

1 Einleitung

1.1 Struktur und Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Die Signaltransduktion von extrazellulären Reizen über die Plasmamembran in das Innere der Zellen ist ein wesentlicher Aspekt der zellulären Regulation. Grundsätzlich lassen sich vier verschiedene Signaltransduktionsmodelle beschreiben: 1) Membranrezeptoren, die als Ionenkanäle fungieren, 2) Enzyme, die als Membranrezeptoren wirken, 3) intrazelluläre Rezeptoren, die lipophile Liganden erkennen, die über die Plasmamembran diffundieren sowie 4) G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Mit mehr als 1000 Mitgliedern repräsentiert die Familie der GPCRs, die Signale durch Aktivierung heterotrimerer GTP-bindender Protein (G-Proteine) in die Zelle weiterleitet, die größte Gruppe der Oberflächenrezeptoren im menschlichem Genom (>1% aller Gene) (Gutkind, 2000). Diese G-Protein gekoppelten Rezeptoren mediieren die Weiterleitung biologischer Signale vieler verschiedener Stimuli, einschließlich Wachstumsfaktoren, vasoaktiven Polypeptiden, chemotaktischen Substanzen, Neurotransmittern, Hormonen, Phospholipiden, Photonen, Odorantien sowie Geschmacksstoffen und dienen als Zielstruktur für ungefähr 50% der auf dem Markt erhältlichen Medikamente (Leurs et al., 1998). Basierend auf strukturellen Ähnlichkeiten lassen sich die GPCRs im Säuger in drei Subfamilien einteilen: Gruppe A (Rhodopsin-ähnlich), Gruppe B (Sekretin-Rezeptor-ähnlich) und Gruppe C (Metabotroper-Glutamat-Rezeptor-ähnlich). Alle diese Rezeptoren werden auch als heptahelikale Rezeptoren bezeichnet, da sie ein konserviertes Strukturmotiv aus sieben α -helikalen, die Membran durchspannenden Regionen, besitzen (Kobilka et al., 1984; Dohlman et al., 1987). Die Transmembrandomänen sind durch jeweils drei alternierende, intrazelluläre und extrazelluläre Peptidschleifen verbunden, wobei sich bei allen GPCRs der N-Terminus auf der extrazellulären Seite und der C-Terminus auf der intrazellulären Seite befindet. Während die transmembranären Domänen eine hohe Sequenzähnlichkeit zeigen, variieren die extra- und intrazellulären Schleifen sowie N- und C-Termini stark in Länge und Aminosäuresequenz. Diese Differenz in der Aminosäuresequenz der verschiedenen GPCRs erklärt die Ligandenspezifität und ermöglicht die spezifische G-Protein Kopplung an die einzelnen Rezeptoren (Strader et al., 1994). Die Aktivierung dieser Rezeptoren resultiert in einer grundlegenden Änderung der transmembranären α -Helices, führt zu einer Konformationsänderung der intrazellulären Schleifen und führt schließlich zur Signalweiterleitung, indem die Interaktion mit G-Proteinen ermöglicht wird (Bourne et al., 1997; Wess, 1997; Altenbach et al., 1996). Die GPCR-G-Protein Interaktion wiederum beeinflusst die Aktivität verschiedener Effektormoleküle, wodurch „second Messenger“ Konzentrationen verändert werden oder das Membranpotential beeinflusst und letztlich eine zelluläre Antwort ausgelöst wird.

1.2 Heterotrimere G-Proteine

Die zu der Superfamilie der GTPasen zählenden G-Proteine sind phylogenetisch konserviert und für die unterschiedlichsten zellregulatorischen Prozesse verantwortlich (Gilman, 1995). Die Familie der Rezeptor-gekoppelten G-Proteine zeigt eine einheitliche heterotrimere Zusammensetzung, wobei aber jede der drei Polypeptid-Komponenten strukturelle und funktionelle Eigenheiten aufweist (Hepler et al., 1992; Simon et al., 1991). Heterotrimere G-Proteine bestehen aus einer α - sowie der β - und γ -Untereinheit. Die $\beta\gamma$ -Untereinheit wird als funktionelle Einheit angesehen, da sie unter *in vivo* Bedingungen einen undissoziierbaren Komplex darstellt. Das heterotrimere G-Protein durchläuft bei der Signalübertragung vom aktivierten Rezeptor zum Effektor einen Aktivierungs-Inaktivierungszyklus und fungiert somit als regulierbarer molekularer Schalter (Abbildung 1). Durch Agonisten aktivierte Rezeptoren assoziieren mit heterotrimeren G-Proteinen und führen zur Freisetzung von an die α -Untereinheit gebundenem GDP. Die GDP-Freisetzung erlaubt die Bindung von GTP und damit eine Konformationsänderung der α -Untereinheit. Dies führt zur Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins, was in der Dissoziation des Heterotrimers in die α -Untereinheit sowie das $\beta\gamma$ -Dimer resultiert. Die GTP-gebundene α -Untereinheit, sowie der $\beta\gamma$ -Komplex sind nun in der Lage, unabhängig voneinander synergistisch oder antagonistisch mit Effektorproteinen zu interagieren, um so zelluläre Effekte hervorzurufen (Neer et al., 1998). Eine intrinsische GTPase Aktivität der α -Untereinheit determiniert die Lebenszeit dieses aktiven (dissoziierten) Zustands des G-Proteins. Das aus der Hydrolyse von GTP entstehende GDP bleibt an die α -Untereinheit gebunden, die nun mit dem $\beta\gamma$ -Komplex reassoziert. Diese Reassoziaton stellt den entscheidenden Inaktivierungsschritt dar (Bourne et al., 1989). Die Geschwindigkeit der GTP-Hydrolyse hängt nicht ausschließlich von der GTPase-Aktivität der α -Untereinheit ab, sondern kann auch durch verschiedene Effektoren beschleunigt werden. Dies konnte u. a. für die retinale cGMP-Phosphodiesterase als Effektor des Transducins und die Phospholipase C- β 1 als Effektor von $G\alpha_{q/11}$ nachgewiesen werden (Arshavsky et al., 1992; Berstein et al., 1992). Sowohl die GTPase Aktivität der α -Untereinheit als auch die Assoziation mit $\beta\gamma$ -Dimeren wird durch akzessorische Proteine, die „regulators of G protein signaling“ (RGS), negativ reguliert.

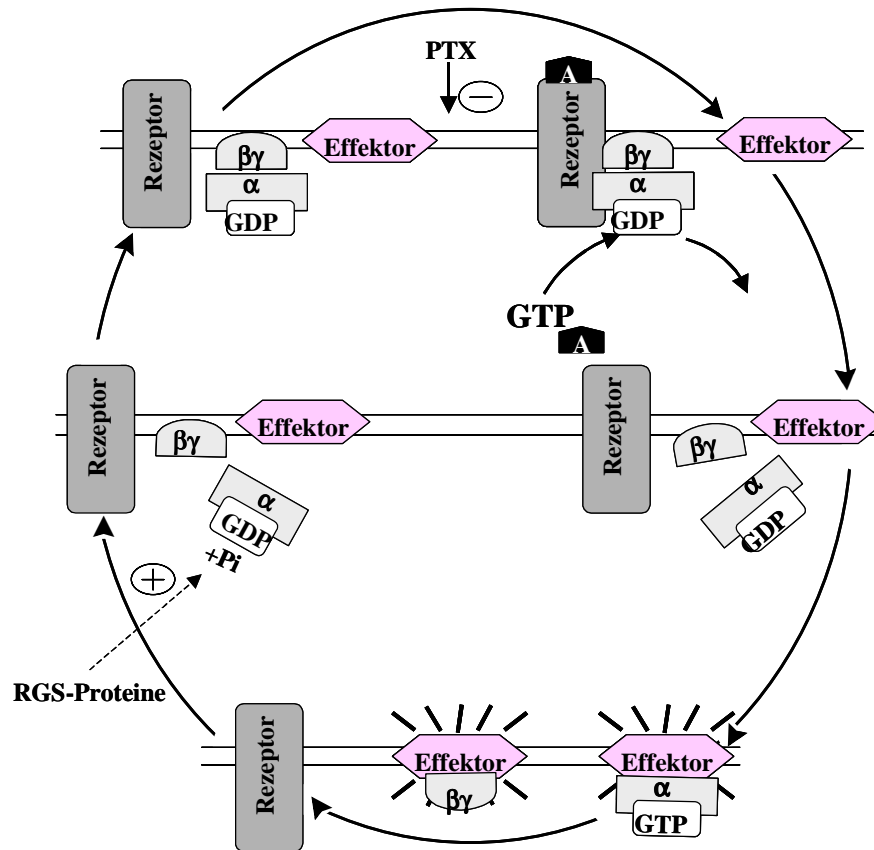


Abbildung 1: G-Protein Funktionszyklus. α: G-Protein α-Untereinheit; βγ: G-Protein βγ-Komplex; A: Agonist; GDP: Guaninnukleotiddiphosphat; GTP: Guaninnukleotidtriphosphat; PTX: Pertussis-Toxin; RGS: „regulators of G-protein signalling“.

Durch die Bindung der RGS Proteine an die α-Untereinheit wird die GTP-Hydrolyse beschleunigt (Berghuis et al., 1996; Berman et al., 1998; Berman et al., 1996; De Vries et al., 1996; Bluml et al., 1997). RGS-Proteine spielen demnach eine wichtige Rolle bei der dynamischen Regulation der Sensitivität der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion. Die meisten der bisher identifizierten RGS-Proteine scheinen spezifisch für Mitglieder der G_i und G_q Familie zu sein. Allerdings konnte kürzlich für die RGS-Homologie Domäne verschiedener Rho-spezifischer Guaninnukleotidaustauschfaktoren (Rho-GEFs) eine GAP-Aktivität für $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ nachgewiesen werden (Fukuhara et al., 2000, Hart et al., 1998; Kozasa et al., 1998; Mao et al., 1998).

1.3 Die heterotrimeren G-Protein Untereinheiten

Im Säugersystem umfasst die Familie der G-Proteine 23 α -, 7 β - und 12 γ - Untereinheiten. Da die Klassifizierung der G-Proteine auf der Heterogenität der α -Untereinheiten basiert, haben funktionelle Analysen und Sequenzanalysen an den G-Protein α -Untereinheiten zu einer Einteilung in die folgenden vier Gruppen geführt: G α_i , G α_s , G α_q und G α_{12} . Diese G-Protein α -Untereinheiten variieren zum Teil stark in ihrem Expressionsmuster sowie den Signaltransduktionswegen die durch sie reguliert werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: G-Protein α -Untereinheiten des Säugerorganismus

Subtyp	Expression	Effektoren
Gα_s-Familie		
G α_{sL} (2Varianten) ^a	ubiquitär	AC \uparrow
G α_{sS} (2Varianten) ^a	ubiquitär	AC \uparrow
G α_{olf}	olfaktorisches Epithel, Gehirn	AC \uparrow
Gα_i-Familie		
G α_{gust}	Geschmacks-Zellen	? (cGMP-PDE \uparrow)
G α_{t-r}	Stäbchen, Geschmacks-Zellen	cGMP-PDE \uparrow
G α_{t-c}	Zapfen (Retina)	cGMP-PDE \uparrow
G α_{i1}	weit verbreitet (neuronal)	AC (Typ I,V,VI) \downarrow
G α_{i2}	ubiquitär	AC (Typ I,V,VI) \downarrow
G α_{i3}	weit verbreitet (extraneuronal)	AC (Typ I,V,VI) \downarrow
G α_{o1a}	neuronale, neuroendokrine Zellen	VDCC (L-/N-Typ) \downarrow
G α_{o2a}	neuronale, neuroendokrine Zellen	VDCC (L-/N-Typ) \downarrow
G α_z	neuronale Zellen, Thrombozyten	? (AC \downarrow)
Gα_q-Familie		
G α_q	ubiquitär	PLC- β \uparrow
G α_{11}	ubiquitär (außer Thrombozyten)	PLC- β \uparrow
G α_{14}	stromale, epitheliale Zellen	PLC- β \uparrow
G $\alpha_{15/16b}$	hämatopoetische Zellen	PLC- β \uparrow
Gα_{12}-Familie		
G α_{12}	ubiquitär	RhoGEFs \uparrow
G α_{13}	ubiquitär	RhoGEFs \uparrow

^aSpleißvarianten desselben Gens

^bG α_{16} ist das humane Ortholog des aus der Maus stammenden G α_{15}

Abkürzungen: AC, Adenylylcyclase; GEF, Guaninnukleotid austauschfaktor; PDE, Phosphodiesterase; PLC, Phospholipase C; VDCC, spannungsabhängiger Kalziumkanal; \uparrow : Stimulation; \downarrow : Hemmung

Der $\beta\gamma$ -Komplex galt lange Zeit als ein eher passiver Partner der G-Protein α -Untereinheit. Durch verschiedene Untersuchungen konnte allerdings gezeigt werden, dass $\beta\gamma$ -Komplexe, ebenso wie die α -Untereinheiten eine wichtige Rolle bei der Regulation verschiedener Effektoren spielen (Birnbaumer, 1992; Sternweis, 1994; Clapham und Neer, 1997). G $\beta\gamma$ -Untereinheiten sind über eine „coiled coil“ Domäne miteinander assoziiert (Wall et al., 1995; Sondek et al., 1996; Lambright et al., 1996). Abgesehen von der vor allem im zentralen Nervensystem exprimierten β_5 -Untereinheit, zeigen die bisher bekannten β -Untereinheiten eine hohe Sequenzhomologie zueinander (79-90%), während G-Protein γ -Untereinheiten weitaus heterogener sind und für die funktionellen Unterschiede zwischen den verschiedenen $\beta\gamma$ -Komplexen verantwortlich gemacht werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheiten des Säugerorganismus

Subtyp ^a	Expression	Effektoren
β_1	weit verbreitet/ Retina (Stäbchen)	AC (Typ I, V, VII) ↓
β_2	weit verbreitet	AC (Typ II, IV) ↑
β_3	weit verbreitet	PLC- β ($\beta_3 > \beta_2 > \beta_1$) ↑
β_{3s}	?	Phospholipase A2 ↑
β_4	weit verbreitet	VDCC ↓
β_5	hauptsächlich im Gehirn	Einwärts gleichrichtender Kaliumkanal (GIRK) ↑
β_{5L}	Retina	Rezeptorkinasen (GRK) ↑
γ_1	Retina (Stäbchen)	PI3K β , PI3K γ ↑
γ_2	hauptsächlich im Gehirn	
γ_3	hauptsächlich im Gehirn	
γ_4	weit verbreitet	
γ_5	weit verbreitet	
γ_7	weit verbreitet	
γ_8	Retina (Zapfen)	
γ_9	olfaktorisches Epithel	
γ_{10}	weit verbreitet	
γ_{11}	weit verbreitet, nicht im Gehirn	
γ_{12}	weit verbreitet	
γ_{13}	Geschmacksknospen	

^aG γ_6 wurde in der Nomenklatur übersprungen; ^bdie Regulation erfolgt durch $\beta\gamma$ -Heterodimere

Abkürzungen: ↑, Stimulation; ↓, Hemmung; AC, Adenylylcyclase; GRK, G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase; PLC, Phospholipase C; PI3K, Phosphatidylinositol-3-Kinase; VDCC, spannungsabhängiger Kalziumkanal

Viele Studien sind der Frage nachgegangen, ob ebenfalls funktionelle Unterschiede zwischen verschiedenen $\beta\gamma$ -Kombinationen bezüglich ihrer Rezeptorregulation bestehen, wobei mit Ausnahme der nur in Photorezeptorzellen der Retina exprimierten $\beta_1\gamma_1$ -Komplexe in Rekonstitutionsexperimenten kein Unterschied zwischen verschiedenen $\beta\gamma$ -Kombinationen nachgewiesen werden konnte (Ueda et al., 1994; Wickman et al., 1994).

1.4 Die G_q -Familie

Die G_q -Familie besteht aus 5 Mitgliedern, deren α -Untereinheiten ein unterschiedliches Expressionsmuster aufweisen. $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ werden nahezu ubiquitär exprimiert und sind primär für die Pertussis-Toxin-insensitive Kopplung von Rezeptoren an Phospholipase C β -Isoformen verantwortlich (Taylor et al., 1991; Wu et al., 1992, 1993a, 1993b). Die Expression der G-Protein α -Untereinheit $G\alpha_{14}$ ist beschränkt auf wenige Organe wie Hoden, Niere, Milz und Lunge (Wilkie et al., 1991), während die humane G-Protein α -Untereinheit $G\alpha_{16}$ sowie ihr murines Pendant $G\alpha_{15}$ nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden (Wilkie et al., 1991; Amatruda et al., 1991; Mapara et al., 1995). Nach den bisherigen Untersuchungen scheinen zwischen den einzelnen Mitgliedern der $G\alpha_q$ -Familie hinsichtlich ihrer Fähigkeit, verschiedene Isoformen der Phospholipase C β zu regulieren, keine gravierenden Unterschiede zu bestehen. Während alle $G\alpha_q$ -Familienmitglieder die β_1 -, β_3 - und β_4 -Isoformen der Phospholipase C in vergleichbarer Weise aktivieren, sind im Gegensatz dazu alle Formen schlechte Regulatoren der β_2 -Isoform der Phospholipase C (Blank et al., 1991; Wu et al., 1992; Hepler et al., 1993; Jiang et al., 1994; Lee et al., 1994). Desgleichen scheinen Rezeptoren nicht zwischen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ zu unterscheiden. Allerdings konnte kürzlich anhand von $G\alpha_q$ bzw. $G\alpha_{11}$ -einzeldefizienten Zelllinien gezeigt werden, dass die Stimulation der Phospholipase C nach Gabe von Pasteurella Multocida Toxin (PMT) ausschließlich über die $G\alpha_q$ - und nicht über die nahe verwandte $G\alpha_{11}$ -Untereinheit der G_q -Familie mediiert wird (Zywietz et al., 2001). Auf funktionelle Unterschiede zwischen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ deuten auch Studien an Mauslinien hin, die inaktivierende Mutationen der jeweiligen Gene tragen. Während $G\alpha_{11}$ -defiziente Mäuse phänotypisch unauffällig sind, zeigen $G\alpha_q$ -defiziente Mäuse eine zerebelläre Ataxie mit klaren Anzeichen motorischer Koordinationsstörungen sowie Störungen in der primären Hämostase. (Offermanns et al., 1997). Mäuse, die lediglich ein intaktes Allel des $G\alpha_q$ -Gens (*Gnaq*) oder des $G\alpha_{11}$ -Gens (*Gna11*) tragen, sterben kurz nach der Geburt infolge kardialer und kraniofazialer Fehlbildungen, während $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -doppeldefiziente Embryonen aufgrund einer myokardialen Hypoplasie schon *in utero* sterben (Offermanns et al., 1998). Neuere Untersuchungen an herzspezifisch $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -doppeldefizienten Mäusen zeigen, dass der $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ mediierte Signaltransduktionsweg eine wesentliche Rolle bei der Entstehung einer myokardialen Hypertrophie im Mauserzen spielt (Wettschureck et al., persönliche Mitteilung).

Die meisten der physiologischen Aktivatoren von Thrombozyten, wie Thrombin, Thromboxan- A_2 , Collagen oder ADP agieren über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die wiederum zur Aktivierung der heterotrimeren G-Proteine G_i , G_q , G_{12} und G_{13} führen

(Shenker et al., 1991; Offermanns et al., 1994). Während die meisten Zellen im Organismus sowohl $G\alpha_q$ als auch $G\alpha_{11}$ exprimieren, enthalten Thrombozyten ausschließlich $G\alpha_q$ (Johnson et al., 1996). Der Hauptsignaltransduktionsweg, der zur vollständigen Thrombozytenaktivierung führt, involviert β -Isoformen der Phospholipase C, die über G-Protein α -Untereinheiten aktiviert werden (Tabelle 1). Studien an $G\alpha_q$ -defizienten Mäusen haben gezeigt, dass in diesen Thrombozyten nach Gabe von Thromboxan A_2 , Thrombin, ADP sowie geringen Collagen Konzentrationen keine Aggregation mehr erfolgt (Offermanns et al., 1997b). Entsprechend konnte in $G\alpha_q$ -defizienten Thrombozyten kein Anstieg der Inositol-1,4,5-trisphosphat Konzentration sowie des intrazellulären Kalziums nachgewiesen werden. $G\beta\gamma$ -Dimere sind offensichtlich nicht in der Lage, das Fehlen von $G\alpha_q$ bezüglich der Thrombozytenaktivierung zu kompensieren. Trotz der fehlenden Phospholipase C-Aktivierung konnte nach Gabe verschiedener Agonisten die typische Formveränderung aktivierter Thrombozyten, der „shape-change“, gemessen werden, was die Vermutung nahelegt, dass andere G-Proteine als $G\alpha_q$ für die Induktion des „shape-change“ in Thrombozyten verantwortlich sind. Untersuchungen an $G\alpha_q$ -defizienten Thrombozyten deuten daraufhin, dass die G-Proteine $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$, nicht aber $G\alpha_i$ an der Auslösung des „shape-change“ beteiligt sind. Der $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -medierte „shape-change“ involviert vermutlich einen Rho/Rhokinase-abhängigen Signalweg, der zur Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins führt (Klages et al., 1999).

1.5 Die G_{12} -Familie

Die G-Proteine $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ werden ubiquitär exprimiert und konstituieren zusammen die G_{12} -Familie. Sie besitzen 67% Sequenzidentität und sind weniger als 45% homolog zu anderen G-Protein α -Untereinheiten (Strathmann und Simon, 1991). Sie unterscheiden sich von den meisten anderen bekannten G-Proteinen hinsichtlich der biochemischen Eigenschaften ihrer $G\alpha$ -Untereinheiten. So konnte z.B. gezeigt werden, dass in Membranfraktionen die Rate des Rezeptor- katalysierten Guaninnukleotid-Austausches an $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ sehr viel langsamer erfolgt, als an den meisten anderen G-Protein α -Untereinheiten (Offermanns et al., 1994). Auch Untersuchungen an gereinigtem $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ zeigten eine sehr langsame Rate der GDP-Dissoziation bzw. der GTP-Assoziation (Singer et al., 1994). Sowohl gereinigtes $G\alpha_{12}$ als auch zelluläres $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ können in einer Proteinkinase C-abhängigen Weise phosphoryliert werden (Kozasa et al., 1996; Offermanns et al., 1996). Die funktionelle Bedeutung dieser Phosphorylierung ist zur Zeit jedoch noch nicht geklärt.

Für eine Reihe von Rezeptoren konnte in den letzten Jahren eine Kopplung an G-Proteine der G_{12} -Familie nachgewiesen werden. So führt die Aktivierung des Thromboxan- A_2 - und des Thrombin-Rezeptors sowie des Rezeptors für Thyreotropes Hormon (TSH) in Schilddrüsenzellen zur Stimulation von $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ (Allgeier et al., 1994; Offermanns et al., 1994; Laugwitz et al., 1996).

Mikroinjektionsexperimente haben gezeigt, dass die DNA-Synthese in 1321N1 Zellen nach Aktivierung des Thrombin-Rezeptors über $G\alpha_{12}$ reguliert wird (Aragay et al., 1995). Ebenso wie Thrombin-Rezeptoren sind auch einige LPA-Rezeptoren in der Lage $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ zu aktivieren. Entsprechende Untersuchungen haben gezeigt, dass nach Aktivierung der o.g. G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sowie nach Aktivierung von $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ über verschiedenen Signaltransduktionswege, die kleinen GTPase Rho aktiviert wird (Gohla et al., 1998; Mao et al., 1998a). Rho scheint involviert in die Ausführung verschiedener zellulärer Funktionen, wie die Regulation von zytoskelettären Veränderungen, Veränderungen in der Zellform und Gen-Expression (Hall, 1998; Kaibuchi et al., 1999). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass Rho ebenfalls in intrazelluläre, membranäre Prozesse, wie Exocytose (Komuro et al., 1996; Norman et al., 1996; Kowluru et al., 1997), endocytotische Vorgänge (Schmalzing et al., 1995; Lamaze et al., 1996) und phagozytotische Prozesse involviert ist (Hackam et al., 1997; Caron and Hall, 1998). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Ca^{2+} -abhängige Exocytose über einen Rho/Rho-assozierten Kinase-abhängigen Signaltransduktionsweg mediiert und durch die Aktivierung von $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ inhibiert wird (Yamaguchi et al., 2000).

Für verschiedene vasokonstriktorische Rezeptoren wurde in vaskulären glatten Muskelzellen neben einer Kopplung an die heterotrimeren G-Proteine der G_q -Familie, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ ebenfalls eine eindeutige Kopplung an die G-Protein Untereinheiten der G_{12} -Familie gezeigt, die über einen Rho/Rhokinase-abhängigen Signaltransduktionsmechanismus zur Induktion der Zellkontraktion führt. Durch diese Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die Kontraktion glatter Muskelzellen nicht ausschließlich über einen G_q/G_{11} -medierten Signalweg, der in der Aktivierung der MLCK resultiert, sondern gleichermaßen über eine $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ mediierte Signaltransduktionskaskade, die zu einer Rho/Rhokinase-abhängigen Inhibition der Myosinphosphatase führt, erfolgt (Gohla et al., 2000). Dass $G\alpha_{13}$ in die Induktion eines hypertrophen Phänotyps involviert ist, zeigen Expressionsstudien mit daueraktivem $G\alpha_{13}$. Durch Überexpression von $G\alpha_{13}$ wird in Kardiomyozyten eine hypertrophe Antwort ausgelöst und die entsprechenden transkriptionalen Effekte werden über einen Rho-abhängigen Mechanismus gesteuert (Finn et al., 1999).

Untersuchungen mit konstitutiv aktiven Mutanten beider G-Protein α -Untereinheiten haben Hinweise darauf ergeben, dass G_{12} und G_{13} an der Regulation verschiedenster Effektoren und Signaltransduktionswege beteiligt sind. Dazu gehören der Na^+/H^+ -Austauscher (Voyno-Yasenetskaya et al., 1994; Dhanasekaran et al., 1994; Hooley et al., 1996), die Aktivierung der Phospholipase D (Plonk et al., 1998; Rumenapp et al., 2001), der Jun-Kinase/Streß-aktivierte Proteinkinase-Weg (Prasad et al., 1995; Voyno-Yasenetskaya et al., 1996; Jho et al., 1997), die Aktivierung von (ERKs) extrazellulären signalregulierten Kinasen (Fukuhara et al., 2000), die Rho-abhängige Ausbildung von Aktin-Streßfasern (Buhl et al., 1995; Gohla et al., 1998; Sah et al., 2000) sowie die SRE-mediierte Gentranskription (Fromm et al., 1997; Mao et al., 1998; Shi et al., 2000). Untersuchungen zur Identifizierung von Effektormolekülen von $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ haben gezeigt, dass die Mitglieder der G_{12} -Familie mit den zytoplasmatischen Domänen verschiedener Mitglieder der Cadherin Familie spezifisch interagieren. Die Bindung von $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ führt zur Dissoziation des

Transkriptionsaktivators β -Catenin von den Cadherinen und damit zur Auslösung zellulärer Antworten. In adenomatösen Polyposis Coli (APC)-defizienten Zellen, in denen keine Degradation des β -Catenins mehr stattfindet, kommt es nach Expression von konstitutiv aktiven $G\alpha_{12}$ - und $G\alpha_{13}$ -Mutanten zu einer Steigerung der β -Catenin mediierten transkriptionalen Aktivität. Diese Befunde bestätigen die Fähigkeit der G_{12} -Familie zur Zelltransformation und stellen eine Verbindung zwischen den heterotrimeren G-Proteinen $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ sowie den zellulären Prozessen, die Wachstums- und Differenzierungsprozesse kontrollieren, her (Meigs et al., 2001).

Während zwar eindeutige Gemeinsamkeiten in den durch konstitutiv aktive Mutanten von $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ induzierten Effekten bestehen, sind dennoch deutliche Unterschiede in den jeweils involvierten Signaltransduktionsmechanismen gefunden worden. Beispielsweise wird der Amilorid-sensitive Na^+/H^+ -Protonen-Austauscher durch $G\alpha_{12}$ über einen PKC-abhängigen Mechanismus aktiviert, wohingegen die $G\alpha_{13}$ vermittelte Aktivierung ohne Beteiligung der PKC verläuft (Dhanasekaran et al., 1994). Weiterhin wurde beschrieben, dass $G\alpha_{12}$ die Isoformen des Na^+/H^+ -Austauschers unterschiedlich reguliert: Während NHE-2 und NHE-3-Isoformen durch konstitutiv aktives $G\alpha_{12}$ stimuliert werden, wird NHE-1 durch $G\alpha_{12}$ inhibiert. Im Gegensatz dazu werden sämtliche Isoformen des Na^+/H^+ -Austauschers durch $G\alpha_{13}$ stimuliert (Lin et al., 1996). Cotransfektionsexperimente mit PLC ϵ und $G\alpha_{12}$ sowie $G\alpha_{13}$ in TSA201-Zellen haben gezeigt, dass die $G\alpha_{12}$ -Untereinheit im Gegensatz zu $G\alpha_{13}$ zu einer Regulation der PLC ϵ sowie zur Aktivierung des Mitogen-aktivierten Proteinkinase Signaltransduktionsweges durch die kleine GTPase Ras führt (Lopez et al., 2001; Song et al., 2001). $G\alpha_{12}$ wurde als Onkogen identifiziert (Chan et al., 1993) und kann die zelluläre Transformation von Fibroblasten induzieren (Fromm et al., 1997; Jiang et al., 1993). Kürzlich konnten Effektormoleküle für $G\alpha_{13}$ identifiziert werden, die zur Familie der ERM (Ezrin, Radixin, Moesin)-Proteine gehören. Die Aktivierung von Radixin durch $G\alpha_{13}$ führt zur Zelltransformation und stellt vermutlich einen Parallelprozeß dar, der zur Aktivierung der kleinen GTPase Rho und damit verbundenen zytoskelettären Veränderungen führt. (Vaiskunaite et al., 2000). Die Aktivierung eines onkogenen G-Protein gekoppelten Rezeptors (G2A) führt zur Bindung von G2A an $G\alpha_{13}$ und unter Beteiligung der kleinen GTPase Rho zur Zelltransformation (Zohn et al., 2000). Vermutlich kommt es nach Bindung von G2A zu einer direkten Aktivierung des Rho-spezifischen Guaninnukleotid austauschfaktors Lsc durch $G\alpha_{13}$, der wiederum zu einer direkten Aktivierung der kleinen GTPase Rho führt (Zohn et al., 2000). Verschiedene Arbeiten deuten auf eine Co-Regulation von Lsc und EGF-Rezeptoren, oder anderen Tyrosin Kinasen durch $G\alpha_{13}$ oder aber einen Lsc-unabhängigen Mechanismus der Rho Aktivierung durch $G\alpha_{13}$ hin (Zohn et al., 2000). Einen Hinweis darauf liefert auch die durch $G\alpha_{13}$, nicht aber $G\alpha_{12}$ hervorgerufene, und durch Tyrosin-Kinase Inhibitoren bzw. dominant negative Formen des EGF-Rezeptors blockbare Rho Aktivierung (Gohla et al., 2000). Funktionelle Unterschiede zwischen $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ sind weiterhin aus Studien an $G\alpha_{12}$ -defizienten- (*Gnal2*^{-/-}) und $G\alpha_{13}$ -defizienten- (*Gnal3*^{-/-}) Mäusen abzuleiten. Während an *Gnal2*^{-/-} Null-Mutanten keine offensichtlichen Defekte beobachtet werden konnten, sterben *Gnal3*^{-/-} Embryonen am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung. Zu diesem Zeitpunkt wird sowohl $G\alpha_{12}$ als auch $G\alpha_{13}$ exprimiert. Untersuchungen an *Gnal3*^{-/-} Embryonen haben

gezeigt, dass das Fehlen von $G\alpha_{13}$ zu einer fehlerhaften Organisation des vaskulären Systems, vor allem im Dottersack und im Kopfmesenenchym führt (Offermanns et al., 1997a). Während die Vaskulogenese mit der Blutgefäßbildung aus Vorläuferzellen in Endothelzellen durch eine $G\alpha_{13}$ -Defizienz nicht betroffen war, konnten massive Defekte in der Angiogenese, die die Verzweigung, das Wachstum, Migration und die Weiterentwicklung von bereits existierenden Gefäßsystemen umfasst (Risau, 1997), nachgewiesen werden (Offermanns et al., 1997a). $Gna12^{-/-};Gna13^{-/-}$ Embryonen sterben bereits am Tag 8,5 *in utero* (Müller et al., persönliche Mitteilung). Untersuchungen an aus $Gna13^{-/-}$ Mäusen gewonnenen Fibroblasten, die nach wie vor $G\alpha_{12}$ exprimieren, zeigen eine stark eingeschränkte chemokinetische Reaktion auf Thrombin, was daraufhindeutet, dass $G\alpha_{13}$ für eine vollständige migratorische Antwort notwendig ist (Offermanns et al., 1997a). Interessanterweise sterben $Gna12^{-/-}$ Tiere, die nur ein $Gna13$ -Allel tragen ebenfalls *in utero* (Müller et al., persönliche Mitteilung). Diese genetischen Untersuchungen zeigen, dass $G\alpha_{13}$ und das nahe verwandte $G\alpha_{12}$ zumindest teilweise nicht überlappende zelluläre und biologische Funktionen ausüben.

1.6 Effektoren von G-Proteinen der G_q und G_{12} -Familien

1.6.1 Phospholipase C

Ausgehend von verschiedenen membranären Rezeptormolekülen erfolgt die Initiation der intrazellulären Signaltransduktion mit der Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP_2) durch die Phosphoinositid-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) (Rhee, 1997). Diese Reaktion führt zur Generierung von zwei intrazellulären „second messenger“, Diacylglycerol und Inositol 1,4,5-Triphosphat (Berridge, 1983; Exton, 1996) und damit zur Aktivierung der Proteinkinase C bzw. zur Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern. Erste Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Reduktion der PIP_2 Konzentration zur Modulation der Aktivität verschiedener Aktin-bindender Proteine und Pleckstrin Homologie Domänen enthaltender Proteine führt (Toker, 1998). Weiterhin scheint die PIP_2 Konzentration an der Membran eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellform während der Regulation des Aktin Zytoskelettes zu spielen (Czech, 2000).

Bisher konnten mehr als 10 Mitglieder der humanen PI-PLC Isoformen identifiziert und in vier Gruppen (β , γ , δ , ϵ) klassifiziert werden (Lopez et al., 2001; Song et al., 2001). Alle PI-PLC Isoformen enthalten zwei auf Sequenzebene hoch homologe Regionen, die als X und Y bezeichnet werden und die katalytische Domäne konstituieren (Essen et al., 1996; Essen et al., 1997). Es gibt Hinweise darauf, dass ausschließlich die Phospholipasen β 1-4 sowie die Phospholipase C epsilon durch eine Rezeptor vermittelte Aktivierung der G-Protein Familien G_q und G_i bzw. durch $G\alpha_{12}$, nicht aber durch $G\alpha_{13}$ reguliert werden (Sternweis et al, 1992; Exton, 1996; Lopez et al., 2001). Einige PI-PLC- β -Subtypen können von α -Untereinheiten der Pertussis Toxin insensitiven Mitgliedern der G_q -Familie stimuliert werden, während eine Pertussis Toxin sensitive Stimulation durch $\beta\gamma$ -Untereinheiten erfolgt, die aus aktivierten

Heterotrimeren der $G_{i/o}$ -Familie hervorgehen (Smrcka et al., 1993). Eine Ausnahme innerhalb dieser PLC β Subfamilie bildet die hauptsächlich neuronal exprimierte β -4 Isoform. Diese wird nur durch α -Untereinheiten der G_q -Familie, nicht aber durch $\beta\gamma$ -Komplexe stimuliert (Jiang et al., 1994). Studien an transgenen Tieren haben gezeigt, dass eine Inaktivierung des PI-PLC β 3 Gens in einem embryonal letalem Phänotyp (e2,5) resultiert (Wang et al., 1998). Im Gegensatz zu der PI-PLC- β 3, scheinen die anderen Isoformen keine lebenswichtige Rolle im Organismus zu übernehmen, da die Erzeugung von Null-Mutanten lediglich zu Phänotypen führt, die entsprechend ihrer Expressionsmuster auf eine sehr spezialisierte Funktion im Organismus hinweisen (Kim et al., 1997; Jiang et al., 1997).

1.6.2 Rho-spezifische Guaninnukleotidaustauschfaktoren

Einige Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) einschließlich Lbc, Lfc, Lsc (murines homolog zu p115 Rho-GEF) LARG, p115Rho-GEF und PDZ-Rho GEF zeigen eine eindeutige Spezifität für Rho (Glaven et al., 1996; Hart et al., 1996; Fukuhara et al., 2000). Rho Proteine wechseln als Mitglieder der Ras Superfamilie der GTPasen ebenso wie die heterotrimeren G-Proteine zwischen einer GDP-gebundenen inaktiven und einer GTP-gebundenen aktiven Form. Der GDP/GTP Austausch wird durch GEFs und GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) reguliert.

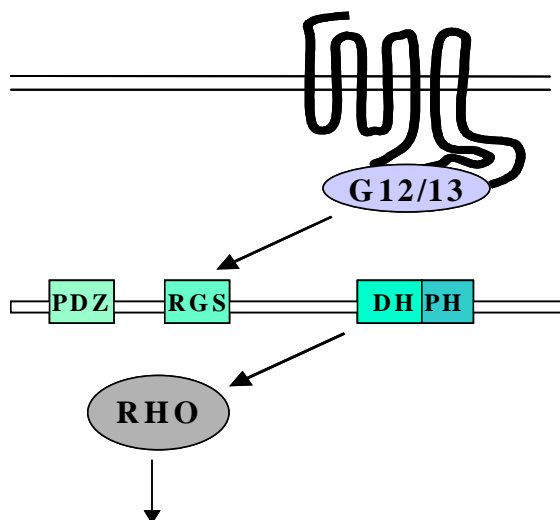


Abbildung 2: Möglicher Mechanismus, über den G-Protein-gekoppelte Rezeptoren einen Rho-abhängigen Signaltransduktionsweg medieren.

Cytoskelettäre Veränderungen
Regulation der Genregulation

Während GEFs den Austausch von GDP zu GTP unterstützen und damit zur Aktivierung der Ras-ähnlichen Proteine führen (Boguski et al., 1993) dienen GAPs als negative Modulatoren, indem sie die geringe intrinsische Rate der GTP Hydrolyse der kleinen GTPasen verstärken (Lamarque et al., 1994). Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass Rho-spezifische GEF's

Signale von der G_{12} -Familie heterotrimerer G-Proteine zu Rho transduzieren können. Die Aktivierung von $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ durch verschiedene Agonisten führt zu einer Interaktion mit LH/RGS Domänen enthaltenden RHO-GEFs wie z.B. Lsc, LARG, PDZ-Rho-GEF und p115Rho-GEF. Dieses wiederum führt zu einer Aktivierung der Guaninnukleotidaustauschfaktoren und dem GDP/GTP Austausch an der kleinen GTPase Rho, über die DH/PH-Domäne der Rho-GEFs, resultierend in der Aktivierung Rho abhängiger Signaltransduktionswege (Fukuhara et al., 2000; Abbildung 2). Das kürzlich identifizierte LARG repräsentiert ein neues Rho-GEF, das physikalisch mit $G\alpha_{12}$ sowie $G\alpha_{13}$ assoziieren kann, zu einer Akkumulation von aktivem Rho führt und somit Rho-abhängige Signaltransduktionsprozesse stimuliert (Fukuhara et al., 2000). Ebenso wie LARG trägt auch das p115 Rho-GEF eine RGS-ähnliche Domäne und fungiert als GTPase-aktivierendes Protein für $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$. Während $G\alpha_{13}$ die Rho austauschaktivität des p115 Rho-GEF's erhöht, übt $G\alpha_{12}$ eine antagonistische Wirkung aus (Hart et al., 1998; Kozasa et al., 1998). Weiterhin konnte zwischen $G\alpha_{13}$ und p115 Rho-GEF eine synergistische Aktivierung der SRE (serum-response-element)-medierten Gentranskription nachgewiesen werden (Mao et al., 1998). Ein weiteres $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ bindendes Protein, das PDZ-RhoGEF (KIAA0380) führt ebenfalls durch $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ zur SRE Aktivierung (Fukuhara et al., 1999).

1.7 Gezielte konditionale Inaktivierung des *Gna13* Gens in der Maus

Um eine konditionale Inaktivierung durchzuführen, die es ermöglicht, dass Zielgen zu einem definierten Zeitpunkt in einem definierten Gewebe zu deletieren, macht man sich das so genannte Cre-*loxP* (Cre: causes recombination) System zunutze (Abbildung 3). Bei dem Cre-*loxP* System handelt es sich um ein im Bakteriophagen P1 natürlich vorkommendes Rekombinationssystem, in dem die Rekombinase Cre 34bp Sequenzen, die als *loxP*-Stellen (locus of crossover (x) in *P1*) bezeichnet werden, erkennt und zwischen diesen eine ortsspezifische Rekombination vermittelt (Sternberg et al., 1981). Eine *loxP*-Stelle besteht aus zwei invertierten 13bp langen repetitiven Sequenzen, die eine nicht palindrome 8bp Sequenz flankieren. Über diese gerichtete 8bp-Sequenz wird die Orientierung der *loxP*-Stelle determiniert (Abbildung 3). Sind auf einem linearen DNA-Molekül zwei *loxP*-Stellen in gleicher Orientierung angeordnet, führt eine Cre-vermittelte intramolekulare Rekombination zur Exzision der zwischen den *loxP*-Stellen liegenden DNA-Sequenz, die als „gefloxt“ Sequenz (flanked by *loxP*-sites) bezeichnet wird (Hoess et al., 1982). Eine *loxP*-Stelle verbleibt dabei auf der linearen DNA-Sequenz, während sich die andere auf dem exzidierten Bereich befindet, der nach der Rekombination als zirkuläres Molekül vorliegt (Abbildung 3). Die reverse Reaktion, eine intramolekulare Reaktion, resultiert in der Integration eines zirkulären *loxP*-tragenden DNA-Moleküls in eine lineare Sequenz, die ebenfalls eine *loxP*-Stelle trägt. Weiterhin lässt sich das Cre-*loxP* System zu einem reziproken Austausch von *loxP*-Stellen tragenden Regionen sowie zur Invertierung von „gefloxt“ Bereichen nutzen (Abremski et al., 1983; Hamilton et al., 1984).

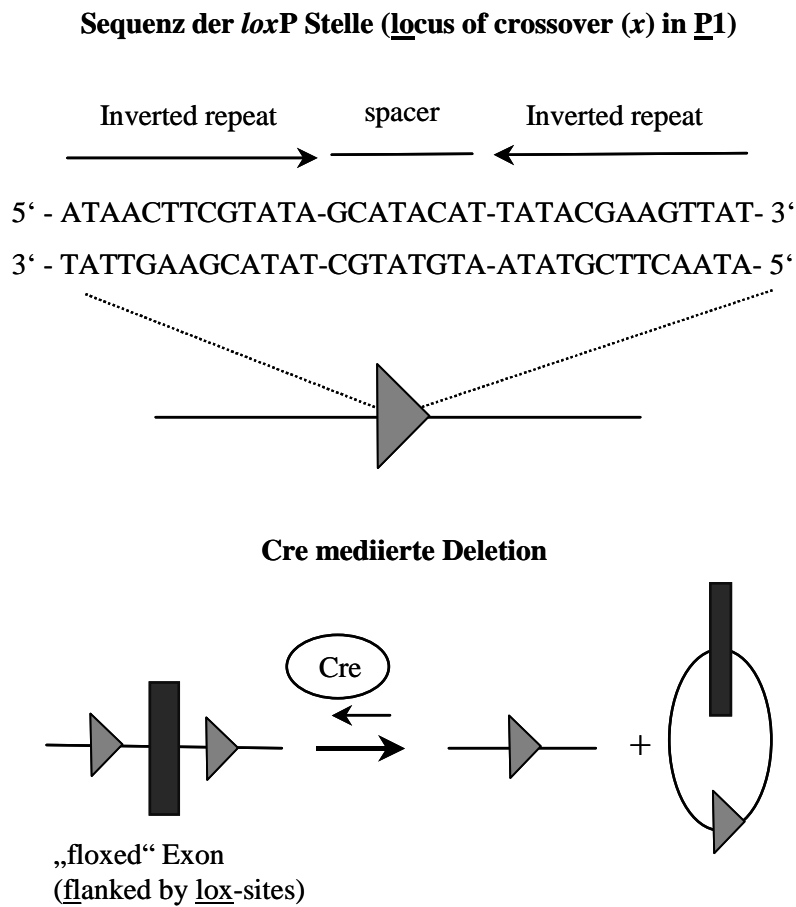


Abbildung 3: Schematische Darstellung der durch die Rekombinase Cre mediierten intramolekularen Reaktion sowie die Nukleotidsequenz der *loxP*-Stellen. Dreiecke kennzeichnen die *loxP*-Stellen, während Rechtecke die Exons darstellen.

Diese Rekombinationsereignisse sind unabhängig von der Herkunft der genomischen DNA und damit auch für eukaryotische Zellen nutzbar (Sauer et al., 1990). Durch eine konditionale Mutagenese kann je nach Wahl des Promotors unter dessen Kontrolle Cre in entsprechenden transgenen Mauslinien exprimiert wird, eine zell- und/oder entwicklungspezifische bzw. induzierbare Veränderung des Zielgens in der Maus durchgeführt werden. Zunächst aber wird ausgehend von der genomischen Sequenz und flankierenden Sequenzen des später zu verändernden Bereiches ein Zielvektor konstruiert. Dieses rekombinante DNA-Konstrukt enthält 5' und 3' von der zu deletierenden Sequenz unveränderte, wildtypische Bereiche, über die im Folgenden eine homologe Integration in das Genom ermöglicht wird. Das später zu deletierende DNA-Segment, das in der Regel aus einem oder mehreren essentiellen Exons eines Gens besteht sowie die Neomycinphosphotransferase- (Neo) und Thymidinkinase-(TK) Kassetten als Selektionsmarker werden jeweils von zwei *loxP*-Stellen flankiert. In einem ersten Schritt wird über eine Elektroporation des Zielvektors eine homologe Rekombination und damit die Integration der modifizierten genomischen Sequenz in embryonalen Stammzellen erreicht. Exprimiert man in derart veränderten ES-Zellen die Rekombinase Cre, kann es zu

drei verschiedenen Rekombinationsereignissen kommen: Die beiden terminalen *loxP*-Stellen rekombinieren unter Deletion der Zielsequenz und Exzision der Selektionsmarker, als deren Folge ein *loxP*-Stelle im Genom verbleibt. Dieses Rekombinationsereignis wird als TypI-Deletion bezeichnet und repräsentiert durch die vollständige Entfernung der Zielsequenz einen klassischen „Knock-out“ (Abbildung 4).

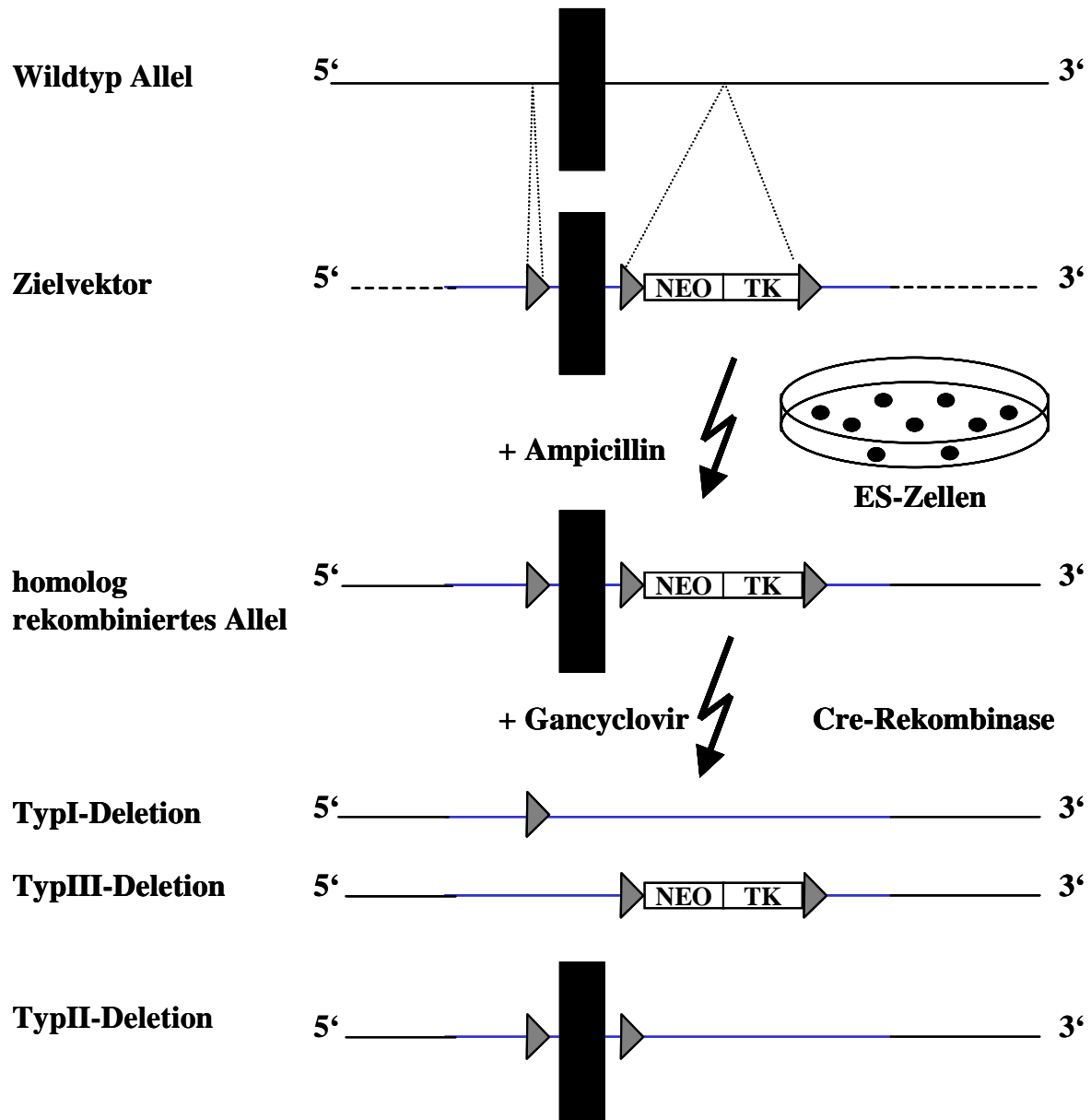


Abbildung 4: Selektionsschema zur Herstellung der TypII-Deletion. Die horizontale Linie kennzeichnet den genomischen Klon des *Gna13* Gens. Dreiecke symbolisieren die *loxP*-Stellen, während Rechtecke die Exons und Blockpfeile die zwei Selektionskassetten darstellen (pGKneo: Neomycinphosphotransferase; HSVtk: Thymidinkinase).

Rekombiniert die externe *loxP*-Stelle mit der nächstgelegenen *loxP*-Stelle, resultiert dieses Ereignis in der Deletion der Zielsequenz und dem Verbleib der „gefloxten“ Selektionsmarker. Da es sich im Gegensatz zur Neo-Kassette bei der TK-Kassette um einen negativen

Selektionsmarker handelt, sterben alle ES-Zellen, die diese als TypIII-Konfiguration bezeichnete Variante aufweisen, nach Gabe von Gancyclovir als Selektionsmittel zum Zellkulturmedium. Rekombinieren die diese Selektionskassette flankierenden *loxP*-Stellen unter Deletion der Selektionsmarker und Verbleib einer *loxP*-Stelle, entsteht eine genomische Situation, bei der die Zielsequenz (ein oder mehrere Exons eines Gens) von *loxP*-Stellen flankiert sind (Abbildung 4). Bei diesen so genannten TypII-Deletionen ist die Funktion des Zielgens zunächst nicht beeinträchtigt, wenn die *loxP*-Stellen in funktionslose Intronbereiche integriert wurden. Mit ES-Zellen, die diese TypII-Deletionen tragen werden Mäuse generiert, die in sämtlichen Körperzellen die „gefloxte“ Sequenz tragen. Kreuzt man eine Cre transgene Mauslinie, die Cre unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors exprimiert in Mäuse mit dem „gefloxten“ Zielgen, kommt es in allen Zellen, in denen Cre exprimiert wird, zur Exzision der „gefloxten“ Sequenz und damit zur Inaktivierung des Zielgens (Tsien et al., 1996; Sano et al., 1999). Eine Inaktivierung des Zielgens kann auch erreicht werden, wenn direkt aus homolog rekombinierten ES-Zellen, ohne einen zweiten Zellkulturschritt zur Generierung der TypII-Deletion, Mäuse hergestellt werden, die in sämtlichen Körperzellen das homolog rekombinierte Allel tragen. Da in diesem homolog rekombinierten Bereich zusätzlich zu der durch *loxP*-Stellen markierten Zielsequenz noch die durch *loxP*-Stellen flankierten Selektionsmarker vorhanden sind, kann es zu einer in diesem Fall unerwünschten Inaktivierung des Zielgens kommen.

Tiere, die homozygot für diese Veränderung sind und keinen offensichtlichen Phänotyp aufweisen, lebensfähig und fertil sind, können mit einem so genannten „General-Deleter“, einer Cre Maus, die Cre in sämtlichen Zellen des Maus-Organismus vor Implantation des Embryos exprimiert, verpaart werden. In den direkten Nachkommen sind entsprechend der Cre Expression in der Zellkultur, alle drei bereits beschriebenen Deletionstypen nachweisbar. Tiere, die nach dieser Cre Expression die TypII-Deletion tragen, werden zur Generierung von Mäusen genutzt, die in sämtlichen Körperzellen die „gefloxte“ Sequenz tragen.

1.8 Cre-Linien und Reporter-Mäuse

Unterschiedliche Cre-Linien ermöglichen, je nach Wahl des Promotors unter dessen Kontrolle die P1 Bakteriophage Cre-Rekombinase exprimiert wird, eine zeit- und gewebespezifische Deletion der „gefloxten“, für essentielle Funktionen verantwortliche Bereiche eines Gens. Bei *EIIa*^{Cre/+} transgenen Tieren handelt es sich um eine „Knock-in“ Mauslinie, die Cre unter der Kontrolle des adenoviralen *EIIa*-Promotors, selektiv im frühen Mausembryo, vor Implantation des Embryos, exprimiert (Lakso et al., 1996). *MLC2a*^{Cre/+} transgene „Knock-in“ Mäuse hingegen exprimieren Cre ab Tag e8,5 in Kardiomyozyten. Durch β -Galactosidase Färbungen an *MLC2a*^{Cre/+}, *Rosa26*^{lacZ} positiven Tieren konnte allerdings gezeigt werden, dass die Spezifität der *MLC2a*-Cre Expression nur bis Tag e10,5 erhalten bleibt, und in späteren Entwicklungsstadien auch in anderen Organen eine *MLC2a*-Cre Expression nachgewiesen werden kann (Chen et al., unpublizierte Daten). Mit der *Rosa26*^{lacZ} Reporter Linie wurde (Mao et al., 1999) eine Mauslinie etabliert, die ein durch *loxP*-Stellen flankiertes β -

Galactosidase-Neomycin-Phosphotransferase Fusionsgen (*β geo*) auf dem *Rosa26* Locus trägt. So kommt es ausschließlich nach einer Cre-medierten Exzision der *loxP* flankierten DNA Sequenzen zu einer *β geo* Expression des exzidierten *Rosa26* Alleles wird sowohl in Embryonen als auch im adulten Tier ubiquitär exprimiert und ermöglicht damit eine Aussage über das Expressionsmuster der unterschiedlichen Cre-Linien. Eine für Endothelzellen spezifische Expression wird durch transgene Cre-Linien erreicht, die Cre unter der Kontrolle des *tie-1* Promotors exprimieren. Das *tie*-Gen codiert für eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die in frühen Stadien der Vaskulogenese exprimiert wird. Die früheste Expression wurde in Angioblasten des Kopfmesenchyms, in Endothelzellen der dorsalen Aorta sowie in Blutgefäßen des Dottersackes am Tag 8 der Embryonalentwicklung nachgewiesen (Gustafsson et al., 2001). Mithilfe des induzierbaren Promotors des *Mx1* Gens der Maus, kommt es nach Gabe von Interferon α oder β bzw. der synthetischen doppelsträngigen RNA „polyinosinic-polycytidylic acid“ (PI-PC), einem Interferon Induktor, zur Aktivierung der in die Abwehr von viralen Infektionen involvierten, in gesunden Mäusen aber inaktiven *Mx1*-Promotors (Kühn et al., 1995). Die Aktivierung dieses Promotors führt zu einer vollständigen, bzw. nahezu vollständigen Rekombination in Leber und Milz sowie in Zellen des hämatopoetischen Systems, wie z.B. Thrombozyten (Betz et al., 1998).