

## 7 Zusammenfassung

Da bisher nur wenige funktionelle Daten über die physiologische Bedeutung von  $G\alpha_{12}$  und  $G\alpha_{13}$  bekannt waren, sollte über die Generierung eines konditionalen *Gna13* „Knock-outs“ dieses umfangreiche Gebiet näher untersucht werden. Durch Kreuzung des konditionalen *Gna13* „Knock-outs“ mit unterschiedlichen Cre-Linien wird eine zeitlich exakt determinierte und gewebespezifische Inaktivierung des *Gna13* Gens ermöglicht. Durch die Nutzung des Cre/loxP Rekombinationssystems ist es gelungen, einen konditionalen *Gna13* „Knock-out“ herzustellen. Die durch einen „general-deleter“ hervorgerufene Cre-mediierte Rekombination in *Gna13<sup>flox/-</sup>* Tieren führt tatsächlich zu der Generierung eines Null-Alleles und damit zu einem dem klassischen *Gna13* „Knock-out“ entsprechenden Phänotyp. Dies konnte durch Verpaarungen von *Gna13<sup>TA/-</sup>* Mäusen mit *Ella<sup>Cre/+</sup>* Tieren gezeigt werden.

Um neben der physiologischen Bedeutung von  $G\alpha_{13}$ , auch die Rolle von  $G\alpha_{12}$  untersuchen zu können, wurden sämtliche Cre-Linien sowohl in *Gna13<sup>flox/flox</sup>* als auch in *Gna12<sup>-/-</sup>;Gna13<sup>flox/flox</sup>* Mäuse eingekreuzt, um auf diesem Wege eine konditionale Inaktivierung der G-Proteine  $G\alpha_{12}$  und  $G\alpha_{13}$  zu ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Cre-Linien in die o.g. Mauslinien eingekreuzt.

Mithilfe der *tie-1* Cre Maus, einer Endothelzell-spezifischen Cre-Linie, sollte die Frage beantwortet werden, ob für den zum intrauterinen Tod führenden angiogenetischen Defekt in *Gna13* „Knock-out“ Tieren das Fehlen von  $G\alpha_{13}$  in Endothelzellen oder den umliegenden mesenchymalen Geweben verantwortlich ist. Da aber bisher keine für Analysen ausreichenden Mengen an Endothelzellen isoliert werden konnten, kann diese Frage bisher nicht beantwortet werden.

Allerdings konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von  $G\alpha_{13}$  in Endothelzellen nicht zu einer verminderten Leberregeneration in *Gna13<sup>flox/-</sup>;tie-1* Cre Tieren nach partieller Hepatektomie führt. Ein ähnlicher Befund wurde in *Gna13<sup>flox/-</sup>;Mx1*-Cre Tieren beobachtet. Auch in diesen Tieren konnte nach einer partiellen Hepatektomie keine reduzierte Leberregeneration beobachtet werden. Offensichtlich scheint weder der Verlust von  $G\alpha_{13}$  in Endothelzellen noch in Hepatozyten in den untersuchten Modellsystemen von physiologischer Relevanz zu sein.

Um die Bedeutung von  $G\alpha_{12}$  und  $G\alpha_{13}$  für die Induktion einer hypertrophen Antwort im Herz zu untersuchen, wurde eine Kardiomyozyten-spezifische Mauslinie, *Mlc2a<sup>Cre/+</sup>*, (Chen et al., persönliche Mitteilung) in *Gna13<sup>flox/flox</sup>* bzw. *Gna12<sup>-/-</sup>;Gna13<sup>flox/flox</sup>* Tiere eingekreuzt. Durch  $\beta$ -Galactosidase-Färbungen bzw. Westernblotanalysen konnte gezeigt werden, dass in Kardiomyozyten ein vollständiges Rekombinationsereignis stattfindet. Da aber kein spezifisches Rekombinationsereignis vorliegt, sondern auch in verschiedenen anderen Organen eine Rekombination nachgewiesen wurde, kann die deutlich reduzierte Überlebensrate der *Gna13<sup>flox/flox</sup>;Mlc2a<sup>Cre/+</sup>* bzw. *Gna12<sup>-/-</sup>;Gna13<sup>flox/flox</sup>;Mlc2a<sup>Cre/+</sup>* neben Herz-spezifischen Defekten, auch auf der unspezifischen Rekombination beruhen. Um die Involvement von  $G\alpha_{12}$  und  $G\alpha_{13}$  in die Hypertrophie-Reaktion zu klären, werden zur Zeit „Aorten-banding“ Operationen an den entsprechenden überlebenden Mäusen durchgeführt.

Interessante Daten wurden mithilfe der durch PI-PC induzierbaren *Mx1*-Cre Mauslinie erhalten. Da neben der Leber auch in der Milz hohe Rekombinationsraten nach i.p. Gabe von PI-PC über Westernblotanalysen gezeigt werden konnten, wurden immunologische Analysen an verschiedenen immunologischen Organen durchgeführt. Neben einer Reduktion der T-Helfer Zellen in der Milz in *Gnal3<sup>flox/flox</sup>;Mx1*-Cre Mäusen, die durch einen Migrationsdefekt aufgrund des Fehlens von  $G\alpha_{13}$  hervorgerufen sein könnte, wurde zusätzlich ein B-Zell-spezifischer Defekt beobachtet. In *Gnal3<sup>flox/flox</sup>;Mx1*-Cre Tieren konnte eine deutliche Reduktion der B-Zellen in der Randzone der Milz gezeigt werden. In lymphozytären Systemen wird eine Signaltransduktionskaskade bestehend aus  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ , dem Rho-GEF Lsc und Pyk-2 besprochen, über die zytoskelettäre Prozesse reguliert werden. Als mögliche  $G\alpha_{12}$  und  $G\alpha_{13}$  aktivierende und damit diesen Signalweg regulierende Rezeptoren, kommen solche der Edg-Familie oder G2A in Betracht.

An Thrombozytenstudien aus *Gnal3<sup>flox/flox</sup>;Mx1*-Cre- bzw. *Gnal3<sup>flox/flox</sup>;Gnal<sup>2-/-</sup>;Mx1*-Cre-Mäusen konnte eindeutig gezeigt werden, dass  $G_{13}$ , nicht aber  $G_{12}$  in die Induktion des Thrombozyten „shape-changes“ bei niedrigen Agonisten Konzentrationen, mit Ausnahme von ADP, involviert ist. Bei höheren Agonist-Konzentrationen wird die Auslösung der „shape-change“ Reaktion von  $G_q$  übernommen. Neben der Induktion des „shape-changes“ scheint  $G_{13}$  ebenfalls für aggregatorische Prozesse verantwortlich zu sein. So kommt es nach Gabe verschiedener Stimuli und Ausschaltung ADP-vermittelter Verstärkungsmechanismen, in *Gnal3<sup>flox/flox</sup>;Mx1*-Cre- bzw. *Gnal3<sup>flox/flox</sup>;Gnal<sup>2-/-</sup>;Mx1*-Cre-Thrombozyten nicht mehr zu einem vollständigen Aggregationsereignis. Erste Daten deuten auf eine verminderte Aktivierung des  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Fibrinogenrezeptors sowie auf eine reduzierte Degranulation hin. Beide Prozesse sind notwendig, um zu einer vollständigen Aggregation zu führen.