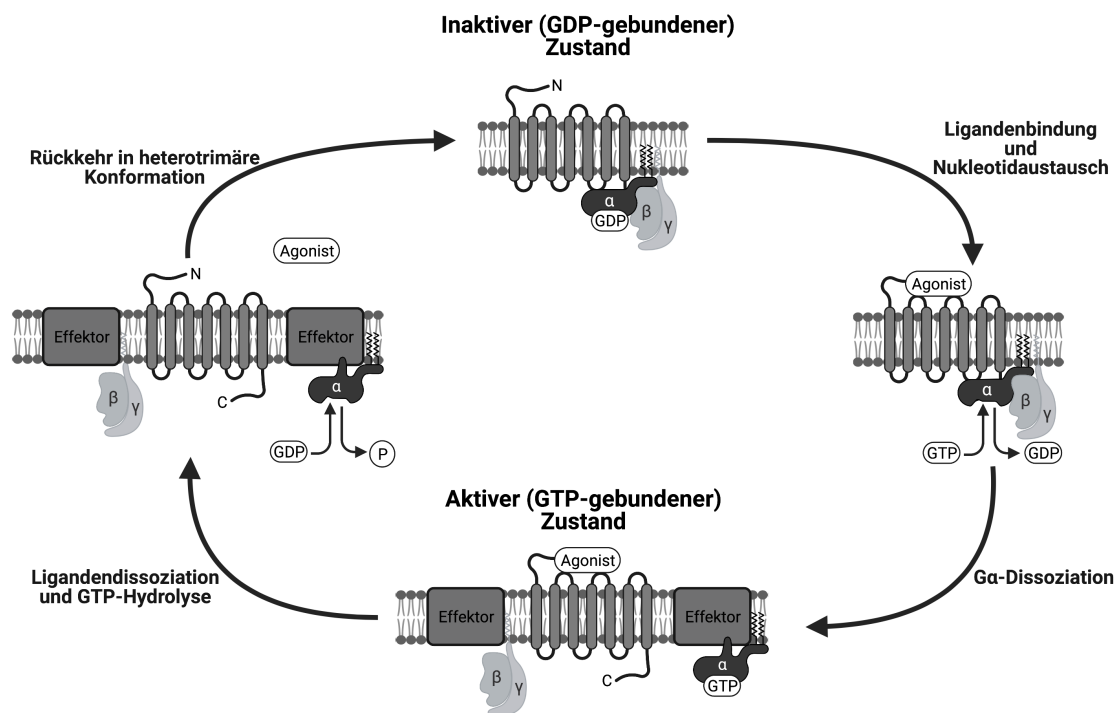


Abbildung 1.1: Aktivierungs-Inaktivierungs-Zyklus der G-Proteine. Die Aktivierung eines GPCRs durch einen Agonisten katalysiert den Austausch von GDP durch GTP in der α -Untereinheit des G-Proteins. Durch die Bindung von GTP an die α -Untereinheit kommt es zu einer Aktivierung und Dissoziation des G-Proteins. Sowohl die α -Untereinheit als auch das β/γ -Dimer können verschiedene Effektorproteine modulieren. Die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit katalysiert die Hydrolyse von GTP zu GDP und beendet damit die Effektormodulation. Abschließend kommt es zu einer Reassoziierung der beiden Untereinheiten. α - α -Untereinheit des G-Proteins; β/γ - β/γ -Untereinheit des G-Proteins; GDP - Guanosindiphosphat; GTP - Guanosintriphosphat; P - Phosphat; C - C-terminale Domäne; N - N-terminale Domäne. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Aktivierung stellt die Freisetzung von Guanosindiphosphat (GDP) aus der α -Untereinheit dar. Da G-Proteine im inaktiven Zustand eine sehr hohe Affinität gegenüber GDP besitzen und das $\beta\gamma$ -Dimer als Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor (guanine-nucleotide dissociation inhibitor, GDI) fungiert, läuft die spontane Freisetzung nur sehr langsam ab (McCudden *et al.*, 2005; Syrovatkina *et al.*, 2016). Um diese

Barriere zu überwinden, reduziert der aktivierte Rezeptor als Guaninnukleotid-Austauscher (guanine-nucleotide exchange factor, GEF) die Affinität des G-Proteins gegenüber GDP und ermöglicht so eine Dissoziation des GDPs aus der Nukleotid-Bindungstasche der α -Untereinheit. Die freie Bindungstasche kann anschließend durch das intrazellulär wesentlich höher konzentrierte GTP besetzt werden (Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Oldham & Hamm, 2008). Das gebundene GTP initialisiert eine Konformationsänderung in den zwei variablen Regionen Switch I und II der α -Untereinheit, wodurch die Affinität zur $\beta\gamma$ -Untereinheit reduziert wird und das G-Protein in seine zwei funktionellen Einheiten dissoziiert (Vetter & Wittinghofer, 2001; Oldham & Hamm, 2008). Sowohl die $G\alpha$ -Untereinheit als auch das $G\beta\gamma$ -Dimer können unabhängig voneinander mit unterschiedlichen Effektoren kommunizieren und diese modulieren. Beendet wird die Modulation durch die hydrolytische Spaltung von GTP zu GDP und Phosphat, katalysiert von der Ras-like Domäne der α -Untereinheit. Im letzten Schritt kommt es zu einer Reassoziations der beiden funktionellen Einheiten und der Aktivierungs-Inaktivierungs-Zyklus kann von vorne beginnen (Rassow *et al.*, 2016). Die Dauer der G-Protein-vermittelten Effektoraktivierung wird einerseits durch die sehr variable intrinsische GTPase-Aktivität verschiedener $G\alpha$ -Untereinheiten bestimmt. So ist die Wechselzahl (Turnover Frequency, TOF) für die GTP-Hydrolyse von $G\alpha_z$, einem Vertreter der $G\alpha_i$ -Proteine, etwa 200-fach niedriger als von $G\alpha_s$ und $G\alpha_o$ (Casey *et al.*, 1990). Andererseits wurden bereits eine Vielzahl von separaten Molekülen/Proteinen/Enzymen entdeckt, die die Dauer der Effektoraktivierung beeinflussen. Die als GTPase-aktivierenden Proteine (GAPs) bezeichneten Moleküle dienen dazu, die Deaktivierung von G-Protein-gesteuerten Prozessen zu beschleunigen. Hierzu zählen unter anderem $G\alpha$ -Effektoren wie die $PLC\beta$, die γ -Untereinheit der Phosphodiesterasen (negative Rückkopplung) und RGS-Proteine (regulators of G protein signaling). Zusätzlich zu den GAPs kommen auch sogenannte AGS-Proteine (activators of G-protein mediated signaling), die rezeptorunabhängig G-Proteine aktivieren können. Zu den wichtigsten Vertretern zählen Ric-8, GPR-domain-beinhaltende Proteine und GBA-motif-beinhaltende Proteine (Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Blumer *et al.*, 2005; Syrovatkina *et al.*, 2016).

1.3.3 Klassifikation und Funktion von G-Proteinen

G-Proteine werden anhand ihrer Aminosäuresequenzenhomologie der $G\alpha$ -Untereinheit in vier Subfamilien eingeteilt: $G\alpha_s$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$ und $G\alpha_{i/o}$. Die Bezeichnung $G\alpha_s$ leitet sich aus ihrer Funktion ab, rezeptorvermittelt die Adenylylcyclase zu stimulieren (s steht für Stimulation) und damit zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration zu führen. Die $G\alpha_s$ -Subfamilie umfasst mit $G\alpha_s$ und $G\alpha_{olf}$ (olfaction) lediglich zwei Mitglieder (Wettschureck & Offermanns, 2005; Syrovatkina *et al.*, 2016). $G\alpha_s$ wird ubiquitär exprimiert und ist damit sowohl an vielen physiologischen als auch pathophysiologischen Prozessen beteiligt (Gaudin *et al.*, 1995; Sakamoto *et al.*, 2005; Podyma *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). Anders als der Name $G\alpha_{olf}$ erwarten lässt, wird es nicht ausschließlich von den Neuronen des olfaktorischen Epithels exprimiert, sondern konnte auch auf bestimmten zerebralen Strukturen wie dem Striatum und dem Nucleus accumbens nachgewiesen werden. Dort ist es an der Transduktion Dopamin- und Adenosin-vermittelter Effekte beteiligt. Ein Fehlen von $G\alpha_{olf}$ führt folglich zu Anosmie und steht im Zusammenhang mit der Entwicklung von Bewegungsstörungen (Belluscio *et al.*, 1998; Corvol *et al.*, 2004; Syrovatkina *et al.*, 2016). Zur $G\alpha_{q/11}$ -Familie zählen die ubiquitären Formen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ sowie die gewebespezifischen Formen $G\alpha_{14}$ (Leber, Lunge, Niere) und $G\alpha_{15/16}$ (hämatopoetischen Zellen). Sie interagieren mit den β -Isoformen der Phospholipase C (β_1 –4), welche die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in Inositoltrisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) katalysieren. Während $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ an der Herzfunktion, der Plättchenaktivierung und der Bewegungskoordination beteiligt sind, ist die biologische Rolle von $G\alpha_{14}$ und $G\alpha_{15}$ noch weitestgehend unklar (Offermanns, Hashimoto, *et al.*, 1997; Offermanns, Toombs, *et al.*, 1997; Offermanns *et al.*, 1998; Wettschureck & Offermanns, 2005). Die ubiquitär exprimierte $G\alpha_{12/13}$ -Subfamilie besitzt eine Vielzahl von Interaktionspartnern, darunter die Btk-Tyrosinkinase, Gap1, rasGAP, Cadherine, SNAP- α und p120-Catenin (Syrovatkina *et al.*, 2016).

1.3.4 Die Subfamilie der $G\alpha_i$ -Proteine

Die $G\alpha_i$ -Unterfamilie stellt zahlenmäßig die größte Gruppe mit der stärksten Diversität in der Aminosäuresequenz dar. Ihr Name leitet sich aus der Fähigkeit ab, die Adenylylcyclase zu inhibieren und den intrazellulären cAMP-Spiegel zu senken (Wong *et al.*, 1991). Neben den ubiquitär exprimierten inhibitorischen Isoformen (α_{i1} , α_{i2} , α_{i3}), zählen auch eine Vielzahl von zellspezifischen Isoformen wie $G\alpha_z$, $G\alpha_o$, $G\alpha_t$ und $G\alpha_g$ zu dieser Subfamilie (Syrovatkina *et al.*, 2016). $G\alpha_z$ wird in verschiedenen Zellen wie Neuronen und Thrombozyten exprimiert. Heterologe Expressionsstudien konnten eine Interaktion von $G\alpha_z$ mit unterschiedlichen Rezeptoren für Neurotransmitter und Neuropeptiden nachweisen, sodass von einer Beteiligung an der neuronalen Funktion ausgegangen wird (Ho & Wong, 2001; Wettschureck & Offermanns, 2005). Zudem konnte mithilfe Thrombozyten-spezifischer $G\alpha_z$ -defizienter Mausmodelle ein Einfluss auf die Epinephrin-vermittelte Plättchenaggregation nachgewiesen werden (Yang *et al.*, 2000). Die beiden sensorischen G-Proteine $G\alpha_g$ (Gustducin) und $G\alpha_t$ (Transducin) weisen mit einer Sequenzhomologie von 80% starke strukturelle Ähnlichkeiten auf (Hoon *et al.*, 1995). Gustducin wird überwiegend in den Geschmacksknospen exprimiert und vermittelt über eine Stimulation der Phospholipase C β 2 die Geschmacksrichtungen süß, bitter und umami, während das in den Photorezeptorzellen exprimierte Transducin der Transduktion von externen Lichtreizen in neuronale Signale dient (Stryer, 1983; Zancanaro *et al.*, 1999; Chandrashekar *et al.*, 2006; Mosinger *et al.*, 2010; Rassow *et al.*, 2016). Das Fehlen eines dieser Proteine führt folglich zu einer starken Einschränkung der jeweiligen Sinneswahrnehmung (Calvert *et al.*, 2000; He *et al.*, 2002). $G\alpha_o$ weist mit $G\alpha_{oA}$ und $G\alpha_{oB}$ zwei Splicevarianten auf, die überwiegend von Neuronen exprimiert werden. Ein Fehlen dieser Proteine führt zu schwerwiegenden neurologischen Störungen wie Epilepsie, Entwicklungs- und Bewegungsstörungen (Nürnberg *et al.*, 1994; Syrovatkina *et al.*, 2016; Feng *et al.*, 2018). Die drei Isoformen $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ besitzen mit einer Sequenzhomologie von 88-94% die stärkste Homologie innerhalb der $G\alpha_i$ -Familie. Die größte Übereinstimmung ist dabei zwischen $G\alpha_{i1}/G\alpha_{i3}$ und $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ festzustellen (Wilkie & Yokoyama, 1994). Die starke Sequenzhomologie der

einzelnen Isoformen lässt vermuten, dass sie redundante Funktionen besitzen. Dies wurde durch Expressionsanalysen *Gnai2*-defizienter Mauslinien bestätigt, die eine kompensatorische Hochregulation von $G\alpha_{i3}$ nachweisen konnten (Dizayee *et al.*, 2011). Jedoch zeigten funktionelle Analysen gewebe- bzw. zellspezifischer $G\alpha_i$ -Mutanten, dass jede Isoform auch eigene, nicht-kompensierbare Funktionen in der Zelle übernimmt (Nagata *et al.*, 2000; Wiege *et al.*, 2012). Bei den einzelnen Isoformen handelt es sich zwar um ubiquitär exprimierte Proteine, sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Expressionslevel auf verschiedenen Zelltypen deutlich. Die prädominante Isoform stellt $G\alpha_{i2}$ dar. Sie ist dementsprechend an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. Zu den physiologischen Funktionen zählen unter anderem die Steuerung der Embryonalentwicklung, des Inflammationsprozesses und der Hörwahrnehmung (Rudolph *et al.*, 1995; Wiege *et al.*, 2012; Wiege *et al.*, 2013; Beer-Hammer *et al.*, 2018). Aus pathophysiologischer Sicht spielen die $G\alpha_{i2}$ -Expressionslevel bei einer Vielzahl von Erkrankungen wie beispielsweise dem Ovarialkarzinom, dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom und der Osteoarthritis eine wichtige Rolle (Dmitriev *et al.*, 2012; Raymond *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2018). Das $G\alpha_{i1}$ -Protein wird in höheren Konzentrationen vor allem von neuronalen Strukturen exprimiert auf denen es zusammen mit $G\alpha_o$ den prädominanten Typ aus der $G\alpha_i$ -Familie darstellt (Nürnberg *et al.*, 1994). Es wird vermutet, dass es dort an der Transduktion cholinerg-vermittelter Prozesse beteiligt ist (Jia *et al.*, 2020). Im Gegensatz zu $G\alpha_{i1}$ wird $G\alpha_{i3}$ überwiegend von nicht-neuronalen Strukturen exprimiert (Leiss *et al.*, 2021). Aufgrund des weiten Expressionsmusters ist $G\alpha_{i3}$ ähnlich wie $G\alpha_{i2}$ an der Vermittlung vieler zellspezifischer Funktionen beteiligt. Hierzu zählen die Steuerung der Autophagie von Insulin in der Leber und die Beeinflussung des Reperfusionsschadens in den Kardiomyozyten nach Myokardinfarkt (Gohla *et al.*, 2007; Köhler *et al.*, 2014).

1.3.5 Funktion der $G\alpha_i$ -Proteine in Adipozyten

Neben den vielfältigen o.g. Funktionen sind inhibitorische G-Proteine entscheidend an der Signaltransduktion in Adipozyten und damit an der

Entwicklung Adipositas-assoziiierter Erkrankungen beteiligt. Wie bereits in 1.2.1 beschrieben, fungieren Adipozyten als zentrale regulatorische Einheit des Energiestoffwechsels. Um adäquat auf Veränderungen reagieren zu können, exprimieren Adipozyten eine große Anzahl unterschiedlichster GPCRs. Analysen humaner Fettdepots konnten die Expression von mindestens 162 verschiedenen GPCRs nachweisen (Amisten *et al.*, 2015). Viele dieser GPCRs wie beispielsweise α -Adrenozeptoren, Adenosin-Rezeptoren, Frizzled-Rezeptoren und Lysophospholipid-Rezeptoren nutzen $G\alpha_i$ -Proteine zur Transduktion empfangener Signale (Rosen *et al.*, 2009; Nichols *et al.*, 2013; Tozzi & Novak, 2017; Evans *et al.*, 2019).

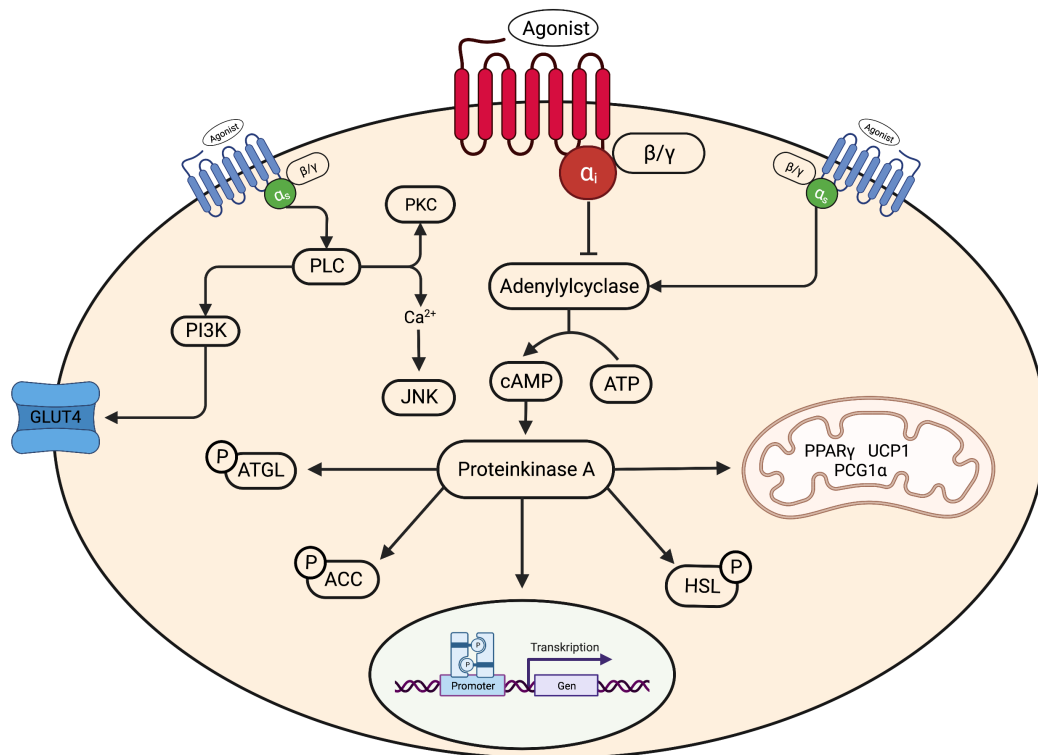


Abbildung 1.2: G-Protein-vermittelte Steuerung des Metabolismus in Adipozyten. Die metabolische Aktivität der Adipozyten wird durch die Interaktion verschiedener GPCRs und G-Proteine gesteuert. Eine entscheidende Rolle nehmen $G\alpha_i$ -Proteine ein. Sie hemmen die Aktivität der Adenylylcyclase, die für die Bildung von cAMP aus ATP verantwortlich ist. cAMP aktiviert als sekundärer Botenstoff die PKA, die als Serin/Threonin-Kinasen über Phosphorylierungen zahlreiche Reaktionen des Energiestoffwechsels steuert. Zu diesen Reaktionen zählen u.a. die Lipolyse, Fettsäuresynthese und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Nähere Erläuterungen siehe Text. Abbildung modifiziert nach (Barella *et al.*, 2021). α - α - Untereinheit des G-Proteins; β/γ - β/γ -Untereinheit des G-Proteins; P - Phosphat; PKC - Proteinkinase C; PLC - Phospholipase C; JNK - Januskinase, PI3K - Phosphoinositid-3-Kinase; GLUT4 - Glukosetransporter Typ 4; cAMP - cyclisches Adenosinmonophosphat; ATP - Adenosintriphosphat; ATGL - Adipozyten-Triglycerid-Lipase; ACC - Acetyl-CoA-Carboxylase; HSL - Hormonsensitive Lipase; PPAR- γ - Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor gamma; UCP1 - Entkopplungsprotein 1; PGC-1 α - Peroxisome proliferator-activated receptor γ -co-activator 1 α . Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Die Aktivierung eines $G\alpha_i$ -Proteins (siehe 1.3.2) führt zu einer Hemmung der Adenylcyclase, die als membrangebundenes Protein für die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus 5'-Adenosintriphosphat (ATP) verantwortlich ist. Für den sekundären Botenstoff cAMP sind drei Haupteffektoren bekannt: Proteinkinase A (PKA), EPAC (exchange protein directly activated by cAMP) und cAMP-abhängige Ionenkanäle (Sassone-Corsi, 2012). Die PKA ist als Serin/Threonin-Kinase dazu befähigt, zahlreiche Stoffwechsellzyme zu phosphorylieren und damit ihre Aktivität zu steuern. Zu den PKA-assoziierten Enzymen zählen die Hormonsensitive Lipase (HSL), die Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL), die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) und die Phosphorylase-Kinase, wodurch insbesondere der Lipidstoffwechsel beeinflusst wird (Brushia & Walsh, 1999; Munday, 2002; Krintel *et al.*, 2009; Barella *et al.*, 2021). Darüber hinaus steuert die PKA über Phosphorylierungen von Transkriptionsfaktoren die Expression nukleärer und mitochondrialer Gene. Zu den nukleären Genen zählt unter anderem das cAMP response element-binding protein (CREB), das entscheidend an der Ausdifferenzierung von Adipozyten beteiligt ist (Reusch *et al.*, 2000; Rosenberg *et al.*, 2002; Amigoni *et al.*, 2015). Im mitochondrialen Genom wird die Expression von PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptors gamma), seinem Koaktivator PGC-1 α (PPAR γ coactivator 1- α) und UCP1 beeinflusst (Barella *et al.*, 2021). PPAR γ fungiert als nukleärer Hormonrezeptor, der die Expression diverser Gene reguliert, die am Inflammationsprozessen, der Adipogenese, dem Fettstoffwechsel, der Glukosehomöostase und der Insulinresistenz beteiligt sind (Corrales *et al.*, 2018). Auf die Funktion von UCP1 wurde bereits im Abschnitt 1.2.2 eingegangen. Das EPAC-Protein aktiviert mit Rap1 und Rap2 zwei Mitglieder der Ras-Superfamilie. Es ist damit an Zellfunktionen wie der Zelladhäsion, der Exozytose und der Zelldifferenzierung beteiligt (Ozaki *et al.*, 2000; Rangarajan *et al.*, 2003; Kiermayer *et al.*, 2005). Zu den cAMP-abhängigen Ionenkanälen zählen nichtselektive Kationenkanäle, die v.a. Calcium aber auch Natrium und Kalium transportieren. Calcium stimuliert Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinasen, die wiederum die Aktivität der AC und Phosphodiesterasen modulieren (Zaccolo & Pozzan, 2003). Durch all diese Funktionen ist es wenig überraschend, dass das Fehlen einer $G\alpha_i$ -Isoform zu

folgenhaften Veränderungen führt. Analysen Adipozyten-spezifischer Mausmodelle zeigten, dass das Fehlen der prädominant exprimierten $G\alpha_{i2}$ -Isoform zu einer abgeschwächten Entwicklung ernährungsbedingter Adipositas führt. Als Ursache wird ein erhöhter Energieumsatz angesehen, der nicht auf Unterschiede in der Nahrungsaufnahme oder physikalischer Aktivität zurückzuführen ist. Stattdessen werden erhöhte cAMP-Spiegel und eine gesteigerte Lipolyseaktivität nach β -Adrenozeptor-Stimulation als ursächlich angesehen. Unklar bleibt, ob diese Veränderungen auf einer direkten Interaktion von $G\alpha_{i2}$ mit den β -Adrenozeptoren oder der fehlenden Hemmung auf die AC (relative Überaktivität von $G\alpha_s$) beruhen. Zusätzlich zeigten die Knockoutmäuse eine höhere Insulinsensitivität und eine verbesserte Glukosetoleranz. Verantwortlich hierfür sind niedrigere Spiegel von IL-6 und TNF- α , die als proinflammatorische Mediatoren entscheidend an der Entwicklung einer peripheren Insulinresistenz beteiligt sind (Leiss *et al.*, 2020). Neben den inhibitorischen G-Proteinen sind auch andere G-Proteine wie $G\alpha_s$ und $G\alpha_q$ an der Signaltransduktion in Adipozyten beteiligt. $G\alpha_s$ -Proteine stimulieren die Adenylylcyclase, wodurch sie den Effekten der $G\alpha_i$ -Proteine entgegenwirken. $G\alpha_q$ -Proteinen wird ein Einfluss auf die Expression mitochondrialer Gene, der Glukoseaufnahme über GLUT4 und der Aktivität c-Jun-N-terminaler Kinasen (JNK) zugeschrieben (Barella *et al.*, 2021).

1.4 Genome Editing zur Funktionsanalyse einzelner Gene

Um die Funktionen einzelner Gene, Gensegmente oder Proteine zu verstehen, hat es sich bewährt, diese zu inaktivieren oder in ihrer Funktion zu verändern. In der Forschung nutzt man dazu sogenannte Knockoutmodelle. Dabei handelt es sich um Organismen, die gentechnisch so verändert wurden, dass es zu einer Deletion der im Fokus stehenden Genabschnitte kommt (Schenkel, 2006). Im Laufe der Zeit wurde eine Vielzahl von Techniken entwickelt, die diese Deletion ermöglichen. Grundsätzlich kann man zwischen der konventionellen und der konditionalen Knockout-Strategie unterscheiden. Bei konventionellen Knockout-Modellen werden ein oder mehrere Exons des Zielgens in pluripotenten, embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) entfernt. Die veränderten ES-Zellen

werden in die Keimbahn eingebracht, wodurch in den Nachkommen das entsprechende Gen in allen Zellen deletiert ist (Capecchi, 1989). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass bis zu 15% der Knockout-Mäuse bereits in der Embryonal- oder Neonatalperiode versterben. Außerdem kann es schwierig sein, direkte zell- oder gewebespezifische Effekte des Knockouts von sekundären Effekten, die auf den Knockout in anderen Organen zurückzuführen sind, zu unterscheiden (Davey & MacLean, 2006; Hall *et al.*, 2009). Diese Einschränkungen haben dazu geführt, dass neuartige Techniken zur steuerbaren, zell- oder gewebespezifischen Geninaktivierung entwickelt wurden. Diese Techniken werden heute als konditionale Mutagenese bezeichnet (Brüning *et al.*, 1999). Ein weit verbreitetes Verfahren ist das sogenannte Cre/loxP-System.

1.4.1 Konditionale Gendeletion mit Hilfe des Cre-/LoxP-Systems

Bei der Cre-Rekombinase (cyclization recombination) handelt es sich um ein Enzym des Bakteriophagen P1, das die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA-Abschnitten katalysiert. Das 38 kDa große Protein orientiert sich dabei an speziellen Erkennungssequenzen, die ebenfalls dem Bakteriophagen P1 entstammen und als loxP-Sequenzen (locus of x-over P1) bezeichnet werden. Die loxP-Sequenzen bestehen aus einem Spacer mit einer Länge von acht Basenpaaren, welcher von zwei Palindromsequenzen mit einer Länge von 13 Basenpaaren flankiert wird. Der Spacer bestimmt die Orientierung der gesamten loxP-Sequenz (Lukowski *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2018). Die Cre-vermittelte Rekombination zwischen zwei loxP-Sequenzen bewirkt letztendlich einen reziproken Austausch von DNA-Abschnitten. Das Endprodukt ist von der Lage und Orientierung der beiden loxP-Sequenzen abhängig. Sind beide Sequenzen in die gleiche Richtung orientiert, kommt es zu einer Exzision des DNA-Abschnittes, während es bei einer konträren Orientierung zu einer Inversion kommt. Liegen beide loxP-Sequenzen auf unterschiedlichen DNA-Strängen, führt dies zu einer Translokation der flankierten DNA-Sequenzen (Kuhn & Torres, 2002). Um eine zellspezifische Aktivität der Cre-Rekombinase zu erreichen, muss der Promotor eines zell-/gewebsspezifischen Proteins vor das Cre-Transgen gesetzt werden. Da eine Rekombinase-Aktivität während der

Embryonalentwicklung häufig zu Entwicklungsstörungen führt, ist es wichtig, die Aktivierung zeitlich steuern zu können. Man erreicht dies, indem man die Cre-Rekombinase mit einem modifizierten humanen Estrogenrezeptor (ER) koppelt, der keine Affinität mehr zu endogenem Östrogen besitzt, jedoch durch den aktiven Metaboliten von Tamoxifen, 4-Hydroxytamoxifen (OHT), aktiviert werden kann. Die so modifizierte Cre-Rekombinase nennt man CreER^{T2} (Schenkel, 2006; Kim *et al.*, 2018).

1.4.2 Adipozyten-spezifische *Gnai3*-Deletion mit Hilfe des Cre-/LoxP-Systems

Das *Gnai3*-Gen ist im Modellorganismus Maus (*Mus musculus*) auf Chromosom drei lokalisiert und zählt insgesamt neun Exons.

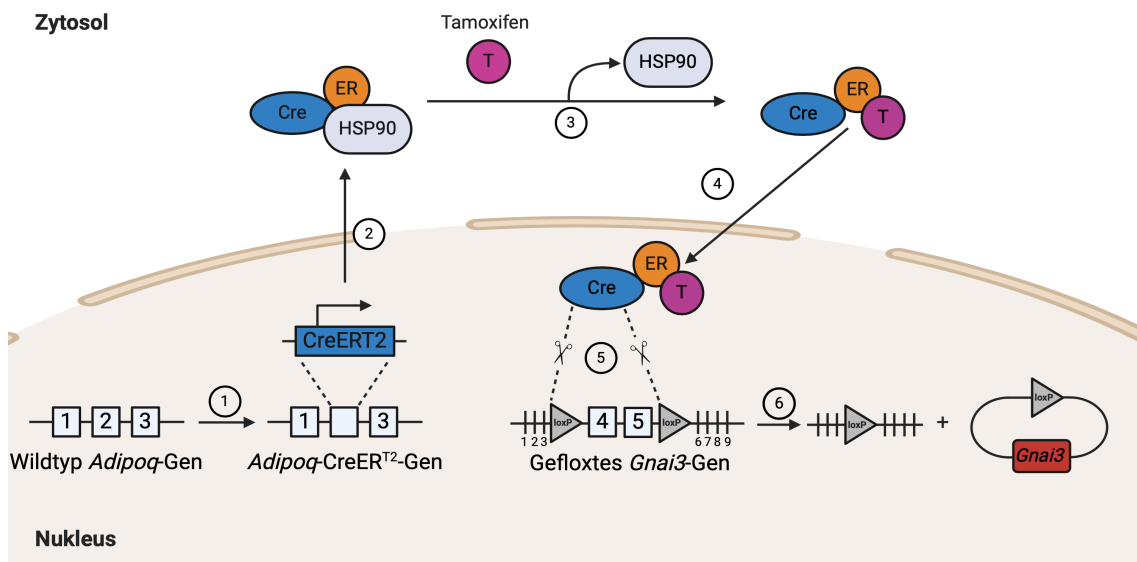


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Adipozyten-spezifischen *Gnai3*-Knockouts. Nach Integration (1) und Translation des Fusionsproteins aus Cre-Rekombinase und Estrogen-Rezeptor (2) durch den Einsatz von Tamoxifen wird eine Dissoziation des HSP90 bewirkt (3). Hierdurch wird die Translokation der Cre-Rekombinase in den Zellkern ermöglicht (4). Durch eine Interaktion des Fusionsproteins mit den in das *Gnai3*-Gen eingebrachten loxP-Sequenzen, kann eine Deletion erreicht werden (5,6). Das Ergebnis sind deletierte *Gnai3*-Genabschnitte sowie ausgeschnittene, zirkuläre DNA-Abschnitte, die anschließend durch zelluläre Mechanismen abgebaut werden. Cre - Cre-Rekombinase; ER - Estrogenrezeptor; HSP90 - Hitzeschockprotein 90; T - Tamoxifen; loxP - Locus of x-over P1. Abbildung modifiziert nach (Kim *et al.*, 2018). Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Die palindromischen loxP-Sequenzen werden in gleicher Richtung vor Exon 4 und nach Exon 5 in das *Gnai3*-Gen integriert. Als Zell-spezifischer Promotor dient das *Adipoq*-Gen auf Chromosom 16, welches für das Protein Adiponektin, einem Hormon, das ausschließlich von differenzierten Adipozyten exprimiert wird, kodiert (Lebas *et al.*, 2003; Sassmann *et al.*, 2010). Das Exon 2 im Startcodon

des *Adipoq*-Gens wird durch ein CreERT2-Transgen ersetzt (1). Dieses Transgen kodiert für ein Fusionsprotein aus Cre-Rekombinase (Cre) und einem mutierten Estrogen-Rezeptor (ER), dessen Aktivität von der Anwesenheit von Tamoxifen (T) abhängig ist. Das Fusionsprotein ist in seinem inaktiven Zustand im Zytosol lokalisiert und an das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) gekoppelt (2). Die Bindung des synthetischen Steroids 4-OHT an den modifizierten Estrogen-Rezeptor des Fusionsproteins führt zu einer Dissoziation des HSP90 (3). Dies erlaubt eine Translokation des Fusionsproteins in den Nukleus und eine Interaktion mit den loxP-Sequenzen des geflochten DNA-Abschnittes (4). Die Cre-Rekombinase ist als Mitglied der Integrase-Familie dazu fähig, die loxP-Sequenzen zu erkennen, das dazwischenliegende *Gnai3*-Gen in Form eines zirkulären Produktes herauszuschneiden (5) und die beiden verbleibenden Chromosomenenden erneut zu verknüpfen. Dabei bleibt eine der beiden loxP-Sequenzen auf dem Chromosom zurück. Der ausgeschnittene, zirkuläre DNA-Abschnitt wird von zellulären Enzymen abgebaut (6) (Sassmann *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2018).

2 Zielsetzung

Präadipositas und Adipositas werden mit einer Vielzahl von Komorbiditäten wie dem metabolischen Syndrom, kardiovaskulären Erkrankungen und bestimmten Typen von Karzinomen assoziiert. Ursächlich für die exzessive Akkumulation von Fett ist ein Ungleichgewicht zwischen der Energiezufuhr und dem Energieverbrauch. An der Aufnahme, Speicherung und Verteilung dieses Energieüberschusses sind eine Vielzahl von Organen beteiligt. Neben der Resorption von Fetten und Kohlenhydraten im Darm spielen auch die Aufnahme in die Skelettmuskulatur, die Leber, das Fettgewebe, die Speicherung überschüssiger Fettsäuren im Fettgewebe sowie die neuronale Steuerung eine wichtige Rolle. Die Regulation dieser Prozesse wird unter anderem über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) und G-Proteine vermittelt. Hervorzuheben sind insbesondere die inhibitorischen $G\alpha_i$ -Proteine. So konnte bereits gezeigt werden, dass das Adipozyten-spezifische Fehlen der im Fettgewebe dominant exprimierten $G\alpha_{i2}$ -Isoform die Entwicklung einer Diät-induzierten Fettleibigkeit abschwächen kann (Leiss *et al.*, 2020). Entgegen der früheren Annahme, dass das Fehlen einer $G\alpha_i$ -Isoform durch die Hochregulation einer anderen $G\alpha_i$ -Isoform kompensiert werden könne, zeigten Analysen Zell-spezifischer $G\alpha_i$ -Mutanten, dass jede Isoform auch eigene, nicht kompensierbare Funktionen in der Zelle übernimmt. Auf Grundlage dieser Daten soll die Adipozyten-spezifische Funktion des minoren $G\alpha_{i3}$ -Proteins, insbesondere hinsichtlich des Einflusses auf die Gewichtszunahme, den Glukosestoffwechsel und den Lipidmetabolismus geklärt werden. Dazu sollen Adipozyten-spezifische *Gnai3*-defiziente Mäuse sowie Geschwisterkontrollen generiert und entweder einer 45%-igen Hochfettdiät oder einer Kontrolldiät ausgesetzt werden. Die Gewichtsentwicklung soll über einen Zeitraum von 22 Wochen wöchentlich dokumentiert werden. Um den Einfluss auf die Fettspeicherung aufzuklären, sollen die Fettdepots nach Ablauf der 22 Wochen entnommen und gewogen werden. Anschließend sollen die Fettzellgrößen histologisch an Paraffinschnitten bestimmt werden. Unter physiologischen Bedingungen hemmen die inhibitorischen $G\alpha_i$ -Proteine die Adenylylcyclase und tragen zur Senkung der intrazellulären cAMP-Spiegel bei. Durch das Fehlen des $G\alpha_{i3}$ -Proteins könnte

diese Hemmung entfallen oder abgeschwächt werden und ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Spiegel ist zu erwarten. Das cAMP ist als sekundärer Botenstoff an der Regulation von Stoffwechselprozessen beteiligt. Dazu zählt unter anderem die Lipolyse, also die hydrolytische Spaltung von Triglyceriden in Glycerin und freie Fettsäuren. Unter Zuhilfenahme spezifischer *ex vivo* cAMP-, Triglycerid- und Lipolyseassays soll der Einfluss von $G\alpha_{i3}$ auf diesen Stoffwechselweg analysiert werden. Adipositas beeinflusst die Insulinsensitivität und die Glukosetoleranz negativ. Als Hauptursache wird eine mit Fettleibigkeit assoziierte Entzündung des Fettgewebes angesehen. Mögliche Veränderungen in der Glukosehomöostase der *Gnai3*-defizienten Mäuse sollen durch *in vivo* Glukose- und Insulintoleranztests aufgedeckt werden. Der Einfluss von $G\alpha_{i3}$ auf die Entzündungsaktivität im Fettgewebe soll durch die Messung proinflammatorischer Mediatoren und des Makrophagenmarkers F4/80 mittels quantitativer PCR analysiert werden. Diese Zielsetzungen sind in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt.

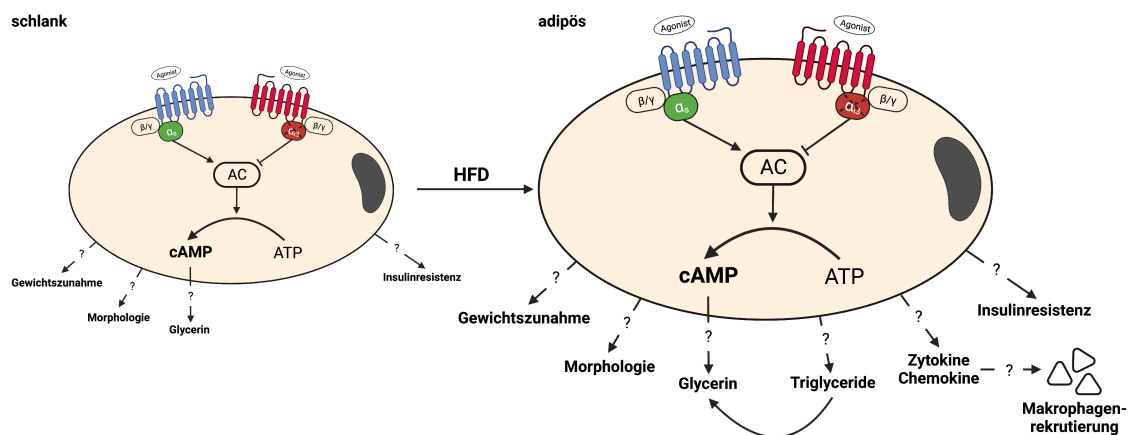


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Zielsetzung des Projektes. In *Gnai3*^{ko}-Mäusen soll die Rolle von $G\alpha_{i3}$ bei der Regulation des Körpergewichtes, der Beeinflussung des cAMP-Signalweges, der Lipolyseaktivität, der Entstehung von Insulinresistenz und der Rekrutierung von Makrophagen analysiert werden. α - α -Untereinheit des G-Proteins; β/γ - β/γ -Untereinheit des G-Proteins; AC - Adenylylcyclase; ATP - Adenosintriphosphat, cAMP - cyclisches Adenosinmonophosphat, HFD - Hochfett-diät. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

3 Materialien & Methoden

3.1 Materialien

Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Stripetten, Petrischalen und Spritzen wurden von den Firmen Becton-Dickinson GmbH (Heidelberg), Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf), Eppendorf AG (Hamburg), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) und Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht) bezogen. Die verwendeten Chemikalien wurden in größter Reinheit von den Firmen Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) oder VWR International GmbH (Darmstadt) erworben.

3.2 Methoden

3.2.1 Transgene Mauslinie

Die verwendeten Mäuse waren mindestens acht Generationen auf einen C57BL/6N Hintergrund rückgekreuzt. Die *Adipoq*CreERT2-Linie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Stefan Offermanns (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Frankfurt am Main, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Tiere waren im spezifiziert pathogenfreien Bereich (SPF) der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen untergebracht. Die Haltung erfolgte in individuell ventilierten Käfigen (IVC) bei Temperaturen zwischen 21°C und 24°C, einer Luftfeuchtigkeit von 45-55% und einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus. Über die gesamte Lebenszeit wurde ein freier Zugang zu Futter und Trinkwasser gewährleistet. Die Tiere wurden täglich von den Tierpflegern begutachtet sowie einmal wöchentlich gewogen und anhand von Score-Sheets, die im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung erforderlich waren, bewertet.

Alle tierexperimentellen Arbeiten waren durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Bewilligungsnummer PH09/18G).

3.2.2 Generierung von Adipozyten-spezifischen *Gnai3*-defizienten Versuchstieren

Für die Generierung der Adipozyten-spezifischen *Gnai3*-defizienten Versuchstiere wurde zunächst das Transgen (*Adipoq*-CreERT2) in die homozygot gefloخته *Gnai3*-Linie (*Gnai3^{fl/fl}*) eingekreuzt. Die daraus resultierenden männlichen transgenen Nachkommen (Genotyp: *Gnai3^{+/fl}*; *Adipoq*-CreERT2^{+/tg}) wurden anschließend so lange mit *Gnai3^{fl/fl}*-Weibchen verpaart, bis männliche *Gnai3^{fl/fl}*; *Adipoq*-CreERT2^{+/tg} Nachkommen mit homozygot geflochten *Gnai3* Weibchen verpaart werden konnten. Gemäß den mendelschen Regeln besitzen 100% der Nachkommen in der F1-Generation einen *Gnai3*-geflochten Genabschnitt. Die heterozygoten *Adipoq*-Cre-Mäuse der Parentalgeneration vererben zusätzlich an 50% ihrer Nachkommen das Transgen. Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden ausschließlich Tamoxifen-behandelte Mäuse analysiert (siehe 1.2.2). Knockoutmäuse (KO) trugen den Genotyp *Gnai3^{fl/fl}*; *Adipoq*-CreERT2^{+/tg}. Als Kontrollen (Kon) wurden männliche Wurfgeschwister, die kein Transgen trugen (Genotyp: *Gnai3^{fl/fl}*) verwendet.

3.2.3 Tamoxifen-Injektion und Umstellung auf Spezialdiät

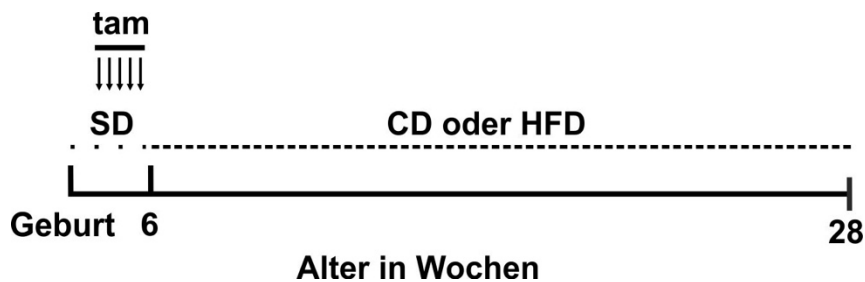


Abbildung 3.1: Schematisierter zeitlicher Ablauf von Tamoxifen-Injektion und der Umstellung auf Kontroll- bzw. Hochfett-diät. Vom Zeitpunkt der Geburt bis zum Absetzen der Jungtiere von der Mutter erhielten die Versuchstiere entweder Muttermilch oder eine Standarddiät (SD). Zwischen der vierten und fünften Lebenswoche wurden die Tamoxifen-Applikationen durchgeführt. Die Mäuse erhielten an fünf aufeinander folgenden Tagen 1 mg Tamoxifen. In einem Alter von 6 Wochen erfolgte die Umstellung auf die jeweilige Spezialdiät für 22 Wochen. tam - Tamoxifen; SD - Standarddiät; CD - Kontrolldiät; HFD - Hochfett-diät. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Zur Induktion des Knockouts wurde den Mäusen in einem Alter von vier bis fünf Wochen an fünf aufeinander folgenden Tagen intraperitoneal (i.p.) Tamoxifen injiziert. Dabei wurde täglich eine Dosis von 1 mg in 100 µl Miglyol verabreicht. Das Tamoxifen (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde abgewogen und in der

entsprechenden Menge in Miglyol® 812 (Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland) lichtgeschützt gelöst. Das Gemisch wurde aliquotiert und lichtgeschützt bei -20°C gelagert. Die Tamoxifeninjektionen wurden von Dr. Veronika Leiss durchgeführt. Vor der Umstellung auf die jeweilige Spezialdiät, erhielten alle Mäuse Muttermilch oder eine kommerzielle Standarddiät (SD). In einem Alter von sechs Wochen erfolgte die Umstellung auf Kontroll- (CD) bzw. Hochfettdiät (HFD) (Research Diets, New Brunswick, New Jersey, USA). Die Gewichtsentwicklung wurde nach Umstellung der Diäten wöchentlich über einen Zeitraum von 22 Wochen dokumentiert.

Tabelle 2: Zusammensetzung der unterschiedlichen Diäten. Das HFD-Futter weist einen deutlich höheren Fettanteil auf als das CD-Futter.

	Kontrolldiät	Hochfettdiät
Protein	19%	24%
Kohlenhydrate	67%	41%
Fett	4%	24%

3.2.4 Entnahme von Gewebe

Die Mäuse wurden in ein Becherglas überführt, das eine supratherapeutische Dosis des volatilen Anästhetikums Isofluran (cp-pharma, Burgdorf, Deutschland) enthielt. Die Inhalation wurde bis zur Regungslosigkeit und Apnoe durchgeführt. Anschließend erfolgte eine zervikale Dislokation. Die Gliedmaßen der Maus wurden fixiert, die Bauchdecke mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und durch einen longitudinalen Schnitt mit einer chirurgischen Schere eröffnet. Das subkutan lokalisierte inguinale weiße Fettgewebe (iWAT) wurde vorsichtig freipräpariert und entnommen. Für die Entnahme des gonadalen weißen Fettgewebes (gWAT) wurde das Peritoneum eröffnet und das Fettgewebe ohne Mitnahme von Hoden, Nebenhoden oder Samenleiter entnommen. Zur Entnahme des im weißen Nackenfett eingebetteten braunen Fettgewebes (BAT) wurde die Maus auf den Bauch gedreht, der Rücken desinfiziert, die Nackenhaut entfernt und das gesamte im Nacken befindliche Fettgewebe entnommen. Anschließend wurde das braune Fettgewebe aus dem weißen Fettgewebe isoliert. Das entnommene Gewebe wurde gewogen und je nach

Verwendungszweck in flüssigen Stickstoff oder in das jeweilige Medium überführt.

3.2.5 Genotypisierung und Rekombinationsanalysen

Um eine erfolgreiche Rekombination nach Tamoxifen-Gabe zu überprüfen, wurden Rekombinationsanalysen auf genomischer Ebene mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt und die Proteinniveaus mittels Immunoblots analysiert.

3.2.5.1 Gewebebiopsie

PCR-Lysepuffer	5% Proteinase K (1 mg/ml) in Direct PCR [®] -Tail (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
-----------------------	--

Die Jungtiere wurden durch eine individuelle Ohrmarkierung gekennzeichnet. Die dabei gewonnene Ohrbiopsie wurde standardmäßig zur Genotypisierung verwendet. Durch eine zwölfstündige Inkubation des Gewebes in 1 ml Lysepuffer bei 55°C wurde die darin enthaltene genomische Desoxyribonukleinsäure (DNA) freigesetzt. Durch anschließendes Erhitzen des Lysates auf 85°C für 55 Minuten (min) kam es zur Inaktivierung der Proteinase K, die als Serinprotease für den Abbau zellulärer Proteine verantwortlich ist. Nicht gelöste Gewebestandteile und Haare wurden durch Zentrifugation (13 000 rpm, 5 min, RT) vom Lysat getrennt, der Überstand abgenommen und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

3.2.5.2 Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Technik, die eine *in vitro* Amplifikation von Nukleinsäuren aus unterschiedlichen Ausgangsmaterialien ermöglicht. Zu den benötigten Materialien zählen die zu replizierende DNA (template DNA), spezifische Oligonukleotidprimer, freie Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und eine DNA-Polymerase. Der Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase bietet den Vorteil, dass alle benötigten Komponenten in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt werden können und die Amplifikation vollautomatisch durch einen Thermocycler vollzogen werden kann. Grundsätzlich kann die PCR in drei, jeweils von der Temperatur abhängige Arbeitsschritte eingeteilt werden: Denaturierung,

Annealing und Elongation. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA (dsDNA) auf 95°C erhitzt. Dies führt zu einer Denaturierung, also einer Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den unterschiedlichen Basen der DNA. Daraus resultieren zwei DNA-Einzelstränge (single strand-DNA, ssDNA). Ein Abkühlen des Ansatzes auf 40-60°C (abhängig vom mittleren Schmelzwert T_m der Primer) ermöglicht das Binden von spezifischen Oligonukleotidprimern an die 5'- und 3'-Enden des zu amplifizierenden Bereiches (Annealing). Im letzten Schritt findet die Elongation, also eine Verlängerung der Oligonukleotidprimer durch eine thermostabile DNA-Polymerase in Anwesenheit freier dNTPs statt. Diese Arbeitsschritte werden in der Regel 25- bis 35-mal (Zykluszahl) durchlaufen, bevor ein abschließender Elongationsschritt eingeleitet wird. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAxcel Systems (Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande), einem automatisierten, multikapillaren Gelelektrophoresesystem, analysiert.

3.2.5.3 Nachweis des *Gnai3*-Genabschnittes

Zum Nachweis der geflochten DNA-Abschnitte wurde das Lysat aus den Ohrbiopsien verwendet. Um die Adipozyten-spezifische Deletion zu überprüfen, wurden unterschiedliche Organe der Versuchstiere entnommen und analysiert. Für beide Nachweise wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Substanz	Volumen	Endkonzentration
Master Mix	12,5 µl	
Primer EX7-R (10 µM)	0,5 µl	0,5 µM
Primer Int-F (10 µM)	0,5 µl	0,5 µM
RNAse-freies Wasser	10,5 µl	
DNA-Lysat	1,0 µl	
SUMME	25 µl	

Der verwendete Mastermix (TopTaq Master Mix Kit, Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande) enthielt eine thermostabile DNA-Polymerase und Desoxynukleosidtriphosphate. Hierzu wurden Primer (Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland) mit folgenden Sequenzen sowie RNAse-freies Wasser (Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande) gegeben:

Primer EX7-R	5' ATG CTG TCA AAC AAT TTC ATG 3'
Primer Int-F	5' TAG CAG TTG TCA TGG CTA CC 3'

Zu 24 µl des Reaktionsgemisches wurde jeweils 1 µl des DNA-Lysates gegeben. Um vorhandene Luftblasen zu entfernen, wurde der Reaktionsansatz für wenige Sekunden zentrifugiert und anschließend folgende Zyklen in einem Thermocycler (C1000 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA) durchlaufen:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94°C	3 min	
Denaturierung	94°C	30 sek	34x
Annealing	60°C	30 sek	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Extension	72°C	10 min	
Ende	8°C	∞	

Die Reaktionsansätze lagerten im Kühlschrank bei 4°C bis die PCR-Produkte mit Hilfe des QIAxcel Systems (Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande) analysiert wurden.

3.2.5.4 Nachweis des Transgens in *Adipoq*-Cre-Mäusen

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

Substanz	Volumen	Endkonzentration
Multiplex Kit	12,5 µl	
Primer Adipoq-for (10 µM)	0,75 µl	0,75 µM
Primer Adipoq-rev (10 µM)	0,75 µl	0,75 µM
Primer IPC-for (10 µM)	0,25 µl	
Primer IPC-rev (10 µM)	0,25 µl	
RNAse-freies Wasser	9,5 µl	
DNA-Lysat	1,0 µl	
SUMME	25 µl	

Folgendes Programm wurde in einem Thermocycler (C1000 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA) durchlaufen:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95°C	15 min	
Denaturierung	94°C	30 sek	32x
Annealing	60°C	1:30 min	
Elongation	72°C	1:30 min	
Finale Extension	72°C	10 min	
Ende	8°C	∞	

Die PCR-Produkte wurden wiederum mit Hilfe des QIAxcel Systems (Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande) analysiert.

3.2.6 Immunoblot

3.2.6.1 Proteinextraktion

TN-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 7,5
	100 mM NaCl
	2,5 mM EDTA
	0,2 mM PMSF
	Roche cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail
	ddH ₂ O

Das gefrorene Gewebe wurde mit Hilfe eines Dispergiergerätes (ULTRA-TURRAX®, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland) in 500 µl TN-Puffer homogenisiert, das Lysat anschließend 1 min bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert.

3.2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Um den Proteingehalt in den Zelllysaten zu quantifizieren, wurden Proteinbestimmungen nach Bradford durchgeführt. Dieser Test beruht auf der Verschiebung des Absorptionsspektrums des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) bei Interaktion mit den basischen und aromatischen Aminosäureresten von Proteinen. Die Verschiebung des Absorptionsspektrums lässt sich photometrisch bestimmen. Dabei korreliert die Intensität der Blaufärbung mit der Proteinkonzentration. Um die Korrelation zwischen Färbung und Proteinkonzentration berechnen zu können, wurde bei jeder Proteinbestimmung eine BSA-Standardreihe mit gemessen. Damit die

Proteinkonzentrationen der Proben innerhalb der Standardreihe liegen, haben sich für weißes Fettgewebe Verdünnungen im Verhältnis von 1:25 und 1:50 und für braunes Fettgewebe 1:50 und 1:100 bewährt. Es wurden jeweils 25 µl der Probenverdünnungen mit 225 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad Laboratories GmbH) gemischt und 30 min lichtgeschützt bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde bei 600 nm mit Hilfe des GloMax Explorer (Promega GmbH, Walldorf, Deutschland) gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Microsoft Excel.

3.2.6.3 Proteinfällung

SDS-Lysepuffer	21 mM Tris/HCl pH 8,3
	0,67% SDS
	283 mM 2-Mercaptoethanol
	0,2 mM PMSF

1.5 x Laemmli	SDS-Lysepuffer	937,5 µl
	4X ROTI® Load (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	562,5 µl

Um die wässrigen Proteinlösungen von störenden Triglyceriden und Fettsäuren zu trennen und sie zu konzentrieren, wurden die Proteine vor der Gelelektrophorese gefällt. Hierzu wurde eine denaturierende Fällung mit Chloroform und Methanol durchgeführt. Um Proteindegradierung zu vermeiden, wurden alle Schritte bei 4°C durchgeführt. Es wurden 100 µl des Proteinlysates mit 100 µl Chloroform, 300 µl Methanol und 300 µl bidestilliertem Wasser vermischt. Der Reaktionsansatz wurde gevortext und 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Hierbei bildeten sich drei Phasen: eine wässrige Oberphase, eine Interphase, in der sich die ausgefällten Proteine befanden und eine Unterphase bestehend aus Methanol und Chloroform. Die Oberphase wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Es wurden erneut 300 µl Methanol hinzugegeben und der Reaktionsansatz wurde 10min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei Raumtemperatur (RT) und geöffneten Reaktionsgefäß unter dem Abzug getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 1.5 x Laemmli resuspendiert, sodass eine Endkonzentration von 1,0 µg/µl

erreicht wurde. Die Proben wurden bis zum Einsatz im Immunoblot bei -20°C gelagert.

3.2.6.4 Gelelektrophorese

Sammelgel	124 mM Tris/HCl pH 6,8
	2% SDS
	10% Acrylamid (30%)
	0,007% APS (12,5%)
	0,001% TEMED

Trenngel	375 mM Tris/HCl pH 8,8
	6 M Harnstoff
	3,5 mM SDS
	9% Acrylamid (40%)
	0,025% APS (12,5 %)
	0,025% TEMED

Zur Quantifizierung der einzelnen $G\alpha_i$ -Isoformen wurden die Proteine entsprechend ihrer relativen Molekülmasse aufgetrennt. Hierfür wurde die Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese verwendet. Das verwendete SDS denaturiert die Proteine und verleiht ihnen eine einheitliche negative Ladung, sodass sie ausschließlich entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden konnten. Das großporige Sammelgel diente zur Konzentrierung der Proteine. Für die Auftrennung der einzelnen Proteine wurden 6 M Harnstoffgele verwendet. Durch den Harnstoff wurden die Proteine durch die Spaltung von Wasserstoffbrücken zusätzlich denaturiert, wodurch eine Aggregation der einzelnen $G\alpha_i$ -Isoformen verhindert werden konnte. Nachdem die einzelnen Geltaschen mit jeweils $20\ \mu\text{g}$ Proteinlysate beladen wurden, erfolgte die Proteinauftrennung bei einer kontinuierlichen Spannung von 100 V für 3 h.

3.2.6.5 Western Blot

Transferpuffer	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	20% Methanol

Ponceau S-Lösung	0,1% Ponceau S
	5% Essigsäure

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

Zur Detektion der im Harnstoffgel aufgetrennten $G\alpha_i$ -Proteine wurden diese auf eine Trägermembran transferiert. Hierzu wurde ein Tank-Blot-System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA) verwendet. Die benötigten Komponenten wurden wie folgt zusammengesetzt: Schwamm, drei Filterpapiere, Harnstoffgel, PVDF-Membran, vier Filterpapiere, Schwamm. Die verwendeten PVDF-Membranen wurden zuvor 5 min in Methanol inkubiert, um die Hydrophobie der Membran herabzusetzen und so für den Transferpuffer zugänglich zu machen. Alle anderen Bestandteile wurden zuvor in Transferpuffer getränkt. Die genannten Materialien wurden in das beiliegende Gitter eingespannt, in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer überführt und die Proteine bei einer kontinuierlichen Spannung von 250 mA für 70 min auf die Membran transferiert. Der erfolgreiche Nachweis des Transfers erfolgte durch das reversible Anfärben der Proteinbanden mit Ponceau S. Durch einen einfachen Waschschrift in TBS-T für 5 min konnte die Bindung des Ponceau S an die Proteinbanden aufgehoben werden.

3.2.6.6 Immundetektion

Blockpuffer	5% (m/v) Milchpulver in TBS-T
--------------------	-------------------------------

Antikörperlösung	5% (m/v) BSA in TBS-T
-------------------------	-----------------------

Um unspezifische Bindungen der Antikörper an andere Bindungsstellen zu vermeiden, inkubierte die Membran eine Stunde (h) bei RT in der Blocklösung. Durch dreimaliges Waschen in TBS-T für jeweils 10 min wurde überschüssiger Puffer von der Membran entfernt. Es folgte die Inkubation mit den spezifischen Primärantikörpern bei 4°C über Nacht auf dem Rollenmischer. Am darauffolgenden Morgen wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min in 1,5%-iger Milchpulverlösung gewaschen und für 1h bei RT mit einem

Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Durch die nachfolgenden drei Waschschriffe in TBS-T für jeweils 10 min wurde schwach gebundener Antikörper entfernt. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase erzeugt durch Oxidation von Luminol ein Lichtsignal (Chemolumineszenz). Hierfür wurden 500 µl eines 1:1 Gemisches der Lösungen A und B des ECL Western Blotting Detection Systems (GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland) gleichmäßig auf der Membran verteilt und für 1 min lichtgeschützt inkubiert. Mit Hilfe einer CCD-Kamera am Versa-Doc Luminescent Image Analyzer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) erfolgte die Detektion der Chemolumineszenz. Die semiquantitative Auswertung erfolgte mit der Software Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA). Um Ladungsunterschiede zu relativieren, wurde die $G\alpha_i$ -Expression auf die β -Aktin-Expression derselben Probe normalisiert.

3.2.7 Histologie

3.2.7.1 Gewebefixierung und Anfertigung von Gewebeschnitten

PBS pH 7,4	135 mM NaCl
	3 mM KCl
	8 mM Na ₂ HPO ₄
	2 mM KH ₂ PO ₄
4% Paraformaldehyd	4% (m/v) Paraformaldehyd/PBS
PBS-Saccharose	1,5% (m/v) Saccharose/PBS
Saccharose-Gelatine	1,5% Saccharose/0,75% Gelatine in PBS

Um Ultradünnschnitte der Fettgewebe anfertigen zu können, wurde das Gewebe direkt nach der Präparation in 14 ml einer 4%-igen Paraformaldehydlösung überführt und über Nacht auf dem Rollenmischer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 90 min in PBS wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%) dehydriert. Das Ethanol wurde durch Inkubation in einem Ethanol-Toluol-Gemisch (1:1) für 30 min und einer dreimaligen Inkubation in 100% Toluol für 20 min verdrängt, wodurch sich die Durchdringungsfähigkeit für das Paraffin erhöht. Das fixierte Gewebe wurde in

Einbettkassetten überführt und über zwei Tage in geschmolzenem Paraffin inkubiert. In dieser Zeit wurde das Paraffin dreimal gewechselt, um möglichst wenig Toluolrückstände in den Proben zu haben. Abschließend wurde das Gewebe in frischem Paraffin eingebettet, auf Eis ausgehärtet und bei RT gelagert. Die Anfertigung von Gewebeschnitten erfolgte an einem gekühlten Rotationsmikrotoms. Die Schnittdicke wurde auf 5 µm festgelegt.

Für die Fixierung von Gewebe, das für Gefrierschnitte bestimmt war, wurde Zinc-Formalin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) verwendet. Die Inkubationszeit richtete sich nach der Größe des entnommenen Gewebes. Gewebeproben <1 g wurden über Nacht bei 4°C auf dem Rollenmischer inkubiert, während größere Gewebeproben für 36-48 h inkubiert wurden. Nach drei 90-minütigen Waschschritten in PBS wurden die Proben anschließend in PBS-Saccharose überführt, über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag in Saccharose-Gelatine eingebettet. Das eingebettete Gewebe wurde für mindestens 24 h bei -80°C gelagert. Mit Hilfe eines Kryotoms wurden 10 µm dicke Serienschnitte auf Superfrost-Plus-Objektträgern angefertigt. Die Objektträger wurden 3 h bei RT getrocknet und abschließend bei -80°C gelagert.

3.2.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung dient in der Histologie der Differenzierung von verschiedenen Gewebestrukturen. Im Fettgewebe ermöglicht sie die Quantifizierung und morphologische Untersuchung der Adipozyten. Damit die Gewebeschnitte angefärbt werden können, wurden sie zunächst zweimal für 10 min in 100% Toluol entparaffinisiert, in einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 100%, 90%, 70 %, 50%) für jeweils 5 min rehydriert und 5 min in Leitungswasser inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellkerne mit dem Naturfarbstoff Hämatoxylin für 10 Sekunden. Um die typische blaue Kernfarbe zu erhalten und die Haltbarkeit der Färbung zu erhöhen, wurden die Paraffinschnitte intensiv mit Leitungswasser gespült (3 x 2 min) und 1 min in 0,1% Ammoniumhydroxid inkubiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation in lauwarmem Leitungswasser, erfolgte die Gegenfärbung der übrigen Strukturen mit Eosin G für 4 min. Überschüssiges Eosin wurde durch fünf kurze Waschschriffe in Leitungswasser entfernt. Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigender Ethanol-

/Toluol-Reihe (1 min in 80% Ethanol, 2 x 5 min in 100% Ethanol, 2 x 5 min in 100% Toluol) dehydriert und mit einem Einschlussmittel (ROTI®Histokitt, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt. Für die Quantifizierung der Adipozytengröße wurden Bilder in 20-facher Vergrößerung mit Hilfe der Software PanoramicView aufgenommen. Die Zählung und Flächenmessung der Adipozyten erfolgte mit der Software ImageJ.

3.2.7.3 Öl-Rot-Färbung

Die Quantifizierung sowie die morphologischen Analysen der Adipozyten in der Leber wurden mit Hilfe der Öl-Rot-O-Färbung an Gefrierschnitten durchgeführt. Für die Öl-Rot-O-Färbelösung wurden zunächst 500 mg Öl-Rot-O (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 100 ml Isopropanol gelöst. Die Lösung wurde gefiltert und in einem Verhältnis von 3:2 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Die Gefrierschnitte wurden 5 min bei RT gelagert, in Leitungswasser (1 x 5 min) gewaschen und 15 min in der Öl-Rot-O-Färbelösung inkubiert. Überschüssiges Färbemittel wurde anschließend durch Waschen mit Leitungswasser (3 x 5 min) und 50% Isopropanol entfernt. Abschließend wurden die gefärbten Gefrierschnitte mit Aquatex (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) abgedeckt.

3.2.8 Glukosetoleranztest

Um den Einfluss des Fehlens von $G\alpha_{i3}$ in den Adipoyten auf den *in vivo* Glukosestoffwechsel der Mäuse zu analysieren, wurden i.p. Glukosetoleranztests im Alter von 8 und 26 Wochen durchgeführt.

Nach einer 12-stündigen Fastenperiode, um für alle Tiere die gleiche Ausgangssituation zu schaffen, wurden die basalen Blutzuckerwerte mit einem Blutglukosemessgerät (Contour XT, Bayer Healthcare, Leverkusen) bestimmt. Anschließend wurden 2 mg pro Gramm Körpergewicht Glukose (Glucosteril 20%, Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe) i.p. appliziert. Der Blutzucker wurde nach 15, 30, 60 und 120 min gemessen. Für die nachträgliche Analyse der Plasmainsulinspiegel wurde zu jedem Messzeitpunkt Blut in heparinisierten Microvetten (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) gesammelt.

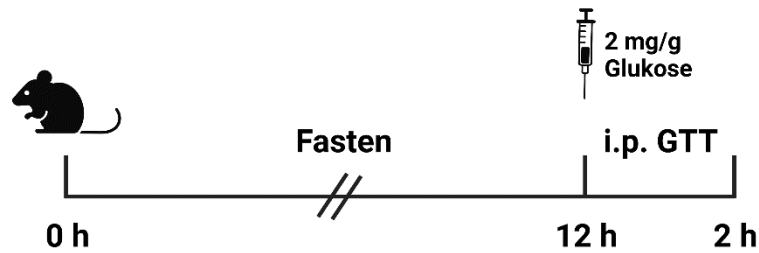


Abbildung 3.2: Schematischer Ablauf des i.p. Glukosetoleranztestes. Die Tiere wurden über Nacht nüchtern gesetzt. Nach Messung des basalen Blutzuckerwertes, wurde ihnen 2 mg pro g Körpergewicht Glukose i.p. appliziert. Anschließend wurden die Blutglukosewerte nach 15, 30, 60 und 120 min gemessen. h - Stunde; i.p. - intraperitoneal; GTT - Glukosetoleranztest; mg - Milligramm; g - Gramm. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Die Proben wurde nach der Abnahme mit 300 nM Aprotinin versetzt und auf Eis gelagert. Das Aprotinin dient als Proteaseinhibitor zum Schutz vor dem Abbau des Insulins durch zelluläre Enzyme. Nach der Durchführung des Glukosetoleranztestes wurden die Blutproben 10 min bei 4°C und 2000 rpm zentrifugiert. Das Plasma wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert. Die Durchführung des Glukosetoleranztestes geschah unter ständiger Mitarbeit von Dr. Veronika Leiss.

3.2.9 Insulin-ELISA

Die korrespondierenden Plasmainsulinspiegel wurden mit Hilfe eines ultrasensitiven Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) der Firma Merckodia AB (Uppsala, Schweden) bestimmt. Die Funktionsweise beruht auf der Bindung von zwei monoklonalen Antikörpern an unterschiedliche Epitope des Insulinmoleküls. Dabei ist der erste Antikörper (engl. coat antibody) fest an den Boden der mitgelieferten Mikrotiterplatte gebunden. Der zweite Antikörper ist mit einer Peroxidase, also einem Enzym, das die Reduktion von Peroxiden katalysiert, gekoppelt. Die Inkubation ermöglicht die Bindung des in der Plasmaprobe befindlichen Insulins an die beiden Antikörper. Durch anschließende Waschschrte werden ungebundene, enzymatisch aktive Antikörper entfernt. Durch Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wird dieses durch die Peroxidase reduziert, wodurch ein blaues Abbauprodukt entsteht. Die Zugabe von Schwefelsäure stoppt die Reaktion und sorgt für einen Farbumschlag nach gelb, der spektrophotometrisch ($\lambda = 450 \text{ nm}$) mit einem Mikrotiterplattenlesegerät (Promega GmbH, Walldorf, Deutschland) gemessen

werden kann. Die Durchführung erfolgte gemäß Protokoll des Herstellers. Anstatt der im Protokoll empfohlenen 25 µl Plasma wurden 10 µl verwendet. Die Analyse der Messwerte erfolgte mit Microsoft Excel.

3.2.10 Insulintoleranztest

Zur Analyse der peripheren Insulinsensitivität wurden i.p. Insulintoleranztests an 26-28 Wochen alten Mäusen durchgeführt.

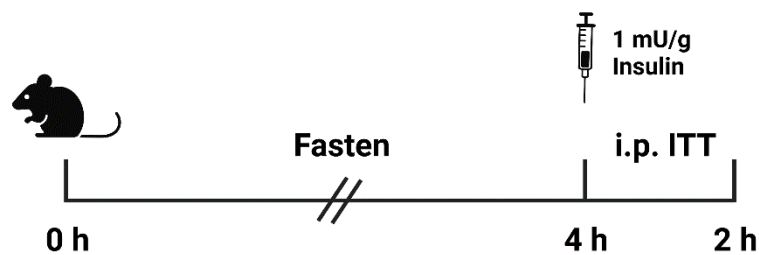


Abbildung 3.3: Schematischer Ablauf des i.p. Insulintoleranztestes. Nach einer vierstündigen Fastenperiode wurde der basale Blutzuckerwert gemessen, den Mäusen wurden 1 mU pro g Körpergewicht Insulin verabreicht und es wurden die Blutzuckerspiegel nach 15, 30, 60 und 120 min gemessen. h - Stunde; i.p. - intraperitoneal; ITT - Insulintoleranztest; mU - Milliunits; g - Gramm. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Nach einer vierstündigen Fastenperiode wurde der basale Blutglukosewert mit einem Blutglukosemessgerätes (Contour XT, Bayer Healthcare, Leverkusen, Deutschland) gemessen. Anschließend wurde den Mäusen i.p. 1 mU pro g Körpergewicht Insulin (Actrapid®, Novo Nordisk A/S, Dänemark) injiziert. Die Blutzuckermessungen erfolgten 15, 30, 60 und 120 min nach der Injektion. Die Injektion des Insulins wurde von Dr. Veronika Leiss durchgeführt.

3.2.11 Genexpression ausgewählter Adipozytokine

Eine mit Fettleibigkeit assoziierte Entzündung des Fettgewebes wird mittlerweile als ein Hauptgrund für eine reduzierte Insulinsensitivität im Rahmen eines Diabetes mellitus Typ 2 angesehen. Da das Ausmaß der inflammatorischen Aktivität entscheidend durch $G\alpha_i$ -Proteine beeinflusst wird, wurde die Genexpression beteiligter pro-inflammatorischer Mediatoren im weißen Fettgewebe mittels quantitativer PCR (qPCR) analysiert.

3.2.11.1 RNA-Extraktion aus dem Fettgewebe

Als Grundlage diente das single-step-Protokoll von Piotr Chomczynski und Nicoletta Sacchi, die ein Guanidiumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Gemisch verwendeten, um RNA aus Gewebe zu isolieren. Ihr Protokoll ermöglicht eine simultane RNA-Isolation mehrerer Proben innerhalb von vier h (Chomczynski & Sacchi, 1987). Das schockgefrorene Fettgewebe wurde in ein Guanidiumthiocyanat-Phenol-Gemisch (TRI Reagent®, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) überführt (1 ml auf 100 mg Gewebe) und mit Hilfe eines Dispergiergerätes (ULTRA-TURRAX®, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland) homogenisiert. Guanidiumthiocyanat wirkt stark denaturierend, wodurch RNAsen und andere Enzyme abgebaut werden. Das enthaltene Phenol führt zu einer Trennung der DNA und RNA von sonstigen Zellbestandteilen. Durch Zentrifugation (10 min bei 12000 rpm und 4°C) wurde ein Zwei-Phasen-Gemisch erzeugt. Die obere wässrige Phase, welche unter anderem die RNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die untere Phase mit den restlichen Zellbestandteilen wurde verworfen. Ein kurzes Erwärmen der Proben auf RT führte zu einer Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe. Nachdem den Proben 200 µl Chloroform hinzugefügt worden war, wurden diese gevortext und 15 min bei RT inkubiert. Eine anschließende Zentrifugation (15 min bei 12000 rpm und 4°C) sorgte für die Auftrennung in drei Phasen: eine rötliche Unterphase und eine Interphase, in denen DNA und zelluläre Proteine lokalisiert waren, sowie eine wässrige Oberphase, in der sich die RNA befand. Die Oberphasen wurden abgenommen, in neue Reaktionsgefäße überführt und mit 500 µl Isopropanol vermischt. Das Isopropanol führte zu einer Präzipitation der RNA. Eine zehnmünütige Inkubation bei RT und ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min bei 12000 rpm und 4°C) sorgten dafür, dass sich die präzipitierte RNA als Pellet am Rand der Reaktionsgefäße ablagerte. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit 75%-igem Ethanol, um Chloroformrückstände zu vermeiden und einer Zentrifugation für 4 min bei 7500 rpm und 4°C. Die Pellets wurden für 10 min unter dem Abzug getrocknet bevor sie abschließend in 30-50 µl Nuklease-freiem Wasser (abhängig von der Größe der Pellets) resuspendiert wurden. Durch eine

Inkubation für 10 min bei 55°C wurde ein vollständiges Lösen der Pellets in Nuklease-freiem Wasser erreicht.

3.2.11.2 Qualifizierung der extrahierten RNA

Die quantitativen und qualitativen Analysen der RNA-Proben wurden mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers (NanoDrop®, Implen GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Es beruht auf der Messung unterschiedlicher Absorptionsmaxima der verschiedenen Probenbestandteile. Das Absorptionsmaximum der zuvor isolierten RNA lag bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm (A_{260}) auf. Proteine und weitere Störsubstanzen zeigen ihre Maxima bei $\lambda = 280$ nm (A_{280}) bzw. $\lambda = 230$ nm (A_{230}). Aus dem Absorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} lässt sich somit ein Wert für die Reinheit der Proben errechnen. Bei Werten von 1,8-2,1 kann von einer guten Reinheit ausgegangen werden, was die Verwendung der Proben für weiterführende Analysen erlaubt. Da keine signifikante Korrelation zwischen dem Absorptionsverhältnis von A_{260}/A_{230} und der Effizienz der qPCR festgestellt werden konnte und es keine generell akzeptierte Grenze gibt, wurde dieser Wert außer Acht gelassen (Kuang *et al.*, 2018).

3.2.11.3 Transkription in cDNA

Da es sich bei RNA um sehr empfindliche Zellkomponenten handelt, erfolgte zunächst die Transkription in die stabilere komplementäre DNA (engl. complementary DNA, cDNA). Hierfür wurde das High capacity cDNA Reverse Transcription Kit der Firma Applied Biosystems (Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Nach dem Auftauen der Proben auf Eis wurde ein Master Mix nach Herstellerangaben angesetzt:

Reagenz	Volumen [μ l]
10x RT Buffer	2,0
25x RT dNTP Mix (100 mM)	0,8
10x RT Random Primer	2,0
MultiScribe Reverse Transcriptase	1,0
RNase Inhibitor	1,0
Nuklease-freies Wasser	3,2
Volumen gesamt	10

Bei der reversen Transkriptase handelt es sich um ein Enzym, das die Transkription von RNA in DNA katalysiert. Die enthaltenen RNase-Inhibitoren verhindern den Abbau der RNA durch physiologisch vorkommende Ribonukleasen (RNasen). Der Mastermix wurde in ein PCR-Gefäß überführt, auf Eis gelagert und mit 10 µl der RNA-Probe (c = 200 ng/µl) vermischt. Dabei entstandene Luftblasen wurden durch einen kurzen Zentrifugationsschritt eliminiert. Anschließend wurden folgende Zyklen in einem Thermocycler (C1000 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA) durchlaufen:

Vorgang	Temperatur [°C]	Dauer [min]
Annealing	25	10
Reverse Transkription	37	120
Finale Extension	85	5
Ende	4	∞

Der erste Inkubationsschritt dient der Anlagerung der im Mastermix enthaltenen Zufallsprimer an die RNA-Templates. Eine anschließende Erhöhung der Temperatur auf 37°C führt zu einer Aktivierung der Reversen Transkriptasen und zum Start der cDNA-Synthese. Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 85°C führt zu einer Inaktivierung der Reversen Transkriptasen und somit zu einem Abschluss der cDNA-Synthese. Die Proben wurden auf 4°C heruntergekühlt und in einem Verhältnis von 1:10 mit ddH₂O verdünnt. Die Lagerung der verdünnten Proben erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

3.2.11.4 Quantifizierung der cDNA mittels qPCR

Eine Quantifizierung der Genexpression ausgewählter Entzündungsparameter im Fettgewebe erfolgte mit Hilfe der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). Das Prinzip dieser Methode wurde bereits in Kapitel 3.2.5.2 erläutert. Zusätzlich zu der Vervielfältigung der Nukleinsäuren ist eine Quantifizierung durch Fluoreszenzmessungen möglich. Zunächst wurde ein Master Mix nach Herstellerangaben (AMPLIFYME Probe Universal Mix, BLIRT S.A., Polen) angesetzt:

Reagenz	Volumen [μ l]	Endkonzentration
2x AMPLIFYME Probe Mix	5	1x
Forward Primer (10 μ M)	0,3	0,3 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	0,3	0,3 μ M
Nuklease-freies Wasser	1,9	
Probe	2,5	
Volumen gesamt	10	

Jeweils 10 μ l des Master Mixes wurden in eine Mikrotiterplatte überführt. Folgende Zyklen wurde im Light Cycler 480 (Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) durchlaufen:

Vorgang	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer [sek]	Wiederholung
Prä-Inkubation	95		
Denaturierung	95	10	45
Annealing	60	10	
Elongation	70	10	
Ende	40	∞	

Der Master Mix enthielt neben Pufferkomponenten und den benötigten Desoxynukleosid-Triphosphaten, eine in dem Bakterium *Escherichia coli* überexprimierte Taq-Polymerase und einen spezifischen monoklonalen anti-Taq-Antikörper. Die Bindung dieses Antikörpers an die Taq-Polymerase erfolgte bei niedrigen Temperaturen, wodurch eine Verlängerung von unspezifisch gebundenen Primern außerhalb der Elongationsphase verhindert werden konnte. Des Weiteren enthielt der Mix den fluoreszierenden Farbstoff SYBR Green, der mit der synthetisierten dsDNA interkaliert. Das entstandene Fluoreszenzsignal verhielt sich bei einer Wellenlänge von $\lambda = 520$ nm proportional zu der vorliegenden Menge dsDNA. Für die nachfolgenden Quantifizierungen wurde zusätzlich die Expression spezieller Referenzgene gemessen. Da es sich bei den Proben um Fettgewebe handelte, wurden β -Aktin und das TATA-Bindeprotein als Referenzgene festgelegt (Almeida-Oliveira *et al.*, 2017).

3.2.12 cAMP-Assay

Zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Spiegel in den unterschiedlichen Fettgewebsdepots wurde das Gewebe in ca. 80 mg große Stücke geschnitten

und in eine 24-well-Platte überführt, in der 600 µl Inkubationsmedium (DMEM, 2% BSA, 1mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)) vorgelegt waren. Die Hälfte der Ansätze wurde anschließend mit 10 µM Isoproterenol (Abcam plc., Cambridge, UK), einem unselektiven β -Adrenozeptor-Agonisten, behandelt, um so die Lipolyse zu stimulieren. Alle Proben wurden für 15 min bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Gewebestücke in neue Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Nutzung bei -80°C gelagert. Zum Aufschluss der Proben wurde das Gewebe in 0.1 M Salzsäure (Verhältnis 1:5) homogenisiert und der pH mit 1 M Natronlauge neutralisiert. Die Quantifizierung der cAMP-Konzentrationen wurde mit einem spezifischen Enzymimmunoassay (EIA) des Herstellers R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA) durchgeführt. Der Assay basiert auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung. Die Streptavidin-beschichtete Platte wird dabei mit einem biotinylierten monoklonalen Antikörper inkubiert, der spezifisch gegen cAMP gerichtet ist. Anschließend wurde durch einen Waschschrift überschüssiger monoklonaler Antikörper entfernt. Das in der Probe vorhandene cAMP konkurriert mit einer definierten Menge an Meerrettichperoxidase (HRP)-markiertem cAMP um die Bindungsstellen auf dem monoklonalen Antikörper. Es folgte ein erneutes Waschen, um überschüssiges Konjugat und ungebundene Probe zu entfernen. Die Bestimmung der gebundene Enzymaktivität erfolgte über eine Substratlösung, wobei die Extinktion nach Zugabe einer Stopplösung bei 450 nm gemessen wurde. Die Extinktion ist umgekehrt proportional zur Konzentration des cAMPs in der Probe.

3.2.13 Triglycerid-Assay

Die Bestimmung der Triglycerid-Spiegel in den Fettgewebsdepots und der Leber wurde mit Hilfe eines kolorimetrischen Triglycerid-Kits (Abcam plc., Cambridge, UK) durchgeführt. Dieser Assay beruht auf der Spaltung der Triglyceride in freie Fettsäuren und Glycerin durch Lipasen. Das anschließend oxidierte Glycerin kann kolorimetrisch ($\lambda = 570$ nm) bestimmt werden. Die zuvor abgewogenen Proben wurden in 1 ml einer 5%-igen ddH₂O/NP-40-Lösung homogenisiert, dreimal auf 85°C erhitzt und anschließend gemäß den Herstellerangaben analysiert.

3.2.14 Glycerin-Assay

Zur Quantifizierung der Lipolyseaktivität der einzelnen Fettgewebe wurde der Glyceringehalt basal und nach 10 μM Isoproterenol-Stimulation gemessen. Das Gewebe wurde nach der Präparation in kleine Stücke geschnitten, gewogen, in ein Inkubationsmedium (DMEM, 2% BSA) überführt, auf Eis gelagert und in weiter zerkleinert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank. Nach der Inkubation wurden jeweils 100 μl der flüssigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

Für die Bestimmung des Glyceringehaltes in den einzelnen Proben wurde ein Glycerol Assay Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben. Der Assay beruht auf einer gekoppelten Enzymreaktion der Glycerinkinase und der Glycerin-3-Phosphat-Oxidase, bei der ein kolorimetrisch detektierbares Produkt entsteht, dessen Intensität proportional zum Glyceringehalt ist.

3.2.15 Sauerstoffverbrauch

Das Fettgewebe spielt durch seine vielfältigen Funktionen sowohl auf Organ- als auch auf Systemebene eine zentrale Rolle bei der Regulierung des Energiestoffwechsels (Luo & Liu, 2016). Als indirekter Indikator für den zellulären Stoffwechsel und die Funktion der Mitochondrien wird häufig der Sauerstoffverbrauch herangezogen (Divakaruni & Jastroch, 2022). Unter Verwendung spezieller Stoffwechselkammern (Phenomaster-System, TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland), die mit O_2 -Gassensoren ausgestattet waren, wurde der individuelle Gesamtsauerstoffverbrauch über 24 h gemessen. Die Mäuse durften sich vor den Messungen 24 h lang an die Stoffwechselkammern gewöhnen. Die Messungen wurden durch Dr. Thorsten Gnad am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (Deutschland) durchgeführt.

3.2.16 Statistische Auswertung

Alle Daten sind als Mittelwerte einzelner Messungen inklusive des Standardfehlers (\pm SEM) dargestellt. Die Auswertungen wurden mit Hilfe der

Statistiksoftware GraphPad Prism (San Diego, USA) durchgeführt. Für den Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben wurde ein zweiseitiger Student's t-Test angewandt. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, wurde eine einfache Varianzanalyse (engl. one-way analysis of variance) mit einem post-Bonferroni-Test durchgeführt. Für alle Tests wurden die Signifikanzniveaus wie folgt festgelegt: $p < 0.05$ = signifikant (*), $p < 0.01$ = sehr signifikant (**) und $p < 0.001$ = extrem signifikant (***) .

4 Ergebnisse

4.1 Verifizierung der Adipozyten-spezifischen *Gnai3*-Deletion auf Genomebene

Durch die Verpaarung transgener Mäuse (Genotyp: *Gnai3^{fl/fl}*; *Adipoq*-CreER^{T2/+tg}) mit homozygot geflochtenen *Gnai3*-Mäusen (Genotyp: *Gnai3^{fl/fl}*) konnten die gewünschten Genotypen generiert werden. Beide Genotypen waren lebensfähig und fertil und wurden entsprechend den Regeln nach Mendel geboren. In einem Alter von 6 Wochen wurde die Rekombination durch die i.p. Injektion von 1 mg Tamoxifen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen induziert. Um die Adipozyten-spezifische *Gnai3*-Deletion zu verifizieren, wurden am Ende der Studie unterschiedliche Gewebe der *Gnai3^{ako}*- und ctrl-Tiere entnommen, die genomische DNA isoliert und mittels PCR hinsichtlich der *Gnai3*-Expression analysiert.

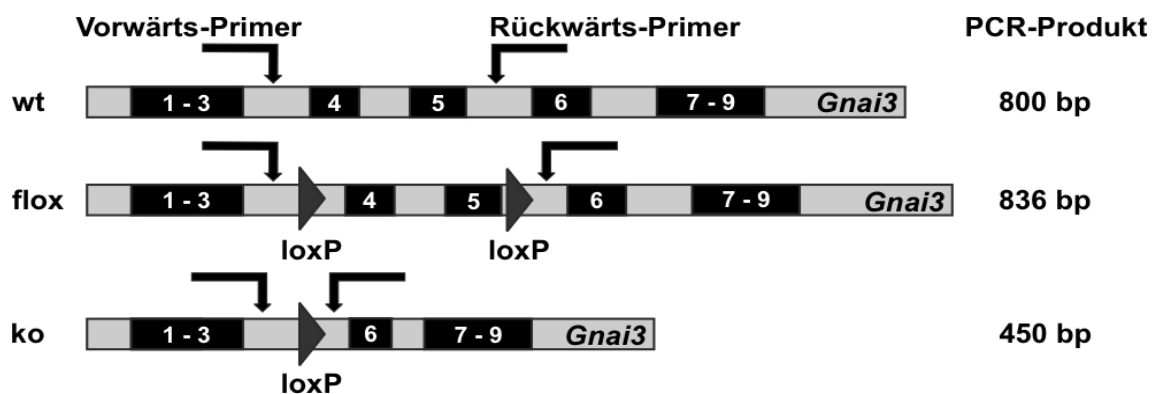


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des *Gnai3*-Gens und der Primerstrategie zur Detektion des Knockout-Allels. Durch Insertion der loxP-Sequenzen in die Introns 3-4 und 5-6 verlängerte sich das Ausgangsprodukt (wt) um 36 bp. Bei erfolgreicher Deletion verkürzt sich das PCR-Produkt auf 450 bp. wt - Wildtyp-Allel; flox - gefloxtes Allel; ko - Knockout-Allel; loxP - Locus of x-over P1; PCR - Polymerasekettenreaktion; bp - Basenpaare

Durch die festgelegten Bindungsstellen der verwendeten Primer entsteht bei einem *Gnai3*-Wildtypallel (wt) ein PCR-Produkt mit einer Länge von 800 bp. Durch Einbringen der palindromischen loxP-Sequenzen vor und hinter die Primerbindungsstellen verlängert sich das Genprodukt für geflochte *Gnai3*-Allele (flox) auf 836 bp. Bei erfolgreicher Liganden-induzierten Rekombination wird der geflochte *Gnai3*-Genabschnitt exzidiert (ko), wodurch sich das PCR-Produkt auf 450 bp verkürzt (Abb. 4.1). Die exemplarischen Ergebnisse der

kapillarelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte einer *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Maus sind nachfolgend dargestellt (Abb. 4.2).

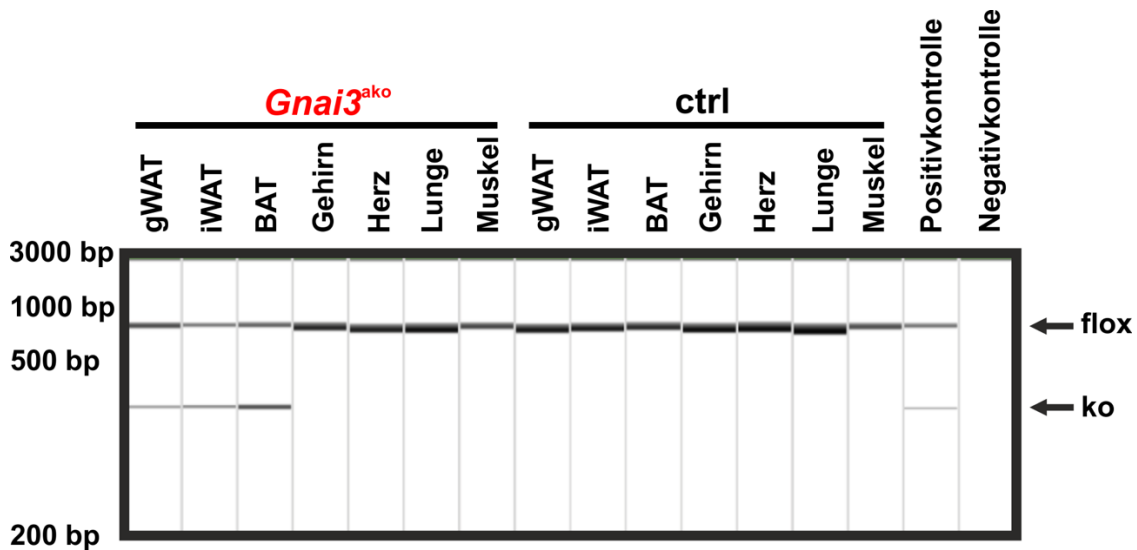


Abbildung 4.2: *Gnai3*-Expressionsanalyse an unterschiedlichen Gewebeproben einer *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Maus. Repräsentative Analyseergebnisse nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte unterschiedlicher Gewebeproben einer *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Maus. Als Positivkontrolle diente das Gewebe einer bereits genotypisierten Maus derselben Zelllinie (*Gnai3*^{ako}). Als Negativkontrolle wurde H₂O verwendet. Die Knockout-Bande (450 bp) ließ sich ausschließlich in den Fettgeweben (gWAT, iWAT, BAT) des *Gnai3*^{ako}-Tieres nachweisen, während in den restlichen Gewebeproben des *Gnai3*^{ako}-Tieres und den gesamten Gewebeproben des ctrl-Tieres nur die gefloxtete Bande nachgewiesen werden konnte. Analysiert wurden die Gewebeproben von jeweils 8 *Gnai3*^{ako} und ctrl-Tieren. gWAT - gonadales weißes Fettgewebe; iWAT - inguinales weißes Fettgewebe; BAT - braunes Fettgewebe; bp - Basenpaare; flox - gefloxtes PCR-Produkt; ko - Knockout PCR-Produkt

Zu den analysierten Geweben zählten gWAT, iWAT, BAT, Gehirn, Herz, Lunge und Skelettmuskulatur. In den drei Fettgeweben gWAT, iWAT und BAT des *Gnai3*^{ako}-Tieres ließen sich zwei unterschiedliche PCR-Produkte nachweisen. Einerseits das gefloxtete *Gnai3*-Allel mit einer Länge von 836 bp, andererseits das deletierte *Gnai3*-Allel mit einer Länge von 450 bp. In den übrigen Geweben des *Gnai3*^{ako}-Tieres (Gehirn, Herz, Lunge, Muskel) konnte ausschließlich das gefloxtete *Gnai3*-Allel nachgewiesen werden. Alle Gewebeproben des ctrl-Tieres exprimierten ausschließlich gefloxtete *Gnai3*-Allele (836 bp).

4.2 Expression der inhibitorischen G-Proteinuntereinheiten G α_{i1-3} im Fettgewebe

Bei den inhibitorischen G-Proteinen (G α_{i1} , G α_{i2} und G α_{i3}) handelt es sich um ubiquitär exprimierte Isoformen. Die einzelnen Isoformen übernehmen im Fettgewebe einerseits überlappende, andererseits Isoform-spezifische Funktionen. Die starken strukturellen Ähnlichkeiten und teils überlappenden

Funktionen lassen vermuten, dass die Deletion einer Isoform zu einer kompensatorischen Hochregulation von Mitgliedern derselben Subfamilie führen könnte. Aus diesem Grund wurde neben der $G\alpha_{i3}$ -Expression auch die Expression der $G\alpha_{i1}$ - und $G\alpha_{i2}$ -Proteine analysiert.

4.2.1 Expressionsanalysen von $G\alpha_{i3}$

Primär wurde die Expression der im Fokus stehenden $G\alpha_{i3}$ -Isoform in den unterschiedlichen Fettgeweben der *Gnai3^{ako}*- und ctrl-Tiere mittels Immunoblotanalysen untersucht. Durch Verwendung von $G\alpha_{i3}$ -spezifischen Antikörpern war es möglich, den Knockout zu visualisieren und anschließend durch die Software Image Lab semiquantitativ auszuwerten (Abb. 4.3).

Der erfolgreiche Knockout im Fettgewebe der *Gnai3^{ako}*-Tiere wird durch die geringere Signalintensität der $G\alpha_{i3}$ -Bande im Vergleich zur Bande der ctrl-Tiere deutlich (Abb. 4.3 A/C/E). Das verbleibende $G\alpha_{i3}$ -Signal im Fettgewebe der *Gnai3^{ako}*-Tiere resultiert vermutlich aus der $G\alpha_{i3}$ -Expression anderer, im Fettgewebe vorkommender Zellen wie beispielsweise Fibroblasten/Fibrozyten, Nervenzellen, Stroma-Gefäßzellen und Immunzellen. Unterhalb der $G\alpha_{i3}$ -Bande lässt sich eine zweite Bande detektieren. Da sich diese Bande nicht im Leber-Lysat der globalen *Gnai2*-defizienten Mäusen (*Gnai2^{-/-}*) wiederfinden lässt, handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine Kreuzreaktivität des Anti- $G\alpha_{i3}$ -Antikörpers gegenüber dem strukturähnlichen $G\alpha_{i2}$ -Protein. Die Semiquantifizierung der Immunoblots brachte eine durchschnittliche Reduktion der $G\alpha_{i3}$ -Expression in den gWAT-Lysaten um 41% (ctrl 1,00 ± 0,08; *Gnai3^{ako}* 0,59 ± 0,08), in den iWAT-Lysaten um 43% (ctrl 1,00 ± 0,13; *Gnai3^{ako}* 0,57 ± 0,12) und in den BAT-Lysaten um 53% (ctrl 1,00 ± 0,46; *Gnai3^{ako}* 0,47 ± 0,29). Die Tamoxifen-induzierte Deletion führte somit auch auf Proteinebene zu einer signifikanten Reduktion der $G\alpha_{i3}$ -Expression im Fettgewebe der *Gnai3^{ako}*-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren.

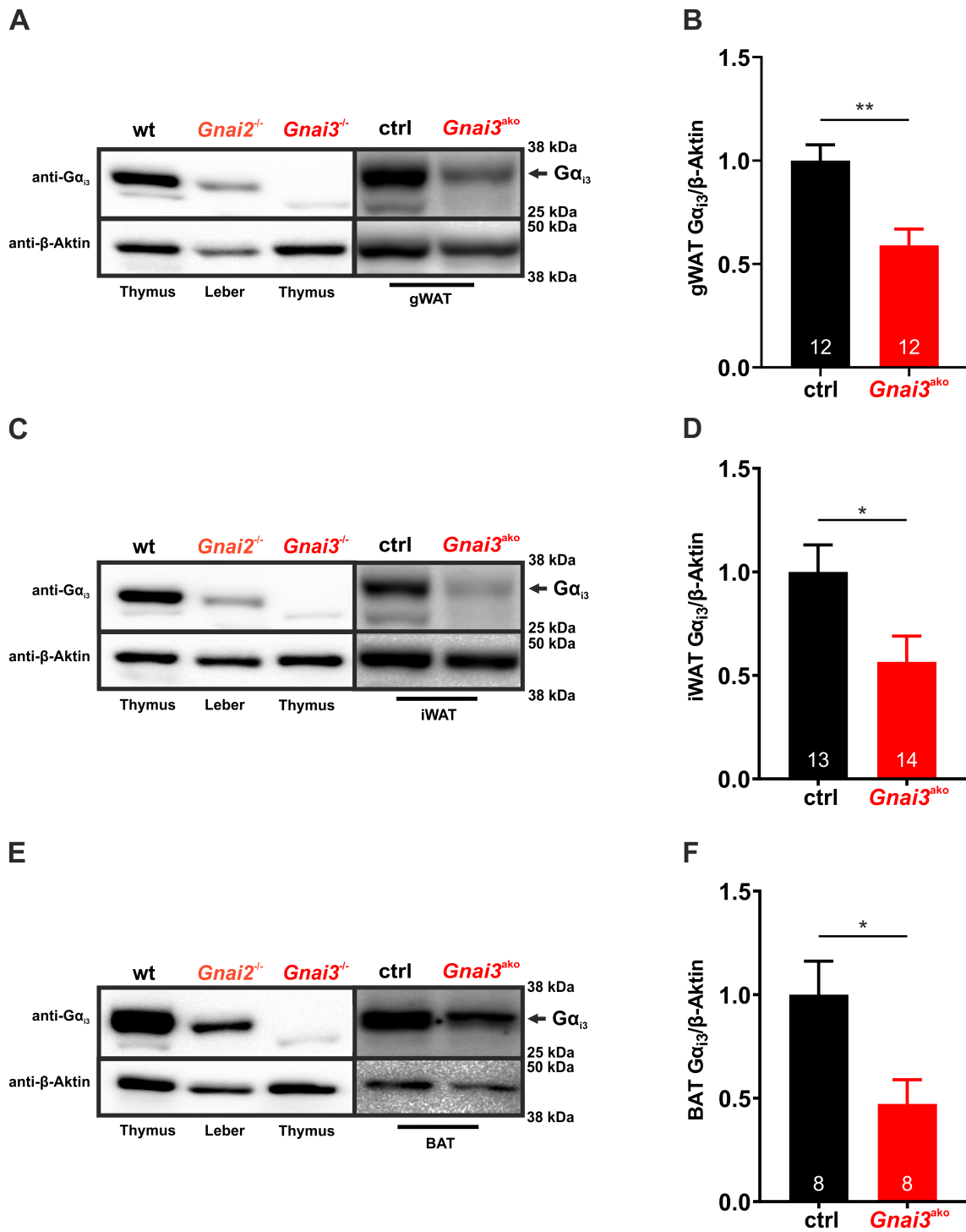


Abbildung 4.3: $G\alpha_{13}$ -Expression im WAT und BAT von *Gnai3^{ako}*- und ctrl-Tieren. (A/C/E) Repräsentative Immunoblots der $G\alpha_{13}$ -Expression im gWAT (A), iWAT (C) und BAT (E) von *Gnai3^{ako}*- und ctrl-Tieren. Die Überprüfung der Ladungsmenge erfolgte mit β -Aktin. Zur Veranschaulichung der Antikörperspezifität wurden Organlysate aus Wildtyp- (wt), globalen *Gnai2*- (*Gnai2^{-/-}*) und globalen *Gnai3*-defizienten Mäusen (*Gnai3^{-/-}*) geladen. (B/D/F) Semiquantifizierung der $G\alpha_{13}$ -Expression im gWAT- (B), iWAT- (D) und BAT-Lysat (F) von *Gnai3^{ako}*- und ctrl-Tieren. Die Anzahl der analysierten Gewebeprobe ist in den Balken dargestellt. Die $G\alpha_{13}$ -Expression der *Gnai3*-defizienten Mäuse wurde auf den Mittelwert der ctrl-Mäuse normalisiert. Sowohl visuell als auch semiquantitativ konnte eine signifikante Reduktion der $G\alpha_{13}$ -Expression im Fettgewebe der *Gnai3^{ako}*-Tiere nachgewiesen werden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus den Fettgewebslysaten 28-Wochen-alter *Gnai3^{ako}*- und ctrl-Tiere.

4.2.2 Expressionsanalysen von $G\alpha_{i1}$ und $G\alpha_{i2}$

Zum Ausschluss einer Hochregulation von $G\alpha_{i1}$ und $G\alpha_{i2}$ zur möglichen Kompensation des fehlenden $G\alpha_{i3}$ -Proteins, wurden die Immunoblots im Anschluss an die $G\alpha_{i3}$ -Expressionsanalysen hinsichtlich der $G\alpha_{i1}$ - und $G\alpha_{i2}$ -Expression analysiert. Durch Verwendung von $G\alpha_{i1/i2}$ -spezifischen Antikörpern war es möglich, die Proteinlevel zu quantifizieren.

Wie erwartet ließen sich in den gWAT-Lysaten der globalen Knockout-Mäuse (globale *Gnai1*-defiziente Maus \triangleq *Gnai1*^{-/-}, globale *Gnai2*-defiziente Maus \triangleq *Gnai2*^{-/-}) die deletierten Proteine nicht mehr detektieren. In den untersuchten Fettgewebslysaten (gWAT, iWAT, BAT) der *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Tiere waren sowohl $G\alpha_{i1}$ als auch $G\alpha_{i2}$ nachweisbar. Visuell ließen sich keine Unterschiede in den Signalintensitäten zwischen den beiden Genotypen erkennen.

Auch semiquantitativ konnten keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression von $G\alpha_{i1}$ (gWAT: ctrl $1,00 \pm 0,19$; *Gnai3*^{ako} $1,17 \pm 0,26$ / iWAT: ctrl $1,00 \pm 0,31$; *Gnai3*^{ako} $0,75 \pm 0,17$ / BAT: ctrl $1,00 \pm 0,27$; *Gnai3*^{ako} $1,12 \pm 0,23$) und $G\alpha_{i2}$ (gWAT: ctrl $1,00 \pm 0,23$; *Gnai3*^{ako} $1,11 \pm 0,35$ / iWAT: ctrl $1,00 \pm 0,32$; *Gnai3*^{ako} $0,91 \pm 0,37$ / BAT: ctrl $1,00 \pm 0,05$; *Gnai3*^{ako} $1,09 \pm 0,22$) festgestellt werden.

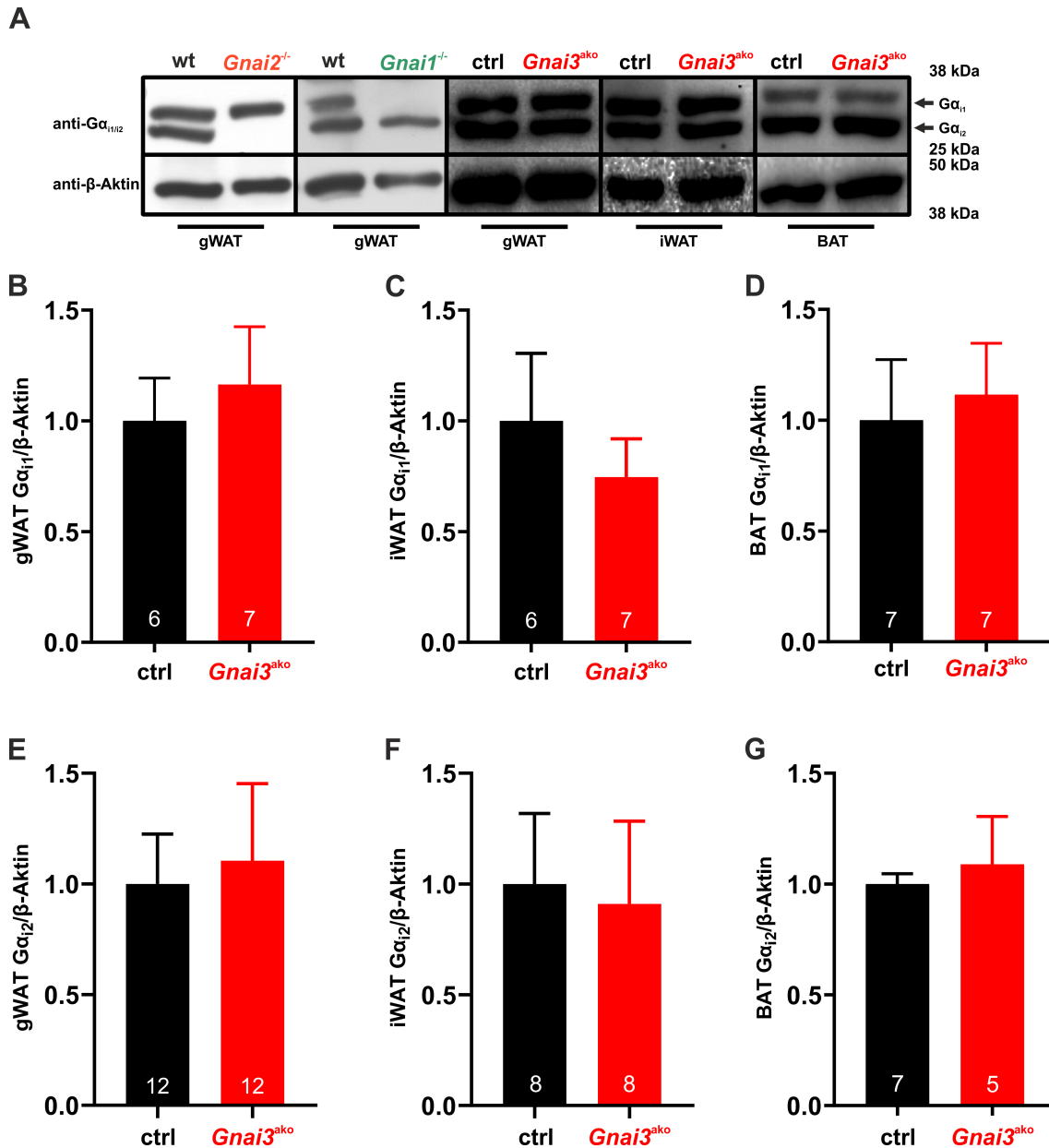


Abbildung 4.4: Expressionsanalysen von $G\alpha_{11}$ und $G\alpha_{12}$ im Fettgewebe von $Gnai3^{ako}$ - und ctrl-Tieren. (A) Repräsentative Immunoblots der $G\alpha_{11}$ - und $G\alpha_{12}$ -Expression im gWAT, iWAT und BAT von $Gnai3^{ako}$ - und ctrl-Tieren nach Inkubation mit $G\alpha_{11/12}$ -spezifischen Antikörpern. Die Überprüfung der Ladungsmenge erfolgte mit β -Aktin. Zur Veranschaulichung der Antikörperspezifität wurden Fettgewebslysate aus globalen $Gnai1$ - ($Gnai1^{-/-}$) bzw. $Gnai2$ -defizienten Mäusen ($Gnai2^{-/-}$) geladen. (B-G) Semiquantifizierung der $G\alpha_{11}$ und $G\alpha_{12}$ -Expression im gWAT (B/E), iWAT (C/F) und BAT-Lysat (D/G) von $Gnai3^{ako}$ - und ctrl-Tieren. Die Anzahl der analysierten Gewebeprobe ist in den Balken dargestellt. Die $G\alpha_{11/12}$ -Expression der $Gnai3$ -defizienten Mäuse wurde auf den Mittelwert der ctrl-Mäuse normalisiert. Sowohl visuell als auch semiquantitativ ließen sich keine Unterschiede in der $G\alpha_{11}$ - und $G\alpha_{12}$ -Expression zwischen $Gnai3^{ako}$ - und ctrl-Tieren feststellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus Fettgewebslysaten 28-Wochen-alter $Gnai3^{ako}$ - und ctrl-Tiere.

4.3 Gewichtszunahme der $Gnai3^{ako}$ - und ctrl-Tiere

Wie bereits in der Einleitung beschrieben wird die Gewichtszunahme entscheidend durch inhibitorische G-Proteine beeinflusst. So führt die Adipozyten-spezifische Deletion von $G\alpha_{12}$ zu einer abgeschwächten Entwicklung

einer Diät-induzierten Fettleibigkeit. Auf Grundlage dieser Daten sollte der Einfluss einer Adipozyten-spezifischen *Gnai3*-Deletion auf die Gewichtszunahme untersucht werden. Hierzu wurden wöchentliche Gewichtskontrollen über einen Zeitraum von 22 Wochen durchgeführt (Abb. 4.5).

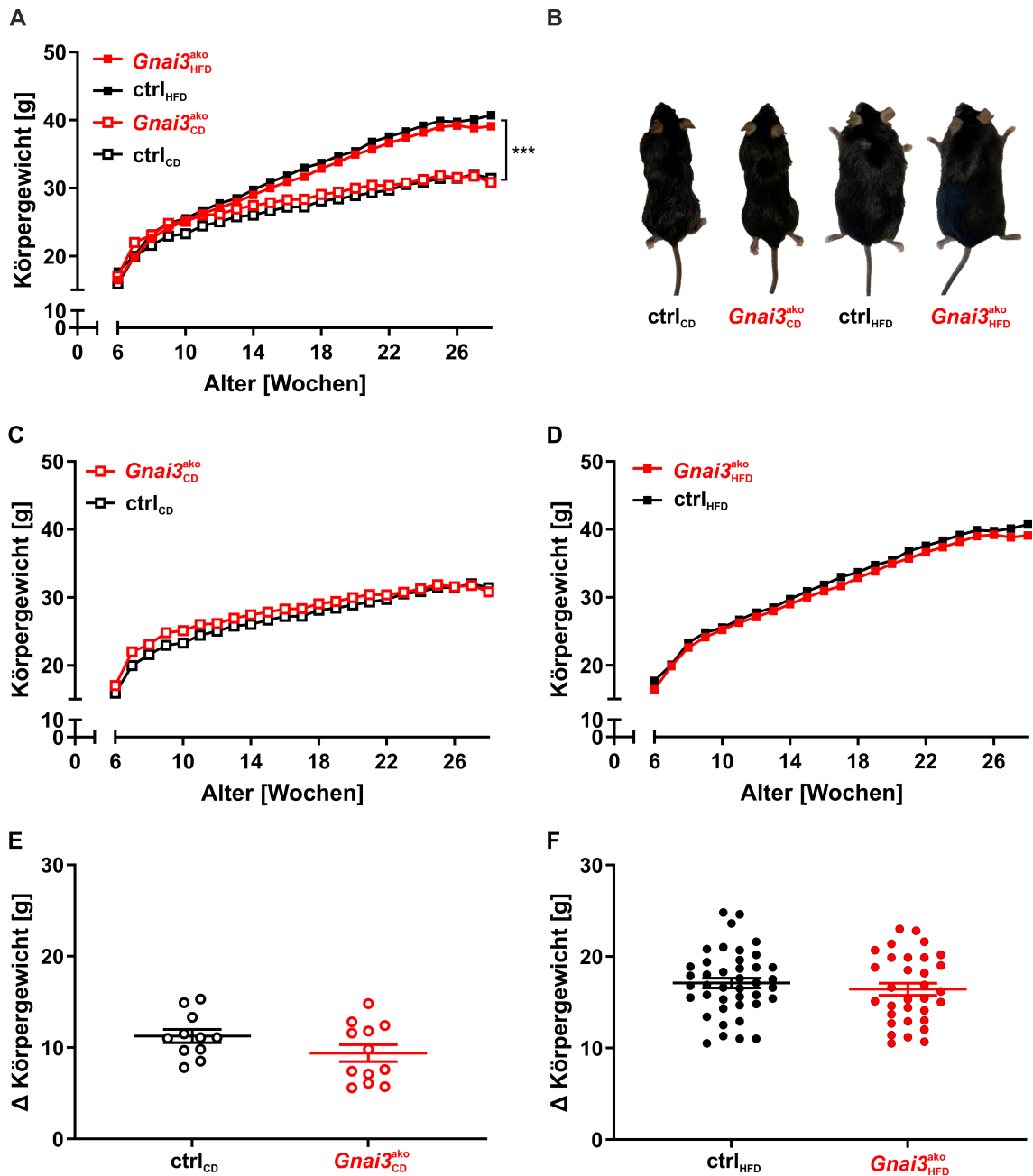


Abbildung 4.5: Gewichtsentwicklung von *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Tieren unter CD und HFD. (A/C-D) Gewichtsentwicklung von ctrl_{CD}- (n = 11), *Gnai3*^{ako}_{CD}- (n = 11), ctrl_{HFD}- (n = 36) und *Gnai3*^{ako}_{HFD}-Tieren (n = 26) über einen Zeitraum von 22 Wochen. Die Gewichtszunahme der CD-Tiere ist signifikant geringer als die der HFD-Tiere. Es sind keine Unterschiede in der Gewichtsentwicklung zwischen *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Tieren erkennbar. (B) Repräsentative Bilder von *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Tieren nach 22 Wochen Spezialdiät. (E-F) Differenz (Δ Körpergewicht) zwischen dem Anfangskörpergewicht (Woche 6) und dem Endkörpergewicht (Woche 26) in *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Tieren. Die durchschnittliche Gewichtsänderung der *Gnai3*^{ako}-Tiere lag leicht unter der Gewichtsänderung der ctrl-Tiere. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

Die erste Gewichtskontrolle erfolgte in einem Alter von 6 Wochen vor dem Start der jeweiligen Spezialdiät. Zu diesem Zeitpunkt konnten - unabhängig von der jeweiligen Diät - keine Gewichtsunterschiede zwischen *Gnai3^{ako}*- und ctrl-Tieren festgestellt werden. Die ersten signifikanten Gewichtsunterschiede zwischen CD- und HFD-Tieren konnten in einem Alter von 12 Wochen zwischen ctrl_{CD}- und ctrl_{HFD}-Tieren verzeichnet werden. In den nachfolgenden Wochen verstärkten sich die Unterschiede zwischen den beiden Spezialdiäten zunehmend. Nach 22 Wochen lag das Körpergewicht (KG) der *Gnai3^{ako}*_{HFD}- (41,15 ± 0,67 g) und ctrl_{HFD}-Tiere (42,43 ± 0,71 g) durchschnittlich 32% (10,04 g) über dem der *Gnai3^{ako}*_{CD}- (31,39 ± 0,82 g) und ctrl_{CD}-Tiere (32,11 ± 0,8460 g). Zwischen den *Gnai3^{ako}*- und ctrl-Tieren konnten keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtszunahme beobachtet werden. Auch die Analyse der Gewichtsunterschiede ($\Delta \text{KG} = \text{KG}_{28\text{Wochen}} - \text{KG}_{6\text{Wochen}}$) brachte nur geringfügige Unterschiede zwischen den Knockout- und Kontrolltieren. Die durchschnittliche Gewichtsunterschiede der *Gnai3^{ako}*_{CD}- (9,39 ± 0,92 g) und *Gnai3^{ako}*_{HFD}-Tiere (16,4 ± 0,66 g) lag leicht unter der durchschnittlichen Gewichtszunahme der ctrl_{CD}- (11,3 ± 0,73 g) und ctrl_{HFD}-Tiere (17,1 ± 0,55 g).

4.4 Fettmassen der *Gnai3^{ako}*- und ctrl-Tiere

Präadipositas und Adipositas resultieren in den meisten Fällen aus einem Ungleichgewicht zwischen Energiezufuhr und Energieverbrauch. Für die Speicherung dieses Energieüberschusses ist vor allem das Fettgewebe verantwortlich. Um den Einfluss von $G\alpha_{i3}$ auf die Fettspeicherung aufzudecken, wurden am Ende der Studie verschiedenen Fettdepots (gWAT, iWAT, BAT) entnommen und hinsichtlich ihrer Masse analysiert. Die Darstellung der einzelnen Fettdepotmassen erfolgt als Anteil am Gesamtkörpergewicht (Abb. 4.6).

Die HFD führte in den *Gnai3^{ako}*- und ctrl-Tieren zu einer signifikanten Zunahme der gWAT-, iWAT- und BAT-Massen. Der Anteil am Gesamtkörpergewicht erhöhte sich im gWAT von 2,92% (CD) auf 4,15% (HFD), im iWAT von 2,53% (CD) auf 5,41% (HFD) und im BAT von durchschnittlich 0,47% (CD) auf 0,78% (HFD).

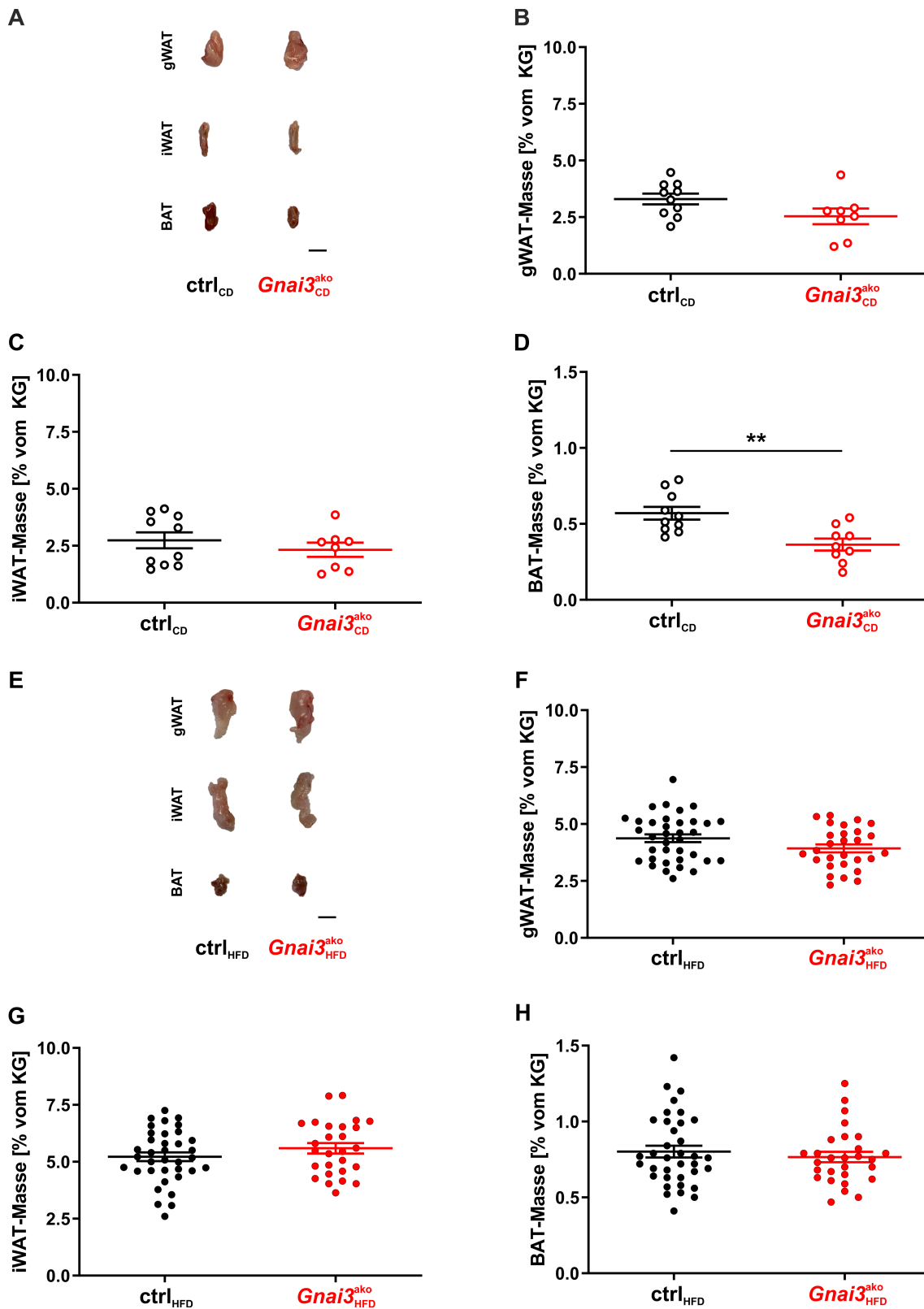


Abbildung 4.6: Fettdepotmassen von *Gnai3*^{ako} und ctrl-Tieren. (A/E) Repräsentative Bilder ausgewählter gWAT-, iWAT und BAT-Fettdepotmassen aus *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Tiere. Maßstabsbalken = 1 cm. (B-D/F-H) Prozentualer Anteil der gWAT-, iWAT- und BAT-Fettdepotmassen am Gesamtkörpergewicht. Durch die HFD kam es zu einer Zunahme der gWAT, iWAT- und BAT-Massen beider Genotypen. *Gnai3*^{ako}_{CD}-Tiere zeigten im Vergleich zu ihren Geschwisterkontrollen (ctrl_{CD}) leicht reduzierte WAT-Massen sowie signifikant reduzierte BAT-Massen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

Keine signifikanten Unterschiede ließen sich beim Vergleich der gWAT- (ctrl_{HFD} $4,37 \pm 0,17\%$; $Gnai3^{\text{ako}}_{\text{HFD}}$ $3,93 \pm 0,17\%$), iWAT- (ctrl_{HFD} $5,22 \pm 0,19\%$; $Gnai3^{\text{ako}}_{\text{HFD}}$ $5,59 \pm 0,23\%$) und BAT-Massen (ctrl_{HFD} $0,80 \pm 0,04\%$; $Gnai3^{\text{ako}}_{\text{HFD}}$ $0,77 \pm 0,04\%$) der HFD-Tiere finden. Die *Gnai3*-Deletion bewirkte in $Gnai3^{\text{ako}}_{\text{CD}}$ -Tieren im Vergleich zu den ctrl_{CD} -Tieren eine tendenzielle Abnahme der WAT-Masse sowie eine signifikante Abnahme der BAT-Masse. Der Anteil der gWAT-Masse am Gesamtkörpergewicht reduzierte sich von durchschnittlich $3,30 \pm 0,24\%$ in ctrl_{CD} -Tieren auf $2,54 \pm 0,35\%$ in $Gnai3^{\text{ako}}_{\text{CD}}$ -Tieren ($\triangleq 23,03\%$), der Anteil der iWAT-Masse reduzierte sich von $2,74 \pm 0,35\%$ in ctrl_{CD} -Tieren auf $2,32 \pm 0,31\%$ in $Gnai3^{\text{ako}}_{\text{CD}}$ -Tieren ($\triangleq 15,33\%$). Die BAT-Masse reduzierte sich von durchschnittlich $0,57 \pm 0,04\%$ in ctrl_{CD} -Tieren auf $0,36 \pm 0,04\%$ in $Gnai3^{\text{ako}}_{\text{CD}}$ -Tieren signifikant. Dies entspricht einer Reduktion um 36,83%. Abhängig von der jeweiligen Spezialdiät führte die *Gnai3*-Deletion zu unterschiedlichen Effekten: Während die *Gnai3*-Deletion keinen messbaren Effekt auf die Fettdepotmassen der HFD-Tiere hatte, führte die *Gnai3*-Deletion in den $Gnai3^{\text{ako}}_{\text{CD}}$ -Tieren zu einer leichten Reduktion der weißen und einer signifikanten Reduktion der braunen Fettdepotmassen.

4.5 Adipozytenmorphologie im weißen Fettgewebe

Die metabolische Aktivität des weißen Fettgewebes ist abhängig von der Größe und der Anzahl der Adipozyten. Um den Effekt der *Gnai3*-Deletion auf die Morphologie des Fettgewebes zu untersuchen, wurden Paraffin-Schnitte angefertigt, mittels H&E gefärbt und hinsichtlich der durchschnittlichen Adipozytengröße und -frequenz analysiert.

4.5.1 Durchschnittliche Adipozytengrößen

Die Ermittlung der durchschnittlichen Zellgrößen erfolgte an H&E-gefärbten Paraffinschnitten aus unterschiedlichen gWAT- und iWAT-Gewebeprobe von $Gnai3^{\text{ako}}$ - und ctrl -Tieren. Für jede Gewebeprobe wurden Schnitte aus drei Ebenen (apikal, medial, basal) angefertigt. Repräsentative Schnitte wurden ausgewählt und sind nachfolgend dargestellt (Abb. 4.7).

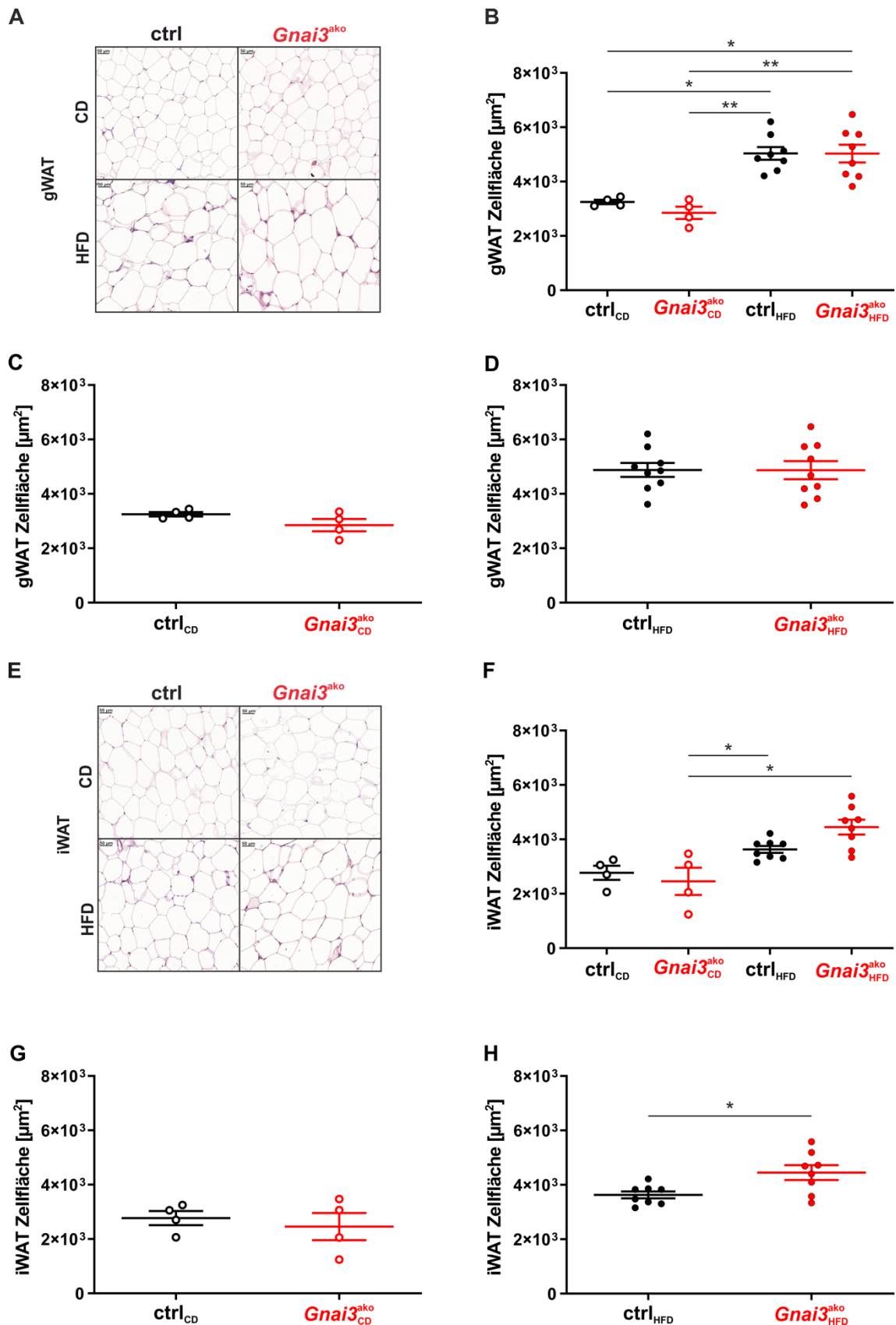


Abbildung 4.7: Morphologie und durchschnittliche Zellgröße der weißen Adipozyten von *Gnai3*^{ak0}- und ctrl-Tieren. (A/C) Exemplarische Darstellung H&E-gefärbter Paraffinschnitte angefertigt von gWAT und iWAT von *Gnai3*^{ak0}- und ctrl-Tieren. (B-D/D-F) Einfache Varianzanalyse (B/F) bzw. Student's t-Test (C-D/G-H) der durchschnittlichen Zellgröße weißer Adipozyten. Die HFD führte zu einer Hypertrophie der Adipozyten im gWAT und iWAT beider Genotypen. Die *Gnai3*-Deletion führte im iWAT der HFD-Tiere zu einer signifikanten Zunahme der durchschnittlichen Adipozytengröße. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der in seiner oxidierten Form zu einer blau-violetten Färbung von sauren bzw. basophilen Strukturen führt. Zu diesen Strukturen zählen unter anderem der Zellkern und die DNA, die Ribosomen und das raue Endoplasmatisches Retikulum (rER). In den Adipozyten führt dies zu einer intensiven blau-violetten Anfärbung der peripher gelegenen Zellkerne. Eosin ist ein synthetischer Farbstoff, der basische bzw. acidophile Strukturen wie beispielsweise das Zytoplasma, die Mitochondrien und das glatte Endoplasmatische Retikulum (sER) rot färbt. Da Adipozyten nur wenig Zellplasma besitzen, überwiegt die blau-violette Färbung der Zellkerne. Die zentralen Lipideinlagerungen, die über 90% des Zellvolumens einnehmen, werden durch den Entwässerungsprozess, das Formalin und die aufsteigende Alkoholreihe aus den Schnitten herausgelöst. In den Fettzellen verbleiben daher „leer“ erscheinende Fettvakuolen. Bereits visuell lässt sich feststellen, dass es unter der HFD zu einer signifikanten Zunahme der Adipozytengröße im gWAT und iWAT kam. Die durchschnittliche Adipozytengröße erhöhte sich von 3052 μm^2 auf 4681,5 μm^2 im gWAT (\triangleq Zunahme um 53,39%) und von 2612,5 μm^2 auf 4064,5 μm^2 im iWAT (\triangleq Zunahme um 55,58%). Während im gWAT (ctrl_{CD} 3252 \pm 80,6 μm^2 ; *Gnai3*^{ako}_{CD} 2852 \pm 227,8 μm^2) und iWAT (ctrl_{CD} 2768 \pm 260,3 μm^2 ; *Gnai3*^{ako}_{CD} 2457 \pm 502,4 μm^2) der CD-Tiere sowie im gWAT der HFD-Tiere (ctrl_{HFD} 4595 \pm 176,7 μm^2 ; *Gnai3*^{ako}_{HFD} 4768 \pm 457 μm^2) keine signifikanten Unterschiede in der durchschnittlichen Adipozytengröße beobachtet werden konnten, führte die *Gnai3*-Deletion im iWAT der HFD-Tiere zu einer signifikanten Zunahme der durchschnittlichen Adipozytengröße (ctrl_{HFD} 3930 \pm 228,3 μm^2 ; *Gnai3*^{ako}_{HFD} 4199 \pm 443,5 μm^2).

4.5.2 Adipozytenfrequenz

Zur Darstellung der Adipozytenfrequenz wurden die ausgemessenen Zellgrößen in unterschiedliche Größenbereiche eingeteilt. Den ersten Größenbereich bildeten alle Adipozyten bis 1500 μm^2 . Die Definition der weiteren Größenbereiche erfolgte in Abständen von 1000 μm^2 . Die prozentuale Größenverteilung der Adipozyten ist in Abb. 4.8 dargestellt.

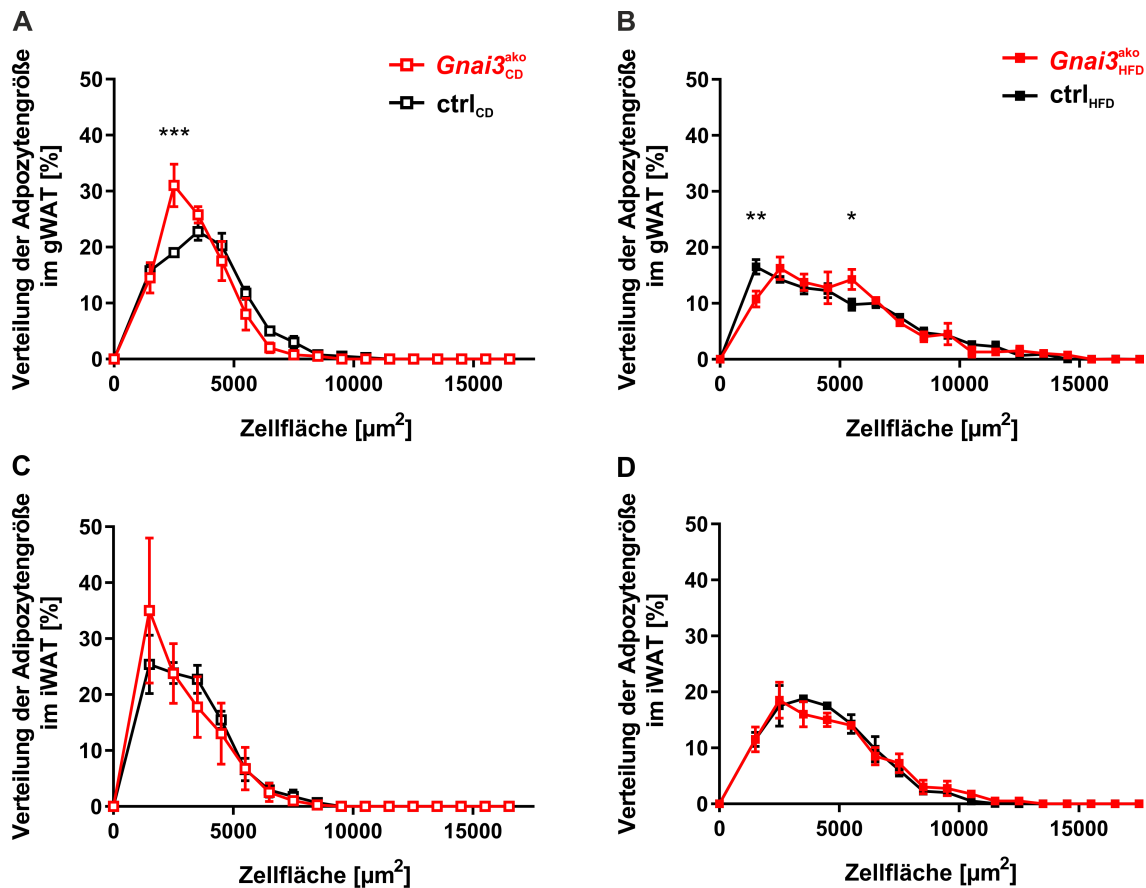


Abbildung 4.8: Adipozytenfrequenz im WAT der *Gnai3*^{ak_o}- und ctrl-Tiere. (A-D) Prozentuale Größenverteilung der Adipozyten im gWAT und iWAT der *Gnai3*^{ak_o}- und ctrl-Tiere. Im gWAT und iWAT der HFD-Tiere ließen sich größere Adipozyten als in den Geweben der CD-Tiere nachweisen. Während im gWAT der *Gnai3*^{ak_{CD}}-Tiere ein höherer Anteil an kleine Adipozyten (2500 μm²) als in den Proben der Geschwisterkontrollen zu finden waren (A), ließen sich im gWAT der *Gnai3*^{ak_{HFD}}-Tiere im Vergleich zu ihren Geschwisterkontrollen ein höherer Anteil an größeren Adipozyten (5500 μm²) finden (B). Im iWAT ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen (C-D). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus jeweils 4 Gewebeproben pro Genotyp.

Sowohl die beiden Diätformen als auch die beiden Genotypen ließen Unterschiede in der gWAT-Adipozytenfrequenz erkennen. Während die meisten Adipozyten im weißen Fettgewebe der CD-Mäuse im Größenbereich von 1500 - 7500 μm² lagen, konnte im Fettgewebe der HFD-Mäuse auch eine größere Anzahl an Adipozyten oberhalb dieses Größenbereiches identifiziert werden. Dies bestätigt die Annahme, dass es unter HFD zu einer Hypertrophie der vorhandenen Adipozyten kommt. Die Analyse der Adipozytenfrequenz im gWAT der *Gnai3*^{ak_o}- und ctrl-Tiere brachte konträre Ergebnisse für die CD und HFD. Während das gWAT der Knockout-Tiere unter CD aus einem signifikant höheren Anteil an kleinen Adipozyten besteht (Größenbereich 2500 μm²: ctrl_{CD} 19 ± 0,58%; *Gnai3*^{ak_{CD}} 31 ± 3,83%), lassen sich im gWAT der Knockout-Tiere unter HFD ein geringerer Anteil an kleinen Adipozyten (Größenbereich 1500 μm²:

ctrl_{HFD} $16,5 \pm 1,32\%$; *Gnai3*^{ako}_{HFD} $10,75 \pm 1,44\%$) bei gleichzeitig erhöhtem Anteil an großen Adipozyten nachweisen (Größenbereich $5500 \mu\text{m}^2$: ctrl_{HFD} $9,75 \pm 1,03\%$; *Gnai3*^{ako}_{HFD} $14,25 \pm 1,80\%$). Im iWAT der CD-Tiere ließen sich ähnliche Unterschiede wie im gWAT der CD-Tiere beobachten (Größenbereich $1500 \mu\text{m}^2$: ctrl_{CD} $25,4 \pm 5,23\%$; *Gnai3*^{ako}_{CD} $35 \pm 12,97\%$), jedoch ohne Signifikanz zu erreichen. Die Analyse der Adipozytenfrequenz im iWAT der HFD-Tiere brachte trotz Veränderungen in der durchschnittlichen Adipozytengröße keine signifikanten Unterschiede hervor.

4.6 Einfluss der *Gnai3*-Deletion auf den Fettstoffwechsel der Leber

Unter Zuhilfenahme spezifischer Färbetechniken und *ex vivo* Triglycerid-Assays wurde überprüft, ob das Adipozyten-spezifische Fehlen von $G\alpha_{i3}$ auch einen Einfluss auf die Fettspeicherung in der Leber und die Entstehung einer NAFLD hat (Abb. 4.9).

Die Analyse der Lebermassen bezogen auf das Gesamtkörpergewicht zeigte, dass Tiere unter CD (ctrl_{CD} $5,61 \pm 0,19\%$; *Gnai3*^{ako}_{CD} $5,52 \pm 0,12\%$) tendenziell höhere Lebermassen als Tiere unter HFD (ctrl_{HFD} $4,851 \pm 0,17\%$; *Gnai3*^{ako}_{HFD} $5,02 \pm 0,15\%$) besaßen. Trotz annähernd identischer Lebermassen von *Gnai3*^{ako}_{HFD}- und ctrl_{HFD}-Tieren ließen sich morphologische Unterschiede in den H&E-Färbungen beobachten. Wie in den H&E-Färbungen des weißen Fettgewebes erscheinen die Zellkerne der Hepato- und Adipozyten blau-violett, das Zytoplasma pink-violett und die Fettvakuolen farblos. Sowohl im Leberparenchym der *Gnai3*^{ako}_{HFD}-Tiere als auch im Parenchym der ctrl_{HFD}-Tiere lassen sich Fettvakuolen nachweisen, die auf eine HFD-induzierte hepatische Steatose hinweisen. Passend zu dem erhöhten Anteil an großen Adipozyten im gWAT der *Gnai3*^{ako}_{HFD}-Tiere erschienen auch die Fettvakuolen im Leberparenchym der *Gnai3*^{ako}_{HFD}-Tiere größer.

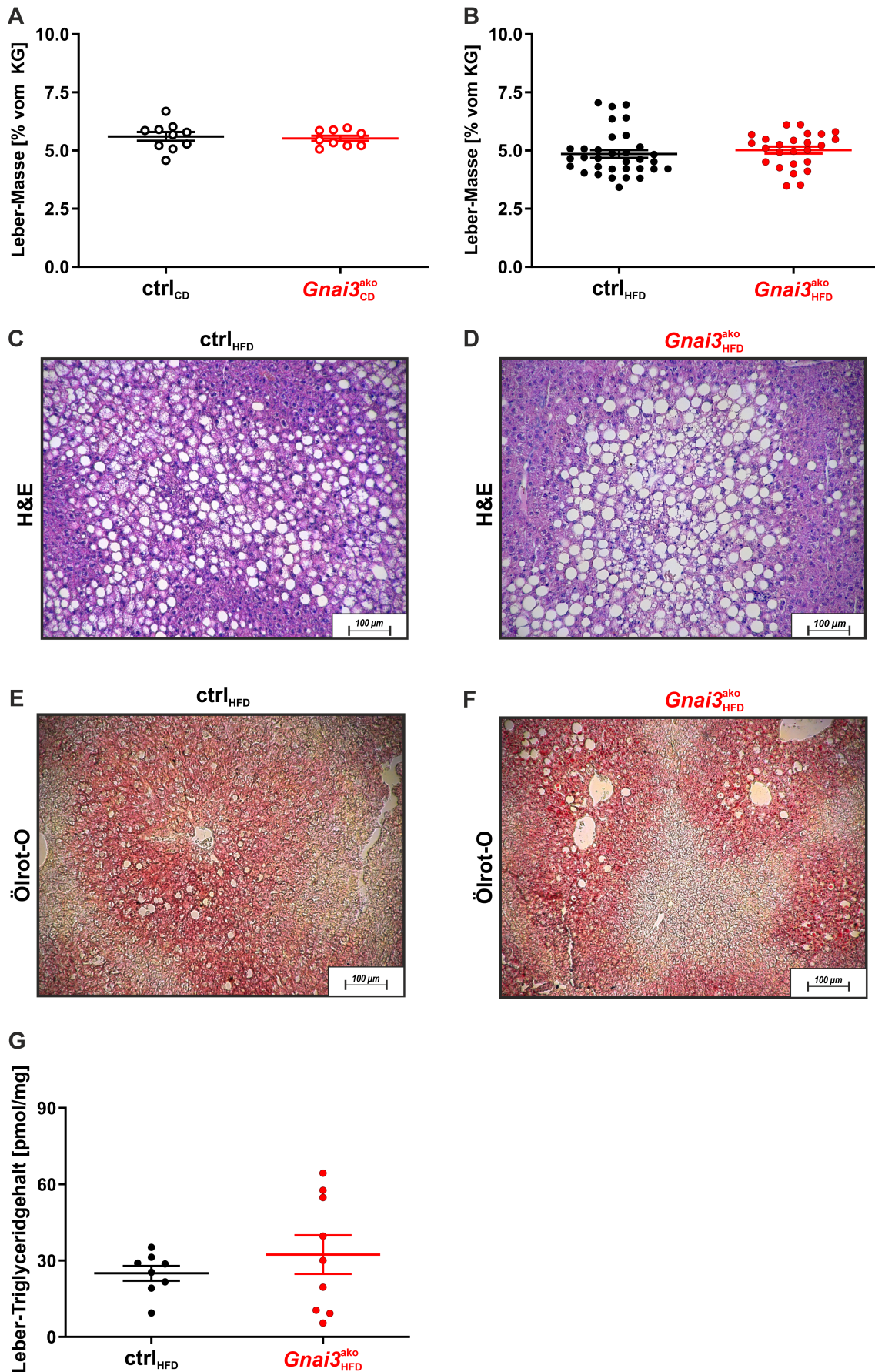


Abbildung 4.9: Lebermorphologie und -triglyceridgehalt von *Gnai3*^{ako}_{HFD}- und ctrl_{HFD}-Tieren. (A-B) Prozentualer Anteil der Lebermasse am Gesamtkörpergewicht von *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Tieren unter HFD. (D-E) H&E- und (F-G) Öl-Rot-O-gefärbte Schnitte aus Lebergewebe von *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Tieren unter HFD. (G) Triglyceridgehalt in der Leber von *Gnai3*^{ako}_{HFD}- und ctrl_{HFD}-Tieren. Bei annähernd identischen Lebermassen ließen sich im Leberparenchym der *Gnai3*^{ako}_{HFD}-Tiere größere Fettvakuolen nachweisen und Hinweise auf eine leicht gesteigerte Triglyceridakkumulation finden.

Die Färbeergebnisse der Ölrot-O-Färbung sowie die TAG-Analysen korrelieren mit den Beobachtungen der H&E-Färbung des Lebergewebes. Im Leberparenchym beider Genotypen lassen sich Triglyceridakkumulationen (Rotfärbungen) vor allem um die Periportalfelder nachweisen. In den Schnitten der *Gnai3^{ako}*-Tiere lassen sich stellenweise intensivere Rotfärbungen als in den Schnitten der ctrl_{HFD}-Tiere beobachten, die auf vermehrte Lipid- und Triglycerideinlagerungen im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern hinweisen. Bestätigen ließen sich diese Beobachtungen durch die Messung des TAG-Gehaltes. *Gnai3^{ako}*_{HFD}-Tiere ($32,35 \pm 7,57$ pmol/mg) zeigen im Vergleich zu ctrl_{HFD}-Tieren ($24,99 \pm 2,87$ pmol/mg) einen leicht erhöhten TAG-Gehalt.

4.7 Einfluss der *Gnai3*-Deletion auf die Genexpression von Adipozytokinen

Da für $G\alpha_{i2}$ bereits ein Einfluss auf die Expression von Adipokinen und proinflammatorischen Mediatoren wie IL-6, TNF- α und IFN- β nachgewiesen werden konnte, sollte nun auch der Einfluss von $G\alpha_{i3}$ auf die Expression dieser Mediatoren untersucht werden. Hierzu wurden am Ende der Studie unterschiedliche Fettdepots der *Gnai3^{ako}*_{HFD}- und ctrl_{HFD}-Tiere entnommen und die Expressionslevel ausgewählter Mediatoren mittels qPCR bestimmt.

4.7.1 Adipokine

Zu den analysierten Adipokinen zählten Leptin, Adipoq (Adiponektin), Resistin und PAI (Plasminogen Activator Inhibitor) (Abb. 4.10).

Die Analyse der Adipokinexpression brachte weder im gWAT (Leptin: ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,16$; *Gnai3^{ako}*_{HFD} $1,13 \pm 0,11$ / Adiponektin: ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,30$; *Gnai3^{ako}*_{HFD} $0,77 \pm 0,12$ / Resistin: ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,22$; *Gnai3^{ako}*_{HFD} $0,88 \pm 0,12$ / PAI: ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,13$; *Gnai3^{ako}*_{HFD} $0,86 \pm 0,09$) noch im iWAT (Leptin: ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,28$; *Gnai3^{ako}*_{HFD} $0,68 \pm 0,1$ / Adiponektin: ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,20$; *Gnai3^{ako}*_{HFD} $0,90 \pm 0,14$ / Resistin: ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,21$; *Gnai3^{ako}*_{HFD} $0,85 \pm 0,19$ / PAI: ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,24$; *Gnai3^{ako}*_{HFD} $0,87 \pm 0,22$) signifikante Unterschiede zwischen *Gnai3^{ako}*_{HFD} und ctrl_{HFD}-Tieren.

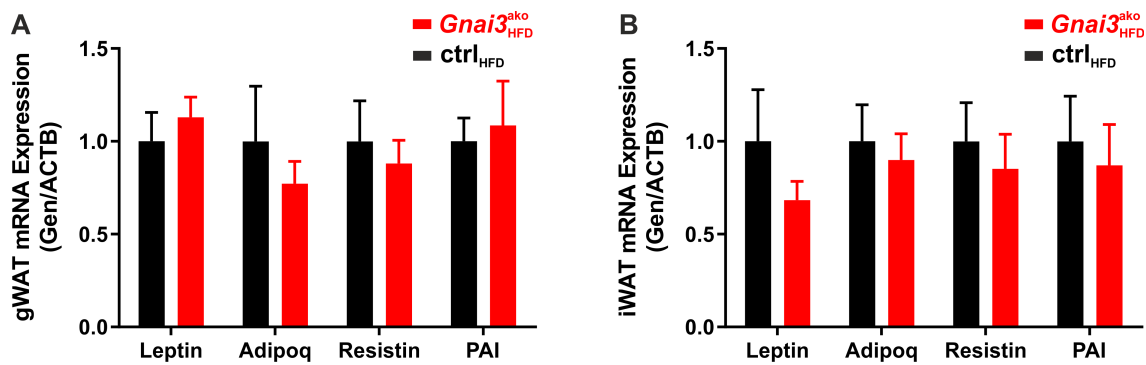


Abbildung 4.10: mRNA-Expression ausgewählter Adipokine im WAT von *Gnai3*^{ak_{HFD}}- und ctrl_{HFD}-Tieren. Mittels qPCR wurde die Expression ausgewählter Adipokine im gWAT und iWAT der *Gnai3*^{ak_{HFD}}- und ctrl_{HFD}-Tiere bestimmt. Die mRNA-Expression der *Gnai3*-defizienten Mäuse wurde auf den Mittelwert der ctrl-Mäuse normalisiert. Weder im gWAT noch im iWAT der *Gnai3*^{ak_{HFD}}- und ctrl_{HFD}-Tiere ließen sich Unterschiede in der mRNA-Expression der Adipokine feststellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der Fettgewebeproben von 9-12 männlichen Tieren im Alter von 26-28 Wochen.

4.7.2 Proinflammatorische Mediatoren

Zu den analysierten proinflammatorischen Mediatoren zählten die Zytokine IL-6, IFN- β , Socs3, IL-1 β , TNF- α , der IgE-Rezeptor Fc ϵ RI sowie die Makrophagenmarker MCP-1, Chil3 und F4/80 (Abb. 4.11).

Im gWAT der *Gnai3*^{ak_{HFD}}-Tiere ($0,54 \pm 0,08$) zeigte sich eine Reduktion der F4/80-mRNA-Expression um 46 % im Vergleich zu den Geschwisterkontrollen ($1,00 \pm 0,19$). Die IL-6- (ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,52$; *Gnai3*^{ak_{HFD}} $1,03 \pm 0,51$), IFN- β - (ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,43$; *Gnai3*^{ak_{HFD}} $0,76 \pm 0,47$), Socs3- (ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,17$; *Gnai3*^{ak_{HFD}} $1,46 \pm 0,34$), IL-1 β - (ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,11$; *Gnai3*^{ak_{HFD}} $1,12 \pm 0,16$), TNF- α - (ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,21$; *Gnai3*^{ak_{HFD}} $1,06 \pm 0,15$), Fc ϵ RI- (ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,21$; *Gnai3*^{ak_{HFD}} $0,68 \pm 0,13$), MCP-1- (ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,41$; *Gnai3*^{ak_{HFD}} $1,08 \pm 0,33$) und Chil3-Expression (ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,21$; *Gnai3*^{ak_{HFD}} $1,10 \pm 0,50$) im gWAT waren annähernd identisch. Im iWAT zeigten sich Unterschiede in der IL-6- (ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,21$; *Gnai3*^{ak_{HFD}} $2,72 \pm 0,89$) und IFN- β -Expression (ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,24$; *Gnai3*^{ak_{HFD}} $2,48 \pm 0,88$), allerdings ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Keine Unterschiede zeigten sich in den Expressionsanalysen von Socs3 (ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,22$; *Gnai3*^{ak_{HFD}} $0,96 \pm 0,12$), IL-1 β (ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,21$; *Gnai3*^{ak_{HFD}} $1,04 \pm 0,22$), TNF- α (ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,27$; *Gnai3*^{ak_{HFD}} $1,05 \pm 0,21$), Fc ϵ RI (ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,15$; *Gnai3*^{ak_{HFD}} $1,33 \pm 0,19$), MCP-1 (ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,23$; *Gnai3*^{ak_{HFD}} $0,91 \pm 0,18$), Chil3 (ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,21$; *Gnai3*^{ak_{HFD}} $1,39 \pm 0,42$) und F4/80 (ctrl_{HFD} $1,00 \pm 0,17$; *Gnai3*^{ak_{HFD}} $1,39 \pm 0,35$) im iWAT der ctrl_{HFD}- und *Gnai3*^{ak_{HFD}}-Tiere.

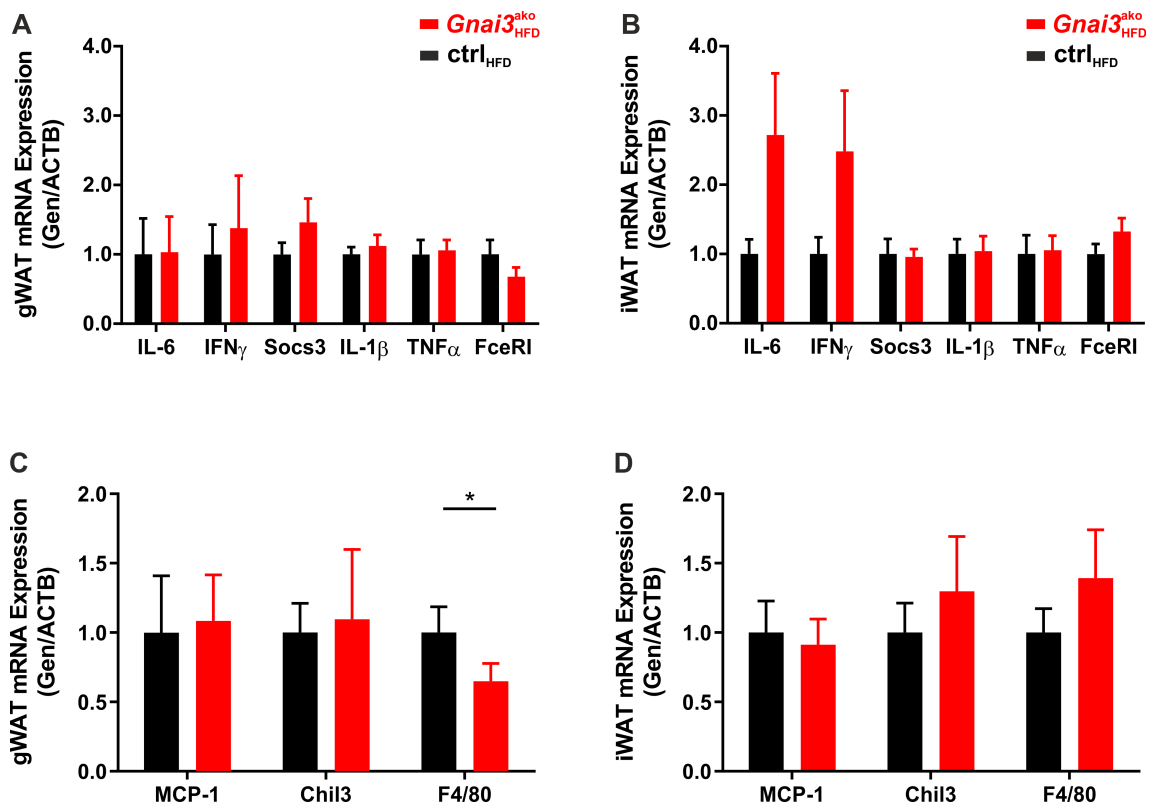


Abbildung 4.11: mRNA-Expression ausgewählter proinflammatorischer Mediatoren im WAT von *Gnai3*^{ak^o}_{HFD}- und ctrl_{HFD}-Tieren. Mittels qPCR wurde die Expression ausgewählter (A-B) proinflammatorischer Mediatoren und (C-D) Makrophagenmarker im gWAT und iWAT der *Gnai3*^{ak^o}_{HFD}- und ctrl_{HFD}-Tiere bestimmt. Die mRNA-Expression der *Gnai3*-defizienten Mäuse wurde auf den Mittelwert der ctrl-Mäuse normalisiert. Weder im gWAT noch im iWAT der *Gnai3*^{ak^o}_{HFD}- und ctrl_{HFD}-Tiere ließen sich signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression der proinflammatorischen Mediatoren feststellen. Im gWAT der *Gnai3*^{ak^o}_{HFD}-Tiere ließ sich eine signifikant reduzierte Expression des Makrophagenmarkers F4/80 nachweisen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM der Fettgewebsproben von 9-12 männlichen Tieren im Alter von 26-28 Wochen.

4.8 Einfluss der *Gnai3*-Deletion auf die Glukosehomöostase

Zahlreiche Studien lassen vermuten, dass $G\alpha_i$ -Proteine eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 einnehmen. Um einen möglichen Einfluss der Adipozyten-spezifischen *Gnai3*-Deletion auf die Glukosehomöostase aufzudecken, wurden *in vivo* Glukose- und Insulintoleranztests durchgeführt.

4.8.1 Glukosetoleranz der *Gnai3*^{ak^o}- und ctrl-Tiere

Die *in vivo* Glukosetoleranztests wurden in einem Alter von 8 (Abb. 4.12) und 26 Wochen (Abb. 4.13) durchgeführt. Im Anschluss an die Glukosetoleranztests wurden die korrespondierenden Plasmainsulinspiegel bestimmt. Die Bestimmung der Plasmainsulinspiegel gestaltete sich trotz ununterbrochener

Lagerung auf Eis und Verwendung eines Protease-Inhibitors insbesondere bei den Proben der 8-Wochen-alten Tiere schwierig. Die Insulinspiegel der meisten Proben lagen - wahrscheinlich durch die Kombination *per se* niedriger Insulinspiegel und *ex vivo* Proteindegradierung - unterhalb der Nachweisgrenze. Die verbleibende Probenanzahl reichte nicht aus, um aussagekräftige Ergebnisse zu generieren. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind deshalb nur die Ergebnisse der 26-Wochen-alten Tiere dargestellt.

4.8.1.1 Glukosetoleranz der 8-Wochen-alten *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Tiere

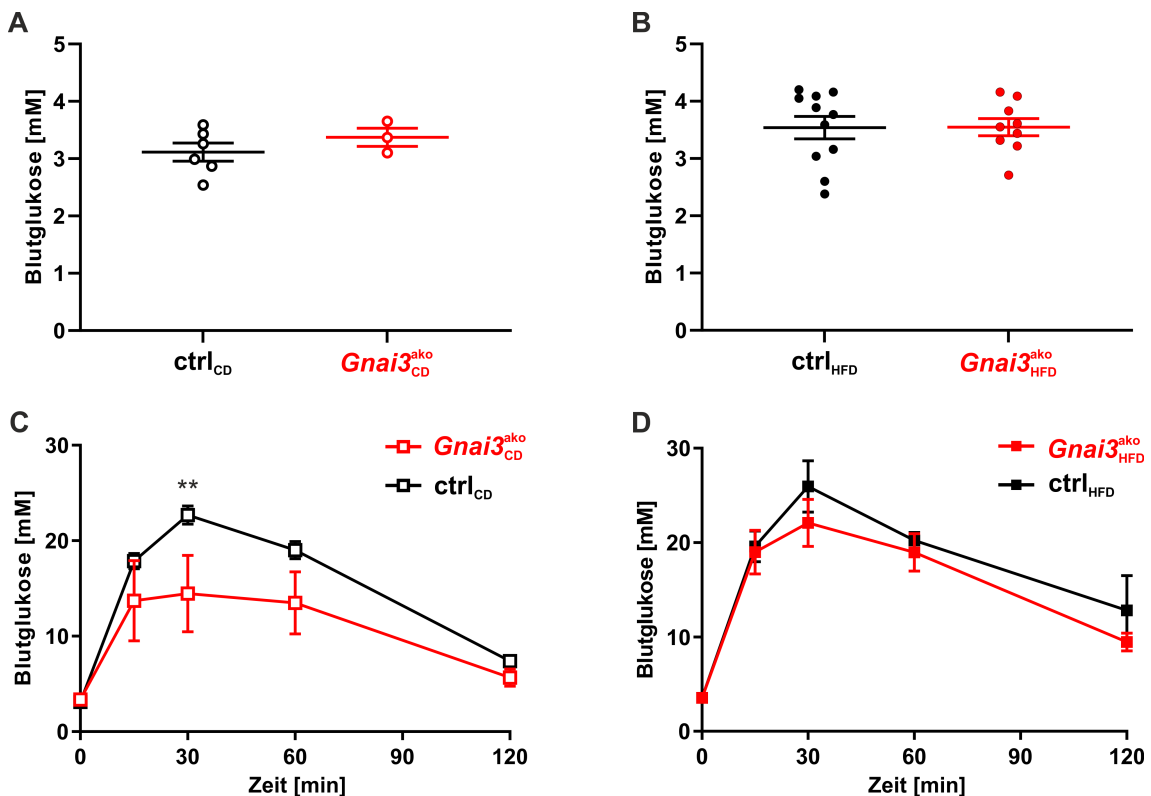


Abbildung 4.12: Glukosetoleranz der 8-Wochen-alten *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Tiere. (A-B) Basale Blutglukosespiegel von 8-Wochen-alten *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Tieren nach einer 12-stündigen Fastenperiode. Es ließen sich keine Unterschiede in den basalen Blutglukosespiegeln von *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Tieren detektieren. (C-D) Messung der Blutglukosespiegel von *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Tieren über einen Zeitraum von 120 min. *Gnai3*^{ako}_{CD}-Tiere zeigten partiell erniedrigte Blutglukosespiegel im Vergleich zu ihren Geschwisterkontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von jeweils 3-11 männlichen Tieren im Alter von 8 Wochen.

Die Analyse der basalen Blutglukosespiegel nach zwei Wochen Spezialdiät und einer 12-stündigen Fastenperiode (Abb. 4.12 A/B) ergab annähernd identische Spiegel für alle vier Versuchsgruppen (*ctrl*_{CD} 3,11 ± 0,16 mM; *Gnai3*^{ako}_{CD} 3,37 ± 0,16 mM; *ctrl*_{HFD} 3,54 ± 0,20 mM; *Gnai3*^{ako}_{HFD} 3,55 ± 0,15 mM). Unterschiede ergaben sich beim Vergleich der Glukose-Reaktionskurven der 8-Wochen-alten

Tiere (Abb. 4.12 C/D). *Gnai3*^{ako}_{CD}-Tiere zeigten einen abgeflachten Kurvenverlauf im Vergleich zu ihren Geschwisterkontrollen und gleichaltrigen HFD-Tieren. Nach i.p. Glukoseinjektion konnte ein sprunghafter Anstieg der Blutglukosespiegel verzeichnet werden, wobei dieser in den *Gnai3*^{ako}_{CD}-Tieren ($13,71 \pm 4,21$ mM) deutlich geringer ausfiel als in den Vergleichsgruppen (ctrl_{CD} $17,87 \pm 0,80$ mM; ctrl_{HFD} $19,60 \pm 1,63$ mM; *Gnai3*^{ako}_{HFD} $18,98 \pm 2,31$ mM). Während die Blutglukosespiegel der *Gnai3*^{ako}_{CD}-Tiere ($14,47 \pm 4,00$ mM) 30 min nach Injektion nahezu konstant blieben, konnte in den Vergleichsgruppen (ctrl_{CD} $22,70 \pm 0,96$ mM; ctrl_{HFD} $25,95 \pm 2,72$ mM; *Gnai3*^{ako}_{HFD} $22,09 \pm 2,49$ mM) ein weiterer Anstieg der Blutglukosespiegel verzeichnet werden, sodass sich signifikante Unterschiede zwischen *Gnai3*^{ako}_{CD}- und ctrl_{CD}-Tieren ergaben. Die ersten Effekte der hormonellen Gegenregulation ließen sich 60 min nach der Injektion erkennen. Insbesondere die ctrl_{CD}- ($19,02 \pm 0,91$ mM), ctrl_{HFD}- ($20,23 \pm 0,84$ mM) und *Gnai3*^{ako}_{HFD}-Tiere ($18,97 \pm 1,98$ mM) zeigten einen deutlichen Abfall der Blutglukosespiegel, während diese bei den *Gnai3*^{ako}_{CD}-Tieren ($13,49 \pm 3,26$ mM) nahezu konstant blieben. Zwei h nach der Injektion lagen die Blutglukosespiegel der ctrl_{CD}- ($7,38 \pm 0,37$ mM) und *Gnai3*^{ako}_{CD}-Tiere ($5,67 \pm 0,91$ mM) wieder nahe ihren Ausgangsniveaus und es ließen sich keine eindeutigen Unterschiede mehr zwischen den beiden Genotypen erkennen. Die Blutglukosespiegel der HFD-Tiere hingegen lagen noch deutlich über ihren Ausgangsniveaus (ctrl_{HFD} $12,83 \pm 3,69$ mM; *Gnai3*^{ako}_{HFD} $9,46 \pm 0,93$ mM).

4.8.1.2 Glukosetoleranz der 26-Wochen-alten *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Tiere

Die Fortsetzung der jeweiligen Spezialdiät über 18 Wochen führten sowohl unter CD als auch unter HFD zu einem deutlichen Anstieg der basalen Blutglukosespiegel (Abb. 4.13 A). Erwartungsgemäß lagen die basalen Blutglukosespiegel der HFD-Tiere (ctrl_{HFD} $5,59 \pm 0,41$ mM; *Gnai3*^{ako}_{HFD} $5,31 \pm 0,26$ mM) über denen der CD-Tiere (ctrl_{CD} $4,66 \pm 0,23$ mM; *Gnai3*^{ako}_{CD} $4,58 \pm 0,27$ mM). Die Analysen der korrespondierenden basalen Plasmainsulinspiegel (Abb. 4.13 B) ergaben annähernd identische Plasmaspiegel der ctrl_{CD}- ($0,25 \pm 0,05$ µg/L), ctrl_{HFD}- ($0,26 \pm 0,05$ µg/L) und *Gnai3*^{ako}_{HFD}-Tiere ($0,39 \pm 0,07$ µg/L). Im Vergleich hierzu zeigten *Gnai3*^{ako}_{CD}-Tiere signifikant erniedrigten Plasmainsulinspiegel ($0,08 \pm 0,02$ µg/L). Die zu Beginn der CD detektieren

Unterschiede in der Glukosetoleranz von *Gnai3*^{ako}_{CD}- und ctrl_{CD}-Tieren ließen sich in einem Alter von 26 Wochen nicht mehr nachvollziehen. Die Knockouttiere unter CD zeigten 15 min (ctrl_{CD} 21,24 ± 0,85 mM; *Gnai3*^{ako}_{CD} 19,22 ± 1,72 mM), 30 min (ctrl_{CD} 23,57 ± 1,52 mM; *Gnai3*^{ako}_{CD} 21,96 ± 1,64 mM), 60 min (ctrl_{CD} 21,17 ± 1,10 mM; *Gnai3*^{ako}_{CD} 20,94 ± 1,03 mM) und 120 min (ctrl_{CD} 14,58 ± 1,41 mM; *Gnai3*^{ako}_{CD} 12,27 ± 1,42 mM) nach Injektion nur noch minimal niedrigere Blutglukosespiegel als ihre Geschwisterkontrollen. Folglich ergaben auch die Analyse der korrespondierenden Plasmainsulinspiegel keine signifikanten Unterschiede zwischen ctrl_{CD}-Tieren (15 min: 0,39 ± 0,11 µg/L; 30 min: 0,26 ± 0,05 µg/L; 60 min: 0,19 ± 0,04 µg/L; 120 min: 0,39 ± 0,10 µg/L) und *Gnai3*^{ako}_{CD}-Tieren (15 min: 0,17 ± 0,03 µg/L; 30 min: 0,22 ± 0,03 µg/L; 60 min: 0,32 ± 0,08 µg/L; 120 min: 0,38 ± 0,09 µg/L).

Jedoch ließen sich Unterschiede in den Blutglukoseprofilen der 26-Wochen-alten HFD-Tiere detektieren. Während sich die Blutglukosespiegel der ctrl_{HFD}- und *Gnai3*^{ako}_{HFD}-Tiere 15 min (ctrl_{HFD} 23,09 ± 0,89 mM; *Gnai3*^{ako}_{HFD} 21,58 ± 0,67 mM), 30 min (ctrl_{HFD} 28,2 ± 0,58 mM; *Gnai3*^{ako}_{HFD} 26,0,2 ± 0,87 mM) und 60 min (ctrl_{HFD} 26,18 ± 1,23 mM; *Gnai3*^{ako}_{HFD} 26,64 ± 0,96 mM) nach der Injektion nicht wesentlich unterschieden, zeigten sich zwei Stunden nach der Injektion signifikant niedrigere Blutglukosespiegeln in den *Gnai3*^{ako}_{HFD}-Tiere (18,55 ± 1,04 mM) als in den ctrl_{HFD}-Tieren (23,78 ± 2,56 mM). Entsprechende Unterschiede in den Plasmainsulinspiegeln der ctrl_{HFD}- (15 min: 0,32 ± 0,06 µg/L; 30 min: 0,32 ± 0,06 µg/L; 60 min: 0,34 ± 0,06 µg/L; 120 min: 0,70 ± 0,10 µg/L) und *Gnai3*^{ako}_{HFD}-Tiere (15 min: 0,53 ± 0,10 µg/L; 30 min: 0,35 ± 0,09 µg/L; 60 min: 0,39 ± 0,08 µg/L; 120 min: 0,76 ± 0,14 µg/L) konnten nicht festgestellt werden.

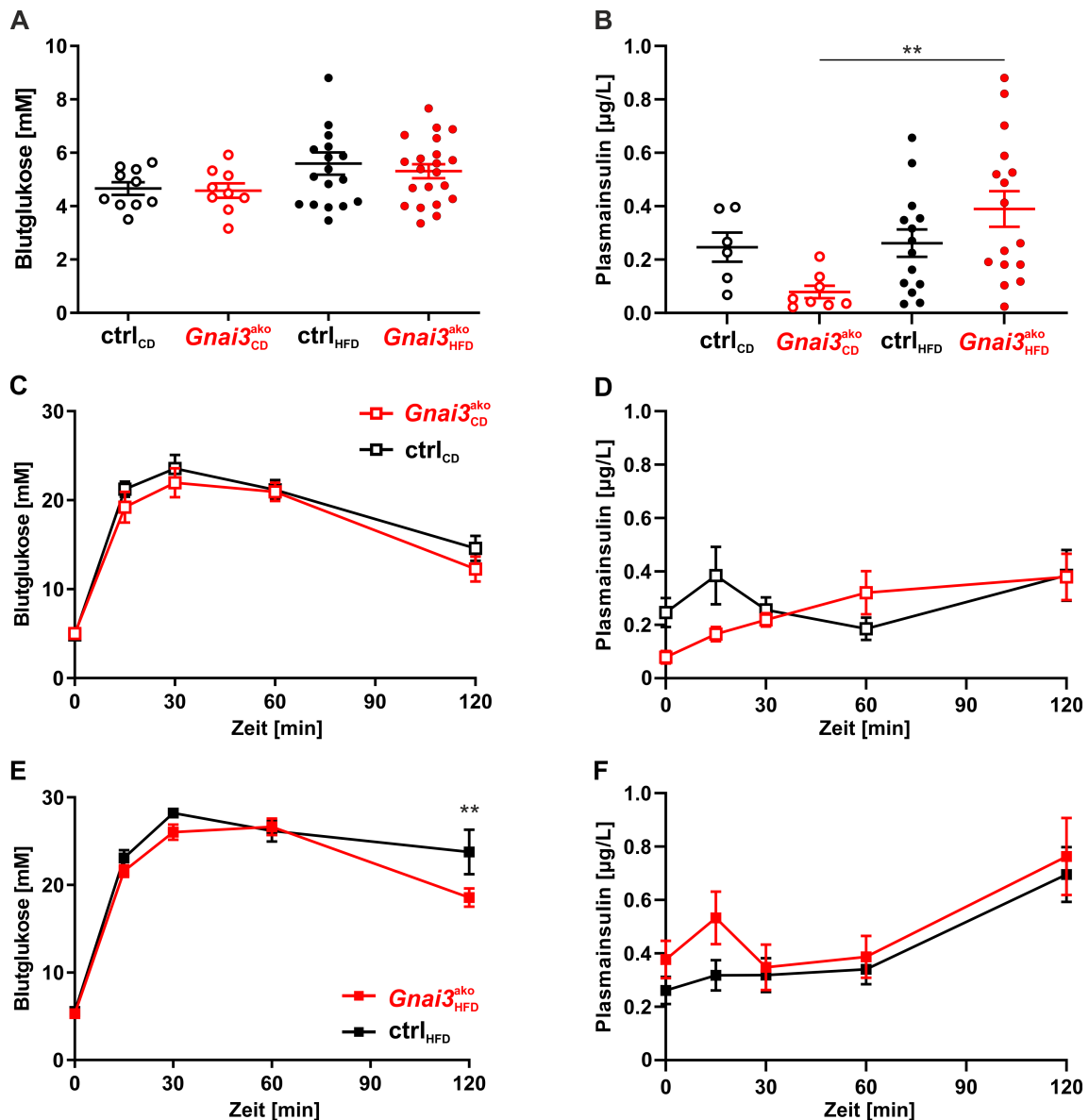


Abbildung 4.13: Glukosetoleranz der 26-Wochen-alten $Gnai3^{ak0}$ - und ctrl-Tiere. (A-B) Basale Blutglukose- und Plasmainsulinspiegel von 26-Wochen-alten $Gnai3^{ak0}$ - und ctrl-Tieren. $Gnai3^{ak0}_{CD}$ -Tiere benötigten zur Aufrechterhaltung des Nüchternblutzuckers niedrigere Plasmainsulinspiegel als ihre Geschwisterkontrollen und gleichaltrige HFD-Tiere. (C-F) Messung der Blutglukosespiegel von $Gnai3^{ak0}$ - und ctrl-Tieren über einen Zeitraum von 120 min. Keine signifikanten Unterschiede in den Blutglukose- und Plasmainsulinspiegel zwischen $Gnai3^{ak0}_{CD}$ - und ctrl_{CD}-Tieren (C-D). $Gnai3^{ak0}_{HFD}$ -Tiere zeigten 120 min nach Glukoseinjektion signifikant niedrigere Blutglukosespiegel als ihre Kontrollgeschwister. Keine Unterschiede bei den Plasmainsulinspiegel zwischen $Gnai3^{ak0}_{HFD}$ - und ctrl_{HFD}-Tieren (E-F). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 6-21 männlichen Tieren im Alter von 26 Wochen.

4.8.2 Insulinsensitivität

Die Pathophysiologie hinter der Entstehung von Diabetes mellitus Typ ist komplex und nicht abschließend geklärt. Als gesichert gilt, dass es primär zu einer Insulinresistenz peripherer Zellen kommt. Zu den peripheren Zellen zählen insbesondere Adipo- und Myozyten. Zur Bestimmung der Ganzkörpersensitivität

der Insulinrezeptoren wurden i.p. Insulintoleranztests an 26- bis 28-Wochen-alten $Gnai3^{ako}_{HFD}$ - und $ctrl_{HFD}$ -Tieren durchgeführt (Abb. 4.14).

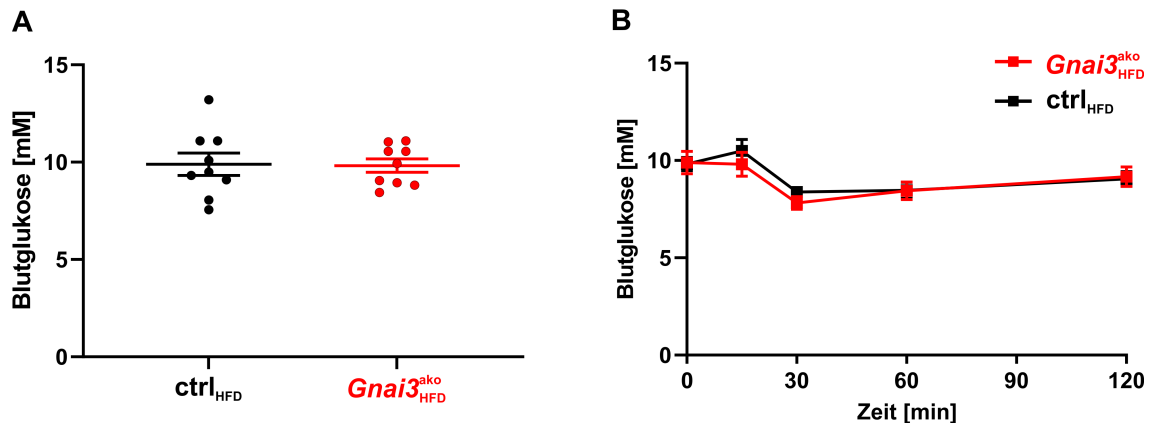


Abbildung 4.14: Insulinsensitivität von $Gnai3^{ako}_{HFD}$ - und $ctrl_{HFD}$ -Tieren. (A) Messung der basalen Blutglukosespiegel von $Gnai3^{ako}$ - und $ctrl$ -Tieren nach einer 4-stündigen Fastenperiode. Anschließend i.p. Injektion von Insulin (1 mU/g KG). (B) Messung der Blutglukosespiegel nach 15, 30, 60 und 120 min. Annähernd identische Blutglukosespiegel von $Gnai3^{ako}_{HFD}$ - und $ctrl_{HFD}$ -Tieren basal und nach i.p. Injektion von Insulin. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 9 männlichen Tieren im Alter von 26-28 Wochen.

Die Messung der basalen Blutglukosespiegel nach einer vierstündigen Fastenperiode brachte annähernd identische Werte für $ctrl_{HFD}$ - ($9,89 \pm 0,58$ mM) und $Gnai3^{ako}_{HFD}$ -Tiere ($9,82 \pm 0,34$ mM). Innerhalb der ersten 15 min nach Insulininjektion konnten keine relevanten Änderungen der Blutglukosespiegel verzeichnet werden ($ctrl_{HFD}$ $9,81 \pm 0,62$ mM; $Gnai3^{ako}_{HFD}$ $10,5 \pm 0,59$ mM). Der blutzuckersenkende Effekt des Insulins kam eine halbe h nach Insulininjektion zum Tragen. Es konnte ein leichter Abfall der Blutglukosespiegel auf $7,81 \pm 0,33$ mM in $ctrl_{HFD}$ -Tieren und $8,38 \pm 0,29$ mM in $Gnai3^{ako}_{HFD}$ -Tieren beobachtet werden. Bereits 60 min nach Insulininjektion kam es zum Erlöschen der Insulinwirkung mit einem Anstieg der Blutglukosespiegel auf $8,45 \pm 0,46$ mM in $ctrl_{HFD}$ - und $8,47 \pm 0,42$ mM in $Gnai3^{ako}_{HFD}$ -Tieren. Zwei h nach Injektion lagen die Blutglukosespiegel wieder nahe ihrer Ausgangsniveaus ($ctrl_{HFD}$ $9,17 \pm 0,5$ mM; $Gnai3^{ako}_{HFD}$ $9,06 \pm 0,38$ mM).

4.9 Intrazelluläre cAMP-Konzentrationen im Fettgewebe

Die Funktion der Adipozyten wird unter anderem G-Protein-vermittelt über den cAMP/PKA-Signalweg gesteuert. Da die Deletion des $Gnai3$ -Gens in den Adipozyten zu einem Wegfall der tonisch inhibierenden Wirkung auf die Adenylylcyclase führen kann, wurden die intrazellulären cAMP-Konzentrationen

basal und nach Zugabe eines unselektiven β -Adrenorezeptor-Agonisten (Isoproterenol) mittels spezifischer *ex vivo* cAMP-Assays gemessen (Abb. 4.15).

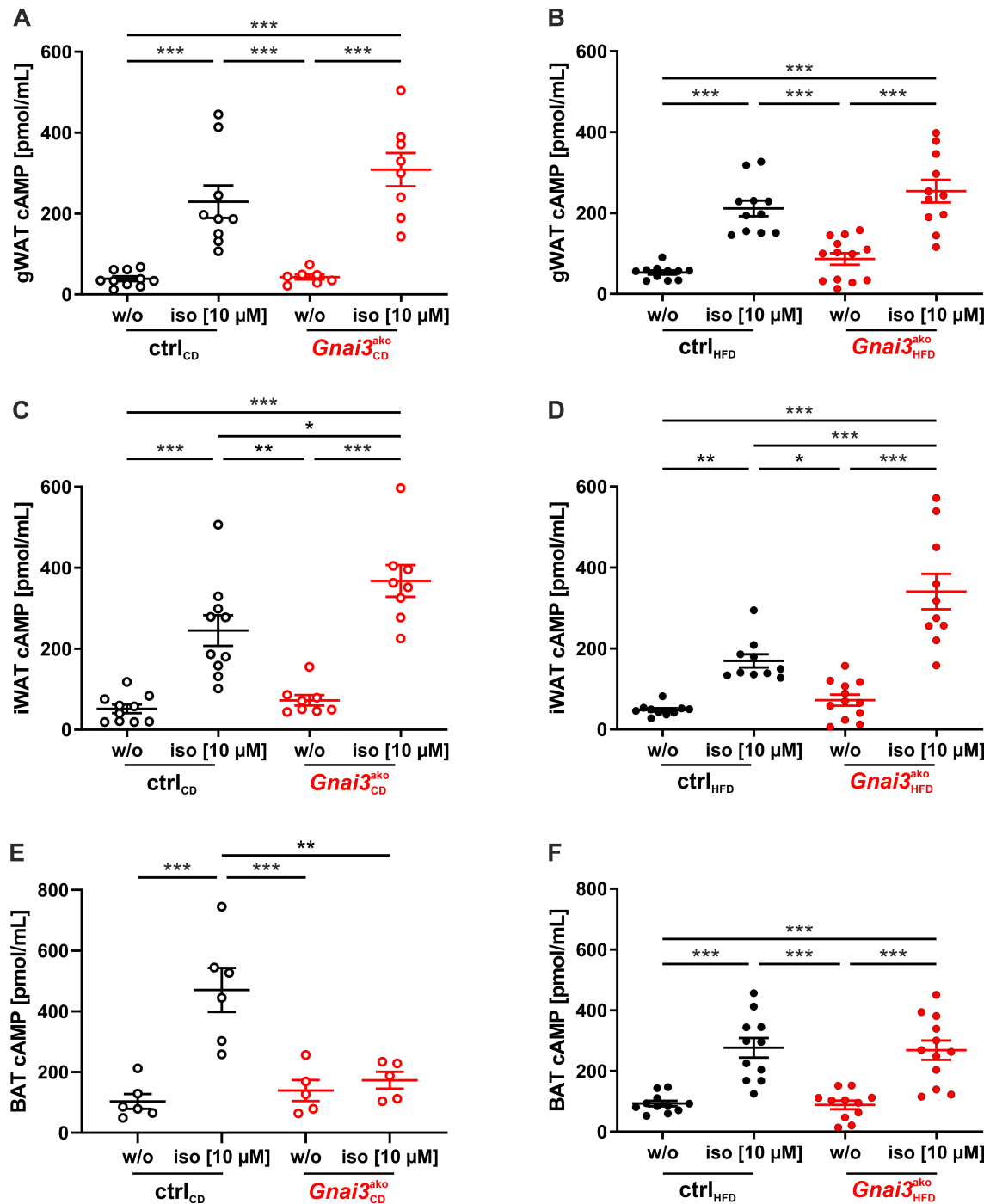


Abbildung 4.15: Intrazelluläre cAMP-Konzentrationen im Fettgewebe von *Gnai3^{ako}*- und *ctrl*-Tieren. (A-F) Messung der intrazellulären cAMP-Konzentrationen *ex vivo* basal (w/o) und nach Stimulation mit Isoproterenol (iso) (10 μ M) im gWAT, iWAT und BAT von *Gnai3^{ako}*- und *ctrl*-Tieren bestimmt. Die Zugabe von Isoproterenol führte in allen Proben, außer in den BAT-Proben der *Gnai3^{ako}_{CD}*-Tiere zu einem signifikanten Anstieg der cAMP-Konzentrationen. Hierdurch ergaben sich signifikant höhere post-stimulatorische cAMP-Konzentrationen in den BAT-Proben der *ctrl_{CD}*-Tiere im Vergleich zu den *Gnai3^{ako}_{CD}*-Tieren. In den iWAT-Proben der *Gnai3^{ako}*-Tiere konnten nach Stimulation signifikant erhöhte cAMP-Konzentrationen im Vergleich zu den Proben der Geschwisterkontrollen nachgewiesen werden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

In allen entnommenen Fettdepots, außer in den BAT-Depots der *Gnai3^{ako}_{CD}*-Tiere (w/o $139,16 \pm 34,65$ pmol/mL; iso $173,31 \pm 27,81$ pmol/ml), konnte durch die Zugabe des unselektiven β -Adrenozeptor-Agonisten Isoproterenol eine signifikante Erhöhung der cAMP-Spiegel erreicht werden. Die höchsten cAMP-Konzentrationen konnten nach Stimulation in den BAT-Proben der ctrl_{CD}-Tiere gemessen werden ($470,14 \pm 72,49$ pmol/ml). Durch den fehlenden stimulatorischen Effekt von Isoproterenol auf die BAT-Proben der *Gnai3^{ako}_{CD}*-Tiere ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den stimulierten BAT-Proben der beiden Genotypen (ctrl_{CD} $470,14 \pm 72,49$ pmol/ml; *Gnai3^{ako}_{CD}* $173,31 \pm 27,81$ pmol/ml). Das Fehlen des $G\alpha_{i3}$ -Proteins spezifisch in Adipozyten hatte keinen Einfluss auf die intrazellulären cAMP-Level im BAT unter HFD. Die gWAT-Proben der *Gnai3^{ako}*-Tiere zeigten nach Stimulation tendenziell erhöhte cAMP-Konzentrationen (*Gnai3^{ako}_{CD}* $308,59 \pm 41,31$ pmol/ml; *Gnai3^{ako}_{HFD}* $254,32 \pm 27,90$ pmol/ml) im Vergleich zu den Proben der Geschwisterkontrollen (ctrl_{CD} $229,27 \pm 40,18$ pmol/ml; ctrl_{HFD} $211,59 \pm 19,30$ pmol/ml). In den iWAT-Proben der *Gnai3^{ako}*-Tiere konnten nach Stimulation (*Gnai3^{ako}_{CD}* $367,49 \pm 38,98$ pmol/ml; *Gnai3^{ako}_{HFD}* $340,52 \pm 43,74$ pmol/ml) sogar signifikant erhöhte cAMP-Konzentrationen im Vergleich zu den Geschwisterkontrollen (ctrl_{CD} $245,01 \pm 37,85$ pmol/ml; ctrl_{HFD} $169,40 \pm 16,28$ pmol/ml) gemessen werden. Zudem zeigten sich tendenziell erhöhte basale cAMP-Konzentrationen in den gWAT- (ctrl_{HFD} $53,06 \pm 19,30$ pmol/ml; *Gnai3^{ako}_{HFD}* $86,71 \pm 14,30$ pmol/ml) und iWAT-Proben (ctrl_{HFD} $48,24 \pm 4,52$ pmol/ml; *Gnai3^{ako}_{HFD}* $72,36 \pm 13,64$ pmol/ml) der *Gnai3^{ako}_{HFD}*-Tiere. Die *Gnai3*-Deletion führte somit zu konträren Effekten im BAT und WAT. Während die *Gnai3*-Deletion insbesondere im iWAT eine Sensibilitätssteigerung gegenüber Isoproterenol bewirkte, führte die Deletion im BAT der *Gnai3^{ako}_{CD}*-Tiere zu einer Sensibilitätsabnahme gegenüber Isoproterenol.

4.10 Einfluss der *Gnai3*-Deletion auf den Lipidmetabolismus

Zu den wichtigsten Funktionen der Adipozyten zählen die Aufnahme von Fettsäuren aus dem Blut, die Speicherung dieser in Form von Triglyceriden (TAG-Synthese) und der bedarfsgerechte Abbau von TAGs zu Glycerin und Fettsäuren (Lipolyse). All diese Prozesse werden unter anderem G-Protein-

vermittelt über den cAMP-/PKA-Signalweg reguliert. Da es sich bei cAMP um einen sehr instabilen und ubiquitär verwendeten Botenstoff handelt, lassen sich aus den veränderten cAMP-Konzentrationen der *Gnai3^{ako}*-Tiere keine Schlüsse auf den Fettstoffwechsel ziehen. Somit sind isolierte Analysen des Fettstoffwechsels notwendig.

4.10.1 Glyceringehalt im Fettgewebe

Die Lipolyse dient der hydrolytischen Spaltung von Triglyceriden in Glycerin und Fettsäuren. Da die Schlüsselenzyme der Lipolyse unter anderem über den cAMP-/PKA-Signalweg reguliert werden, stellt sich die Frage, ob sich die veränderten cAMP-Konzentrationen der *Gnai3^{ako}*-Tiere auch auf die Lipolyseaktivität auswirken. Um diese Änderungen zu erfassen, wurden am Ende der Studie verschiedene Fettdepots entnommen und der Glyceringehalt basal sowie nach 10 μ M Isoproterenol-Stimulation unter Verwendung spezifischer *ex vivo* Lipolyseassays bestimmt.

Die Zugabe von Isoproterenol führte in allen Proben des WATs zu einer Stimulation der Lipolyse und folglich zu einer signifikanten Steigerung der Glycerinfreisetzung. Trotz tendenziell erhöhter basaler und signifikant erhöhter post-stimulatorischer cAMP-Konzentrationen im WAT der *Gnai3^{ako}*-Tiere konnten weder basal (gWAT: ctrl_{CD} 0,04 \pm 0,01 μ g/ml; *Gnai3^{ako}*_{CD} 0,06 \pm 0,01 μ g/ml; ctrl_{HFD} 0,11 \pm 0,01 μ g/ml; *Gnai3^{ako}*_{HFD} 0,11 \pm 0,03 μ g/ml / iWAT: ctrl_{CD} 0,09 \pm 0,02 μ g/ml; *Gnai3^{ako}*_{CD} 0,08 \pm 0,02 μ g/ml; ctrl_{HFD} 0,07 \pm 0,01 μ g/ml; *Gnai3^{ako}*_{HFD} 0,07 \pm 0,01 μ g/ml) noch post-stimulatorisch (gWAT: ctrl_{CD} 0,37 \pm 0,04 μ g/ml; *Gnai3^{ako}*_{CD} 0,4 \pm 0,07 μ g/ml; ctrl_{HFD} 0,33 \pm 0,04 μ g/ml; *Gnai3^{ako}*_{HFD} 0,30 \pm 0,03 μ g/ml / iWAT: ctrl_{CD} 0,53 \pm 0,05 μ g/ml; *Gnai3^{ako}*_{CD} 0,44 \pm 0,08 μ g/ml; ctrl_{HFD} 0,23 \pm 0,03 μ g/ml; *Gnai3^{ako}*_{HFD} 0,23 \pm 0,03 μ g/ml) Unterschiede in der Glycerinfreisetzung festgestellt werden. Entsprechend der reduzierten post-stimulatorischen cAMP-Spiegel im BAT der *Gnai3^{ako}*_{CD}-Tiere, konnte nur ein leichter Anstieg der Lipolyserate verzeichnet werden (w/o 1,05 \pm 0,1 μ g/ml; iso 1,38 \pm 0,25 μ g/ml). Im BAT ihrer Geschwisterkontrollen (ctrl_{CD}-Tiere) konnte hingegen ein signifikanter Anstieg der Glycerinfreisetzung beobachtet werden (w/o 0,99 \pm 0,14 μ g/ml; iso 2,82 \pm 0,28 μ g/ml). Überraschende Ergebnisse lieferten auch die Glycerinmessungen im BAT der HFD-Tiere. Trotz des signifikanten Anstieges der

cAMP-Konzentrationen nach adrenerger Stimulation blieb ein nachweisbarer Effekt auf die Glycerinfreisetzung vollständig aus (ctrl_{HFD} w/o $0,46 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$; iso $0,41 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$; *Gnai3*^{ako}_{HFD} w/o $0,42 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$; iso $0,45 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$).

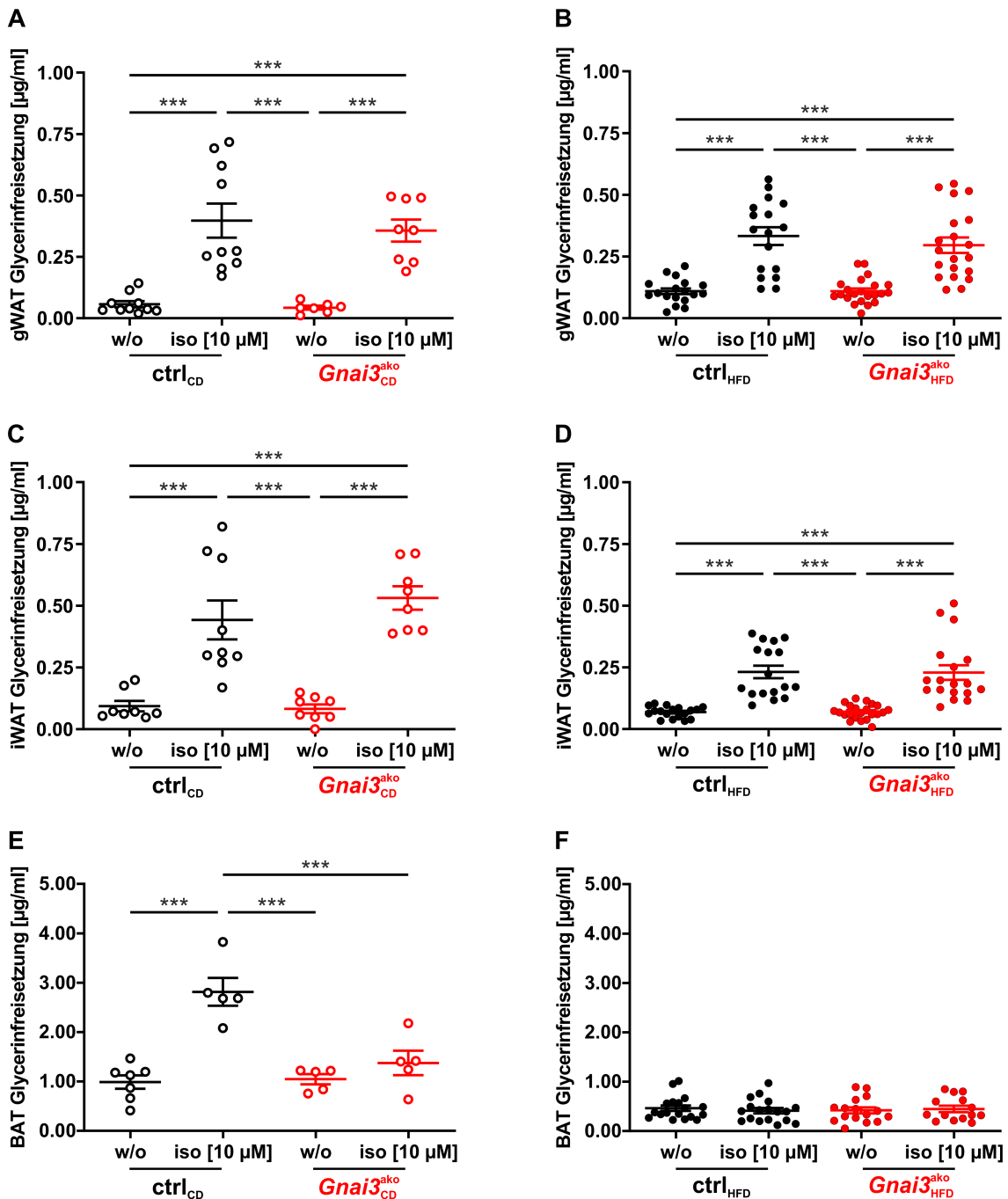


Abbildung 4.16: Ex vivo Glycerin Gehalt im Fettgewebe der *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Tiere. (A-F) Die Glycerinfreisetzung wurde basal (w/o) und nach Stimulation mit 10 μm Isoproterenol (iso) im gWAT, iWAT und BAT von *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Tieren bestimmt. Im BAT der *Gnai3*^{ako}_{CD}-Tiere konnten nach Stimulation signifikant niedrigere Glycerinkonzentrationen als in den Gewebeproben der Kontrolltiere festgestellt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

4.10.2 Triglyceridgehalt im Fettgewebe

Der TAG-Gehalt in den Adipozyten wird durch das Aktivitätsniveau der anabolen und katabolen Enzyme des Fettstoffwechsels bestimmt. Da cAMP einen indirekten Einfluss auf die Aktivität dieser Enzyme hat, sind ebenfalls Änderungen in den Triglyceridspiegeln zu erwarten. Am Ende der Studie wurden verschiedene Fettdepots der *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Tiere entnommen und unter Zuhilfenahme spezifischer *ex vivo* Triglyceridassays auf ihren TAG-Gehalt untersucht (Abb. 4.17). Aus Zeitgründen konnten die *ex vivo* TAG-Assays ausschließlich für Gewebeproben der HFD-Tiere durchgeführt werden.

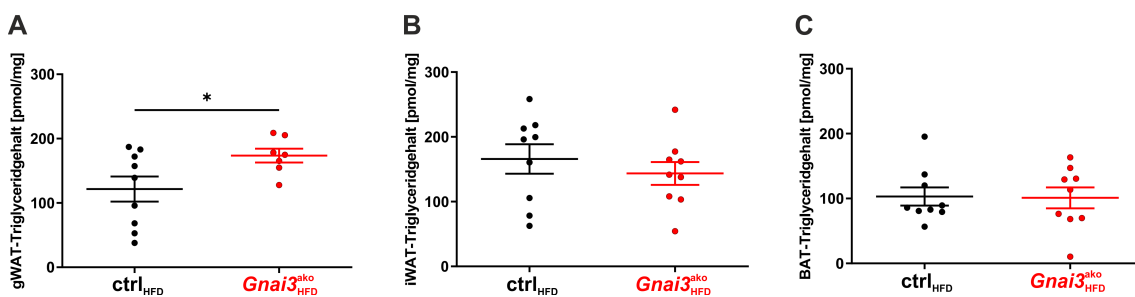


Abbildung 4.17: Triglyceridgehalt im Fettgewebe von *Gnai3*^{ako}_{HFD}- und ctrl_{HFD}-Tieren. Im gWAT der *Gnai3*^{ako}_{HFD}-Tiere konnten signifikant höhere Triglyceridspiegel als im gWAT ihre Kontrollgeschwister gemessen werden (A). Im iWAT (B) und BAT (C) lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Die Messungen der TAG-Konzentrationen im iWAT (ctrl_{HFD} 165,86 \pm 22,83 pmol/mg; *Gnai3*^{ako}_{HFD} 143,53 \pm 17,68 pmol/mg) und BAT (ctrl_{HFD} 103,09 \pm 13,98 pmol/mg; *Gnai3*^{ako}_{HFD} 101,00 \pm 16,13 pmol/mg) und brachten keine signifikanten Unterschiede zwischen den ctrl_{HFD}- und *Gnai3*^{ako}_{HFD}-Tieren. Trotz annähernd identischer Lipolyseraten im gWAT der *Gnai3*^{ako}_{HFD}- und ctrl_{HFD}-Tiere konnten signifikant höhere Triglyceridspiegel im gWAT der *Gnai3*^{ako}_{HFD}-Tiere (ctrl_{HFD} 121,59 \pm 19,52 pmol/mg; *Gnai3*^{ako}_{HFD} 173,68 \pm 10,69 pmol/mg) gemessen werden.

4.11 Sauerstoffverbrauch

Die reduzierten BAT-Massen und die reduzierte metabolische Aktivität der *Gnai3*^{ako}_{CD}-Tiere lassen Veränderungen in dem Gesamtsauerstoffverbrauch vermuten.

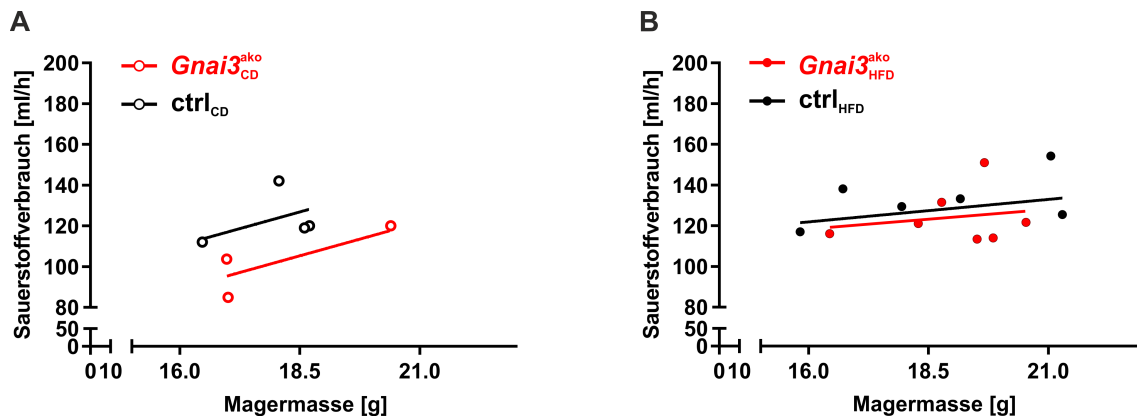


Abbildung 4.18: Gesamtsauerstoffverbrauch der *Gnai3*^{ak_o}- und ctrl-Tiere. (A/B) Nichtlineare Regressionsanalyse für den Zusammenhang zwischen Sauerstoffverbrauch und Magermasse von *Gnai3*^{ak_o}- und ctrl-Tieren. Während sich in *Gnai3*^{ak_o}_{HFD}- und ctrl_{HFD}-Tiere keine Unterschiede im Sauerstoffverbrauch detektieren ließen, zeigten *Gnai3*^{ak_o}_{CD}-Tiere im Vergleich zu ihren Geschwisterkontrollen einen reduzierten Sauerstoffverbrauch. Die Messungen des Sauerstoffverbrauches sowie die Auswertungen dieser Messungen erfolgten durch Dr. Thorsten Gnad (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Deutschland).

Die nichtlinearen Regressionsanalysen des Sauerstoffverbrauches der HFD-Tiere (Abb. 4.18 B) ergaben keine eindeutigen Unterschiede zwischen den beiden Genotypen ($p = 0,207$). Im Gegensatz dazu ergaben die Analysen der CD-Tiere (Abb. 4.18 A) einen deutlich erniedrigten Gesamtsauerstoffverbrauch der *Gnai3*^{ak_o}_{CD}-Tiere im Vergleich zu den ctrl_{CD}-Tieren ($p = 0,093$).

5 Diskussion

Die steigenden Prävalenzen von Präadipositas, Adipositas und damit assoziierten Begleiterkrankungen sorgen für ein zunehmendes Interesse an den zugrundeliegenden pathophysiologischen Ursachen. Auf zellulärer Ebene wird eine Funktionsstörung des Fettgewebes als eine der Hauptursachen angesehen (Bluher, 2009; Longo *et al.*, 2019). Eine wichtige Rolle bei der Regulation dieser dysfunktionalen Prozesse nehmen GPCRs und G-Proteine ein. Für eine Vielzahl der $G\alpha_s$ -, $G\alpha_q$ -, $G\alpha_{12/13}$ - und $G\alpha_{i/o}$ -Proteine konnte bereits eine Beteiligung an der metabolischen Homöostase von Adipozyten nachgewiesen werden (Vannucci *et al.*, 1989; Johansson *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2010; Collins, 2012; Yanagida *et al.*, 2018; Ceddia & Collins, 2020; Leiss *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Durch die selektive Expression von Pertussis-Toxin in Adipozyten, einem Gift des Bakteriums *Bordetella pertussis*, das die Interaktion von $G\alpha_{i/o}$ -Proteinen (außer $G\alpha_z$) mit den Rezeptoren durch kovalente Modifikation eines C-terminalen Cystein-Rests verhindert, in Adipozyten gelang es einen funktionellen Ausfall von $G\alpha_i$ -Proteinen in Adipozyten herbeizuführen (Wettschureck & Offermanns, 2005; Wang *et al.*, 2020). Da bekannt ist, dass die einzelnen $G\alpha_i$ -Isoformen nicht ausschließlich redundante, sondern auch eigene, nicht kompensierbare Zellfunktionen übernehmen, wurden zudem bereits Analysen zur Adipozyten-spezifischen Funktion der prädominanten $G\alpha_{i2}$ -Isoform durchgeführt (Leiss *et al.*, 2020). Sowohl das funktionelle Fehlen aller $G\alpha_{i/o}$ -Proteine als auch die selektive *Gnai2*-Deletion in den Adipozyten führte zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Körperkompartimente, dem Lipidstoffwechsel und der Glukosehomöostase (Leiss *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Die Beteiligung der minoren $G\alpha_{i3}$ -Isoform an diesen Prozessen ist bisher weitestgehend ungeklärt und sollte durch die vorliegende Arbeit mithilfe eines *Gnai3*-defizienten Mausmodells untersucht werden. Die Generierung Adipozyten-spezifischer Knockoutmodelle wurde durch Verpaarung von geflochtenen *Gnai3*-Mäusen mit heterozygoten AdipoqERT2-Cre-Trägern erreicht (Sassmann *et al.*, 2010; Leiss *et al.*, 2020). Die zellspezifische *Gnai3*-Deletion auf Genomebene konnte durch den kapillarelektrophoretischen Nachweis des Knockout-Produktes in den Fettgewebsdepots bei gleichzeitig fehlendem Nachweis in den Lysaten anderer

Organe verifiziert werden (siehe Abb. 4.2). Da die Aktivität der Cre-Rekombinase von der Expression des Adipozyten-spezifischen Promotors Adiponektin abhängig war, kam es ausschließlich in den Fettgewebslysaten der *Gnai3*^{ako}-Tiere zu einer *Gnai3*-Deletion und damit zu einer Amplifikation des Knockout-Produktes. Die simultane Expression des geflochtenen Alleles erklärt sich durch die hohe Anzahl an Fibroblasten/Fibrozyten, Nervenzellen, Stroma-Gefäßzellen und Immunzellen im Fettgewebe, in denen keine Rekombination stattfand (Rosen & Spiegelman, 2014).

5.1 Einfluss der Adipozyten-spezifischen *Gnai3*-Deletion auf die Expression der $G\alpha_i$ -Proteine im Fettgewebe

Die Proteinquantifizierung mittels Immunoblot brachte unterschiedliche $G\alpha_{i3}$ -Expressionslevel im gWAT, iWAT und BAT der *Gnai3*^{ako}- und ctrl-Tiere. Die Fettgewebslysate der *Gnai3*^{ako}-Tiere zeigten im Vergleich zu den Lysaten der ctrl-Tiere eine durchschnittliche Reduktion der $G\alpha_{i3}$ -Expression um 42% im WAT und um 53% im BAT (siehe Abb. 4.3). Das verbleibende $G\alpha_{i3}$ -Signal im Fettgewebe der *Gnai3*^{ako}-Tiere resultiert vermutlich aus der $G\alpha_{i3}$ -Expression anderer, im Fettgewebe vorkommender Zellen wie beispielsweise Fibroblasten/Fibrozyten, Nervenzellen, Stroma-Gefäßzellen und Immunzellen, die über 60% des Gesamtzellgehaltes ausmachen (Rosen & Spiegelman, 2014). Weitere Ursachen könnten eine inkomplette Rekombination durch den Verlust der Cre-Expression mit zunehmender Generationszahl, eine unzureichende Tamoxifen-Injektion oder eine ineffiziente Deletion durch partielle Resistenz des *Gnai3*-Gens gegenüber der Cre-Rekombinase sein (Schulz *et al.*, 2007; Becher *et al.*, 2018). Um abschließend beurteilen zu können, ob das verbleibende $G\alpha_{i3}$ -Signal tatsächlich von nicht-Adipozyten stammt oder durch eine inkomplette Rekombination in den Adipozyten zustande kommt, wäre eine Isolation der Adipozyten aus den Fettgewebslysaten und eine erneute Proteinquantifizierung mittels Immunoblot notwendig. Da in der Literatur bereits eine kompensatorische Hochregulation des $G\alpha_{i3}$ -Proteins bei globaler Deletion von $G\alpha_{i2}$ beschrieben wurde, erfolgte ergänzend die Quantifizierung der $G\alpha_{i1}$ - und $G\alpha_{i2}$ -Expressionslevel aus den Fettgewebslysaten der beiden Genotypen (Gohla *et al.*, 2007; Wiege *et al.*, 2012; Wiege *et al.*, 2013; Köhler *et al.*, 2014; Leiss *et al.*,

2014; Devanathan *et al.*, 2015; Keller *et al.*, 2015). Hierbei konnten keine Unterschiede in den $G\alpha_{i1}$ - und $G\alpha_{i2}$ -Expressionsleveln der $Gnai3^{ako}$ -Tiere beobachtet werden (siehe Abb. 4.4). Somit kann eine kompensatorische Hochregulation der minoren $G\alpha_{i1}$ -Isoform und prädominanten $G\alpha_{i2}$ -Isoform in Adipozyten-spezifischen $Gnai3$ -defizienten Mäusen ausgeschlossen werden. Interessanterweise konnte – anders als in der Studie von Leiss *et al.* – die $G\alpha_{i1}$ -Isoform nicht nur im WAT, sondern auch im BAT nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.4) (Leiss *et al.*, 2020).

5.2 Die Beteiligung von $G\alpha_{i3}$ an der Glukosehomöostase

Das Fettgewebe spielt eine wichtige Rolle bei der physiologischen Glukosehomöostase sowie bei der Entwicklung einer gestörten Glukosetoleranz im Rahmen eines Diabetes mellitus Typ 2 (Rosen & Spiegelman, 2006). Als Hauptursache für einen Diabetes mellitus Typ 2 wird eine chronische, subklinische Entzündung des Fettgewebes angesehen, die im Laufe der Zeit zu einer peripheren Insulinresistenz der Adipozyten führt (Shoelson *et al.*, 2006; Wu & Ballantyne, 2020). Die Studien von Leiss *et al.* und Wang *et al.* konnten eine Beteiligung der $G\alpha_i$ -Proteine an diesem Prozess nachweisen (Leiss *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Sowohl der funktionelle $G\alpha_{i\omega}$ -Knockout, als auch die selektive $Gnai2$ -Deletion in den Adipozyten schwächten die inflammatorischen Prozesse im Fettgewebe und damit die Entwicklung einer diätinduzierten Insulinresistenz ab (Leiss *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Die selektive Funktion von $G\alpha_{i3}$ bei diesem Prozess ist bisher ungeklärt. Die anfangs durchgeführten Glukosetoleranztests ergaben ein verbessertes Glukosehandling der $Gnai3^{ako}$ -Tiere (insbesondere $Gnai3^{ako_{CD}}$ -Tiere) im Vergleich zu ihren Geschwisterkontrollen (siehe Abb. 4.12). Die Fortführung der jeweiligen Spezialdiät führte zu einer Abnahme des zu beobachteten Effektes (siehe Abb. 4.13). Die Abnahme der Effekte mit zunehmender Studiendauer könnte durch das Cre/loxP-System bedingt sein. Durch die zeitlich begrenzte Tamoxifen-Injektion besteht die Gefahr, dass neu rekrutierte Vorläuferzellen, die keine oder nur eine sehr geringe Adiponektin-Expression aufweisen, der Cre-vermittelten Rekombination entgehen (Körner *et al.*, 2005). Bekräftigt wird diese Vermutung durch die Studienergebnisse von Ye *et al.*, die potenziell wirksames Tamoxifen

maximal 10 Tagen nach Ende der Tamoxifen-Injektion nachweisen konnten (Ye *et al.*, 2015). Zur Aufrechterhaltung des Effektes wäre demnach eine Tamoxifen-Injektion über den gesamten Versuchszeitraum notwendig.

Eine zentrale Bedeutung bei der Entwicklung einer peripheren Insulinresistenz wird den Makrophagen zugeschrieben. Sie gelten als Hauptursprungsort für bedeutende Entzündungsmediatoren wie TNF- α , IL-6 und IL-1 β (Weisberg *et al.*, 2003; Heilbronn & Campbell, 2008). Ihr Anteil am Gesamtzellgehalt im Fettgewebe kann sich im Rahmen einer Gewichtszunahme von ca. 10% auf ca. 40% erhöhen (Weisberg *et al.*, 2003). Zur Quantifizierung der Makrophagentätigkeit wird häufig die Expression des F4/80-Proteins, einem Antigen auf der Zelloberfläche von Gewebemakrophagen, analysiert (Khazen *et al.*, 2005). Die mRNA-Expressionsanalysen der proinflammatorischen Mediatoren im WAT der *Gnai3*^{ako}_{HFD}-Tiere zeigten eine signifikant reduzierte Expression dieses Markerproteins im Vergleich zu den Geschwisterkontrollen (siehe Abb. 4.11). Die von Nguyen *et al.* durchgeführten FACS-Analysen von Fettgewebemakrophagen (Adipose tissue macrophages, ATMs) konnten spezifische Subpopulationen identifizieren, die neben F4/80 auch CD11b und CD11c exprimierten. Während dreifach-positive Zellen eine hohe Zahl an proinflammatorischen Mediatoren freisetzen, sezernierten CD11c-negative Zellen sogar anti-inflammatorische Mediatoren wie IL-10 (Nguyen *et al.*, 2007). Dies suggeriert, dass Fluktuationen in der F4/80-Expression nicht per se mit einer veränderten Entzündungsaktivität im Fettgewebe einher gehen müssen. Bestätigt wird dies durch die unveränderten Expressionslevel der weiteren Makrophagenmarker wie MCP-1 und Chil-3, der proinflammatorischen Mediatoren IL-6, IFN- β , Socs3, IL-1 β , TNF- α , des IgE-Rezeptors Fc ϵ RI (siehe Abb. 4.11) sowie die unveränderte Insulinsensitivität in *Gnai3*^{ako}_{HFD}-Tieren (siehe Abb. 4.14).

Die signifikant erniedrigten Spiegel von IL-6 und TNF- α im WAT nach Adipozyten-spezifischer *Gnai2*-Deletion deuten darauf hin, dass einzig *G α _{i2}* für die verbesserte Glukosetoleranz der *G α _i*-defizienten Mausmodelle verantwortlich ist (Leiss *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Unklar bleibt, weshalb *Gnai3*^{ako}-Mäuse sowohl unter CD als auch unter HFD eine partiell verbesserte Glukosetoleranz aufweisen.

5.3 Effekt der $G\alpha_{i3}$ -Deletion auf die Funktion von weißen Adipozyten

$G\alpha_{i6}$ -Proteine sind über den cAMP/PKA-Signalweg an der Steuerung des Energiestoffwechsels der Adipozyten beteiligt (Leiss *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Erwartungsgemäß führte das Fehlen des $G\alpha_{i3}$ -Proteins in den Adipozyten des weißen Fettgewebes in den durchgeführten Analysen zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentrationen (siehe Abb. 4.15). Dieser Effekt konnte insbesondere im iWAT nach adrenerger Stimulation beobachtet werden (eine ähnliche Tendenz ist auch im gWAT erkennbar). Ursächlich für die ungleichen Effekte in den beiden Fettdepots könnte eine stärkere sympathische Innervation und eine höhere Umsatzrate für Katecholamine des iWATs im Vergleich zum gWAT sein (Bartness & Song, 2007; Lee *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016). Unklar bleibt, ob die Veränderungen der cAMP-Konzentrationen auf einer Interaktion von $G\alpha_{i3}$ mit den β -Adrenozeptoren oder dem Wegfall der inhibierenden Wirkung von $G\alpha_{i3}$ auf die Adenylylcyclase (effizientere $G\alpha_s$ -vermittelte Signalgebung) beruhen (Lafontan & Berlan, 1993; Martin *et al.*, 2004). Eine entsprechende cAMP-vermittelte Erhöhung der Lipolyserate mit verstärktem Triglyceridabbau wie in den Adipozyten-spezifischen *Gnai2*-defizienten Mäusen unter HFD konnte nicht beobachtet werden (siehe Abb. 4.16) (Leiss *et al.*, 2020). Ursächlich für den fehlenden Effekt der erhöhten cAMP-Spiegel auf die Lipolyserate könnte die subzelluläre Distribution der einzelnen Isoformen in den weißen Adipozyten sein. Immunhistochemische Analysen von primär kultivierten Adipozyten der Maus zeigten, dass $G\alpha_{i1}$ und $G\alpha_{i2}$ überwiegend im Bereich der Adiposomen zu finden sind, während $G\alpha_{i3}$ vorrangig perinukleär im Bereich des Golgi-Apparates zu finden ist (Cadrin *et al.*, 1993; Denis-Henriot *et al.*, 1996; Bégin-Heick *et al.*, 1997). Allein die Lokalisation der verschiedenen Isoformen suggeriert, dass die Regulation des Lipidstoffwechsels überwiegend von den $G\alpha_{i1}$ - und $G\alpha_{i2}$ -Proteinleveln abhängig ist. Das Fehlen des *per se* schwach exprimierten $G\alpha_{i3}$ -Proteins spezifisch in Adipozyten würde somit insbesondere im Golgi-Apparat zu einer Enthemmung der Adenylylcyclase und einem Anstieg der cAMP-Konzentration führen. Da cAMP nicht dazu in der Lage ist durch freie Diffusion zu einem beliebigen intrazellulären Effektor zu gelangen, sondern ausschließlich in definierten Kompartimenten wirkt, erscheint ein Effekt auf die lipolytischen

Enzyme unwahrscheinlich (Ill & Cheng, 2018). Neben den unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen der einzelnen Isoformen könnten auch modifizierte Aktivitätsniveaus der cAMP-abhängigen Effektoren (PKA, EPAC, Ionenkanäle) oder der Phosphodiesterasen ursächlich für die eingeschränkte cAMP-vermittelte Signaltransduktion sein. Neben den klassischen PKAs existieren mit den EPACs eine weitere wichtige Gruppe an cAMP-Rezeptoren. Obwohl beide durch denselben Botenstoff aktiviert werden, können sie sich bei der Kontrolle zellulärer Funktionen antagonisieren (Cheng *et al.*, 2008; Ill & Cheng, 2018). Eine verstärkte Expression der EPACs würde eine größere Menge des intrazellulären cAMPs binden, wodurch weniger cAMP für eine PKA-Aktivierung zur Verfügung stünde. Vergleichbares würde eine erhöhte Aktivität von PDEs bewirken. PDEs sind entscheidend für die Stärke und Dauer des cAMP-Signals in einer Zelle (Ill & Cheng, 2018). Eine Steigerung der Aktivität würde zu einem vorzeitigen Abbau von cAMP führen und damit die PKA-Aktivierung abschwächen (Li *et al.*, 2022). Eine Beteiligung der $G\alpha_i$ -Proteine und ihrer nachgeschalteten Effektoren an der komplexen Regulation der PDEs konnte wiederholt gezeigt werden (Omori & Kotera, 2007; Syrovatkina *et al.*, 2016). Da die metabolische bzw. lipolytische Aktivität des weißen Fettgewebes im direkten Zusammenhang mit der Morphologie der Adipozyten steht, konnten keine eindeutigen Veränderungen in der Gewichtszunahme (siehe Abb. 4.5 A-C), den Gesamtfettmassen (siehe Abb. 4.6) oder der Adipozytenmorphologie (siehe Abb. 4.7 und 4.8) festgestellt werden (Laurencikiene *et al.*, 2011). Daraus lässt sich schließen, dass $G\alpha_{i3}$ – anders als $G\alpha_{i2}$ – keine zentrale Rolle bei der Entwicklung von ernährungsbedingter Fettleibigkeit spielt (Leiss *et al.*, 2020).

Insgesamt lassen die fehlenden (eindeutigen) Veränderungen in den WAT-Depots der *Gnai3*^{ako}-Tiere vermuten, dass $G\alpha_{i3}$ allenfalls eine untergeordnete Rolle bei der Steuerung der weißen Adipozytenfunktion einnimmt.

5.4 Die Rolle von $G\alpha_{i3}$ im braunen Fettgewebe

Die Differenzierung von braunen Adipozyten ist komplex und unterliegt einer seriellen Aktivierung und Unterdrückung von Transkriptionsfaktoren, Co-Aktivatoren sowie Co-Repressoren. Hierzu zählen unter anderem PPAR γ , PGC-1 α , CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine (C/EBP) sowie microRNAs (Alcalá *et al.*,

2019). Obwohl sich die meisten braunen Adipozyten bereits während der Embryonalentwicklung aus mesenchymalen Stammzellen differenzieren, unterliegt das BAT auch nach der Embryogenese einer gewissen Dynamik (Tapia *et al.*, 2018; Alcalá *et al.*, 2019). Zu den verantwortlichen Mechanismen zählt unter anderem die kälteinduzierte BAT-Rekrutierung durch verstärkte Proliferation und Differenzierung von MSCs (Lee *et al.*, 2015; Nedergaard *et al.*, 2019). Initialisiert wird dieser Prozess durch die Aktivierung von β -Adrenozeptoren, die über den cAMP/PKA Signalweg die Mitoseaktivität der MSCs beeinflussen (Fredriksson & Nedergaard, 2002; Hinoi *et al.*, 2014; Labbé *et al.*, 2016). Das Maß der BAT-Rekrutierung ist damit abhängig von der Aktivität der β -Adrenozeptoren und ihrer nachgeschalteten Effektoren (Bronnikov *et al.*, 1999; Fukano *et al.*, 2016). Da der $G\alpha_{i3}$ -Mangel im BAT wider Erwarten zu reduzierten cAMP-Konzentrationen nach adrenerger Stimulation führte (siehe Abb. 4.15 E), ist ein negativer Einfluss der $G\alpha_{i3}$ -Deletion auf die kälteinduzierte BAT-Rekrutierung denkbar. Neben der kälteinduzierten BAT-Rekrutierung spielen auch inflammatorische Prozesse eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der Transdifferenzierung von Adipozyten. Während einige Immunzellen essenziell für die Kälteadaptation des BATs zu sein scheinen, wirken sich andere inflammatorische Signale negativ auf die Differenzierungsfähigkeit der Adipozyten aus (Nguyen *et al.*, 2011; Medrikova *et al.*, 2015). Verschiedene proinflammatorische Stimuli (z.B. TNF- α , IL-1 und LPS) können über Zytokin-, Mustererkennung-, TNF-, T- und B-Zell-Rezeptoren eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges und eine Herunterregulation adipogener Transkriptionsfaktoren bewirken (Bae *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017; Alcalá *et al.*, 2019). Zudem können Entzündungssignale die zelluläre Apoptose sowohl in weißen als auch in braunen Adipozyten fördern (Alcalá *et al.*, 2019). Die Studien von Wang *et al.* konnten bereits belegen, dass ein funktioneller Knockout von $G\alpha_{i/o}$ -Proteinen spezifisch in Adipozyten zu einer erhöhten Expression proinflammatorischer Mediatoren im BAT von HFD-Tieren führt (Wang *et al.*, 2020). Entsprechende Veränderungen im BAT der $Gnai3^{ako_{CD}}$ -Tiere könnten die Differenzierungsfähigkeit einschränken und über erhöhte Apoptoseraten zu reduzierten BAT-Massen führen. Weiterführend sollten deshalb die Expressionslevel von proinflammatorischen

Mediatoren, adipogenen Transkriptionsfaktoren und Apoptosemarkern im BAT untersucht werden.

Neben reduzierten BAT-Massen zeigten die *Gnai3^{ako}_{CD}*-Tiere auch einen verminderten Gesamtsauerstoffverbrauch im Vergleich zu ihren Geschwisterkontrollen (siehe Abb. 4.18 A). Der größte Teil des Sauerstoffs (ca. 98%), der die Gewebezellen erreicht wird von Mitochondrien zur Energieerzeugung durch oxidative Phosphorylierung verwendet (Wefers Bettink *et al.*, 2019). Einen wichtigen Botenstoff bei der Regulation der Mitochondrienfunktion stellt cAMP dar (Valsecchi *et al.*, 2013). Zahlreiche Studien lassen vermuten, dass cAMP zu einer Stimulation von Proteinkinasen in unterschiedlichen Kompartimenten der Mitochondrien führt (Schwoch *et al.*, 1990; Sardanelli *et al.*, 1996). Die Aktivierung des cAMP/PKA-Signalweges führt über Phosphorylierungsprozesse unterschiedlicher Komplexe der Atmungskette zu einer erhöhten Zellatmung (Carlucci *et al.*, 2008). Die reduzierten cAMP-Konzentrationen nach adrenerger Stimulation (siehe Abb. 4.15 E) könnten damit ein Grund für den verminderten Gesamtsauerstoffverbrauch der *Gnai3^{ako}_{CD}*-Tiere sein. Darüber hinaus haben die cAMP-Konzentrationen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie, die im direkten Zusammenhang mit den Autophagieprozessen der Mitochondrien (Mitophagie) steht (Valsecchi *et al.*, 2013). Die PKA-vermittelte Phosphorylierung von Drp1, einem Dynamin-verwandten GTPase-Protein, fördert die mitochondriale Elongation, indem es die Fusion ungehindert ermöglicht und so das Überleben der Zelle fördert (Chang & Blackstone, 2007; Cribbs & Strack, 2007; Gomes *et al.*, 2011). Hinweise auf eine komplexe Beteiligung von $G\alpha_{i3}$ an Autophagieprozessen wurden in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Ogier-Denis *et al.*, 1995; Gohla *et al.*, 2007). Während die Überexpression von $G\alpha_{i3}$ in humanen Zellen des Kolonkarzinoms zu einer Steigerung der autophagischen Sequestrierung führte, ergaben Analysen zur autophagischen Proteolyse in perfundierten Mäuselebern, dass ein Mangel an $G\alpha_{i3}$ zu einem Verlust der anti-autophagischen Wirkung von Insulin führt (Ogier-Denis *et al.*, 1995; Gohla *et al.*, 2007). Aktuelle, bisher unveröffentlichte Daten meiner Kollegen zu den Auswirkungen eines globalen $G\alpha_{i3}$ -Mangels auf die Funktion von Thrombozyten bestätigen eine Beteiligung von $G\alpha_{i3}$ am Autophagieprozess. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der

Thrombozyten zeigen eine Vielzahl von Mitochondrien-beladenen Autophagosomen sowie eine daraus resultierende reduzierte Anzahl an Mitochondrien. Die wenigen, noch vorhandenen Mitochondrien weisen eine atypisch-diffuse Struktur auf. Zudem konnte eine Herabregulation mitochondrialer Gene festgestellt werden (Dr. Veronika Leiss, persönliche Mitteilung). Daraus lässt sich ableiten, dass $G\alpha_{i3}$ nicht nur für die Regulation der Auto- bzw. Mitophagieprozesse verantwortlich ist, sondern auch einen relevanten Einfluss auf die Morphologie und damit die ordnungsgemäße Funktion der Mitochondrien haben könnte. Während für andere $G\alpha$ -Subfamilien, darunter $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_q$, ein solcher Effekt bereits nachgewiesen werden konnte, sind die Funktionen der ebenfalls exprimierten $G\alpha_i$ -Proteine noch unbekannt (Lyssand & Bajjalieh, 2007; Andreeva *et al.*, 2008; Benincá *et al.*, 2014).

Zusammenfassend lassen die Daten vermuten, dass die $G\alpha_{i3}$ -Deletion zu einer veränderten Mitochondrienmorphologie und einer eingeschränkten Mitochondrienfunktion im BAT der CD-Tiere führte. Weiterführende Analysen sollten neben der Isolation von braunen Adipozyten und der erneuten Bestimmung der intrazellulären cAMP- und ATP-Spiegel detaillierte Analysen der Mitochondrien beinhalten. Hierzu sollte die Morphologie der Mitochondrien mithilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen bewertet werden und ihre Funktion mittels Seahorse Analyzer untersucht werden, der über die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) und des extrazellulären pH-Werts (ECAR) wichtige Informationen über die mitochondriale Funktion, den oxidativen Stress und die metabolische Dysfunktion liefern kann (Divakaruni *et al.*, 2014).

Die fehlenden Unterschiede im BAT der HFD-Tiere könnten durch die ernährungsbedingten Veränderungen der Expressionslevel von $G\alpha_{i1-3}$ bedingt sein. Im Rahmen einer HFD kommt es im braunen Fettgewebe zu einer Hochregulation der dominant exprimierten $G\alpha_{i2}$ -Isoform, wodurch das Fehlen der $G\alpha_{i3}$ -Isoform funktionell kompensiert werden könnte (Gohla *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2020).

5.5 Limitationen der Studie

Unabhängig des gewählten Studiendesigns (Grundlagenforschung, klinische oder epidemiologische Forschung) unterliegen alle Studien gewissen Limitationen (Röhrig *et al.*, 2009; Ross & Bibler Zaidi, 2019).

Eine Limitation ergibt sich aus der prä-experimentellen Entscheidung, sich auf eine bestimmte Versuchsgruppe zu fokussieren, um so den Umfang der Studie einzuschränken (Ross & Bibler Zaidi, 2019). In dieser Studie wurde basierend auf den Analyseergebnissen von Leiss *et al.* und Wang *et al.* der Primärfokus auf Veränderungen in Tieren unter HFD gelegt (Leiss *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Aus diesem Grund wurde eine höhere Anzahl an Tieren unter HFD-Bedingungen gehalten und analysiert (siehe Abb. 4.5). Ein Teil der Analysen konnte folglich ausschließlich für die HFD-Tiere durchgeführt werden. Aufgrund der detektierten Veränderungen in den CD-Tieren wäre es rückblickend von Vorteil gewesen, identische Probenzahlen für CD- und HFD-Tiere zu wählen und alle Projektteile gleichermaßen durchzuführen.

Eine weitere Limitation ergibt sich aus den verwendeten Probenmaterialien. Da es sich bei diesen um Fettgewebslysate und nicht um isolierte Adipozyten handelte, kann keine exakte Aussage zur Rekombinationseffizienz getätigt werden. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die beobachteten Veränderungen nicht auf dem Adipozyten-spezifischen $G\alpha_{i3}$ -Mangel sondern beispielsweise auf adaptiven genetischen Veränderungen anderer Zellen beruhen (Teng *et al.*, 2013). Eine ergänzende Isolation der Adipozyten und erneute Analysen könnten diese Unsicherheiten zumindest partiell auflösen/klären.

Insgesamt verdeutlichen die genannten Limitationen den Bedarf weiterer *ex vivo* und *in vivo* Analysen.

6 Schlussfolgerung

Die Deletion der minoren $G\alpha_{i3}$ -Isoform spezifisch in Adipozyten führte zu unterschiedlichen Veränderungen im weißen und braunen Fettgewebe.

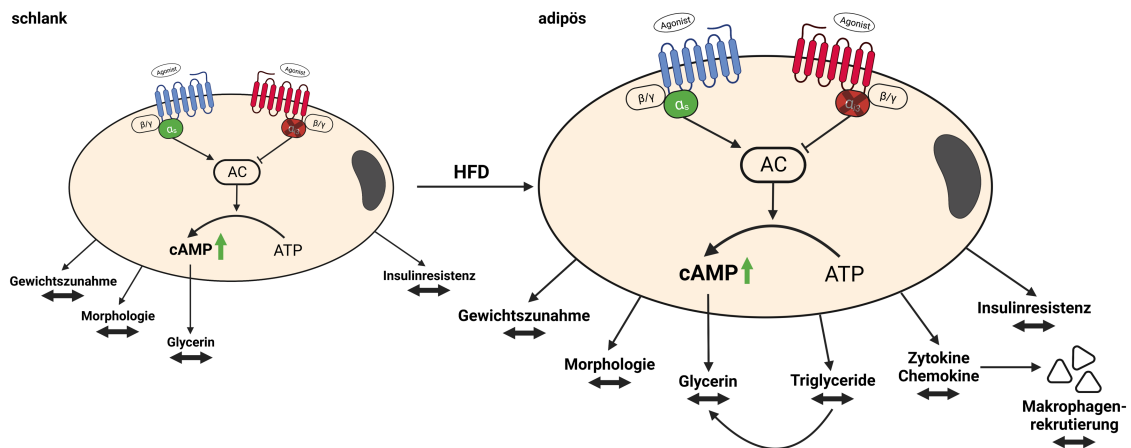


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der $G\alpha_{i3}$ -bedingten Veränderungen im WAT. Der Mangel an $G\alpha_{i3}$ führte erwartungsgemäß zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentrationen nach adrenerger Stimulation. Eindeutige Veränderungen in der metabolischen Funktion oder der Morphologie resultierten daraus jedoch nicht. HFD - Hochfettdiät; AC - Adenylylcyclasen; ATP - Adenosintriphosphat; cAMP - cyclisches Adenosinmonophosphat. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Das Fehlen des $G\alpha_{i3}$ -Proteins spezifisch in weißen Adipozyten führte sowohl unter CD als auch unter HFD vermutlich über eine Enthemmung der Adenylylcyclase zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Spiegel nach adrenerger Stimulation. Eindeutige Veränderungen in der Gewichtszunahme, der Morphologie, der metabolischen Aktivität, der Entzündungsaktivität oder der Glukosetoleranz - wie es in den $Gnai2^{ako}$ -Tieren der Fall war - ergaben sich hieraus nicht (Leiss *et al.*, 2020). Ursächlich für die fehlenden Veränderungen könnten die *per se* niedrigen Expressionslevel von $G\alpha_{i3}$ und/oder die subzelluläre Lokalisation von $G\alpha_{i3}$ sein (siehe 5.3). Dies deutet darauf hin, dass die weißen Adipozyten primär durch das dominant exprimierte $G\alpha_{i2}$ reguliert werden und $G\alpha_{i3}$ allenfalls eine ungeordnete Rolle einnimmt.

In den braunen Adipozyten führte das Fehlen des $G\alpha_{i3}$ -Proteins ausschließlich unter CD-Bedingungen zu signifikanten Veränderungen in den morphologischen und funktionellen Eigenschaften (siehe Abb. 6.2).

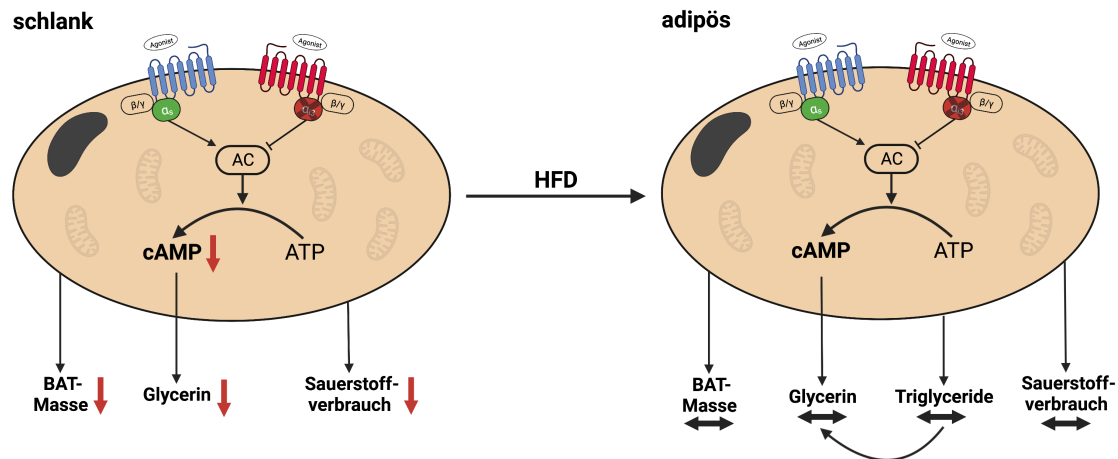


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung der $G\alpha_{13}$ -bedingten Veränderungen im BAT. Während der Mangel an $G\alpha_{13}$ keinen Einfluss auf das BAT unter HFD hatte, führte der $G\alpha_{13}$ -Mangel unter CD zu einer Reduktion der BAT-Massen, einer Abnahme der adrenergen Stimulationsfähigkeit mit reduzierten cAMP- und Glycerinspiegeln und folglich zu einem reduzierten Gesamtsauerstoffverbrauch. HFD - Hochfettdiät; AC - Adenylylcyclasen; ATP - Adenosintriphosphat; cAMP - cyclisches Adenosinmonophosphat. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Die Deletion der minoren $G\alpha_{13}$ -Isoform spezifisch in Adipozyten führte zu einer Reduktion der BAT-Masse, einer Abnahme der adrenergen Stimulationsfähigkeit mit reduzierten cAMP- und Glycerinspiegeln und folglich zu einem reduzierten Gesamtsauerstoffverbrauch der $Gnai3^{ako}$ -Tiere. Unter Einbezug der erhobenen Daten und des aktuellen Forschungsstandes wurde das in Abb. 6.3 abgebildete hypothetische Modell entwickelt.

Über einen bisher unbekanntem Mechanismus führte der Mangel an $G\alpha_{13}$ zu einer Abnahme der adrenergen Stimulationsfähigkeit und damit zu erniedrigten intrazellulären cAMP- und Glycerinspiegeln (als Parameter für die Lipolyseaktivität). Da das klassische Modell zur Wirkungsbeziehung von $G\alpha_{13}$ und den Adenylylcyclasen diese Veränderungen nicht erklärt, muss $G\alpha_{13}$ in Interaktion mit weiteren cAMP-regulierenden Effektoren/Proteinen stehen. Als mögliche Interaktionspartner kommen beispielsweise die β -Adrenozeptoren oder die Phosphodiesterasen in Frage. Die erniedrigten BAT-Massen könnten durch eine gesteigerte Autophagietätigkeit, erhöhte inflammationsbedingte Apoptoseraten und/oder eine reduzierte BAT-Rekrutierung bedingt sein, die sowohl auf veränderten cAMP-Spiegel als auch auf direkten $G\alpha_{13}$ -vermittelten Effekten beruhen könnten. Neben den offensichtlichen Faktoren wie der verminderten metabolischen Aktivität und den reduzierten BAT-Massen als Ursachen für den reduzierten Gesamtsauerstoffverbrauch der $Gnai3^{ako}$ -Tiere lassen insbesondere

die morphologischen Analysen der Thrombozyten aus *Gnai3^{-/-}*-Tieren (siehe 5.3) eine additive Beteiligung der Mitochondrien vermuten.

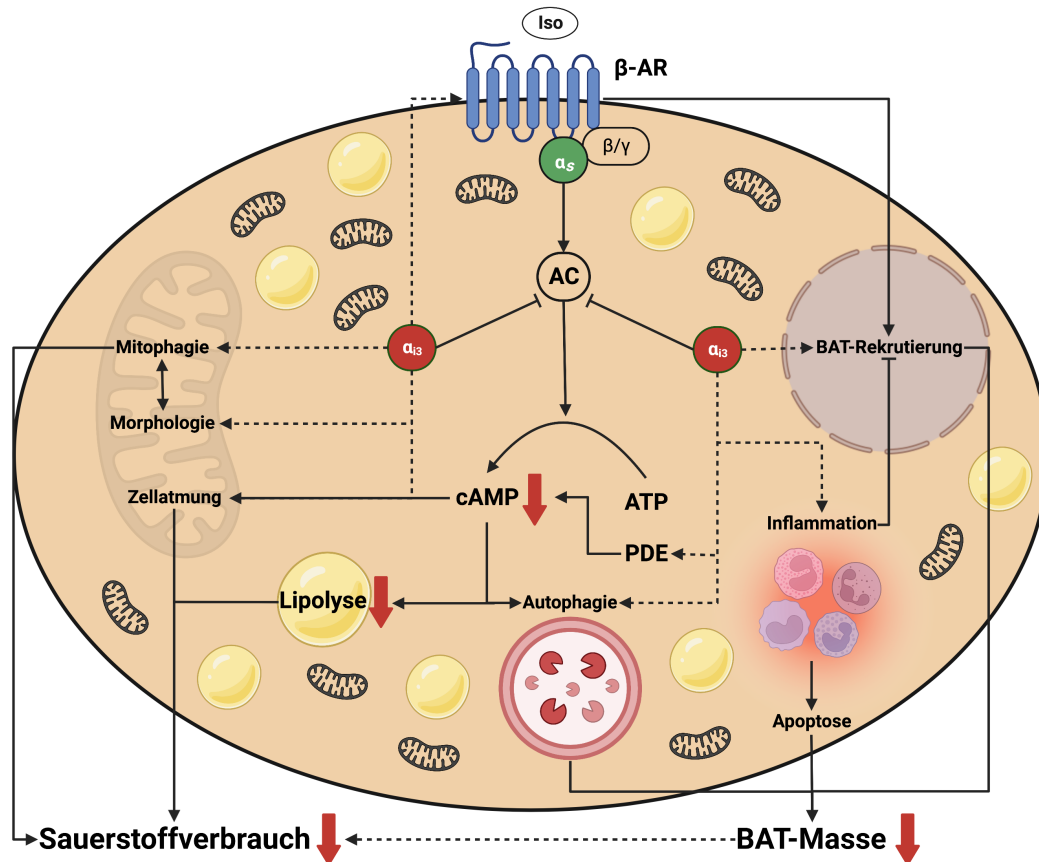


Abbildung 6.3: Hypothetisches Modell zur Beteiligung von $G\alpha_{13}$ an der Funktion brauner Adipozyten. Die Deletion von $G\alpha_{13}$ in den braunen Adipozyten führte über einen bisher unbekanntem Mechanismus zu einer Senkung der intrazellulären cAMP-Konzentrationen nach adrenerger Stimulation mit folglich verminderten Lipolyseraten. Die reduzierten BAT-Massen der Knockouttiere könnten durch gesteigerte Autophagie- und (inflammationsbedingte) Apoptosen in Kombination mit einer reduzierten BAT-Rekrutierung bedingt sein. Neben den reduzierten BAT-Massen und der verminderten metabolischen Aktivität kommen auch eine cAMP-vermittelte Inhibition der Atmungskette und eine gesteigerte mitophagische Aktivität als Ursache für den reduzierten Sauerstoffverbrauch in Frage (nähere Erklärung siehe Text). Iso - Isoproterenol; β -AR - β -Adrenozeptoren; AC - Adenylylcyclasen; ATP - Adenosintriphosphat; cAMP - cyclisches Adenosinmonophosphat. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

In den Mitochondrien könnten die verminderten cAMP-Spiegel zu einer Inhibition der Atmungskette geführt haben und so mitverantwortlich für den erniedrigten Sauerstoffverbrauch sein. Darüber hinaus könnte die $G\alpha_{13}$ -Deletion eine Veränderung der mitochondrialen Morphologie bedingt und so mitophagische Prozesse initialisiert haben. Die Daten zeigen, dass $G\alpha_{13}$ entscheidend an der Regulation der braunen Adipozytenfunktion und -morphologie beteiligt ist. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind dabei weitestgehend unklar und bedürfen weiterer *ex vivo* und *in vivo* Analysen der braunen Adipozyten und speziell ihrer Mitochondrien.

7 Zusammenfassung

Präadipositas und Adipositas sind mit einer Vielzahl von Komorbiditäten wie dem metabolischen Syndrom, kardiovaskulären Erkrankungen und bestimmten Typen von Karzinomen assoziiert. Ursächlich für eine exzessive Akkumulation von Fett ist ein Ungleichgewicht zwischen der Energiezufuhr und dem Energieverbrauch. An der Aufnahme, Speicherung und Verteilung dieses Energieüberschusses sind zahlreiche Organe beteiligt. Die steigende Prävalenz von Präadipositas und Adipositas sorgt für ein zunehmendes Interesse an der Identifizierung beteiligter Strukturen als mögliche (neue) therapeutische Ziele für die Behandlung von Fettleibigkeit.

Einen vielversprechenden Angriffspunkt stellen die inhibitorischen G-Proteine in Adipozyten dar. Sowohl das funktionelle Fehlen aller Pertussis-Toxin (PTX)-sensitiven $G_{\alpha_{i/o}}$ -Proteine, als auch die selektive *Gnai2*-Deletion in den Adipozyten führte zu einer veränderten Körperzusammensetzung, einer gesteigerten Stoffwechselaktivität und einer abgeschwächten Entwicklung der diätinduzierten Insulinresistenz (Leiss *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Die Rolle der minoren $G_{\alpha_{i3}}$ -Isoform bei diesen Prozessen ist bisher ungeklärt und wurde mit Hilfe von Adipozyten-spezifischen $G_{\alpha_{i3}}$ -defizienten Mäusen (*Gnai3*^{ako}) untersucht.

Im weißen Fettgewebe führte die Deletion des $G_{\alpha_{i3}}$ -Proteins zu einem Anstieg der cAMP-Konzentrationen nach adrenerger Stimulation ohne die Lipolyseaktivität oder die Adipozytenmorphologie entscheidend zu beeinflussen. Ebenso wenig konnten eindeutige Veränderungen in der Expression der proinflammatorischen Mediatoren, der *in vivo* Glukosetoleranz oder der *in vivo* Insulinsensitivität festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass die Regulation der weißen Adipozytenfunktion primär von der Aktivität der dominant exprimierte $G_{\alpha_{i2}}$ -Isoform abhängig ist und das minore $G_{\alpha_{i3}}$ -Protein allenfalls eine untergeordnete Rolle einnimmt (Leiss *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020).

Überraschende Versuchsergebnisse ließen sich im braunen Fettgewebe der Knockouttiere unter Kontrolldiät detektieren. Über einen bisher unbekanntem Mechanismus führte der Mangel an $G_{\alpha_{i3}}$ zu einer Abnahme der adrenergen Stimulationsfähigkeit und folglich zu signifikant reduzierten post-stimulatorischen

cAMP- und Glycerinkonzentrationen. Zudem führte die *Gnai3*-Deletion zu einer signifikanten Abnahme der braunen Fettgewebssmasse. Dementsprechend zeigte sich auch der Gesamtsauerstoffverbrauch der *Gnai3*^{ako}_{CD}-Tiere vermindert. Die Daten zeigen, dass $G\alpha_{i3}$ entscheidend an der Regulation der braunen Adipozytenfunktion und vermutlich auch an der Adipozytenmorphologie beteiligt ist. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind dabei weitestgehend ungeklärt und bedürfen weiterer *ex vivo* und *in vivo* Analysen.

8 Literaturverzeichnis

Abdelaal M, le Roux CW, Docherty NG (2017). Morbidity and mortality associated with obesity. *Ann Transl Med*, **5**: 161.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J, Group IDFETFC (2005). The metabolic syndrome-
-a new worldwide definition. *Lancet*, **366**: 1059-1062.

Alberts B (2002). *Molecular biology of the cell [Hauptbd.]*. 4. Garland.

Alcalá M, Calderon-Dominguez M, Serra D, Herrero L, Viana M (2019). Mechanisms of Impaired Brown Adipose Tissue Recruitment in Obesity. *Front Physiol*, **10**: 94.

Almeida-Oliveira F, Leandro JGB, Ausina P, Sola-Penna M, Majerowicz D (2017). Reference genes for quantitative PCR in the adipose tissue of mice with metabolic disease. *Biomed Pharmacother*, **88**: 948-955.

Amigoni L, Colombo S, Belotti F, Alberghina L, Martegani E (2015). The transcription factor Swi4 is target for PKA regulation of cell size at the G1 to S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, **14**: 2429-2438.

Amisten S, Neville M, Hawkes R, Persaud SJ, Karpe F, Salehi A (2015). An atlas of G-protein coupled receptor expression and function in human subcutaneous adipose tissue. *Pharmacology & Therapeutics*, **146**: 61-93.

Andreeva AV, Kutuzov MA, Voyno-Yasenetskaya TA (2008). G alpha12 is targeted to the mitochondria and affects mitochondrial morphology and motility. *FASEB J*, **22**: 2821-2831.

Arner P (1997). Regional adiposity in man. *J Endocrinol*, **155**: 191-192.

Arner P, Hellström L, Wahrenberg H, Brönnegård M (1990). Beta-adrenoceptor expression in human fat cells from different regions. *J Clin Invest*, **86**: 1595-1600.

Bae J, Chen J, Zhao L (2015). Chronic activation of pattern recognition receptors suppresses brown adipogenesis of multipotent mesodermal stem cells and brown pre-adipocytes. *Biochemistry and Cell Biology*, **93**: 251-261.

Barella LF, Jain S, Kimura T, Pydi SP (2021). Metabolic roles of G protein-coupled receptor signaling in obesity and type 2 diabetes. *FEBS J*, **288**: 2622-2644.

Bartness TJ, Song CK (2007). Thematic review series: Adipocyte Biology. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue. *Journal of Lipid Research*, **48**: 1655-1672.

Becher B, Waisman A, Lu LF (2018). Conditional Gene-Targeting in Mice: Problems and Solutions. *Immunity*, **48**: 835-836.

Beer-Hammer S, Lee SC, Mauriac SA, Leiss V, Groh IAM, Novakovic A, Piekorz RP, Bucher K, Chen C, Ni K, Singer W, Harasztosi C, Schimmang T, Zimmermann U, Pfeffer K, Birnbaumer L, Forge A, Montcouquiol M, Knipper M, Nürnberg B, Rüttiger L (2018). Gai Proteins are Indispensable for Hearing. *Cell Physiol Biochem*, **47**: 1509-1532.

Bégin-Heick N, Black MA, Gaffield J, Cadrin M (1997). Subcellular localization of G-proteins in primary-cultured mouse preadipocytes and adipocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, **65**: 259-266.

Belluscio L, Gold GH, Nemes A, Axel R (1998). Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron*, **20**: 69-81.

Benincá C, Planagumà J, de Freitas Shuck A, Acín-Perez R, Muñoz JP, de Almeida MM, Brown JH, Murphy AN, Zorzano A, Enríquez JA, Aragay AM (2014). A new non-canonical pathway of G α (q) protein regulating mitochondrial dynamics and bioenergetics. *Cell Signal*, **26**: 1135-1146.

Berry DC, Stenesen D, Zeev D, Graff JM (2013). The developmental origins of adipose tissue. *Development*, **140**: 3939.

Blüher M (2009). Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **117**: 241-250.

Blumer JB, Cismowski MJ, Sato M, Lanier SM (2005). AGS proteins: receptor-independent activators of G-protein signaling. *Trends Pharmacol Sci*, **26**: 470-476.

Bray GA (1990). Obesity: historical development of scientific and cultural ideas. *Int J Obes*, **14**: 909-926.

Bray GA (2004). Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**: 2583-2589.

Britton KA, Fox CS (2011). Ectopic Fat Depots and Cardiovascular Disease. *Circulation*, **124**: e837-e841.

Bronnikov G, Bengtsson T, Kramarova L, Golozubova V, Cannon B, Nedergaard J (1999). β 1 to β 3 Switch in Control of Cyclic Adenosine Monophosphate during Brown Adipocyte Development Explains Distinct β -Adrenoceptor Subtype Mediation of Proliferation and Differentiation¹. *Endocrinology*, **140**: 4185-4197.

Brüning JC, Kahn CR, Krone W, Müller-Wieland D (1999). Konditionale Mutagenese — Knockout-Mäuse der zweiten Generation als Modelle internistischer Erkrankungen. *Medizinische Klinik*, **94**: 564.

Brushia RJ, Walsh DA (1999). Phosphorylase kinase: the complexity of its regulation is reflected in the complexity of its structure. *Front Biosci*, **4**: D618-641.

Buselmaier W (2009). *Biologie für Mediziner*. 11., völlig neubearbeitete Auflage. Springer Berlin Heidelberg.

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

Cadrin M, McFarlane-Anderson N, Bégin-Heick N (1993). Identification and localization of G(i) alpha 3 in the clonal adipocyte cell lines HGFu and Ob17. *Biochem Cell Biol*, **71**: 518-521.

Calvert PD, Krasnoperova NV, Lyubarsky AL, Isayama T, Nicoló M, Kosaras B, Wong G, Gannon KS, Margolskee RF, Sidman RL, Pugh EN, Makino CL, Lem J (2000). Phototransduction in transgenic mice after targeted deletion of the rod transducin α -subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**: 13913.

Cannon B, Nedergaard J (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, **84**: 277-359.

Capecchi MR (1989). The new mouse genetics: Altering the genome by gene targeting. *Trends in Genetics*, **5**: 70-76.

Carlucci A, Lignitto L, Feliciello A (2008). Control of mitochondria dynamics and oxidative metabolism by cAMP, AKAPs and the proteasome. *Trends in Cell Biology*, **18**: 604-613.

Casey PJ, Fong HK, Simon MI, Gilman AG (1990). Gz, a guanine nucleotide-binding protein with unique biochemical properties. *J Biol Chem*, **265**: 2383-2390.

Ceddia Ryan P, Collins S (2020). A compendium of G-protein-coupled receptors and cyclic nucleotide regulation of adipose tissue metabolism and energy expenditure. *Clinical Science*, **134**: 473-512.

Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJP, Zuker CS (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, **444**: 288-294.

Chang CR, Blackstone C (2007). Drp1 phosphorylation and mitochondrial regulation. *EMBO reports*, **8**: 1088-1089.

Cheng X, Ji Z, Tsalkova T, Mei F (2008). Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, **40**: 651-662.

Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**: 156-159.

Collins S (2012). β -Adrenoceptor Signaling Networks in Adipocytes for Recruiting Stored Fat and Energy Expenditure. *Frontiers in Endocrinology*, **2**.

Corrales P, Vidal-Puig A, Medina-Gómez G (2018). PPARs and Metabolic Disorders Associated with Challenged Adipose Tissue Plasticity. *International journal of molecular sciences*, **19**: 2124.

Corvol JC, Muriel MP, Valjent E, Féger J, Hanoun N, Girault JA, Hirsch EC, Hervé D (2004). Persistent increase in olfactory type G-protein alpha subunit levels may underlie D1 receptor functional hypersensitivity in Parkinson disease. *J Neurosci*, **24**: 7007-7014.

Cousin B, Cinti S, Morrioni M, Raimbault S, Ricquier D, Pénicaud L, Casteilla L (1992). Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci*, **103 (Pt 4)**: 931-942.

Cribbs JT, Strack S (2007). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO reports*, **8**: 939-944.

Davey RA, MacLean HE (2006). Current and future approaches using genetically modified mice in endocrine research. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **291**: E429-438.

Denis-Henriot D, de Mazancourt P, Goldsmith PK, Giudicelli Y (1996). G proteins in adipocytes and preadipocytes: Characterization, subcellular distribution, and potential roles for Gi2 and/or Gi3 in the control of cell proliferation. *Cellular Signalling*, **8**: 225-234.

Desruisseaux MS, Nagajyothi, Trujillo ME, Tanowitz HB, Scherer PE (2007). Adipocyte, Adipose Tissue, and Infectious Disease. *Infection and Immunity*, **75**: 1066.

Devanathan V, Hagedorn I, Köhler D, Pexa K, Cherpokova D, Kraft P, Singh M, Rosenberger P, Stoll G, Birnbaumer L, Piekorz RP, Beer-Hammer S, Nieswandt B, Nürnberg B (2015). Platelet Gi protein Gai2 is an essential mediator of thrombo-inflammatory organ damage in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**: 6491-6496.

Divakaruni AS, Jastroch M (2022). A practical guide for the analysis, standardization and interpretation of oxygen consumption measurements. *Nature Metabolism*, **4**: 978-994.

Divakaruni AS, Paradyse A, Ferrick DA, Murphy AN, Jastroch M (2014). *Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data*. 547. Elsevier.

Dizayee S, Kaestner S, Kuck F, Hein P, Klein C, Piekorz RP, Meszaros J, Matthes J, Birnbaumer L, Nürnberg B, Herzig S (2011). Gai2- and Gai3-specific regulation of voltage-dependent L-type calcium channels in cardiomyocytes. *PLoS One*, **6**: e24979.

Dmitriev AA, Kashuba VI, Haraldson K, Senchenko VN, Pavlova TV, Kudryavtseva AV, Anedchenko EA, Krasnov GS, Pronina IV, Loginov VI,

Kondratieva TT, Kazubskaya TP, Braga EA, Yenamandra SP, Ignatjev I, Ernberg I, Klein G, Lerman MI, Zabarovsky ER (2012). Genetic and epigenetic analysis of non-small cell lung cancer with NotI-microarrays. *Epigenetics*, **7**: 502-513.

Duc NM, Kim HR, Chung KY (2015). Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *Eur J Pharmacol*, **763**: 214-222.

Esteve Ràfols M (2014). Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol Nutr*, **61**: 100-112.

Evans BA, Merlin J, Bengtsson T, Hutchinson DS (2019). Adrenoceptors in white, brown, and brite adipocytes. *British Journal of Pharmacology*, **176**: 2416-2432.

Fang Y, Kenakin T, Liu C (2015). Editorial: Orphan GPCRs As Emerging Drug Targets. *Frontiers in Pharmacology*, **6**.

Feng H, Khalil S, Neubig RR, Sidiropoulos C (2018). A mechanistic review on GNAO1-associated movement disorder. *Neurobiol Dis*, **116**: 131-141.

Finkelstein EA, Khavjou OA, Thompson H, Trogdon JG, Pan L, Sherry B, Dietz W (2012). Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *Am J Prev Med*, **42**: 563-570.

Flier JS, Cook KS, Usher P, Spiegelman BM (1987). Severely impaired adipin expression in genetic and acquired obesity. *Science*, **237**: 405-408.

Fredriksson JM, Nedergaard J (2002). Norepinephrine specifically stimulates ribonucleotide reductase subunit R2 gene expression in proliferating brown adipocytes: mediation via a cAMP/PKA pathway involving Src and Erk1/2 kinases. *Experimental cell research*, **274**: 207-215.

Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, **63**: 1256-1272.

Fukano K, Okamatsu-Ogura Y, Tsubota A, Nio-Kobayashi J, Kimura K (2016). Cold Exposure Induces Proliferation of Mature Brown Adipocyte in a β 3-Adrenergic Receptor-Mediated Pathway. *PLoS One*, **11**: e0166579.

Gaudin C, Ishikawa Y, Wight DC, Mahdavi V, Nadal-Ginard B, Wagner TE, Vatner DE, Homcy CJ (1995). Overexpression of Gs alpha protein in the hearts of transgenic mice. *The Journal of clinical investigation*, **95**: 1676-1683.

Gohla A, Klement K, Piekorz RP, Pexa K, vom Dahl S, Spicher K, Dreval V, Häussinger D, Birnbaumer L, Nürnberg B (2007). An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein Gi3 in the antiautophagic action of insulin in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**: 3003-3008.

Gomes LC, Benedetto GD, Scorrano L (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature cell biology*, **13**: 589-598.

- Hall B, Limaye A, Kulkarni AB (2009). Overview: generation of gene knockout mice. *Curr Protoc Cell Biol*, **Chapter 19**: Unit 19 12 19 12 11-17.
- Haslam D (2016). Weight management in obesity - past and present. *Int J Clin Pract*, **70**: 206-217.
- Hauner H (2018). Prävention und Therapie der Adipositas. *der junge zahnarzt*, **9**: 35-39.
- He W, Danilova V, Zou S, Hellekant G, Max M, Margolskee RF, Damak S (2002). Partial rescue of taste responses of alpha-gustducin null mice by transgenic expression of alpha-transducin. *Chem Senses*, **27**: 719-727.
- Heilbronn LK, Campbell LV (2008). Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Current pharmaceutical design*, **14**: 1225-1230.
- Heinrich, Castell JV, Andus T (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*, **265**: 621-636.
- Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Löffler G (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9., vollst. überarb. Aufl. Springer.
- Hellmér J, Marcus C, Sonnenfeld T, Arner P (1992). Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **75**: 15-20.
- Herz CT, Kiefer FW (2019). Adipose tissue browning in mice and humans. *Journal of Endocrinology*, **241**: R97-R109.
- Hill JO, Wyatt HR, Peters JC (2012). Energy balance and obesity. *Circulation*, **126**: 126-132.
- Hinoi E, Iezaki T, Fujita H, Watanabe T, Odaka Y, Ozaki K, Yoneda Y (2014). PI3K/Akt is involved in brown adipogenesis mediated by growth differentiation factor-5 in association with activation of the Smad pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **450**: 255-260.
- Hiort O, Danne T, Wabitsch M (2010). *Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie*. Springer Berlin Heidelberg.
- Ho MKC, Wong YH (2001). Gz signaling: emerging divergence from Gi signaling. *Oncogene*, **20**: 1615-1625.
- Hoon MA, Northup JK, Margolskee RF, Ryba NJ (1995). Functional expression of the taste specific G-protein, alpha-gustducin. *The Biochemical journal*, **309 (Pt 2)**: 629-636.
- Hruby A, Hu FB (2015). The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*, **33**: 673-689.

- Hu GM, Mai TL, Chen CM (2017). Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution. *Sci Rep*, **7**: 15495.
- Huang H, Zheng J, Shen N, Wang G, Zhou G, Fang Y, Lin J, Zhao J (2018). Identification of pathways and genes associated with synovitis in osteoarthritis using bioinformatics analyses. *Sci Rep*, **8**: 10050.
- Ibrahim MM (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev*, **11**: 11-18.
- Ill WGR, Cheng X (2018). Intracellular cAMP Sensor EPAC: Physiology, Pathophysiology, and Therapeutics Development. *Physiological Reviews*, **98**: 919-1053.
- Ji TH, Grossmann M, Ji I (1998). G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem*, **273**: 17299-17302.
- Jia E, Pan M, Liu Z, Zhou Y, Zhao X, Dong J, Bai Y, Ge Q (2020). Transcriptomic profiling of differentially expressed genes and related pathways in different brain regions in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, **732**: 135074.
- Johansson SM, Lindgren E, Yang JN, Herling AW, Fredholm BB (2008). Adenosine A1 receptors regulate lipolysis and lipogenesis in mouse adipose tissue-interactions with insulin. *Eur J Pharmacol*, **597**: 92-101.
- Keller K, Maass M, Dizayee S, Leiss V, Annala S, Köth J, Seemann WK, Müller-Ehmsen J, Mohr K, Nürnberg B, Engelhardt S, Herzig S, Birnbaumer L, Matthes J (2015). Lack of Gαi2 leads to dilative cardiomyopathy and increased mortality in β1-adrenoceptor overexpressing mice. *Cardiovasc Res*, **108**: 348-356.
- Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J (2008). Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)*, **32**: 1431-1437.
- Kershaw EE, Flier JS (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**: 2548-2556.
- Khazen W, M'Bika J-P, Tomkiewicz C, Benelli C, Chany C, Achour A, Forest C (2005). Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS Letters*, **579**: 5631-5634.
- Kiermayer S, Biondi RM, Imig J, Plotz G, Haupenthal J, Zeuzem S, Piiper A (2005). Epac activation converts cAMP from a proliferative into a differentiation signal in PC12 cells. *Mol Biol Cell*, **16**: 5639-5648.
- Kim H, Kim M, Im SK, Fang S (2018). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res*, **34**: 147-159.
- Kim S-N, Jung Y-S, Kwon H-J, Seong JK, Granneman JG, Lee Y-H (2016). Sex differences in sympathetic innervation and browning of white adipose tissue of mice. *Biology of Sex Differences*, **7**: 67.

Köhler D, Devanathan V, Bernardo de Oliveira Franz C, Eldh T, Novakovic A, Roth JM, Granja T, Birnbaumer L, Rosenberger P, Beer-Hammer S, Nürnberg B (2014). Gai2- and Gai3-deficient mice display opposite severity of myocardial ischemia reperfusion injury. *PLoS One*, **9**: e98325.

Körner A, Wabitsch M, Seidel B, Fischer-Posovszky P, Berthold A, Stumvoll M, Blüher M, Kratzsch J, Kiess W (2005). Adiponectin expression in humans is dependent on differentiation of adipocytes and down-regulated by humoral serum components of high molecular weight. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **337**: 540-550.

Krintel C, Mörgelin M, Logan DT, Holm C (2009). Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by protein kinase A in vitro promotes an increase in its hydrophobic surface area. *FEBS J*, **276**: 4752-4762.

Kuang J, Yan X, Genders AJ, Granata C, Bishop DJ (2018). An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS One*, **13**: e0196438.

Kuhn R, Torres RM (2002). Cre/loxP recombination system and gene targeting. *Methods Mol Biol*, **180**: 175-204.

Kurlander AB, Abraham S, Rion JW (1956). Obesity and disease. *Hum Biol*, **28**: 203-216.

Labbé SM, Mouchiroud M, Caron A, Secco B, Freinkman E, Lamoureux G, Gélinas Y, Lecomte R, Bossé Y, Chimin P (2016). mTORC1 is required for brown adipose tissue recruitment and metabolic adaptation to cold. *Scientific reports*, **6**: 1-17.

Lafontan M, Berlan M (1993). Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *Journal of Lipid Research*, **34**: 1057-1091.

Laurencikiene J, Skurk T, Kulyté A, Hedén P, Åström G, Sjölin E, Rydén M, Hauner H, Arner P (2011). Regulation of Lipolysis in Small and Large Fat Cells of the Same Subject. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **96**: E2045-E2049.

Lebas E, Paquot N, Scheen AJ (2003). [Adiponectin: a new adipocytokine]. *Rev Med Liege*, **58**: 554-558.

Lee YH, Petkova AP, Konkar AA, Granneman JG (2015). Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. *FASEB J*, **29**: 286-299.

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 Gα(i2). *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **307**: E800-812.

- Leiss V, Reisinger E, Speidel A, Beer-Hammer S, Nürnberg B (2021). Analyses of Gna13-iresGFP reporter mice reveal unknown G α (i3) expression sites. *Sci Rep*, **11**: 14271.
- Leiss V, Schonsiegel A, Gnad T, Kerner J, Kaur J, Sartorius T, Machann J, Schick F, Birnbaumer L, Haring HU, Pfeifer A, Nürnberg B (2020). Lack of Galphai2 proteins in adipocytes attenuates diet-induced obesity. *Mol Metab*, **40**: 101029.
- Li Y, Li Z, Ngandiri DA, Llerins Perez M, Wolf A, Wang Y (2022). The Molecular Brakes of Adipose Tissue Lipolysis. *Frontiers in Physiology*, **13**.
- Lidell ME (2019). Brown Adipose Tissue in Human Infants. *Handb Exp Pharmacol*, **251**: 107-123.
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **2**: 17023.
- Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, Beguinot F, Miele C (2019). Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci*, **20**.
- Lukowski R, Weber S, Weinmeister P, Feil S, Feil R (2005). Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-Signalwegs in der Maus. *BIOspektrum*, **3/2005**: 287-290.
- Luo L, Liu M (2016). Adipose tissue in control of metabolism. *Journal of Endocrinology*, **231**: R77-R99.
- Luong Q, Huang J, Lee KY (2019). Deciphering White Adipose Tissue Heterogeneity. *Biology (Basel)*, **8**.
- Lyssand JS, Bajjalieh SM (2007). The heterotrimeric [corrected] G protein subunit G alpha i is present on mitochondria. *FEBS Lett*, **581**: 5765-5768.
- Manglik A, Kruse AC (2017). Structural Basis for G Protein-Coupled Receptor Activation. *Biochemistry*, **56**: 5628-5634.
- Mårin P, Andersson B, Ottosson M, Olbe L, Chowdhury B, Kvist H, Holm G, Sjöström L, Björntorp P (1992). The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism*, **41**: 1242-1248.
- Martin NP, Whalen EJ, Zamah MA, Pierce KL, Lefkowitz RJ (2004). PKA-mediated phosphorylation of the β 1-adrenergic receptor promotes Gs/Gi switching. *Cellular Signalling*, **16**: 1397-1403.
- McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS (2005). G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci*, **62**: 551-577.
- Medrikova D, Sijmonsma TP, Sowodniok K, Richards DM, Delacher M, Sticht C, Gretz N, Schafmeier T, Feuerer M, Herzig S (2015). Brown Adipose Tissue

Harbors a Distinct Sub-Population of Regulatory T Cells. *PLoS One*, **10**: e0118534.

Misra A, Vikram NK (2003). Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. *Nutrition*, **19**: 457-466.

Mittal B (2019). Subcutaneous adipose tissue & visceral adipose tissue. *The Indian journal of medical research*, **149**: 571-573.

Mosinger B, Damak S, Margolskee RF (2010). *Chapter 209 - G Proteins in Gustatory Transduction*. Academic Press.

Mulya A, Kirwan JP (2016). Brown and Beige Adipose Tissue: Therapy for Obesity and Its Comorbidities? *Endocrinol Metab Clin North Am*, **45**: 605-621.

Munday M (2002). Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Society transactions*, **30**: 1059-1064.

Nagata K, Ye C, Jain M, Milstone DS, Liao R, Mortensen RM (2000). Galpha(i2) but not Galpha(i3) is required for muscarinic inhibition of contractility and calcium currents in adult cardiomyocytes. *Circ Res*, **87**: 903-909.

Nair RR, Kiran A, Saini DK (2017). G protein Signaling, Journeys Beyond the Plasma Membrane. *Journal of the Indian Institute of Science*, **97**: 95-108.

Nedergaard J, Wang Y, Cannon B (2019). Cell proliferation and apoptosis inhibition: essential processes for recruitment of the full thermogenic capacity of brown adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1864**: 51-58.

Nguyen KD, Qiu Y, Cui X, Goh YPS, Mwangi J, David T, Mukundan L, Brombacher F, Locksley RM, Chawla A (2011). Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature*, **480**: 104-108.

Nguyen MA, Favelyukis S, Nguyen A-K, Reichart D, Scott PA, Jenn A, Liu-Bryan R, Glass CK, Neels JG, Olefsky JM (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *Journal of Biological Chemistry*, **282**: 35279-35292.

Nichols AS, Floyd DH, Bruinsma SP, Narzinski K, Baranski TJ (2013). Frizzled receptors signal through G proteins. *Cellular Signalling*, **25**: 1468-1475.

Nürnberg B, Ahnert-Hilger G (1996). Potential roles of heterotrimeric G proteins of the endomembrane system. *FEBS Lett*, **389**: 61-65.

Nürnberg B, Spicher K, Harhammer R, Bosserhoff A, Frank R, Hilz H, Schultz G (1994). Purification of a novel G-protein alpha 0-subtype from mammalian brain. *Biochem J*, **300 (Pt 2)**: 387-394.

- Ofei F (2005). Obesity - a preventable disease. *Ghana Med J*, **39**: 98-101.
- Offermanns S, Hashimoto K, Watanabe M, Sun W, Kurihara H, Thompson RF, Inoue Y, Kano M, Simon MI (1997). Impaired motor coordination and persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking Galphaq. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**: 14089-14094.
- Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, Simon MI (1997). Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature*, **389**: 183-186.
- Offermanns S, Zhao LP, Gohla A, Sarosi I, Simon MI, Wilkie TM (1998). Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in G alpha q/G alpha 11-mutant mice. *EMBO J*, **17**: 4304-4312.
- Ogier-Denis E, Couvineau A, Maoret JJ, Hourri JJ, Bauvy C, De Stefanis D, Isidoro C, Laburthe M, Codogno P (1995). A Heterotrimeric G i3-protein Controls Autophagic Sequestration in the Human Colon Cancer Cell Line HT-29 (*). *Journal of Biological Chemistry*, **270**: 13-16.
- Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM (2010). GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell*, **142**: 687-698.
- Oldham WM, Hamm HE (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**: 60-71.
- Omori K, Kotera J (2007). Overview of PDEs and Their Regulation. *Circulation Research*, **100**: 309-327.
- Organization WH (2011). *Waist Circumference and Waist-hip Ratio: Report of a WHO Expert Consultation, Geneva, 8-11 December 2008* World Health Organization.
- Organization WH (2022). *WHO European regional obesity report 2022* World Health Organization. Regional Office for Europe.
- Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H, Sunaga Y, Yano H, Matsuura Y, Iwanaga T, Takai Y, Seino S (2000). cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol*, **2**: 805-811.
- Park A, Kim WK, Bae KH (2014). Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*, **6**: 33-42.
- Parlee SD, Lentz SI, Mori H, MacDougald OA (2014). *Chapter Six - Quantifying Size and Number of Adipocytes in Adipose Tissue*. 537. Academic Press.
- Podyma B, Sun H, Wilson EA, Carlson B, Pritikin E, Gavrilova O, Weinstein LS, Chen M (2018). The stimulatory G protein G(s) α is required in melanocortin 4 receptor-expressing cells for normal energy balance, thermogenesis, and glucose metabolism. *J Biol Chem*, **293**: 10993-11005.

Porter SA, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, O'Donnel CJ, Fox CS (2009). Abdominal subcutaneous adipose tissue: a protective fat depot? *Diabetes care*, **32**: 1068-1075.

Purnell JQ (2000). *Definitions, Classification, and Epidemiology of Obesity*.

Rangarajan S, Enserink JM, Kuiperij HB, de Rooij J, Price LS, Schwede F, Bos JL (2003). Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor. *J Cell Biol*, **160**: 487-493.

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2016). *Duale Reihe Biochemie* Thieme.

Rau M, Weiss J, Geier A (2017). *Nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)*. Springer Berlin Heidelberg.

Raymond JR, Jr., Appleton KM, Pierce JY, Peterson YK (2014). Suppression of GNAI2 message in ovarian cancer. *J Ovarian Res*, **7**: 6.

Reneau J, Goldblatt M, Gould J, Kindel T, Kastenmeier A, Higgins R, Rengel LR, Schoyer K, James R, Obi B, Moosreiner A, Nicholson K, Sahoo D, Kidambi S (2018). Effect of adiposity on tissue-specific adiponectin secretion. *PLoS One*, **13**: e0198889.

Reusch JE, Colton LA, Klemm DJ (2000). CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Molecular and cellular biology*, **20**: 1008-1020.

Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S, Mehta JL (2017). Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, **11**: 215-225.

Röhrig B, Prel J-Bd, Wachtlin D, Blettner M (2009). Studientypen in der medizinischen Forschung. *Dtsch Arztebl International*, **106**: 262-268.

Rosen ED, Spiegelman BM (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, **444**: 847-853.

Rosen Evan D, Spiegelman Bruce M (2014). What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell*, **156**: 20-44.

Rosen H, Gonzalez-Cabrera PJ, Sanna MG, Brown S (2009). Sphingosine 1-phosphate receptor signaling. *Annu Rev Biochem*, **78**: 743-768.

Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, **459**: 356-363.

Rosenberg D, Groussin L, Jullian E, Perlemoine K, Bertagna X, Bertherat J (2002). Role of the PKA-regulated transcription factor CREB in development and tumorigenesis of endocrine tissues. *Ann N Y Acad Sci*, **968**: 65-74.

- Ross PT, Bibler Zaidi NL (2019). Limited by our limitations. *Perspectives on Medical Education*, **8**: 261-264.
- Rudolph U, Finegold MJ, Rich SS, Harriman GR, Srinivasan Y, Brabet P, Boulay G, Bradley A, Birnbaumer L (1995). Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in Gai2-deficient mice. *Nature Genetics*, **10**: 143-150.
- Sakamoto A, Chen M, Nakamura T, Xie T, Karsenty G, Weinstein LS (2005). Deficiency of the G-protein alpha-subunit G(s)alpha in osteoblasts leads to differential effects on trabecular and cortical bone. *J Biol Chem*, **280**: 21369-21375.
- Sardanelli AM, Technikova-Dobrova Z, Speranza F, Mazzocca A, Scacco S, Papa S (1996). Topology of the mitochondrial cAMP-dependent protein kinase and its substrates. *FEBS Letters*, **396**: 276-278.
- Sassmann A, Offermanns S, Wettschureck N (2010). Tamoxifen-inducible Cre-mediated recombination in adipocytes. *Genesis*, **48**: 618-625.
- Sassone-Corsi P (2012). The cyclic AMP pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **4**: a011148.
- Schenkel J (2006). *Transgene Tiere mit ... 20 Tabellen*. 2., überarb. u. aktualis. Aufl. Springer.
- Schienkiewitz A, Mensink G, Kuhnert R, Lange C. (2017). Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen in Deutschland. In: Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung.
- Schulz TJ, Glaubitz M, Kuhlow D, Thierbach R, Birringer M, Steinberg P, Pfeiffer AFH, Ristow M (2007). Variable Expression of Cre Recombinase Transgenes Precludes Reliable Prediction of Tissue-Specific Gene Disruption by Tail-Biopsy Genotyping. *PLoS One*, **2**: e1013.
- Schwoch G, Trinczek B, Bode C (1990). Localization of catalytic and regulatory subunits of cyclic AMP-dependent protein kinases in mitochondria from various rat tissues. *Biochemical Journal*, **270**: 181-188.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB (2006). Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*, **116**: 1793-1801.
- Shuster A, Patlas M, Pinthus JH, Mourtzakis M (2012). The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. *The British journal of radiology*, **85**: 1-10.
- Snijder MB, Visser M, Dekker JM, Goodpaster BH, Harris TB, Kritchevsky SB, De Rekeneire N, Kanaya AM, Newman AB, Tylavsky FA, Seidell JC (2005). Low subcutaneous thigh fat is a risk factor for unfavourable glucose and lipid levels, independently of high abdominal fat. The Health ABC Study. *Diabetologia*, **48**: 301-308.

Stecco C, Hammer W, Vleeming A, De Caro R (2015). *1 - Connective Tissues*. Churchill Livingstone.

Stryer L (1983). Transducin and the cyclic GMP phosphodiesterase: amplifier proteins in vision. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **48 Pt 2**: 841-852.

Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R, Huang XY (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J Mol Biol*, **428**: 3850-3868.

Tapia P, Fernández-Galilea M, Robledo F, Mardones P, Galgani JE, Cortés VA (2018). Biology and pathological implications of brown adipose tissue: promises and caveats for the control of obesity and its associated complications. *Biological Reviews*, **93**: 1145-1164.

Teng X, Dayhoff-Brannigan M, Cheng W-C, Gilbert Catherine E, Sing Cierra N, Diny Nicola L, Wheelan Sarah J, Dunham Maitreya J, Boeke Jef D, Pineda Fernando J, Hardwick JM (2013). Genome-wide Consequences of Deleting Any Single Gene. *Molecular Cell*, **52**: 485-494.

Torres N, Vargas-Castillo AE, Tovar AR (2016). *Adipose Tissue: White Adipose Tissue Structure and Function*. Academic Press.

Tozzi M, Novak I (2017). Purinergic Receptors in Adipose Tissue As Potential Targets in Metabolic Disorders. *Front Pharmacol*, **8**: 878.

Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR (2008). Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab*, **7**: 410-420.

Tsujinaka S, Konishi F, Kawamura YJ, Saito M, Tajima N, Tanaka O, Lefor AT (2008). Visceral obesity predicts surgical outcomes after laparoscopic colectomy for sigmoid colon cancer. *Dis Colon Rectum*, **51**: 1757-1765; discussion 1765-1757.

Valsecchi F, Ramos-Espiritu LS, Buck J, Levin LR, Manfredi G (2013). cAMP and mitochondria. *Physiology (Bethesda)*, **28**: 199-209.

Vannucci S, Klim C, Martin L, LaNoue K (1989). A1-adenosine receptor-mediated inhibition of adipocyte adenylate cyclase and lipolysis in Zucker rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **257**: E871-E878.

Vetter IR, Wittinghofer A (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, **294**: 1299-1304.

Wajchenberg BL (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine reviews*, **21**: 697-738.

Wang J, Gareri C, Rockman HA (2018). G-Protein-Coupled Receptors in Heart Disease. *Circulation Research*, **123**: 716-735.

Wang L, Pydi SP, Zhu L, Barella LF, Cui Y, Gavrilova O, Bence KK, Vernochet C, Wess J (2020). Adipocyte G(i) signaling is essential for maintaining whole-

- body glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Nature Communications*, **11**: 2995-2995.
- Wefers Bettink MA, Arbous MS, Raat NJH, Mik EG (2019). Mind the mitochondria! *Journal of Emergency and Critical Care Medicine*, **3**.
- Weir CB, Jan A (2021). *BMI Classification Percentile And Cut Off Points*.
- Weis WI, Kobilka BK (2018). The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annu Rev Biochem*, **87**: 897-919.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, **112**: 1796-1808.
- Wettschureck N, Offermanns S (2005). Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiological Reviews*, **85**: 1159-1204.
- Wiege K, Ali SR, Gewecke B, Novakovic A, Konrad FM, Pexa K, Beer-Hammer S, Reutershan J, Piekorz RP, Schmidt RE, Nürnberg B, Gessner JE (2013). Gai2 is the essential Gai protein in immune complex-induced lung disease. *J Immunol*, **190**: 324-333.
- Wiege K, Le DD, Syed SN, Ali SR, Novakovic A, Beer-Hammer S, Piekorz RP, Schmidt RE, Nürnberg B, Gessner JE (2012). Defective macrophage migration in Gai2- but not Gai3-deficient mice. *The Journal of Immunology*, **189**: 980.
- Wilkie TM, Yokoyama S (1994). Evolution of the G protein alpha subunit multigene family. *Soc Gen Physiol Ser*, **49**: 249-270.
- Wong YH, Federman A, Pace AM, Zachary I, Evans T, Pouysségur J, Bourne HR (1991). Mutant α subunits of Gi2 inhibit cyclic AMP accumulation. *Nature*, **351**: 63-65.
- Wronska A, Kmiec Z (2012). Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol (Oxf)*, **205**: 194-208.
- Wu H, Ballantyne CM (2020). Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Circulation Research*, **126**: 1549-1564.
- Wu J, Boström P, Sparks Lauren M, Ye L, Choi Jang H, Giang A-H, Khandekar M, Virtanen Kirsi A, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt Wouter D, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman Bruce M (2012). Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell*, **150**: 366-376.
- Yanagida K, Igarashi H, Yasuda D, Kobayashi D, Ohto-Nakanishi T, Akahoshi N, Sekiba A, Toyoda T, Ishijima T, Nakai Y, Shojima N, Kubota N, Abe K, Kadowaki T, Ishii S, Shimizu T (2018). The G α 12/13-coupled receptor LPA4 limits proper adipose tissue expansion and remodeling in diet-induced obesity. *JCI Insight*, **3**.

Yang J, Wu J, Kowalska MA, Dalvi A, Prevost N, O'Brien PJ, Manning D, Poncz M, Lucki I, Blendy JA, Brass LF (2000). Loss of signaling through the G protein, Gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**: 9984-9989.

Ye R, Wang QA, Tao C, Vishvanath L, Shao M, McDonald JG, Gupta RK, Scherer PE (2015). Impact of tamoxifen on adipocyte lineage tracing: Inducer of adipogenesis and prolonged nuclear translocation of Cre recombinase. *Mol Metab*, **4**: 771-778.

Young P, Arch JRS, Ashwell M (1984). Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Letters*, **167**: 10-14.

Zaccolo M, Pozzan T (2003). CAMP and Ca²⁺ interplay: a matter of oscillation patterns. *Trends Neurosci*, **26**: 53-55.

Zancanaro C, Caretta CM, Merigo F, Cavaggioni A, Osculati F (1999). alpha-Gustducin expression in the vomeronasal organ of the mouse. *Eur J Neurosci*, **11**: 4473-4475.

Zwick RK, Guerrero-Juarez CF, Horsley V, Plikus MV (2018). Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell metabolism*, **27**: 68-83.

9 Anhang

9.1 Antikörper

9.1.1 Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-G $\alpha_{i1/2}$	Kaninchen	1:5000	7 Bio Science
Anti-G α_{i3}	Kaninchen	1:5000 – 1:20 000	7 Bio Science
Anti- β -Aktin	Maus	1:50 000	Sigma-Aldrich

9.1.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus IgG HRP-konjugiert	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling Technology, Inc.

9.2 Oligonukleotide

Zielgen	Primer	Sequenz	PCR-Produkt
<i>Gnai3</i>	Primer EX7-R	5'ATGCTGTCAAACAATTTTCATG3'	wt 800 bp flox 836 bp ko 450 bp
	Primer Int-F	5'TAGCAGTTGTCATGGCTACC 3'	
Adipoq- Cre	Adipoq-for	5'TGGTGCATCTGAAGACACTACA3'	tg 700 bp kon 200 bp
	Adipoq-rev	5'TGCTGTTGGATGGTCTTCACA3'	
	IPC-for	5'CAAATGTTGCTTGTCTGGTG3'	
	IPC-rev	5'GTCAGTCGAGTGCACAGTTT3'	

I. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Abteilung für Pharmakologie, Experimentelle Therapie und Toxikologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg und Dr. Veronika Leiss durchgeführt, die ebenfalls für die Konzeption der Studie verantwortlich waren.

Die i.p. Tamoxifen-, Glukose- und Insulininjektionen wurden durch Dr. Veronika Leiss durchgeführt.

Die histologischen Analysen und die Quantifizierung der pro-inflammatorischen Mediatoren wurden in Zusammenarbeit mit den Bacheloranden Lena Pfeiffer (L.P.) und Ralph Sinn (R.S.) durchgeführt:

Mitarbeiter	Methode
J.K.	<ul style="list-style-type: none"> • Präparation, Fixierung und Einbettung der benötigten Gewebeproben für die histologischen Methoden und die Quantifizierung der pro-inflammatorischen Mediatoren • Zusammenführung der erhobenen Daten, statistische Gesamtauswertung, Erstellung der Abbildungen
R.S.	<ul style="list-style-type: none"> • Anfertigung von Gewebeschnitten • H&E- und Öl-Rot-Färbungen • Erstellung und Auswertung digitaler Bilder
L.P.	<ul style="list-style-type: none"> • Anfertigung von Gewebeschnitten • H&E- und Öl-Rot-Färbungen • Erstellung und Auswertung digitaler Bilder • Quantifizierung der pro-inflammatorischen Mediatoren

Die Messungen des Sauerstoffverbrauches sowie die Auswertungen dieser Messungen erfolgten durch Dr. Thorsten Gnad (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Deutschland).

Alle übrigen Methoden wurden nach Einarbeitung durch Dr. Veronika Leiss und Renate Riehle eigenständig (J.K.) durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig (J.K.) nach Anleitung durch Dr. Veronika Leiss.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Dr. Veronika Leiss verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

II. Veröffentlichungen

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 $G\alpha_2$ proteins in adipocytes attenuates diet-induced obesity. *Molecular metabolism*, 40, 101029.

III. Danksagung

Sehr herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Dr. B. Nürnberg für die Aufnahme an das Institut für Pharmakologie, Experimentelle Therapie und Toxikologie, die Überlassung des Projektes, seine Mithilfe bei der Bewerbung um das IZKF-Stipendium, sowie für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Betreuerin Dr. Veronika Leiss, die nicht nur durch ihr umfassendes Wissen, sondern auch durch ihre motivierende Arbeitsweise entscheidend zur Vollendung dieses Projektes beigetragen hat. Danke für deine aufbauenden Worte bei missglückten Versuchen, die amüsanten Gespräche und vor allem die viele Geduld bei der Anfertigung meiner Dissertationsschrift. Ich bin sehr froh dich als meine Betreuerin gehabt zu haben und hoffe, dass wir auch in Zukunft weiter in Kontakt bleiben.

Weitere Dankesworte richten sich an:

Frau Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer für ein ständig offenes Ohr sowie die zahlreichen Anregungen im Rahmen der Progress Reports.

Renate Riehle für die Einführung in die Welt der Immunoblots und ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft.

Lena Pfeiffer und Ralph Sinn für die Mithilfe bei den histologischen Analysen und der Analyse der proinflammatorischen Mediatoren.

Allen übrigen Mitarbeitern des Instituts für die entspannte Arbeitsatmosphäre und die gegenseitige Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern und Angelina für ihre bedingungslose Unterstützung und ihren Glauben an mich. Meiner Schwester Lara für die vielen nützlichen Korrekturvorschläge.

Meinen Freunden für die zahlreichen Treffen, lustigen Gespräche und schönen Feiern, die ein perfekter Ausgleich zu der arbeitsintensiven Laborzeit waren.