

6 Diskussion

6.1 Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen

Die G-Proteine $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ werden ubiquitär exprimiert und konstituieren zusammen die $G\alpha_{12}$ -Familie. Funktionelle Unterschiede zwischen $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ sind neben verschiedenen *in vitro* Modellen (1.5) aus Studien an $G\alpha_{12}$ - und $G\alpha_{13}$ -defizienten Mäusen abzuleiten. Während an *Gna12* Null-Mutanten keine offensichtlichen Defekte beobachtet werden konnten, sterben $G\alpha_{13}$ -defiziente Embryonen am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung (Offermanns et al., 1997a). Daher wurde mittels des Cre *loxP*-Systems über homologe Rekombination in ES-Zellen eine Mauslinie generiert, die eine zeit- und gewebespezifische Inaktivierung des *Gna13* Gens ermöglicht und so funktionelle Analysen zu dieser G-Protein α -Untereinheit erleichtert.

Um die Voraussetzung für eine Cre-gerichtete Mutagenese zu schaffen, wurde das für ein funktionsfähiges *Gna13*-Gen essentielle Exon II sowie die Neomycinphosphotransferasekassette und die Thymidinkinasekassette mit je zwei gleichgerichteten *loxP*-Stellen flankiert (5.2). Entsprechend wurden in einem ersten Rekombinationsschritt insgesamt drei *loxP*-Stellen sowie o.g. Selektionsmarker in das Genom embryonaler Stammzellen integriert. Insgesamt konnte über dieses erste Rekombinationsereignis in ca. 0,1% der analysierten Klone (5.2) eine vollständige homologe Rekombination über Southernblotting (4.3) bzw. PCR (4.4) nachgewiesen werden. Mit einer Rekombinationsfrequenz von 0,1% wurden eher niedrige Rekombinationshäufigkeiten erreicht, die sich in der Literatur zwischen 25%-0,05% bewegen (Zhang et al., 1994). Die Rekombinationsfrequenzen sind vor allem von der Länge der Homologiearme (Deng et al., 1992) sowie dem Genlocus abhängig. Wie am HGPRT-Genlocus gezeigt werden konnte, steigt die Frequenz der homologen Rekombination mit zunehmender Homologielänge des Zielvektors (Hasty et al., 1991). Durch Verwendung isogener DNA wird die Rekombinationsfrequenz positiv beeinflusst (te Riele et al., 1992). Dieses scheint aber eine weitaus weniger wichtige Rolle zu spielen als der Genlocus selber, da auch vereinzelt bei Verwendung von Vektoren mit kurzen Homologien nicht isogener DNA gute Rekombinationsraten beobachtet werden konnten (Holtschke et al., 1996). Da der 5' Homologiearm des Zielvektors mit 1,2 kb bis zur externen *loxP*-Stelle sehr kurz ist, waren geringe Rekombinationsfrequenzen zu vermuten.

6.2 Cre-medierte Rekombination in embryonalen Stammzellen

Zwei der als homolog identifizierten embryonalen Stammzellklone wurden für den zweiten Rekombinationsschritt, die Cre-vermittelte Rekombination im Genom der ES-Zellen, genutzt (5.3). Unter ca. 5000 untersuchten Klonen konnte mit dem gewählten Cre-Plasmid p185Cre lediglich in 0,1% der Fälle eine TypI-Deletion identifiziert, nie aber eine TypII-Deletion nachgewiesen werden. Da in einem Großteil der überlebenden Klone kein Rekombinationsereignis stattgefunden hatte, wurde ein anderes Cre-Plasmid gewählt, das zusätzlich zum Cre-Gen das Pac-gen trägt. Dieses Gen kodiert für eine N-Acetyltransferase (pac) und ermöglicht die Anreicherung Cre-exprimierender Klone durch Selektion mit

Puromycin (Taniguchi et al., 1998). Tatsächlich führte die Elektroporation des als pIC-Cre-Pac bezeichneten Plasmids zu einer deutlich gesteigerten Effizienz bezüglich der Generierung von TypI- (20%) bzw. TypII-Deletionen (4%). Laut Literatur wurde unter Verwendung von pIC-Cre-Pac in Abhängigkeit vom Genlocus Rekombinationsraten zwischen 6% und 11% für TypII-Deletionen gefunden (Taniguchi et al., 1998).

6.3 Generierung und Identifizierung von Keimbahntransmittern sowie *Gna13*^{TA/TA} Mäusen

Vier homolog rekombinierte Klone sowie vier die TypII-Deletion tragende ES-Zellklone wurden in Blastozysten injiziert (4.12.3) und diese in scheinchwangere Leihmütter reimplantiert (4.12.4). Lediglich mit einem homolog rekombinierten Zellklon konnte eine Keimbahntransmission erzielt werden. Ein kritischer und für die Erzeugung von Mäusen mit gezielter Keimbahntransmission essentieller Parameter ist die Aufrechterhaltung des pluripotenten Status der embryonalen Stammzellen während des gesamten Zellkulturprozesses. Ausschließlich unter optimalen Bedingungen bleibt die Pluripotenz sowie die Euploidie (Pandolfi et al., 1997) der ES-Zellen erhalten, sodass nach Injektion in Blastozysten hochchimäre Tiere generiert werden können, die zur Keimbahntransmission des ES-Zellgenoms fähig sind (Evans et al., 1989; Longo et al., 1997). Von den erzeugten 10 Chimären war lediglich ein Tier in der Lage, die gewünschte Modifikation des *Gna13* Gens über die Keimbahn an die nächste Generation weiterzugeben. Vier der Chimären waren infertil, wobei zwei eine aberrante Entwicklung der Geschlechtsteile aufwiesen. Diese relativ geringe Keimbahntransmission könnte auf suboptimale Zellkultur und/oder Injektionsbedingungen zurückzuführen sein. Für die Mutation heterozygote Tiere (*Gna13*^{TA/+}) wurden untereinander verpaart, um zu untersuchen, ob die Insertion der Neomycinphosphotransferasekassette und der Thymidinkinasekassette in Intronbereiche des *Gna13*-Gens zu einer Unterbrechung oder Modifikation des G α_{13} -Proteins führt, eventuell zum Überleben notwendige Funktionen eingeschränkt sind oder aber wie in der Literatur beschrieben, die Reproduktion beeinträchtigt ist (Ramirez-Solis et al., 1993). *Gna13*^{TA/TA} Weibchen sind im Gegensatz zu *Gna13*^{TA/TA} Männchen phänotypisch unauffällig (Abbildung 19); ca. 50% der *Gna13*^{TA/TA} Männchen sind steril. Die Sterilität der Männchen ist vermutlich auf die Integration der Thymidinkinasekassette zurückzuführen, da in anderen Studien durch histologische Analysen eine Veränderung der Morphologie elongierter Spermatozoen nachgewiesen werden konnte, die vermutlich durch hohe Expressionslevel des HSV-TK Gens in diesen Zellen ausgelöst wird (Braun et al., 1990).

6.4 Analyse von *Gna13*^{flox/-}; *Ella*^{Cre/+} Mäusen

Da beschrieben worden ist, dass Kreuzungen zwischen Weibchen, die das „Zielkonstrukt“ in homolog rekombinierter Form trägt, und *Ella*^{Cre/+} Männchen, einer als „general-deleter“ bezeichneten Cre-transgenen Linie, in 40% der Nachkommen, Mischungen aus allen drei

möglichen Deletionstypen ergeben (Xu et al., 1998), wurden $Gna13^{TA/TA}$ Weibchen mit $Ella^{Cre/+}$ Männchen verpaart, um auf diesem Weg die Selektionsmarker zu entfernen und ein $Gna13$ Allel herzustellen, das abgesehen von den zwei 34bp langen $loxP$ -Sequenzen dem Wildtyp-Allel entspricht. In 25% der untersuchten Tiere konnte in der Tat ein Mosaik aus den drei verschiedenen Deletionstypen nachgewiesen werden (5.5). Durch die direkte Injektion der homolog rekombinierten Klone, konnte letztendlich die gewünschte Keimbahngängigkeit erzielt werden. Nachteilig an diesem Verfahren ist generell die benötigte hohe Anzahl an Mäusen, da nur zu einem bestimmten Prozentsatz (hier 25%, laut Literatur ca. 40%) in den Nachkommen aus $Gna13^{TA/TA} \times Ella^{Cre/+}$ ein Mosaik vorhanden ist. Eindeutige Vorteile sind allerdings offensichtlich:

1. Es liegt eine hohe Zeitersparnis gegenüber einer zweiten Runde Zellkultur vor, da die Injektion der embryonalen Stammzellen in Blastozysten direkt nach der Identifikation homolog rekombinierter Klone erfolgt.
2. Grundsätzlich birgt das wiederholte Auftauen und Einfrieren von homolog rekombinierten ES-Zellklonen die Gefahr, dass die ES-Zellen ihre Pluripotenz und Euploidie verlieren und somit keine Keimbahntransmission mehr erzielt werden kann bzw. eine eventuelle Aneuploidie zu unerwünschten Nebeneffekten führt (Liu et al., 1997; Longo et al., 1997).

Die aus weiteren Verpaarungen resultierenden, als $Gna13^{flox/flox}$ bezeichneten Tiere sind phänotypisch unauffällig und fertil. Parallel wurden $Gna13^{TA/-}$ Mäuse mit $Ella^{Cre/+}$ Tieren verpaart, um zu zeigen, dass eine Cre-medierte Rekombination des „geflochten“ Alleles in der Generierung eines Null-Alleles resultiert. Tatsächlich konnte durch die Reproduktion des klassischen Phänotypes in $Gna13^{TA/-};Ella^{Cre/+}$ Tieren (Abbildung 20) die Funktionsfähigkeit des Cre/ $loxP$ -Systems bestätigt werden.

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

Die Überexpression von $G\alpha_{13}$ in Kardiomyozyten *in vitro* löst eine Hypertrophiereaktion aus und steuert die entsprechenden transkriptionalen Effekte möglicherweise über einen Rho-abhängigen Mechanismus (Finn et al., 1999). Dass das RhoA neben den bereits gut dokumentierten zytoskelettären Veränderungen für herzspezifische Funktionen verantwortlich ist, geht ebenfalls aus Studien mit Mäusen die RhoA-transgen sind hervor. In diesen Tieren führt die Überexpression von RhoA zu einer Hypertrophie-Reaktion und als Folge darauf zu einer Dysfunktion des Artrioventrikularknotens sowie Kontraktionsdefekten (Sah et al., 1999).

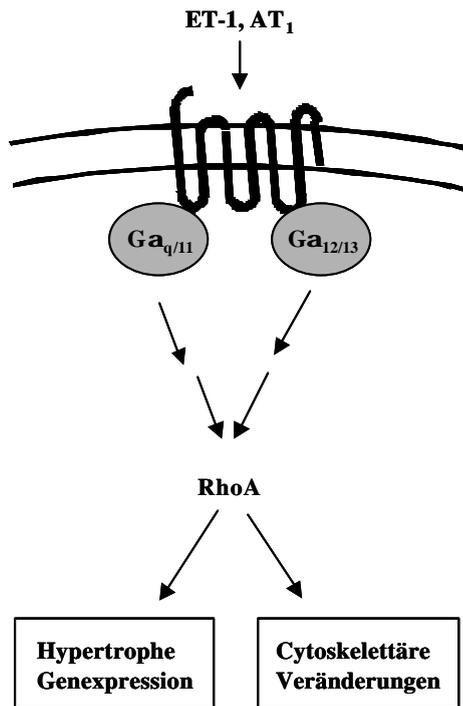


Abbildung 47: Die Aktivierung der G-Proteine $Ga_{q/11}$ und $Ga_{12/13}$ über den Endothelin- (ET-1) Rezeptor bzw. Angiotensin II- (AT₁) Rezeptor führt zu einer Aktivierung der kleinen GTPase Rho und damit verbundenen „downstream“ Effekten.

Da aber die phänotypischen Veränderungen dieser Mäuse von einer kompensierten Hypertrophie sehr verschieden sind, ist es nur schwer möglich sichere Aussagen über die tatsächliche Rolle von RhoA in der Hypertrophie-Reaktion zu treffen (Clerk et al., 2000). Mithilfe des konditionalen *Gna13* „Knock-out“ besteht nun die Möglichkeit über eine herzspezifische Inaktivierung durch eine entsprechende Cre-Linie die Beteiligung der Mitglieder der G_{12} -Familie an der myokardialen Hypertrophie zu untersuchen. Als Cre-Linie wurde ein als *Mlc2a-Cre* bezeichneter „Knock-in“ (1.8) gewählt. In der Tat konnte in Kardiomyozyten von *Gna13^{flox/flox};Mlc2a^{Cre/+}* Mäusen eine vollständige Deletion des $G\alpha_{13}$ -Proteins gezeigt werden (Abbildung 24). Da nur 13% der Tiere das Embryonalstadium überleben, scheint die Beteiligung von $G\alpha_{13}$ an der Herzentwicklung essentiell zu sein. Um zu überprüfen, ob der vorzeitige Tod *Gna13^{flox/flox};Mlc2a^{Cre/+}* Tiere ausschließlich auf eine myokardiale $G\alpha_{13}$ -Defizienz zurückzuführen und nicht mit einer extrakardialen Cre Rekombination in Zusammenhang zu bringen ist, wurden Embryonen zu verschiedenen Entwicklungsstadien (12,5, 15, 18,5 Tage p.c) isoliert und ihr Genotyp bestimmt. Zu jedem der untersuchten Zeitpunkte konnten stark retardierte Embryonen mit dem gewünschten Genotyp nachgewiesen werden. Da aber kein spezifisches Entwicklungsstadium beim Tod der Embryonen festgelegt werden konnte, schien eine unspezifische *Mlc2a^{Cre/+}* Rekombination wahrscheinlich. Diese Vermutung wurde durch einen Southernblot an *Gna13^{flox/flox};Mlc2a^{Cre/+}* Geweben bestätigt (Abbildung 25). In verschiedenen Organen bzw. Geweben (Leber, Milz, Muskel, Niere) wurde eine bis zu 50%ige Deletion des $G\alpha_{13}$ -Protein nachgewiesen. Aufgrund der unspezifischen Cre-Rekombination, lässt sich nicht sicher sagen, ob der intrauterine Tod der *Gna13^{flox/flox};Mlc2a^{Cre/+}* Tiere ausschließlich auf eine $G\alpha_{13}$ -Defizienz in Kardiomyozyten zurückzuführen ist. Interessanterweise sterben aber *Gna13^{flox/flox};Gna12^{-/-};Mlc2a^{Cre/+}* Mäuse mit einer deutlich höheren Frequenz als *Gna13^{flox/flox};Mlc2a^{Cre/+}* Tiere in

utero. Lediglich ca. 1% der Mäuse mit entsprechendem Genotyp überleben die ersten drei Wochen nach der Geburt. Auch bei $Gna13^{flox/flox};Gna12^{+/-};Mlc2a^{Cre/+}$ ist die Überlebensrate mit ca. 9% im Vergleich zu $Gna13^{flox/flox};Mlc2a^{Cre/+}$ noch stark reduziert. Momentan werden die Herzen neugeborener Tiere morphologisch und histologisch untersucht, um zu untersuchen ob die Mitglieder der G_{12} -Familie eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung normaler Herzfunktionen spielen. Um ebenso wie für $Gnaq^{flox/flox};Gna11^{-/-};Mlc2a^{Cre/+}$ Tiere (Wetschureck et al., persönliche Mitteilung) genaue Aussagen über die Beteiligung von $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ an der Hypertrophiereaktion treffen zu können, werden zur Zeit sowohl $Gna13^{flox/flox};Mlc2a^{Cre/+}$ Tiere als auch $Gna13^{flox/flox};Gna12^{-/-};Mlc2a^{Cre/+}$ einer Aortenbanding-Operation unterzogen und die Regulation hypertrophiespezifischer Marker untersucht.

Die unspezifische Cre-Expression in $Mlc2a^{Cre/+}$ „Knock-in“ Mäusen wirft die generelle Frage nach der Spezifität und Effizienz von Cre-Mauslinien auf. Durch β -Galactosidase Färbungen an $MLC2a^{Cre/+};Rosa26^{lacZ}$ positiven Tieren konnte z.B. gezeigt werden, dass bei längerer Inkubation in der β -Galactosidase-Färbelösung 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). Das Expressionsmuster der verwendeten Promotorregion ist sowohl verantwortlich für den Beginn der Expression als auch für die Spezifität der Cre-medierten Genmodifikation, während die Expressionslevel die Effizienz der Genmodifikation in einem bestimmten Zelltyp determinieren. Abhängig von der Zahl der Integrate und der Position der Integration variiert die Effizienz und Spezifität der transgenen Linien massiv (Palmiter et al., 1986). Bis heute existieren aber keine genauen Studien über das Verhältnis zwischen der Anzahl der notwendigen Cre-Moleküle in einer Zelle und dem Ausmaß der Deletion eines „geflochten“ Gensegments. Darüber hinaus scheint die Effizienz einer Cre-medierten Rekombination von der chromosomalen Lage der zu deletierenden Sequenz abzuhängen (Sauer, 1993).

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

Eine für Endothelzellen spezifische Expression wird durch eine transgene Cre-Linie erreicht, die Cre unter der Kontrolle des *tie-1* Promotors exprimiert. Das *tie*-Gen codiert für eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die in frühen Stadien der Blutgefäßbildung exprimiert wird. Um die Effizienz und Endothelzell-Spezifität verschiedener ES-Zellklone zu überprüfen, wurde die embryonale Stammzell- sowie die Embryoidkörpertechnologie genutzt (Gustafsson et al., 2001). Mit einem effizient und spezifisch rekombinierendem ES-Zellklon wurden Keimbahntransmitter hergestellt. Über β -Galactosidase Färbungen konnte gezeigt werden, dass über die generierte *tie-1* Cre-transgene Linie eine effiziente, Endothelzell-spezifische Deletion „gefloxter“ Allele ermöglicht wird. Lediglich in adulten erythroiden- myeloiden- und lymphoiden-Zellen sowie in Gehirnregionen wurde eine 12-20% ektopische Cre-Expression gefunden (Gustafsson et al., 2001). Um zu zeigen, dass in $Gna13^{flox/-};tie-1$ Cre Mäusen ebenfalls eine Endothelzell-spezifische Deletion von $G\alpha_{13}$ erfolgt, wurde versucht mithilfe der „primary-explant-technique“ eine für Westernblotting ausreichende Zellmenge zu generieren (Abbildung 26). Da aber nicht genügend Zellmaterial isoliert werden konnte,

wurde zumindest über Southernblotting gezeigt, dass ein Rekombinationsereignis stattgefunden hat (Abbildung 27). Die höchsten Rekombinationsfrequenzen wurden wie erwartet in endothelzellhaltigen Geweben wie Aorta und Leber nachgewiesen. Da für den intrauterinen Tod der klassisch *Gna13*-defizienten Mäuse am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung eine schwere Störung der Blutgefäßbildung während der Angiogenese im sich entwickelnden Embryo verantwortlich ist (Offermanns et al., 1997), die vorhergegangene vaskulogenetische Blutgefäßbildung aber intakt zu sein scheint, liegt die Vermutung nahe, dass $G\alpha_{13}$ keine essentielle Bedeutung während der Vaskulogenese übernimmt. Da Cre-exprimierende Linien ein limitierender Faktor in der Analyse konditionaler „Knock-outs“ sind, wurde trotz der frühen Cre-Expression (Gustafsson et al., 2001) die *tie-1* Cre Maus als Cre-transgene Linie gewählt. *Gna13^{flox/flox};tie-1* Cre Mäuse überleben die Embryonalentwicklung, obwohl die Cre-Expression bereits zu einem späten Stadium der Vaskulogenese bzw. zu Beginn der Angiogenese einsetzt. Bis die Cre-Expression allerdings zu einer vollständigen Deletion von *Gna13* geführt hat, könnte das Entwicklungsstadium, in dem $G\alpha_{13}$ für die Blutgefäßbildung essentiell ist, überschritten sein.

In verschiedenen zellulären Systemen konnten Hinweise darauf erhoben werden, dass Rho-medierte Prozesse an der Regulation des Zellwachstums beteiligt sind (Sah et al., 2000). Die Aktivierung von Rho und seinen „downstream“ Effektoren wird wiederum u.a. durch die G-Proteine $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ vermittelt (1.5). Eine Involvierung von Rho-medierten Prozessen an der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie erscheint daher wahrscheinlich.

Die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie beruht auf der Proliferation aller existierenden, reifen Zellen in der Leber. Das schließt Hepatozyten, biliare Epithelzellen, fenestrierte Endothelzellen, Kupfferzellen und Itozellen ein. *Gna13^{flox/flox};tie-1* Cre Mäuse wurden einer partiellen Hepatektomie unterzogen, um im adulten Organismus den Effekt einer $G\alpha_{13}$ -Defizienz in Endothelzellen auf die Leberregeneration zu untersuchen. Im Vergleich zu Wildtyptieren konnte nach 72h post OP keine signifikant verminderte Leberregeneration beobachtet werden. Da eine Aktivierung von RhoA und damit die Regulation der DNA-Synthese nicht ausschließlich über $G\alpha_{13}$ sondern auch über $G\alpha_{12}$ und die heterotrimeren G-Proteine $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ erfolgt, könnte es sein, dass die übrigen G-Protein α -Untereinheiten den Verlust von $G\alpha_{13}$ kompensieren. Weiterhin liegt die Vermutung nahe, dass primär andere, in der Leber vorkommenden Zelltypen für die gesteigerte DNA-Synthese und die damit verbundene Leberregeneration verantwortlich sind. In der Tat setzt die DNA-Synthese zunächst in Hepatozyten und anderen Zellen ein, während sinusoidale Endothelzellen erst nach 96h eine maximale DNA-Syntheserate erreichen (Abbildung 49).

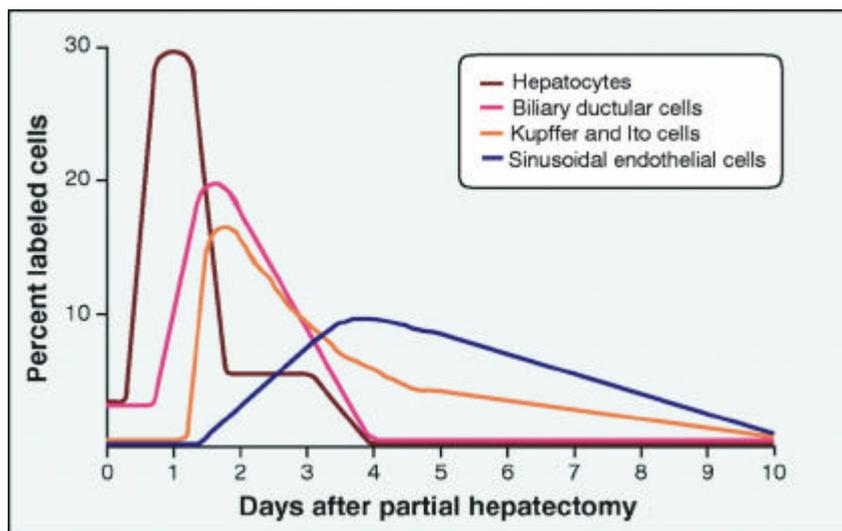


Abbildung 48: Kinetik der DNA-Synthese verschiedener Leberzell-Typen während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie (aus: Michalopoulos G. K., DeFrances M. C. (1997) Liver regeneration. Science. 4;276(5309):60-6. Review.)

Der zum intrauterinen Tod führende angiogenetische Defekt in *Gna13*^{-/-} Mäusen, wirft die Frage auf, ob das Fehlen von $G\alpha_{13}$ in Endothelzellen oder den umgebenden mesenchymalen Zellen für den Defekt verantwortlich ist. Da in *Gna13*^{flox/flox};*tie-1* Cre Mäusen kein Defekt in der Leberregeneration beobachtet werden konnte, besteht die Möglichkeit, dass tatsächlich die umgebenden mesenchymalen Gewebe für den angiogenetischen Defekt in $G\alpha_{13}$ -defizienten Mäusen verantwortlich sind. Um die durch die G_{12} -Familie mediierte Signaltransduktionskaskade vollständig zu unterbrechen, wurden *Gna13*^{flox/flox};*tie-1* Cre Mäuse mit *Gna12*^{-/-} Tieren verpaart, um eine Mauslinie zu erhalten, die eine konditionale Inaktivierung von *Gna13* in Endothelzellen in einem $G\alpha_{12}$ -defizientem Hintergrund erlaubt. Interessanterweise überleben nur 2,5% der *Gna13*^{flox/flox};*Gna12*^{-/-};*tie-1* Cre Mäuse die Embryonalentwicklung, sodass bisher keine Leberregenerationsstudien an den entsprechenden „Doppelknock-out“ Tieren durchgeführt werden konnten. Wenn man bei diesen überlebenden Tieren von einer reduzierten Effizienz der Rekombinase-Cre in Endothelzellen ausgeht, zeigt dieser Befund, dass die mit Einsatz der Vaskulogenese beginnende Cre-Expression in Endothelzellen, und die damit verbundene Deletion von *Gna13* in einem $G\alpha_{12}$ -defizientem Hintergrund zu massiven Entwicklungsstörungen führt. Dieses würde zu der These führen, dass bereits eine $G\alpha_{13}$ -Defizienz zu angiogenetischen Defekten wie im klassischen *Gna13* „Knock-out“ führen würde, um Störungen in der Vaskulogenese hervorzurufen, aber beide Mitglieder der G_{12} -Familie benötigt werden. Allerdings wäre auch vorstellbar, dass ebenso wie bei *Mlc2a*^{Cre/+} Tieren, trotz der sorgfältigen Analyse der *tie-1* transgenen Linie, keine spezifische Cre-Rekombination erfolgt und auch in anderen Geweben eine Deletion des *Gna13* Gens hervorgerufen wird. In Kombination mit dem $G\alpha_{12}$ -defizientem Hintergrund könnte dieser Effekt zu einer embryonalen Letalität führen. Um die Effizienz und Spezifität der Cre mediierten Rekombination beurteilen zu können, werden zur Zeit immunhistochemische Analysen an verschiedenen Geweben von überlebenden *Gna13*^{flox/flox};*Gna12*^{-/-};*tie-1* Cre

Tieren durchgeführt. Parallel werden $Gna13^{flox/flox};Gna12^{-};tie-1$ Cre Embryonen zu verschiedenen Entwicklungsstadien präpariert um an ihnen eine histologische Analyse durchzuführen und eventuelle vaskulogenetische Defekte zu untersuchen.

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

Um überprüfen zu können, ob der Verlust von $G\alpha_{13}$ in Hepatozyten zu einer Störung der Leberregeneration führt, wurde die durch Interferon induzierbare $Mx1$ -Cre-Linie in $Gna13^{flox/-}$ Tiere eingekreuzt. Anhand eines Westernblots konnte die nahezu vollständige Deletion von $G\alpha_{13}$ in der Leber gezeigt werden. Allerdings konnte auch in diesen Tieren keine defekte Leberregeneration nach partieller Hepatektomie beobachtet werden. Dieses deutet draufhin, dass $G\alpha_{13}$ keine essentielle Rolle während der Leberregeneration übernimmt oder aber andere G-Protein α Untereinheiten den Verlust von $G\alpha_{13}$ kompensieren können. Weiterhin wäre vorstellbar, dass G-Protein-unabhängige Signaltransduktionswege für einen entsprechenden Regenerationsmechanismus verantwortlich sind. Untersuchungen an $Gna13^{flox/flox};Gna12^{-};Mx1$ -Cre Mäusen konnten bisher aufgrund zu geringer Tierzahlen nicht durchgeführt werden.

6.8 Immunologische Analysen an $G\alpha_{13}^{flox/-};Mx1$ -Cre Tieren

Da im Westernblot neben der Leber auch in der Milz eine nahezu vollständige $G\alpha_{13}$ -Defizienz gezeigt werden konnte, wurden immunologische Untersuchungen an Splenozyten von $Gna13^{flox/flox};Mx1$ -Cre Tieren durchgeführt.

Interessanterweise ist das Verhältnis von B- zu T-Zellen im Vergleich zu entsprechenden Wildtypkontrollen zugunsten der B-Zellen verändert (Abbildung 33). Untersuchungen des T-Zellkompartiments mit CD4 und CD8 als Oberflächenmarker haben gezeigt, dass die Zahl der T-Helferzellen (CD4+-Zellen), nach Deletion von $G\alpha_{13}$ abnimmt. Die Rho-Familie der kleinen GTPasen spielt eine kritische Rolle für die zytoskelettärer Organisationen und die Zellmotilität in verschiedenen Zellsystemen (Drubin et al., 1996; Drgonova et al., 1996; Zipkin et al., 1997), wie auch während der Lymphozyten Polarisierung und Migration (Borrito et al., 2000). Da unter anderem die G-Proteine der G_{12} -Familie für eine Rho-Aktivierung verantwortlich sind, könnte durch das Fehlen von $G\alpha_{13}$ die Wanderung CD4+ T Lymphozyten aus dem Thymus in die Peripherie verändert und reduziert sein. Neben einem T-Zell-spezifischen Defekt konnte in $Gna13^{flox/flox};Mx1$ -Cre Tieren aber auch ein B-Zell-spezifischer Defekt beobachtet werden. So wurde in der Randzone der Milz im Vergleich zu Wildtyp Zellen eine Reduktion der B-Zellen beobachtet. Guinamard et al. konnten zeigen, dass in Mäusen, die eine Defizienz für die Tyrosinkinase Pyk-2 aufweisen, B-Zellen in der Randzone der Milz selektiv fehlen (Guinamard et al., 2000). Pyk-2 führt zur Aktivierung eines „Serum response element“ (SRE) Reporter Gens, „downstream“ von $G\alpha_{13}$, über einen Rho-abhängig Signaltransduktionsweg. Pyk-2 wird durch $G\alpha_{13}$ und weniger stark auch durch $G\alpha_{12}$ aktiviert (Shi et al., 2000). Die RGS Domäne des Guaninnukleotidaustauschfaktors Lsc hingegen, blockiert eine durch $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -medierte Pyk-2 Aktivierung. Rho liegt „upstream“ einer NF- κ B Aktivierung und ebenso wie Pyk-2 defiziente Mäuse zeigen NF- κ B-defiziente Tiere einen selektiven Verlust von B-Zellen in der Randzone der Milz (Cariappa et al., 2000). Auch im klassischen Lsc „Knock-out“ kommt es interessanterweise zu einer

Reduktion der B-Zellen in der Randzone der Milz (Girkontaite et al., 2001). Verschiedene Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs), u.a. p115Rho-GEF, zeigen eine eindeutige Spezifität für Rho (Aasheim et al., 1997; Glaven et al., 1996; Hart et al., 1996; Hart et al., 1998; Fukuhara et al., 2000). Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass Rho-spezifische GEF's Signale von der G₁₂-Familie heterotrimerer G-Proteine zu Rho tansduzieren können. Die Aktivierung von G α ₁₂ und G α ₁₃ durch verschiedene Agonisten führt danach, wie unter 1.6.2 beschrieben zu einer Interaktion mit den LH/RGS Domänen von p115Rho-GEF, dem humanen Homolog zu Lsc. Dieses wiederum führt zu einer Aktivierung der Guaninnukleotidaustauschfaktoren und dem GDP/GTP Austausch an der kleinen GTPase Rho, was in der Aktivierung Rho abhängiger Signaltransduktionswege resultiert. Demnach besteht in lymphozytären Systemen möglicherweise eine Signaltransduktionskaskade, die aus G α ₁₂/G α ₁₃, Pyk-2, Lsc und NF- κ B besteht und die Migration der B-Zellen in die Randzone der Milz beeinflusst. Als mögliche diesen Signalweg regulierende Rezeptoren kommen solche der Edg-Familie (Kranenbourg et al., 2001; Fukushima et al., 2001) oder G2A in Betracht (Kabarowski et al., 2000). Im Falle einer G α ₁₂ /G α ₁₃-Defizienz würde die dargestellte Interaktion mit p115 Rho-GEF und eventuellen anderen Guaninnukleotidaustauschfaktoren nicht mehr stattfinden und eine Aktivierung der kleinen GTPase Rho verhindert werden. Das wiederum würde die deutliche Reduktion der B-Zellen in der Randzone der Milz erklären.

6.9 Untersuchungen an Thrombozyten $Gna13^{fllox/-}$; $Mx1$ -Cre Tieren

Die meisten der physiologischen Aktivatoren von Thrombozyten, wie ADP, Thromboxan A_2 und Thrombin wirken über ihre G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die wiederum zu einer Aktivierung von G_i , G_q , G_{12} und G_{13} führen.

Tabelle 7: G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die die Thrombozytenaktivierung vermitteln

| Rezeptor | Stimulus | G-Protein |
|-------------------|------------------|-------------------------------------|
| PAR-1/3 | Thrombin | G_{a_i} G_{a_q} $G_{a_{12/13}}$ |
| PAR-4 | | G_{a_i} G_{a_q} $G_{a_{12/13}}$ |
| P2Y ₁ | ADP | G_{a_q} ($G_{a_{12/13}}$) |
| P2Y ₁₂ | | G_{a_i} |
| TPa | Thromboxan A_2 | G_{a_q} $G_{a_{12/13}}$ |
| TPb | | G_{a_q} $G_{a_{12/13}}$ |

Da Untersuchungen an $G\alpha_q$ -defizienten Thrombozyten auf eine Involvierung der G-Proteine $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ in frühe Prozesse der Thrombozytenaktivierung, nach Gabe des Thromboxan A_2 Mimetikums U46619, das neben G_q ausschließlich zu einer Aktivierung von G_{12} und G_{13} führt, hindeuteten (Klages et al., 1999), wurden sowohl $G\alpha_{12}$ -, konditional $G\alpha_{13}$ -einzeldefiziente und konditional $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -doppeldefiziente Thrombozyten für die entsprechenden Analysen genutzt. Im Vergleich zu Wildtyp- und $G\alpha_{12}$ -defizienten Thrombozyten setzt der „shape-change“ in konditional $G\alpha_{13}$ -defizienten und konditional $G\alpha_{12};G\alpha_{13}$ -doppeldefizienten Thrombozyten bei ca. 100-fach höheren U46619 Konzentrationen ein. Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass vornehmlich $G\alpha_{13}$ und nicht $G\alpha_{12}$ in die Induktion des durch U46619 mediierten „shape-changes“ in Thrombozyten involviert ist. Diese Befunde bestätigen die Daten aus $G\alpha_q$ -defizienten Thrombozyten, die auf eine Involvierung der G_{12} -Familie in die frühe Aktivierung der Thrombozyten hinweisen (Klages et al., 1999).

Die diskoide Form ruhender Thrombozyten wird durch Mikrotubuli, die ringförmig an der Peripherie der Thrombozyten angeordnet sind, aufrechterhalten. Nach ihrer Aktivierung ordnen sich die Mikrotubuli um und ermöglichen eine Zentralisierung der Granulae, die der eigentlichen Sekretion vorausgeht (Escolar et al., 1987). Während der Sekretion fusionieren die Membranen der Granulae mit den Invaginationen der Thrombozytenmembran. Parallel dazu kommt es zur Filopodienbildung und im Falle einer Adhäsion zum „Spreading“ der Thrombozyten. Sowohl in konditional $G\alpha_{13}$ -einzeldefizienten als auch in konditional $G\alpha_{12};G\alpha_{13}$ -doppeldefizienten Thrombozyten könnte bei geringen U46619 Konzentrationen ein Kontraktionsdefekt vorliegen, der die Zentralisierung der Granulae und damit den „shape-change“ verzögert. Dieser Vorgang könnte ebenso wie andere kontraktorische Prozesse

(Suzuki et al., 1999) über einen Rho/Rhokinase-abhängigen Mechanismus reguliert werden (Klages et al., 1999).

Interessanterweise wurde neben dem bereits erwarteten „shape-change“ Defekt in $G\alpha_{13}$ -defizienten Thrombozyten in Anwesenheit von Apyrase ein massiver Aggregationsdefekt beobachtet (Abbildung 39). Bei intermediären U46619 Konzentrationen liegt in wildtypischen sowie $G\alpha_{12}$ -defizienten Thrombozyten bereits eine vollständige, irreversible Aggregation vor, während konditional $G\alpha_{13}$ -einfachdefiziente sowie konditional $G\alpha_{12};G\alpha_{13}$ -doppeldefiziente Thrombozyten in Anwesenheit von Apyrase, einem ADP „scavenger“, auch bei hohen U46619 Dosen [30 μ M] nicht vollständig und nur irreversibel aggregieren (Abbildung 40). Da der Defekt in konditional $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -doppeldefizienten Thrombozyten nicht verstärkt wurde und $G\alpha_{12}$ -defiziente Thrombozyten wie Wildtyp-Zellen reagieren (Abbildung 41), konnte auch hier eindeutig gezeigt werden, dass $G\alpha_{12}$ nicht in die Aktivierungskaskade der Thrombozyten, die zur Aggregation führt, involviert ist. Erste Untersuchungen deuten daraufhin, dass in konditional $G\alpha_{13}$ -einfachdefizienten sowie konditional $G\alpha_{12},G\alpha_{13}$ -doppeldefizienten Thrombozyten eine reduzierte Sekretion sowie eine verminderte Fibrinogenrezeptor Aktivierung stattfindet (Daten nicht gezeigt).

Eine vollständige Thrombozyten-Aggregation besteht aus der Degranulation, der Fibrinogenrezeptor-Aktivierung sowie dem „inside out signalling“ des $\alpha_{IIb}\beta_3$ Fibrinogen Rezeptors. Während die Freisetzung des „dense-granula“ Inhaltes bereits bei niedrigen Agonisten Konzentrationen einsetzt, wird für die Sekretion der „ α -Granulae“ eine hohe Agonisten Konzentration benötigt. „Dense-granula“ sind kalziumreich, enthalten anorganische Phosphate und aktivierende Substanzen wie Serotonin oder ADP (Mannel et al., 1997). α -Granulae hingegen enthalten hauptsächlich Proteine, die für Coagulationsprozesse und Aggregationsvorgänge von Bedeutung sind. Nach Gabe von U46619 als Agonist, kommt es erst in Folge der Degranulation zur Freisetzung von ADP und anderen Mediatoren, was in der weiteren Thrombozytenaktivierung und damit einer Aggregation und Thrombenbildung resultiert (Huang et al., 1980). Durch den Zusatz von Apyrase wird endogenes ADP abgefangen, sodass G_i - sowie G_q -medierte Signaltransduktionsprozesse ausgeschaltet bzw. nur bedingt über die Freisetzung des Granula-Inhaltes aktiviert werden. In Anwesenheit von Apyrase werden offensichtlich keine Substanzen freigesetzt, die zu einer für eine Aggregation ausreichenden Aktivierung des Fibrinogenrezeptors führen, sodass auch bei hohen U46619 Konzentrationen keine vollständige Aggregation beobachtet werden kann.

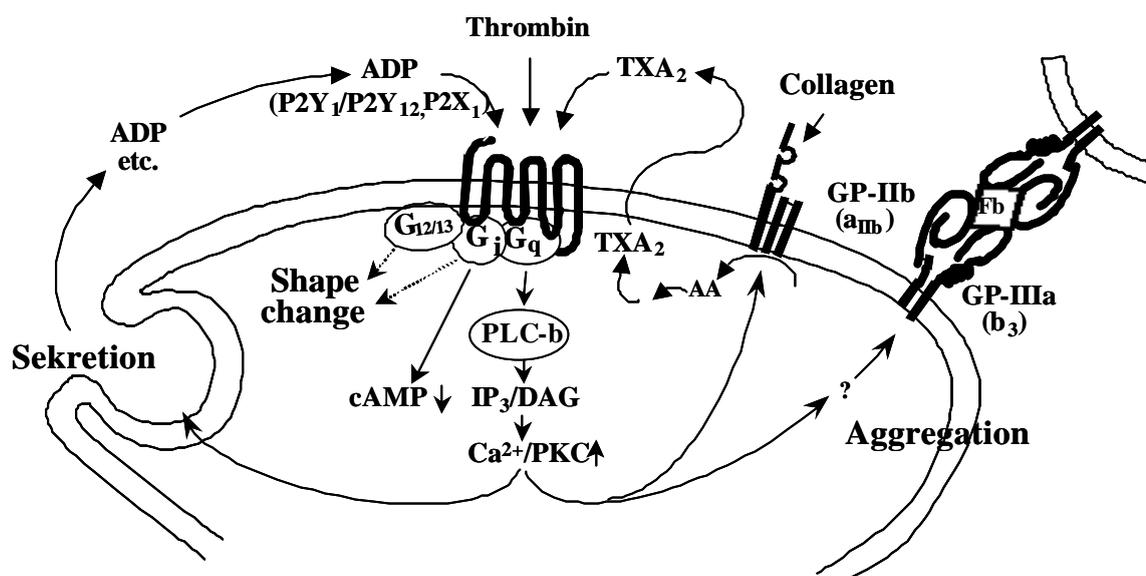


Abbildung 49: Thrombozytenaktivierung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Entsprechende Versuche wurden ebenfalls ohne den Zusatz des „ADP-Scavengers“ Apyrase durchgeführt. In konditional $G\alpha_{13}$ - bzw. konditional $G\alpha_{12}, G\alpha_{13}$ -doppeldefizienten Thrombozyten wurde unabhängig von der Gabe von Apyrase ein „shape-change“ Defekt gemessen, aber kein massiver Aggregationsdefekt mehr beobachtet. So wurde ohne den Zusatz von Apyrase mit $1\mu\text{M}$ U46619 eine leicht verzögerte, aber bereits vollständige und irreversible Aggregation in konditional $G\alpha_{13}$ - bzw. konditional $G\alpha_{12}, G\alpha_{13}$ -defizienten Thrombozyten gemessen (Abbildung 45).

Diese Daten zeigen, dass $G\alpha_{13}$ essentiell für die Auslösung der „shape-change“ Reaktion durch niedrige Agonisten Konzentrationen ist. Dieser deutliche „shape-change“ Defekt wurde in konditional $G\alpha_{13}$ - und konditional $G\alpha_{12}; G\alpha_{13}$ -defizienten Zellen ebenfalls nach Gabe von Thrombin und Collagen in An- und Abwesenheit von Apyrase beobachtet. $G\alpha_{13}$ ist folglich nicht nur in den durch Thromboxan A₂ induzierten „shape-change“ involviert, sondern ist generell der entscheidende Mediator für die Induktion des „shape-changes“. Da bei höheren U46619-Konzentrationen aber auch in konditional $G\alpha_{13}$ -defizienten und konditional $G\alpha_{12}; G\alpha_{13}$ -doppeldefizienten Zellen eine „shape-change“ Reaktion erfolgt, muss neben $G\alpha_{13}$, $G\alpha_q$ in diesen Vorgang involviert sein. Vermutlich werden aufgrund unterschiedlicher Affinitäten, die G-Proteine $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ bei niedrigen U46619 Konzentrationen aktiviert, während hohe U46619 Konzentrationen benötigt werden, um zu einer Aktivierung von $G\alpha_q$ zu führen (Offermanns et al., 1994). Dass es nach Gabe von Thrombin zu einer Aggregation kommt, die kaum durch den Verlust von $G\alpha_{13}$ beeinflusst wird, könnte darauf beruhen, dass die durch Thrombin aktivierten PAR-Rezeptoren 1 und 3 zu einer Aktivierung von $G\alpha_i$ und $G\alpha_q$ führen (Nakanishi-Matsui et al., 2000; Sambrano et al., 2001). Offensichtlich reicht die Aktivierung von $G\alpha_i$ und $G\alpha_q$ für die effiziente Auslösung einer Aggregationsreaktion aus. Nach Gabe von Collagen kommt es primär zu einer Aktivierung der Collagen-Rezeptoren

GPVI und $\alpha_{IIb}\beta_1$ und damit zunächst zu G-Protein unabhängigen Prozessen (Clemetson et al., 2001; Nieswandt et al., 2001; Watson 2000).

Da ADP zu einer Aktivierung von G_i und G_q führt, aber nur zu einer sehr schwachen Aktivierung von G_{13} , konnte nach Gabe von ADP kein „shape-change“ Defekt beobachtet werden (Ohlmann et al., 2000). Offensichtlich muß die Induktion des „shape-changes“ nach Gabe von ADP durch bisher unbekannte Mechanismen erfolgen.

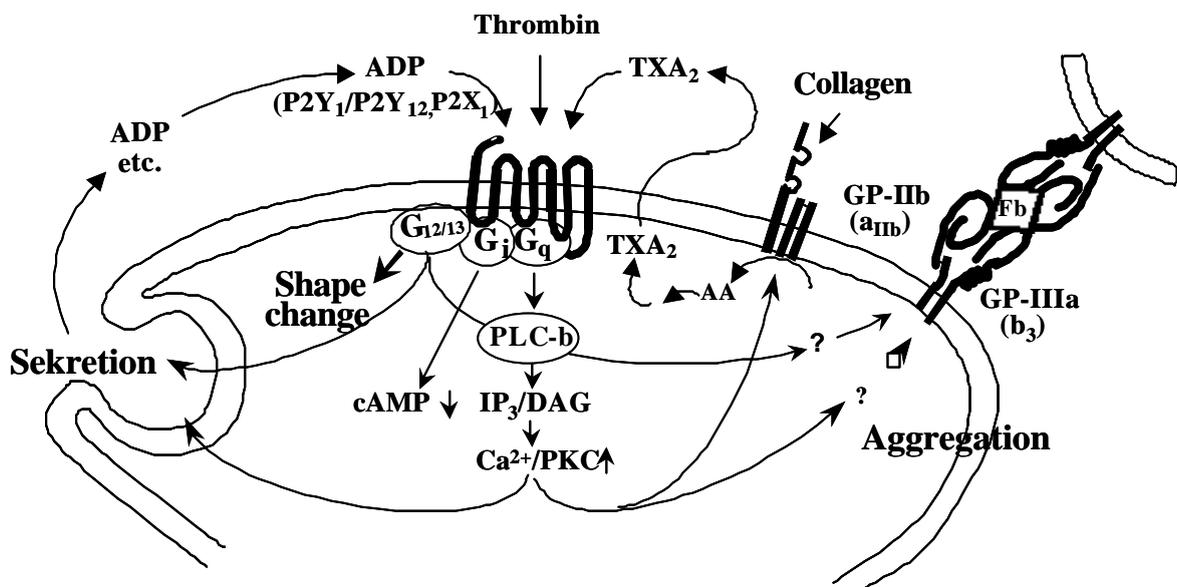


Abbildung 50: Thrombozytenaktivierung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Involvierung von $G_{\alpha 12}$ und $G_{\alpha 13}$ in „shape-change“ und Aggregationsprozesse.