

**Erste orientierende Untersuchungen
zur Beteiligung von $G\alpha_i$ -Proteinen
an der Glukosehomöostase und Nierenfunktion
bei genetisch veränderten Mäusen**

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

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

vorgelegt von

Ryba, Agnieszka Maria

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Ullrich

*Meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg,
der mir trotz aller Widrigkeiten des Schicksals
eine Chance gegeben hat...*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Allgemeine Prinzipien der zellulären Kommunikation.....	10
1.2	G-Proteine.....	11
1.3	Diabetes mellitus.....	13
1.4	Diabetische Nephropathie.....	16
1.5	Fragestellung	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Bezugsquellennachweis.....	18
2.1.1	Hersteller und Lieferanten.....	18
2.1.2	Chemikalien	19
2.1.3	Radiochemikalien.....	20
2.1.4	Antikörper.....	21
2.1.5	Film	21
2.1.6	Kommerzielle Detektionsverfahren (Kits)	21
2.1.7	Futtermittel für Mäuse	21
2.1.8	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	21
2.1.9	Geräte	22
2.2	Stammlösungen, Puffer und Standards	24
2.3	SDS-Polyacrylamidgele	26
2.4	Versuchstiere	26
2.5	Versuche in metabolischen Käfigen.....	27
2.6	Retroorbitale Blutentnahme	27
2.7	Probenaufbewahrung.....	28

2.8	Oraler Glukosetoleranztest (oGTT) und intraperitonealer Glukosetoleranztest (iGTT)	28
2.9	Bestimmung renovaskulärer Parameter nach STZ-Behandlung und mikrochirurgische Präparation.....	29
2.10	Radioaktive Inulinabsorption	30
2.11	Berechnung der glomerulären Filtrationsrate (GFR)	30
2.12	Proteinanalytische Methoden.....	31
2.12.1	Proteinlysate	31
2.12.2	Proteinbestimmung nach der BCA-Methode.....	31
2.12.2.1	Messprinzip.....	31
2.12.2.2	Durchführung	31
2.12.2.3	Probenaufbereitung zur Immunoblot-Analyse	32
2.12.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.12.3.1	Prinzip	32
2.12.3.2	Gelvorbereitung	33
2.12.3.3	Durchführung	33
2.12.4	Western Blot (Immunoblot)	33
2.12.4.1	Prinzip	33
2.12.4.2	Durchführung	34
2.13	ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)	35
2.13.1	Prinzip	35
2.13.2	Insulinbestimmung	35
2.13.3	Albuminbestimmung.....	36
2.14	Natrium- und Kaliumbestimmung mittels Flammenphotometer	36
2.15	UV-Photometrie	37
2.15.1	Glukosebestimmung	37
2.15.2	Kalziumbestimmung.....	37
2.15.3	Phosphatbestimmung	37

2.15.4	Kreatininbestimmung nach der Jaffé Methode und Kreatininclearanceberechnung	38
2.16	Statistische Analyse	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Bedeutung des $G\alpha_{i2}$ -Proteins für die Glukosehomöostase	39
3.2	Streptozotozin-induzierter Diabetes	44
3.3	Bestimmung der renovaskulären Parameter nach STZ-Behandlung .	55
4	Diskussion	65
4.1	Bedeutung des $G\alpha_{i2}$ -Proteins für die Glukosehomöostase	65
4.2	Diabetesinduktion mittels Streptozotozin	69
4.3	Bedeutung von $G\alpha_{i1}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Proteinen für die Glukosehomöostase in einem experimentellen Diabetesmodell der Maus.....	70
4.4	Rolle der $G\alpha_{i1}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Proteine bei diabetischer Nephropathie.....	72
5	Zusammenfassung	76
6	Literaturverzeichnis	77
7	Erklärungen zum Eigenanteil	87
8	Anhang	88
9	Danksagung	95
10	Lebenslauf	97

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	-	Abbildung
APS	-	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	-	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	-	Bicinchonisäure
BSA	-	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
°C	-	Grad Celsius
cAMP	-	<i>3',5'-cyclic adenosine monophosphate</i> , zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CCR5	-	Chemokin-Rezeptor, Ko-Rezeptor für HIV
cpm	-	Zerfälle pro Minute
DAG	-	Diacylglycerol
DNA	-	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
ECL	-	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	-	<i>Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i> , Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	-	<i>Epidermal growth factor</i> , Epidermis-Wachstumsfaktor
ELISA	-	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> , Enzym-gekoppelter Immunoassay
FOXO	-	<i>Forkhead box O</i> (Transkriptionsfaktor)
G-Protein	-	heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein
GABA	-	γ -Aminobuttersäure
GDP	-	Guanosin-5'-diphosphat
GFR	-	<i>Glomerular filtration rate</i> , glomeruläre Filtrationsrate
GIP	-	<i>Glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i>
GIPR	-	<i>Glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i> -Rezeptor
GLP-1	-	<i>Glucagon-like-peptid 1</i>
GLP-1R	-	<i>Glucagon-like-peptid</i> -Rezeptor
GLUT 2	-	<i>Glucose transporter 2</i> , Glukosetransporter 2
GLUT 4	-	<i>Glucose transporter 4</i> , Glukosetransporter 4
GPCR	-	<i>G protein-coupled receptor</i> , G-Protein-gekoppelter Rezeptor

GTP	-	Guanosin-5'-triphosphat
[³ H]	-	Tritium
HIV	-	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HRP	-	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
i.p.	-	intraperitoneal
Ig	-	Immunglobulin
IGF	-	<i>Insulin-like growth factor</i>
iGTT	-	intraperitonealer Glukosetoleranztest
IP ₃	-	Inositol-1,4,5- trisphosphat
MOPS	-	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
nAChR	-	nikotinerger Acetylcholin-Rezeptor
OEA	-	Oleylethanolamid
oGTT	-	oraler Glukosetoleranztest
PAF	-	Plättchen-aktivierender Faktor
PAGE	-	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	-	<i>Phosphate buffer salin</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PTX	-	Pertussistoxin, Exotoxin von <i>Bordetella pertussis</i>
Q205L	-	Aminosäureposition (Zahl) mit Austausch der Aminosäuren im Buchstabencode
RhoGEF	-	Rho-spezifische Guaninnukleotid-Austauschfaktoren
rpm	-	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SD	-	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	-	<i>Sodium dodecyl sulphate</i> , Natriumdodecylsulfat
SGLT-1	-	<i>Sodium-glucose linked transporter</i> , Natrium/Glukose- Ko-Transporter
SPF	-	<i>specific pathogen free</i> , spezifisch pathogenfrei
STZ	-	Streptozotozin
Tab.	-	Tabelle
TBS	-	<i>Tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Lösung
TBS-T	-	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i> , Tris-gepufferte Lösung mit Tween 20
TEMED	-	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TGF- β	-	<i>Tumor growth factor beta, Wachstumstumorfaktor beta</i>
Tris	-	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
Tween 20	-	Polyoxyethylen-(20)-monolaurat
WHO	-	<i>World Health Organization</i>
ZNS	-	zentrales Nervensystem
μCi	-	Mikrocurie
5-HT ₃ -R	-	ionotroper Serotonin-Rezeptor
% (w/v)	-	Gewichtsprozent (Gewicht/Volumen)

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Prinzipien der zellulären Kommunikation

Die Existenz mehrzelliger Organismen erfordert einerseits eine koordinierte Verarbeitung der Signale seiner einzelnen Zellen sowie andererseits ihre Kommunikation mit dem äußeren Milieu. Dies geschieht nur bei ständig aufeinander abgestimmten Zellfunktionen und ist für die Zellen lebenswichtig. Dem Informationsaustausch dienen verschiedene Mechanismen. Hierzu gibt es elektrische oder auf humoralen Wegen hormonelle Signale sowie Adhäsionsmoleküle (z.B. Integrine, Cadherine, Selektine), die an die Zelloberfläche binden und mittels eines direkten Zell-Zell-Kontaktes ein Signal überleiten können (Aplin *et al.*, 1998). Zu den humoralen Mediatoren gehören Hormone bzw. Neurotransmitter oder lösliche Gase, die durch Exozytose freigesetzt werden oder mittels Diffusion über die Plasmamembran wirken (Lang, 1999; Gross, 2001). Die Diffusionsfähigkeit der Botenstoffe liegt in ihren Eigenschaften begründet. Lipophile Stoffe, wie beispielsweise Steroidhormone, sind in der Lage die Zellmembran zu überwinden und den Zielrezeptor im Zytosol zu erreichen (Parker, 1993). Die meisten Botenstoffe sind jedoch hydrophil und können in dem Zellinneren ein Signal nur mit Hilfe entsprechender Transmembranrezeptoren auslösen. Ein extrazellulärer Ligand bindet an diese, was zu einer Konformationsänderung des Rezeptors führt. Im Weiteren werden intrazelluläre Effektorsysteme mittels sekundärer Botenstoffe aktiviert. Auf diese Weise kommt es zum Auslösen einer zellulären biologischen Antwort. Mechanismusabhängig unterscheidet man verschiedene Rezeptorklassen.

Es gibt Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, die den Ionenfluss durch die Zellmembran regulieren. Dies geschieht infolge einer Durchlässigkeit für Kationen, z.B. der nikotinerge Acetylcholinrezeptor (nAChR) (Hucho *et al.*, 1996) oder der ionotrope Serotonin-Rezeptor (5-HT₃-R) (Barnes *et al.*, 2009) oder Anionen, z.B. der γ -Aminobuttersäure-(GABA_A)-Rezeptor (Barnard *et al.*, 1993) oder der Glycin-Rezeptor (Yu *et al.*, 2014). Zu einer anderen Gruppe gehören Rezeptoren, deren im Zytosol lokalisierte Domäne eine

Tyrosinkinaseaktivität besitzt. Hierzu zählt man z.B. Rezeptortyrosinkinasen, wie der Insulin- oder der *Epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptor. Eine Bindung des Liganden an den Rezeptor führt zu seiner Aktivierung mit einer begleitenden Autophosphorylierung, die zur Rekrutierung von Effektorproteinen führen kann (White und Kahn, 1994; Malarkey *et al.*, 1995; Bazley und Gullick, 2005).

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs, auch als metabotrope oder heptahelikale Rezeptoren bezeichnet), repräsentieren die allergrößte Rezeptorfamilie. Diese durchspannen die Plasmamembran mit sieben transmembranären Helixstrukturen, davon stammt auch der Begriff heptahelikale Rezeptoren. Extrazellulär befindet sich ein N-terminaler Abschnitt und zytosolisch eine C-terminale Domäne (Gudermann *et al.*, 1995). Da diese Klasse von Rezeptoren nicht über *second messenger*-generierende Enzym- oder Ionenkanalfunktionen verfügt, signalisieren diese Rezeptoren über signalübertragende Transduktoren, den sog. heterotrimeren G-Proteinen.

1.2 G-Proteine

G-Proteine sind an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert und interagieren mit den GPCRs. Sie existieren im inaktiven Zustand als heterotrimerere Komplexe, die aus einer α , β und γ Einheit zusammengesetzt sind. Davon besitzt die α -Einheit eine Guanosin-5'-diphosphat (GDP)-Bindungseigenschaft. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor löst eine Konformationsänderung aus, die sich auf das G-Protein überträgt. Infolgedessen kommt es zu einer Öffnung der Guaninnukleotid-Bindungstasche und zu einer Freisetzung von GDP aus der $G\alpha$ -Untereinheit. Damit werden anschließend die G-Proteine durch den Austausch von GDP zu Guanosin-5'-triphosphat (GTP) aktiviert und dissoziieren in ihre $G\alpha$ -Untereinheit und den $G\beta\gamma$ -Komplex, die voneinander unabhängig unterschiedliche Effektoren modulieren können (Clapham und Neer, 1997; Lambert, 2008). Die Aktivität der α -Untereinheit wird zeitlich durch die inhärente GTPase-Aktivität von $G\alpha$ limitiert. Nach der Hydrolyse von GTP in GDP und Phosphat schwingt die

G α -Untereinheit in ihre inaktive Konformation zurück und ermöglicht so die Bindung des G $\beta\gamma$ -Dimers an das G α -Monomer (Strathmann und Simon, 1990). Die G α -Untereinheiten wurden nach Sequenzähnlichkeiten in vier Subfamilien klassifiziert, was auch ihre funktionellen Eigenschaften widerspiegelt: G α_s , G α_i , G α_q und G α_{12} (Nürnberg *et al.*, 1995). G-Proteine der G s -Subklasse (Choleratoxin-sensitiv) aktivieren typischerweise über eine Rezeptor-induzierte Stimulation Adenylylzyklasen, die das zyklische Adenosin-3',5'-monophosphat, (cAMP, *second messenger*) aus Adenosin-5'-triphosphat (ATP) synthetisieren (Taussig und Gilman, 1995; Sunahara *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu inhibiert das G i -Protein (Pertussistoxin-empfindlich) Adenylylzyklasen und ist damit an der Homöostase der zellulären cAMP-Konzentration beteiligt (Kaziro *et al.*, 1991; Offermanns, 2003). Im engen Sinn sind derzeit drei G α_i -Isoformen bekannt, wobei G α_{i1} überwiegend neuronal, G α_{i2} ubiquitär und G α_{i3} überwiegend nicht-neuronal exprimiert wird (Nürnberg *et al.*, 1995). G α_q -Proteine, genauso wie G $\beta\gamma$ -Komplexe der G i -Proteine, stimulieren die Phospholipase C, die zur Spaltung von Inositol-4,5-bisphosphat in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG) führt (Exton, 1996). Die zuletzt beschriebene Familie von G-Proteinen ist die G $\alpha_{12/13}$ -Familie, deren Haupteffektoren die Rho-spezifischen Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (RhoGEF) sind (Strathmann und Simon, 1991; Shang *et al.*, 2013). Darüber hinaus regulieren G-Proteine zahlreiche Effektoren, häufig über eine direkte Interaktion mit dem G $\beta\gamma$ -Komplex (Clapham und Neer, 1997).

Die heptahelikalen Rezeptoren spielen eine wesentliche Rolle in der Signaltransduktion. Es gibt über 800 Gene im menschlichen Genom, die für diese Rezeptoren kodieren (Pierce *et al.*, 2002). Ein GPCR kann eine oder mehrere G-Protein-Isoformen aktivieren (Bourne, 1997). Die Prinzipien der Interaktion von GPCRs mit G-Proteinen sind inzwischen aufgeklärt. In den letzten Jahren wurden Mutationen des GPCRs, sowie der α -Untereinheit der G-Proteine als Ursache von verschiedenen somatischen und hereditären Krankheiten, wie endokrine Tumore (Lyons *et al.*, 1990), Schilddrüsenadenom (Parma *et al.*, 1993), McCune-Albright-Syndrom (Weinstein *et al.*, 1991) und Diabetes insipidus (Fujiwara *et al.*, 1995) identifiziert. Manchmal ist die Wirkung

dieser Interaktionen protektiv, wie beispielsweise die Mutation des Chemokin-Rezeptors (CCR5, Ko-Rezeptor für HIV), die vor einer HIV-Infektion schützt (Liu *et al.*, 1996).

1.3 Diabetes mellitus

Eine der größten Herausforderungen für die Medizin weltweit scheint in den nächsten Dekaden der Diabetes mellitus zu sein. Laut Daten der *World Health Organization* (WHO) sind 347 Millionen Menschen in der Welt an Diabetes erkrankt. Im Jahre 2012 war Diabetes die unmittelbare Todesursache von ca. 1.5 Millionen Diabetikern (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>). Diabetes mellitus umfasst eine Gruppe heterogener Erkrankungen mit dem gemeinsamen Merkmal einer chronischen Hyperglykämie. Die zugrundeliegenden Ursachen beinhalten u.a. entweder eine autoimmunologische β -Zelldestruktion mit darauffolgendem Verlust der Insulinsekretion (typisch für Diabetes Typ I, obligat insulinabhängig, ca. 10 - 15 % der Patienten), eine fehlende Insulinwirkung in Folge einer Insulinresistenz (typisch für Diabetes Typ II, nicht obligat insulinabhängig, ca. 85 - 90 % der Patienten) oder eine Kombination der beiden (Adorini *et al.*, 2002; Cefalu, 2006; Bouche *et al.*, 2010; Myers *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2010). Es gibt starke Hinweise darauf, dass unabhängig vom Diabetes-Typ eine familiäre Veranlagung für Diabetes besteht und damit auf einen genetischen Hintergrund der Krankheit zu schließen ist (Taylor, 2006).

Eine langfristige, nicht adäquate Diabetesbehandlung führt zu Gefäß- und Nervenschäden mit entsprechend schwerwiegenden Komplikationen. Die orale antidiabetische Therapie des Typ II Diabetes ist oftmals zeitlich limitiert und muss durch Insulinsubstitution ergänzt werden. Die Insulintherapie ist nicht nur wegen der mehrfachen täglichen Injektionen unangenehm, sondern auch durch viele Nebenwirkungen begleitet, wie Hypoglykämie oder Insulinmast. Diabetes Typ II korreliert mit einem erhöhten Krebsrisiko (Ogunleye *et al.*, 2009). Sulfonylharnstoffe und einige Insulinanaloga können das Risiko steigern, was am wahrscheinlichsten durch die Stimulation des *Insulin-like growth factor-1* (IGF-1) bedingt ist (Hassan *et al.*, 2010; Gough *et al.*, 2011).

Deshalb ist eine intensive Suche nach neuen therapeutischen Strategien gegen Diabetes erforderlich. Insbesondere eine genaue Erforschung der molekularen Mechanismen des Insulinsignalweges ist hierfür unabdingbar. Zu diesem Zweck nutzt man gerne genetisch modifizierte Tiere, in denen die entsprechenden Gene inaktiviert werden, um ihre Funktion in einem biologischen Kontext besser untersuchen zu können (Jiang *et al.*, 2002).

Die Freisetzung von Insulin und seine Signalwege sind komplexe, auf mehreren Stufen regulierte Prozesse, in denen auch eine Beteiligung von G-Proteinen postuliert wurde (Heyworth und Houslay, 1983; Heyworth *et al.*, 1983; Pennington, 1987; Robertson *et al.*, 1991; Sharp, 1996; Avruch, 1998; Bevan, 2001; Pessin und Saltiel, 2010; Kimple *et al.*, 2014). Es gibt Hinweise darauf, dass die Pertussistoxin (PTX)-sensitiven G_i -Proteine zelluläre Signaltransduktoren sind, die an Hormon- und Neurotransmitter-GPCRs, aber nicht direkt an Insulin- oder Tyrosinkinaserzeptoren gekoppelt sind, und an der Insulinwirkung teilnehmen (Malarkey *et al.*, 1995; Lang, 1999). In den Pankreasinseln der Maus wurden mindestens 28 verschiedene GPCRs detektiert, acht von ihnen sind wichtige Regulatoren der β -Zellfunktion (Regard *et al.*, 2007). Hierbei sollen Rezeptoren über G_{α_q} oder G_{α_s} die Insulinsekretion steigern, während andere GPCRs über $G_{\alpha_{i/o}}$ die Insulinfreisetzung hemmen sollen (Layden *et al.*, 2010). Das cAMP als zellulärer *second messenger* wird über GPCRs durch mehrere Hormone kontrolliert. Intrazellulär wird es durch Adenylylzyklasen gebildet, deren Aktivität durch G_s (stimulierend) und G_i (inhibierend) entgegengesetzt kontrolliert wird (Houslay, 1984). Eine physiologische Glukosehomöostase wird vor allem durch ein Gleichgewicht der beiden gegensätzlich wirkenden Hormone Glukagon und Insulin erreicht. In der Leber führt das Glukagon zur Erhöhung der cAMP-Konzentration, was über G_s vermittelt wird. Die Wirkung wird durch das Insulin antagonisiert (Gawler *et al.*, 1987). Es wurde postuliert, dass Insulin die Adenylylzyklaseaktivität ohne Mitwirkung inhibitorischer G_i -Proteine hemmt (Gawler *et al.*, 1988).

Es konnte gezeigt werden, dass eine postnatale Ablation des $G_{\alpha_{i2}}$ -Proteins im Fettgewebe und in der Leber zur Insulinwirkungsbeeinträchtigung im Sinne

einer Hyperinsulinämie, gestörter Insulintoleranz und Insulinresistenz bei der Maus führt (Moxham und Malbon, 1996). Andererseits verbessert die Überexpression von GTPase-inaktivem, konstitutiv aktivem $G\alpha_{i2}$ (Q205L) im Fettgewebe, in den Skelettmuskeln und in der Leber die Symptomatik des experimentell-induzierten Diabetes (Zheng *et al.*, 1998). Ebenfalls zeigen Tiere dieses Genotyps unter fehlender Insulinstimulation einen vermehrten Glukosetransport, der mit einer Translokation des Insulin-sensitiven Glukosetransporters GLUT 4 in die Plasmamembran im Fettgewebe und in den Skelettmuskeln einhergeht, was darauf hindeutet, dass das $G\alpha_{i2}$ -Protein auch an dem Glukoseaufnahmeprozess beteiligt sein könnte (Song *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang gibt es einen Befund, der eine Ko-Präzipitation von humanen Insulinrezeptoren mit $G\alpha_{i2}$ -Protein nachweisen konnte (Kreuzer *et al.*, 2004).

Außerdem wird ein Zusammenhang zwischen der Regulation der Glukosekonzentration und der Expression von $G\alpha_i$ -Proteinen im Gewebe vermutet. So soll die Diabetes-induzierte Hyperglykämie zu einer verringerten Expression von $G\alpha_i$ -Proteinen führen (Li *et al.*, 2008). Beispielsweise zeigte sich in Immunoblot-Untersuchungen eine verringerte Expression von $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Proteinen in vaskulären glatten Muskelzellen, die einer hohen Glukosekonzentration ausgesetzt waren, wohingegen das $G\alpha_s$ -Expressionsniveau unbeeinflusst blieb (Hashim *et al.*, 2004).

In den Leberzellen von Ratten konnte nach einem experimentell-induzierten Diabetes eine Reduktion der hemmenden Wirkung des $G\alpha_i$ -Proteins auf die cAMP-Bildung nachgewiesen werden, was mit einer verminderten Expression des $G\alpha_i$ -Proteins einherging. Der Verlust der hemmenden Wirkung des G_i -Proteins auf cAMP konnte unter subkutaner Insulinbehandlung partiell wiederhergestellt werden (Gawler *et al.*, 1987).

1.4 Diabetische Nephropathie

Diabetes mellitus ist mit zahlreichen Komplikationen verbunden. Hiervon ist eine der bedeutsamsten die diabetische Nephropathie, deren Prävalenz bei etwa 40 % der Diabetiker beider Typen liegt (Gross *et al.*, 2005). Außerdem ist sie die führende Ursache für eine terminale Niereninsuffizienz (Vallon *et al.*, 1999).

In der Literatur ist belegt, dass in den Nieren von Ratten alle drei Isoformen der $G\alpha_i$ -Proteine exprimiert werden (Stow *et al.*, 1991). In B-Lymphoblasten von insulinabhängigen Diabetikern mit diabetischer Nephropathie konnte im Vergleich zu Erkrankten ohne Nephropathie eine verstärkte Aktivierbarkeit der PTX-sensitiven $G\alpha_{i/o}$ -Proteine festgestellt werden, wobei sich die Proteine in beiden Patientengruppen auf einem vergleichbaren Expressionsniveau befanden. Zur Quantifizierung der Reaktivität der PTX-sensitiven Proteine diente eine mittels Plättchen-aktivierendem Faktor(PAF)-induzierte Kalzium-mobilisationsmessung (Pietruck *et al.*, 1998).

1.5 Fragestellung

GPCRs stellen die allergrößte Rezeptorfamilie dar, dank ihrer transmembranären Struktur können sie ein extrazelluläres Signal ins Zellinnere übermitteln. Da sie nicht über eine Effektorfunktion verfügen, signalisieren sie über heterotrimere G-Proteine, die in allen menschlichen Zellen exprimiert sind (Nürnberg *et al.*, 1995; Bourne, 1997). Das detaillierte Verständnis der Signalwege ist unabdingbar für die Identifizierung der Krankheitsursachen und des therapeutischen Nutzens.

Die vorliegende Arbeit fokussiert auf die Bedeutung von $G\alpha_i$ -Proteinen für die Zivilisationskrankheit Diabetes mellitus und der darauffolgenden Komplikation einer diabetischen Nephropathie. Hierzu sollten $G\alpha_i$ -defiziente Mäuse untersucht werden.

Die Defizienz von $G\alpha_{i2}$ im Fettgewebe und in der Leber der Mäuse wurde als Ursache einer Insulinwirkungsbeeinträchtigung im Sinne einer Insulinresistenz in diesen Geweben identifiziert (Moxham und Malbon, 1996). Andererseits verbessert eine Überexpression dieses Proteins in diesen Geweben und in den

Skelettmuskeln den experimentell-induzierten Diabetes (Zheng *et al.*, 1998). In beiden Studien stand nur die periphere gewebespezifische Insulinwirkung im Mittelpunkt. Zu den zwei weiteren Isoformen des $G\alpha_i$ -Proteins, $G\alpha_{i1}$ und $G\alpha_{i3}$, sind keine Daten verfügbar. Unser Ziel war die Erforschung der Auswirkung aller Isoformen des $G\alpha_i$ -Proteins auf die Glukosehomöostase mit Hilfe global genetisch modifizierter Tiere. Die Isoformen (i1, i2, i3) von $G\alpha_i$ -Proteinen können redundant oder isoformspezifisch wirken.

Im Falle eines Phänotyps ohne Auffälligkeiten im Glukose- und/oder Insulinspiegel, wurde der Diabetes experimentell mittels Streptozotozin (STZ) induziert. Hier wurde, nach unserem Kenntnisstand, eine erste langfristige Studie (bis 90 Tage nach der Diabetesinduktion) unter STZ-Behandlung angestrebt und deren Erfolg in regelmäßigen Abständen durch Serum-Glukose, aber auch Insulinverläufe evaluiert. Dies fehlt normalerweise in den aus der Literatur bekannten Studien.

Des Weiteren sollte der Frage nachgegangen werden, ob $G\alpha_i$ -Proteine zur diabetischen Nephropathie beitragen. Bereits vor mehreren Jahren wurde bei den Erkrankten eine verstärkte Aktivierbarkeit der PTX-sensitiven Proteine postuliert (Pietruck *et al.*, 1998). Der genaue molekulare Mechanismus ist bislang nicht bekannt.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Hersteller und Lieferanten

- (1) Abbott Laboratories, Abbott Park, USA
- (2) ALPCO Diagnostics, Salem, USA
- (3) Assaypro, Saint Charles, USA
- (4) Bayer AG, Leverkusen, D
- (5) BD Biosciences, San Jose, USA
- (6) Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
- (7) Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
- (8) Branson Ultraschall, Dietzenbach, D
- (9) Canberra Packard Central Europe GmbH, Schwadorf, A
- (10) Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
- (11) Crystal Chem Inc., Downers Grove, USA
- (12) Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld-Beiseförth, D
- (13) Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, USA
- (14) Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, USA
- (15) Eppendorf AG, Hamburg, D
- (16) GE Healthcare, Little Chalfont, UK
- (17) Gilson Inc., Middleton, USA
- (18) Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
- (19) Heidolph, Schwabach, D
- (20) Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D
- (21) Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, D
- (22) Hitachi Ltd., Tokyo, J
- (23) IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
- (24) Kern & Sohn GmbH, Balingen, D
- (25) Kodak, New York, USA
- (26) Labor+Technik GmbH, Berlin, D
- (27) Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D

- (28) Med.-Techn. Gerätebau, Sulzbach, D
- (29) Memmert GmbH & Co. KG, Büchenbach, D
- (30) Merck, Darmstadt, D
- (31) MettlerToledo GmbH, Gießen, D
- (32) Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA
- (33) NeoLab, Heidelberg, D
- (34) PerkinElmer Inc., Waltham, USA
- (35) Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
- (36) Protec GmbH & Co. KG, Oberstenfeld, D
- (37) Recomed Hellige GmbH, Freiburg, D
- (38) Roche Diagnostics GmbH, Basel, CH
- (39) Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
- (40) Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
- (41) Sartorius AG, Göttingen, D
- (42) Scharr CPC GmbH, Krefeld, D
- (43) Scotsman Ice Systems, Fairfax, USA
- (44) Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- (45) Ssniff® GmbH, Soest, D
- (46) Tecniplast GmbH, Hohenpeissenberg, D
- (47) Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA
- (48) VWR Chemicals Prolabo®, Fontenay-sous-Bois, F
- (49) Wasemann GmbH & Co., Syke, D
- (50) WPI GmbH, Berlin, D

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	(39)
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	(44)
BSA (Rinderserumalbumin)	(44)
Dinatriumhydrogenphosphat	(30)
EDTA (Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	(30)
Ethanol 70 %	(30)

Florene [®] (Isofluran)	(1)
Glukose	(39)
Glycin	(39)
Kaliumchlorid	(30)
Kaliumdihydrogenphosphat	(30)
Kalziumchlorid	(30)
Magnesiumchloridhexahydrat	(30)
β-Mercaptoethanol	(44)
Methanol	(48)
Milchpulver	(39)
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)	(44)
Natriumchlorid	(30)
Natriumcitratdihydrat	(30)
Natriumhydrogencarbonat	(30)
Pentobarbital	(44)
Ponceau S Solution	(44)
Propan/Butangasflasche	(42)
Protease Inhibitor Cocktail Tablette	(38)
Salzsäure	(30)
SDS (<i>Sodium dodecyl sulphate</i>)	(16)
Streptozotozin	(14)
D(+)-Sucrose	(44)
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	(44)
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	(44)
Tween R 20	(39)
Ultima Gold [™] Cocktail	(34)
Zitronensäure	(39)

2.1.3 Radiochemikalien

Radiochemikalie	Bezugsquelle
[³ H]-Inulin	(34)

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	(10)
Anti-TGF- β	(10)

2.1.5 Film

Film	Bezugsquelle
X-OMAT UV Plus	(25)

2.1.6 Kommerzielle Detektionsverfahren (Kits)

Kit	Bezugsquelle
Albumin Assay Max Mouse ELISA Kit	(3)
BCA TM Protein Kit	(47)
ECL Westernblotting Detektionreagenz	(16)
Glucose/HK Gluco-quant Kit	(38)
Insulin Mouse Ultra Sensitive ELISA Kit	(2), (11)
Kalzium Reagent Kit	(38)
Kreatinin Jaffé Reagent Kit	(26)
Phosphate Reagent Kit	(38)

2.1.7 Futtermittel für Mäuse

Futtermittel	Bezugsquelle
Alleinfuttermittel für Zucht von Mäusen	(45)

2.1.8 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Reagenz/Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Hämatokrit-Kapillaren	(21)
Kuvetten REF67.742	(40)

Lithium-Stammlösung 500 mmol/l	(15)
Microtainer [®] SST [™] Tubes	(6)
Nitrozellulose-Membran Hybond [™] -C Extra	(16)
Pipettenspitze	
10 µl, 200 µl	(40)
1000 µl	(17)
Plastikwaren	(5), (17), (18)
Polyethylene Vial [™]	(34)
Protein [™] Standards Precision Plus Dual Color	(7)
Reaktionsgefäße	
0,5 ml	(15)
1,5 ml; 2 ml	(18)
Silikonspray	(12)
Whatman [®] Gel blotting Paper	(44)

2.1.9 Geräte

Gerät	Hersteller
Abzug	(49)
Blutströmungsmesser	(37)
Brutschrank 37 °C	(29)
Contour Sensor	(4)
Eismaschine AF156	(43)
Flammenphotometer ELEX6361	(15)
Flüssigszintillationszähler TRI-CARB [®] 2000CA	(9)
Hämatokritzentrifuge Mikro 12-24	(20)
Homogenator RGL500	(19)
Laborwaagen	
CP3202S	(41)
40SM-200A	(35)
440-47	(24)
Magnetrührer MR3001	(19)
Metabolische Käfige	(46)

Microplate Reader SpectraMax [®] M2/M2 ^e	(32)
Microtiterplatten Leser MR5000	(13)
Mikroskop Wild M10	(27)
Mini-Protean [®] Tetra System	(7)
Multipette [®] plus	(15)
OP-Tisch für kleine Tiere	(28)
pH-Meter MP220	(31)
Pipetten	
0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl,	(15)
50-250 µl, 500-5000 µl	(15)
50-200 µl, 100-1000 µl	(41)
Plattformschüttler	(19)
Power Supply	(7)
Sonifier B15	(8)
Spectrophotometer U-3000	(22)
Spritzenpumpe Sp210iw	(50)
Taumel-Rollermischer	(33)
Thermomixer 5436	(15)
Trans-Blot SD Semi-Dry	(7)
X-Ray Film Processor Optimax 1170-1-0000	(36)
VortexMS2	(23)
Zentrifugen	
5415R	(15)
Heraeus Pico17	(47)

2.2 Stammlösungen, Puffer und Standards

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Anodenpuffer I	300 mM	Tris
	20 %	Methanol
Anodenpuffer II	25 mM	Tris
	20 %	Methanol
Citratpuffer	0,096 g	Zitronensäure
	0,148 g	Natriumcitratdihydrat
	pH = 4,5	
Kathodenpuffer	25 mM	Tris
	40 mM	Glycin
	10 %	Methanol
	0,005 %	SDS
Ladepuffer (Immunoblot)	Roth Lab	Karlsruhe
Laufpuffer (Immunoblot)	50 mM	MOPS
	50 mM	Tris
	0,1 %	SDS
	1 mM	EDTA
	pH = 7,7	
Lysepuffer (Immunoblot)	320 mM	Sucrose
	1 mM	MgCl ₂ x 6H ₂ O
	1 mM	CaCl ₂
	1 mM	NaHCO ₃
	5 mM	Tris
	1 Protease Inhibitor Tablette/50 ml	
	pH = 7,5	
Natriumchloridlösung	0,85 %	NaCl

Natrium/Kalium- Standardlösung für Plasma	130 mM/l 0,380 g 0,485 g in 50 ml	NaCl KCl H ₂ O _{bidest} gelöst
Natrium/Kalium- Standardlösung für Urin	200 mM/l 0,584 g 0,746 g in 50 ml	NaCl KCl H ₂ O _{bidest} gelöst
PBS (<i>Phosphat buffer saline</i>)	13,7 mM 2,7 mM 80,9 mM 1,5 mM pH = 7,4	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
Sammelgelpuffer (Immunoblot)	250 mM 0,2 % pH = 6,8	Tris/HCl SDS
TBS (10 x)	500 mM 1,5 M pH = 7,4	Tris/HCl NaCl
TBS-T	100 ml H ₂ O _{bidest} 0,05 %	10 x TBS bis 1l Tween
Transferpuffer (10 x) (Immunoblot)	192 mM 25 mM 1 % 20 % pH = 8,3	Glycin Tris SDS Methanol

Trenngelpuffer (Immunoblot)	750 mM	Tris/HCl
	0,2 %	SDS
	pH = 8,8	
Waschpuffer (Immunoblot)	100 ml	10 x TBS
	H ₂ O _{bidest}	bis 1 l
	0,05 %	Tween

2.3 SDS-Polyacrylamidgele

Bezeichnung	Zusammensetzung
Sammelgel	0,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 %) 1,5 ml Sammelgelpuffer 1 ml H ₂ O _{bidest} 10 µl TEMED 20 µl APS (10 %)
Trenngel (10 %)	2 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 %) 3 ml Trenngelpuffer 1 ml H ₂ O _{bidest} 15 µl TEMED 45 µl APS (10 %)

2.4 Versuchstiere

Die $G\alpha_{i1-}$, $G\alpha_{i2-}$, $G\alpha_{i3-}$ -defizienten Mäuse wurden mindestens über zehn Generationen auf einen C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt (Albarrán-Juárez *et al.*, 2009; Wiege *et al.*, 2013). $G\alpha_i^{+/+}$, $G\alpha_{i1}^{-/-}$ und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Tiere wurden durch homozygote Verpaarungen generiert. $G\alpha_{i2}^{-/-}$ und $G\alpha_{i2}^{+/+}$ Mäuse stammten aus heterozygoten Verpaarungen. Die Wildtyp-Tiere waren entweder Geschwister oder stammten aus einer C57BL/6 Zucht. Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tiere waren männlichen Geschlechts. Die Mäuse wurden im spezifisch pathogenfreien (SPF) Bereich der Tierversuchsanlage des Pharmakologischen Instituts der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen gezüchtet und gehalten. Die Temperatur in den

Mausräumen betrug 21 - 23 °C, die Luftfeuchtigkeit 45 - 60 %. Es wurde ein Beleuchtungsrhythmus von 12 h Licht (7 - 19 Uhr) und 12 h Dunkelheit (19 - 7 Uhr) eingehalten. Die Fütterung erfolgte mit pelletiertem Trockenfutter (Ssniff® GmbH).

2.5 Versuche in metabolischen Käfigen

Die durchgeführten Experimente in metabolischen Käfigen dienten der Analyse renaler Funktionen. Der Hauptvorteil dieser Methode ist, dass keine Anästhetika verwendet werden müssen, die zu Nebenwirkungen führen können (Vallon, 2003). Die Mäuse wurden einzeln in metabolische Käfige (Tecniplast GmbH) gesetzt, um das Körpergewicht, die Futter- und Trinkmenge sowie die Urinausscheidung zu bestimmen. Zur quantitativen Messung der Urinmenge wurden die Plastikflächen der Käfige vor den Experimenten mit Silikonspray (Dr. Schumacher GmbH) beschichtet. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

Zunächst wurden einmalig die o.g. Parameter über 24 h gemessen. Zusätzlich wurde den Tieren Blut abgenommen (s. 2.6). Streptozotozin (Enzo Life Sciences Inc.) wurde in Citratpuffer (s. 2.2) in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Den Mäusen wurde am Folgetag der basalen Messungen und nach weiteren fünf Tagen eine so frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Weitere Messungen in den metabolischen Käfigen sowie Blutentnahmen wurden an den Tagen 30, 45, 60, 75 und 90 durchgeführt. In den Serumproben wurde der Insulinspiegel (s. 2.13.2), die Glukose- (s. 2.15.1) und Kreatininkonzentration (s. 2.15.4) bestimmt. In den Urinproben wurden die Natrium- (s. 2.14), Kalium (s. 2.14), Glukose- (s. 2.15.1), Protein- (s. 2.12.2.2) und Albuminausscheidungen (s. 2.13.3) gemessen.

2.6 Retroorbitale Blutentnahme

Die Blutgewinnung erfolgte unter Isoflurannarkose (Florene®, Abbott Laboratories) mit Hilfe von Hämatokrit-Kapillaren (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG) aus dem retroorbitalen Plexus des Auges. Es wurden ca. 50 µl Blut in Microtainer® SST™ Tubes (Becton Dickinson) gesammelt.

Diese Blutmenge sollte ohne hämodynamische Konsequenzen für die Tiere sein (Vallon, 2003). Die Proben wurden für 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Das Serum wurde in frische Reaktionsgefäße überführt.

2.7 Probenaufbewahrung

Plasma- und Urinproben wurden bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Unmittelbar vor den Elektrolytbestimmungen wurden die Proben aufgetaut, geschüttelt und für 2 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert.

2.8 Oraler Glukosetoleranztest (oGTT) und intraperitonealer Glukosetoleranztest (iGTT)

Die in diesem Absatz beschriebenen Experimente wurden bei Frau Prof. Dr. Annette Schürmann-Bartsch am Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke durchgeführt. Vier $G\alpha_{i2}^{-/-}$ Mäuse und ihre vier Wildtyp-Geschwister wurden bei Nacht über 16 h nüchtern gesetzt. Für die Blutglukosebestimmungen wurde der Schwanz distal eingeschnitten. Vor der peroralen Gabe eines 20 %igen Glukosebolus (2 g/kg Körpergewicht) per Schlucksonde sowie 15, 30, 60 und 120 min danach wurde die Blutglukosekonzentration mittels Contour Sensor (Bayer AG) gemessen. Die Blutentnahmen von 20 μ l aus dem Schwanz in Microtainer[®] SST[™] Tubes (Becton Dickinson) dienten zusätzlich der Bestimmung der Insulinkonzentration. Die Blutproben wurden für 10 min bei 8.600 rpm abzentrifugiert. Der Insulinspiegel wurde im so gewonnenen Serum mittels ELISA (s. 2.13.2) bestimmt. Nach sieben Erholungstagen wurden dieselben Tiere in einem intraperitonealen Glukosetoleranztest (iGTT) getestet. Das Versuchsprotokoll war identisch, der Glukosebolus von 2 g/kg Körpergewicht wurde jedoch intraperitoneal injiziert. Die Messungen der Blutglukose und die Blutentnahmen zur Insulinbestimmung erfolgten zusätzlich nach 240 min.

2.9 Bestimmung renovaskulärer Parameter nach STZ-Behandlung und mikrochirurgische Präparation

STZ (Enzo Life Sciences Inc.) wurde in Citratpuffer (s. 2.2) in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Den Mäusen der Genotypen $G\alpha_i^{+/+}$ (Kontroll-Tiere), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine so frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation um die Nierenfunktion zu beurteilen. $G\alpha_i^{+/+}$ und $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Mäuse wurden mit 80 mg/kg Körpergewicht und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Tiere mit 60 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital (Sigma-Aldrich) anästhetisiert. Die niedrigere Dosierung bei $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Tieren stützte sich auf unsere Erfahrung, dass dieser Stamm empfindlicher auf dieses Anästhetikum reagiert (Dr. Huang, persönliche Mitteilung). Die Schmerzreaktion wurde regelmäßig während der Präparation geprüft und falls nötig Pentobarbital nachinjiziert. Durch die Lagerung auf einem OP-Tisch mit regulierbarer Heizplatte (Med.-Techn. Gerätebau) lag die Körpertemperatur bei 37,4 °C. In die Trachea wurde eine Kanüle gelegt, sodass eine konstante 100 %ige Sauerstoffzufuhr möglich war. In die linke *Arteria femoralis* wurde eine Kanüle gelegt, um den Blutdruck zu kontrollieren und um die Blutproben zu gewinnen. In die rechte *Vena jugularis* wurde eine weitere Kanüle gelegt, um eine konstante Dauerinfusion mit 0,85 % NaCl geben zu können. Die gesamte Präparation dauerte ca. 40 min, 10 min nach ihrer Beendigung wurde in die *Vena jugularis* eine [³H]-Inulin-Dauerinfusion (20 µCi/h) mit einer Geschwindigkeit von 8 ml/min angeschlossen. Sowohl direkt als auch 1 h nach der Präparation erfolgte die Blutdruck- und Herzfrequenzmessung sowie Blutgewinnung in eine Hämatokrit-Kapillare (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG) aus der linken *Arteria femoralis*. Der inzwischen ausgeschiedene Urin wurde mittels eines operativ gelegten Blasenkatheters gesammelt. Am Ende des Versuchs wurden die linke und dann die rechte Niere durch den Schnitt der entsprechenden *Arteria renalis* entfernt. Die Kapsel wurde mit einer Pinzette entfernt. Die Nieren wurden gewogen. Die linke Niere wurde zu weiterer Analyse und zur Durchführung von Immunoblots genutzt. Die mit Blut gefüllten Kapillaren wurden mittels Hämatokritzentrifuge Mikro 12-24 (Hettich

GmbH & Co. KG) für 3 min bei 8.000 rpm abzentrifugiert. Die Hämatokritberechnung erfolgte als Verhältnis des Erythrozytensediments zur gesamten Länge des Sediments und des Überstands in der Kapillare. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. In den Serum- und Urinproben wurden bestimmt: radioaktive Absorption der Inulin (s. 2.10), Glukose- (s. 2.15.1), Natrium- (s. 2.14), Kalium- (s. 2.14), Kalzium- (s. 2.15.2) und Phosphatkonzentrationen (s. 2.15.3). Zusätzlich wurde im Serum der Insulinspiegel (s. 2.13.2) und im Urin die Albuminausscheidung (s. 2.13.3) bestimmt.

2.10 Radioaktive Inulinabsorption

Zur Messung der Inulinradioaktivität wurden 5 µl des direkt nach der Präparation (s. 2.9) sowie des eine Stunde später gesammelten Serums und des inzwischen gesammelten Urins zu je 10 ml Ultima Gold™ Cocktail (PerkinElmer Inc.) in Polyethylene Vials™ (PerkinElmer Inc.) pipetiert. Die Messwerte des [³H]-Inulins (PerkinElmer Inc.) erfolgten in Doppelbestimmungen mittels Flüssigszintillationszähler TRI-CARB® 2000CA (Canberra Packard Central Europe GmbH) über 5 min.

2.11 Berechnung der glomerulären Filtrationsrate (GFR)

Die glomeruläre Filtrationsrate zeigt an, wie viel Blutvolumen in einer Zeiteinheit durch die Nieren filtriert und von Schadstoffen befreit wird.

Zur GFR-Berechnung wird das intravenöse Inulin gemessen (s. 2.10):

$$\text{GFR} [\mu\text{l}/\text{min}] = (\text{U} / \text{P}) \times (\text{UV} / \text{t})$$

GFR - glomeruläre Filtrationsrate

U - relative radioaktive Inulinmenge im Urin als Mittelwert einer zweifachen Bestimmung [cpm]

P - relative radioaktive Inulinmenge im Serum als Mittelwert jeweiliger Doppelbestimmungen zu Beginn und am Ende der Urinsammlung [cpm]

UV - gesammeltes Urinvolumen [µl]

t - Zeitraum der Urinsammlung [min]

2.12 Proteinanalytische Methoden

2.12.1 Proteinlysate

Die linke Niere der Mäuse (s. 2.9) wurde mit 0,5 ml des Lysepuffers (s. 2.2) mittels Homogenator RGL500 (Heidolph) bei 4 °C auf Eis für 40 s bei 3.000 rpm zerkleinert sowie die Zellen lysiert. Anschließend wurden die Zellmembranen für 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in Reaktionsgefäße überführt und erneut mittels Sonifier B15 (Branson Ultraschall) bei 4 °C auf Eis für 30 s lysiert. Aus dem Überstand erfolgte die Proteinbestimmung.

2.12.2 Proteinbestimmung nach der BCA-Methode

2.12.2.1 Messprinzip

Bicinchonisäure (BCA) ist eine schwache Säure bestehend aus zwei carboxylierten Quinolinringen. Der BCA-Assay wurde im Jahre 1985 publiziert (Smith *et al.*, 1985). Er basiert auf der Reduktion von Cu (II) zu Cu (I), die durch bestimmte Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan, Cystein, Cystin) und deren Peptidbindungen bewirkt wird. Hierbei wird ein Komplex durch BCA spezifisch mit Cu (I) gebildet. Die Komplexbindung mit einwertigen Kupferionen ist durch eine violette Farbe sichtbar, deren Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm ausgewertet werden kann. Die BCA-Reaktion wird in der Biochemie zur quantitativen photometrischen Bestimmung der Proteinmenge angewendet. Die Proteinbestimmung nach der BCA-Methode war Voraussetzung für Immunoblots auch wurde sie zur Analyse der ausgeschiedenen Proteinmenge im Urin der Mäuse verwendet.

2.12.2.2 Durchführung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Herstellerangaben und wurde wie folgt durchgeführt: 2 mg/ml BSA-Lösung (Sigma-Aldrich) wurden mit H₂O_{bidest} im Verhältnis 1 : 1 verdünnt und zur Erstellung der Standardreihe: 0; 20; 33,3; 66,6; 100 und 133,3 µg/ml weiterverdünnt. Pro Standardprobe wurden entsprechend 0, 3, 5, 10, 15 und 20 µl einer BSA-Lösung (1 mg/ml) sowie

jeweils 5 µl des Lysepuffers (s. 2.2) für Immunoblot bzw. des H₂O_{bidest} zur Bestimmung der Proteinurie pipetiert. Von den untersuchten Proben wurden 5 µl zur Analyse eingesetzt. Alle Proben wurden mit H₂O_{bidest} auf 150 µl aufgefüllt, anschließend wurden 150 µl der Reagenzmischung (BCATM Protein Kit, Thermo Fischer Scientific Inc.) im Verhältnis MA : MB : MC = 1,25 : 1,2 : 0,05 zugegeben. Die Proben wurden für 30 min bei 37 °C (Brutschrank, Memmert GmbH & Co. KG) inkubiert. Die Absorption wurde photometrisch mittels Microtiterplatten Leser MR5000 (Dynatech Laboratories Inc.) bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen.

2.12.2.3 Probenaufbereitung zur Immunoblot-Analyse

Zur Immunoblot-Analyse wurden 80 µg Protein des Nierengewebes pro Probe eingesetzt. Das entsprechende Volumen des Lysates (s. 2.12.1) wurde mit 10 µl Ladepuffer (Roth GmbH & Co. KG) und mit PBS (s. 2.2) auf 40 µl aufgefüllt, sodass die gleichen Proteinmengen im identischen Volumen eingesetzt wurden. Die Proben wurden zum Lösen von Disulfidbrücken in Anwesenheit von β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) bei 95 °C für 8 min erhitzt. Anschließend wurden sie auf das Gel aufgetragen und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt.

2.12.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

2.12.3.1 Prinzip

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist ein von Laemmli (Laemmli, 1970) entwickeltes System, das der Auftrennung von Proteinen in erster Näherung nach ihrem Molekulargewicht dient. *Sodium dodecyl sulphate* (SDS, Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, dessen Moleküle sich an hydrophobe Proteinreste (Valin, Leucin, Isoleucin) anlagern und damit die Tertiär- und Quartärstrukturen zerstören sowie die Ladungsunterschiede von Proteinen neutralisieren. Deshalb erfolgt die Trennung primär nach dem Molekulargewicht der getrennten Proteine, wobei die SDS-Bindung für eine gleichmäßige negative Ladung der Proteine sorgt, was für eine Proteinwanderung in Abhängigkeit von der Molmasse in Richtung Anode sorgt.

Acrylamid/Bisacrylamid bildet durch die Polymerisation ein dreidimensionales Gitter. Die Proteine befinden sich zunächst in einem kurzen niedrigprozentigen Sammelgel, dann wandern sie in das Trenngel. Je größer das Molekulargewicht ist, desto kleinere Trenngelprozentigkeiten sind erforderlich. Die Proteinfractionen erreichen so bestimmte Position im Trenngel in Abhängigkeit von der Molmasse.

2.12.3.2 Gelvorbereitung

Zur Gelvorbereitung wurde das Mini-Protean[®] Tetra Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories Inc.) benutzt. Zwischen zwei mit 70 %igem Ethanol (Merck) gereinigten Gläschen wurde zunächst eine 10 %ige Trenngellösung (s. 2.3) eingefüllt und mit wenig 70 %igem Ethanol überschichtet, um eine Austrocknung beim Polymerisieren zu vermeiden. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde der Alkohol mit einem Filterpapier abgesaugt, die Sammelgellösung (s. 2.3) auf das Trenngel pipettiert und ein Kamm zur Ausbildung der Ladetaschen in die Sammelgellösung eingesteckt.

2.12.3.3 Durchführung

Die elektrophoretische Proteinauftrennung erfolgte im Laufpuffer (s. 2.2) mit Hilfe von Mini-Protean Tetra Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories Inc.). Die denaturierten Proben (s. 2.12.2.3) wurden in die Taschen des Gels aufgetragen und bei einer konstanten Stromspannung von 60 V über 30 min und danach bei 90 V aufgetrennt bis das Bromphenolblau des Ladepuffers die untere Grenze des Gels erreicht hatte. Zur späteren Größenbestimmung der Proteinbanden wurden parallel 10 µl eines Molekulargewichtsstandards (Protein[™] Standards Precision Plus Dual Color, Bio-Rad Laboratories Inc.) aufgetragen.

2.12.4 Western Blot (Immunoblot)

2.12.4.1 Prinzip

Die Western Blot-Analyse dient dem Nachweis der aufgetrennten Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper. Hierzu werden die Proteine auf Nitrozellulose transferiert. Das Protein stellt dabei das Antigen dar, welches mit dem

zugegebenen Antikörper einen Komplex bildet. Die Komplexe werden mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

2.12.4.2 Durchführung

Im Anschluss an eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte mittels Trans-Blot SD Semi-Dry (Bio-Rad Laboratories Inc.) ein Elektrotransfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (HybondTM-C Extra, GE Healthcare). Die Membran sowie Transferpapier (Whatman[®] Gel blotting Paper, Sigma-Aldrich) wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Zwei Lagen Transferpapier wurden in Anodenpuffer I (s. 2.2) getränkt und auf der Anode platziert, zwei weitere in Anodenpuffer II (s. 2.2) getränkte Papierstücke wurden darüber geschichtet. Darauf wurde die Membran platziert und dann auf die Membran das Gel aufgelegt. Den Abschluss zur Kathode bildeten sechs Transferpapierstücke, die in Kathodenpuffer (s. 2.2) getränkt waren. Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten des Blots wurden entfernt. Der Transfer dauerte 60 min bei einer Stromstärke von 0,06 A pro transferiertes Gel. Um eine gleichmäßige Beladung zu dokumentieren, wurden die Membranen mit Ponceau S Lösung (Sigma-Aldrich) angefärbt und der überschüssige Farbstoff durch Spülen mit H₂O_{bidest} entfernt. Die auf die Membran transferierten Proteine wurden dabei durch Bindung des roten Farbstoffs reversibel sichtbar gemacht und eingescannt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Nitrozellulose-Membranen für 15 min bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 5 %igem Magermilchpulver (Roth GmbH & Co. KG) in TBS-T (s. 2.2) blockiert. Im Anschluss daran wurden die Membranen mit einem spezifischen anti-TGF- β Antikörper (Cell Signaling Technology Inc.) in der Verdünnung 1 : 500 in einer Lösung aus 5 %igem Magermilchpulver in TBS-T über Nacht (16 h) bei 4 °C unter leichtem Schütteln mittels Plattformschüttler (Heidolph) inkubiert. Darauf folgten drei Waschschrte von jeweils 5 min mit Waschpuffer (s. 2.2). Anschließend wurden die Membranen für 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mittels Plattformschüttler mit einem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper (anti-Kaninchen IgG, Cell Signaling Technology Inc.) in Verdünnung 1 : 5000 ebenfalls in einer Lösung aus 5 %igem Magermilchpulver

in TBS-T inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden nach erneutem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer über die Peroxidaseaktivität durch Chemilumineszenz nachgewiesen. Dies erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems (GE Healthcare), dabei wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Die spezifischen Signale wurden mittels Röntgenfilm X-OMAT UV Plus (Kodak) und X-Ray Film Processor Optimax 1170-1-0000 (Protec GmbH & Co. KG) detektiert.

2.13 ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

2.13.1 Prinzip

Der ELISA dient dem quantitativen Nachweis von Proteinen. Die ELISA-Platte eines Kits ist mit spezifischen Antikörpern gegen das zu untersuchende Protein beschichtet. Der Antikörper bindet das zu untersuchende Antigen. Anschließend kommt es zur Bindung eines markierten Antikörpers (Enzyms) an den zweiten Antikörper. Die ungebundenen Moleküle werden ausgespült, das entsprechende Substrat zugegeben und am markierten Antikörper umgesetzt. Nach einer definierten Inkubationszeit wird die Reaktion gestoppt, die Absorption photometrisch gemessen und die Proteinmenge nach der Standardkurve ausgewertet.

2.13.2 Insulinbestimmung

Der Insulinspiegel wurde in unverdünnten Plasmaproben mittels Insulin Mouse Ultra Sensitive ELISA Kit (ALPCO Diagnostics im Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke und Crystal Chem Inc. im Pharmakologischen Institut der Uni Tübingen) bestimmt. Vor dem Pipettieren wurden die Proben geschüttelt (Vortex MS2, IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG) und bei 4 °C für 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert (Zentrifuge 5415R, Eppendorf AG). Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Absorption wurde bei 450 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) mittels Microplate Reader SpectraMax[®] M2/M2[°] (Molecular Devices Corporation) im Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke und mit Hilfe Microtiterplatten Leser

MR5000 (Dynatech Laboratories Inc.) im Pharmakologischem Institut der Uni Tübingen gemessen und mit Hilfe von Standardkurven ausgewertet.

2.13.3 Albuminbestimmung

Die Albuminbestimmung erfolgte in unverdünnten Urinproben mittels Albumin AssayMax Mouse Elisa Kit (Assaypro). Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Vor dem Pipettieren wurden die Proben geschüttelt (Vortex MS2, IKA®-Werke GmbH & Co. KG) und bei 4 °C für 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert (Zentrifuge 5415R, Eppendorf AG). Die Absorption wurde bei 450 nm mittels Microtiterplatten Leser MR5000 (Dynatech Laboratories Inc.) gemessen und mit Hilfe von Standardkurven ausgewertet.

2.14 Natrium- und Kaliumbestimmung mittels Flammenphotometer

10 ml der Lithium-Stammlösung 500 mmol/l (Eppendorf AG) wurden mit H_2O_{bidest} auf 1000 ml verdünnt. Für die Bestimmung von Natrium und Kalium im Serum wurde eine 130 mM/l Natrium/Kalium-Standardlösung (s. 2.2) vorbereitet, für die Bestimmung von Natrium und Kalium im Urin wurde eine 200 mM/l Natrium/Kalium-Standardlösung (s. 2.2) verwendet. Als Standard 0 mM/l diente H_2O_{bidest} . 10 μ l jeder Natrium/Kalium-Standardlösung wurde in Triplikaten und jede unverdünnte bzw. 1 : 2 oder 1 : 4 mit H_2O_{bidest} verdünnte Urin- oder Plasmaprobe in Duplikaten in 2 ml der verdünnten Lithium-Stammlösung pipetiert. Alle vorbereiteten Proben wurden für 10 s geschüttelt (Vortex MS2, IKA®-Werke GmbH & Co. KG) und für 3 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert (Zentrifuge 5415R, Eppendorf AG). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe eines Flammenphotometers (ELEX 6361; Eppendorf AG). Berechnet wurden die Messwerte auf der Basis von Standardkonzentrationsreihen.

2.15 UV-Photometrie

2.15.1 Glukosebestimmung

Zunächst wurden die Plasmaproben im Verhältnis 1 : 2 und die Urinproben 1 : 5 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verdünnt. Parallel wurde eine Standardreihe von 0; 2,5; 5,0; 7,5 und 10,0 mM Glukose vorbereitet. In das Reagenzgemisch (Glukose/HK Glucoquant Kit, Roche Diagnostics GmbH) aus 500 μl Reagenz I und 50 μl Reagenz II wurden jeweils 3 μl des Standards sowie der Proben in Doppelbestimmungen pipettiert. Die Absorption wurde mittels Spektrophotometer U-3000 (Hitachi Ltd.) bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Die Berechnung der Glukosekonzentration erfolgte nach der Standardkurve.

2.15.2 Kalziumbestimmung

Die Plasmaproben wurden im Verhältnis 1 : 2 und die Urinproben im Verhältnis 1 : 5 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verdünnt. Es wurde eine Standardreihe von 0; 0,125; 0,25; 1,0; 1,5 und 2,0 mM Kalziumchlorid (Merck) vorbereitet. In das Reagenzgemisch (Calcium Reagent Kit, Roche Diagnostics GmbH) aus 500 μl Reagenz I und 200 μl Reagenz II wurden jeweils 10 μl des Standards sowie der Proben in Doppelbestimmungen pipettiert. Die Absorption wurde mittels Spektrophotometer U-3000 (Hitachi Ltd.) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Die Bestimmung der Kalziumkonzentrationen erfolgte nach der Standardkurve.

2.15.3 Phosphatbestimmung

Die Plasmaproben wurden im Verhältnis 1 : 2 und die Urinproben im Verhältnis 1 : 5 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verdünnt. Es wurde eine Standardreihe von 0; 1,56; 3,125; 6,25 und 12,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat (Merck) vorbereitet. In das Reagenzgemisch (Phosphate Reagent Kit, Roche Diagnostics GmbH) aus 500 μl Reagenz I und 220 μl Reagenz II wurden jeweils 10 μl des Standards sowie der Proben in Doppelbestimmungen pipettiert. Die Absorption wurde mittels Spektrophotometer U-3000 (Hitachi Ltd.) bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Die Bestimmung der Phosphatkonzentrationen erfolgte nach der Standardkurve.

2.15.4 Kreatininbestimmung nach der Jaffé Methode und Kreatininclearanceberechnung

Der Kreatininspiegel wurde mittels Creatinin Jaffé Reagent Kit nach der Jaffé Methode (Labor+Technik GmbH) bestimmt. Die Urin- und Plasmaproben wurden im Verhältnis 1 : 50 mit H₂O_{bidest} verdünnt. In das Reagenzgemisch im Verhältnis 1 : 1 wurden jeweils 100 µl H₂O_{bidest} (Kontrolle), des Standards (Standardkonzentration = 2 mg/ml, bzw. 1,77 µmol/l) und der Proben als Doppelbestimmung pipettiert. Die Extinktionen wurden nach 30 s (E₁) und nach weiteren 3 min (E₂) mittels Spektrophotometer U-3000 (Hitachi Ltd.) bei einer Wellenlänge von 492 nm bestimmt.

Die Kreatininauswertung erfolgte nach folgender Berechnung:

$$\Delta E = E_2 - E_1$$

[c] = Kreatininkonzentration

$$[c] = \text{Standardkonz.} \times (\Delta E_{\text{PROBE}} - \Delta E_{\text{BLANK}}) / (\Delta E_{\text{STANDARD}} - \Delta E_{\text{BLANK}}) \times 50$$

Die Kreatininclearance wurde in folgender Weise berechnet:

$$C [\mu\text{l}/\text{min}] = U \times UV / S$$

U - Kreatininkonzentration im Urin [mg/dl]

S - Kreatininkonzentration im Serum [mg/dl]

UV - Urinvolumen in 24 h [$\mu\text{l} / 24 \text{ h} = \mu\text{l} / 24 * 60 \text{ min} = \mu\text{l} / 1440 \text{ min}$]

2.16 Statistische Analyse

Alle Analysen erfolgten mittels Statistica 10 (StatSoft).

Für die statistischen Auswertungen wurden folgende Tests eingesetzt:

- bei normaler Verteilung unabhängiger Gruppen: t-Test,
- bei nicht parametrischer Verteilung unabhängiger Gruppen (unverbundener Stichproben): U-Mann-Whitney-Test,
- bei nicht parametrischer Verteilung abhängiger Gruppen (verbundener Stichproben): Wilcoxon-Test.

3 Ergebnisse

3.1 Bedeutung des $G\alpha_{i2}$ -Proteins für die Glukosehomöostase

Der Glukosetoleranztest ist ein wichtiger Nachweis einer gestörten Glukosehomöostase. In der klinischen Praxis hat er u.a. eine diagnostische Bedeutung bei Verdacht auf Diabetes mellitus Typ II.

Der Test wird auch zur Beurteilung der Glukosetoleranz bei Mäusen eingesetzt. Bei C57BL/6 Mäusen wird nach einer 16 h-Nüchtern-Periode eine Dosis von 2 g Glukose pro kg Körpergewicht empfohlen (Andrikopoulos *et al.*, 2008). Der Glukosebolus wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl intraperitoneal als auch peroral verabreicht. Mit dem ersten Verfahren werden Einflüsse des Magen-Darm-Traktes auf die Glukoseaufnahme, wie die Wirkung der Inkretine oder Aufnahme im Darm umgangen.

Für den intraperitonealen Glukosetoleranztest (iGTT) wurden vier $G\alpha_{i2}^{+/+}$ (Kontroll-Tiere) und ihre vier $G\alpha_{i2}^{-/-}$ Geschwistermäuse im Alter von 56 Tagen, alle männlichen Geschlechts, über Nacht für 16 h nüchtern gesetzt. Die Bestimmung der Blut-Glukose (Abb. 1) und des Serum-Insulinspiegels (Abb. 2) erfolgte über 4 h.

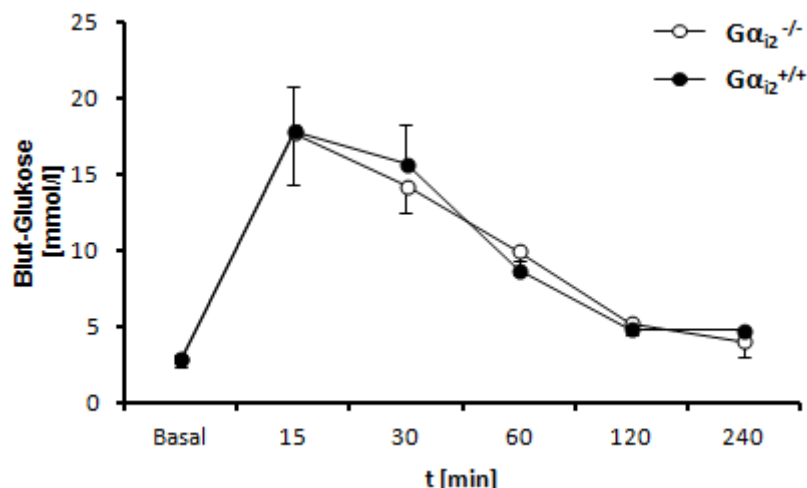


Abb. 1: Blut-Glukose nach iGTT. Männliche $G\alpha_{i2}^{-/-}$ und $G\alpha_{i2}^{+/+}$ Mäuse (je $n = 4$) wurden über Nacht für 16 h nüchtern gesetzt. Die Bestimmung der Blut-Glukose erfolgte basal sowie 15, 30, 60, 120 und 240 min nach einer intraperitonealen Gabe eines 20 %igen Glukosebolus (2 g/kg Körpergewicht). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

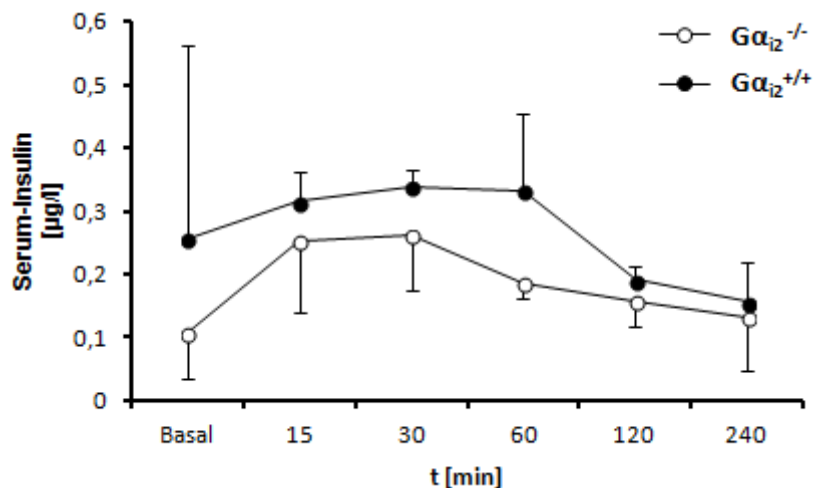


Abb. 2: Serum-Insulin nach iGTT. Männliche Gα_{i2}^{-/-} und Gα_{i2}^{+/+} Mäuse (je n = 4) wurden über Nacht für 16 h nüchtern gesetzt. Die Bestimmung des Serum-Insulins erfolgte basal sowie 15, 30, 60, 120 und 240 min nach einer intraperitonealen Gabe eines 20 %igen Glukosebolus (2 g/kg Körpergewicht). Dargestellt sind Mittelwerte ± SD.

Bei vergleichbarem Verlauf der Glukosewerte bei beiden Mausgenotypen zeigten die Gα_{i2}^{-/-} Tiere jedoch schon basal tendenziell niedrigere Insulinwerte. Zu keinem Zeitpunkt des Experiments war der Unterschied signifikant, jedoch fiel auf, dass die Gα_{i2}^{-/-} Mäuse bei tendenziell niedrigeren Insulinwerten die Blut-Glukosewerte auf demselben Niveau halten konnten wie die Wildtyp-Tiere.

Zur Durchführung des oralen Glukosetoleranztests (oGTT) wurden dieselben Gα_{i2}^{-/-} und Gα_{i2}^{+/+} Mäuse nach einer Erholungsphase von einer Woche erneut über Nacht für 16 h nüchtern gesetzt. Die Bestimmung der Blut-Glukose (Abb. 3) und des Serum-Insulins (Abb. 4) erfolgte über 120 min nach einer peroralen Gabe eines 20 %igen Glukosebolus (2 g/kg Körpergewicht).

Interessanterweise zeigten die Gα_{i2}^{-/-} Mäuse bei dem oGTT tendenziell niedrigere Blut-Glukosewerte, die 2 h nach der Glukosegabe statistische Signifikanz erreichten. Ursprünglich war das Experiment ebenfalls über 4 h geplant, da aber nach 2 h die Tiere ihre Glukoseausgangswerte erreichten, wurde der Versuch beendet, um den Tieren eine unnötige Belastung zu ersparen.

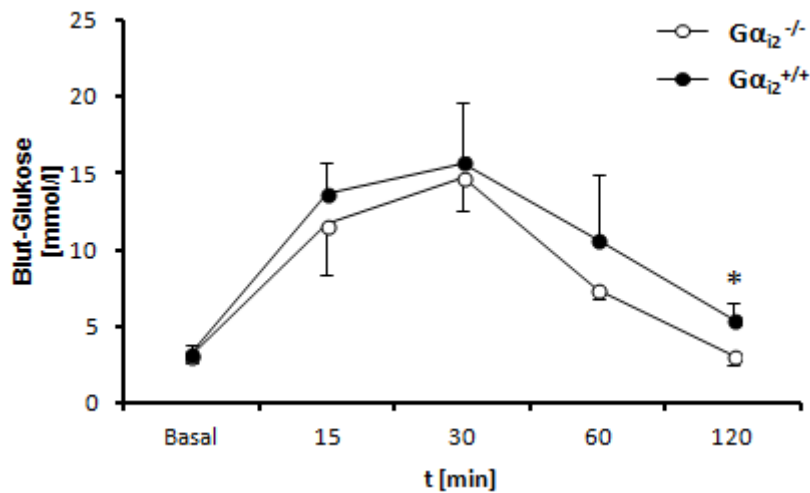


Abb. 3: Blut-Glukose nach oGTT. Dieselben männlichen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ und $G\alpha_{i2}^{+/+}$ Mäuse wie in Abb. 1 und 2 (je $n = 4$) wurden über Nacht für 16 h nüchtern gesetzt. Die Bestimmung der Blut-Glukose erfolgte basal sowie 15, 30, 60 und 120 min nach einer peroralen Gabe eines 20 %igen Glukosebolus (2 g/kg Körpergewicht). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; *: $p < 0,05$.

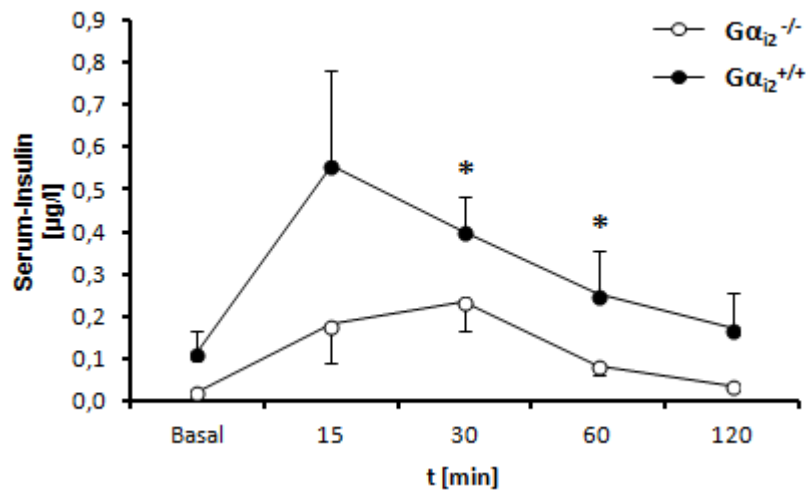


Abb. 4: Serum-Insulin nach oGTT. Dieselben männlichen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ ($n = 2 - 4$) und $G\alpha_{i2}^{+/+}$ ($n = 4$) Mäuse wie in Abb. 1 und 2 wurden über Nacht für 16 h nüchtern gesetzt. Die Bestimmung des Serum-Insulins erfolgte basal sowie 15, 30, 60 und 120 min nach einer peroralen Gabe von 20 % Glukosebolus (2 g/kg Körpergewicht). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; *: $p < 0,05$.

Auch die Insulinspiegel der $G\alpha_{i2}^{-/-}$ Mäuse nach oGTT waren niedriger und erreichten nach 30 und 60 min statistische Signifikanz. In den Serumproben der $G\alpha_{i2}^{-/-}$ Tiere waren zwei Insulinwerte initial und einer nach 120 min unterhalb der Nachweisgrenze und wurden deshalb von den weiteren Berechnungen

ausgeschlossen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass beim Einschluss dieser Daten die Unterschiede noch größer sein würden.

Zur weiteren Analyse der erhobenen Daten wurden diese in Abhängigkeit von der Applikationsart dargestellt. Die Kontroll-Tiere wie auch die $G\alpha_{i2}^{-/-}$ Tiere zeigten 15 min nach dem intraperitonealen Glukosebolus höhere Glukosewerte, also eine bessere Glukosekontrolle nach einer peroralen Gabe (Abb. 5 und 6). Die $G\alpha_{i2}^{-/-}$ Mäuse hielten bei 60 und 120 min des oGTTs die Glukosewerte auf einem tendenziell niedrigeren Niveau im Vergleich zu iGTT (Abb. 6).

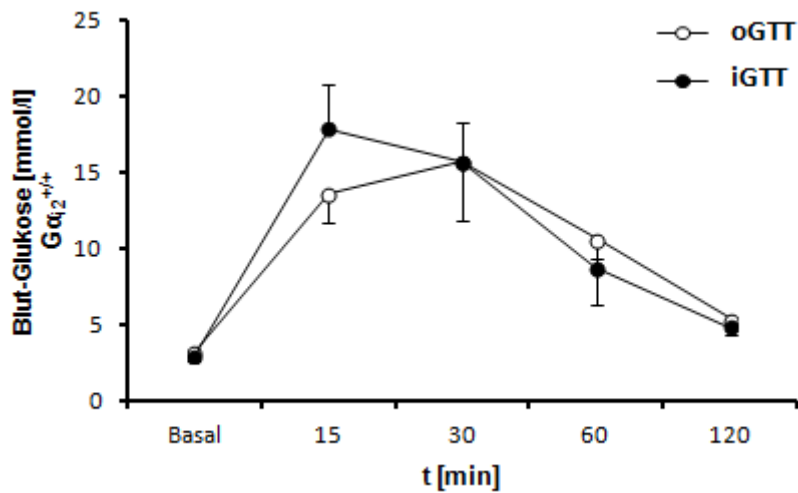


Abb. 5: Blut-Glukose nach iGTT und oGTT. Die männlichen $G\alpha_{i2}^{+/+}$ Mäuse (je $n = 4$) wurden jeweils über Nacht für 16 h nüchtern gesetzt. Die Bestimmung der Blut-Glukose erfolgte basal sowie 15, 30, 60 und 120 min nach einer peroralen bzw. intraperitonealen Gabe eines 20 %igen Glukosebolus (2 g/kg Körpergewicht). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

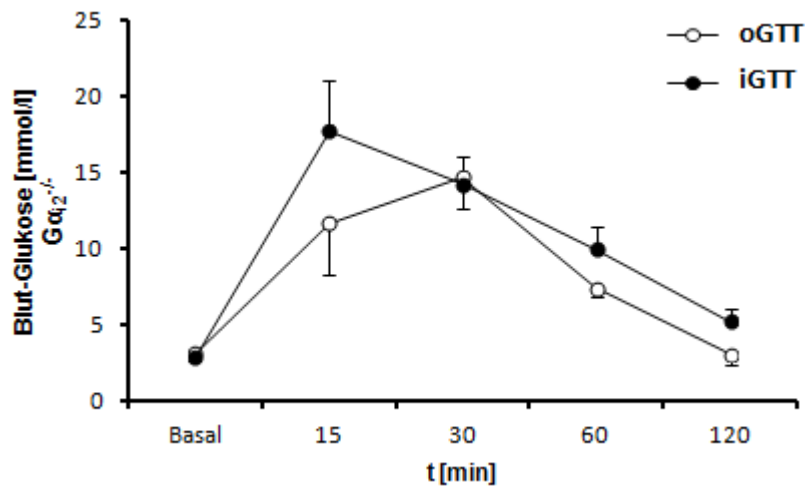


Abb. 6: Blut-Glukose nach iGTT und oGTT. Die männlichen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ Mäuse (je $n = 4$) wurden jeweils über Nacht für 16 h nüchtern gesetzt. Die Bestimmung der Blut-Glukose erfolgte basal sowie 15, 30, 60 und 120 min nach einer peroralen bzw. intraperitonealen Gabe eines 20 %igen Glukosebolus (2 g/kg Körpergewicht). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

Ein peroraler Glukosebolus löste bei den Wildtyp-Mäusen eine stärkere Insulinfreisetzung aus, die 15 und 30 min nach der Glukosegabe maximale Werte erreichte (Abb. 7). Dies geschah sogar trotz der ursprünglich niedrigeren Werte.

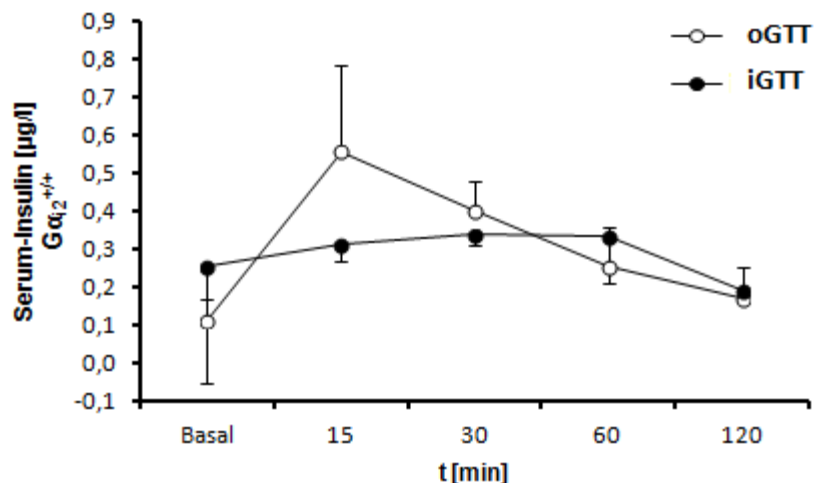


Abb. 7: Serum-Insulin nach iGTT und oGTT. Die männlichen $G\alpha_{i2}^{+/+}$ Mäuse (je $n = 4$) wurden jeweils über Nacht für 16 h nüchtern gesetzt. Die Bestimmung des Serum-Insulins erfolgte basal sowie 15, 30, 60 und 120 min nach einer peroralen bzw. intraperitonealen Gabe eines 20 %igen Glukosebolus (2 g/kg Körpergewicht). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

Im Gegensatz hierzu zeigten die $G\alpha_{i2}^{-/-}$ Tiere zu jedem Zeitpunkt höhere Insulinwerte im iGTT im Vergleich zum oGTT. Interessant ist jedoch, dass über die ersten 30 min der Anstieg der Insulinkonzentrationen parallel verlief und anschließend nach peroraler Glukosegabe die Insulinkonzentrationen im Serum sehr viel stärker absanken als nach intraperitonealer Gabe (Abb. 8).

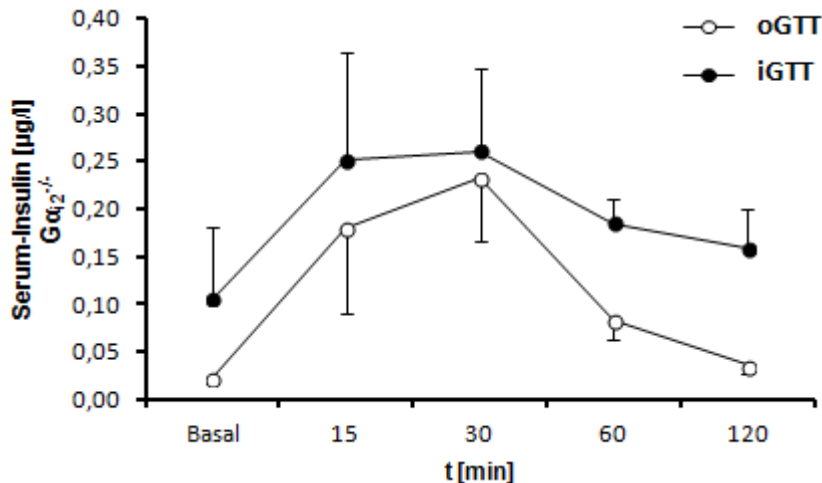


Abb. 8: Serum-Insulin nach iGTT und oGTT. Die männlichen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ Mäuse ($n = 2 - 4$) wurden jeweils über Nacht für 16 h nüchtern gesetzt. Die Bestimmung des Serum-Insulins erfolgte basal sowie 15, 30, 60 und 120 min nach einer peroralen bzw. intraperitonealen Gabe eines 20 %igen Glukosebolus (2 g/kg Körpergewicht). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

3.2 Streptozotozin-induzierter Diabetes

Tiermodelle ermöglichen eine *in vivo* Beobachtung einer induzierten Krankheit und ihrer Konsequenzen. Eine häufig verwendete Methode für einen experimentell-induzierten Diabetes ist die chemisch-toxische Induktion der Erkrankung durch Streptozotozin (STZ). STZ ist ein durch *Streptomyces achromogenes* produziertes, für β -Zellen toxisches Antibiotikum, das durch den Glukosetransporter 2 (GLUT 2) in die β -Zellen gelangt, ihre DNA zerstört und dadurch zum Zelluntergang führt (Yamamoto *et al.*, 1981; Szkudelski, 2001). Die Diabetesinduktion sollte entweder durch eine einmalig hohe Dosis oder durch mehrmalige niedrig dosierte Injektionen erfolgen (Tian *et al.*, 2010). In einer Studie mit STZ-behandelten Ratten (Alimohammadi *et al.*, 2013), die einmalig eine i.p. Injektion von 60 mg STZ/kg Körpergewicht erhielten, ließ sich

eine Reduktion der Langerhans-Inselmasse um ca. 75 % ($19,2 \pm 4,9$ Inseln bei den Kontroll-Tieren vs. $5 \pm 1,4$ Inseln bei den STZ-Tieren) nachweisen. Die Anzahl der β -Zellen bei den Kontroll-Tieren lag bei $120,4 \pm 24,6$ Zellen pro Insel und bei den STZ-Tieren bei $42 \pm 7,3$ Zellen pro Insel, was einer Abnahme um ca. 65 % entspricht. Parallel nahm der Durchmesser der β -Zellen nach der STZ-Behandlung fast um die Hälfte ab: $102,8 \pm 11,8 \mu\text{m}$ bei den Kontroll-Tieren vs. $51,8 \pm 16,3 \mu\text{m}$ bei den STZ-Tieren.

In den β -Zellen der Maus werden neben $G\alpha_{i2}$ -Protein auch die PTX-sensitiven Proteine $G\alpha_{i1}$ und $G\alpha_{i3}$ exprimiert. Befunde aus der Literatur (Wang *et al.*, 2011) sowie eigene initiale Untersuchungen (Prof. Dr. Dr. Nürnberg, persönliche Mitteilung) zeigten keinen signifikanten Effekt einer $G\alpha_{i1}$ - oder $G\alpha_{i3}$ -Defizienz auf Glukose- und Insulinspiegel nach durchgeführtem Glukosetoleranztest. Um die Bedeutung dieser $G\alpha_i$ -Isoformen auf die Glukose- und Insulinhomöostase weitergehend zu untersuchen, wurde das STZ-Modell des experimentell-induzierten Diabetes verwendet. In einem ersten Versuchsansatz wurden acht $G\alpha_i^{+/+}$ Mäuse im Alter von 153 ± 25 Tagen, sieben $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Tiere 147 ± 16 Tage alt ($G\alpha_{i1}^{-/-}$ vs. $G\alpha_i^{+/+}$, $p = 0,19$) und neun $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse im Alter von 138 ± 20 Tagen ($G\alpha_{i3}^{-/-}$ vs. $G\alpha_i^{+/+}$, $p = 0,61$), alle männlichen Geschlechts, verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde den Mäusen am Folgetag nach den basalen Messungen (Glukosekonzentration und Insulinspiegel im Serum, Körpergewicht, Flüssigkeitsaufnahme, Nahrungsaufnahme, Ausscheidung von Urin, Natrium, Kalium, Albumin und Glukose sowie Kreatininclearance) und nach weiteren fünf Tagen eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg Streptozotizin pro kg Körpergewicht i.p. injiziert. Die weiteren Bestimmungen erfolgten am Tag 30, 45, 60, 75 und 90 ohne vorhergehenden Nahrungsentzug. Im Verlauf des Versuchs verstarben einige Tiere, deren bis zum Tode erhaltene Ergebnisse flossen jedoch in die Resultate mit ein. Eine $G\alpha_i^{+/+}$ und eine $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Maus wurden zwischen dem Tag 60 und 75 in Käfigen tot aufgefunden. Ein $G\alpha_i^{+/+}$ Tier verstarb zwischen dem Tag 30 und 45. Eine $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Maus verstarb während der Isoflurannarkose zur Blutgewinnung am Tag der basalen Messungen.

Um den Erfolg der STZ-Behandlung zu beurteilen, wurden als erstes die Serum-Insulinspiegel über den Versuchszeitraum bestimmt (Abb. 9). Basal waren die Insulinwerte aller Mauslinien vergleichbar. Bei allen Genotypen fielen die Insulinwerte bis 60 Tage nach Versuchsbeginn ab. Danach war wiederum bei allen drei Genotypen ein Anstieg der mittleren Insulinkonzentrationen zu beobachten.

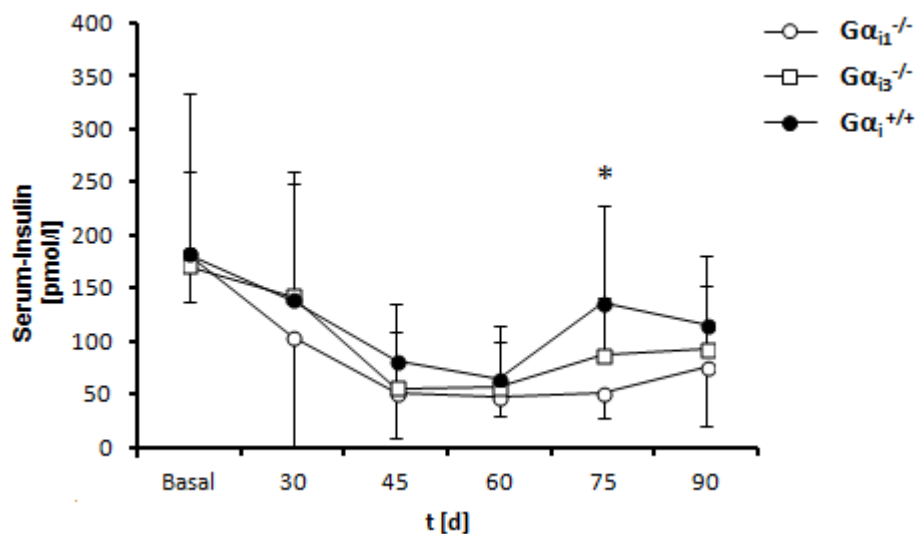


Abb. 9: Serum-Insulin bei STZ-induziertem Diabetes der männlichen $G\alpha_{i}^{+/+}$ (n = 6 - 8), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 6 - 7) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse (n = 8 - 9). Den Mäusen wurde am Folgetag der basalen Messung und nach weiteren fünf Tagen eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Das Serum-Insulin wurde basal, am Tag 30, 45, 60, 75 und 90 unter nicht-nüchternen Bedingungen mittels ELISA (s. 2.13.2) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. *: $p < 0,05$ $G\alpha_{i1}^{-/-}$ vs. $G\alpha_{i}^{+/+}$.

Über den Versuchszeitraum waren die Insulinwerte bei den *knock out* Tieren tendenziell niedriger als bei den Kontroll-Tieren. Am Tag 75 war der Unterschied $G\alpha_{i1}^{-/-}$ vs. $G\alpha_{i}^{+/+}$ statistisch signifikant.

Die Serum-Glukosewerte (Abb. 10) stiegen bei allen Genotypen vergleichbar bis zum Tag 45 an und verblieben dann auf einem Plateau. Die Höhe der gemessenen Glukosekonzentrationen waren in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie in der Literatur berichtet (Tian *et al.*, 2010).

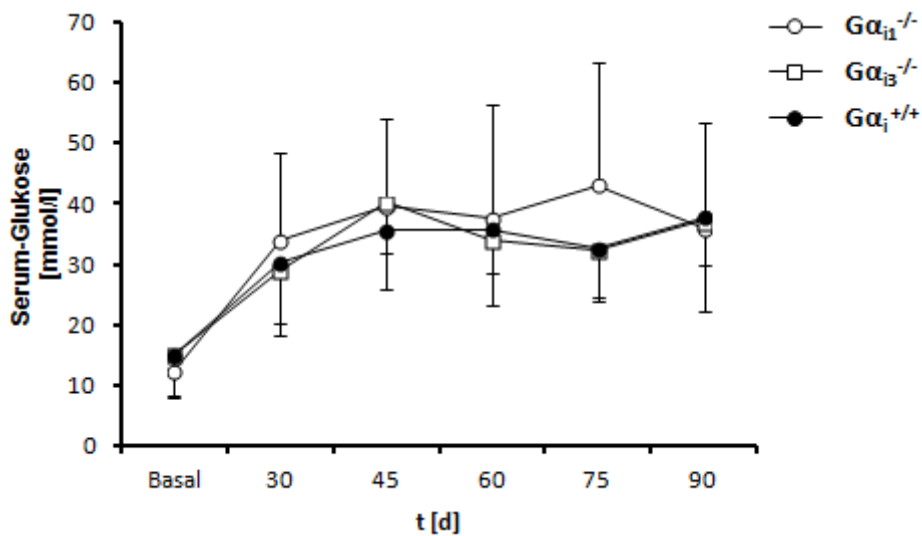


Abb. 10: Serum-Glukose bei STZ-induziertem Diabetes der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ (n = 6 - 8), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 6 - 7) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse (n = 8 - 9). Den Mäusen wurde am Folgetag der basalen Messung und nach weiteren fünf Tagen eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Die Serum-Glukose wurde basal, am Tag 30, 45, 60, 75 und 90 unter nicht-nüchternen Bedingungen mittels UV-Photometrie (s. 2.15.1) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

Weiterhin wurde der Verlauf des Körpergewichts ermittelt. Bis zum Tag 30 verloren die Mäuse aller drei Genotypen an Gewicht (Abb. 11) und ihr ursprünglich unterschiedliches Ausgangsgewicht glich sich an. Die prozentuale Gewichtsabnahme bei Tieren beider *knock out* Genotypen betrug 10 %, bei den Kontroll-Tieren 15 %. Danach blieb es bei den $G\alpha_i^{+/+}$ und $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Mäusen stabil, während interessanterweise bei den $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Tieren eine tendenziell leichte Zunahme zu beobachten war.

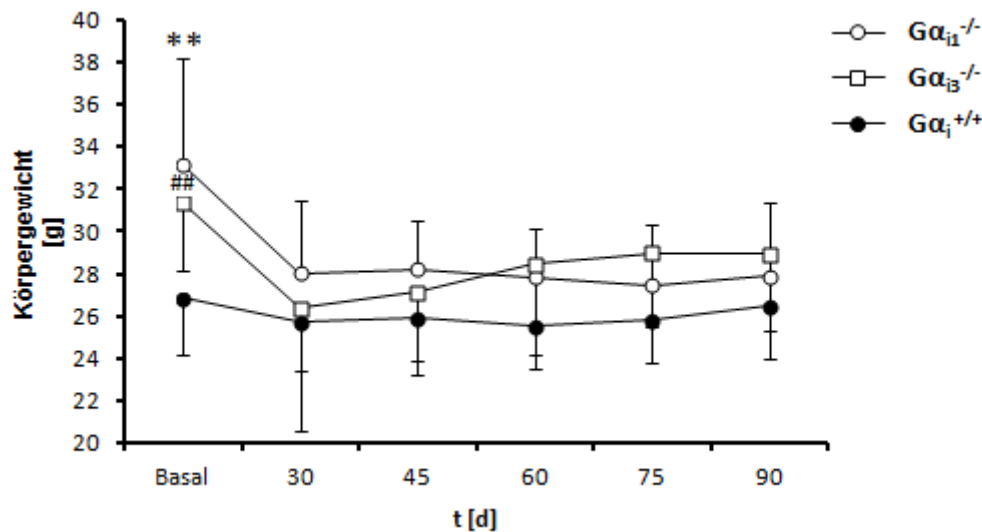


Abb. 11: Körpergewicht bei STZ-induziertem Diabetes der männlichen $G\alpha_{i1}^{+/+}$ ($n = 6 - 8$), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ ($n = 6 - 7$) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse ($n = 8 - 9$). Zunächst wurde das basale Körpergewicht bestimmt. Den Mäusen wurde am Folgetag der basalen Messung und nach weiteren fünf Tagen eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Die Tiere wurden erneut am Tag 30, 45, 60, 75 und 90 gewogen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; **: $p < 0,01$ $G\alpha_{i1}^{-/-}$ vs. $G\alpha_{i}^{+/+}$; ##: $p < 0,01$ $G\alpha_{i3}^{-/-}$ vs. $G\alpha_{i}^{+/+}$.

Über weitere Merkmale des experimentell-induzierten Diabetes, wie Polyphagie (vermehrte Nahrungsaufnahme), Polydipsie (vermehrte Flüssigkeitsaufnahme) und Polyurie (vermehrte Urinausscheidung) wurde schon mehrmals in der Literatur berichtet (Wald und Popovtzer, 1984; Hakim *et al.*, 1997; Chatzigeorgiou *et al.*, 2009). Deshalb wurden auch diese Parameter über den Untersuchungszeitraum bestimmt.

In unseren Untersuchungen nahm der Verbrauch an Nahrung bei allen Genotypen bis zum Tag 30 deutlich zu, um danach tendenziell wieder abzunehmen (Abb. 12). Die $G\alpha_{i1}$ -defizienten Tiere zeigten jedoch eine tendenziell größere Nahrungsaufnahme im Vergleich zu den anderen Stämmen, die zwischen dem Tag 30 bis 75 konstant blieb und am Tag 90 wieder abfiel.

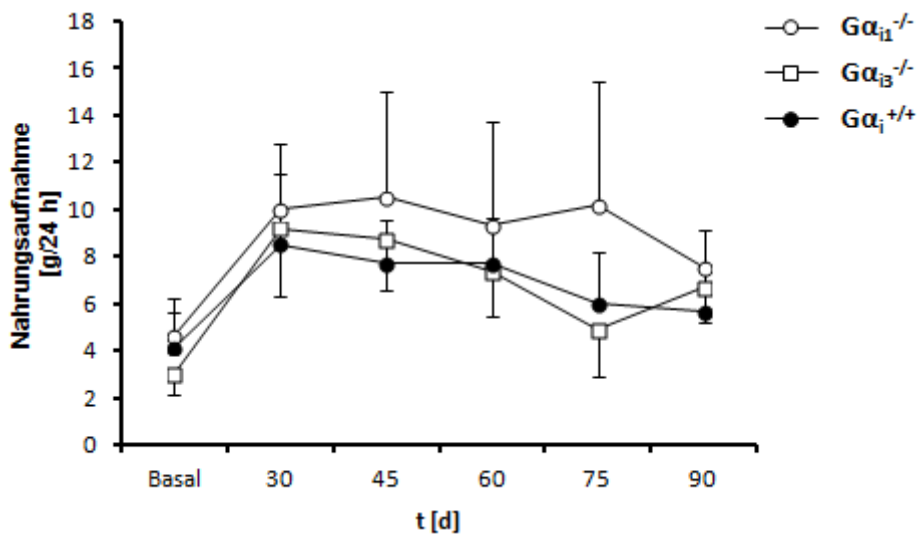


Abb. 12: Nahrungsaufnahme bei STZ-induziertem Diabetes der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ (n = 6 - 8), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 6 - 7) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse (n = 8 - 9). Zunächst wurde die basale Nahrungsaufnahme bestimmt. Den Mäusen wurde am Folgetag der basalen Messung und nach weiteren fünf Tagen eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Die Nahrungsaufnahme wurde erneut am Tag 30, 45, 60, 75 und 90 bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

Die Flüssigkeitsaufnahme (Abb. 13) und die Urinausscheidung (Abb. 14) zeigten bei jedem Genotyp einen ähnlichen Verlauf, jedoch waren Unterschiede festzustellen. Beide Parameter stiegen bis zum Tag 45 bei allen Genotypen an. Ab diesem Zeitpunkt zeigten die $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Mäuse Polydipsie und Polyurie, während die beiden anderen Stämme diese reduzierten bzw. gleich hielten. Die Tendenz der $G\alpha_{i1}$ -defizienten Tiere war deutlich, aber aufgrund großer Standardabweichungen wurde keine statistische Signifikanz erreicht.

In den Urinproben wurde die Ausscheidung folgender Parameter gemessen: Natrium, Kalium, Protein, Albumin und Glukose. Die Natrium- sowie Kaliumausscheidung zeigten in allen drei Gruppen einen ansteigend schwankenden Verlauf ohne signifikante Unterschiede (Abb. 15 und 16).

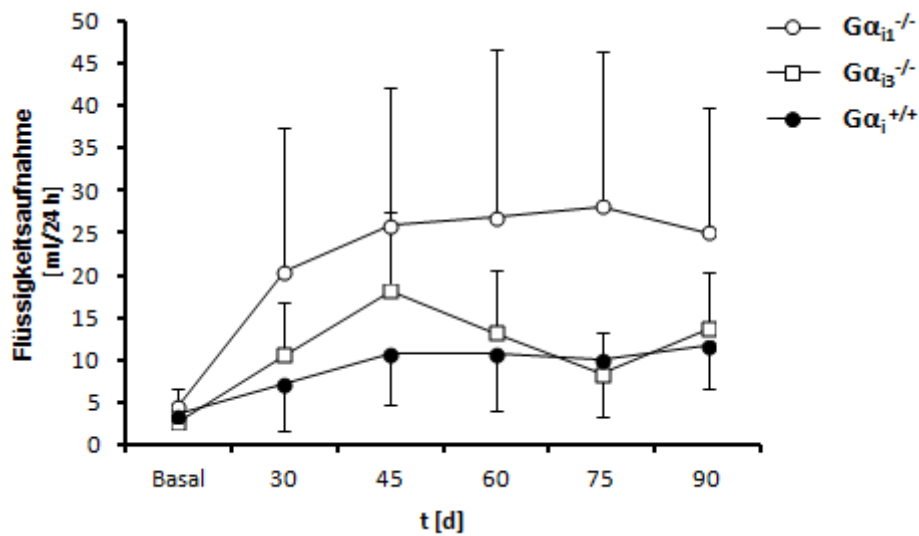


Abb. 13: Flüssigkeitsaufnahme bei STZ-induziertem Diabetes der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ ($n = 6 - 8$), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ ($n = 6 - 7$) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse ($n = 8 - 9$). Zunächst wurde die basale Flüssigkeitsaufnahme bestimmt. Den Mäusen wurde am Folgetag der basalen Messung und nach weiteren fünf Tagen eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Die Flüssigkeitsaufnahme wurde erneut am Tag 30, 45, 60, 75 und 90 bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

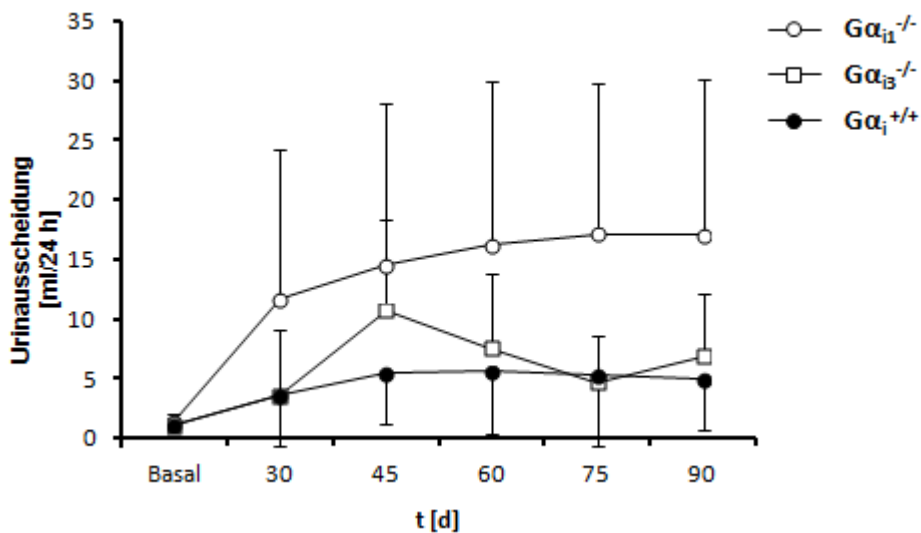


Abb. 14: Urinausscheidung bei STZ-induziertem Diabetes der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ ($n = 6 - 8$), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ ($n = 6 - 7$) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse ($n = 8 - 9$). Zunächst wurde die basale Urinausscheidung bestimmt. Den Mäusen wurde am Folgetag der basalen Messung und nach weiteren fünf Tagen eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Die Urinausscheidung wurde erneut am Tag 30, 45, 60, 75 und 90 bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

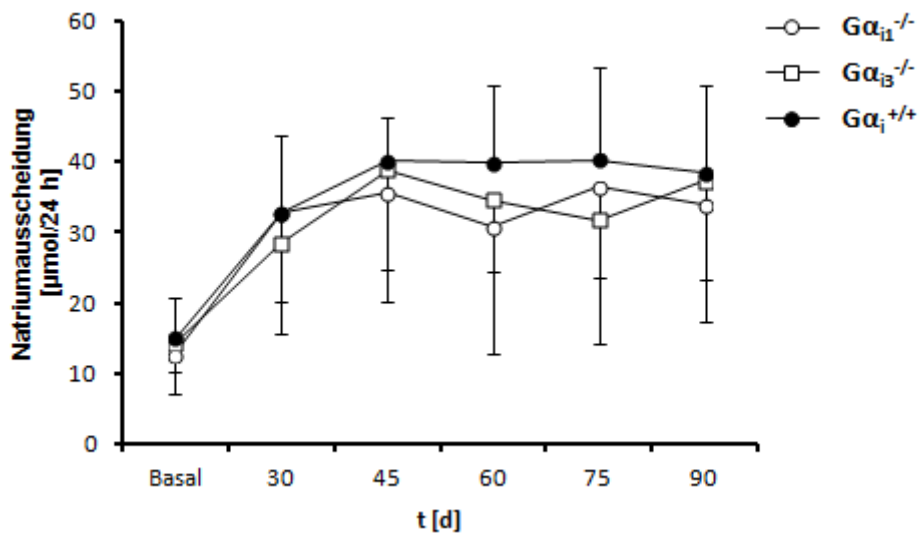


Abb. 15: Natriumausscheidung bei STZ-induziertem Diabetes der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ (n = 6 - 8), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 6 - 7) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse (n = 8 - 9). Den Mäusen wurde am Folgetag der basalen Messung und nach weiteren fünf Tagen eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Die Natriumausscheidung wurde basal, am Tag 30, 45, 60, 75 und 90 mittels Flammenphotometer (s. 2.14) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

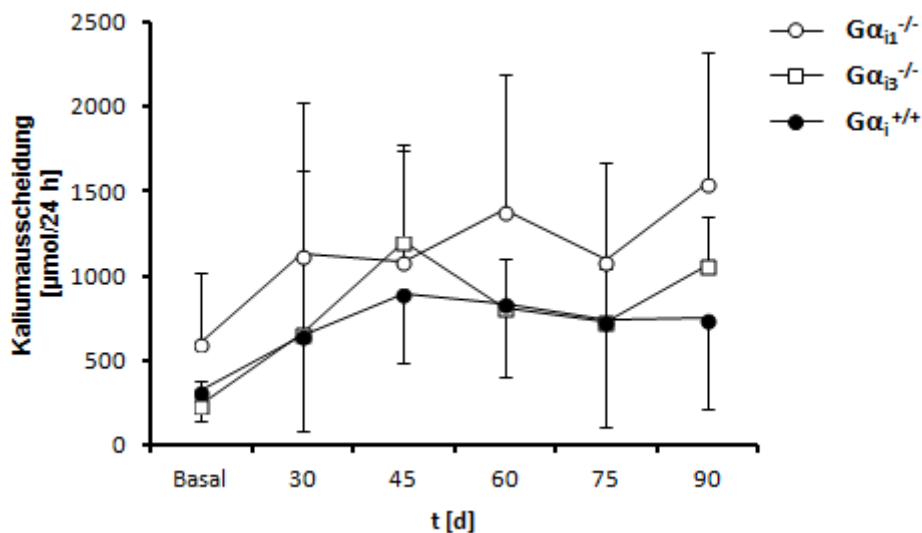


Abb. 16: Kaliumausscheidung bei STZ-induziertem Diabetes der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ (n = 6 - 8), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 6 - 7) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse (n = 8 - 9). Den Mäusen wurde am Folgetag der basalen Messung und nach weiteren fünf Tagen eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Die Kaliumausscheidung wurde basal, am Tag 30, 45, 60, 75 und 90 mittels Flammenphotometer (s. 2.14) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

Bekannt ist, dass eine Mikroalbuminurie ein erstes klinisches Zeichen der diabetischen Nephropathie sein kann und pathophysiologisch bedeutsam ist (Mogensen *et al.*, 1983; Mogensen, 1987; Lehmann und Schleicher, 2000). Bezüglich der Albuminausscheidung (Abb. 17) fiel auf, dass diese bei $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Tieren höher war. Aufgrund sehr großer Standardabweichungen in dieser Gruppe wurde jedoch keine statistische Signifikanz erreicht. Das gleiche traf auch auf die Proteinausscheidung zu (Abb. 18).

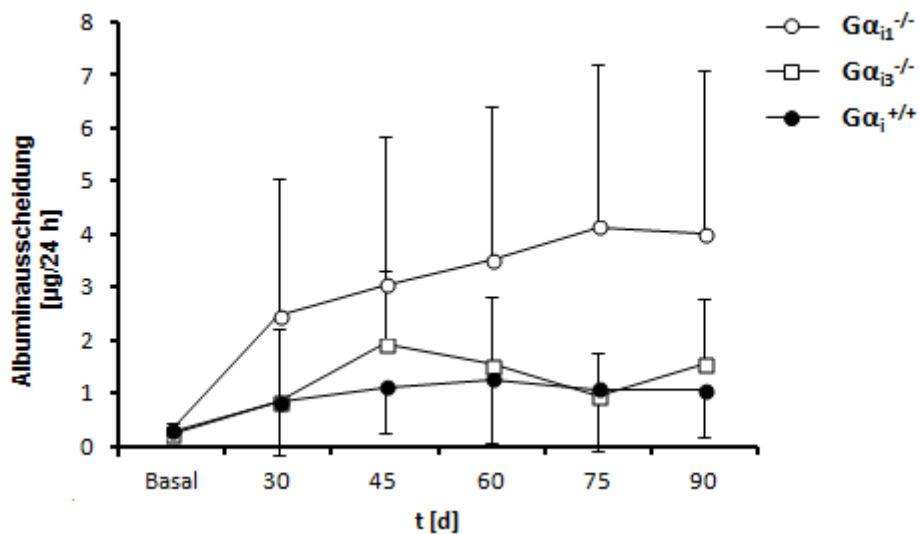


Abb. 17: Albuminausscheidung bei STZ-induziertem Diabetes der männlichen $G\alpha_{i}^{+/+}$ ($n = 6 - 8$), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ ($n = 6 - 7$) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse ($n = 8 - 9$). Den Mäusen wurde am Folgetag der basalen Messung und nach weiteren fünf Tagen eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Die Albuminausscheidung wurde basal, am Tag 30, 45, 60, 75 und 90 mittels ELISA (s. 2.13.3) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

Glukose besitzt beim Menschen eine Nierenschwelle von etwa 180 mg/dl (10 mmol/l). Wenn dieser Wert überschritten wird, ist Glukose im Urin nachweisbar. Im dargestellten Versuch wurde sie bei Mäusen aller Genotypen bereits initial geringfügig detektiert. Im gesamten Verlauf des Versuchs war die Glukosekonzentration im Urin aller drei Mausstämme vergleichbar (Abb. 19), die absolute Glukoseausscheidung pro 24 h (Abb. 20) war jedoch bei $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Tieren im Laufe der Erkrankung steigend mit ähnlichem Verlauf wie die Protein- und Albuminausscheidung.

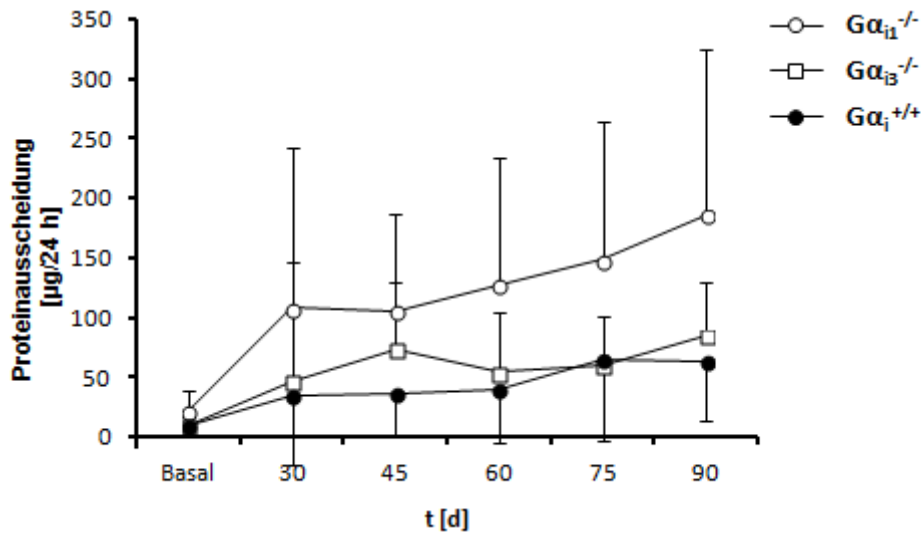


Abb. 18: Proteinausscheidung bei STZ-induziertem Diabetes der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ ($n = 6 - 8$), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ ($n = 6 - 7$) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse ($n = 8 - 9$). Den Mäusen wurde am Folgetag der basalen Messung und nach weiteren fünf Tagen eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Die Proteinausscheidung wurde basal, am Tag 30, 45, 60, 75 und 90 nach der BCA-Methode (s. 2.12.2.2) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

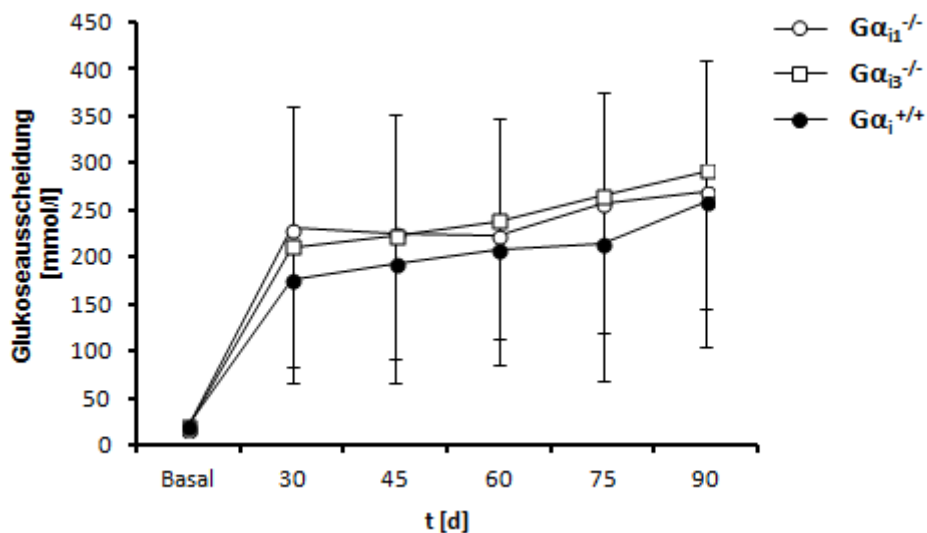


Abb. 19: Glukoseausscheidung bei STZ-induziertem Diabetes der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ ($n = 6 - 8$), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ ($n = 6 - 7$) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse ($n = 8 - 9$). Den Mäusen wurde am Folgetag der basalen Messung und nach weiteren fünf Tagen eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Die Glukoseausscheidung wurde basal, am Tag 30, 45, 60, 75 und 90 mittels UV-Photometrie (s. 2.15.1) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

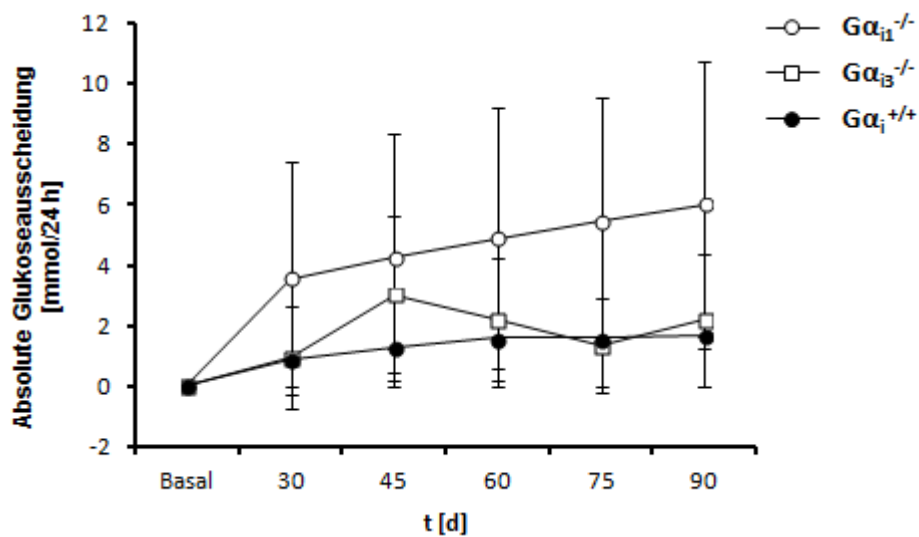


Abb. 20: Absolute Glukoseausscheidung bei STZ-induziertem Diabetes der männlichen $G\alpha_{1}^{+/+}$ (n = 6 - 8), $G\alpha_{11}^{-/-}$ (n = 6 - 7) und $G\alpha_{13}^{-/-}$ Mäuse (n = 8 - 9). Den Mäusen wurde am Folgetag der basalen Messung und nach weiteren fünf Tagen eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Die Glukoseausscheidung wurde basal, am Tag 30, 45, 60, 75 und 90 mittels UV-Photometrie (s. 2.15.1) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

Erste anatomisch-histopathologische Veränderungen an der Niere bei einem Diabetes mellitus zeigen sich durch eine Größenzunahme der Glomeruli sowie der Nieren insgesamt (Mogensen *et al.*, 1983; Mauer *et al.*, 1984). Parallel kommt es auch anfangs zu einer Zunahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Bei zunehmender Progredienz der diabetischen Nephropathie wird jedoch das Filtrationsvermögen immer geringer (O'Donnell *et al.*, 1988; Kiran *et al.*, 2012). Bei unseren Untersuchungen bestimmten wir als Funktionsparameter die Kreatinin-clearance. Sie blieb über einen Zeitraum von 75 Tagen bei allen drei Mausstämmen relativ konstant. Lediglich zum letzten erfassten Zeitpunkt (90 Tage nach der Diabetesinduktion) war die Kreatinin-clearance der $G\alpha_{11}^{-/-}$ und $G\alpha_{13}^{-/-}$ Tiere überraschenderweise signifikant erhöht (Abb. 21).

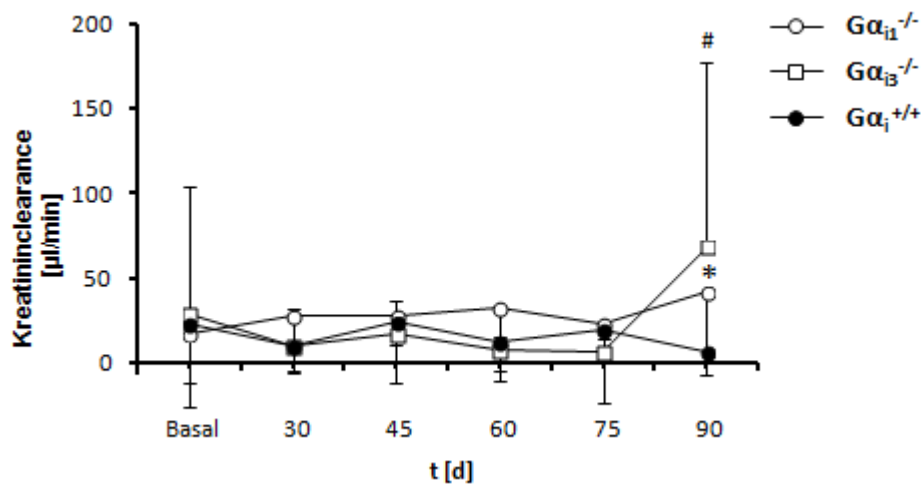


Abb. 21: Kreatininclearance bei STZ-induziertem Diabetes der männlichen $G\alpha_{i1}^{-/-}$ ($n = 6 - 8$), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ ($n = 6 - 7$) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse ($n = 8 - 9$). Den Mäusen wurde am Folgetag der basalen Messung und nach weiteren fünf Tagen eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Die Kreatininkonzentration im Urin sowie im Serum wurde basal, am Tag 30, 45, 60, 75 und 90 mittels Spektrophotometrie nach der Jaffé Methode (s. 2.15.4) bestimmt und die Kreatininclearance berechnet (s. 2.15.4). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; *: $p < 0,05$ $G\alpha_{i1}^{-/-}$ vs. $G\alpha_{i}^{+/+}$; #: $p < 0,05$ $G\alpha_{i3}^{-/-}$ vs. $G\alpha_{i}^{+/+}$.

3.3 Bestimmung der renovaskulären Parameter nach STZ-Behandlung

Die Ergebnisse der im vorherigen Kapitel dargestellten Studie (s. 3.2) veranlassten uns weitere renovaskuläre Parameter zu untersuchen. Die nach 90 Tagen beobachtete erhöhte Kreatininclearance von $G\alpha_{i1}^{-/-}$ und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäusen (Abb. 21) könnte auf eine beginnende vermehrte Nierenfiltration hindeuten. Zusätzlich zeigten die $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Tiere eine anhaltende Albuminurie (Abb. 17) mit Proteinurie (Abb. 18), was ein erstes laborchemisches Merkmal der Nierenschädigung sein könnte (Wolf und Ziyadeh, 2007).

Deshalb untersuchten wir unsere Tiere 100 - 115 Tage nach den STZ-Injektionen. Es wurden sechs $G\alpha_{i}^{+/+}$ Mäuse im Alter von 216 ± 15 Tagen, fünf $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Tiere im Alter von 200 ± 13 Tagen ($G\alpha_{i1}^{-/-}$ vs. $G\alpha_{i}^{+/+}$, $p = 0,76$) und vier $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse im Alter von 202 ± 4 Tagen ($G\alpha_{i3}^{-/-}$ vs. $G\alpha_{i}^{+/+}$, $p = 0,06$), alle männlichen Geschlechts, verwendet. Der wichtigste Parameter der Nierenfiltration ist die GFR. Zusätzlich wurden auch Elektrolytkonzentrationen bestimmt. Zu diesem Zweck erfolgte eine mikrochirurgische Präparation unter

Pentobarbitalnarkose (s. 2.9). Die Tab. 1 stellt die kardiovaskulären Parameter dar, die während des Eingriffs gemessen wurden. Der Vergleich der Kreislaufverhältnisse, des Körpergewichts und des Hämatokrits ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen.

Parameter	Genotyp		
	$G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 5)	$G\alpha_i^{+/+}$ (n = 6)	$G\alpha_{i3}^{-/-}$ (n = 4)
Körpergewicht [g]	30,3 ± 4,6	26,7 ± 1,4	26 ± 4,7
Initialer mittlerer arterieller Blutdruck in linker A. femoralis unter Pentobarbitalnarkose [mm Hg]	96 ± 20,7	90,3 ± 20,1	70,5 ± 7,5
Stetiger mittlerer arterieller Blutdruck in linker A. femoralis unter Pentobarbitalnarkose [mm Hg]	82,4 ± 18,5	91,3 ± 36,8	80,5 ± 28,4
Initiale Herzfrequenz unter Pentobarbitalnarkose [Schläge/min]	444 ± 80,5	500 ± 26	450 ± 77,5
Stetige Herzfrequenz unter Pentobarbitalnarkose [Schläge/min]	540 ± 42,4	590 ± 45	555 ± 113
Hämatokrit [%]	41,2 ± 5,3	39 ± 3,8	41,6 ± 2,3

Tab. 1: Parameter, die während der mikrochirurgischen Präparation nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ (n = 6), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 5) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse (n = 4) bestimmt wurden. Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Der Eingriff (s. 2.9) wurde nach 100 - 115 Tagen durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD.

Interessanterweise zeigte sich bei den $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Mäusen eine tendenziell niedrigere GFR (Abb. 22).

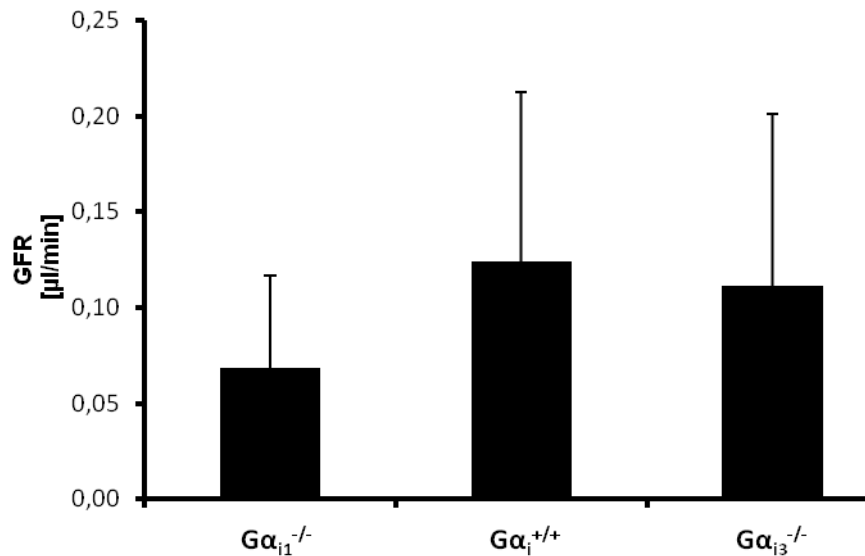


Abb. 22: GFR nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_{i}^{+/+}$ (n = 6), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 5) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ (n = 4) Mäuse. Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9). Die GFR wurde entsprechend berechnet (s. 2.11). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

Am Ende der oben erwähnten Mikrochirurgie wurden die Nieren entfernt und gewogen. Die Nieren der $G\alpha_{i1}^{-/-}$ und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Tiere waren leicht schwerer im Vergleich zu den $G\alpha_{i}^{+/+}$ Mäusen (Abb. 23 - 25). Es war jedoch kein messbarer Unterschied im Gewicht zwischen den $G\alpha_{i}$ -defizienten Tieren und den Kontroll-Tieren zu dokumentieren. Die Auswertung der spezifischen Nierengewichte erbrachte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Abb. 26 - 28).

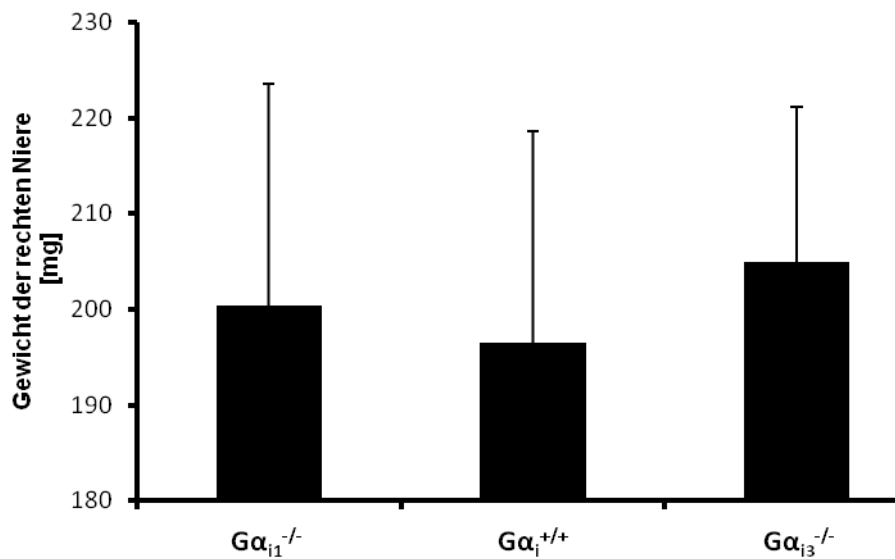


Abb. 23: Gewicht der rechten Niere nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ (n = 6), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 5) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ (n = 4) Mäuse. Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9) und die Entnahme der Nieren, um das Gewicht zu bestimmen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

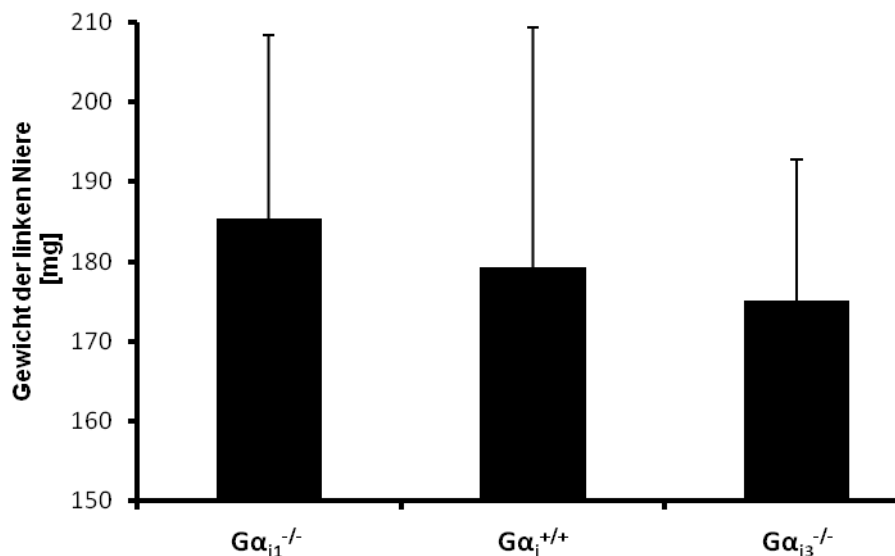


Abb. 24: Gewicht der linken Niere nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ (n = 6), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 5) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ (n = 4) Mäuse. Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9) und die Entnahme der Nieren, um das Gewicht zu bestimmen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

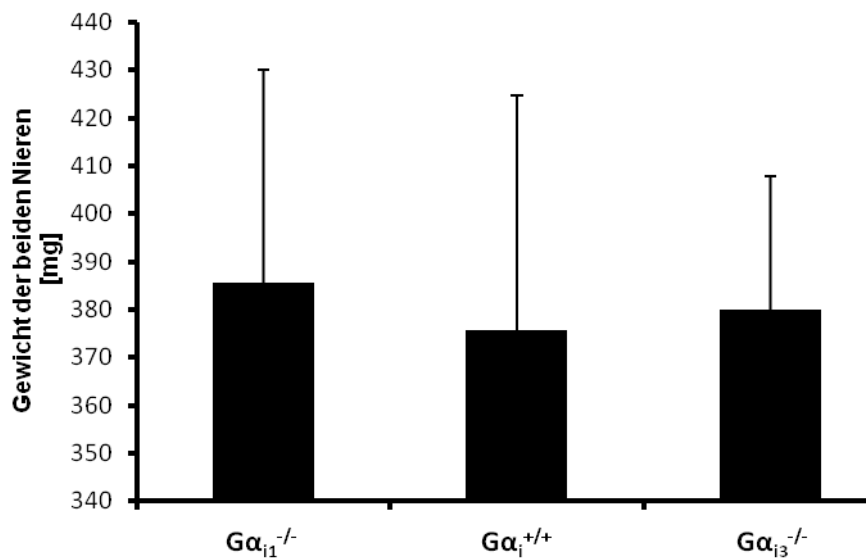


Abb. 25: Gewicht der beiden Nieren nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ ($n = 6$), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ ($n = 5$) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ ($n = 4$) Mäuse. Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9) und die Entnahme der Nieren, um das Gewicht zu bestimmen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

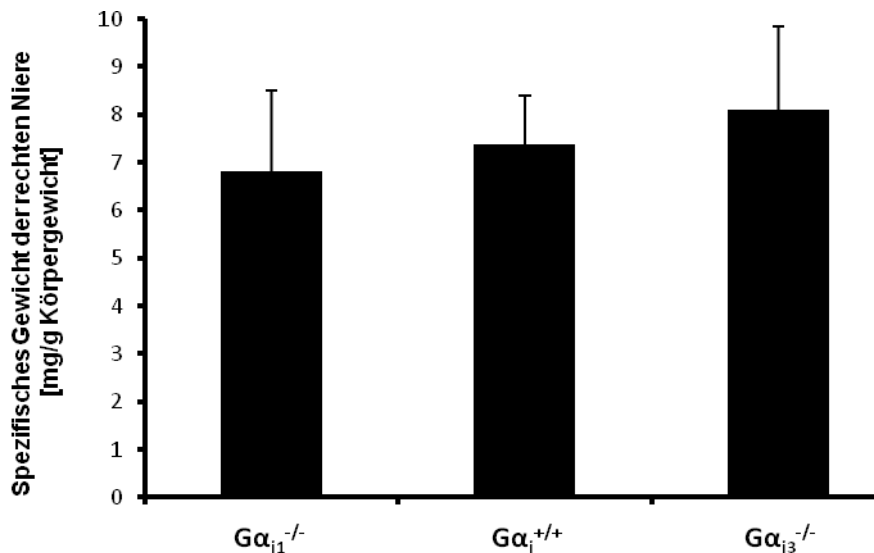


Abb. 26: Spezifisches Gewicht der rechten Niere nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ ($n = 6$), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ ($n = 5$) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ ($n = 4$) Mäuse. Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9) und die Entnahme der Nieren, um das Gewicht zu bestimmen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

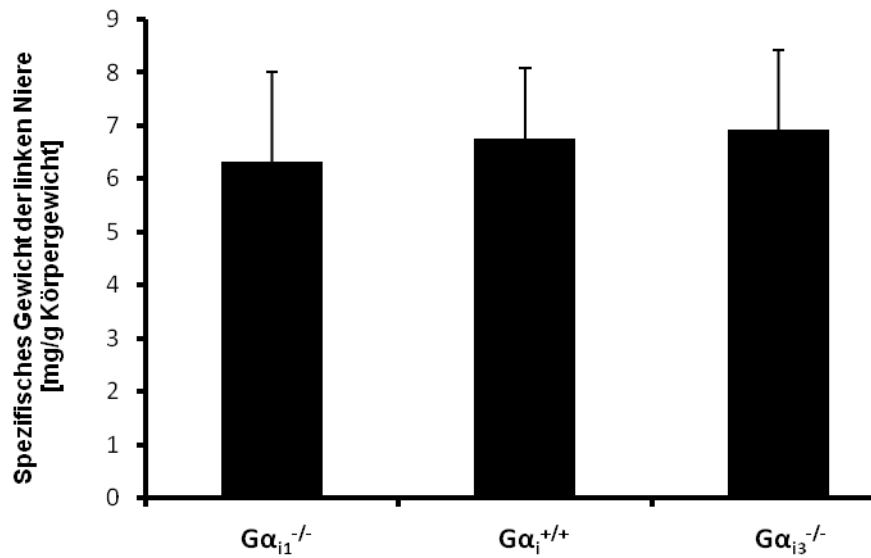


Abb. 27: Spezifisches Gewicht der linken Niere nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_{11}^{+/+}$ (n = 6), $G\alpha_{11}^{-/-}$ (n = 5) und $G\alpha_{13}^{-/-}$ (n = 4) Mäuse. Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9) und die Entnahme der Nieren, um das Gewicht zu bestimmen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

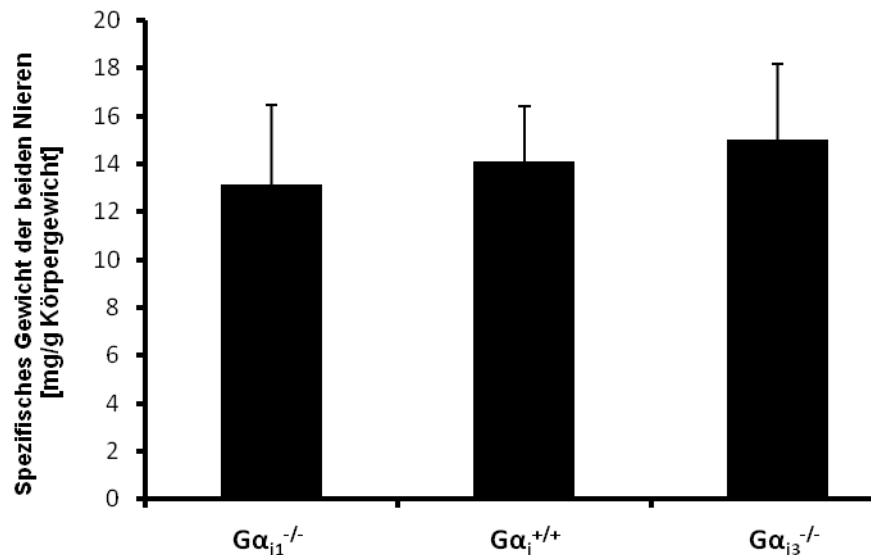


Abb. 28: Spezifisches Gewicht der beiden Nieren nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_{11}^{+/+}$ (n = 6), $G\alpha_{11}^{-/-}$ (n = 5) und $G\alpha_{13}^{-/-}$ (n = 4) Mäuse. Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9) und die Entnahme der Nieren, um das Gewicht zu bestimmen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

Aus der Literatur ist bekannt, dass der *Tumor growth factor beta* (TGF- β) bei der Entstehung der diabetischen Nephropathie beteiligt ist, der genaue Pathomechanismus ist jedoch nicht genügend geklärt (Nakamura *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1993; Lehmann und Schleicher, 2000; Vallon, 2011). Deshalb wurde auch eine Bestimmung der TGF- β -Expression durchgeführt. Dies erfolgte mittels der Immunoblot-Analyse in den Homogenaten, die aus den linken Nieren der Mäuse gewonnen wurden. Es wurde kein Unterschied zwischen den Genotypen gefunden (Abb. 29).

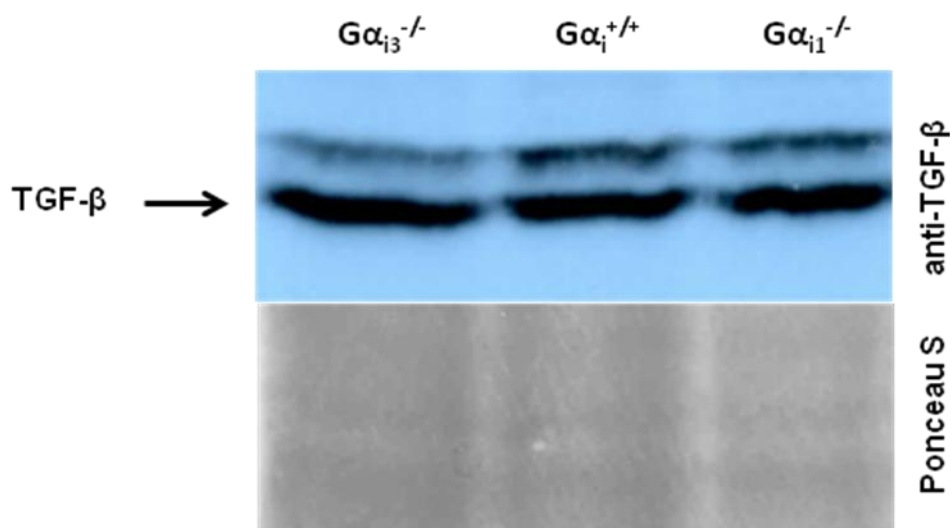


Abb. 29: TGF- β -Expression in der linken Niere nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_1^{+/+}$ ($n = 6$), $G\alpha_{11}^{-/-}$ ($n = 5$) und $G\alpha_{13}^{-/-}$ ($n = 4$) Mäuse. Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation mit der anschließenden Entnahme der Nieren (s. 2.9). Aus dem Nierengewebe wurden Homogenate hergestellt und mittels der Western Blot-Analyse (s. 2.12.4) TGF- β nachgewiesen. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus vier Experimenten. Ponceau S dient als Ladekontrolle.

Zur genaueren Nierenfunktionsbeurteilung wurden außerdem Elektrolytkonzentrationen im Serum und Urin untersucht. In Tab. 2 sind die gemessenen Werte dargestellt. Die Kalziumkonzentrationen im Urin bei den $G\alpha_{11}^{-/-}$ Tieren waren signifikant höher im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen.

Die gesammelte Urinmenge eines der $G\alpha_{11}^{-/-}$ Tiere und die Blutmenge eines der Wildtyp-Tiere war zu gering, um alle Parameter zu bestimmen. Daher fehlen bei diesen zwei Tieren die Phosphatbestimmungen.

Parameter	Genotyp		
	$G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 4 - 5)	$G\alpha_i^{+/+}$ (n = 5 - 6)	$G\alpha_{i3}^{-/-}$ (n = 4)
Serum-Natrium [mM]	113,5 ± 19,6	114 ± 18,5	104 ± 15,7
Urin-Natrium [mM]	48,6 ± 47,3	38,8 ± 15,3	34,7 ± 12,4
Serum-Kalium [mM]	150,6 ± 28,2	159,6 ± 30,0	133,3 ± 19,1
Urin-Kalium [mM]	259 ± 153,9	187,2 ± 109,9	181,8 ± 76,8
Serum-Kalzium [mM]	0,6 ± 0,3	0,9 ± 0,9	0,4 ± 0,2
Urin-Kalzium [mM]	2,6 ± 1,3*	0,7 ± 0,9	4,8 ± 6,3
Serum-Phosphat [mM]	1,4 ± 0,5	2,0 ± 0,7	1,2 ± 0,4
Urin-Phosphat [mM]	32 ± 36,1	42,1 ± 19,6	28,2 ± 27,6

Tab. 2: Elektrolytkonzentrationen nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ (n = 5 - 6), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 4 - 5) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ (n = 4) Mäuse. Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9), während gleichzeitig Blut- und Urinproben gesammelt wurden. In diesen Proben wurde die Konzentration von Natrium (s. 2.14), Kalium (s. 2.14), Kalzium (s. 2.15.2) und Phosphat (s. 2.15.3) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD; *: $p < 0,05$ $G\alpha_{i1}^{-/-}$ vs. $G\alpha_i^{+/+}$.

Als sekundäre Daten wurde Folgendes berechnet:

- (1) Filtration eines Elektrolytes = GFR x Serum-Elektrolyt
- (2) Renale Ausscheidung eines Elektrolytes = Urinfluss x Urin-Elektrolyt
- (3) Renale Reabsorption eines Elektrolytes = (1) - (2)
- (4) Fraktionelle Reabsorption eines Elektrolytes = (3) / (1)

Nachfolgend werden nur die sekundär abgeleiteten Daten dargestellt, die einen statistisch signifikanten Unterschied zeigten. Dazu gehörten Kalzium- und Phosphatwerte (Abb. 30 - 32), während die Natrium- und Kaliumwerte ohne Auffälligkeiten waren. Die Abbildungen zu statistisch insignifikanten Werten befinden sich im Anhang.

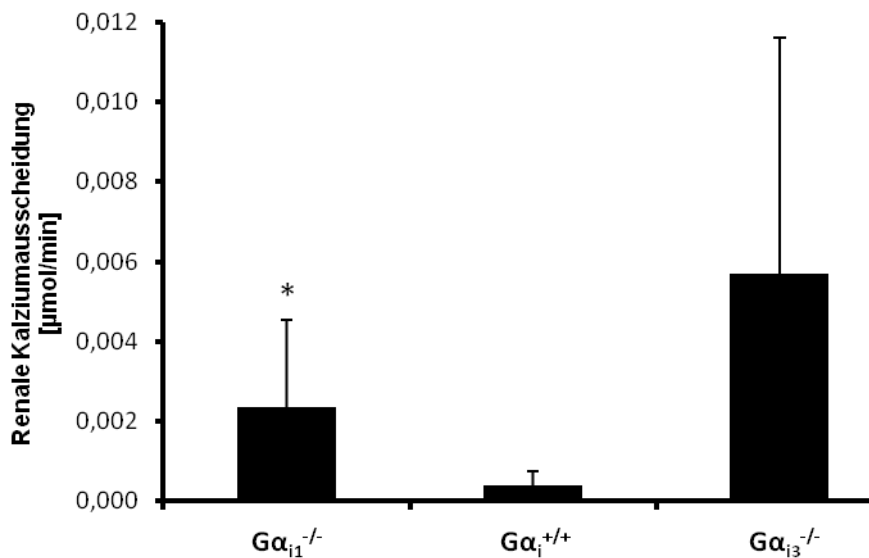


Abb. 30: Renale Kalziumausscheidung nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ (n = 6), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 5) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse (n = 4). Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9), während gleichzeitig Urinproben gesammelt wurden. In diesen Proben wurde die Kalziumkonzentration (s. 2.15.2) bestimmt und der o.g. Parameter berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; *: $p < 0,05$ $G\alpha_{i1}^{-/-}$ vs. $G\alpha_i^{+/+}$.

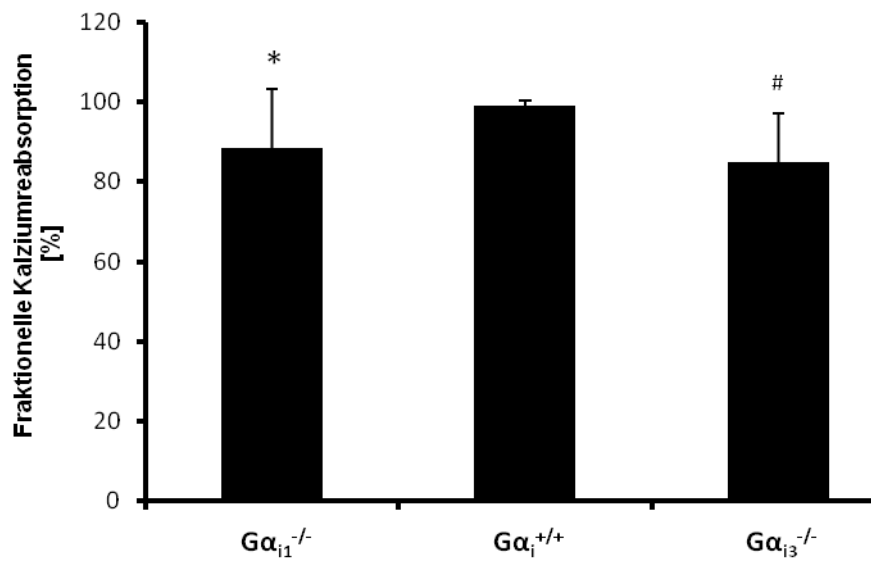


Abb. 31: Fraktionelle Kalziumreabsorption nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ (n = 6), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 5) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse (n = 4). Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9), während gleichzeitig Blut- und Urinproben gesammelt wurden. In diesen Proben wurde die Kalziumkonzentration (s. 2.15.2) bestimmt und der o.g. Parameter berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; *: p < 0,05 $G\alpha_{i1}^{-/-}$ vs. $G\alpha_i^{+/+}$; #: p < 0,05 $G\alpha_{i3}^{-/-}$ vs. $G\alpha_i^{+/+}$.

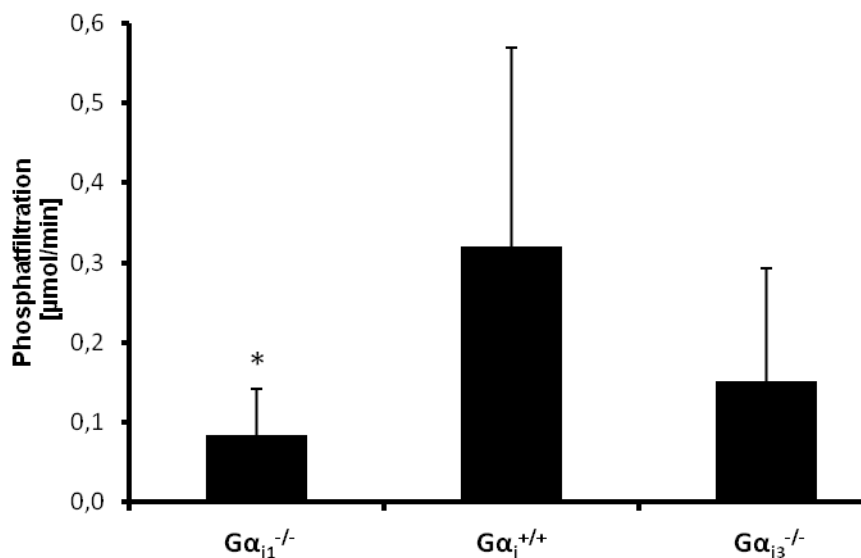


Abb. 32: Phosphatfiltration nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ (n = 5), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 5) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse (n = 4). Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9), während gleichzeitig Blut- und Urinproben gesammelt wurden. In diesen Proben wurde die Phosphatkonzentration (s. 2.15.3) bestimmt und der o.g. Parameter berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; *: p < 0,05 $G\alpha_{i1}^{-/-}$ vs. $G\alpha_i^{+/+}$.

4 Diskussion

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen die allergrößte Rezeptorfamilie im humanen Genom dar. Gegenwertig repräsentieren sie die Zielstrukturen für etwa 25 % der therapeutisch verwendbaren Wirkstoffe (Overington *et al.*, 2006). Dank ihrer transmembranären Struktur können die GPCRs ein extrazelluläres Signal ins Zellinnere übermitteln. Die Signalweiterleitung erfolgt über heterotrimere G-Proteine, die im menschlichen Organismus ubiquitär exprimiert sind (Nürnberg *et al.*, 1995; Bourne, 1997). Ein GPCR kann eine oder mehrere G-Protein-Isoformen aktivieren (Bourne, 1997). Das detaillierte Verständnis der Signalwege ist unabdingbar für die Identifizierung der Krankheitsursachen und des therapeutischen Nutzens. Verschiedene Mutationen bei GPCRs sowie bei α -Untereinheiten der G-Proteine konnten in den letzten Jahren als genetische Ursachen für zahlreiche Erkrankungen nachgewiesen werden (Lyons *et al.*, 1990; Weinstein *et al.*, 1991; Parma *et al.*, 1993; Fujiwara *et al.*, 1995; Spiegel, 1997).

4.1 Bedeutung des $G\alpha_{i2}$ -Proteins für die Glukosehomöostase

Eine Mitbeteiligung des $G\alpha_{i2}$ -Proteins an der Glukosehomöostase wurde bereits vor Jahren postuliert. So konnte gezeigt werden, dass infolge einer partiellen postnatalen Ablation des $G\alpha_{i2}$ -Proteins eine Insulinresistenz entsteht (Moxham und Malbon, 1996). Komplementär erhobene Befunde deuteten daraufhin, dass eine Überexpression des $G\alpha_{i2}$ -Proteins in peripheren Geweben einen experimentell-induzierten Diabetes verbessert (Zheng *et al.*, 1998). Dies veranlasste uns, die Bedeutung des $G\alpha_{i2}$ -Proteins für die Glukosehomöostase in globalen *knock out* Mäusen zu untersuchen. Unsere ersten Versuche mit $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen zeigten interessanterweise, dass sowohl die Blutglukosewerte als auch der Insulinspiegel im Serum in diesen Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen niedriger waren (Prof. Dr. Nürnberg, persönliche Mitteilung). Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die Glukosehomöostase durch das $G\alpha_{i2}$ -Protein moduliert werden kann, z.B. durch Produktion und/oder Freisetzung und/oder intrazelluläre Insulinwirkung.

Ein wichtiger Nachweis eines gestörten Glukosestoffwechsels ist der Glukosetoleranztest. In der klinischen Praxis ist er bei Verdacht auf Diabetes Typ II, z.B. bei abnormer Nüchternglukose, von Bedeutung. Dazu müssen Patienten 10 h nüchtern bleiben und dann eine Lösung mit 75 g Glukose trinken. Nach 120 min wird die Blut-Glukose gemessen. Nach Vorgaben der WHO wird bei Werten ≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l) die Diagnose Diabetes mellitus gestellt (http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241594934_eng.pdf?ua=1).

Für entsprechende Untersuchungen an Mäusen sind verschiedene Protokolle publiziert. Bei C57BL/6 Mäusen wird nach einer 16 h-Nüchtern-Periode eine Dosis von 2 g Glukose pro kg Körpergewicht empfohlen (Andrikopoulos *et al.*, 2008). Routinemäßig lässt man die Tiere über Nacht nüchtern, wobei zu berücksichtigen ist, dass die Mäuse mit einer 70 %igen Nahrungsaufnahme in der Nacht einen umgekehrten Aktivitätsrhythmus im Vergleich zum Menschen haben (Ayala *et al.*, 2008). Die mit Mäusen erhaltenen Ergebnisse sollen daher noch genauer betrachtet werden, weil die Sensitivität des Insulins erhöht ist. Der Glukosebolus wurde in der vorliegenden Arbeit den untersuchten Mäusen sowohl intraperitoneal als auch peroral verabreicht. Mit dem ersten Verfahren werden die hormonellen Beiträge des Magen-Darm-Traktes zur Glukoseaufnahme umgangen.

In dem intraperitonealen Glukosetoleranztest wiesen sowohl $G\alpha_{i2}$ -defiziente als auch Wildtyp-Mäuse im gesamten Verlauf vergleichbare Blut-Glukosewerte auf (Abb. 1), obwohl der Insulinspiegel sowohl basal als auch zu jedem Zeitpunkt nach der Glukosebolusverabreichung in den $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen niedriger war (Abb. 2). Obwohl die Differenzen nicht signifikant waren, lassen die vorliegenden initialen Daten eine bessere Insulinsensitivität bei den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ Mäusen erwarten.

Der orale Glukosetoleranztest deutete tendenziell niedrigere Blut-Glukosewerte in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ Tieren im Vergleich zu ihren Kontroll-Tieren an (Abb. 3). Der Unterschied war nach 2 h statistisch signifikant. Parallel zeigte sich auch der Insulinspiegel in diesem Stamm auf einem niedrigeren Niveau mit statistischer Signifikanz nach 30 und 60 min (Abb. 4). Daher ziehen wir den Schluss, dass

das $G\alpha_{i2}$ -Protein auch zu den intestinalen Mechanismen der Glukosehomöostase beiträgt.

Interessant war auch der Vergleich der Applikationsart des Glukosebolus für die Genotypen. Die Kontroll-Tiere reagierten mit einer tendenziell stärkeren Insulinausschüttung 15 und 30 min nach der Glukosegabe, wenn die Glukose peroral gegeben wurde (Abb. 7). Dafür fiel bei den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ Tieren auf, dass der Insulinspiegel im Laufe des intraperitonealen Glukosetoleranztests kontinuierlich auf einem höheren Niveau als nach der peroralen Glukosegabe gehalten wurde (Abb. 8). Offensichtlich ist der Stimulus einer peroralen Glukosegabe auf die Insulinsekretion wesentlich schwächer als bei Wildtyp-Tieren.

Eine ähnliche Beobachtung, wie hier bei den Wildtyp-Tieren, dass nämlich eine perorale Glukosegabe zu einer stärkeren Insulinfreisetzung als die intravenöse Gabe führt, war die Grundlage der Inkretinentdeckung (Elrick *et al.*, 1964; McIntyre *et al.*, 1964). Inkretine sind vom Darm mahlzeitabhängig freigesetzte hormonale Stimulationsfaktoren der Insulinsekretion in β -Zellen. Zu dieser Gruppe gehören das *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide* (GIP), das vor allem in K-Zellen im Dünndarm produziert wird und das *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1), das überwiegend von L-Zellen im Ileum freigesetzt wird (Mortensen *et al.*, 2003; Nauck, 2011). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurden in menschlichem Duodenum in der Umgebung von GLP-1 identifiziert (Rozenfurt *et al.*, 2006; Jang *et al.*, 2007). GLP-1 und GIP binden an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren GLP-1R und GIPR, was zu einer cAMP-Erhöhung führt (Usdin *et al.*, 1993; Fehmman *et al.*, 1996; Mayo *et al.*, 2003). Im Zentrum des Interesses steht auch GPR119, ursprünglich als ein β -Zell-Rezeptor identifiziert (Fredriksson *et al.*, 2003). Sein endogener Agonist Oleoylethanolamid (OEA) löst eine Insulin- und Inkretinfreisetzung aus, die Signalvermittlung erfolgt *via* $G\alpha_s$ mit einem darauffolgenden cAMP-Anstieg (Overton *et al.*, 2008; Flock *et al.*, 2011). Ein Beitrag von $G\alpha_i$ -Proteinen ist bislang nicht bekannt. Wir halten es deshalb für wichtig, zukünftig Inkretinmessungen bei den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ Tieren und den Kontroll-Mäusen durchzuführen.

Unsere Experimente ergaben Hinweise auf eine Beteiligung von $G\alpha_i$ -Proteinen an der Glukoseregulation auf verschiedenen Stufen bzw. in verschiedenen Organen/Geweben. In Betracht kommen z.B. die Insulin-sensitiven Glukosetransporter, insbesondere GLUT 2, dessen Präsenz u.a. im Pankreas, Darm und in der Leber beschrieben wurde (Bell *et al.*, 1990; Thorens *et al.*, 1990). Im Pankreas der Mäuse mit STZ-induziertem Diabetes wurde die Expression von GLUT 2 in einem geringeren Ausmaß detektiert (Thorens *et al.*, 1992). Im Darm von Ratten, bei denen Diabetes auch mit Hilfe von STZ induziert wurde, konnte eine vermehrte Expression sowohl von GLUT 2 (bereits nach fünf Tagen nach der STZ-Injektion) als auch von SGLT-1 (zwischen 30 und 60 Tagen nach der Diabetesinduktion) festgestellt werden (Miyamoto *et al.*, 1991). Insgesamt ist es vorstellbar, dass die Expression von GLUTs nicht nur mittels Glukosekonzentration und Insulinspiegel gesteuert wird, sondern auch durch regulatorische G-Proteine in ihrer Funktion beeinflusst wird. Dies sollte in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden.

Die Angaben aus der Literatur sowie die hier erhobenen Befunde führten dazu, dass in ersten orientierenden Studien zur Funktion von $G\alpha_i$ -Proteinen unsere Arbeitsgruppe in Kooperation mit dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen Versuche zur Beurteilung der elektrogenen intestinalen Glukoseabsorption durchführte. Der Natrium/Glukose-Ko-Transporter SGLT-1 wurde in der apikalen Zellmembran im Jejunum in den $G\alpha_{i2}^{-/-}$ Mäusen und ihren Kontroll-Tieren identifiziert. Die Expression in den defizienten Tieren war jedoch signifikant niedriger (Dr. Huang, persönliche Mitteilung). In derselben Studie konnte unsere Arbeitsgruppe die Ergebnisse der oralen und intraperitonealen Glukosetoleranztests reproduzieren und mit entsprechend hohen Tierzahlen statistisch signifikant absichern. Hierzu wurden Wildtyp-Geschwister als Kontrollen verwendet.

Es ist bekannt, dass ein mangelndes Ansprechen auf Insulin durch eine reduzierte Expression des Transkriptionsfaktors *Forkhead box O* (FOXO) entsteht, letzteres fördert den Glukosemetabolismus *via* Glukose-6-Phosphatase (Nakae *et al.*, 2001; Carter und Brunet, 2007). Angesichts der vergleichbaren Glukosewerte beider Genotypen trotz niedrigerer Insulinwerte

könnte man vermuten, dass die *knock out* Tiere eine höhere FOXO-Expression haben könnten. Die Klärung dieser Frage bleibt weitergehenden Untersuchungen vorbehalten.

Insgesamt scheint das $G\alpha_{i2}$ -Protein pleiotrop an der Glukosehomöostase beteiligt zu sein. Bei Abwesenheit des $G\alpha_{i2}$ -Proteins scheint sowohl der Glukosemetabolismus in den peripheren Zielgeweben als auch die Mitwirkung der darmabhängigen Effekte gesteigert zu sein, was auf eine antidiabetische Wirkung hindeuten könnte. Nachfolgende Arbeiten sollten sich auf die Überprüfung dieser Hypothesen konzentrieren.

4.2 Diabetesinduktion mittels Streptozotozin

Hyperglykämie soll einerseits die Expression von $G\alpha_i$ -Proteinen vermindern und andererseits die Aktivität der Adenylzyklasen erhöhen (Li *et al.*, 2008). Unsere Ergebnisse bezüglich der G_{i2} -Isoform veranlassten uns, weitere $G\alpha_i$ -Isoformen in die Untersuchungen mit einzubeziehen. Initiale Befunde aus der Literatur (Wang *et al.*, 2011) sowie eigene präliminäre Untersuchungen (Prof. Dr. Dr. Nürnberg, persönliche Mitteilung) zeigten keinen signifikanten Effekt einer $G\alpha_{i1}$ - oder $G\alpha_{i3}$ -Defizienz auf Glukose- und Insulinspiegel nach Glukosetoleranztest. Um jedoch die Bedeutung dieser $G\alpha_i$ -Isoformen auf die Glukose- und Insulinhomöostase weitergehend zu untersuchen, wurde das STZ-Modell des experimentell-induzierten Diabetes verwendet. Zur Diabetesinduktion wurde eine STZ-Lösung verabreicht, die einen β -Zelluntergang verursacht (Yamamoto *et al.*, 1981; Szkudelski, 2001). Im Anschluss wurden mehrere Parameter in 15-tägigen Abständen gemessen. Als Kontrolle des erfolgreich ausgelösten Diabetes diente die Bestimmung der Serum-Insulinwerte und der Serum-Glukosewerte. Die Tiere aller drei Stämme entwickelten einen vergleichbaren Insulinabfall mit Erreichen der tiefsten Werte am Tag 60 nach den Injektionen (Abb. 9). Danach stiegen die Werte wieder an, hindeutend auf eine spontane Erholung der β -Zellen.

Eine zugrundeliegende Regenerationsfähigkeit der β -Zellen wurde auch in der Literatur beschrieben. In den Mäusen, denen STZ im Alter von sieben Tagen verabreicht wurde, konnte eine Erholung der β -Zellen nach 50 Tagen

beobachtet werden. Eine signifikante Zunahme der β -Zellmasse konnte 100 - 150 Tage nach der Diabetesinduktion nachgewiesen werden (Kataoka *et al.*, 2013).

In einer langfristigen Studie (bis 90 Tage nach der STZ-Applikation) konnten wir die Wirkung von Streptozotocin zur chemischen Diabetesinduktion mit Hilfe regelmäßiger Insulinspiegelbestimmungen überprüfen. Die Abstände zwischen der Diabetesinduktion und dem Beginn der Versuche unter Diabetesbedingungen sind in der Literatur sehr diskrepanz und werden normalerweise zwischen einem Tag und 22 Wochen beschrieben. Zielparameter sind immer die entgleisten Blut-Glukosewerte, jedoch werden Insulinkonzentrationen nicht angegeben (Rossini *et al.*, 1977; Howarth *et al.*, 2005; Jensen *et al.*; 2006; Tian *et al.*, 2010; Alimohammadi *et al.*, 2013). Aufgrund unserer Ergebnisse ist zu empfehlen, die Messungen bei den Mäusen unter STZ-Behandlung optimal ca. 60 Tage nach der Diabetesinduktion durchzuführen (Hyperglykämie unter niedrigstem Insulinspiegel im Serum).

Am Tag 75 war der Unterschied zwischen $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Mäusen und den Kontroll-Tieren statistisch signifikant, jedoch bei der nächsten Messung 15 Tage später nicht mehr nachweisbar, weshalb die Relevanz dieser einmalig berechneten Signifikanz begrenzt erscheint.

4.3 Bedeutung von $G\alpha_{i1}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Proteinen für die Glukosehomöostase in einem experimentellen Diabetesmodell der Maus

Mittels STZ wurde bei Mäusen erfolgreich Diabetes mellitus induziert. Nachfolgend wurden weitere Messungen zur Beurteilung der typischen Diabeteszeichen durchgeführt.

Entsprechend den Insulinwerten verliefen die Kurven der Serum-Glukose (Abb. 10), es imponierten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Mausstämmen.

Typisch für den Diabetes Typ I ist eine Gewichtsabnahme, die auch in dem STZ-Modell sowohl bei den Wildtyp-Tieren als auch bei den $G\alpha_i$ -defizienten Stämmen beobachtet wurde (Abb. 11). Die Literatur erklärt dieses Phänomen

durch die Dehydratation und einen katabolen Stoffwechselzustand, der mit einer Reduktion des Lipid- und Proteingehaltes einhergeht (Hakim *et al.*, 1997). Das zu Beginn unserer Studie höhere Körpergewicht der $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Tiere scheint typisch für diese Tiere zu sein (Prof. Dr. Dr. Nürnberg, persönliche Mitteilung und eigene Beobachtung). Das relativ niedrigere Ausgangsgewicht der $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Tiere hatte jedoch keinen Einfluss auf den weiteren Versuchsverlauf der Mäuse. Bis zum Tag 30 nahmen alle drei Stämme prozentual vergleichbar ab, um dann das Gewicht konstant zu halten.

Zu den klinischen Merkmalen des experimentell-induzierten Diabetes gehören Polyphagie, Polydipsie und Polyurie (Wald und Popovtzer, 1984; Hakim *et al.*, 1997; Chatzigeorgiou *et al.*, 2009). 30 Tage nach dem Versuchsbeginn zeigten alle Genotypen die höchste Nahrungsaufnahme, danach nahm der Verbrauch an Nahrung langsam wieder ab (Abb. 12). Allerdings zeigten die $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Tiere auch weiterhin die höchsten Werte. Analoges traf auf die Flüssigkeitsaufnahme (Abb. 13) und die Urinausscheidung (Abb. 14) zu. Bis zum Tag 45 stiegen beide Parameter bei allen Genotypen an, danach selektiv bei den $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Tieren. Obwohl sich zu jenem Zeitpunkt des Versuchs aufgrund der starken Standardabweichungen keine Signifikanzen ergaben, sind die Auffälligkeiten bei den $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Mäusen nicht zu ignorieren.

In diesem Zusammenhang sind zwei Eigenschaften des $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Modells zu berücksichtigen. Erstens wird $G\alpha_{i1}$ prädominant im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert (Nürnberg *et al.*, 1995) und zweitens handelt es sich um ein global $G\alpha_{i1}$ -defizientes Mausmodell. Deshalb ist eine Beteiligung des ZNS an der Ausbildung des Phänotyps zu vermuten. So könnte das generell höhere Körpergewicht der $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Mäuse Folge einer Dysregulation im Ess- und Trinkzentrum mit darauffolgender Polyurie sein, aber auch ein reines metabolisches Defizit, das sich in dieser Studie mit Hilfe von STZ herausstellen ließ, bzw. durch Kombination der beiden Ansätze. Die Nahrungsaufnahme war ursprünglich (ohne STZ-Einfluss) fast identisch, daher scheint der Metabolismus tatsächlich beeinträchtigt zu sein im Sinne einer Neigung zum Diabetes Typ II bzw. zum metabolischen Syndrom bei Abwesenheit des $G\alpha_{i1}$ -Proteins. Mit der STZ-Behandlung wird aber der Diabetes Typ I ausgelöst,

sodass die Gewichtsabnahme, die unsere Tiere unter STZ-Behandlung entwickelten, nicht verwundert. Die gemessenen Werte der Flüssigkeits- und der Nahrungsaufnahme sowie der Urinausscheidung unter STZ-Behandlung legen nahe, dass die $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Mäuse leichter an Diabetes erkranken könnten. Um endgültig die Ursachen der beschriebenen Phänomene differenzieren zu können, schlagen wir vor, weitere Versuche in konditionellen *knock out* Tieren durchzuführen, in denen das $G\alpha_{i1}$ -Protein im Gehirn weiterhin exprimiert wird.

4.4 Rolle der $G\alpha_{i1}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Proteine bei diabetischer Nephropathie

Der molekulare Mechanismus der diabetischen Nephropathie ist nicht ausreichend geklärt. Wissend, dass die G-Proteine in den Nieren exprimiert sind (Stow *et al.*, 1991) und, dass bereits Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen $G\alpha_i$ -Proteinen und diabetischer Nephropathie vorliegen (Pietruck *et al.*, 1998) haben wir uns dazu entschlossen, weitere Messungen vorzunehmen. In den gesammelten Urinproben haben wir Natrium, Kalium, Protein, Albumin und Glukose gemessen. Unter STZ-Behandlung entwickeln die Mäuse in der Regel eine erhöhte Ausscheidung von Natrium und Kalium, was u.a. durch die Hyperfiltration in der Frühphase der Nephropathie erklärt werden kann (Wald und Popovtzer, 1984). Unsere Tiere zeigten steigende Werte der Ausscheidung dieser Elektrolyte (Abb. 15 und 16). Diese waren zwischen den Genotypen vergleichbar, was jedoch eine selektive Mitbeteiligung von $G\alpha_{i1}$ oder $G\alpha_{i3}$ nicht unbedingt vermuten lässt.

Zu weiteren Zeichen der diabetischen Nephropathie gehört auch die Mikroalbuminurie (Mogensen *et al.*, 1983; Mogensen, 1987; Lehmann und Schleicher, 2000). Die Albuminurie beginnt normalerweise zwei Wochen nach der STZ-Behandlung, allerdings ist der Nachweis von Protein im Urin in kleinen Mengen bei Mäusen physiologisch (Romero *et al.*, 2013). Die Bestimmungen der Albumin- (Abb. 17) und Proteinausscheidung (Abb.18) ergaben bei den $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Tieren ab Tag 30 pathophysiologische Werte, die im Verlauf weiter zunahmten. Aufgrund starker Standardabweichungen konnte in diesen orientierenden Untersuchungen keine Signifikanz berechnet werden.

Da die Nierenschwelle des Menschen für Glukose ca. 180 mg/ml beträgt, geht mit dem Diabetes eine Glukosurie einher. In unserem Versuch konnte sie bereits initial geringfügig nachgewiesen werden, nach der STZ-Injektion nahm sie gleichmäßig in allen Genotypen zu (Abb. 19). Die absolute Glukoseausscheidung pro 24 h stieg kontinuierlich bei den $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Mäusen über den Versuchszeitraum an (Abb. 20). Auch hier begründeten die hohen Standardabweichungen das Fehlen der statistisch signifikanten Unterschiede gegenüber den Kontroll-Tieren. Auch mit STZ-behandelte Ratten entwickelten bereits nach 48 h nach der STZ-Injektion eine Glukosurie (> 2 %), die über die gesamte Beobachtungsdauer von sechs Wochen persistierte (Hakim *et al.*, 1997). In einer anderen Studie trat die Glukosurie bei den Ratten schon nach 24 h nach der STZ-Applikation auf (Wald und Popovtzer, 1984).

Insgesamt prädisponiert die Abwesenheit des $G\alpha_{i1}$ -Proteins zur Entwicklung typischer Zeichen der diabetischen Nephropathie. Unsere Ergebnisse beinhalten keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren, weshalb unsere Feststellungen nicht ausreichend aussagekräftig sind und durch nachfolgende systematische Untersuchungen abgesichert werden sollten.

Histologisch beginnt die diabetische Nephropathie mit einer Größenzunahme der Glomeruli (Mauer *et al.*, 1984). Dies resultiert in einer zu Beginn dieser Veränderung vermehrten Filtration mit einem darauffolgenden Anstieg der Kreatininclearance. Dieser Parameter am Tag 90 nach der STZ-Injektion zeigte einen relevanten Anstieg bei den $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Mäusen und einen weniger auffälligen auch bei den $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Tieren (Abb. 21). Die statistische Auswertung zeigte signifikante Unterschiede bei beiden Stämmen im Vergleich zu den Kontroll-Tieren. Ob dies jedoch von Bedeutung ist, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, da nur an einem Messtag dieser Befund erhoben wurde. Die Betrachtung der Originaldaten zeigte jedoch, dass es im Datensatz zwei Messwerte gab, die als Ausreißer (jeweils einer in beiden *knock out* Gruppen) angesehen werden könnten. Die Kreatininclearance lag in der Kontroll-Gruppe im Durchschnitt bei ca. 6 μ l/min. Beide *knock out* Mauslinien zeigten generell höhere Werte und die Ausreißer verstärkten die Abweichungen. Somit traten

signifikante Unterschiede auf, die wie oben geschildert schwierig zu interpretieren sind.

Diese Unklarheit veranlasste uns diese Genotypen genauer zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden weitere renovaskuläre Parameter bestimmt. Unter der Voraussetzung, dass die Diabetes-bedingten renalen Veränderungen ab Tag 90 nach der Diabetesinduktion stattfinden, führten wir diesmal die mikrochirurgische Präparation zwischen Tag 100 und 115 nach den STZ-Injektionen durch. Im Mittelpunkt stand die Messung der GRF als eines präzisen Parameters des Filtrationsvermögens. Interessanterweise zeigte sich bei den $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Mäusen eine tendenziell niedrigere GFR (Abb. 22). Am Tag 90 in der vorherigen Studie waren die Werte der Kreatininclearance bei Tieren dieses Genotyps höher als bei den Wildtyp-Tieren. Die aktuelle Messung ergab widersprüchliche Ergebnisse. Es könnte sein, dass es zwischen Tag 90 und Tag 100 - 115 zu einem raschen Progress der diabetischen Nephropathie kam. Ein solcher Verlauf würde dem natürlichen Filtrationsvermögen der Nieren bei Diabetikern entsprechen. Nach dem Filtrationsanstieg im Frühstadium der Krankheit verlieren die Organe im Laufe der Zeit ihre Filtrationsfähigkeit (Mogensen *et al.*, 1983; O'Donnell *et al.*, 1988; Kiran *et al.*, 2012). Der zeitliche Abstand war aber sehr kurz und es müsste sich um eine sehr rasche Progression handeln, was wir jedoch nach einer 90-tägigen „stillen“ Phase für unwahrscheinlich halten.

Der Vergleich der Gewichte (Abb. 23 - 25) sowie der spezifischen Organgewichte (Abb. 26 - 28) der Nieren zwischen den Genotypen erbrachte keine Besonderheiten. Mittels der Immunoblot-Analyse wurde in den Homogenaten aus den linken Nieren der TGF- β detektiert. Dieser ist der molekulare Hauptfaktor, der die Nierenhypertrophie fördert (Nakamura *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1993; Lehmann und Schleicher, 2000; Vallon, 2011). Es konnten keine Unterschiede in dessen Expression zwischen den Mauslinien festgestellt werden (Abb. 29). Die überprüften Isoformen des $G\alpha_i$ -Proteins waren ohne Auswirkung auf die TGF- β -Funktion. Deshalb spielt das $G\alpha_i$ -Protein entweder keine Rolle in dem Mechanismus oder die Nierengrößenzunahme ist

an dieser Stelle zu gering um den Unterschied in der TGF- β -Expression nachzuweisen.

Beide *knock out* Stämme unter der STZ-Behandlung schieden mehr Kalzium als die Wildtyp-Mäuse aus (Abb. 30 und 31), sodass diese Proteine in der renalen Kalziumreabsorption am experimentell-induzierten Diabetes beteiligt sein könnten. Die vermehrte Kalziumausscheidung wurde in den mit STZ-behandelten Tieren mit diabetischer Nephropathie im Vergleich zu Nicht-Diabetikern beschrieben, möglicherweise als durch eine verminderte Expression von renalem *Klotho* in dem STZ-induzierten Diabetes bedingt (Asai *et al.*, 2012). Ob das $G\alpha_{i1}$ - und/oder $G\alpha_{i3}$ -Protein die renale *Klotho*-Expression reguliert, muss noch erforscht werden.

Hyperphosphaturie und Hyperphosphatämie als Folge des STZ-induzierten Diabetes sind bekannt (Zhang *et al.*, 1992). Die Phosphatfiltration der $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Tiere war signifikant niedriger als bei den Kontroll-Tieren (Abb. 32), dabei muss aber die niedrigere GRF dieser Mäuse berücksichtigt werden. Weitere Berechnungen hinsichtlich des Phosphathaushaltes ergaben keine Signifikanzen.

Zusammengenommen ist festzustellen, dass die Ergebnisse eine Mitwirkung des $G\alpha_{i3}$ -Proteins bei der Entwicklung der diabetischen Nephropathie nicht vermuten lassen. Hinsichtlich des $G\alpha_{i1}$ -Proteins sind aktuell keine eindeutigen Angaben möglich. Mehrere Bestimmungen erbrachten den Nachweis einer Prädisposition zur Entwicklung typischer Zeichen einer diabetischen Nephropathie. Somit könnte das $G\alpha_{i1}$ -Protein einen Beitrag zum Pathomechanismus der Erkrankung leisten, hier sollen erneute Versuche vorgenommen werden, als Kontrollen sollen *litter mates* dienen.

5 Zusammenfassung

G-Proteine sind Bestandteile einer interzellulären GPCR-abhängigen Kommunikationskette. Dysregulationen und Mutationen von G-Proteinen und GPCRs konnten als Ursachen zahlreicher Erkrankungen identifiziert werden.

Hinweise in der Literatur lassen vermuten, dass das $G\alpha_{i2}$ -Protein in der Leber, im Fettgewebe und in Skelettmuskeln bedeutsam für die Glukosehomöostase sowie die Entwicklung eines Diabetes mellitus sein könnte. Die vorliegende Arbeit ist eine erste orientierende Untersuchung von global $G\alpha_i$ -defizienten Mäusen zur Bedeutung dieser G-Proteine für den Glukosehaushalt. Die Untersuchungen mit Hilfe von Glukosetoleranztests (oGTT und iGTT) ergaben, dass die Defizienz von $G\alpha_{i2}$ die Glukosehomöostase beeinflusst. Dies könnte verschiedene Ursachen haben: z.B. eine Beeinflussung der β -Zell-funktion, des Inkretinsignalweges, eine Regulation von Glukosetransportern, eine Beeinflussung der SGLT1-Expression und/oder eine Regulation der FOXO-Expression. Hingegen konnten die erhobenen Daten eine signifikante Rolle von $G\alpha_{i1}$ und $G\alpha_{i3}$ bei der physiologischen Regulation der Glukosehomöostase nicht erkennen lassen. Zur weiteren Überprüfung wurde in $G\alpha_{i1}$ - und $G\alpha_{i3}$ -defizienten Tieren ein experimenteller Diabetes mellitus mit Hilfe von Streptozotozin (STZ) induziert. Als Erfolgskontrolle wurden regelmäßige Insulinbestimmungen, die mehrheitlich in den aus der Literatur bekannten Studien fehlen, durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass ein maximaler Effekt etwa 60 Tage nach der STZ-Applikation (Hyperglykämie bei minimalen Insulinspiegeln) zu beobachten war. Interessanterweise zeigten $G\alpha_{i1}^{-/-}$ Tiere nach der STZ-Behandlung eine sehr starke Tendenz, typische Zeichen eines Diabetes zu entwickeln.

Untersuchungen hinsichtlich der diabetischen Nephropathie nach STZ-Behandlung zeigten, bis auf den Kalzium- und Phosphathaushalt, keine signifikanten Unterschiede zwischen den $G\alpha_i$ -defizienten und den Kontroll-Tieren, insbesondere war die TGF- β -Expression gleich.

Unsere Befunde legen nahe, dass die Funktion der drei $G\alpha_i$ -Isoformen im Inselapparat des Pankreas sowie in insulinsensitiven Geweben und im Intestinum mit Hilfe gewebespezifischer $G\alpha_i$ -defizienter Tiere genauer untersucht werden sollten.

6 Literaturverzeichnis

Adorini L, Gregori S und Harrison LC (2002) Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. *Trends Mol Med* 8(1): 31-38.

Albarrán-Juárez J, Gilsbach R, Piekorz RP, Pexa K, Beetz N, Schneider J, Nürnberg B, Birnbaumer L und Hein L (2009) Modulation of alpha2-adrenoceptor functions by heterotrimeric G α_i protein isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* 331(1): 35-44.

Alimohammadi S, Hobbenaghi R, Javanbakht J, Kheradmand D, Mortezaee R, Tavakoli M, Khadivar F und Akbari H (2013) Protective and antidiabetic effects of extract from *Nigella sativa* on blood glucose concentrations against streptozotocin (STZ)-induced diabetic in rats: an experimental study with histopathological Evaluation. *Diagn Pathol* 8: 137.

Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC und Proietto J (2008) Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(6): 1323-1332.

Aplin AE, Howe A, Alahari SK und Juliano RL (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 50(2): 197-263.

Asai O, Nakatani K, Tanaka T, Sakan H, Imura A, Yoshimoto S, Samejima K, Yamaguchi Y, Matsui M, Akai Y, Konishi N, Iwano M, Nabeshima Y und Saito Y (2012) Decreased renal α -Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion. *Kidney Int* 81(6): 539-547.

Avruch J (1998) Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* 182(1-2): 31-48.

Ayala JE, Bracy DP, McGuinness OP und Wasserman DH (2006) Consideration in the design of hyperinsulinemic-euglycemic clamps in the conscious mouse. *Diabetes* 55(2): 390-397.

Barnard EA, Sutherland M, Zaman S, Matsumoto M, Nayeem N, Green T, Darlison MG und Bateson AN (1993) Multiplicity, structure, and function in GABA_A receptors. *Ann N Y Acad Sci* 707: 116-125.

Barnes NM, Hales TG, Lummis SC und Peters JA (2009) The 5-HT₃ receptor-the relationship between structure and function. *Neuropharmacology* 56(1): 273-284.

Bazley LA und Gullick WJ (2005) The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer* 12(Suppl.1): 17-27.

Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H und Seino S (1990) Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 13(3): 198-208.

Bevan P (2001) Insulin signalling. *J Cell Sci* 114: 1429-1430.

Bouche C, Lopez X, Fleischman A, Cypess AM, O'Shea S, Stefanovski D, Bergman RN, Rogatsky E, Stein DT, Kahn CR, Kulkarni RN und Goldfine AB (2010) Insulin enhances glucose-stimulated insulin secretion in healthy humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(10): 4770-4775.

Bourne HR (1997) How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9: 134-142.

Bowker SL, Majumdar SR, Veugelers P und Johnson JA (2006) Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. *Diabetes Care* 29(2): 254-258.

Carter ME und Brunet A (2007) FOXO transcription factors. *Curr Biol* 17(4): 113-114.

Cefalu WT (2006) Animal models of type 2 diabetes: clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition. *ILAR J* 47(3): 186-198.

Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K und Kamper E (2009) The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In vivo* 23(2): 245-258.

Clapham DE und Neer EJ (1997) G protein $\beta\gamma$ subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 167-203.

Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ Jr und Arai Y (1964) Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *J Clin Endocrinol Metab* 24: 1076-1082.

Exton JH (1996) Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G-proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 481-509.

Fehmann HC, Jiang J, Pitt D, Schweinfurth J und Göke B (1996) Ligand-induced regulation of glucagon-like peptide-I receptor function and expression in insulin-secreting beta cells. *Pancreas* 13(3): 273-282.

Flock G, Holland D, Seino Y und Drucker DJ (2011) GPR119 regulates murine glucose homeostasis through incretin receptor-dependent and independent mechanisms. *Endocrinology* 152(2): 374-383.

Fredriksson R, Höglund PJ, Gloriam DE, Lagerström MC und Schiöth HB (2003) Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Lett* 554(3): 381-388.

Fujiwara TM, Morgan K und Bichet DG (1995) Molecular biology of diabetes insipidus. *Annu Rev Med* 46: 331-343.

Gawler D, Milligan G und Houslay MD (1988) Treatment of streptozotocin-diabetic rats with metformin restores the ability of insulin to inhibit adenylate cyclase activity and demonstrates that insulin does not exert this action through the inhibitory guanine nucleotide regulatory protein G_i . *Biochem J* 249(2): 537-542.

Gawler D, Milligan G, Spiegel AM, Unson CG und Houslay MD (1987) Abolition of the expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein G_i activity in diabetes. *Nature* 327(6119): 229-232.

Gough SCL, Belda-Iniesta C, Poole C, Weber M, Russell-Jones D, Hansen BF, Mannucci E und Tuomilehto J (2011) Insulin therapy in diabetes and cancer risk: current understanding and implications for future study. *Adv Therapy* 28(Suppl.5): 1-18.

Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML und Zelmanovitz T (2005) Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment *Diabetes Care* 28(1): 164-176.

Gross SS (2001) Vascular biology. Targeted delivery of nitric oxide. *Nature* 409: 577-578.

Gudermann T, Nürnberg B und Schultz G (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part I. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J Mol Med* 73: 51-63.

Hakim ZS, Patel BK und Goyal RK (1997) Effects of chronic ramipril treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 41(4): 353-360.

Hashim S, Li Y, Nagakura A, Takeo S und Anand-Srivastava MB (2004) Modulation of G-protein expression and adenylyl cyclase signaling by high glucose in vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res* 63(4): 709-718.

Hassan MM, Curley SA, Li D, Kaseb A, Davila M, Abdalla EK, Javle M, Dalia MM, Lozano RD, Abbruzzese JL und Vauthey JN (2010) Association of diabetes duration and diabetes treatment with the risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 116(8): 1938-1946.

Heyworth CM und Houslay MD (1983) Insulin exerts actions through a distinct species of guanine nucleotide regulatory protein: inhibition of adenylatecyclase. *Biochem J* 214(2): 547-552.

Heyworth CM, Rawal S und Houslay MD (1983) Guanine nucleotides can activate the insulin-stimulated phosphodiesterase in liver plasma membranes. *FEBS Lett* 154(1): 87-91.

Houslay MD (1984) A family of guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Biochem Sci* 9: 39-40.

Howarth FC, Jacobson M, Shafiullah M und Adeghate E (2005) Long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity und body temperature in rats. *Exp Physiol* 90(6): 827-835.

Hucho F, Tsetlin VI und Machold J (1996) The emerging three-dimensional structure of a receptor. The nicotinic acetylcholine receptor. *Eur J Biochem* 239: 539-557.

Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim BJ, Zhou J, Kim HH, Xu X, Chan SL, Juhaszova M, Bernier M, Mosinger B, Margolskee RF und Egan JM (2007) Gut-expressed gustducin und taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(38): 15069-15074.

Jensen LJ, Denner L, Schrijvers BF, Tilton RG, Rasch R und Flyvbjerg AJ (2006) Renal effects of a neutralising RAGE-antibody in long-term streptozotocin-diabetic mice. *Endocrinol* 188(3): 493-501.

Jiang M, Spicher K, Boulay G, Martín-Requero A, Dye CA, Rudolph U und Birnbaumer L (2002) Mouse gene knockout and knockin strategies in application to α subunits of Gi/Go family of G proteins. *Methods Enzymol* 344: 277-298.

Kataoka M, Kawamuro Y, Shiraki N, Miki R, Sakano D, Yoshida T, Yasukawa T, Kume K und Kume S (2013) Recovery from diabetes in neonatal mice after a low-dose streptozotocin treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 430(3): 1103-1108.

Kaziyo Y, Itoh H, Kozasa T, Nakafuku M und Satoh T (1991) Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu Rev Biochem* 60: 349-400.

Kimble ME, Neuman JC, Linnemann AK und Casey PJ (2014) Inhibitory G proteins and their receptors: emerging therapeutic targets for obesity and diabetes. *Exp Mol Med* 46(6): e102.

Kiran G, Nandini CD, Ramesh HP und Salimath PV (2012) Progression of early phase diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats: evaluation of various kidney-related parameters. *Indian J Exp Biol* 50(2): 133-140.

Kreuzer J, Nürnberg B und Krieger-Brauer HI (2004) Ligand-dependent autophosphorylation of the insulin receptor is positively regulated by Gi-proteins. *Biochem J* 380: 831-836.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.

- Lambert NA (2008) Dissociation of heterotrimeric G-proteins in cells. *Sci Signal* 1(25): re5.
- Lang J (1999) Molecular mechanism and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem* 259: 3-17.
- Layden BT, Durai V und Lowe WL Jr (2010) G-protein-coupled receptors, pancreatic Islets, and Diabetes. *Nature Education* 3(9): 13.
- Lehmann R und Schleicher ED (2000) Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta* 297(1-2): 135-144.
- Li Y, Descorbeth M und Anand-Srivastava MB (2008) Role of oxidative stress in high glucose-induced decreased expression of G_iα proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(6): 2845-2854.
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk RM, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA und Landau NR (1996) Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 Infection. *Cell* 86: 367-377.
- Lyons J, Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grünewald K, Feichtinger H, Duh QY, Clark OH, Kawasaki E, Bourne HR und McCormick F (1990) Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science* 249: 655-659.
- Malarkey K, Belham CM, Paul A, Graham A, McLees A, Scott PH und Plevin R (1995) The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 309: 361-375.
- Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DE, Brown DM und Goetz FC (1984) Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 74(4): 1143-1155.
- Mayo KE, Miller LJ, Bataille D, Dalle S, Göke B, Thorens B und Drucker DJ (2003) International union of pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family. *Pharmacol Rev* 55(1): 167-194.
- McIntyre N, Holdsworth CD und Turner DS (1964) New interpretation of oral glucose tolerance. *Lancet* 2(7349): 20-21.
- Miyamoto K, Hase K, Taketani Y, Minami H, Oka T, Nakabou Y und Hagihira H (1991) Diabetes and glucose transporter gene expression in rat small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 181(3): 1110-1117.
- Mogensen CE (1987) Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. *Kidney Int* 31(2): 673-689.

- Mogensen CE, Christensen CK und Vittinghus E (1983) The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes* 32(Suppl.2): 64-78.
- Mortensen K, Christensen LL, Holst JJ und Orskov C (2003) GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regul Pept* 114(2-3): 189-196.
- Moxham CM und Malbon CC (1996) Insulin action impaired by deficiency of the G-protein subunit $G_{i\alpha 2}$. *Nature* 379(6568): 840-844.
- Myers MG Jr, Kahn CR und Accili D (2010) Leptin therapy for type 1 diabetes gains traction. *Nat Med* 16(4): 380.
- Nakae J, Kitamura T, Silver DL und Accili D (2001) The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest* 108(9): 1359-1367.
- Nakamura T, Fukui M, Ebihara I, Osada S, Nagaoka I, Tomino Y und Koide H (1993) mRNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. *Diabetes* 42(3): 450-456.
- Nauck MA (2011) Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: properties, functions, and clinical implications. *Am J Med* 124(Suppl.1): 3-18.
- Nürnberg B, Gudermann T und Schultz G (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transductions. Part 2. G proteins: structure and function. *J Mol Med* 73: 123-132.
- O'Donnell MP, Kasiske BL und Keane WF (1988) Glomerular hemodynamic and structural alterations in experimental diabetes mellitus. *FASEB J* 2(8): 2339-2347.
- Offermanns S (2003) G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol* 83: 101-130.
- Ogunleye AA, Ogston SA, Morris AD und Evans JM (2009) A cohort study of the risk of cancer associated with type 2 diabetes. *Br J Cancer* 101(7): 1199-1201.
- Overington JP, Al-Lazikani B und Hopkins AL (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5(12): 993-996.
- Overton HA, Fyfe MC und Reynet C (2008) GPR119, a novel G protein-coupled receptor target for the treatment of type 2 diabetes and obesity. *Br J Pharmacol* 153(Suppl.1): 76-81.
- Parker MG (1993) Steroid and related receptors. *Curr Opin Cell Biol* 5: 499-504.

Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mockel J, Dumont J und Vassart G (1993) Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature* 365(6447): 649-651.

Pennington SR (1987) G proteins and diabetes. *Nature* 327(6119): 188-189.

Pessin JE und Saltiel AR (2000) Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 106(2): 165-169.

Pierce KL, Premont RT und Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9): 639-650.

Pietruck F, Spleiter S, Daul A, Philipp T, Derwahl M, Schatz H und Siffert M (1998) Enhanced G protein activation in IDDM patients with diabetic nephropathy. *Diabetologia* 41(1): 94-100.

Regard JB, Kataoka H, Cano DA, Camerer E, Yin L, Zheng YW, Scanlan TS, Hebrok M und Coughlin SR (2007) Probing cell type-specific functions of Gi in vivo identifies GPCR regulators of insulin secretion. *J Clin Invest* 117(12): 4034-4043.

Robertson RP, Seaquist ER und Walseth TF (1991) G proteins and modulation of insulin secretion. *Diabetes* 40(1): 1-6.

Romero MJ, Yao L, Sridhar S, Bhatta A, Dou H, Ramesh G, Brands MW, Pollock DM, Caldwell RB, Cederbaum SD, Head CA, Bagi Z, Lucas R und Caldwell RW (2013) L-citrulline protects from kidney damage in type 1 diabetic mice. *Front Immunol* 4: 480.

Rossini AA, Like AA, Chick WL, Appel MC und Cahill GF Jr (1977) Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(6): 2485-2489.

Rozengurt N, Wu SV, Chen MC, Huang C, Sternini und Rozengurt E (2006) Colocalization of the alpha-subunit of gustducin with PYY and GLP-1 in L cells of human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291(5): 792-802.

Shang X, Marchioni F, Evelyn CR, Sipes N, Zhou X, Seibel W, Wortman M und Zheng Y (2013) Small-molecule inhibitors targeting G-protein-coupled Rho guanine nucleotide exchange factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(8): 3155-3160.

Sharp GW (1996) Mechanisms of inhibition of insulin release. *Am J Physiol* 271(6): 1781-1799.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ und Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1): 76-85.

Song X, Zheng X, Malbon CC und Wang Hy (2001) $G\alpha_{i2}$ enhances *in vivo* activation of and insulin signaling to GLUT4. *J Biol Chem* 276(37): 34651-34658.

Spiegel AM (1997) Inborn errors of signal transduction: mutations in G proteins and G protein-coupled receptors as a cause of disease. *J Inher Metab Dis* 20(2): 113-121.

Stow JL, Sabolic I und Brown D (1991) Heterogeneous localization of G protein alpha-subunits in rat kidney. *Am J Physiol* 261(5): 831-840.

Strathmann MP und Simon MI (1990) G-protein diversity: a distinct class of a subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9113-9117.

Strathmann MP und Simon MI (1991) $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ subunits define a fourth class of G-protein a subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5582-5586.

Sunahara RK, Dessauer CW und Gilman AG (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 461-480.

Suzuki R, Lee K, Jing E, Biddinger SB, McDonald JG, Montine TJ, Craft S und Kahn CR (2010) Diabetes and insulin in regulation of brain cholesterol metabolism. *Cell Metab* 12(6): 567-579.

Szkudelski T (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50(6): 537-546.

Tao J, Malbon CC und Wang HY (2001) $G\alpha_{i2}$ enhances insulin signaling *via* suppression of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* 276(43): 39705-39712.

Taussig R und Gilman AG (1995) Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J Biol Chem* 270(1): 1-4.

Taylor A (2006) The genetics of type 2 diabetes: a review. *Int J Diab Metab* 14: 76-81.

Thorens B, Cheng ZQ, Brown D und Lodish HF (1990) Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 259(6): 279-285.

Thorens B, Wu YJ, Leahy JL und Weir GC (1992) The loss of GLUT2 expression by glucose-unresponsive beta cells of db/db mice is reversible and is induced by the diabetic environment. *J Clin Invest* 90: 77-85.

Tian HL, Wei LS, Xu ZX, Zhao RT, Jin DL und Gao JS (2010) Correlations between blood glucose level and diabetes signs in streptozotocin-induced diabetic mice. *Global J Pharmacol* 4(3): 111-116.

Usdin TB, Mezey E, Button DC, Brownstein MJ und Bonner TI (1993) Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* 133(6): 2861-2870.

Vallon V (2003) *In vivo* studies of the genetically modified mouse kidney. *Nephron Physiol* 94(1): 1-5.

Vallon V (2011) The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300(5): 1009-1022.

Vallon V, Richter K, Blantz RC, Thomson S und Osswald H (1999) Glomerular hyperfiltration in experimental diabetes mellitus: potential role of tubular reabsorption. *J Am Soc Nephrol* 10(12): 2569-2576.

Wald H und Popovtzer MM (1984) The effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on urinary excretion of sodium and renal Na⁺-K⁺-ATPase activity. *Pflügers Archiv* 401(1): 97-100.

Wang Y, Park S, Bajpayee NS, Nagaoka Y, Boulay G, Birnbaumer L und Jiang M (2011) Augmented glucose-induced insulin release in mice lacking G(o2), but not G(o1) or G(i) proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(4):1693-1698.

Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E und Spiegel AM (1991) Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med* 325(24): 1688-1695.

White MF und Kahn CR (1994) The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269(1): 1-4.

Wiege K, Ali SR, Gewecke B, Novakovic A, Konrad FM, Pexa K, Beer-Hammer S, Reutershan J, Piekorz RP, Schmidt RE, Nürnberg B und Gessner JE (2013) Gai2 is the essential Gai protein in immune complex-induced lung disease. *J Immunol* 190(1): 324-333.

Wolf G und Ziyadeh FN (2007) Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol* 106(2): 26-31.

Yamamoto H, Uchigata Y und Okamoto H (1981) Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 294(5838): 284-286.

Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslathi E und Border WA (1993) Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(5): 1814-1818.

Yu R, Hurdiss E, Greiner T, Lape R, Sivilotti L und Biggin PC (2014) Agonist and antagonist binding in human glycine receptors. *Biochemistry* 53(38): 6041-6051.

Zhang XZ, Shi MZ und Dang GD (1992) Effect of insulin therapy on abnormal bone and mineral metabolism in chronic streptozotocin-induced diabetic rat. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 31(11): 674-677, 729.

Zheng XL, Guo Jh, Wang Hy und Malbon CC (1998) Expression of constitutively activated $G_{i\alpha 2}$ *in vivo* ameliorates streptozotocin-induced diabetes. *J Biol Chem* 273(37): 23649-23651.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> [Zugriff 08.12.14]

WHO und IDF (2006): Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemie [on-line].

URL: http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241594934_eng.pdf?ua=1

ISBN: 978 92 4 159493 6

[Zugriff 08.12.14]

7 Erklärungen zum Eigenanteil

Die Konzeption der Studie, deren Ergebnisse im Abschnitt 3.1 beschrieben sind, erfolgte unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. B. Nürnberg. Die Konzeption der Studien, deren Resultate in den Abschnitten 3.2 und 3.3 beschrieben sind, erfolgte unter Anleitung von Frau Dr. D.Y. Huang. Im Laufe der Versuche wurden eigene Ergänzungen und Erweiterungen in die Versuchsdurchführung eingebracht.

Bei den Versuchen und Bestimmungen im Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke (Ergebnisse im Abschnitt 3.1 dargestellt) wurde ich durch Frau Prof. Dr. A. Schürmann-Bartsch betreut und in meiner Arbeit durch erfahrene technische Mitarbeiter unterstützt.

Alle Versuche und Bestimmungen im Abschnitt 3.2 wurden eigenständig durchgeführt. Die Einarbeitung in die proteinanalytischen Methoden und in die ELISA erfolgte durch Frau Dr. V. Denavathan. Die Einweisung in die Messungen mittels Flammenphotometer, UV-Photometrie und radioaktive Inulinabsorption erfolgte durch Fr. Dr. D.Y. Huang.

Die mikrochirurgische Präparation (die Methode im Abschnitt 2.9) wurde durch Fr. Dr. D.Y. Huang mit meiner Unterstützung durchgeführt. Die Methode der mikrochirurgischen Präparation wurde mir beigebracht, ich führte diese an Mäusen durch, die Ergebnisse dieser Untersuchung sind jedoch nicht in die Dissertation eingeflossen. Die Bestimmungen der renovaskulären Parameter erfolgten durch mich.

Alle Abbildungen wurden eigenständig hergestellt. Alle statistischen Auswertungen erfolgten eigenständig.

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

8 Anhang

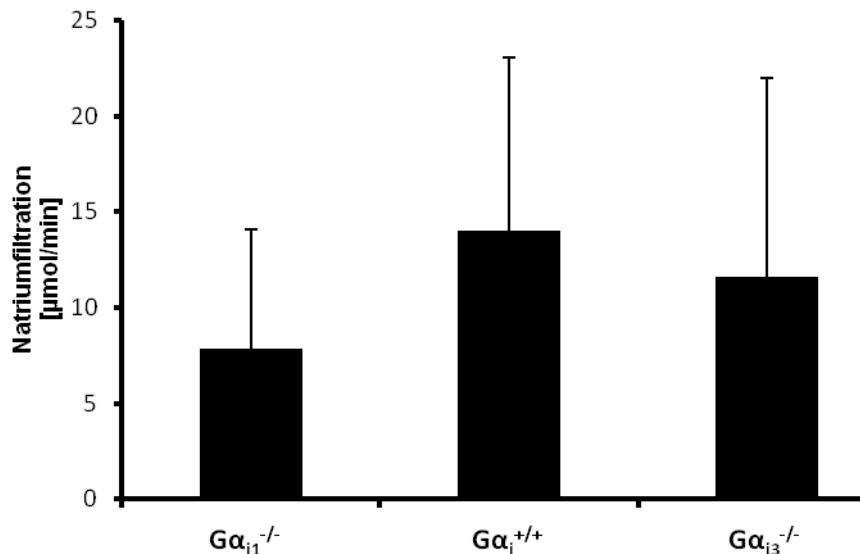


Abb. 33: Natriumfiltration nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_{i}^{+/+}$ (n = 6), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 5) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse (n = 4). Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9), während gleichzeitig Blut- und Urinproben gesammelt wurden. In diesen Proben wurde die Natriumkonzentration (s. 2.14) bestimmt und der o.g. Parameter berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

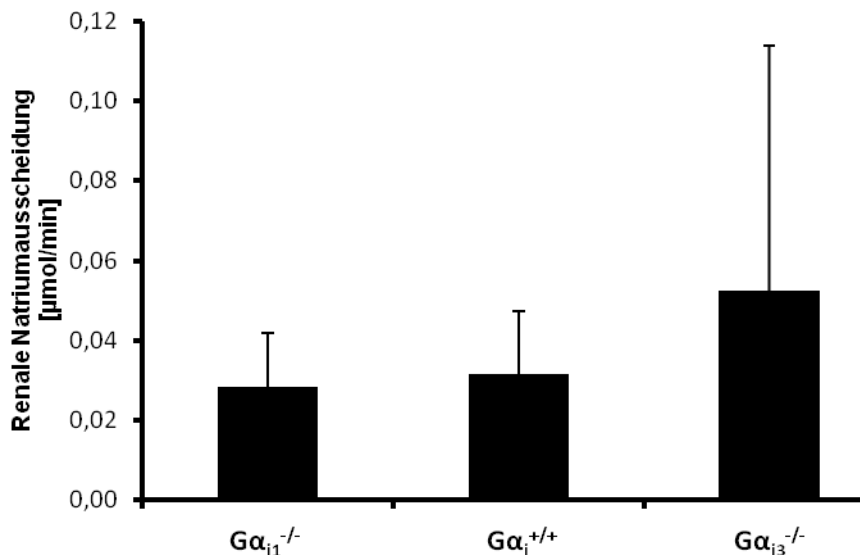


Abb. 34: Renale Natriumausscheidung nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_{i}^{+/+}$ (n = 6), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 5) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse (n = 4). Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9), während gleichzeitig Urinproben gesammelt wurden. In diesen Proben wurde die Natriumkonzentration (s. 2.14) bestimmt und der o.g. Parameter berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

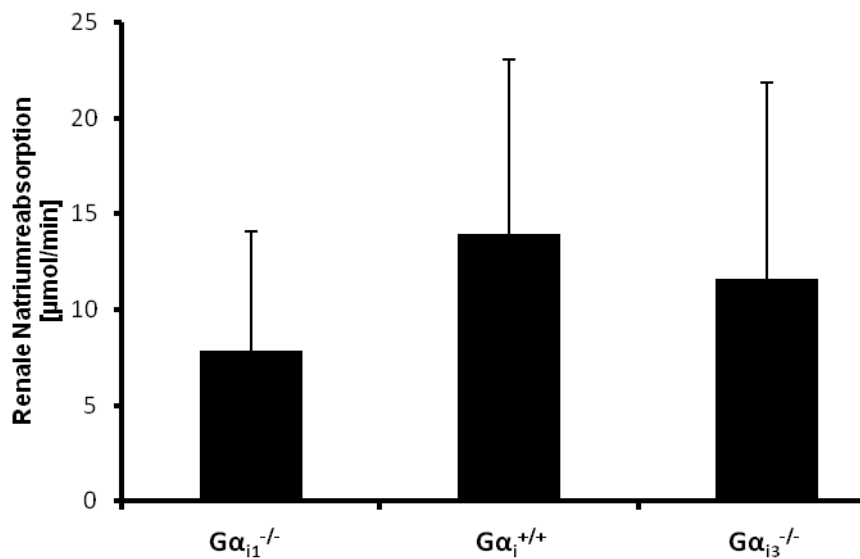


Abb. 35: Renale Natriumreabsorption nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ ($n = 6$), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ ($n = 5$) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse ($n = 4$). Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9), während gleichzeitig Blut- und Urinproben gesammelt wurden. In diesen Proben wurde die Natriumkonzentration (s. 2.14) bestimmt und der o.g. Parameter berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

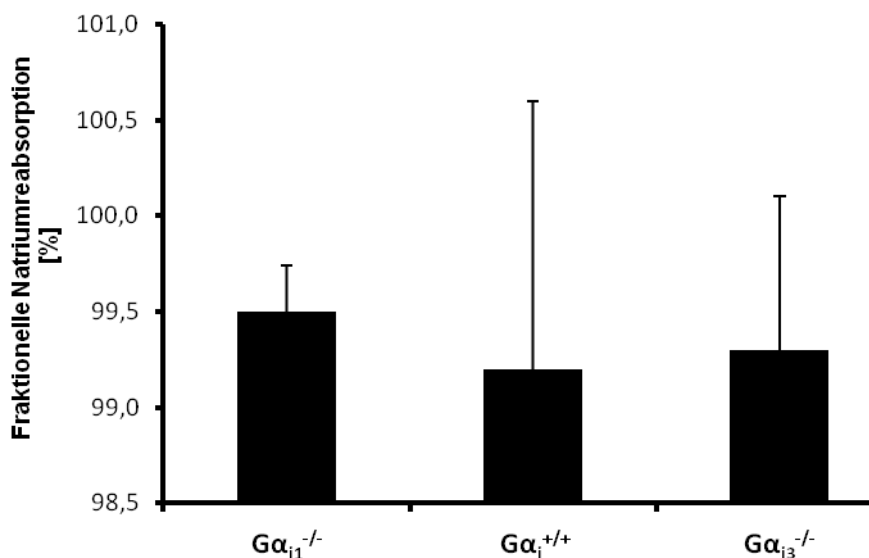


Abb. 36: Fraktionelle Natriumreabsorption nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ ($n = 6$), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ ($n = 5$) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse ($n = 4$). Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9), während gleichzeitig Blut- und Urinproben gesammelt wurden. In diesen Proben wurde die Natriumkonzentration (s. 2.14) bestimmt und der o.g. Parameter berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

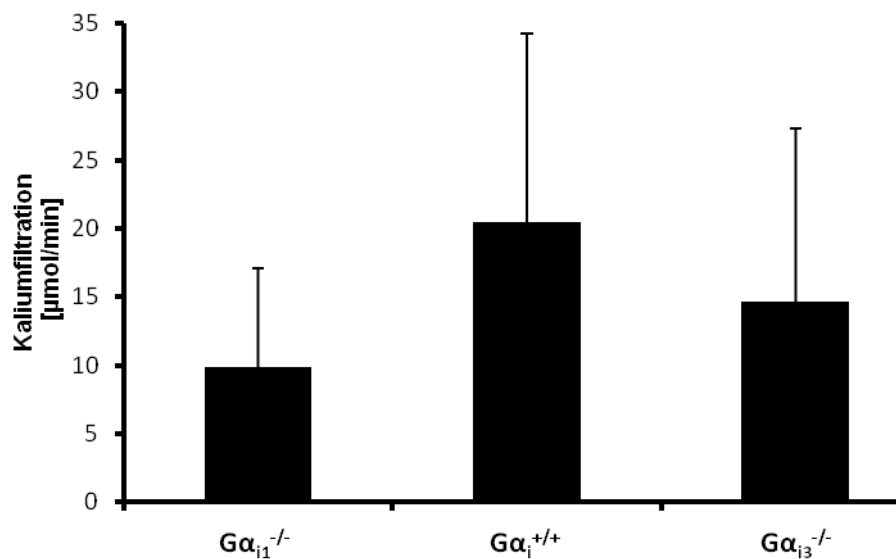


Abb. 37: Kaliumpfaltung nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_1^{+/+}$ (n = 6), $G\alpha_{11}^{-/-}$ (n = 5) und $G\alpha_{13}^{-/-}$ Mäuse (n = 4). Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9), während gleichzeitig Blut- und Urinproben gesammelt wurden. In diesen Proben wurde die Kaliumkonzentration (s. 2.14) bestimmt und der o.g. Parameter berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

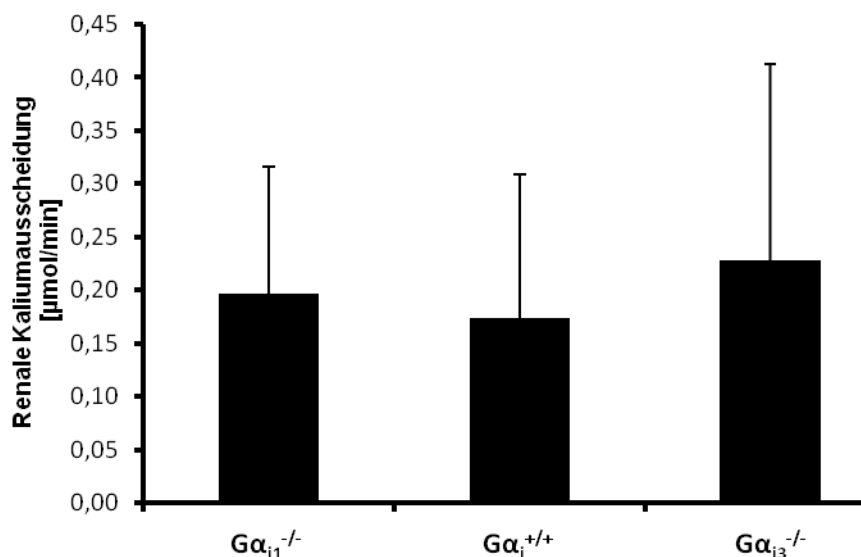


Abb. 38: Renale Kaliumausscheidung nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_1^{+/+}$ (n = 6), $G\alpha_{11}^{-/-}$ (n = 5) und $G\alpha_{13}^{-/-}$ Mäuse (n = 4). Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9), während gleichzeitig Urinproben gesammelt wurden. In diesen Proben wurde die Kaliumkonzentration (s. 2.14) bestimmt und der o.g. Parameter berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

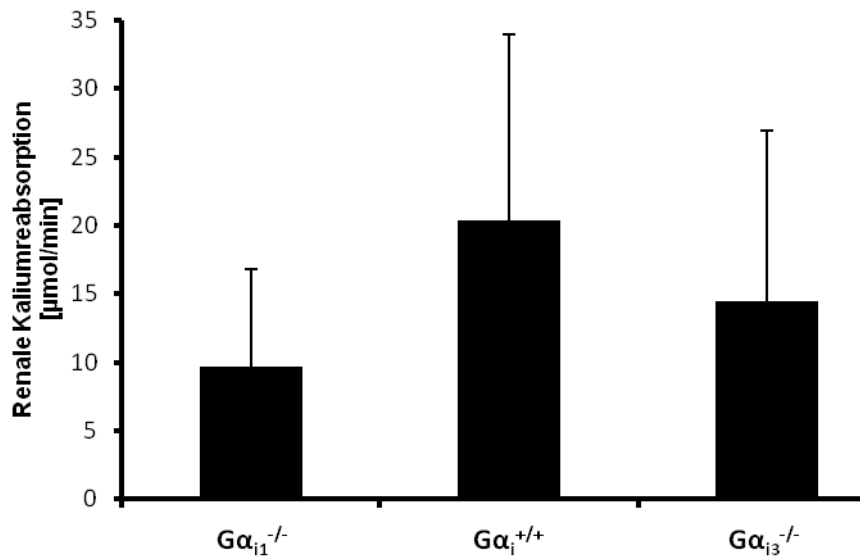


Abb. 39: Renale Kaliumreabsorption nach der STZ-Behandlung der männlichen $\text{Ga}_i^{+/+}$ ($n = 6$), $\text{Ga}_{11}^{-/-}$ ($n = 5$) und $\text{Ga}_{13}^{-/-}$ Mäuse ($n = 4$). Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9), während gleichzeitig Blut- und Urinproben gesammelt wurden. In diesen Proben wurde die Kaliumkonzentration (s. 2.14) bestimmt und der o.g. Parameter berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

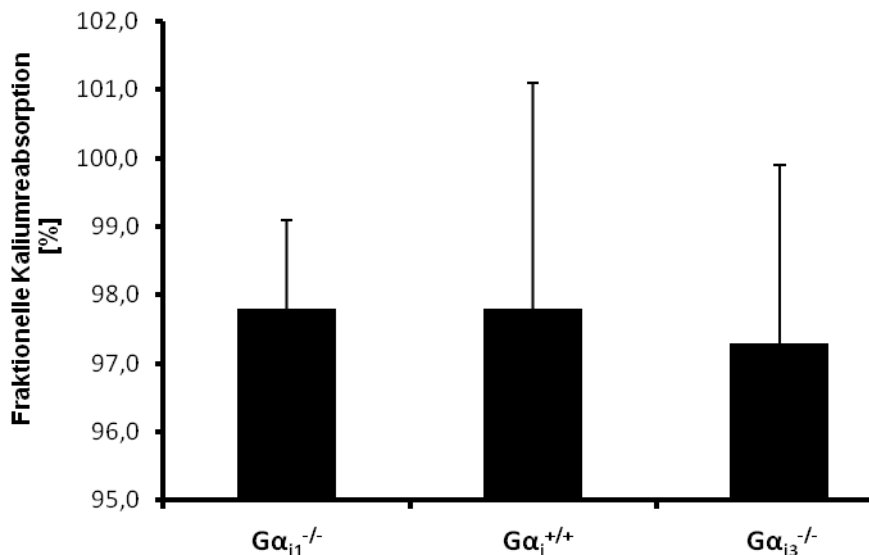


Abb. 40: Fraktionelle Kaliumreabsorption nach der STZ-Behandlung der männlichen $\text{Ga}_i^{+/+}$ ($n = 6$), $\text{Ga}_{11}^{-/-}$ ($n = 5$) und $\text{Ga}_{13}^{-/-}$ Mäuse ($n = 4$). Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9), während gleichzeitig Blut- und Urinproben gesammelt wurden. In diesen Proben wurde die Kaliumkonzentration (s. 2.14) bestimmt und der o.g. Parameter berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

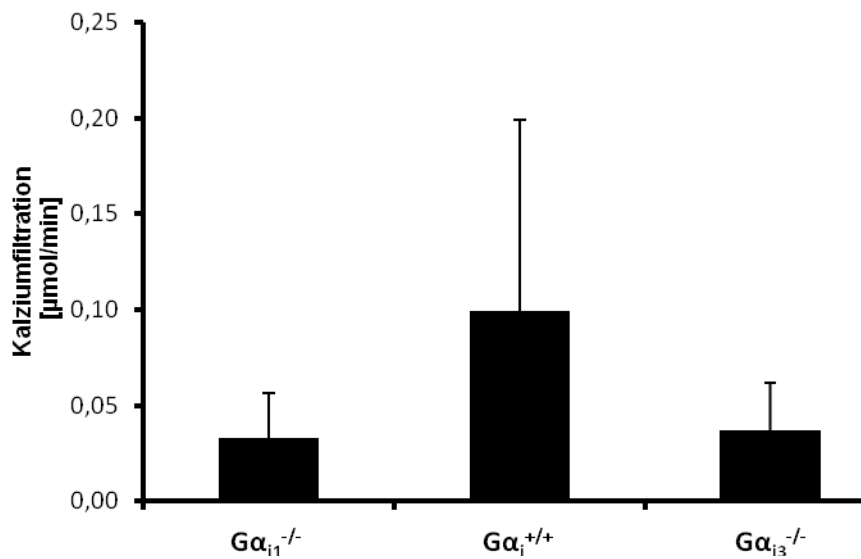


Abb. 41: Kalziumfiltration nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ (n = 6), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 5) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse (n = 4). Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9), während gleichzeitig Blut- und Urinproben gesammelt wurden. In diesen Proben wurde die Kalziumkonzentration (s. 2.15.2) bestimmt und der o.g. Parameter berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

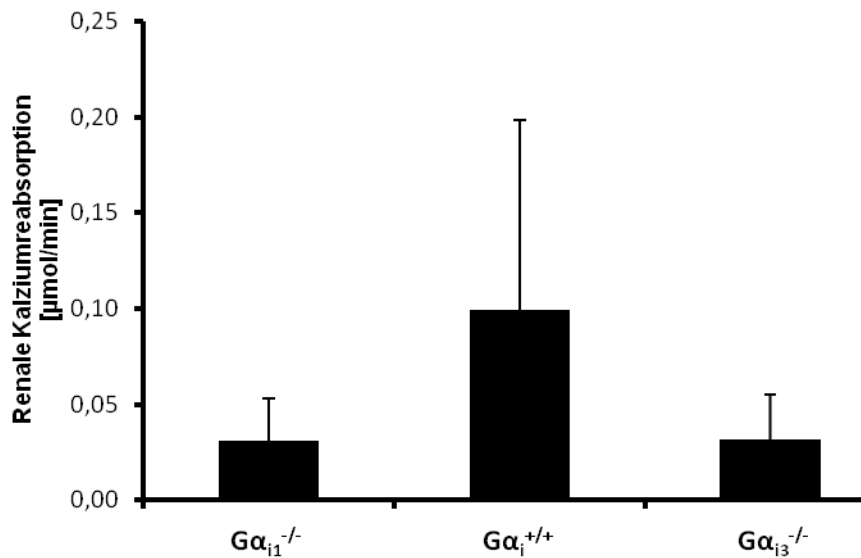


Abb. 42: Renale Kalziumreabsorption nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ (n = 6), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ (n = 5) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse (n = 4). Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9), während gleichzeitig Blut- und Urinproben gesammelt wurden. In diesen Proben wurde die Kalziumkonzentration (s. 2.15.2) bestimmt und der o.g. Parameter berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

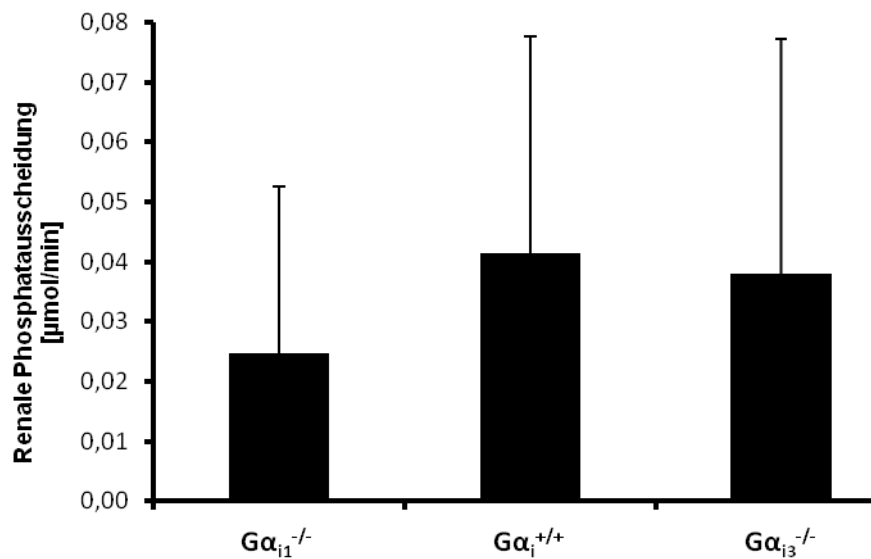


Abb. 43: Renale Phosphatausscheidung nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_1^{+/+}$ (n = 6), $G\alpha_{11}^{-/-}$ (n = 4) und $G\alpha_{13}^{-/-}$ Mäuse (n = 4). Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9), während gleichzeitig Urinproben gesammelt wurden. In diesen Proben wurde die Phosphatkonzentration (s. 2.15.3) bestimmt und der o.g. Parameter berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

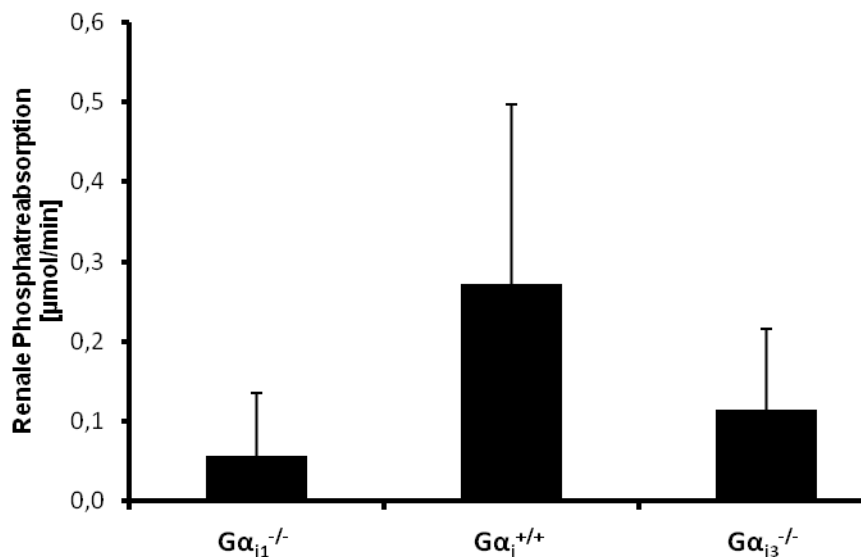


Abb. 44: Renale Phosphatreabsorption nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_1^{+/+}$ (n = 5), $G\alpha_{11}^{-/-}$ (n = 4) und $G\alpha_{13}^{-/-}$ Mäuse (n = 4). Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9), während gleichzeitig Blut- und Urinproben gesammelt wurden. In diesen Proben wurde die Phosphatkonzentration (s. 2.15.3) bestimmt und der o.g. Parameter berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

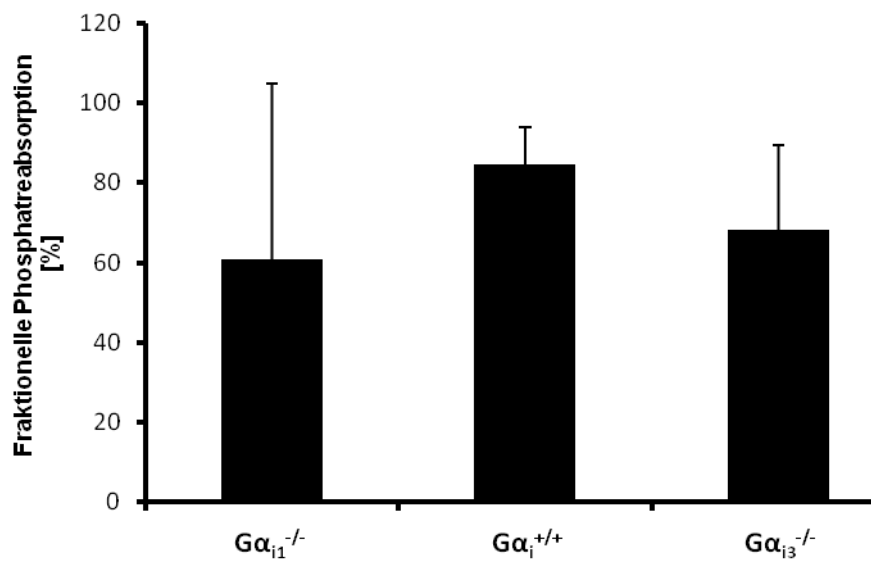


Abb. 45: Fraktionelle Phosphatreabsorption nach der STZ-Behandlung der männlichen $G\alpha_i^{+/+}$ ($n = 5$), $G\alpha_{i1}^{-/-}$ ($n = 4$) und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse ($n = 4$). Den Mäusen wurde zweimal in einem fünftägigen Abstand eine frisch vorbereitete STZ-Lösung mit 125 mg STZ/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 100 - 115 Tagen erfolgte eine mikrochirurgische Präparation (s. 2.9), während gleichzeitig Blut- und Urinproben gesammelt wurden. In diesen Proben wurde die Phosphatkonzentration (s. 2.15.3) bestimmt und der o.g. Parameter berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

9 Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei allen folgenden Personen bedanken:

An allererster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg für die umfassende Betreuung während der gesamten Promotion und für die wissenschaftliche Einstellung. Auf meinem beruflichen Weg bin ich Ihnen für so viel verbunden, wie keinem anderen.

Frau Prof. Annette Schürmann-Bartsch danke ich für die Möglichkeit im Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke zu forschen, sowie für ihre engagierte Unterstützung.

Bei Frau PD Dr. Sandra Beer-Hammer möchte ich mich für die mir stets entgegengebrachte wissenschaftliche Hilfe, engagierte aufmunternde Mitbetreuung, aber vor allem für die geduldigen Korrekturen bedanken.

Frau Dr. Danyang Huang danke ich für die Möglichkeit in ihrem Labor und unter ihrer Leitung überwiegend die Versuche durchführen zu dürfen.

Frau Dr. Vasudha Denavathan gilt mein Dank für die Einführung in die proteinanalytischen Methoden und für die hervorragende Unterstützung im Laborbereich.

Frau Dr. Anna Rusaczonok und Frau Michaela Rath danke ich für die besondere Hilfe während der Versuche im Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke.

Frau Dr. Ana Novakovic danke ich für die Zucht und Bereitstellung der Tiere und die Einweisung in die Tierversuche.

Frau Dr. Veronika Leiss bin ich dankbar für die Korrekturen und konstruktive Kritik.

Frau Prof. Dr. Doris Kloor danke ich ebenfalls für die konstruktive Kritik.

Frau Renate Riehle danke ich für die freundliche Hilfsbereitschaft im Laborbereich.

Bei allen Mitarbeitern des Pharmakologischen Instituts der Universität Tübingen und des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke bedanke ich mich für das nette Arbeitsklima und die freundliche Zusammenarbeit.

Meiner guten Freundin und Kollegin Dr. Jolanta Marzec danke ich für die wertvollen Ratschläge und moralische Unterstützung.

10 Lebenslauf

Name: Agnieszka Maria Ryba

Geburtsdatum: 29.03.1985

Geburtsort: Duszniki-Zdrój (Bad Reinerz, Polen)

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: polnisch

Beruflicher Werdegang:

Seit 01/2012 Assistenzärztin in der Weiterbildung im Gebiet Innere Medizin mit Schwerpunkt Pneumologie, Klinik Schillerhöhe, Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart-Gerlingen

11/2011 - 04/2012 Akademische Mitarbeiterin, Abteilung für Pharmakologie und Experimentelle Therapie, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

Universitärer Werdegang:

11/2011 Approbation als Ärztin

02/2011 Staatsexamen

10/2010 - 10/2011 Ärztin im Praktikum, 4. Klinisches Militärkrankenhaus, Wrocław (Breslau, Polen)

10/2008 - 09/2009 Erasmusaustausch, Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

10/2004 - 06/2010 Studium der Humanmedizin, Ärztliche Fakultät der Medizinischen Universität der Schlesischen Piasten zu Wrocław (Breslau, Polen)

Schulausbildung:

09/2000-06/2004 I Bolesław Chrobry-Lyzeum, Kłodzko (Glatz, Polen)

09/1992-06/2000 Grundschule, Kłodzko (Glatz, Polen)

Stipendien:

2008/2009 Stipendium des Bürgermeisters der Stadt Wrocław (Breslau, Polen)

2005/2006 -2009/2010 Stipendium der Medizinischen Universität der Schlesischen Piasten zu Wrocław (Breslau, Polen)

2003/2004 Stipendium des Ministerpräsidenten der Republik Polen

2001/2002 -2003/2004 Stipendium vom Landrat des Kreises Kłodzko (Glatz, Polen)