

5 Ergebnisse

5.1 Konstruktion des Vektors zur konditionalen Inaktivierung des *Gna13* Gens

Zur Konstruktion des als TV13flox bezeichneten Zielvektors, der zu einer konditionalen Inaktivierung des *Gna13* Gens verwendet werden sollte, wurde der gleiche genomische Klon wie zur Herstellung des Zielvektors für die klassische Inaktivierung des *Gna13* Gens herangezogen. Bei der konditionalen Inaktivierung sollte das zweite kodierende Exon des *Gna13* Gens und nicht wie beim klassischen „Knock-out“, das erste codierende Exon deletiert werden. Zur Herstellung des entsprechenden Zielvektors wurde zunächst eine Restriktionskarte des 14,8 kb λ Phagen Klons erstellt. Eine Auswahl des Ergebnisses dieser Restriktionskartierung ist in Abbildung 5 dargestellt.

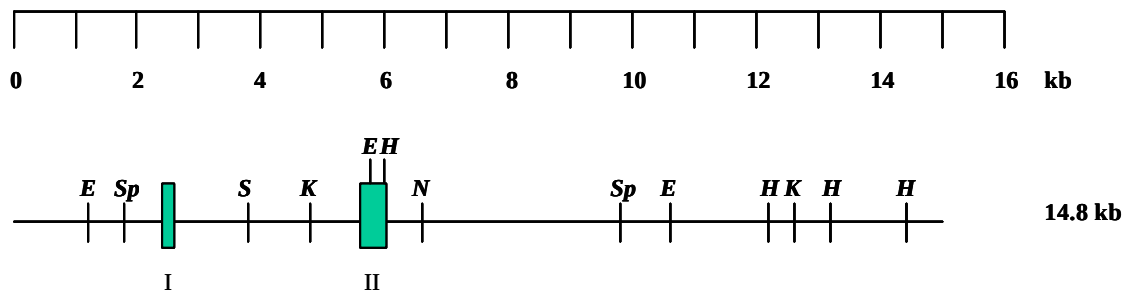


Abbildung 5: Restriktionskarte des *Gna13* Gens. Für die Klonierung und nachfolgende Analyse notwendige Restriktionsstellen wurden als vertikale Striche eingezeichnet und die Restriktionsenzyme mit ihren Anfangsbuchstaben bezeichnet (E: *EcoRI*; H: *HindIII*; K: *KpnI*; N: *NheI*; S: *SacII*; Sp: *SpeI*). Die horizontale Linie kennzeichnet den genomischen Klon, während Rechtecke das Exon I bzw. II des *Gna13* Gens symbolisieren.

Die für das Zielkonstrukt verwendete Neomycinphosphotransferasekassette und Thymidinkinasekassette sowie die für die konditionale Inaktivierung notwendigen *loxP*-Erkennungssequenzen stammen aus einem als pFlox bezeichnetem Plasmid, das freundlicherweise von Dr. D. Chui zur Verfügung gestellt wurde. Die für die Klonierung von TV13flox notwendigen Informationen bezüglich dieses Plasmides sind in Abbildung 6 dargestellt.

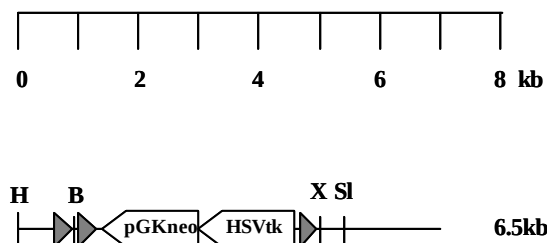


Abbildung 6: Restriktionskarte und Lage der Selektionsmarker. Für die Klonierung notwendige Restriktionsstellen wurden als vertikale Striche eingezeichnet und die Restriktionsenzyme mit ihren Anfangsbuchstaben bezeichnet (B: *BamHI*; H: *HindIII*; Sl: *SalI*; X: *XhoI*). Die Dreiecke kennzeichnen *loxP*-Stellen, während die Blockpfeile die zwei Selektionskassetten darstellen (pGKneo: Neomycinphosphotransferase; HSVtk: Thymidinkinase).

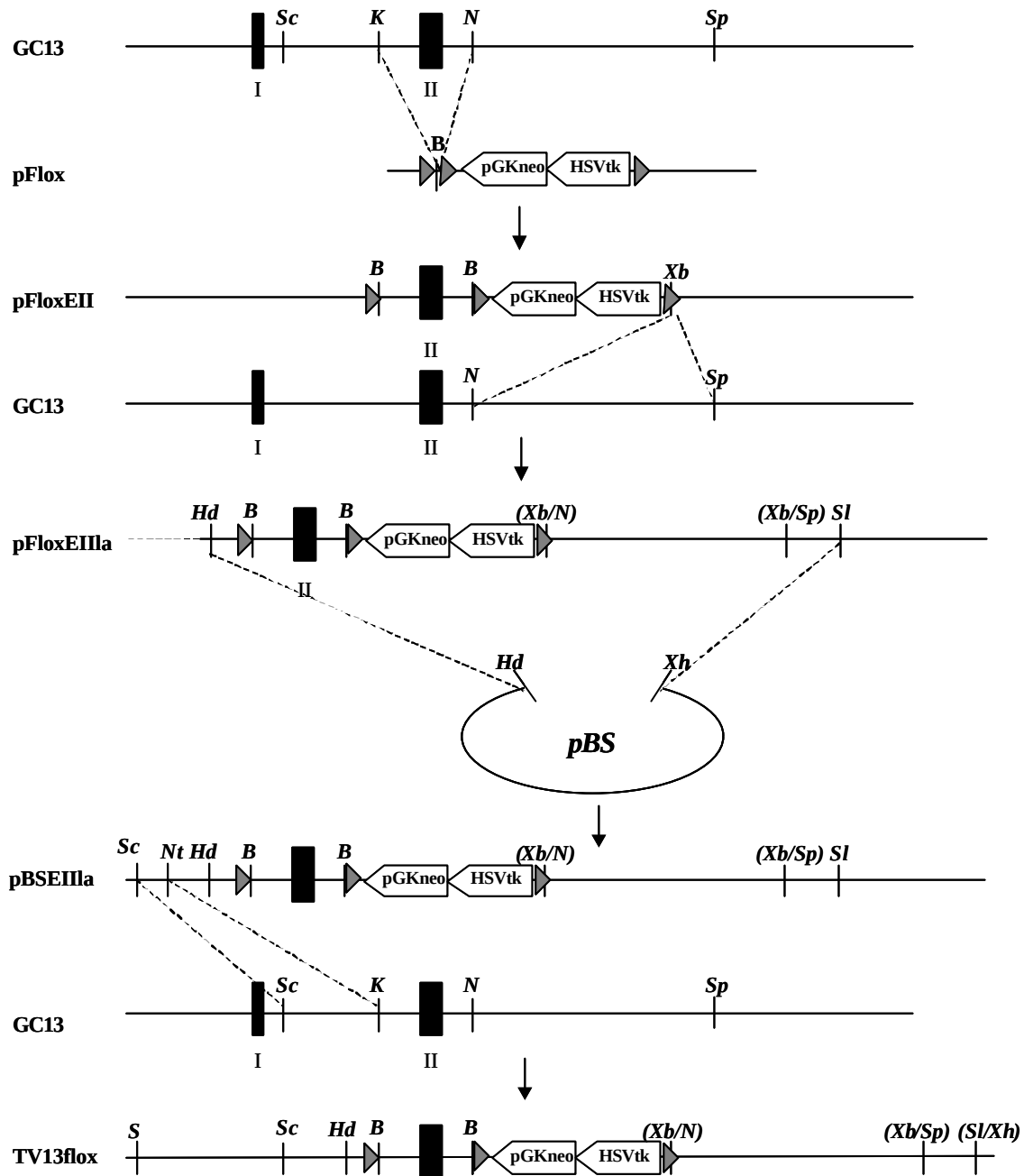


Abbildung 7: Klonierungsschema zur Herstellung des Zielvektors TV13flox zur konditionalen Inaktivierung des *Gna13* Gens. Restriktionsstellen wurden als vertikale Striche eingezeichnet und die Restriktionsenzyme mit ihren Anfangsbuchstaben bezeichnet. (B: BamHI; E: EcoRI; H: HindIII; K: KpnI; N: NheI; Nt: NotI; S: SacI; Sl: SalI; Sc: SacII; Sp: SpeI; Xb: XbaI; X: XhoI). Eingeklammerte Restriktionsenzyme zeigen, dass durch die Klonierung Restriktionsstellen verloren gegangen sind. Die horizontale Linie kennzeichnet den genomischen Klon, während Rechtecke das Exon I bzw. II des *Gna13* Gens symbolisieren. Dreiecke stellen die loxP-Stellen dar, während die Blockpfeile die zwei Selektionskassetten darstellen (pGKneo: Neomycinphosphotransferase; HSVtk: Thymidinkinase).

In einem ersten Klonierungsschritt, wurde der genomische *Gna13*-Klon mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *NheI* verdaut, während pFlox mit *BamHI* linearisiert wurde.

Um die für die Ligation notwendigen „glatten Enden“ zu erzeugen (4.1.4), wurde sowohl für den genomischen *Gna13*-Klon als auch für den pFlox-Vektor eine Auffüllreaktion mit T4 DNA-Polymerase durchgeführt. Nach der Auffüllreaktion wurden beide Ansätze auf ein 1% Agarosegel aufgetragen, die entsprechenden Banden exzidiert und entsprechend der Angaben unter 4.5.1 gereinigt. pFlox wurde dephosphoryliert (4.1.2) und mit dem *KpnI/NheI* Fragment ligiert (4.1.5). Die Analyse auf positive Klone erfolgte mithilfe eines *XhoI* Verdau der aus der Minipräparation (4.10.2) entstandenen DNA. Um den 5'Bereich, den so genannten „langen Arm“ des Zielvektors herzustellen, wurde ein aus der vorhergegangenen Ligation stammender, als pFloxEII bezeichneter, positiver Klon mit *XbaI* verdaut, dephosphoryliert und zu einem aus dem genomischen *Gna13* Klon durch einen *NheI/SpeI* Verdau generierten Fragment ligiert (4.1.5). Nach Transformation (4.2) und Minipräparation (4.10.2) wurden die Klone über einen *AfIII/SacII* Verdau (4.1.1) analysiert. In einem dritten Schritt wurde das die *loxP*-Stellen, das ExonII, die Selektionskassetten sowie den langen Arm enthaltende Konstrukt (pFloxEIIIa) zunächst mit *SalI* linearisiert, einem Verdau mit *HindIII* (4.1.1) unterworfen und in einen zuvor mit *XhoI* und *HindIII* verdauten pBluescript-Vektor kloniert (4.1.5). Die nach der Transformation (4.2) und Minipräparation (4.10.2) vorhandenen DNAs wurden wiederum über verschiedene Testverdau-Ansätze (4.1.1) auf positive Klone untersucht, die als pBSEIIIa bezeichnet wurden. Im letzten Klonierungsschritt wurde der kurze Arm des genomischen *Gna13* Klonen in den Zielvektor eingefügt. Dazu wurde der genomische Klon mit *KpnI* und der Vektor mit *NotI* verdaut (4.1.1). Nach dem *KpnI*-Verdau wurden die Enden mit T4 DNA-Polymerase (4.1.4), nach dem *NotI*-Verdau mit Klenow-Fragment geglättet. In beiden Fällen erfolgte ein zweiter Verdau (4.1.1) mit *SacII* und anschließend die Ligation (4.1.5) der zwei Fragmente. Wiederum wurden die über Transformation (4.2) und anschließende Minipräparation (4.10.2) gewonnenen DNAs über geeignete Verdau-Ansätze (4.1.1) analysiert. Um sicherzustellen, dass sämtliche Klonierungen tatsächlich erfolgreich verlaufen sind, wurden die Übergänge der Klonierungsstellen des als TV13flox (Abbildung 7) bezeichneten Zielvektors durch eine Sequenzierung überprüft.

5.2 Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen

Um die Pluripotenz embryonaler Stammzellen zu erhalten, wurden diese auf einem als Feederrasen bezeichnetem Monolayer embryonaler Fibroblasten (4.11.3) kultiviert und das Medium mit LIF supplementiert (3.13). Der Zielvektor wurde vor der Elektroporation mittels eines Caesium-Chlorid-Gradienten gereinigt (4.5.2), mit *SacI* linearisiert und die Elektroporation wie unter 4.11.6 beschrieben durchgeführt. Nach 48h wurde mit 280µg/ml aktivem G418 als Selektionsmittel auf Klone selektiert, die die Neomycinphosphotransferasekassette und damit zumindest Teile des Zielvektors homolog wie auch heterolog in ihr Genom integriert hatten. Nach 10-12 Tagen wurden makroskopisch sichtbare, undifferenzierte Zellklone unter einem Binokular-Mikroskop mittels einer Mikropipette isoliert (4.11.7) und auf einer 96well Schale ausplattiert. Der Selektionsdruck mit G418 wurde bis zum Wegfrieren

der Originalplatte aufrechterhalten (4.11.8). Die Replikaplatte wurde zur Herstellung von genomischer DNA benutzt (4.10.5), um diese auf eine homologe Rekombination der im Vektor veränderten Bereiche zu untersuchen. Um sicherstellen zu können, dass eine vollständige homologe Rekombination des Zielvektors in embryonalen Stammzellen vorliegt, wurden zunächst PCR-Analysen für den 3'-Bereich der homolog zu rekombinierenden Sequenz durchgeführt. Die entsprechenden Primer Kombinationen sind in Abbildung 8 dargestellt.

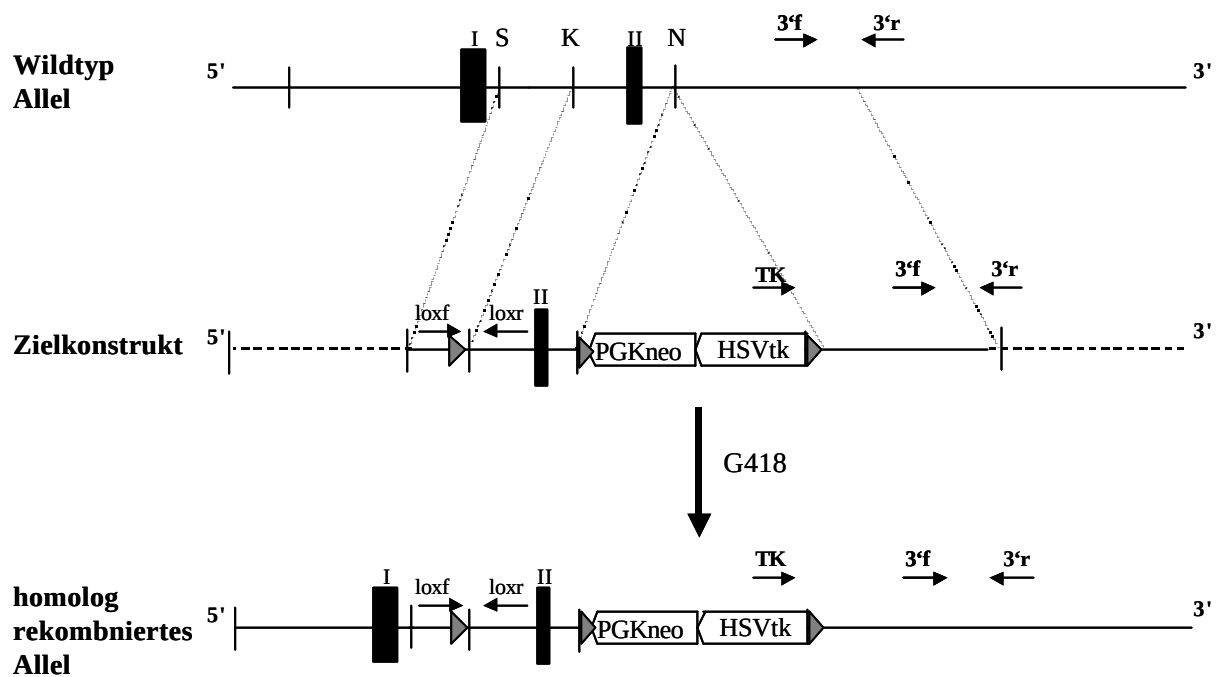


Abbildung 8: Aufbau des Zielvektors und Position der Primer zur Identifikation homolog rekombinierter Klone via PCR. Durchgängige, horizontale Linien stellen genomische Bereiche dar, während die gestrichelten Linien Vektorbereiche markieren. Die vertikalen Linien kennzeichnen Klonierungsstellen bzw. eine Auswahl an Restriktionsenzymen (S: *SacII*; K: *KpnI*; N: *NotI*). Schwarze Balken zeigen die Exons I und II des *Gna13* Gens. Dreiecke stellen die *loxP*-Stellen dar, während Pfeile die Position von Primern markieren. Sequenzen der verwendeten Primer: TK: CTTCCTCTTGAAAACCACACTGC; 3'f: CTGTGCTCTTGTTCCG; 3'r: AGAGGACAGGACAGGGTGTGTGACAG; *lox*f: TCACAAGTGACTACTTGAGTCTG; *lox*r: GCTGTGTTTCAGTCTGCCTTAATGC. PGKneo: Neomycinphosphotransferasekassette; HSVtk: Herpes simplexvirus-Thymidinkinasekassette.

Die Primer zur Identifikation homolog rekombinierter Klone wurden so gewählt, dass am 3'Ende des zu rekombinierenden Bereiches ein Primer innerhalb, der andere außerhalb der homologen, über den Zielvektor in die embryonalen Stammzellen eingebrachten Sequenz lag. Mit dem Primertrio TK,3'f/3'r (Abbildung 8) wurde in homolog rekombinierten Klonen eine 3.2kb große Bande, die dem Amplifikat des Primerpaares TK/3'r entspricht sowie eine 550bp Bande, die mithilfe der Primer 3'f/3'r die Wildtypsequenz amplifiziert, erzeugt. Klone, in denen keine homologe Rekombination stattgefunden hat, zeigten ausschließlich die Wildtypsequenz. Das entsprechende PCR-Ergebnisse ist in Abbildung 9 dargestellt.

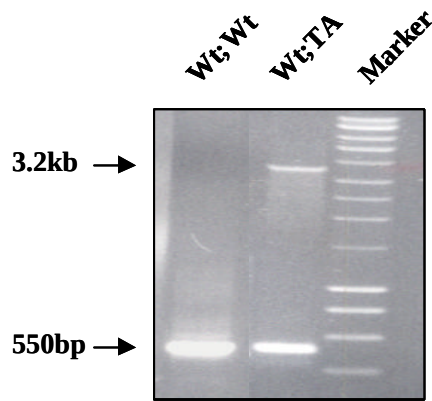


Abbildung 9: PCR-Analyse zur Identifikation homolog rekombinierter Klone. Das Primertrio TK, 3'f/3'r führt in homolog rekombinierten Klonen zur Amplifikation einer 550bp Wildtypbande (Wt) sowie zu einer 3.2kb Bande, die dem homolog rekombinierten Allel (TA) entspricht. In nicht homolog rekombinierten Klonen (Wt;Wt) kann nur die Wildtypbande detektiert werden.

Da eine homologe Rekombination häufig unter Verlust der externen 5' *loxP*-Stelle erfolgt, wurde mit dem Primerpaar *loxP*/*loxR* (Abbildung 10) eine PCR über die externe 5'-*loxP*-Stelle durchgeführt. Während an dem genomischen Klon sowie in wildtypischen embryonalen Stammzellen ausschließlich die Wildtyp Bande und keine zusätzlichen 480bp großen Amplifikate nachgewiesen werden konnten, ist in Abb. 3.3A das Bandenmuster vier *loxP* positiver Klone exemplarisch dargestellt. Neben dem 220bp großen wildtypischen Fragment zeigt sich eine weitere Bande bei 480bp, die der Länge der durch die Klonierung entstandenen modifizierten Sequenz um die *loxP* Stelle herum entspricht. Um die Richtigkeit der Amplifikate zu überprüfen, wurde das Gel auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer *loxP*-Sonde, die eine Teilsequenz der *loxP*-Stelle enthält, hybridisiert. Wie erwartet kommt es in den Spuren, die dem genomischen Klon sowie der wildtypischen ES-Zell DNA entsprechen, aufgrund des Fehlens der *loxP*-Stelle zu keiner Schwärzung des Autoradiographiefilms, während im Zielvektor sowie in den in Abbildung 10 A dargestellten homolog rekombinierten Klonen die *loxP*-Stelle eindeutig nachgewiesen werden konnte (Abbildung 10 B).

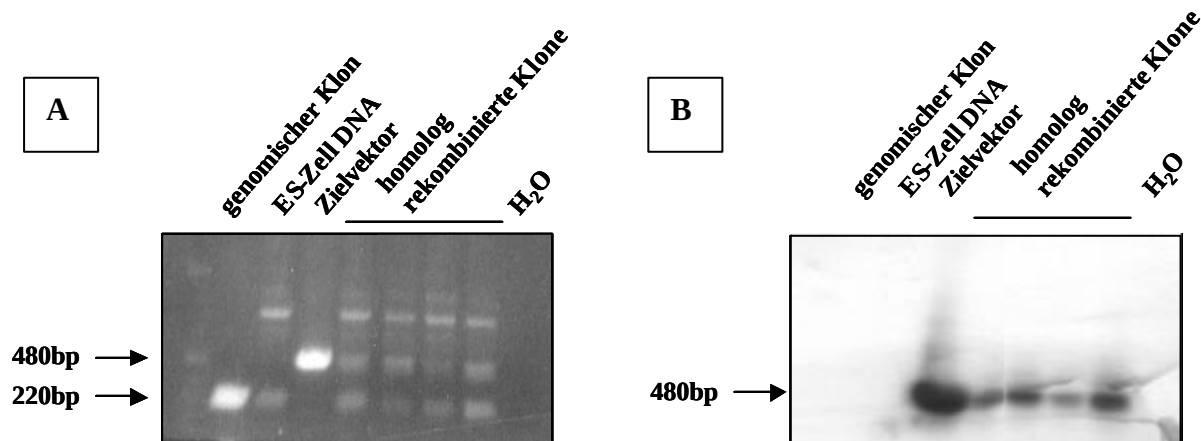


Abbildung 10: PCR und Oligohybridisierung zur Überprüfung der Integration der 5' *loxP*-Stelle in homolog rekombinierten Klonen. A) PCR-Ergebnis mittels die 5' *loxP*-Stelle flankierenden Primern (*loxP*/*loxR*; Abb. 8) B) Hybridisierung des auf eine Membran übertragenen PCR Ergebnisses mittels einer für die *loxP*-Stelle spezifischen Sonde.

Tatsächlich enthielten nur 9% der über die 3'- PCR als homolog rekombiniert identifizierten Klone die externe *loxP*-Stelle. Diese positiven Klone wurden zusätzlich über Southernblotting (4.3) mithilfe einer 5'-, einer 3'- sowie einer internen Sonde verifiziert (Abbildung 12). Ein Schema zur Identifikation homolog rekombinierter Klone via Southernblot ist in Abbildung 11 dargestellt.

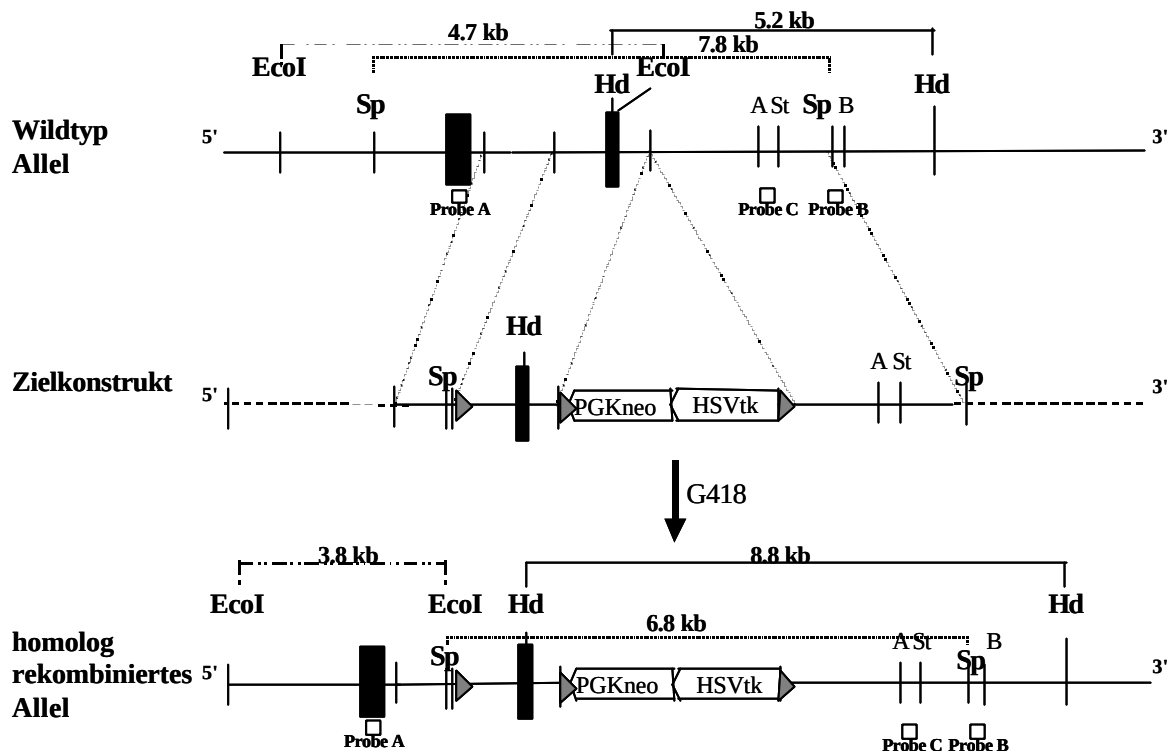


Abbildung 11: Schema zur Identifikation homolog rekombinierter Klone via Southernblotting. Durchgängige, horizontale Linien stellen genomische Bereiche dar, während die gestrichelten Linien Vektorbereiche markieren. Die vertikalen Linien kennzeichnen Klonierungsstellen bzw. für die Identifikation von homolog rekombinierten Klonen notwendige Restriktionsenzyme (A: *AflII*; B: *BamHI*; *EcoI*: *EcoRI*; Hd: *HindIII*; K: *KpnI*; N: *NotI* Sp: *SpeII*; St: *StuI*). Mithilfe der Sonde A und *EcoRI*-Verdau der genomischen DNA wurde der 5'-Bereich der homolog rekombinierten Klone auf seine Vollständigkeit hin überprüft. Für die Überprüfung des 3'-Bereiches wurde *HindIII* verdaute DNA mit der Sonde B hybridisiert. Um Mehrfachintegrationen des Zielvektors auszuschließen, wurden Sonden aus der Sonde C angesetzt und gegen *SpeI* verdaute DNA hybridisiert. Schwarze Balken zeigen die Exons I und II des *Gna13* Gens. Dreiecke stellen die *loxP*-Stellen dar.

Für die Southernblot Analyse wurden verschiedene Sonden ausgewählt, die über einen entsprechenden Verdau Aussagen darüber ermöglichen, ob eine homologe Rekombination des Zielvektors in embryonalen Stammzellen stattgefunden hat. Die Restriktionsstellen wurden möglichst nahe der *loxP*-Stellen gewählt, um so das Vorhandensein der *loxP*-Stellen auch über Southernblot zu bestätigen. Die Sonde A wurde aus einem PCR-Amplifikat hergestellt (Primer: Pfl13A/Pfl13B), während Sonde B und C über einen Verdau der cDNA des genomischen *Gna13* Klones mit *BamHI/SpeI* (Sonde B) bzw. *AflIII/StuI* (Sonde C)

entstanden. Durch die Wahl einer internen Sonde C, konnten Mehrfachintegrationen ausgeschlossen werden. Nur 1% der über PCR als homolog rekombiniert identifizierten Klone zeigten das im Southernblot erwartete Bandenmuster. In den anderen Klonen fand, über PCR-Analysen nicht erkennbar, entweder nur eine partielle homologe Rekombination des Zielvektors oder aber mehr als eine Integration der zu rekombinierenden Sequenz in das Genom statt.

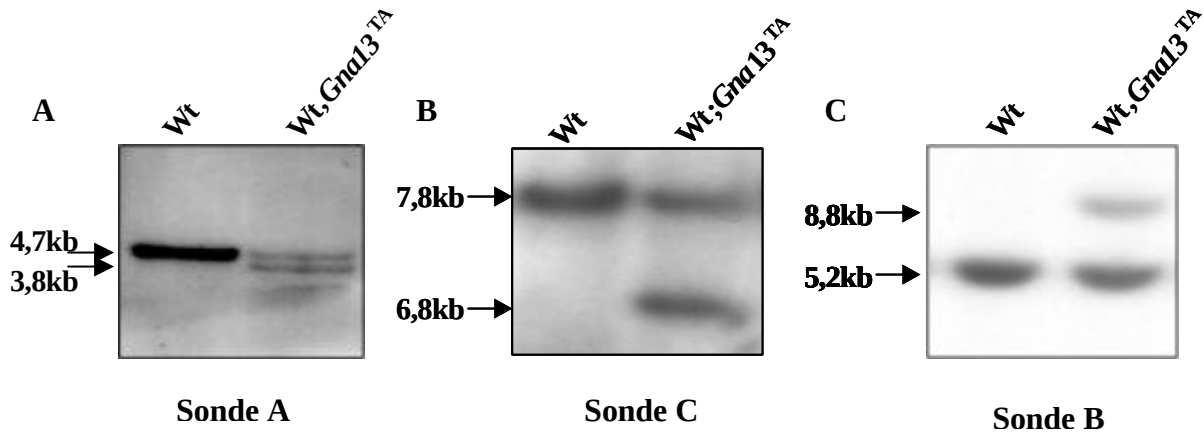


Abbildung 12: Identifikation homolog rekombinierter Klone über Southernblotting. A) Genomische DNA wurde mit *EcoRI* verdaut und der Sonde A (Abbildung 11) hybridisiert. B) Die genomische DNA wurde mit *SpeI* verdaut und Sonde B (Abbildung 11) hybridisiert. C) Die genomische DNA wurde mit *HindIII* verdaut und der Sonde C (Abbildung 11) hybridisiert. Wt bezeichnet wildtypische DNA, während *Gna13*^{TA} das homolog rekombinierte Allel darstellt.

5.3 Cre-medierte Rekombination in embryonalen Stammzellen

Die als homolog identifizierten Klone wurden aufgetaut, unter den in 4.11.5 beschriebenen Bedingungen kultiviert, bis zu einer Dichte von 5×10^6 -Zellen/10er Schale herangezogen und mit variierenden Konzentration (1µg/ml-20µg/ml) des Cre-Expressionsvektors p185-Cre elektroporiert (4.11.6). Die Zellen wurden nach 48h einer Einfachselektion mit 0,2µM Gancyclovir (4.11.7) unterworfen, sodass nur Klone die Selektion überleben konnten, in denen die Thymidinkinasekassette durch die Rekombinase Cre exzidiert wurde. Die zwei verschiedenen, normalerweise aus dieser Exzision resultierenden Deletionstypen werden als TypI- bzw. TypII-Deletion bezeichnet (Abbildung 13). Die TypI-Deletion entspricht funktionell dem klassischen *Gna13* „Knock-out“, während die TypII-Deletion die für die konditionale Geninaktivierung erwünschte Konfiguration repräsentiert (Abbildung 15).

Die Identifikation der TypI- bzw. TypII-Deletion erfolgte über eine PCR-Analyse. In 0,1% der ca. 5000 untersuchten Klone konnte neben dem Wildtyp Allel mittels PCR eine TypI-Deletion (Primer: 13Seq11; *Lox* 3.2, Abbildung 13) identifiziert werden, während die zur Herstellung des konditionalen *Gna13* „Knock-outs“ notwendige TypII-Deletion (Primer 13Seq1; *Lox* 3.2, Abbildung 13) nicht nachweisbar war. Um den Selektionsdruck auf Klone zu erhöhen, in denen tatsächlich ein Rekombinationsereignis durch Expression der Rekombinase Cre stattgefunden hat, wurden die homolog rekombinierten Klone mit einem

Cre-Konstrukt elektroporiert, das zusätzlich zu dem Gen, dass für die Cre-Expression verantwortlich ist, ein Puromycin N-Acetyltransferase (pac) Resistenz-Gen trägt (Yagi et al., 1998) und dieses mit Cre koexprimiert. So kommt es nach Elektroporation dieses als pIC-Cre-Pac bezeichneten Konstruktes innerhalb der ersten 24h zu einer transienten Expression der Puromycin Resistenz. Durch Gabe von 1µg/ml Puromycin zu dem ES-Zellmedium sterben vor dem eigentlichen Selektionsbeginn mit Gancyclovir bereits alle Klone, die nicht puromycinresistent sind und entsprechend nicht die Rekombinase Cre exprimieren. Unter 100 der auf TypI- bzw. TypII-Deletionen untersuchten Klone, trugen 20% die TypI-Deletion (Primer: 13Seq11; *Lox* 3.2, Abbildung 14) und 4% die TypII-Deletion (Primer 13Seq1; *Lox* 3.2, Abbildung 14). Zusätzlich wurde das Vorhandensein der *loxP*-Stellen über eine weitere Hybridisierung mit einem die *loxP*-Sequenz tragendem Oligonukleotid gesichert.

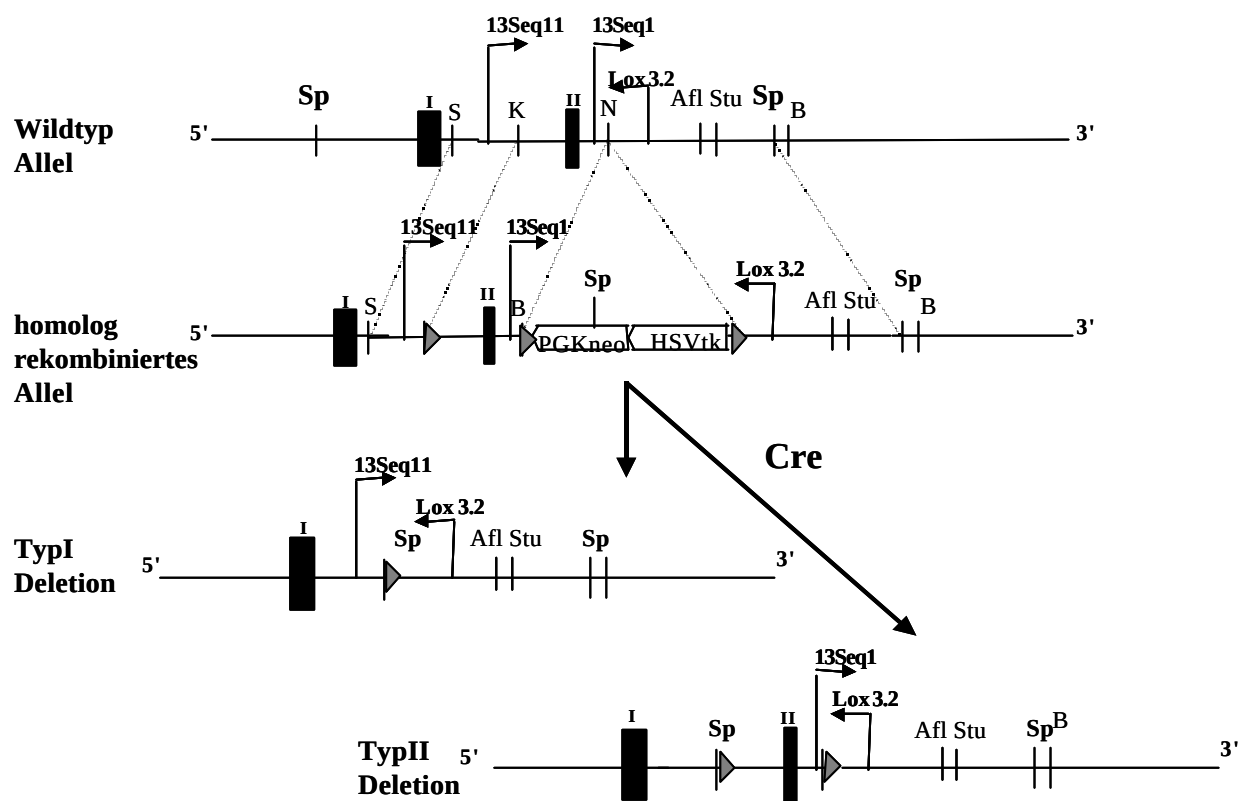


Abbildung 13: Position der Primer zur Identifikation von TypI bzw. TypII Deletionen. Durchgängige, horizontale Linien stellen genomische Bereiche dar. Die vertikalen Linien kennzeichnen Klonierungsstellen bzw. eine Auswahl an Restriktionsenzymen (K: *KpnI*; N: *NotI*; S: *SacII*; Sp: *SpeI*). Schwarze Balken zeigen die Exons I und II des *Gna13* Gens. Dreiecke stellen die *loxP*-Stellen dar, während Pfeile die Position von Primern markieren. Sequenzen der verwendeten Primer: 13Seq1: GCA CTC TTA CAG ACT CCC AC; 13Seq11: CTG AGT GGT TAA GGA GTC ACC; *Lox* 3.2: GCC ACA GAG GGA TTC AGC AC

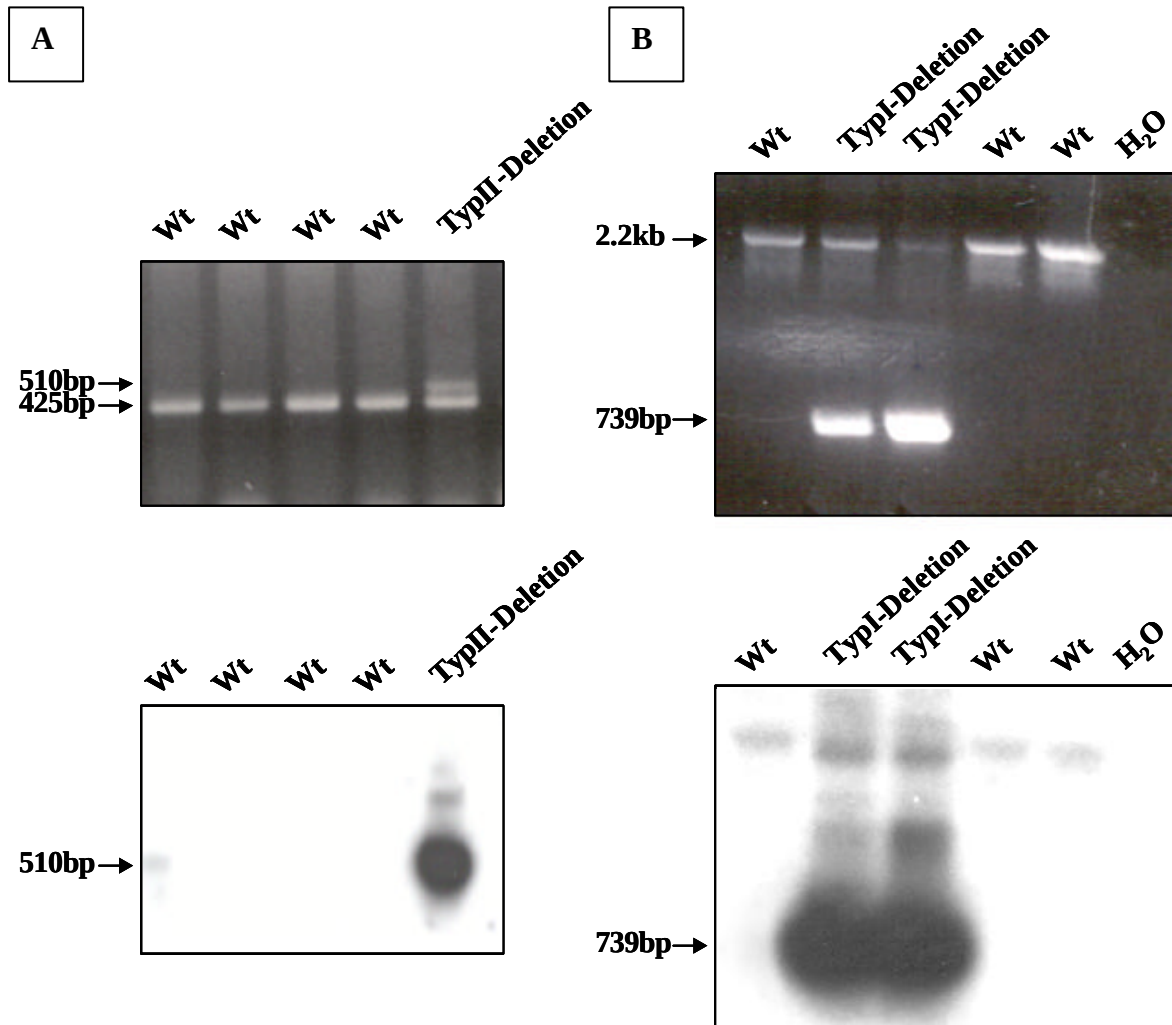


Abbildung 14: PCR und Oligohybridisierung zur Identifikation von TypI bzw. TypII Deletionen. A) Amplifikate der Primerkombination 13Seq1: *Lox*3.2. sowie die entsprechende Oligohybridisierung mit einer *loxP*-Stellen spezifischen Sonde. Wt: Wildtyp. B) Amplifikate der Primerkombination 13Seq11:*Lox* 3.2. sowie die entsprechende Oligohybridisierung mit einer *loxP*-Stellen spezifischen Sonde. Wt: Wildtyp.

Die zunächst über PCR identifizierte TypI und TypII-Deletionen wurden mithilfe eines *SpeI* Verdau und einer internen Sonde (Sonde C) im Southernblot bestätigt.

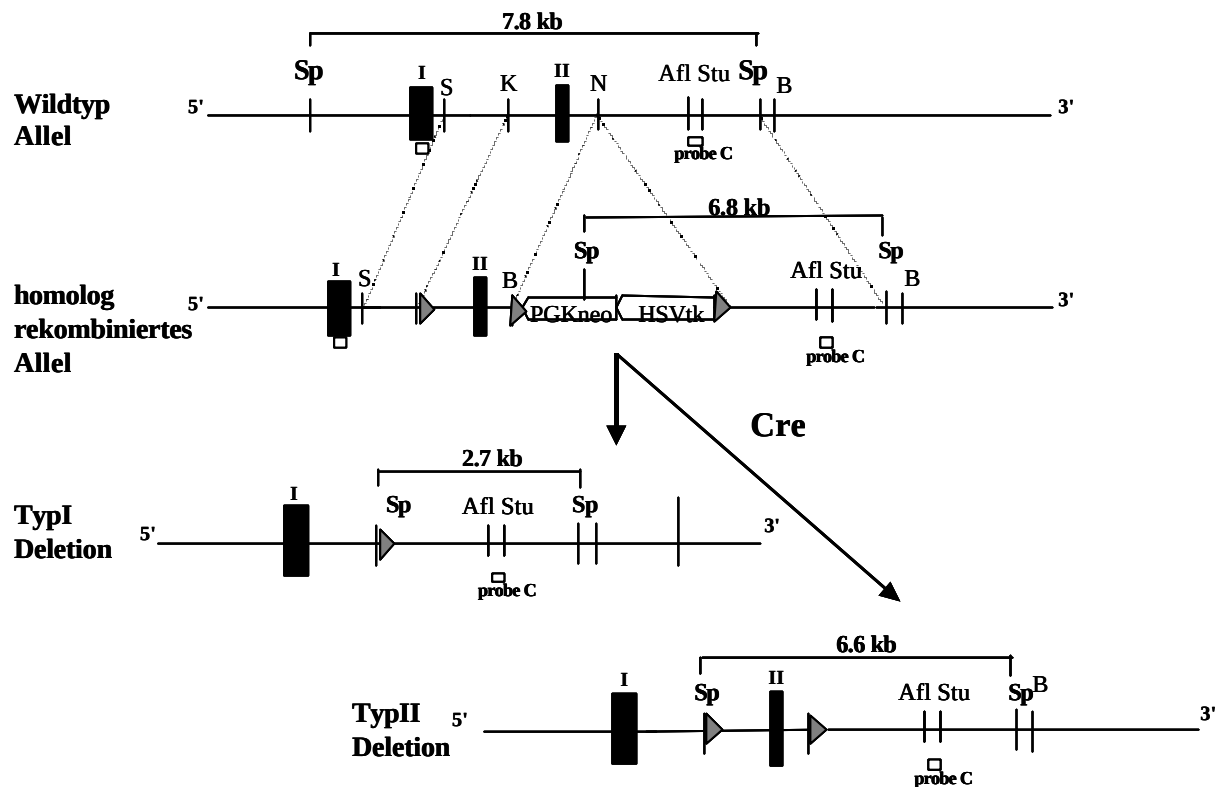


Abbildung 15: Schema zur Identifikation homolog rekombinierter Klone via Southernblotting. Durchgängige, horizontale Linien stellen genomische Bereiche dar. Die vertikalen Linien kennzeichnen Klonierungsstellen bzw. für die Identifikation von homolog rekombinierten Klonen notwendige Restriktionsenzyme (A: *AflII*; B: *BamHI*; K: *KpnI*; N: *NotI*; S: *SacII*; Sp: *SpeI*; St: *StuI*). Mithilfe der Sonde C und *SpeI*-Verdau der genomischen DNA wurden TypI- bzw. TypII-Deletionen identifiziert. Schwarze Balken zeigen die Exons I und II des *Gna13* Gens. Dreiecke stellen die *loxP*-Stellen dar.

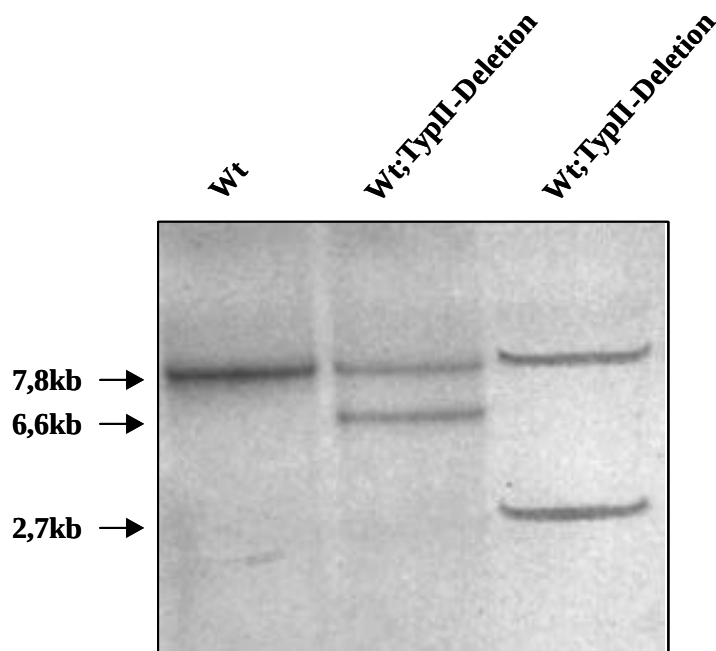


Abbildung 16: Southernblot Analyse zur Identifikation von TypI- bzw. TypII-Deletionen. Wt: Wildtyp Allel; Die genomische DNA wurde mit *SpeI* verdaut und mit der internen Sonde C hybridisiert (Abbildung 15).

5.4 Generierung und Identifizierung von Keimbahntransmittern

In parallelen Ansätzen wurden sowohl vier verschiedene homolog rekombinierte Klone (A10, G8, H2, H6) als auch vier verschiedene, die TypII-Deletion tragende Klone (B3, C7, F9, G2) in nach Superovulation (4.12.1) aus C57Bl/6 Weibchen gewonnene Blastozysten injiziert (4.12.3) und in 8-16 Wochen alte MF1 Ammenmütter transferiert (4.12.4). Die aus diesem Transfer resultierenden Chimären wurden mit C57Bl/6 Mäusen gekreuzt und deren Nachkommen anhand der Fellfärbung auf Keimbahntransmitter untersucht. Während Keimbahntransmitter eine Agouti Fellfärbung aufweisen, zeigen Tiere, die die veränderte Information ausschließlich in somatischen Zellen tragen, eine dunkle, den C57Bl/6 Tieren entsprechende Fellfärbung (4.12.5). Lediglich mit einem Klon (H6) konnte eine Keimbahntransmission nachgewiesen werden. Während zwei der Nachkommen nur wildtypische Allele trugen, konnte in einem weiteren Keimbahntransmitter das homolog rekombinierte Allel nachgewiesen werden (Abbildung 17).

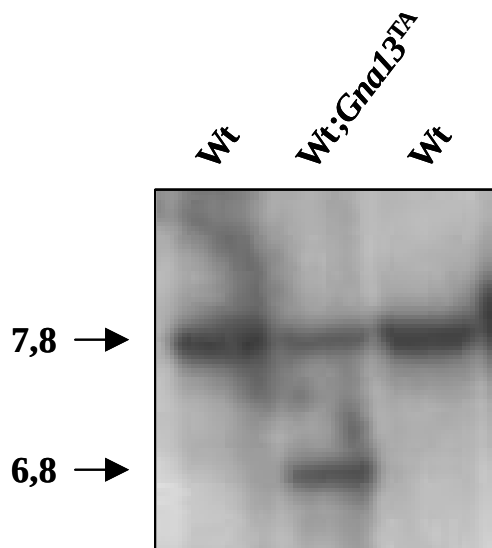


Abbildung 17: Southernblot Analyse zur Identifikation von Keimbahntransmittern, die die genetische Modifikation tragen. Wt: Wildtyp Allel; *Gna13^{TA}*: Keimbahntransmission des homolog rekombinierten Klons H6. Die genomische DNA wurde mit *SpeI* verdaut und der Blot mit der internen Sonde C hybridisiert.

Um zu überprüfen, ob Mäuse, die zusätzlich zu den das ExonII flankierenden *loxP*-Stellen noch die Neomycinphosphotransferase- sowie die Thymidinkinasekassette tragen, überhaupt lebensfähig sind, oder ob durch die Insertion der beiden Selektionsmarker in das *Gna13* Gen ein trunkiertes Protein gebildet, und die Tiere wie im klassischen *Gna13* „Knock-out“ *in utero* sterben, wurden die als *Gna13^{Wt/TA}* Mäuse bezeichneten Tiere bis zur Homozygotie, (*Gna13^{TA/TA}*) gekreuzt. Die Genotypisierung erfolgte via PCR und Southernblotting (Abbildung 18).

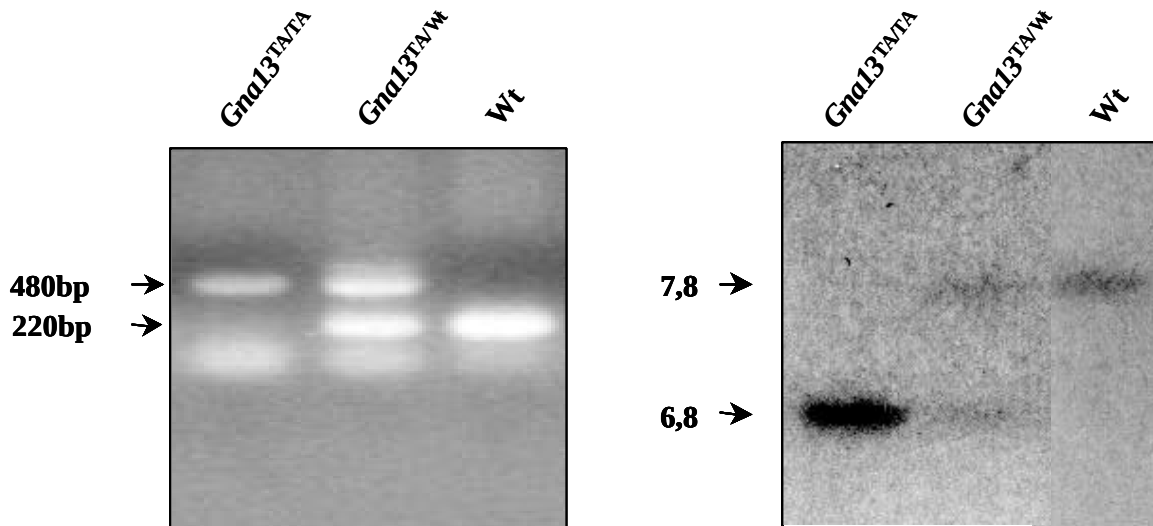


Abbildung 18: Identifikation von für die Mutation homozygoten Keimbahntransmittern über PCR bzw. Southernblotting. A) Wt: Wildtyp Allel; $Gna13^{TA/Wt}$: homolog rekombinierter Klon. Zur Amplifikation wurden die Primer *lox/lox* (Abbildung 8) genutzt. B) Wt: Wildtyp Allel; $Gna13^{TA/Wt}$: homolog rekombinierter Klon. Die genomische DNA wurde mit *SpeI* verdaut und der Blot mit der internen Sonde C hybridisiert.

$Gna13^{TA/TA}$ Mäuse sind lebensfähig und zeigen außer einer reduzierten Fertilität der Männchen, die auf das Vorhandensein der Thymidinkinasekassette zurückzuführen ist (Braun et al., 1990), keine phänotypischen Auffälligkeiten (Abbildung 19).

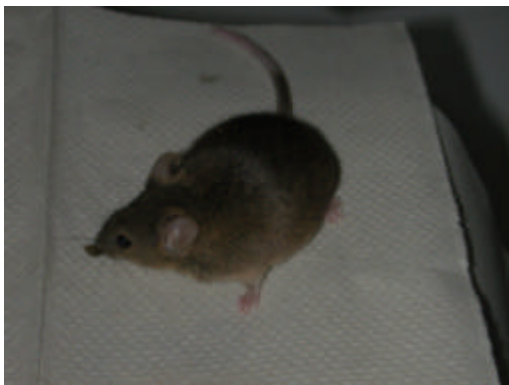


Abbildung 19: $Gna13^{TA/TA}$ Mäuse zeigen keine phänotypischen Auffälligkeiten.

5.5 Analyse von $Gna13^{D1/-};Ella^{Cre/+}$ Mäusen

Da Mäuse, die heterozygot für die Mutation im klassischen $Gna13$ „Knock-out“ ($Gna13^{Wt/-}$) sind, lebensfähig und fertil sind, wurden zunächst $Gna13^{TA/Wt}$ Mäuse mit $Gna13^{Wt/-}$ Tieren verpaart. In aus diesen Verpaarungen resultierenden $Gna13^{TA/-}$ Mäusen mußte demnach nur noch ein $Gna13$ Allel durch die Rekombinase Cre deletiert werden. Um zu überprüfen, ob die durch die Bakteriophage P1 Cre Rekombinase medierte Reaktion in $Gna13^{TA/-}$ Mäusen zu

den gleichen phänotypischen Konsequenzen wie im klassischen *Gna13* „Knock-out“ führt, wurden *Gna13*^{TA/-} Mäuse zunächst mit *EIIa*^{Cre/+} positiven Tieren gekreuzt. Die aus dieser Verpaarung resultierenden *Gna13*^{TA/+};*EIIa*^{Cre/+} Mäuse wurden mit ebenfalls aus diesen Verpaarungen stammenden *Gna13*^{+/-};*EIIa*^{Cre/+} Mäusen verpaart. Da es sich bei *EIIa*^{Cre/+} Tieren wie unter 1.8 beschrieben um einen so genannten „general deleter“, der Cre vor Implantation des Embryos exprimiert, handelt, sollte die Expression der Rekombinase Cre in der Generierung von Null-Mutanten resultieren. Unter einhundertundzwei genotypisierten Nachkommen konnten keine Tiere mit einem *Gna13*^{TA/-};*EIIa*^{Cre/+} Genotyp identifiziert werden. Um 9,5 Tage alte Embryonen auf ihren Phänotyp hin untersuchen zu können, wurden Verpaarungen aus *Gna13*^{TA/+};*EIIa*^{Cre/+} und *Gna13*^{+/-};*EIIa*^{Cre/+} Mäusen angesetzt und die Weibchen täglich auf einen Vaginalplug hin untersucht. 9,5 Tage p.c. wurden die entsprechenden Weibchen getötet, die Embryonen aus dem Uterus isoliert sowie photographiert und die Dottersäcke via PCR genotypisiert. 3/16 der Embryonen sollten *Gna13*^{Δ1/-};*EIIa*^{Cre/+} sein und einen zum klassischen *Gna13* „Knock-out“ identischen Phänotyp aufweisen. Tatsächlich wurden alle stark retardierten Embryonen nach der Genotypisierung als *Gna13*^{Δ1/-};*EIIa*^{Cre/+} Embryonen identifiziert (Abbildung 20). In der Tat führt folglich die durch *EIIa*-Cre hervorgerufene Rekombination im konditionalen *Gna13* „Knock-out“ zur Generierung von Null Allelen.

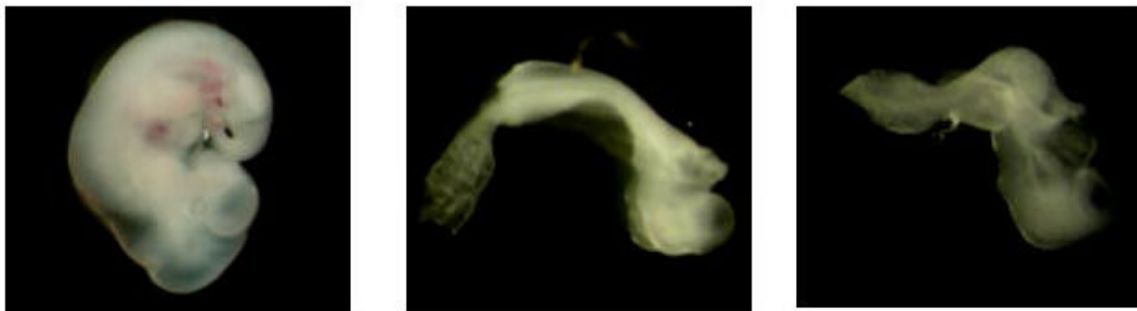


Abbildung 20: Photographien 9.5 Tage alter Embryonen. A) Wildtyp B) *Gna13*^{-/-} C) *Gna13*^{Δ1/-};*EIIa*^{Cre/+}

5.6 Generierung von *Gna13*^{flox/flox} Mäusen

Um Mäuse zu generieren, die ausschließlich das durch *loxP*-Stellen flankierte Exon und nicht zusätzlich die Selektionsmarker tragen, wurden *Gna13*^{Wt/TA} Tiere mit *EIIa*^{Cre/+} Mäusen verpaart. Von acht Nachkommen wiesen in der PCR und im Southernblot zwei *EIIa*-Cre positive Tiere ein Mosaik aus Wildtyp, *Gna13*^{TA}, TypI- und TypII- Deletionen auf. Die das Mosaik tragenden Tiere wurden mit C57bl/6 Mäusen verpaart und deren Nachkommen analysiert. Unter insgesamt 51 Nachkommen wurde in der PCR in einem Cre positiven Tier eine Konfiguration des *Gna13* Gens nachgewiesen, die der TypII-Deletion entspricht. Die PCR Daten wurden im Southernblot überprüft (Abbildung 21) und die Wildtyp; TypII positiven Tiere mit Wildtyp; TypII positiven Tieren gekreuzt. Die aus dieser Kreuzung unter

anderem resultierenden $Gna13^{flox/flox}$ (Abbildung 22) Mäuse wurden für alle weiteren Untersuchungen genutzt.

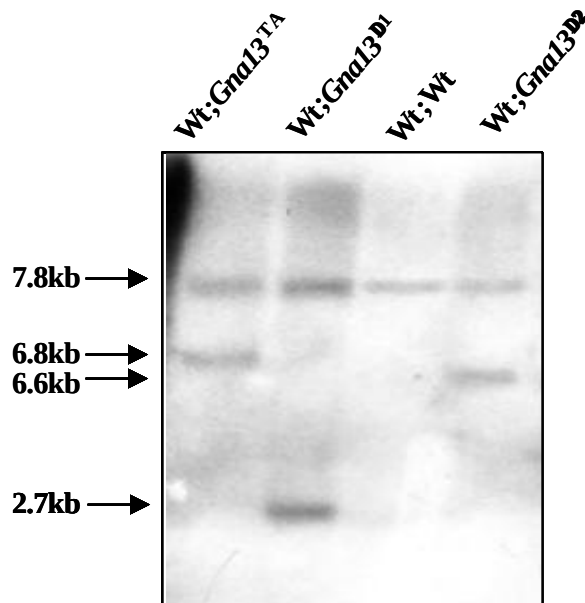


Abbildung 21: Southernblot Analyse von Wt;Gna13^{TA}, Wt;Gna13^{D1}, Wt;Wt und Wt;Gna13^{D2} Mäusen. Die genomische DNA wurde mit *SpeI* verdaut und mit der Sonde C hybridisiert. Wt: Wildtyp Allel; $Gna13^{TA}$: homolog rekombinierter Klon; $Gna13^{\Delta 1}$: TypI Deletion; $Gna13^{\Delta 2}$: TypII Deletion

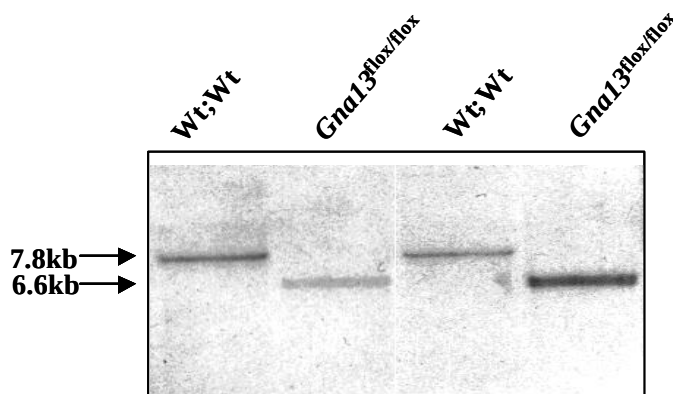


Abbildung 22: Southernblotanalyse von Nachkommen aus Wt;Gna13^{D2} Verpaarungen. Die genomische DNA wurde mit *SpeI* verdaut und mit der Sonde C hybridisiert. Wt: Wildtyp Allel; $Gna13^{flox/flox} = Gna13^{\Delta 2}$: TypII Deletion

5.7 Analyse von $Gna13^{flox/flox};Mlc2a^{Cre/+}$ Tieren

Um die Auswirkung einer kardiomyozytenspezifischen $G\alpha_{13}$ -Defizienz auf die Herzentwicklung bzw. die aus dieser Defizienz resultierenden Veränderungen auf den Organismus untersuchen zu können, wurden *MLC2a*-Cre transgene „Knock-in“ Mäuse, die Cre ab Tag e8,5 kardiomyozytenspezifisch exprimieren (1.8) zunächst in $Gna13^{flox/flox}$ Mäuse und parallel in die unter 1.8 beschriebene *Rosa26^{lacZ}*-Reporter Maus eingekreuzt. Über eine β -Galactosidase Färbung an Herz und Leber $MLC2a^{Cre/+};Rosa26^{lacZ}$ positiver Tiere sollte die Spezifität der Cre-Linie überprüft werden (Abbildung 23).

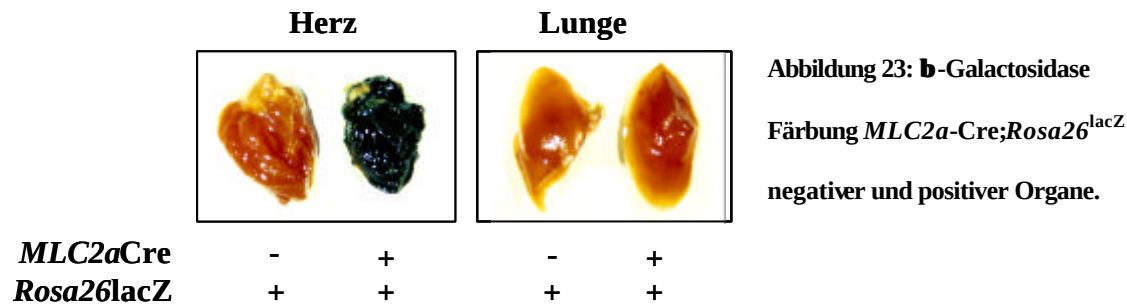


Abbildung 23: β -Galactosidase Färbung *MLC2a-Cre;Rosa26^{lacZ}* negativer und positiver Organe.

Nach kurzer Zeit konnte an Herzen aus *MLC2a^{Cre/+};Rosa26^{lacZ}* positiven Tieren eine eindeutige Blaufärbung beobachtet werden, während die Leber sowie diverse andere Organe, keine β -Galactosidase-Färbung erkennen ließ. Um die kardiomyozytenspezifische Rekombination im Herzen zu überprüfen, wurde eine Herzperfusion durchgeführt, Kardiomyozyten isoliert (4.17) und diese im Westernblot analysiert. Tatsächlich zeigt der Westernblot in aus *Gna13^{flox/flox};Mlc2a^{Cre/+}* Mäusen isolierten Kardiomyozyten eine vollständige Deletion des $G\alpha_{13}$ -Proteins.

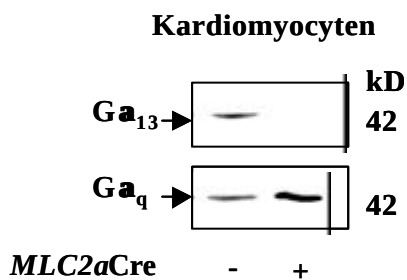


Abbildung 24: Westernblot an *Gna13^{flox/flox};Mlc2a^{Cre/-}* und *Gna13^{flox/flox};Mlc2a^{Cre/+}* Kardiomyozyten. Der Westernblot wurde mit einem Anti- $G\alpha_{13}$ - bzw. einem Anti- $G\alpha_q$ -Antikörper durchgeführt.

Als Beladungskontrolle wurde mit einem Anti- $G\alpha_q$ -Antikörper inkubiert. Dazu wurde der Anti- $G\alpha_{13}$ -Antikörper zunächst vom Westernblot heruntergewaschen und der Blot anschließend mit einem Anti- $G\alpha_q$ -Antikörper inkubiert. Da in einem von 70 untersuchten Nachkommen nur ein Tier mit einem *Gna13^{flox/flox};Mlc2a^{Cre/+}* Genotyp gefunden wurde, wurden schwangere Weibchen zu definierten Zeitpunkten der Schwangerschaft getötet und die Embryonen isoliert. Dazu wurden die Weibchen der entsprechenden Verpaarung morgens und abends auf Vaginalplugs untersucht und so der Zeitpunkt der Konzeption festgelegt. Nach 12,5, 15 bzw. 18,5 Tagen wurden die Weibchen getötet, die Embryonen isoliert und anhand des Dottersackes der Genotyp der Embryonen bestimmt. Diese Analyse ergab, dass zu jedem der untersuchten Zeitpunkte Embryonen mit dem gewünschten Genotyp *Gna13^{flox/flox};Mlc2a^{Cre/+}* nachgewiesen werden konnten. Manche dieser Embryonen waren in den untersuchten Entwicklungsstadien stark retardiert, während andere, auch kurz vor der Geburt, keine phänotypischen Veränderungen aufwiesen. Dieser variable Phänotyp deutet auf eine unspezifische Cre-Expression oder eine zeitlich nicht genau determinierte Rekombination hin. Es wurde daher ein Southernblot an verschiedenen Organen eines der überlebenden *Gna13^{flox/flox};Mlc2a^{Cre/+}* Tiere durchgeführt.

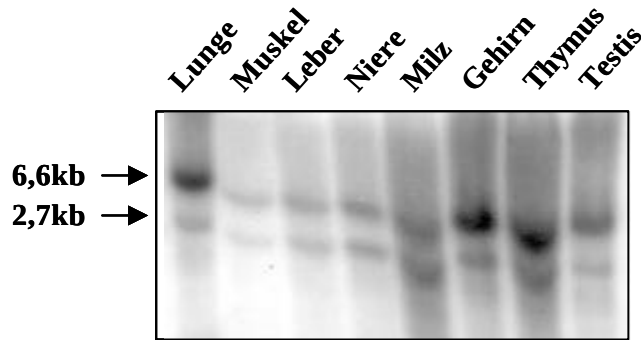


Abbildung 25: Southernblot verschiedener Organe einer $Gna13^{\text{flox/flox}};Mlc2a^{\text{Cre/+}}$ Maus. Als Sonde wurde nach einem *SpeI*-Verdau die interne Sonde C genutzt.

Dieser Southernblot zeigt eindeutig, dass in allen untersuchten Geweben eine durch die Rekombinase Cre hervorgerufene Rekombination vorliegt (Abbildung 25), sodass der variable Phänotyp sowie die geringe Überlebensrate der $Gna13^{\text{flox/flox}};Mlc2a^{\text{Cre/+}}$ Mäuse wahrscheinlich auf das Rekombinationsereignis in anderen Organen und nicht -oder zumindest nicht ausschließlich- auf die $G\alpha_{13}$ -Defizienz in Kardiomyozyten zurückzuführen ist. Die überlebenden $Gna13^{\text{flox/flox}};Mlc2a^{\text{Cre/+}}$ Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtyp Tieren keine phänotypischen Veränderungen, sind fertil und stehen für weitere Analysen zur Verfügung. Um untersuchen zu können, ob $G\alpha_{12}$ den Verlust von $G\alpha_{13}$ kompensieren kann, bzw. ob eine kardiomyozytenspezifische $G\alpha_{13}$ -Defizienz in einem $G\alpha_{12}$ -defizientem Hintergrund zu stärkeren phänotypischen Auswirkungen führt als die $G\alpha_{13}$ -Einfachdefizienz, wurden zunächst $Gna13^{\text{flox/flox}}$ Mäuse mit den klassischen $Gna12^{-/-}$ Mäusen (1.5) verpaart. Die aus diesem Verpaarungsschritt resultierenden $Gna12^{-/+};Gna13^{\text{flox/+}}$ Mäuse wurden mit $Mlc2a^{\text{Cre/+}}$ Tieren gekreuzt um $Gna12^{-/+};Gna13^{\text{flox/+}};Mlc2a^{\text{Cre/+}}$ zu erzeugen. $Gna12^{-/+};Gna13^{\text{flox/+}};Mlc2a^{\text{Cre/+}}$ wurden wiederum mit $Gna12^{-/-};Gna13^{\text{flox/flox}}$ Tieren verpaart. Aus dieser Verpaarung sollten 12,5% der Nachkommen folgenden Genotyp aufweisen: $Gna12^{-/-};Gna13^{\text{flox/flox}};Mlc2a^{\text{Cre/+}}$. Wie aus den Ergebnissen des kardiomyozytenspezifischen $Gna13$ -„Einzelknock-outs“ bereits zu erwarten war, konnte der $Gna12^{-/-};Gna13^{\text{flox/flox}};Mlc2a^{\text{Cre/+}}$ Genotyp nicht in der erwarteten Frequenz nachgewiesen werden. Tabelle 3 stellt die Genotypisierungsdaten der Verpaarung $Gna12^{-/+};Gna13^{\text{flox/+}};Mlc2a^{\text{Cre/+}}$ x $Gna12^{-/-};Gna13^{\text{flox/flox}}$ dar.

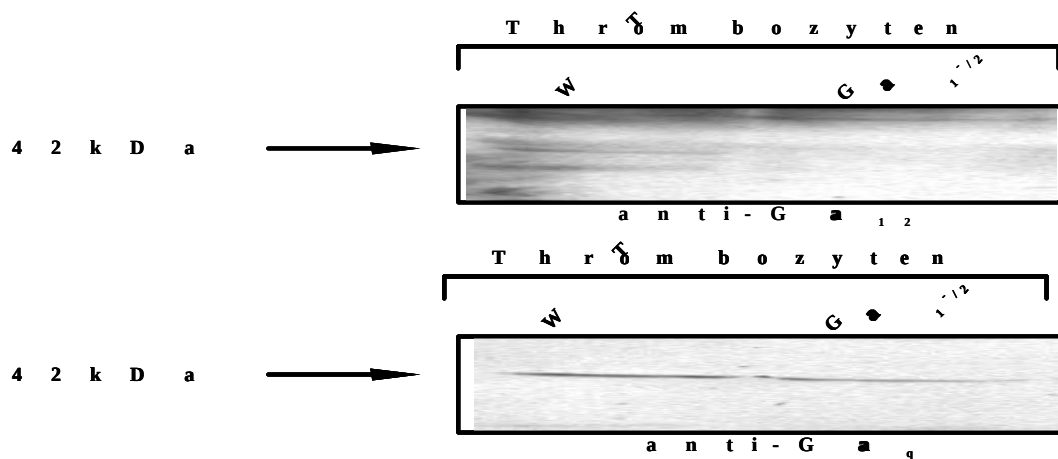
Tabelle 3: Genotypen der Nachkommen aus $Gna12^{-/-};Gna13^{flox/Wt};Mlc2a^{Cre/+}$ x $Gna12^{-/-};Gna13^{flox/flox}$ Verpaarungen

$G\alpha_{12}$	<i>Gna13</i>	<i>Mlc2a</i> ^{Cre/+}	Anzahl der Tiere	Wahrscheinlichkeit	% der Anzahl der Genotypen
+/-	flox/flox	+	19	12,5%	9.22
+/-	flox/Wt	+	33	12,5%	16.01
+/-	flox/flox	-	30	12,5%	14.56
+/-	flox/Wt	-	33	12,5%	16.01
-/-	flox/flox	+	2	12,5%	0.97
-/-	flox/Wt	+	27	12,5%	13.10
-/-	flox/flox	-	34	12,5%	16.50
-/-	flox/Wt	-	28	12,5%	13.59
Gesamt			206	100%	100%

Diese Daten zeigen, dass nur ein geringer Prozentsatz der $Gna12^{-/-};Gna13^{flox/flox};Mlc2a^{Cre/+}$ Tiere die Embryonalentwicklung überlebt. Interessanterweise sterben $Gna12^{-/-};Gna13^{flox/flox};Mlc2a^{Cre/+}$ Tiere mit einer noch höheren Frequenz als der konditionale kardiomyozytenspezifische *Gna13* „Knock-out“. Zur Zeit werden die überlebenden, phänotypisch unauffälligen $Gna12^{-/-};Gna13^{flox/flox};Mlc2a^{Cre/+}$ Mäuse miteinander verpaart, um eine kardiomyozytenspezifische $G\alpha_{12}^{-/-};G\alpha_{13}^{-/-};Mlc2a^{Cre/+}$ positive Kolonie aufzubauen und die Auswirkungen dieser kardiomyozytenspezifischen Doppeldefizienz auf die Herzfunktion und den Gesamtorganismus untersuchen zu können.

5.8 Leberregeneration an $Gna13^{flox/-}$, *tie-1* Cre Tieren

Das *tie-1* Gen codiert für eine Rezeptortyrosinkinase, die bereits während der frühen vaskulären Entwicklung Endothelzell-spezifisch exprimiert wird. Am Tag 8 der Embryonalentwicklung ist die Tyrosinkinase in Angioblasten, im Kopfmesenchym, in Endothelzellen der dorsalen Aorta sowie in Blutinseln des Dottersackes nachzuweisen (Korhonen et al., 1994). In *tie-1* Cre transgenen Mäusen ist die Expression der Cre-Rekombinase über den Maus *tie-1* Promotor fast ausschließlich auf Endothelzellen begrenzt (Gustafsson et al., 2001) und sollte damit nach Verpaarung mit $Gna13^{flox/flox}$ Tieren zu einer konditionalen $G\alpha_{13}$ -Defizienz in Endothelzellen führen. $Gna13^{flox/-};tie-1$ Cre Tiere sind phänotypisch unauffällig und werden mit einer normalen Frequenz geboren. Um die Auswirkung einer konditionalen $G\alpha_{13}$ -Defizienz in Endothelzellen auf die Leberregeneration überprüfen zu können, wurde an $Gna13^{flox/-};tie-1$ Tieren eine partielle Hepatektomie durchgeführt. Die Daten zu diesem Versuch sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Leberregeneration in % nach partieller Hepatektomie an *Gna13^{flox/-};tie-1* Mäusen

Im Vergleich zu den als Kontrollgruppe genutzten *Gna13^{flox/-};tie-1* negativen Tieren, konnte in den entsprechenden *Gna13^{flox/-};tie-1* Cre Mäusen keine reduzierte Leberregeneration gezeigt werden. Auch lässt die Lebermorphologie auf ein normales Regenerationsverhalten schließen. Um überprüfen zu können, ob eine vollständige Deletion von $G\alpha_{13}$ in Endothelzellen erfolgt ist, wurden mithilfe der „Primary Explant Technique“ Endothelzellen aus der thorakalen und abdominalen Aorta präpariert (4.16.1). Durch eine immunhistochemische Färbung wurde ein Endothelzell-spezifischer Marker -der von Willebrandt-Faktor- auf den isolierten Zellen nachgewiesen (4.16.3), und damit eindeutig gezeigt, dass es sich bei diesen Zellen in der Tat um Endothelzellen handelt.

Primary explant technique

B

C

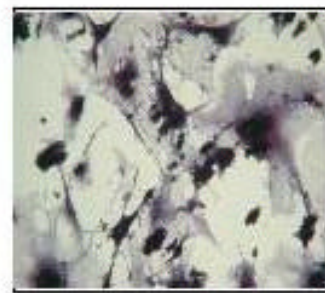
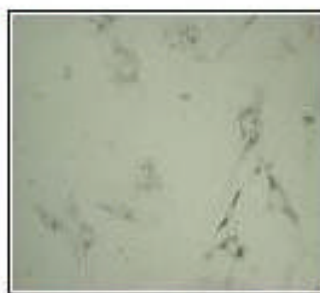


Abbildung 26: Endothelzell-Präparation aus der thorakalen und abdominalen Aorta der Maus. A) „Primary explant technique“ (aus Suh et al., 1999), B) Kontrollfärbung zu C, C) von Willebrandt-Faktor Färbung an Wildtyp Endothelzellen)

Da mit dieser Methode nicht ausreichend Material gewonnen werden konnte, um einen Westernblot an Endothelzellen aus *Gna13^{flox/-};tie-1* Cre positiven Tieren durchzuführen, wurden nach dem Tod der Tiere verschiedene Organe entnommen und ein Southernblot durchgeführt. Der Verdau erfolgte mit *SpeI*, die Hybridisierung mit der internen Sonde C.

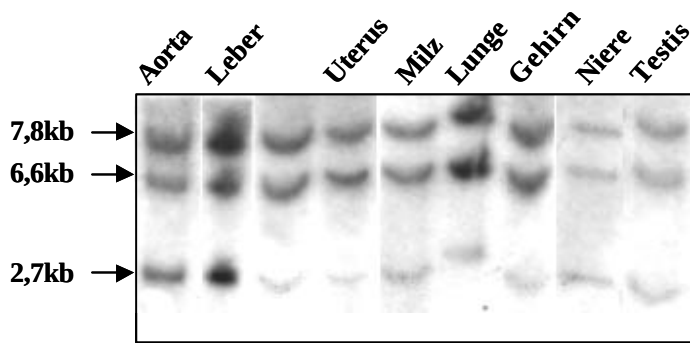


Abbildung 27: Southernblot an Geweben aus $Gna13^{flox/-};tie-1$ Cre Tieren. Die 7,8 kb Bande repräsentiert das Wildtyp-Allel aus dem klassischen $Gna13$ “Knock-out“, 6,6kb das durch $loxP$ -Stellen flankierte Allel und 2,7kb die TypI-Deletion.

Mithilfe des Southernblots konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Geweben aus $Gna13^{flox/-};tie-1$ Cre Tieren ein Rekombinationsereignis stattgefunden hat und dass stark endothelzellhaltige Gewebe, wie z.B. Aorta und Leber, eine höhere Rekombinationsfrequenz aufweisen als Gewebe mit einem geringeren Anteil an Endothelzellen. Um zu untersuchen, ob $Gna12^{-/-};Gna13^{flox/flox};tie-1$ Cre Tiere, ebenso wie die $Gna13^{flox/-};tie-1$ Cre Tiere überleben, wurden entsprechende Verpaarungen angesetzt. Die Auswertung der Genotypisierung aus diesen Verpaarungen ist in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5: Genotypen von Nachkommen aus $Gna12^{-/-};Gna13^{flox/-};tie-1$ Cre x $Gna12^{-/-};Gna13^{flox/flox}$ Verpaarungen

$Gna12$	$Gna13$	$tie-1$ Cre	Anzahl der Tiere	Wahrscheinlichkeit	% der Anzahl der Genotypen
+/-	flox/flox	+	12	12.5%	15
+/-	flox/Wt	+	11	12.5%	13.75
+/-	flox/flox	-	9	12.5%	11.25
+/-	flox/Wt	-	12	12.5%	15
-/-	flox/flox	+	2	12.5%	2.5
-/-	flox/Wt	+	10	12.5%	12.5
-/-	flox/flox	-	11	12.5%	13.75
-/-	flox/Wt	-	13	12.5%	16.25
Gesamt			80	100%	100

Diese Daten zeigen, dass $Gna12^{-/-};Gna13^{flox/flox};tie-1$ Cre Tiere, im Gegensatz zu $Gna13^{flox/-};tie-1$ Cre Tieren, zu einem großen Prozentsatz embryonal Letalmutanten darstellen, oder perinatal sterben. Für weitere Analysen wird zur Zeit zusätzlich zu den $Gna13^{flox/-};tie-1$ Cre Tieren eine $Gna12^{-/-};Gna13^{flox/flox};tie-1$ Cre Kolonie aufgebaut.

5.9 Leberresektion an $Gna13^{flox/-};Mx1$ -Cre Tieren

Ebenso wie für *Gna13^{flox/-};tie-1* Cre Tiere, wurde an *Gna13^{flox/-};Mx1*-Cre Tiere eine partielle Hepatektomie durchgeführt. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob eine $G\alpha_{13}$ -Defizienz in der Leber zu einer gestörten Leberregeneration führt, wurden PI-PC induzierte *Gna13^{flox/-};Mx1*-Cre Tiere einer partiellen Leberresektion unterzogen. Als Kontrolltiere wurden Mäuse gewählt, die ebenfalls einen *Gna13^{flox/-}* Genotyp aufweisen, PI-PC (Polyinosinic-Polycytidylic Acid) induziert wurden, aber *Mx1*-Cre negativ sind. Durch eine, im Abstand von zwei Tagen durchgeführte, sechsmalige intraperitoneale (i.p.) Injektion von je 250µg PI-PC, einem Interferon Induktor, kommt es zu einer Aktivierung des induzierbaren Promotors des *Mx1*-Cre Gens, sodass es in Mäusen, die ein durch *loxP*-Stellen flankiertes Gen sowie das *Mx1*-Cre Transgen tragen, zu einer inaktivierenden Mutation des durch *loxP*-Stellen markierten Gens kommt. Um die Rekombinationsfrequenz in PI-PC induzierten *Gna13^{flox/-};Mx1*-Cre Tieren zu überprüfen, wurden Cholatextrakte (4.9) aus verschiedenen Organen hergestellt und ein Westernblot durchgeführt (4.7). In PI-PC induzierten *Gna13^{flox/-};Mx1*-Cre Tieren kommt es zu einer vollständigen Deletion des $G\alpha_{13}$ Proteins in der Leber, wie durch den Westernblot mit dem Anti- $G\alpha_{13}$ Antikörper gezeigt werden konnte (Abbildung 28). Um gleiche Beladung mit $G\alpha_{13^{flox/-};Mx1$ -Cre und Wildtyp Cholaten nachzuweisen, wurde die Membran gewaschen, um den gebundenen Antikörper zu entfernen (Abbildung 28) und mit einem Anti- $G\alpha_q$ Antikörper inkubiert. In verschiedenen anderen Organen wie z.B. im Gehirn konnte hingegen keine Reduktion des $G\alpha_{13}$ Proteins nachgewiesen werden. Auch hierfür wurde ein Anti- $G\alpha_{13}$ - bzw. als Beladungskontrolle ein Anti- $G\alpha_q$ Westernblot durchgeführt (Abbildung 20).

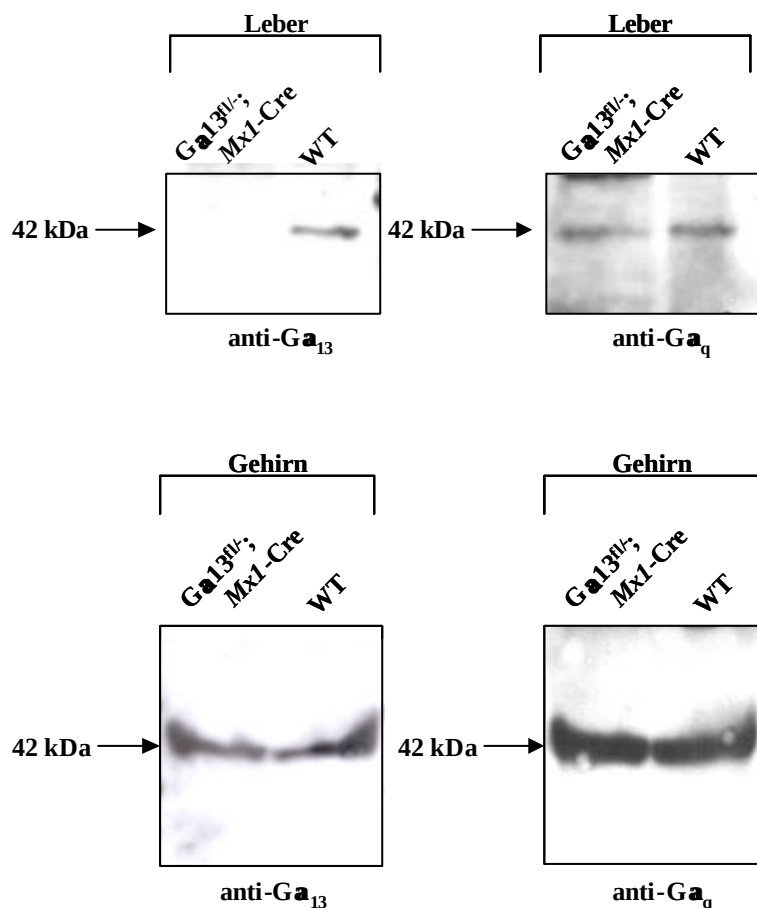


Abbildung 28: Westernblot Analyse mit Leber Cholatextrakten aus PI-PC induzierten *Gna13^{flox/-};Mx1*-Cre sowie Wildtyp Tieren. Als Antikörper wurden Anti- $G\alpha_{13}$ bzw. Anti- $G\alpha_q$ Antikörper verwendet.

Abbildung 29: Westernblot Analyse mit Leber Cholatextrakten aus PI-PC induzierten *Gna13^{flox/-};Mx1*-Cre sowie Wildtyp Tieren. Als Antikörper wurden Anti- $G\alpha_{13}$ bzw. Anti- $G\alpha_q$ Antikörper verwendet.

Nachdem eindeutig gezeigt werden konnte, dass PI-PC induzierte *Gna13^{flox/-};Mx1-Cre* Tiere in der Leber $G\alpha_{13}$ -defizient sind, wurden je 5 *Gna13^{flox/-}* Tiere und 5 *Gna13^{flox/-};Mx1-Cre* Mäuse mit PI-PC behandelt und einer partiellen Hepatektomie (4.15) unterzogen. Nach 72h wurden die Tiere getötet, die Leber entnommen und gewogen. Um eine Aussage über die Regenerationsfähigkeit der Leber von Wildtyp- bzw. konditional $G\alpha_{13}$ -defizienten-Tieren treffen zu können, wurden Tiere ähnlichen Alters und ähnlichen Körpergewichts für die Versuchsreihe gewählt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Leberregeneration in % nach partieller Hepatektomie an *Gna13^{flox/-};Mx1-Cre* Mäusen

Genotyp	Geschlecht	Geburtsdatum	Gewicht [g]	Gewicht Resektat [g]	Lebergewicht [g] 72h p. OP	Leberregeneration %	x
13flox ^{-/-} ;Mx ^{+/-}	f	30.09.2000	32,2	1.0	0.9	52,4	53
13flox ^{-/-} ;Mx ^{+/-}	f	24.09.2000	26,3	0.9	0.9	57,1	
13flox ^{-/-} ;Mx ^{+/-}	f	24.09.2000	23,2	0.8	0.7	51	
13flox ^{-/-} ;Mx ^{+/-}	m	21.09.2000	27,2	1.0	0.9	52,4	
13flox ^{-/-} ;Mx ^{+/-}	m	21.09.2000	28,3	1.0	0.9	52,4	
13flox ^{-/-} ;Mx ^{-/-}	f	30.09.2000	30,8	0.9	0.8	51,7	57
13flox ^{-/-} ;Mx ^{-/-}	f	24.09.2000	27,6	0.9	1.0	61,4	
13flox ^{-/-} ;Mx ^{-/-}	f	24.09.2000	22,2	1.0	0.9	52,4	
13flox ^{-/-} ;Mx ^{-/-}	m	21.09.2000	25,3	0.8	0.8	57,1	
13flox ^{-/-} ;Mx ^{-/-}	m	21.09.2000	30,3	0.9	1.0	61,4	

Zwischen *Gna13^{flox/-};Mx1-Cre* sowie Wildtyp Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied in der Leberregeneration beobachtet werden (Tabelle 6). Auch konnte anhand der Lebermorphologie kein Unterschied zwischen Wildtyp und Tieren beobachtet werden. Um die Rekombinationsfrequenz in verschiedenen Organen zu untersuchen, wurden nach dem Tod der Tiere verschiedene Organe entnommen und ein Southernblot durchgeführt. Der Verdau erfolgte mit *SpeI*, die Hybridisierung mit der internen Sonde C (Abbildung 30).

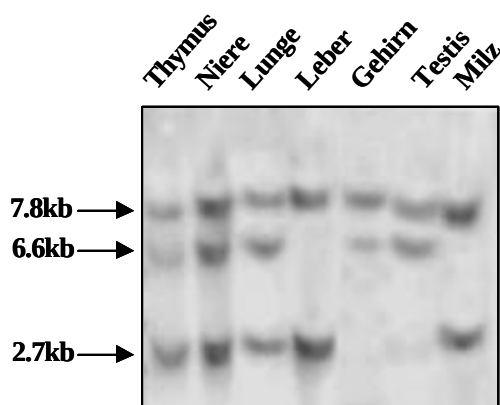


Abbildung 30: Southernblotanalyse an verschiedenen Organen aus *Gna13^{flox/-};Mx1-Cre* Tieren. Die 7.8kb Bande repräsentiert das Wildtyp-Allel aus dem klassischen *Gna13* "Knock-out", 6.6kb das durch *loxP*-Stellen flankierte Allel und 2.7kb die TypI-Deletion.

Sowohl in Leber als auch in der Milz führt die Induktion des *Mx1-Cre* Transgens zu einem vollständigen Rekombinationsereignis. Während im Thymus eine Rekombinationsfrequenz von ca. 75% vorliegt, werden in Niere und Lunge Frequenzen von ungefähr 50% erreicht. In Geweben wie Gehirn oder Herz scheint keine nachweisbare Rekombination stattzufinden (Abbildung 30).

5.10 Immunologische Analysen an *Gna13^{flox/-}*; *Mx1-Cre* Tieren

Um verschiedenste Untersuchungen an *Gna12^{-/-}*; *Gna13^{flox/flox}*; *Mx1-Cre* positiven Tieren durchführen zu können, wurde die entsprechende Linie durch verschiedene Verpaarungsschritte hergestellt. Da der Southernblot gezeigt hat, dass neben der Leber auch in der Milz eine starke Rekombination stattfindet, wurde ein Westernblot an Cholatextrakten der Milz durchgeführt, um in *Gna13^{flox/-}*; *Mx1-Cre*, PI-PC induzierten (Abbildung 31) sowie *Gna12^{-/-}*; *Gna13^{flox/flox}*; *Mx1-Cre* positiven und PI-PC induzierten Mäusen (Abbildung 32) die Menge an α_{13} - bzw. α_{12} - und α_{13} -Protein zu überprüfen.

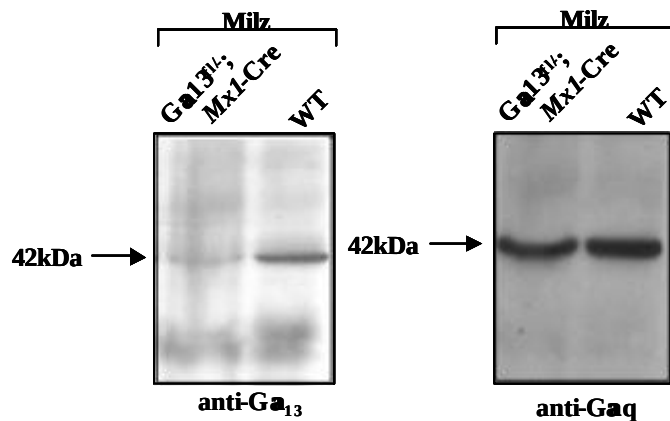


Abbildung 31: Westernblotanalyse an der Milz *Gna13^{flox/-}*; *Mx1-Cre*, PI-PC induzierter Mäuse. Die Membran wurde mit Anti- α_{13} Antikörper bzw. Anti- α_{12} Antikörper hybridisiert.

Als Beladungskontrolle wurde der Westernblot gewaschen, um den gebundenen Antikörper zu entfernen

und mit einem Anti- α_q -Antikörper inkubiert. Der Westernblot mit dem Anti- α_{13} Antikörper zeigt eindeutig eine massive Reduktion an α_{13} -Protein in der Milz im Vergleich zur Wildtypkontrolle.

Um Aussagen darüber treffen zu können, ob $G\alpha_{13}$ in immunologische Prozesse involviert ist, wurden erste Analysen an $Gna13^{flox/flox};Mx1-Cre$, PI-PC induzierten Tieren durchgeführt. Dazu wurden Zellen aus verschiedenen Geweben (Milz, Knochenmark, Lymphknoten, Peyer'sche-Plaques, Thymus) bzw. peripherem Blut isoliert (4.14.1), diese mit üblichen immunologischen Markern (3.10) markiert und FACS-Analysen (4.14.2) durchgeführt. In sämtlichen FACS-Analysen wurden als Kontrollmäuse zu den $Gna13^{flox/flox};Mx1-Cre$, PI-PC induzierten Tieren, $Gna13^{flox/flox};Mx1-Cre$ negative, PI-PC induzierte Tiere verwendet. Erste Untersuchungen wurden mit den T-Zell-spezifischen Markern CD4 und CD8 erhoben. T-Zellen lassen sich basierend auf der Expression von CD4- oder CD8- Membranmolekülen in zwei Gruppen unterteilen. Die CD4+ T-Zell-medierte Antigen Erkennung erfolgt in Assoziation der Klasse II MHC Moleküle, während CD8+ T-Zellen eine Assoziation der Klasse II MHC-Moleküle (Major Histocompatibility Complex) einschließen. CD4+ T-Zellen wirken in erster Linie als T-Helfer-Zellen; CD8+ T-Zellen fungieren hingegen primär als zytotoxische Zellen. Während im Knochenmark, in Lymphknoten, Peyer'schen-Plaques, Thymus bzw. peripherem Blut keine Unterschiede zwischen den zwei untersuchten Mausgruppen gemessen wurden, nimmt in der Milz die Zahl der CD4+-Zellen (T-Helfer Zellen) ab, die Zahl der CD4-/CD8- Zellen zu und die Zahl der CD8+, sowie CD4+/CD8+ Zellen bleibt konstant (Abbildung 32).

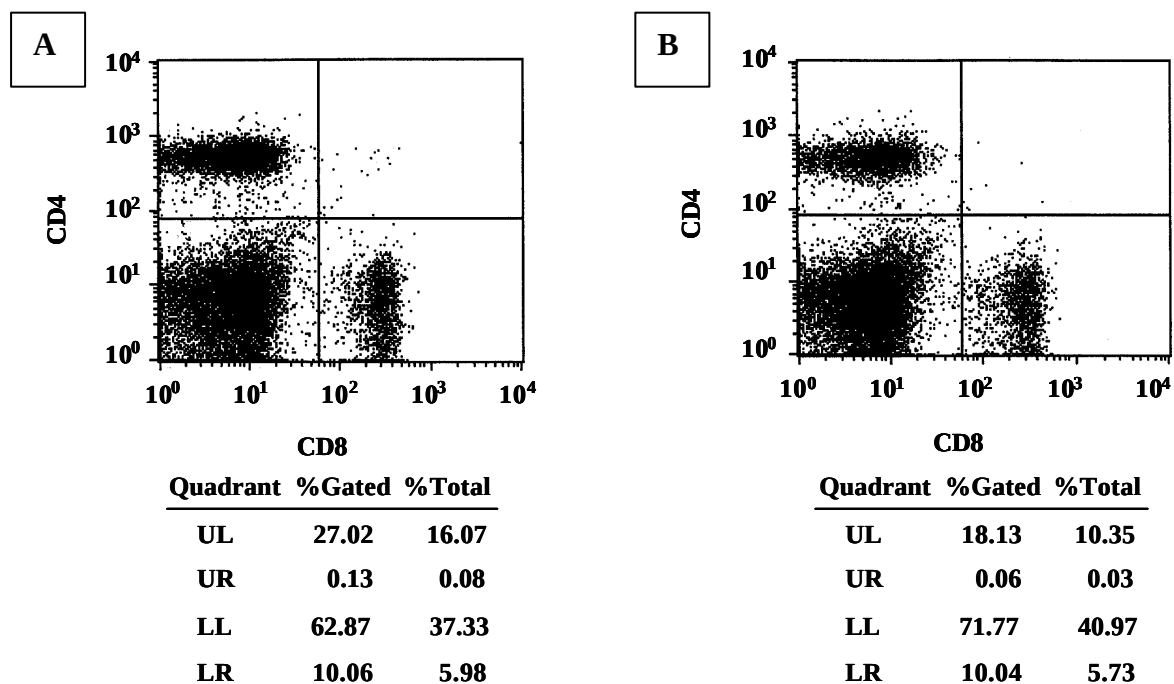


Abbildung 32: Splenozyten von Wildtyp (A) bzw. $Gna13^{flox/flox};Mx1-Cre$ PI-PC induzierten Mäusen (B) wurden mit den T-Zell-spezifischen Markern CD4 und CD8 markiert und ihre Verteilung auf den Zellen über FACS-Analysen bestimmt.

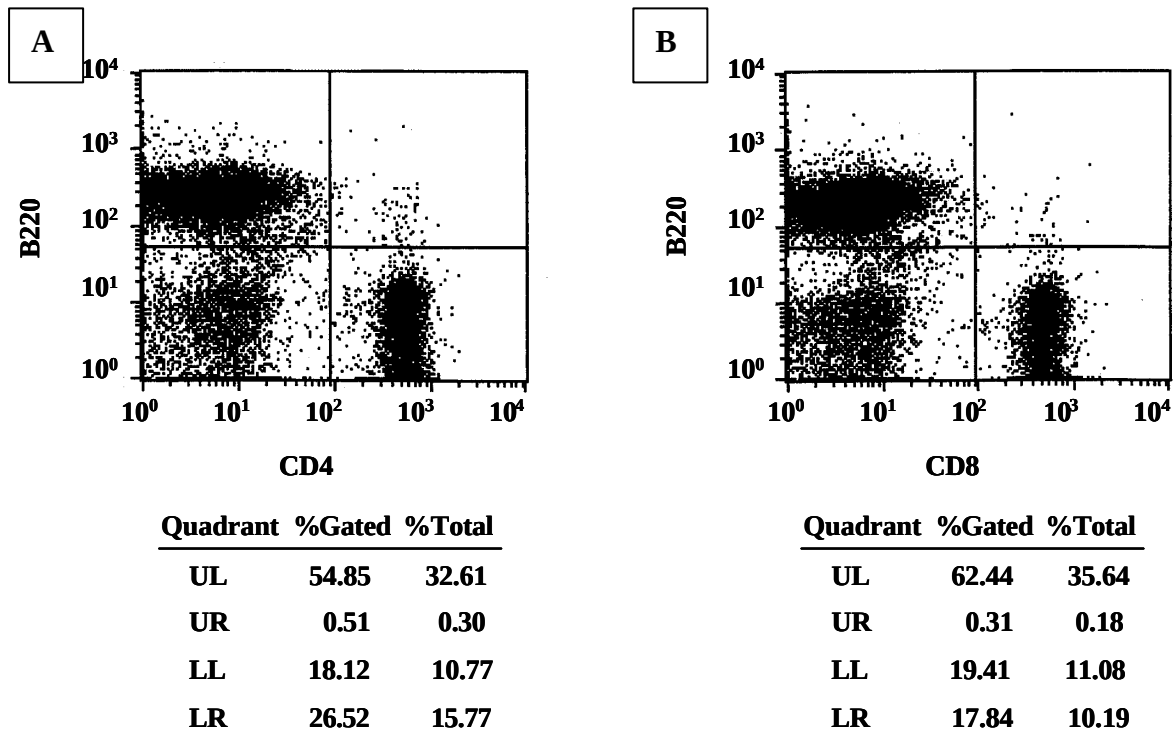


Abbildung 33: Splenozyten von Wildtyp (A) bzw. $Gna13^{flox/flox};Mx1-Cre$ PI-PC induzierten Mäusen (B) wurden mit TcR- sowie B-Zell-spezifischen Antikörpern markiert und über eine FACS-Analyse das Verhältnis von B- zu T-Zellen auf der Splenozytenoberfläche bestimmt.

Um das Verhältnis von B zu T-Zellen zu untersuchen, wurden B220 und TcR als Marker für die FACS-Analyse genutzt. Bei B220 handelt es sich um den frühesten Marker der B-Zell Linie, der während der Reifung der Vorläufer B-Zelle zum ersten Mal nachgewiesen werden kann und über die gesamte Lebensdauer einer B-Zelle erhalten bleibt. Der T-Zell Rezeptor (TcR) wird zuerst während der Reifung der T-Zellen im Thymus exprimiert und unterscheidet sich von membrangebundenen Antikörpern auf B-Zellen dahingehend, dass Tc-Rezeptoren ausschließlich Antigene erkennen können, die mit MHC-Molekülen assoziiert sind. In der Milz, nicht aber in den anderen untersuchten Organen, bzw. im peripheren Blut, konnte ein Unterschied im Verhältnis von B zu T-Zellen in $Gna13^{flox/flox};Mx1-Cre$ negativen, PI-PC induzierten Tieren im Vergleich zu $Gna13^{flox/flox};Mx1-Cre$, PI-PC induzierten Tieren gezeigt werden. Während der prozentuale Anteil der B-Zellen in $Gna13^{flox/flox};Mx1-Cre$, PI-PC induzierten Tieren ansteigt, sinkt die Menge an TcR positiven Zellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abbildung 33).

Da Daten aus anderen Arbeitsgruppen daraufhindeuten, dass $G\alpha_{12}$ und/oder $G\alpha_{13}$ an der Migration von B-Zellen in die Randzone der Milz involviert sind, und/oder deren Reifung beeinflussen (Girkontaite et al., 2001), wurde in $Gna13^{flox/flox};Mx1-Cre$, PI-PC induzierten Tieren sowie der entsprechenden Kontrollgruppe eine FACS-Analyse mit CD21/35 bzw. CD23 durchgeführt. Die Analyse der Zelloberflächenexpression von CD21/35 und CD23 unterscheidet zwischen unreifen B-Zellen ($CD21/35^{neg}CD23^{neg}$), follikulären B-Zellen ($CD21/35^{int}CD23^{hoch}$) und B-Zellen der Randzone ($CD21/35^{hoch}CD23^{neg}$). In der Tat konnte durch eine Splenozyten-Analyse von $Gna13^{flox/flox};Mx1-Cre$, PI-PC induzierten Tieren eine B Zell-Reduktion in der Randzone der Milz gezeigt werden (Abbildung 34).

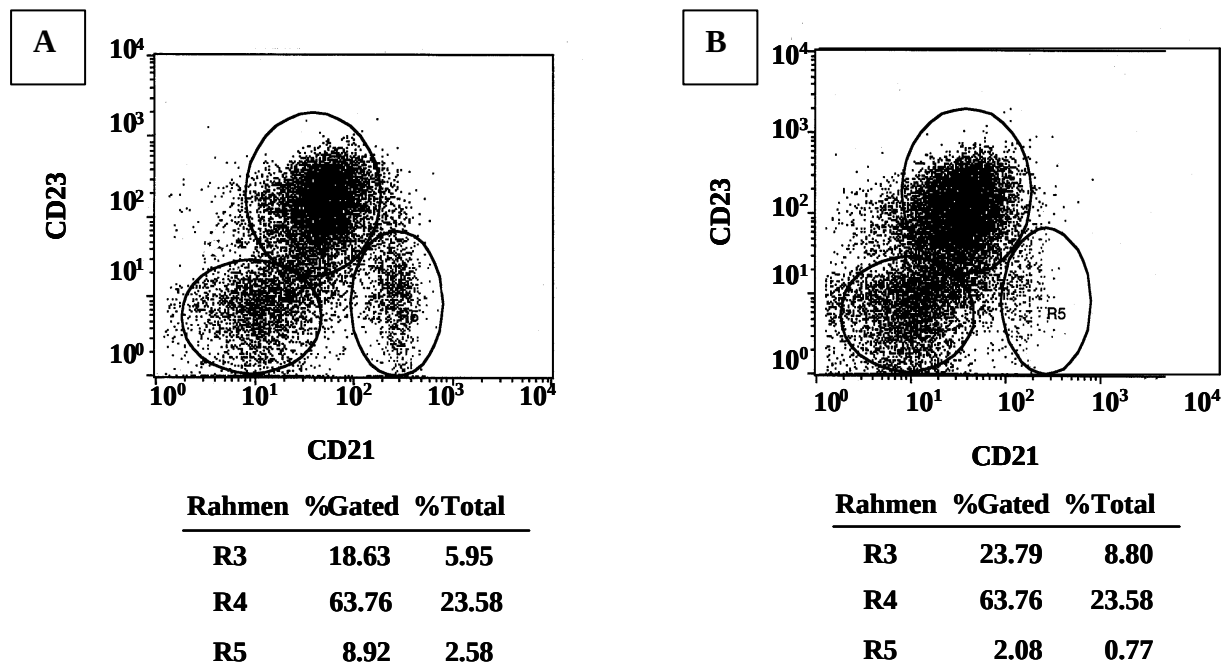


Abbildung 34: Analyse der Splenocyten von *Gna13^{flox/flox};Mx1-Cre*, PI-PC induzierten Tieren (B) im Vergleich zu Wildtyp Tieren (A) in der Randzone der Milz.

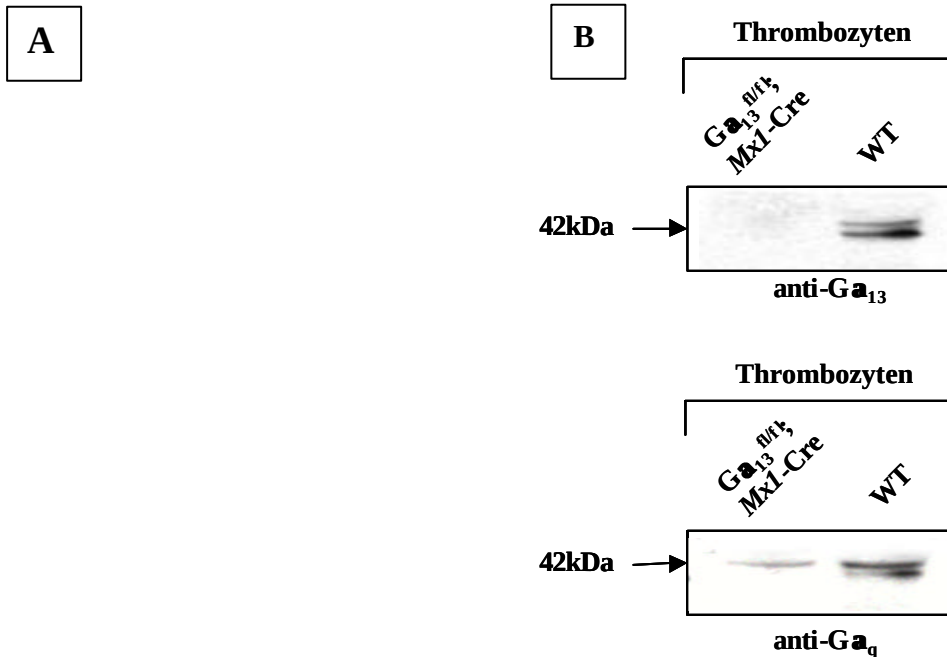
5.11 Untersuchungen an Thrombozyten aus *Gna13^{flox/-};Mx1-Cre* und *Gna12^{-/-};Gna13^{flox/flox};Mx1-Cre* Tieren

Da ebenso wie in Leber und Milz eine nahezu vollständige Rekombination in Zellen des hämatopoetischen Systems beschrieben wurde (Betz et al., 1998), sollte mit dem im Folgenden dargestellten Modell die Rolle von $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ in Thrombozyten untersucht werden. Um die Effizienz der Rekombinase-Cre im konditionalem System in Thrombozyten zu überprüfen, wurde zunächst der konditionale $G\alpha_q$ „Knock-out“ (*Gnaq^{flox/flox}*) mit *Mx1-Cre* Mäusen verpaart. Da in Studien am klassischen *Gnaq* „Knock-out“ eindeutig gezeigt werden konnte, dass $G\alpha_q$ -defiziente Tiere einen Aggregationsdefekt aufweisen (1.4), müsste im Falle einer maximalen Rekombination von Cre in *Gnaq^{flox/flox};Mx1-Cre* Tieren ein entsprechender Defekt zu beobachten sein. In der Tat konnte an Thrombozyten aus *Gnaq^{flox/flox};Mx1-Cre* Tieren im Vergleich zu einer entsprechenden Wildtyp Kontrolle selbst nach Gabe von 30 μ M U46619, einem Thromboxan-A₂ Mimetikum, keine Aggregation beobachtet werden.



Abbildung 35: Aggregationsmessung an Wildtyp sowie *Gnaq*^{flox/flox}; *Mx1*-Cre Tieren, nach Stimulation mit 30µM U46619.

Da mithilfe dieses Vorversuches eine hohe Effizienz der Rekombinase Cre in Thrombozyten nachgewiesen werden konnte, wurden *Gna13*^{flox/-}; *Mx1*-Cre Tiere sowie der *Gna13*^{flox/flox}; *Gna12*^{-/-}; *Mx1*-Cre konditionale „Doppelknock-out“ hergestellt und ebenso wie der klassische *Gna12* „Knock-out“ für weitere Aggregationsversuche (4.13.4) genutzt. Um sicherzustellen, dass in Thrombozyten aus *Gna13*^{flox/-}; *Mx1*-Cre bzw. *Gna13*^{flox/flox}; *Gna12*^{-/-}; *Mx1*-Cre kein $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ Protein mehr vorhanden ist, wurden Thrombozyten isoliert (4.13.1) und ein Westernblot durchgeführt (4.6.2). Die Westernblots wurden mit Anti- $G\alpha_{12}$ bzw. Anti- $G\alpha_{13}$ Antikörpern inkubiert und mit Anti- $G\alpha_q$ auf ähnliche Beladung der Spuren überprüft.



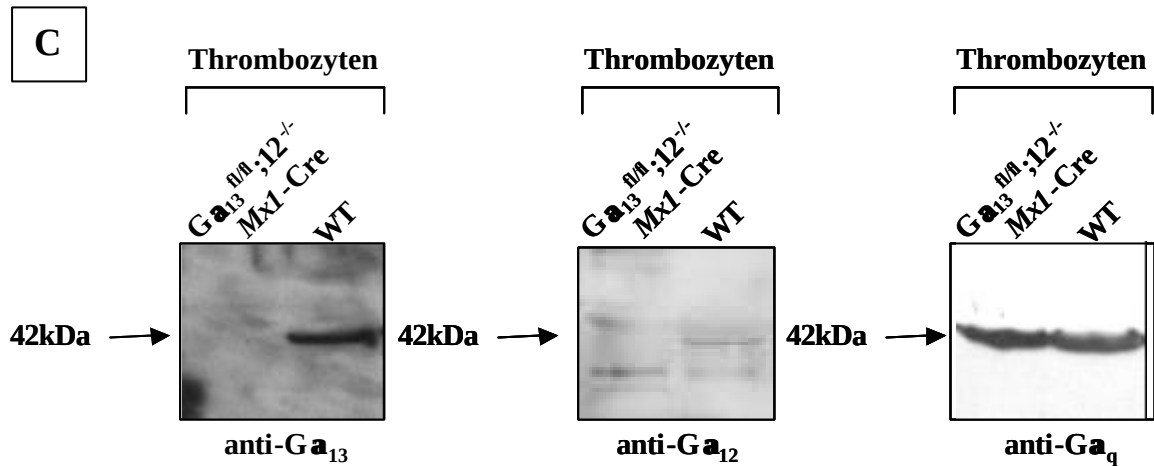


Abbildung 36: Westernblotanalyse an Wildtyp, $Gna12^{-/-}$ (A) und $Gna13^{flox/flox};Mx1-Cre$ (B) sowie $Gna12^{-/-};Gna13^{flox/flox};Mx1-Cre$ Thrombozyten (C).

Durch die Westernblots konnte gezeigt werden, dass die G-Protein α -Unterheiten $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ in den entsprechenden Thrombozyten nicht mehr exprimiert werden (Abbildung 36). Sämtliche Aggregationsversuche wurden sowohl in An- bzw. in Abwesenheit von Apyrase, einem „ADP-Scavenger“, durchgeführt. Durch den Zusatz von Apyrase wird ADP zu AMP umgesetzt und damit nachfolgenden Prozessen entzogen. Um sicherstellen zu können, dass die eingesetzte Menge an Apyrase ausreichend ist um endogenes ADP abzufangen und somit indirekt durch G_i -medierte Signaltransduktionswege auszuschließen, wurde ein Aggregationsversuch durchgeführt, indem Wildtyp Thrombozyten 3min vor Agonisten-Gabe mit 2u/ml Apyrase versetzt wurden. Als Agonist wurde ADP (30 μ M) verwendet. Wie in Abbildung 37 dargestellt ist, konnte selbst mit 30 μ M ADP in Anwesenheit von 2u/ml Apyrase keine Aggregation gemessen werden, während in den entsprechenden Kontroll-Thrombozyten ohne Apyrase nach Gabe von 30 μ M ADP eindeutig eine Aggregation nachzuweisen ist.

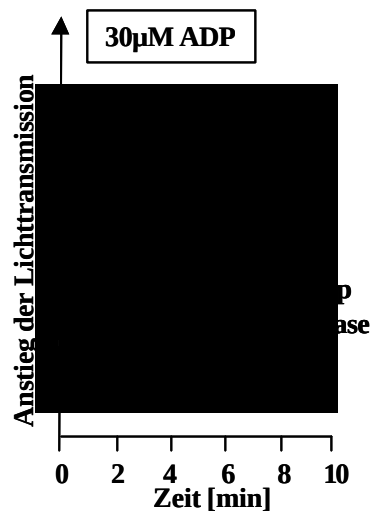


Abbildung 37: Wildtyp Thrombozyten wurden in An- und Abwesenheit von Apyrase mit 30μM ADP stimuliert.

Erste Aggregationsstudien wurden mit dem Thromboxan-A₂ Mimetikum U46619 an *Gna12*^{-/-}, ($G\alpha_{12}$ -defizienten), *Gna13*^{flox/-}; *Mx1*-Cre (konditional $G\alpha_{13}$ -defizienten) sowie *Gna13*^{flox/flox}; *Gna12*^{-/-}; *Mx1*-Cre (konditional $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ -doppeldefizienten) Thrombozyten in Anwesenheit von 2U/ml Apyrase durchgeführt. Während zwischen wildtypischen und $G\alpha_{12}$ -defizienten Thrombozyten keine signifikanten Unterschiede im „shape-change“ bzw. im Aggregationsverhalten gemessen werden konnten (Abbildung 38), zeigen konditional $G\alpha_{13}$ -defiziente (Abbildung 39) sowie konditional $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ -doppeldefiziente Thrombozyten eindeutige Defekte (Abbildung 40).

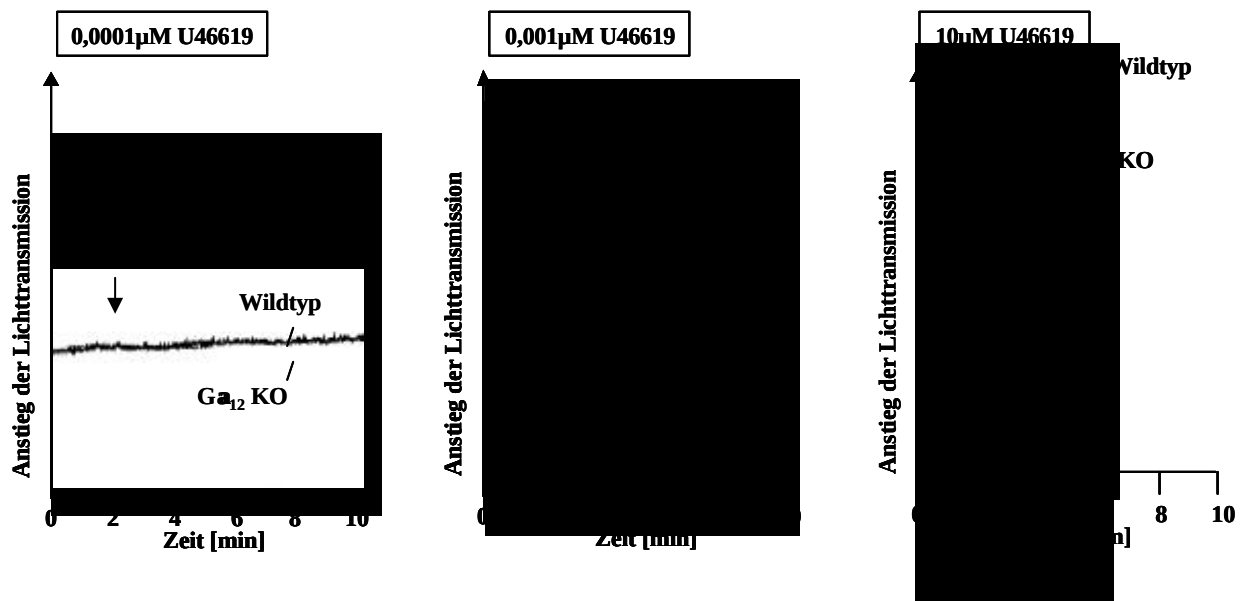


Abbildung 38: Stimulation von Wildtyp sowie $G\alpha_{12}$ -defizienten Thrombozyten ($G\alpha_{12}$ KO) mit steigenden U46619 Konzentrationen, in Anwesenheit von 2u/ml Apyrase.

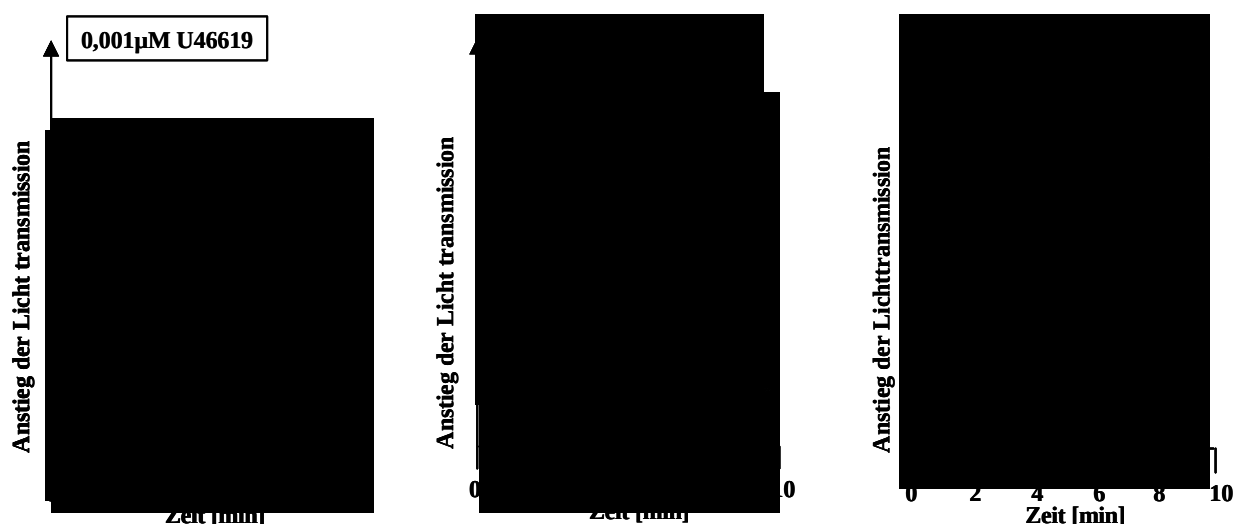


Abbildung 39: Stimulation von Wildtyp sowie konditional $G\alpha_{13}$ -defizienten Thrombozyten ($G\alpha_{13}$ KO) mit steigenden U46619 Konzentrationen, in Anwesenheit von 2u/ml Apyrase.

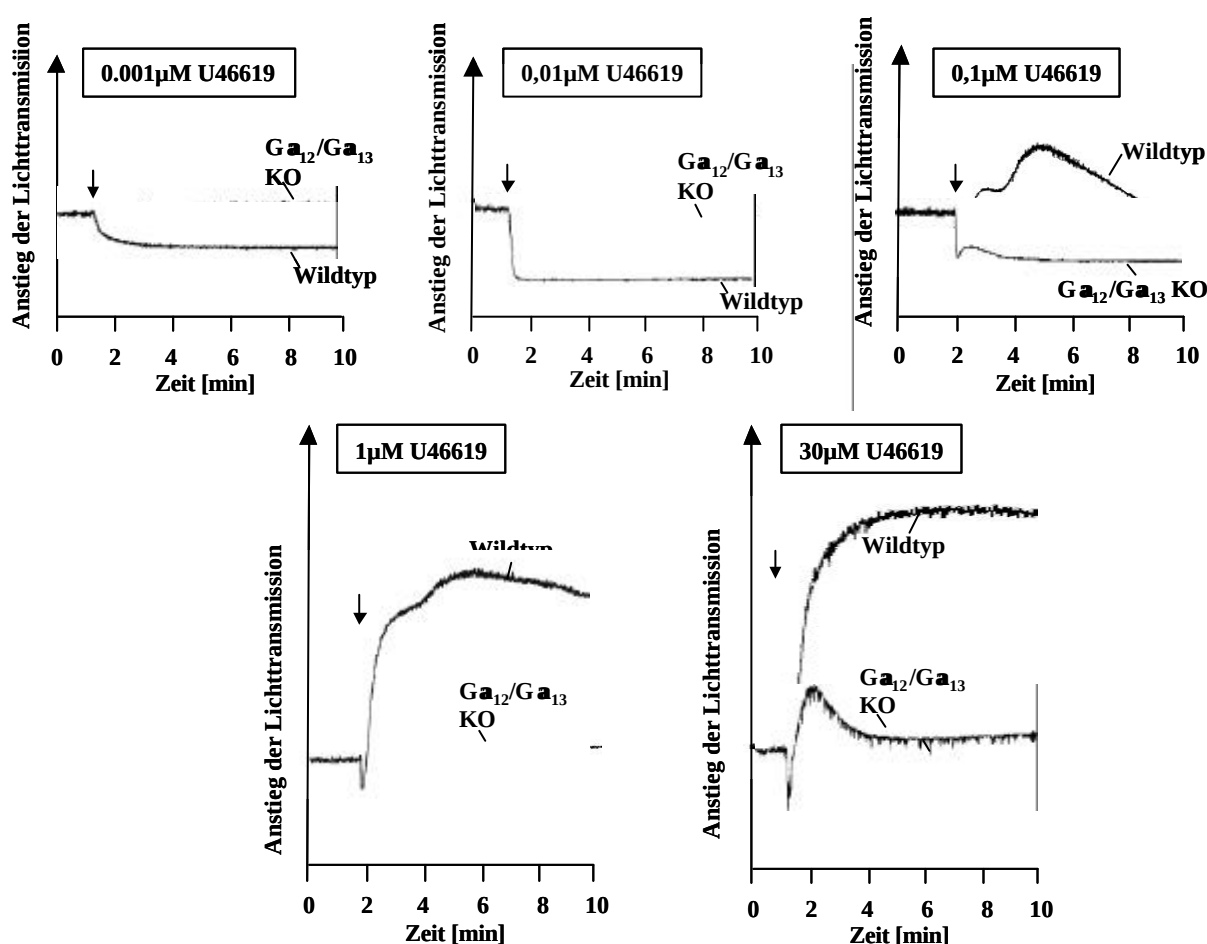


Abbildung 40: Stimulation von Wildtyp sowie konditional $G\alpha_{12};G\alpha_{13}$ -doppeldefizienten ($G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ KO) Thrombozyten mit steigenden U46619 Konzentrationen, in Anwesenheit von 2u/ml Apyrase.

Im Vergleich zu Wildtyp- und $G\alpha_{12}$ -defizienten Thrombozyten setzt der „shape-change“ bei einer konditionalen $G\alpha_{13}$ -Defizienz sowie in konditional $G\alpha_{12};G\alpha_{13}$ -doppeldefizienten

Thrombozyten bei etwa 100-fach höheren U46619 Konzentrationen ein. Bei intermediären U46619 Konzentrationen liegt in wildtypischen, sowie $G\alpha_{12}$ -defizienten Thrombozyten bereits eine vollständige, irreversible Aggregation vor, während konditional $G\alpha_{13}$ -defiziente sowie konditional $G\alpha_{12};G\alpha_{13}$ -doppeldefiziente Thrombozyten in Anwesenheit von Apyrase auch bei hohen U46619 Dosen [30 μ M] nicht vollständig und irreversibel aggregieren. Entsprechende Versuche wurden ebenfalls ohne den Zusatz des „ADP-Scavengers“ Apyrase durchgeführt. Während $G\alpha_{12}$ -defiziente Thrombozyten ebenso wie in Anwesenheit von Apyrase wie wildtypische Thrombozyten auf Gabe des Agonisten U46619 reagieren, konnte in konditional $G\alpha_{13}$ - bzw. konditional $G\alpha_{12};G\alpha_{13}$ -doppeldefizienten Thrombozyten ein deutlicher Unterschied im Aggregationsverhalten nach Agonistengabe in An- bzw. Abwesenheit von Apyrase beobachtet werden. Sowohl in konditional $G\alpha_{13}$ - wie auch in $G\alpha_{12};G\alpha_{13}$ -doppeldefizienten Thrombozyten wurde ohne den Zusatz von Apyrase mit 1 μ M U46619 eine leicht verzögerte, aber bereits vollständige und irreversible Aggregation gemessen (Abbildung 41).

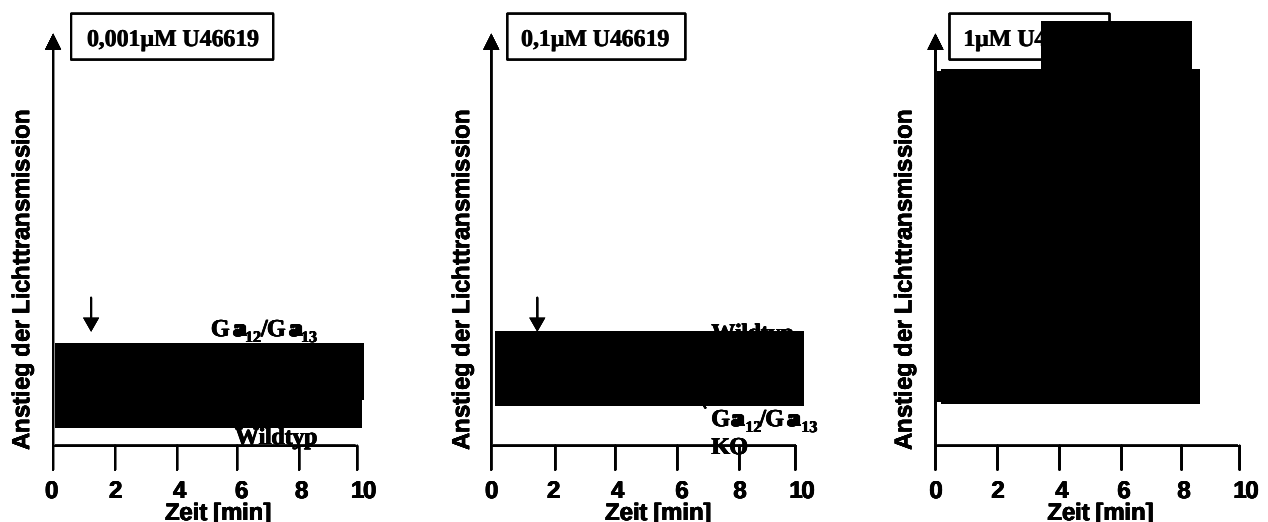


Abbildung 41: Stimulation von Wildtyp sowie $G\alpha_{12};G\alpha_{13}$ -doppeldefizienten Thrombozyten ($G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ KO) mit steigenden U46619 Konzentrationen, ohne Zusatz von 2 μ /ml Apyrase.

Ebenso wie in Anwesenheit von Apyrase setzt der „shape-change“ ohne Zusatz des „ADP-Scavengers“ in konditional $G\alpha_{13}$ - bzw. konditional $G\alpha_{12};G\alpha_{13}$ -defizienten Thrombozyten erst verzögert mit ca. 100fach höheren Konzentrationen U46619 ein. Um überprüfen zu können, ob es sich bei dem „shape-change“ Defekt tatsächlich ausschließlich um $G\alpha_{13}$ getragene Effekte handelt oder ob die $G\alpha_q$ -vermittelte Signaltransduktion ebenfalls in die Induktion des „shape-changes“ involviert ist, wurden $G\alpha_q$ -defiziente Plättchen sowie Wildtyp Plättchen mit geringen Dosen U46619 stimuliert und die „shape-change“ Reaktion untersucht. Zwischen $G\alpha_q$ -defizienten und Wildtyp Plättchen konnte bei niedrigen Konzentrationen U46619 kein Unterschied im Einsatz der „shape-change“ Reaktion beobachtet werden. Sowohl in $G\alpha_q$ „Knock-out“- als auch in Wildtyp-Thrombozyten setzt der „shape-change“ bei gleichen Agonisten Konzentrationen ein.

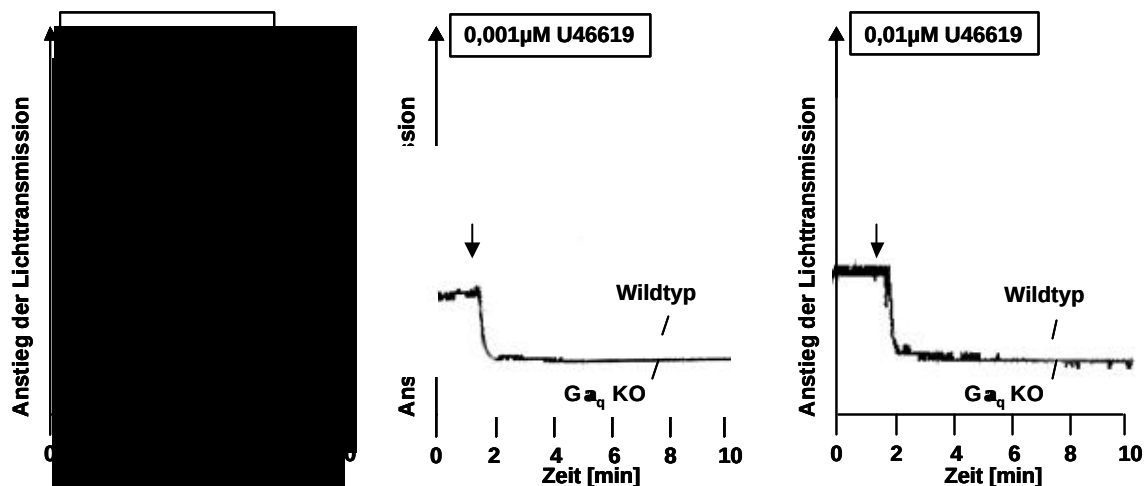


Abbildung 42: Stimulation von Wildtyp sowie $G\alpha_q$ -defizienten Thrombozyten ($G\alpha_q$ KO) mit steigenden U46619 Konzentrationen, ohne Zusatz von 2u/ml Apyrase.

Mithilfe dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass sich $G\alpha_{12}$ -defiziente Thrombozyten nach Gabe unterschiedlicher Konzentrationen U46619 ähnlich wie Wildtyp Thrombozyten verhalten. Im Gegensatz dazu zeigen konditional $G\alpha_{13}$ - sowie konditional $G\alpha_{12}, G\alpha_{13}$ -defiziente Thrombozyten sowohl ohne als auch nach Gabe von Apyrase und Stimulation mit U46619 einen massiven Defekt in der Induktion des Thrombozyten „shape-changes“. Aggregationsdefekte in $G\alpha_{13}$ - sowie konditional $G\alpha_{12}, G\alpha_{13}$ -defiziente Thrombozyten konnten ausschließlich unter Beteiligung von Apyrase beobachtet werden.

Um die Rolle verschiedener anderer Stimuli auf die $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ vermittelte Signaltransduktion zu untersuchen, wurden ADP, Collagen und Thrombin als Agonisten in Aggregationsexperimenten mit $G\alpha_{12}$ -, konditional $G\alpha_{13}$ - und konditional $G\alpha_{12}, G\alpha_{13}$ -defizienten Thrombozyten untersucht. Grundsätzlich wurde in allen mit $G\alpha_{12}$ -defizienten Thrombozyten durchgeführten Experimenten kein Unterschied zu den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen gefunden (Daten nicht gezeigt). Konditional $G\alpha_{13}$ - und konditional $G\alpha_{12}, G\alpha_{13}$ -defizienten Thrombozyten hingegen zeigen mit Collagen und Thrombin eine defekte „shape-change“ Reaktion, reagieren auf ADP allerdings ähnlich wie Wildtyp-Thrombozyten. Im Gegensatz zu U46619 als Agonist konnte allerdings auch nach Inkubation mit Apyrase und anschließender Stimulation mit Collagen und Thrombin kein Aggregationsdefekt beobachtet werden. Da zwischen konditional $G\alpha_{13}$ - und konditional $G\alpha_{12}, G\alpha_{13}$ -defizienten Thrombozyten nach Gabe dieser verschiedenen Stimuli, ebenso wie nach Gabe von U46619, keine Verstärkung der Defekte gemessen werden konnte, stellen Abbildung 43, Abbildung 44 und Abbildung 45 exemplarisch die Aggregationskurven nach Stimulation mit ADP, Collagen und Thrombin an konditional $G\alpha_{13}$ -defizienten Thrombozyten dar.

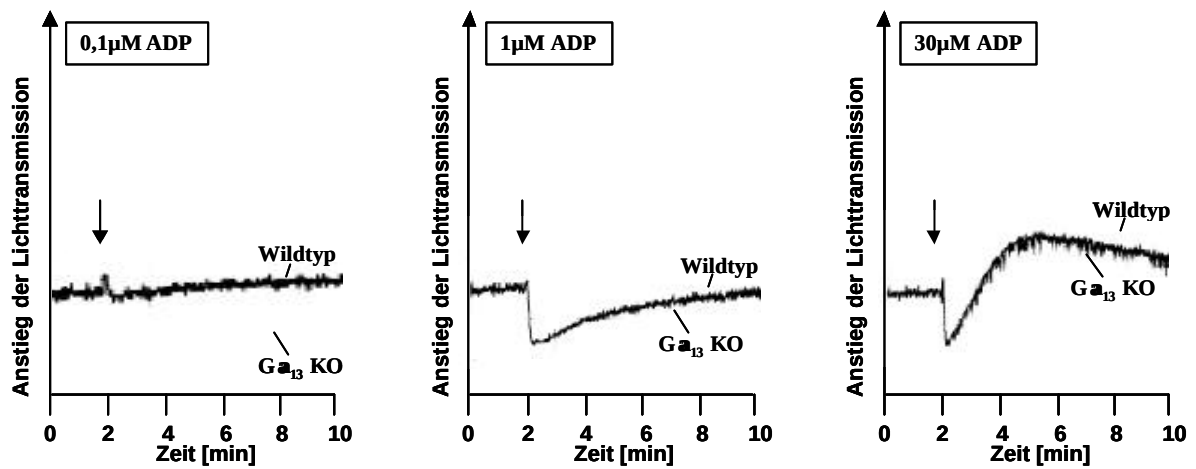


Abbildung 43: Stimulation von Wildtyp sowie konditional Ga_{13} -defizienten Thrombozyten (Ga_{13} KO) mit steigenden ADP Konzentrationen.

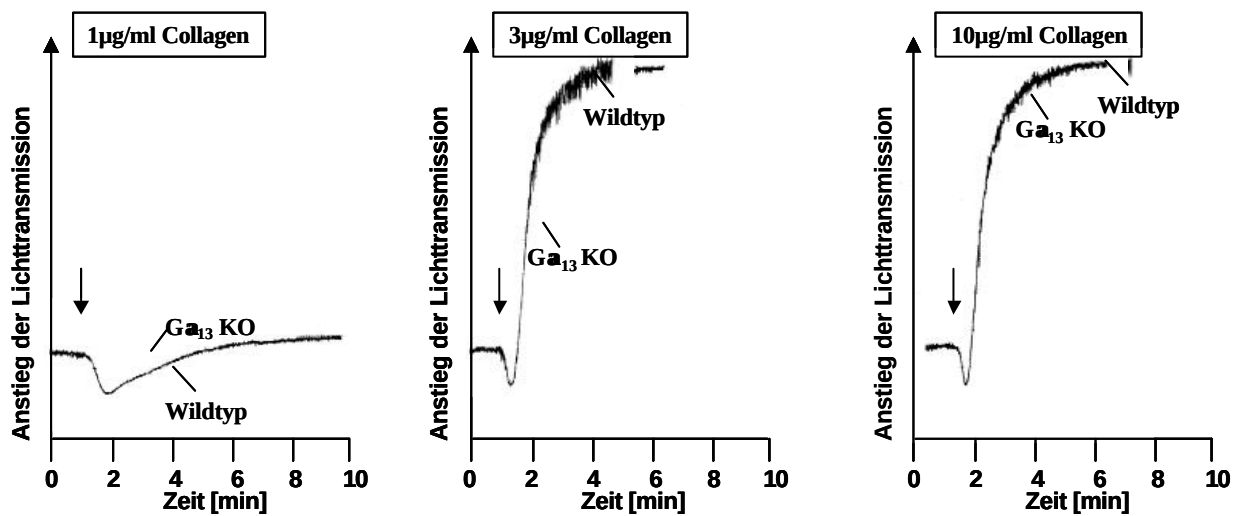


Abbildung 44: Stimulation von Wildtyp sowie konditional Ga_{13} -defizienten Thrombozyten (Ga_{13} KO) mit steigenden Collagen Konzentrationen, ohne Zusatz von Apyrase.

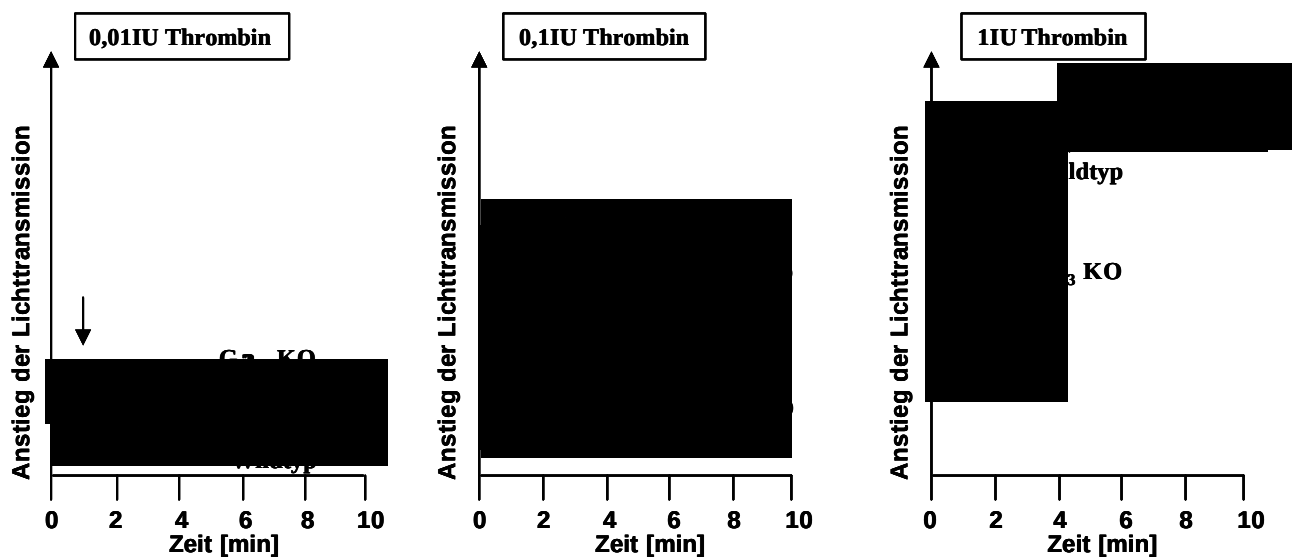


Abbildung 45: Stimulation von Wildtyp sowie konditional Ga_{13} -defizienten Thrombozyten mit steigenden Thrombin Konzentrationen, ohne Zusatz von Apyrase.

Um den in den Aggregationsexperimenten mit U46619 beobachteten Aggregationsdefekt in konditional Ga_{13} -defizienten sowie konditional $Ga_{12};Ga_{13}$ -doppeldefizienten Thrombozyten zu überprüfen, wurden die Blutungszeiten von $Gna13^{flox/flox};Mx1-Cre$ Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Tieren untersucht. Die Tiere wurden wie unter 4.12.4 beschrieben anästhesiert und die Blutungszeit wurde bestimmt. Der Versuch wurde nach maximal 20min beendet. Während die Blutung in Wildtyp Mäusen nach 3,5-5,5min zum Stillstand kommt, bluten konditional Ga_{13} -defiziente Tiere noch nach 20min. Abbildung 46 stellt graphisch das Ergebnis dieses Versuches dar.

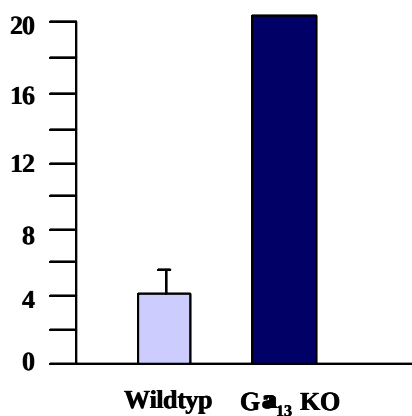


Abbildung 46: Die Blutungszeiten wurden an Wildtypen bzw. konditional Ga_{13} -defizienten Tieren bestimmt. Der Versuch wurde bei anhaltender Blutung nach 20min beendet.

Die verlängerte Blutungszeit in konditional Ga_{13} -defizienten Tieren zeigt, dass der *in vitro* in Thrombozyten beobachtete Defekt offensichtlich auch *in vivo* von Bedeutung ist.