

Modulation der Expression und Funktion kardialer Gap Junction Kanäle

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Pia Niemann
aus
Höxter, Deutschland

Bonn 2023

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd K. Fleischmann**
- 2. Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Christa E. Müller**

Tag der Promotion: 04.01.2024

Erscheinungsjahr: 2024

Widmung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich auf vielfältige Weise bei meiner Dissertation unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Bernd K. Fleischmann bedanken, der mir die großartige Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Betreuung und ständigen Unterstützung durchzuführen. Ich schätze alles, was Sie für mich getan haben.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Zweitbetreuerin Prof. Dr. rer. nat. Christa E. Müller und bei Prof. Dr. med. Wilhelm Röhl für all die Ratschläge und Hilfe bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Caroline Geisen für die enorme Unterstützung und die lieben Worte während meiner gesamten Promotionszeit.

Für die finanzielle Unterstützung meines Projektes möchte ich mich bei dem BMBF und der DFG (SFB1425) bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle wissenschaftliche Diskussionen und die große Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken. Sowohl durch die wissenschaftlichen- als auch durch die gemeinsamen nicht-wissenschaftlichen Aktivitäten habe ich liebe Freunde dazugewonnen, ohne die die letzten Jahre nicht dieselben gewesen wären.

Danke an Caroline und Birte für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön an Stephan für die Ruhe und Sicherheit, die du mir immer gegeben hast, deine immense Geduld, sowie die ständige Unterstützung und den Glauben an mich.

Zudem bin ich meiner Familie sehr dankbar, meinen Eltern und meinen Schwestern Birte und Ines, danke für all eure Unterstützung und dass ihr mir immer mit Rat und Tat zur Seite steht.

Abkürzungsverzeichnis

α-Aktinin⁺	α -Aktinin-positiv
AAV	Adeno assoziierter Virus
AP	Aktionspotential
ASMAC	Alpha smooth muscle actin
ASMAC⁻	Alpha smooth muscle actin-negativ
ASMAC⁺	Alpha smooth muscle actin-positiv
BSA	Rinderserumalbumin
BZ	Border Zone
Ca²⁺	Calciumion
CAG	Synthetischer, ubiquitärer Promotor, zusammengesetzt aus dem CMV-Enhancer, dem beta-Aktin-Promotor (Huhn) und Sequenzen des beta-Globin-Gens (Kaninchen)
CNV	Copy Number Variation
Cre⁻	Cre-negativ
Cre⁺	Cre-positiv
Cx43	Connexin 43
Cx43^{+/-}	Heterozygoter Genotyp für exogenes Cx43
Cx43^{+/+}	Homozygoter Genotyp für exogenes Cx43
Cx43^{-/-}	Wildtyp Genotyp für exogenes Cx43
dPCR	Digitale Polymerase Kettenreaktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
EZM	Extrazellulärmatrix
EPU	Elektrophysiologische Untersuchung

ES	Embryonale Stammzelle
FA	Formaldehyd
FB	Fibroblast
FKS	Fötales Kälberserum
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
FS	Fractional shortening, fraktionelle Verkürzung
gDNA	Genomische DNA
GJ	Gap Junction
GJIC	Gap Junction intercellular communication
HF	Herzfrequenz (bpm)
Hoechst⁺	Hoechst-positiv
ICD	Implantierbarer Kardioverter Defibrillator
IL-10	Interleukin 10
IL-1β	Interleukin 1 β
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
i.p.	Intra peritoneal
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle; RNA-Abschnitte, die eine spezifische Sekundärstruktur aufweisen und darüber die Initiation der Translation unabhängig von der 5'-Cap-Struktur ermöglichen; häufig eingesetzt zur Koexpression eines Ziel- und Reportergens
K⁺	Kaliumion
K29 bzw. K31	G4 embryonaler Stammzell Klon 29 bzw. 31
kDa	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
kFB	Kardialer Fibroblast
KHK	Koronare Herzkrankheit
KM	Kardiomyozyt

KO	Knockout
LAD	Linke absteigende Koronararterie
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVFS	Linksventrikuläre fraktionelle Verkürzung
mCherry⁻	mCherry-negativ
mCherry⁺	mCherry-positiv
MCM	MerCreMer
mFB	Myofibroblast
MI	Myokardinfarkt
MMP	Matrix Metalloproteinase
MP	Milchpulver
Na⁺	Natriumion
NNKM	Neonataler Kardiomyozyt
mRNA	messenger (Boten)-Ribonukleinsäure
P2	Postnataler Tag 2
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGFRα	Platelet-derived growth factor receptor α
PEB	Protein Extraktions Puffer
PSLAX	Parasternale Längsachse
rcf	Relative centrifugal force
RNA	Ribonukleinsäure
RNAseq	RNA-Sequenzierung
RT	Raumtemperatur
s.c.	Subkutan

Sham	„Schein-operiert“ (Eröffnung des Brustkorbs und Entfernung des Perikards, keine Läsion)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,1 % Tween20
Tcf21	Transkriptionsfaktor 21
TGF-β	Transforming growth factor beta
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TNFα	Tumor Nekrose Faktor alpha
üN	Über Nacht
Vimentin⁻	Vimentin-negativ
VT	Ventrikuläre Tachykardie
WB	Western blot
WGA	Wheat Germ Agglutinin
WT	Wildtyp
ZO-1	Zonula occludens-1

Inhaltsverzeichnis

Widmung	I
Abkürzungsverzeichnis	II
Inhaltsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Das Herz.....	1
1.1.1 Aufbau des Herzens.....	1
1.1.2 Kardiomyozyten.....	2
1.1.3 (Myo-)fibroblasten.....	3
1.1.4 Erregungsleitung im Herzen.....	4
1.2 Gap Junctions und Connexine	7
1.2.1 Connexine im Herzen.....	9
1.2.2 Cx43 im Herzen.....	10
1.3 Koronare Herzkrankheit und Herzinfarkt	13
1.3.1 Wundheilung und kardiales Remodeling	14
1.3.2 Ventrikuläre Tachykardien in Folge eines Herzinfarktes.....	17
1.4 Experimentelle Herzinfarktmodelle.....	21
2 Relevanz und Zielsetzung	23
3 Material und Methoden	26
3.1 Material.....	26
3.1.1 Chemikalien und gekaufte Lösungen	26
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	29
3.1.3 Geräte	30
3.1.4 Software	32
3.1.5 Puffer und Lösungen.....	33
3.1.6 Kits	36
3.1.7 Zellkulturmedium und Zusätze	36
3.1.8 Zusammensetzung des Zellkulturmediums.....	37
3.1.9 Versuchstiere	37
3.1.10 Genotypisierungsprimer	38
3.1.11 Adeno-assoziierte Viren	39
3.1.12 Antikörper	39

3.1.13	TaqMan-Assays.....	40
3.2	Methoden.....	42
3.2.1	Generierung transgener Mauslinien durch Blastozysteninjektion	42
3.2.2	Cre-loxP-System	43
3.2.3	Zellkultur neonataler Kardiomyozyten	44
3.2.4	Generierung eines Kryoinfarkts	46
3.2.5	Tamoxifenbehandlung transgener Mäuse.....	47
3.2.6	Funktionelle <i>in vivo</i> Analysen	47
3.2.7	Organentnahme und Präparation der Proben	53
3.2.8	Immunhistochemische und histologische Methoden	54
3.2.9	Mikroskopie.....	56
3.2.10	DNA-Methoden.....	58
3.2.11	RNA-Methoden.....	63
3.2.12	Protein-Methoden	66
3.2.13	Statistische Analysen	69
3.3	Kooperationsübersicht	70
4	Ergebnisse.....	71
4.1	Generierung und Charakterisierung transgener Mausstammzelllinien, die das murine Connexin 43 und das Fluoreszenzreporterprotein mCherry Cre-induzierbar überexprimieren.....	71
4.2	Generierung transgener Mauslinien, die das murine Connexin 43 und das Fluoreszenzreporterprotein mCherry Cre-induzierbar überexprimieren.....	78
4.2.1	Blastozysteninjektion transgener CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry G4-Mausstammzellen.....	79
4.2.2	AAV-Cre2.1-Transduktion neonataler Kardiomyozyten der Gt(ROSA)26Sor ^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF} -Mauslinien	79
4.2.3	Bestimmung der Kopienzahl der Transgenkassette in den Gt(ROSA)26Sor ^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF} -Mauslinien (K29 und K31).....	82
4.2.4	Einkreuzung verschiedener Tamoxifen-induzierbarer MerCreMer-Deleter-Mauslinien.....	83
4.3	Cx43-Überexpression in Kardiomyozyten des gesunden Mausherzens	85
4.3.1	Phänotypische Charakterisierung der α MHC ^{CAG-Cx43-P2A-mCherry} -Mauslinie	85
4.3.2	Charakterisierung der Cx43-Überexpression in Kardiomyozyten zwei Wochen nach Transgeninduktion	87
4.3.3	<i>In vivo</i> Analyse der Herzfunktion zwei Wochen nach Transgeninduktion	95
4.4	Cx43-Überexpression in Kardiomyozyten des Herzens zwei Wochen nach Kryoinfarkt.....	98

4.4.1	Phänotypische Charakterisierung der α MHC ^{CAG-Cx43-P2A-mCherry} -Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Transgeninduktion	98
4.4.2	Charakterisierung der Cx43-Überexpression in Kardiomyozyten zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Transgeninduktion	100
4.4.3	<i>In vivo</i> Analyse der Herzfunktion zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Transgeninduktion	107
4.5	Cx43-Überexpression in Myofibroblasten der Infarkt Narbe und Border Zone nach Kryoinfarkt.....	109
4.5.1	Analyse der Transgenexpression im nicht-infarzierten Herzen und anderen Organen	109
4.5.2	Phänotypische Charakterisierung der Periostin ^{CAG-Cx43-P2A-mCherry} -Mauslinie.....	111
4.5.3	Charakterisierung der Cx43-Überexpression in Myofibroblasten nach Kryoinfarkt und Transgeninduktion	114
4.5.4	<i>In vivo</i> Analyse der Herzfunktion zwei Wochen nach Kryoinfarkt	134
5	Diskussion	138
5.1	Limitationen der ubiquitären Überexpression von Cx43 in der Maus	139
5.2	Generierung des induzierbaren Cx43-Überexpressions-Modells <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	139
5.3	Regulation der KMs- bzw. mFBs-spezifischen Cx43-Überexpression im gesunden und infarzierten Mauserzen.....	142
5.4	Zellbiologische und funktionelle Effekte einer KMs- bzw. mFBs-spezifischen Überexpression von Cx43.....	143
5.5	Mechanistische Grundlage des anti-arrhythmischen Effekts durch die KMs- bzw. mFBs-spezifische Überexpression von Cx43 nach einem Herzinfarkt.....	151
5.6	Alternative Methoden zur Überexpression von Cx43 im Infarktareal	152
5.7	Ausblick	153
	Literaturverzeichnis	155
	Tabellenverzeichnis	175
	Abbildungsverzeichnis	176
	Zusammenfassung	182
	Appendix	184

1 Einleitung

1.1 Das Herz

Das Herz ist ein komplexes und überlebenswichtiges Organ, da es den Körper mit Blut versorgt. Es ist ein beeindruckender Muskel, der täglich im Fall eines durchschnittlichen, gesunden Menschen ca. 7 000 Liter Blut pumpt und etwa 100 000-mal pro Tag, d.h. ca. 3 Milliarden-mal im Leben eines 80-jährigen Menschen, schlägt. Für die Pumpleistung des Herzens ist eine rhythmische Abfolge von Kontraktion (Systole) und Relaxation (Diastole) wichtig. Dazu muss die Aktivität vieler Millionen Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten (KMs)) zeitlich und räumlich koordiniert werden. Dies wird durch die Weiterleitung elektrischer Signale, sogenannter Aktionspotenziale (APs), via Gap Junctions (GJs) von einem KM zum nächsten ermöglicht. GJs sind somit ein wichtiger Bestandteil des funktionellen Synzytiums des Herzens, wodurch ein elektrischer Reiz den gesamten Herzmuskel erregen und kontrahieren kann. Zur bedarfsgerechten Versorgung der Organe wird die Pumpleistung des Herzens über das autonome Nervensystem (Sympathikus und Parasympathikus) sowie über den venösen Rückstrom zum Herzen und die dadurch bedingte Vordehnung der Herzmuskelfasern (Frank-Starling-Mechanismus) reguliert (Larsen 2016; Pape et al. op. 2014).

1.1.1 Aufbau des Herzens

Das Herz ist aus einer linken und einer rechten Herzkammer (Ventrikel) aufgebaut, denen jeweils ein Vorhof (Atrium) vorgeschaltet ist. Im Körper gelangt venöses, Sauerstoff-armes Blut aus der Vena cava inferior und der Vena cava superior in den rechten Vorhof. In der Diastole öffnet sich die Trikuspidalklappe, sodass das Blut in den rechten Ventrikel fließen kann. Während der Systole wird es über die Pulmonalklappe in die Pulmonalarterie und damit in den Lungenkreislauf ausgeworfen, um mit Sauerstoff beladen zu werden. Sauerstoff-reiches Blut fließt aus den Pulmonalvenen in den linken Vorhof. Mit der Diastole öffnet sich die Mitralklappe, sodass das Blut in die linke Herzkammer gelangt. Während der Systole wird es über die Aortenklappe in die Aorta und damit in den Körperkreislauf gepumpt, um die Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen (Abbildung 3) (Pape et al. op. 2014).

Das Herz besteht nicht allein aus kontrahierenden Herzmuskelzellen, sondern es konnten bisher neun verschiedene Zelltypen beobachtet werden: KMs (Herzmuskelzellen), Fibroblasten (FBs), Perizyten, Makrophagen, Endothelzellen, Adipozyten, glatte Muskelzellen, Lymphozyten und neuronale Zellen (Tucker et al. 2020). Sie alle exprimieren Connexin 43 (Cx43), welches die Interaktion der Zellen bzw. ihre interzelluläre Kommunikation ermöglicht

(Kohl 2003; Bermudez-Fajardo et al. 2007; Gao et al. 2021; Ivanova et al. 2017; Mannell et al. 2021; Meier und Rosenkranz 2014; Rodjakovic et al. 2021; Zhu et al. 2016).

Zwei dieser Zelltypen stehen im Fokus dieser Arbeit: KMs und kardiale Fibroblasten (kFBs).

1.1.2 Kardiomyozyten

Herzmuskelzellen bzw. KMs sind etwa 10-20 µm dicke, 50-100 µm lange, verzweigte Zellen des Myokards (Karperien et al. 2019). Im linken Ventrikel eines erwachsenen menschlichen Herzens sind etwa $3,2 \pm 0,75$ Milliarden KMs zu finden (Bergmann et al. 2015). Sie sind elektrisch erregbar und bestehen aus zahlreichen kontraktilen Elementen (überlappende Aktin- und Myosinfilamente = Sarkomer). KMs sind für die Kontraktion des Herzens sowie die Weiterleitung elektrischer Signale zuständig (Larsen 2016). In der Regel besitzen sie ein bis zwei im Zentrum der Zelle liegende Zellkerne (Walek 2023). Im Zuge der Regenerationsphase des Herzens nach z.B. einem Herzinfarkt, konnten aber auch mehrkernige KMs beobachtet werden (Hesse et al. 2018). Die Myofibrillen sowie die parallel zu ihnen angeordneten Sarkomere erzeugen die charakteristische Querstreifung der Herzmuskelzellen. Der Bereich um den Kern herum ist Myofibrillen-frei. KMs besitzen auf Grund ihres hohen Energieverbrauchs besonders viele Mitochondrien (Karperien et al. 2019). T-Tubuli der Plasmamembran (Sarkolemm) ragen ins Zytoplasma, um die APs schnell ins Zellinnere zu übertragen (Pschyrembel Online | Transversalsystem 2018). KMs sind an ihren Enden (Zellpolen) über Glanzstreifen (Ansammlungen von GJs) miteinander verbunden. Über die GJ-Kanäle können sich die kardialen APs über den elektrisch nicht erregbaren Raum (Lücke = „gap“) zwischen benachbarten KMs ausbreiten (Bernstein und Morley 2006; Lin et al. 2003). So können die KMs miteinander kommunizieren und ein funktionelles Synzytium bilden. Die zelluläre Struktur der KMs sowie ihre Anordnung im Herzmuskel ist richtungsgebunden. Diese Anisotropie ist für die gerichtete Weiterleitung der APs durch fortlaufende KMs-Stränge und für die Kontraktion des Herzens notwendig (Karperien et al. 2019) (Abbildung 1). Adulte KMs weisen eine sehr geringe Zellzyklus-Aktivität auf, weniger als 50 % der ventrikulären KMs werden während des gesamten Lebens eines Menschen erneuert (Bergmann et al. 2009).

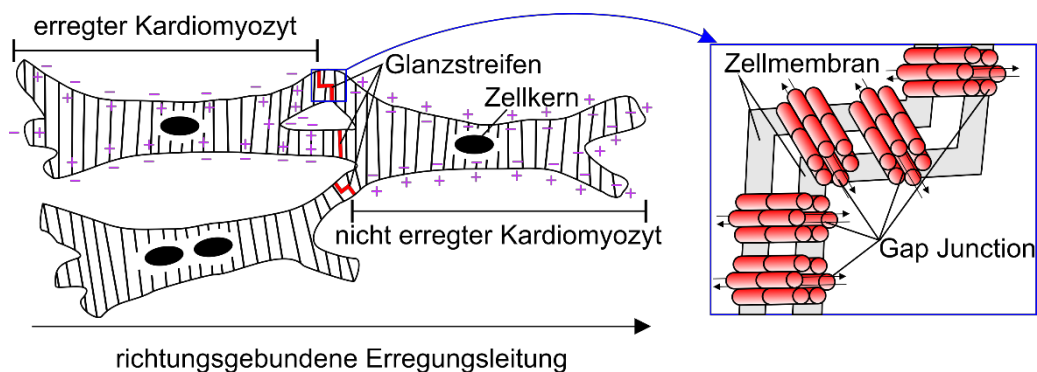


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines KMs-Netzwerks.

Ein- bis zwei-kernige KMs mit charakteristischer Querstreifung sind an ihren Enden über Glanzstreifen (rot eingezeichnet, teils treppenförmig erscheinend) elektrisch und metabolisch gekoppelt. Die Detailansicht der Glanzstreifen (blauer Kasten) zeigt, dass diese durch die Ansammlung zahlreicher GJs das Zytoplasma benachbarter KMs miteinander verbinden. GJs sind besonders wichtig für die Erregungsleitung im Herzen, da sie den Transport von Ionen und damit den Stromfluss zwischen KMs ermöglichen. So kann der GJ-vermittelte Kationenfluss (Kation = positiv geladenes Ion) zwischen einer depolarisierten (positives Membranpotenzial), erregten Herzmuskelzelle (links oben) bei Erreichen eines Schwellenpotenzials (ausreichend starke Depolarisation der Zellmembran einer benachbarten nicht erregten Zelle) dazu führen, dass in der benachbarten, nicht erregten Zelle (rechts oben, negatives Membranpotenzial) ein AP ausgelöst wird und somit die elektrische Erregung von Herzmuskelzelle zu Herzmuskelzelle weitergeleitet wird.

1.1.3 (Myo-)fibroblasten

Obwohl KMs etwa 75 % des Myokardvolumens ausmachen, liegt ihr Anteil an der Gesamtzellzahl bei nur ca. 30 % (Karperien et al. 2019; Baudino et al. 2006), der von kFBs hingegen bei ca. 50 % (Ieda et al. 2010). FBs sind in allen Organen zu finden. Sie sind mesenchymalen Ursprungs und durch einen ovalen Zellkern und eine spindelartige Form charakterisiert. FBs bilden zahlreiche Fortsätze aus (Baudino et al. 2006). Sie sind an der Produktion der Extrazellulärmatrix (EZM) sowie der Regulation der Wundheilung beteiligt. Auch bei der Regeneration von Geweben spielen sie eine wichtige Rolle, da sie verschiedene Botenstoffe, wie Wachstumsfaktoren oder Zytokine sekretieren (Costa-Almeida et al. 2018). Sie sind ein dynamischer Zelltyp, der verschiedene Differenzierungsstadien durchlaufen kann, um die Wundheilung, einschließlich dem langfristigen Gewebeumbau (Remodeling) und der Narbenbildung, zu vermitteln. Verschiedene Trigger, z.B. Gewebsverletzung/-dehnung (z.B. Herzinfarkt (Myokardinfarkt, MI)) oder Zytokine (z.B. Transforming growth factor beta (TGF- β)), aktivieren kFBs (in Mäusen: Tag 2-4 post-MI) und veranlassen sie zur starken Proliferation und Differenzierung zu Myofibroblasten (mFBs, in Mäusen Tag 4-7 post-MI). mFBs produzieren noch größere Mengen an EZM-Proteinen (v.a. verschiedene Kollagen Typen, Periostin) als FBs, um das nekrotische Gewebe strukturell zu stabilisieren. Außerdem exprimieren sie zusätzlich kontraktile Gene, wie alpha smooth muscle actin (ASMAC), welche den Wundverschluss durch Kontraktion der mFBs ermöglichen. So erhalten sie z.B. im Falle eines Herzinfarktes vorübergehend die funktionelle Integrität der geschädigten Ventrikelwand,

bis sich ein Netzwerk aus Kollagen zur strukturellen Stabilisierung der gereiften Narbe ausgebildet hat. Schließlich differenzieren mFBs weiter zu Matrifibrozyten (in Mäusen: ab Tag 10 post-MI), die ihre ASMAC-Expression und Proliferation eingestellt haben und langfristig den ausgereiften Infarktbereich besiedeln (Abbildung 2) (Fu et al. 2018). Im Menschen konnte aber auch die aktive Form der mFBs noch 18 Jahre nach einem Herzinfarkt gefunden werden (Ma et al. 2017).

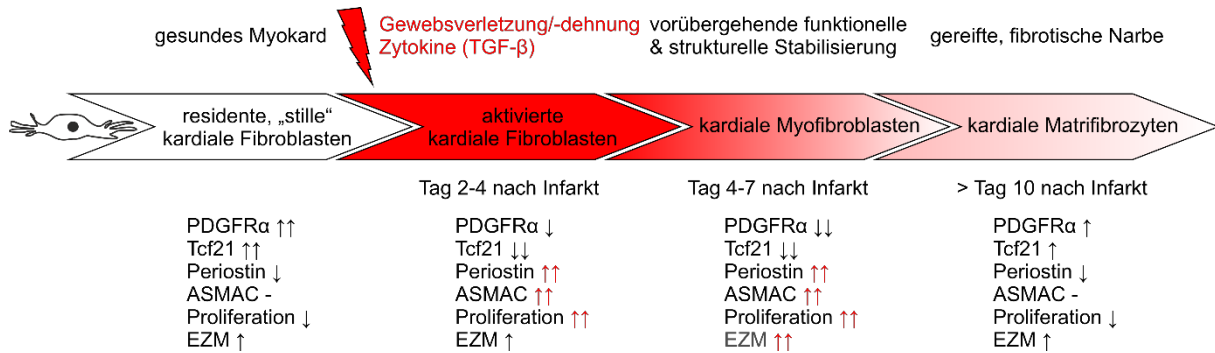


Abbildung 2: Differenzierungsstadien von kFBs in Folge eines Herzinfarktes.

Verschiedene Trigger (Gewebsverletzung wie z.B. MI, Gewebedehnung, Zytokine) können residente „stille“ kFBs aktivieren, wodurch sie in spezialisiertere Differenzierungsstadien übergehen. Die einzelnen Differenzierungsstadien der kFBs sind durch Veränderungen der Expression verschiedener Gene und durch die Ausbildung spezifischer Eigenschaften charakterisiert, sodass kFBs die Wundheilung sowie die langfristige Ausbildung der Narbe optimal unterstützen können. PDGFR α (platelet-derived growth factor receptor α); Tcf21 (Transkriptionsfaktor 21); ASMAC; EZM (Extrazelluläre Matrix). Modifiziert nach Fu et al. 2018; Snider et al. 2009.

1.1.4 Erregungsleitung im Herzen

Der Herzmuskel arbeitet autonom, spezialisierte Herzmuskelzellen generieren durch spontane Depolarisation APs und leiten sie an das Arbeitsmyokard weiter (Larsen 2016). Es kann zwischen zwei verschiedenen Arten der Herzmuskulatur unterschieden werden. Zum einen ist das spezifische Erregungsleitungssystem, ein Muskelsystem zur autonomen Erregungsbildung und -Leitung, zu finden. Dazu gehören der Sinusknoten (Reizbildungszentrum) sowie die Vorhofleitungsbahnen, der AV-Knoten, das His-Bündel, die Tawara-Schenkel und die Purkinje-Fäden. Über die Purkinje-Fäden wird die elektrische Erregung auf das Ventrikelmuskel übertragen, welches (zusammen mit dem Vorhofmyokard) den zweiten Herzmuskeltyp ausmacht und letztlich für die Herzarbeit, nämlich die Kontraktion des Herzens verantwortlich ist (So 2013). Der elektrische Reiz zur Kontraktion des Herzens wird durch APs übermittelt, das sind schnelle Membranpotenzialänderungen, welche Zellen in einen aktivierten Zustand versetzen. Die Weiterleitung solcher elektrischen Signale von Herzmuskelzelle zu Herzmuskelzelle erfolgt über GJs. Diese erlauben den nicht-selektiven Transport von Ionen und somit den Stromfluss (Kationenfluss) zwischen benachbarten Zellen, welcher bei Erreichen eines Schwellenpotenzials (ausreichend starke Depolarisation der

Zellmembran einer benachbarten nicht erregten Zelle) dazu führt, dass in der benachbarten, bisher nicht aktivierten Zelle, ein AP ausgelöst wird („Alles oder Nichts Prinzip“). Daher können GJs auch als elektrische Synapsen bezeichnet werden. Sie bilden durch die elektrische und metabolische Verbindung aller Herzmuskelzellen ein funktionelles Synzytium. Um die Kontraktion des Herzens zu initiieren, werden vom Sinusknoten (primärer Schrittmacher) spontane elektrische Impulse (APs) generiert und zunächst zu den Vorhöfen weitergeleitet. Die Depolarisation der Zellen des Vorhofmyokards, löst deren Kontraktion zu Beginn der Systole aus. Die Erregung läuft weiter zu dem Atrioventrikularknoten (AV-Knoten). Dieser agiert durch seine niedrige Eigenfrequenz als sekundärer Schrittmacher und durch seine langsame Leitungsgeschwindigkeit als Frequenzfilter. Bei Störungen bzw. dem Ausfall des Sinusknotens verhindert er die Überleitung ungewöhnlich hoher Frequenzen der Vorhöfe (z.B. bei Vorhofflimmern) auf die Ventrikel. Bei Ausfall von Sinus- und AV-Knoten kann die Erregung auch vom His-Bündel gebildet werden (Kammerersatzrhythmus). Vom AV-Knoten aus breitet sich die Erregung über das His-Bündel, die beiden Kammerschenkel sowie die Purkinje-Fäden bis ins Ventrikelmuskel aus und führt dort während der Systole zur Kontraktion und somit zum Auswurf des Blutes in die Pulmonalarterie und Aorta (Abbildung 3).

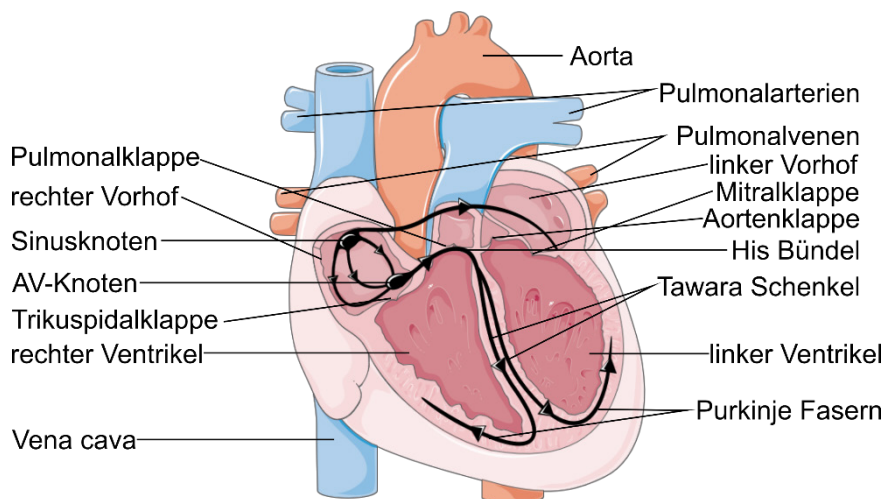


Abbildung 3: Aufbau des Herzens und Erregungsleitung.

Das Herz ist aus einer linken und einer rechten Herzkammer (Ventrikel) aufgebaut, denen jeweils ein Vorhof (Atrium) vorgeschaltet ist. Der Sinusknoten (primärer Schrittmacher) generiert spontane elektrische Impulse (APs), welche zunächst zu den Vorhöfen weitergeleitet werden, um deren Kontraktion auszulösen. Die Erregung läuft weiter zu dem Atrioventrikularknoten (AV-Knoten, sekundärer Schrittmacher). Vom AV-Knoten aus breitet sich die Erregung über das His-Bündel, die beiden Kammerschenkel sowie die Purkinje-Fasern bis ins Ventrikelmuskel aus und führt dort zur Kontraktion (Die Erregungsleitung ist durch schwarze Pfeile dargestellt). Für die Abbildung wurde ein Grafikelement von Servier Medical Art (Servier Medical Art 2022) verwendet und beschriftet.

Die Erregungsleitung von Sinusknoten bis Ventrikelmuskel beträgt ca. 150 ms, nach 210 ms ist das gesamte Herz erregt. Die Dauer eines APs der Arbeitsmuskulatur ist mit 300 ms deutlich länger, sodass nach der Kontraktion des Herzens das erregte Gewebe noch in der

absoluten Refraktärphase verweilt. In dieser Zeitspanne können die Herzmuskelzellen auf keinen elektrischen Reiz reagieren, sodass das Herz vor dem Wiedereintritt (Reentry) der Erregung geschützt ist. Daran schließt sich die relative Refraktärzeit an. Während dieser Periode sind ein Teil der KMs wieder erregbar. Bei erhöhter Reizintensität können daher wieder neue APs ausgelöst werden (Pape et al. op. 2014).

In Herzmuskelzellen wird ein AP nach dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ ausgelöst, sobald ein vom Sinusknoten ausgehender Reiz ihre Zellmembran bis zu einem Schwellenpotenzial (ca. -65 mV) depolarisiert. Niederschwellige Erregungen lösen kein AP aus. Die schnelle Depolarisation der Membran auf ca. +40 mV erfolgt durch die Öffnung von Natriumkanälen der Membran und dem damit verbundenen raschen Natrium (Na^+)-Einstrom (Na^+ extrazellulär: 145 mmol/l, intrazellulär: 12 mmol/l). Anschließend sind die Natriumkanäle bis zur Repolarisation der Membran inaktiviert. Während dieser Zeitspanne können zunächst auch Reize großer Intensität keine weitere Erregung auslösen (absolute Refraktärzeit). Ab einem Membranpotenzial von unter -50 mV ist ein gewisser Teil der Natriumkanäle wieder aktivierbar, sodass bei erhöhter Reizintensität wieder neue APs ausgelöst werden können (relative Refraktärzeit). Auf die Phase der Depolarisation und partiellen Repolarisation folgt die Plateauphase, welche zunächst mit einem langsamen, ebenfalls depolarisierenden Calcium (Ca^{2+})-Einstrom (Ca^{2+} extrazellulär: 1,25 mmol/l, intrazellulär: 0,1 $\mu\text{mol/l}$) in die Zelle beginnt. Gleichzeitig werden aber auch spannungsabhängige Kalium (K^+)-Kanäle aktiviert, was zu einem Ausstrom von K^+ -Ionen (K^+ extrazellulär: 4 mmol/l, intrazellulär: 150 mmol/l) führt, welcher dem Ca^{2+} -Einstrom entgegenwirkt. Daran schließt sich die Phase der Repolarisation an. Dabei sind die Ca^{2+} -Kanäle inaktiviert und der Kaliumausstrom ist maximal. Das Membranpotenzial erreicht dadurch in der Diastole wieder sein Ruhepotenzial von etwa -85 mV. Im Vergleich zum Arbeitsmyokard haben die Schrittmacherzellen des Sinus- und AV-Knotens ein instabiles Ruhemembranpotenzial. Nach ihrer Repolarisation bzw. Hyperpolarisation auf unter -60 mV folgt eine spontane diastolische Depolarisation. Durch die Hyperpolarisation kommt es zur Öffnung von Funny Channels, über die Kationen (v.a. Na^+) ins Zellinnere einströmen und die Membran der Schrittmacherzellen auf ca. -40 mV depolarisieren. Dies bewirkt die Öffnung spannungsabhängiger L-Typ Calcium-Kanäle, über die Ca^{2+} einströmt und die Membran auf über +20 mV depolarisiert. Durch das Schließen der Ca^{2+} -Kanäle und das Öffnen von K^+ -Kanälen kommt es zum K^+ -Ausstrom und schließlich zur Repolarisation der Schrittmacherzellmembran auf ca. -60 mV (Pape et al. op. 2014).

Für die Herzfunktion ist also die Bildung eines elektrischen Synzitiums von elementarer Bedeutung. Ein zentraler Bestandteil dieser elektrischen Vernetzung von Herzmuskelzellen sind die GJs, sie spielen bei der Weiterleitung der elektrischen Erregung eine essentielle Rolle.

1.2 Gap Junctions und Connexine

GJs sind für die Zell-Zell-Kommunikation von großer Bedeutung. Sie verbinden als transmembranäre Kanäle das Zytoplasma benachbarter Zellen und erlauben somit den Austausch von Ionen, second messengern, mikro Ribonukleinsäuren (RNAs), Glukose oder anderen Molekülen bis zu einer Molekularmasse von etwa 1 kDa. Somit sind GJs von großer Bedeutung für die metabolische und elektrische Kopplung von Zellen. In der Regel lagern sie sich zu Hunderten bis Tausenden in sogenannten GJ-Plaques zusammen. GJs werden durch den Zusammenschluss zweier Hemikanäle (Connexone) benachbarter Zellen gebildet. Jeder Hemikanal wiederum besteht aus sechs porenförmig angeordneten Connexinen (Söhl und Willecke 2004; Leithe et al. 2018) (Abbildung 4B).

Als Connexine [von latein. *conexus* = Verknüpfung (Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH 2018)] wird eine große Familie von Transmembranproteinen bezeichnet, welche in der Maus 20- und im Menschen 21 Isoformen umfasst. Die verschiedenen Connexine sind, mit einigen Ausnahmen, nach demselben Schema aufgebaut. Die allgemeine Struktur des Connexingens weist üblicherweise einen 5'-untranslatierten Bereich (Exon 1) auf, welcher durch ein Intron variabler Länge von Exon 2 getrennt ist. Das Exon 2 beinhaltet in der Regel die gesamte kodierende Sequenz des Connexins sowie einen 3'-untranslatierten Genabschnitt (Abbildung 4A). Das Connexin-Protein ist aus vier Transmembrandomänen, zwei extrazellulären Schleifen, einer zytoplasmatischen Schleife sowie einem zytoplasmatischen N- und C-Terminus zusammengesetzt (Abbildung 4B). Die extrazellulären Schleifen weisen je drei Cystein-Reste auf, welche über Disulfid-Brücken-Bindungen die Kopplung zweier Connexone stabilisieren (Söhl und Willecke 2004). Obwohl die Struktur der Connexine insgesamt auf Gen- und Protein-Ebene hoch konserviert ist, unterscheiden sich die verschiedenen Connexin-Isoformen stark in Länge und Sequenz ihres Carboxyl-Terminus, welcher für ihre Regulation und Funktion von Bedeutung ist (Leithe et al. 2018; Kumar und Gilula 1996). Die Proteine werden am endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, gefaltet und post-translational modifiziert. Bei dem Übergang vom ER zum Golgi-Apparat finden der Aufbau der hexameren Hemikanäle, sowie weitere post-translationalen Modifikationen (z.B. Phosphorylierung) statt (Epifantseva und Shaw 2018). Connexone werden anschließend in Vesikel verpackt und mit Hilfe von Mikrotubuli und Aktin-Filamenten zur Zellmembran transportiert, wo sie sich zu größeren Plaques zusammenschließen und mit Hemikanälen benachbarter Zellen koppeln können, um GJ-Kanäle auszubilden. Mittlerweile ist aber auch bekannt, dass unter bestimmten, häufig pathologischen Bedingungen, nicht-koppelnde Hemikanäle aktiv sind und die Membran für den Austausch kleiner Moleküle zwischen Intra- und Extrazellulärraum durchlässig macht (Sáez et al. 2010). Alte Connexone

werden in Vesikel verpackt und von der Membran abgezogen. Die Halbwertszeit der Connexine ist sehr kurz und beträgt etwa 1,5-5 Stunden. Ihr Abbau erfolgt sowohl Ubiquitin-abhängig als auch Ubiquitin-unabhängig durch Proteasomen oder Lysosomen (Rodríguez-Sinovas et al. 2021). Für die Benennung der Transmembranproteine bestehen zwei verschiedene Nomenklatur-Systeme: Die Einteilung erfolgt anhand (I) ihrer Spezies und Molekularmasse in kDa, z.B. mCx43 (murines Connexin mit einer Molmasse von 43 kDa) oder (II) ihrer Sequenzhomologie und der Länge ihrer zytoplasmatischen Domänen. Dabei werden den Connexinen verschiedene Untergruppen (α , β , γ , δ , ϵ) sowie Seriennummern (Reihenfolge ihrer Entdeckung) zugeordnet. Connexin wird in diesem System nicht wie in (I) mit „Cx“ abgekürzt, sondern mit „Gj“, welches für „Gap Junction“ steht. So war mCx43 z.B. das erste Connexin der alpha Gruppe und wird somit als Gja1 bezeichnet (Söhl und Willecke 2003; Nielsen et al. 2012). Connexine werden in einer Vielzahl von Organen und Zelltypen exprimiert. Sie sind vorrangig Plasmamembran-ständig, konnten aber auch in intrazellulären Organellen, wie z.B. Mitochondrien, beobachtet werden (Li et al. 2002; Boengler et al. 2009). Verschiedene, miteinander kompatible (strukturabhängig) Connexin-Isoformen können zu heteromeren Hemikanälen oligomerisieren und auch GJs können heterotypisch aus Connexonen unterschiedlicher Connexin-Isoformen zusammengesetzt sein (Koval et al. 2014) (Abbildung 4C). Connexine spielen schon während der frühen Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle (Boengler et al. 2021). So führte der Knockout (KO) von Cx45 im Mausmodell beispielsweise zu einer frühen embryonalen Letalität. Grund dafür waren Fehlbildungen des Herzens und eine abnormale Gefäßbildung, wodurch der Gasaustausch und die Nährstoffversorgung der Embryonen gestört war (Kumai et al. 2000; Krüger et al. 2000). Außerdem konnten Mutationen in einigen der humanen Connexine mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht werden (Srinivas et al. 2018; Denoyelle et al. 1998).

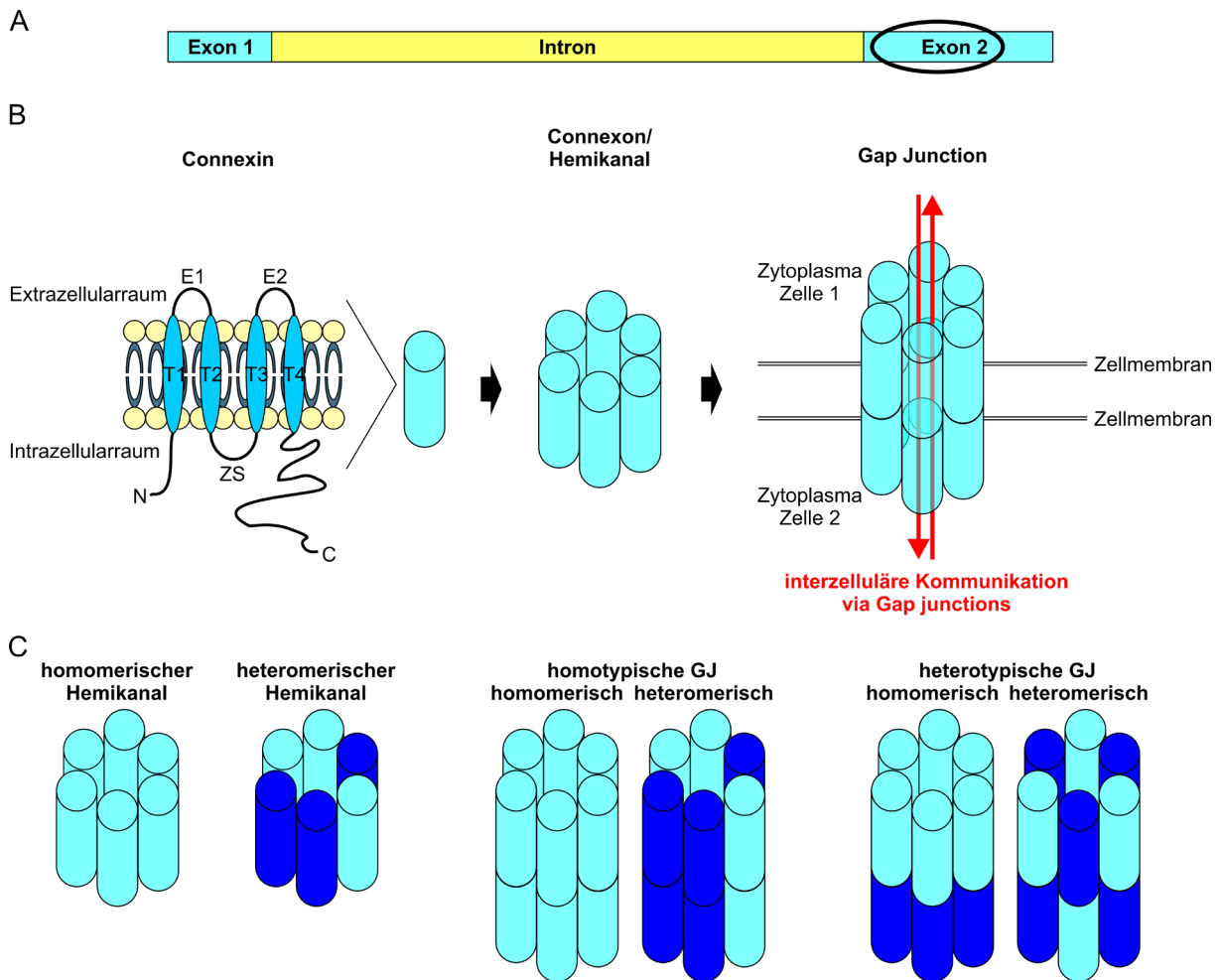


Abbildung 4: Schematischer Aufbau von Connexinen, Hemikanälen (Connexone) und Gap Junctions (GJs).

A: Das Connexin-Gen besteht üblicherweise aus einem 5' untranslatierten Exon 1, welches durch ein Intron variabler Länge von Exon 2 getrennt ist. Das zweite Exon enthält den kodierenden Bereich (mit schwarzer Ellipse gekennzeichnet). **B:** Das Connexin-Protein ist ein Transmembranprotein, welches aus vier Transmembrandomänen (blaue Ellipsen), zwei extrazellulären Schleifen (E1, E2), einer zytosolischen Schleife (ZS) sowie einem zytosolischen N- und C-Terminus (N, C) aufgebaut ist. Durch die porenförmige Zusammenlagerung von sechs Connexinen entsteht ein Hemikanal bzw. Connexon. Durch die Kopplung zweier Hemikanäle benachbarter Zellen werden GJs ausgebildet, welche die interzelluläre Kommunikation benachbarter Zellen ermöglichen. **C:** Homomeric Hemikanäle bestehen aus nur einer Connexin-Isoform, heteromeric können aus unterschiedlichen Isoformen zusammengesetzt sein. GJs können aus Connexonen mit identischer Connexin-Zusammensetzung (homotypisch) oder aus zwei Hemikanälen mit unterschiedlicher Connexin-Isoform-Zusammensetzung (heterotypisch) gebildet werden. Abgewandelt von (Wu und Wang 2019; Söhl und Willecke 2004; Koval et al. 2014).

1.2.1 Connexine im Herzen

Im Herzen werden mehrere Connexin-Isoformen exprimiert, es gibt bezüglich des Expressionsmusters Unterschiede zwischen Maus und Mensch. Im murinen Herzen sind sieben der insgesamt 21 Connexin-Isoformen zu finden: Cx30, Cx30.2, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 und Cx46. Im menschlichen Herzen sind von den insgesamt 20 Connexin-Isoformen

neben Cx43 Cx40 und Cx45 die beiden häufigsten Isoformen. Das Verteilungsmuster der Connexine im Herzen variiert. Im Sinus- und AV-Knoten der Maus werden Cx45 und Cx30.2 exprimiert, beim Menschen Cx45 und Cx40. Im Atrium und den Purkinje-Fasern sind bei beiden Spezies vor allem Cx40 und Cx43 zu finden, im Ventrikel von Maus und Mensch ist Cx43 die vorherrschende Cx-Isoform (Tabelle 1). Dieses unterschiedliche Verteilungsmuster ist neben der Dichte der spannungsabhängigen Na⁺-Kanäle der wichtigste Faktor für die stark variierenden Weiterleitungsgeschwindigkeiten. Am schnellsten leiten die Purkinje-Fasern, am langsamsten ist die Weiterleitung im AV-Knoten. Die KMs des His-Purkinje-Systems sowie der Vorhofleitungsbahnen und der Arbeitsmuskulatur müssen stark koppeln, um eine schnelle Reizleitung zu gewährleisten, daher weisen diese Strukturen eine hohe Dichte spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle sowie Connexine mit einem hohen Leitwert (Cx43, Cx40) auf. Die Purkinje-Fasern sind die Zellen mit dem größten Durchmesser im Herzmuskel, was ihnen einen geringen axialen elektrischen Widerstand zuweist und zu einer besonders schnellen Leitungsgeschwindigkeit beiträgt. Im Gewebe des Sinus- und AV-Knotens sind hingegen geringe Dichten spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle und langsam leitende Cx-Isoformen (Cx30, Cx30.2, Cx45) zu finden. Der Grund dafür ist, dass im Sinus- und AV-Knoten eine deutlich geringere Kopplung benötigt wird, um die Schrittmacherfunktion des Sinusknotens sowie eine zeitlich verzögerte Kontraktion von Atrium und Ventrikel zu ermöglichen. Eine zu starke Kopplung des Sinusknotens (Elektrisches Sink) würde voraussichtlich die spontane Aktivität und Erregung des restlichen Herzens unmöglich machen (Verheule und Kaese 2013).

Tabelle 1: Connexine im murinen und humanen Herzen

Funktionelle Einheit des Herzens	Maus	Human
Sinusknoten	Cx45, Cx30.2, (Cx30, Cx46)	Cx45, Cx40
Atrium	Cx40, Cx43, (Cx45)	Cx40, Cx43, (Cx45)
AV-Knoten	Cx45, Cx30.2	Cx40, Cx45
His Bündel	Cx40, Cx45, (Cx30.2, Cx46)	Cx40, Cx43
Tawara Schenkel	Cx40, Cx45, (Cx46)	Cx45
Purkinje Fasern	Cx40, Cx43, Cx45, (Cx46)	Cx40, Cx43, (Cx45)
Ventrikel	Cx43, (Cx45)	Cx43, (Cx45)

(Verheule und Kaese 2013)

1.2.2 Cx43 im Herzen

Die wichtigste Cx-Isoform im Herzen ist Cx43. Das Cx43-Gen liegt bei der Maus auf Chromosom 10, bei dem Menschen auf Chromosom 6. Die hohe Übereinstimmung in

Nukleotid- und Proteinsequenz, Transkriptgröße und Expressionsmuster von Cx43, erlaubt funktionelle Erkenntnisse zwischen Maus und Mensch zu vergleichen (Söhl und Willecke 2004). Für die Regulation und Funktion der Cx43-Kanäle spielt der ca. 150 Aminosäuren lange C-Terminus des Connexin-Proteins eine besondere Rolle. Er ist aufgrund seiner Prolin- und Serin-reichen Zusammensetzung ein wichtiger Angriffspunkt für post-translationale Modifikationen (wie z.B. Phosphorylierungen und Acetylierungen) und Protein-Interaktionen (Leithe et al. 2018; Lübckemeier et al. 2013). Cx43 wird besonders stark in KMs des Vorhofs und Ventrikels exprimiert (Tabelle 1). Es verbindet die Vielzahl an KMs durch die Ausbildung von GJs (elektrisches Synzytium) und ermöglicht so eine schnelle Erregungsleitung im Herzen (van Kempen et al. 1991; Verheule und Kaese 2013). Neben Cx43-GJs ist auch der spannungsabhängige Natriumkanal, $\text{Na}_v1.5$, äußerst wichtig für die Reizweiterleitung im Herzen. Interessanterweise scheinen beide Proteine in engem Kontakt miteinander zu stehen. So konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Cx43-Expression sowie die Modulation des C-Terminus von Cx43, welcher für die Interaktion mit anderen Proteinen essentiell ist, in einer verminderten Expression des spannungsabhängigen Natriumkanals ($\text{Na}_v1.5$) sowie einer erhöhten Arrhythmie-Inzidenz resultiert (Danik et al. 2008; Jansen et al. 2012; Lübckemeier et al. 2013). Normalerweise sind GJs (Cx43) vor allem in den Glanzstreifen an den Zellpolen der KMs lokalisiert und sind nur sehr selten in den lateralen Membranbereichen der KMs zu finden, da die Leitungsgeschwindigkeit normalerweise in longitudinaler Richtung schneller als in transverser Richtung ist (Fontes et al. 2012). Allerdings wird postuliert, dass in Folge verschiedener Herzerkrankungen (z.B. Herzinfarkt, Kardiomyopathie oder Herzmuskelentzündung) auch die GJs einen Remodeling-Prozess durchlaufen, welcher zu Veränderungen ihrer Expression, Phosphorylierung und ihrem zellulären Verteilungsmuster führen kann. Diese Veränderungen werden mit dem Auftreten lebensbedrohlicher ventrikulärer Arrhythmien in Zusammenhang gebracht. Die Lateralisierung von Cx43 in der KMs-Membran führt z.B. zu einer verlangsamten longitudinalen Leitungsgeschwindigkeit im Herzen und wird somit als potenziell pro-arrhythmisch angesehen (Dhein und Salameh 2021; Severs et al. 2008; Rodríguez-Sinovas et al. 2021). Die genaue pathophysiologische Bedeutung wird aber noch diskutiert (Danik et al. 2004; Rivaud et al. 2020). Cx43 ist aber nicht nur zellmembranständig, sondern wird auch in der Membran kardialer Mitochondrien gefunden. Dort liegt es nicht nur in der 43 kDa großen, sondern auch in der kleineren Cx43-20kDa-C-Terminus-Variante vor. Insgesamt sind bis zu sechs dieser kleineren Cx43-Isoformen bekannt. Sie werden alle von derselben Gja1-mRNA (messenger (Boten)- Ribonukleinsäure) im Herzen translatiert. Die Translation beginnt allerdings alternativ an internen Methioninen, sodass die kleinen Isoformen N-terminal trunkiert sind, jedoch alle mit demselben Cx43-C-Terminus enden. Cx43-20kDa ist die häufigste kleine Isoform von Cx43 im Herzen und scheint dort eine

kardio-protective Wirkung im Falle einer Ischämie zu haben (Boengler et al. 2013; Basheer et al. 2018; Rodríguez-Sinovas et al. 2021). Mutationen im Cx43-Gen können zu schweren Erkrankungen wie z.B. der okulo-dento-digitalen Dysplasie führen (Dobrowolski et al. 2008). Eine Deletion der letzten fünf Aminosäuren des Cx43-C-Terminus führte bei Mäusen neonatal zum Tod (Lübke-meier et al. 2013). Der (totale) KO von Cx43 war im Mausmodell perinatal letal, was auf Fehlbildungen des kardialen Ausflusstraktes zurückgeführt wurde, durch die der pulmonale Gasaustausch gestört war, sodass die Tiere ersticken (Reaume et al. 1995). Interessanterweise führte auch die ubiquitäre Überexpression von Cx43 in Mäusen zu Fehlbildungen des rechtsventrikulären Ausflusstraktes des Herzens sowie zu Neuralrohrdefekten, was eine erhöhte postnatale Sterblichkeit zur Folge hatte (Ewart et al. 1997). Die Regulation der Cx43-Expression während der Embryonalentwicklung scheint also v.a. im Herzen eine wichtige Rolle zu spielen, wobei der Cx43-KO sowie die Cx43-Überexpression ähnliche pathologische Befunde liefern.

Cx43 wird aber nicht nur von KMs exprimiert, sondern auch in geringen Mengen von (m)FBs. Cx43 wurde *in vitro* sowie *in vivo* nach MI an Kontaktpunkten zwischen KMs und (m)FBs detektiert, was eine heterozelluläre Kopplung zwischen KMs und (m)FBs über Cx43-GJs vermuten lässt (McArthur et al. 2015; Camelliti et al. 2004). Funktionell wurde dies anhand FBs-spezifischer Cx43-KO-Mäuse bekräftigt, da nach einem MI in diesem Modell die elektrische Leitungsgeschwindigkeit zwischen FBs-reichem Narbengewebe und dem gesunden Myokard signifikant erniedrigt war (Mahoney et al. 2016).

Auch Arbeiten der AGs Rubart, Kohl und Gourdie deuten darauf hin, dass eine heterozelluläre Kopplung vorliegt (Kohl und Gourdie 2014; Rubart et al. 2018). Diese Hypothese wird durch frühere Studien unserer Arbeitsgruppe unterstützt. So konnten nach der Transplantation Cx43-exprimierender Zellen (murine embryonale KMs, murine mit einem Cx43-Lentivirus transduzierte Skelettmuskelzellen) in die Herzinfarkt-Narbe oder mittels Genterapie (intramyokardiale Injektion eines Cx43-Lentivirus) höhere Leitungsgeschwindigkeiten in der Border Zone (BZ) und der Narbe nachgewiesen werden (Roell et al. 2007; Roell et al. 2018).

Aktuelle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten außerdem zeigen, dass eine Lentivirus-basierte Überexpression von Cx43 in kardialen (m)FBs die Inzidenz von post-Infarkt-Arrhythmien reduziert (Roell et al. 2018).

Die zentrale Bedeutung von Cx43 für die Herzfunktion ist zwar weitgehend bekannt, aber zur zelltypspezifischen Überexpression von Cx43 im gesunden sowie im infarzierten Herzen sind bisher wenige *in vivo* Modelle etabliert. Eine Cx43-Genterapie stellt, wie oben beschrieben, einen neuartigen biologischen Ansatz zur Therapie von post-Infarkt-Arrhythmien dar. Zuvor

müssen aber die zellbiologischen und funktionellen Folgen einer zelltypspezifischen, induzierbaren Cx43-Überexpression im gesunden sowie im infarzierten Herzen untersucht werden. Es ist bislang u.a. unklar, ob ein Mehrangebot von Cx43 im gesunden Herzen zu einer verstärkten Kopplung führen kann oder weitere bzw. keine oder sogar unerwünschte Effekte zur Folge hat wie z.B. die Lateralisierung überschüssiger Cx43-Proteine, morphologische Veränderungen des Herzens oder das Absterben Cx43-überexprimierender Zellen. Eine ubiquitäre, nicht induzierbare Überexpression von Cx43 führte im Mausmodell zu Fehlbildungen des Herzens, Neuralrohrdefekten und einer erhöhten postnatalen Letalität (Ewart et al. 1997). Im infarzierten Herzen ist die heterozelluläre Kopplung von KMs und (m)FBs von besonderem Interesse und bedarf weiterer Erforschung, um die Ausbildung potenziell funktioneller GJs zwischen KMs und (m)FBs, sowie die Konsequenzen einer verstärkten elektrischen Kopplung in der BZ und/oder der Narbe nach Cx43-Überexpression zu analysieren.

Da in dieser Arbeit sowohl die Effekte einer zelltypspezifischen Cx43-Überexpression im gesunden Herzen als auch nach Herzinfarkt untersucht werden, folgt nun ein Einblick in die Pathophysiologie und Therapie eines Herzinfarktes.

1.3 Koronare Herzkrankheit und Herzinfarkt

Die Koronare Herzkrankheit (KHK) (auch als ischämische Herzerkrankung bezeichnet) ist die häufigste Todesursache weltweit. Auf sie sind 16 % aller Todesfälle zurückzuführen. Außerdem verzeichnet die KHK seit 2000 den stärksten Anstieg der Todeszahlen und zwar von über 2 Millionen (im Jahr 2000) auf 8,9 Millionen (im Jahr 2019) (World Health Organization (WHO) 2020).

Unter der koronaren Herzerkrankung (KHK) versteht man die Atherosklerose der Herzkranzarterien. Dadurch kommt es zur Verengung des Gefäßlumens oder zum vollständigen Verschluss der Herzmuskel-versorgenden Koronargefäße und somit zu ihrer verringerten Durchblutung (Ischämie) mit anhaltendem Sauerstoff- und Nährstoffmangel. Dies hat das Absterben von Cx43-exprimierenden Herzmuskelzellen im betroffenen Bereich des Herzens zur Folge (Abbildung 5) (Thygesen et al. 2018). Die KHK tritt in chronischer- oder akuter Form auf. Zu den akuten, unmittelbar lebensbedrohlichen Ereignissen zählt neben der instabilen Angina pectoris (Brustenge/Brustschmerz) und dem plötzlichen Herztod der akute MI (Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin 2022).

Nach der klinischen Definition ist ein MI „Das Vorliegen einer akuten Myokardschädigung, gekennzeichnet durch abnorme kardiale Biomarker in Zusammenhang mit Hinweisen auf

akute Myokardischämie“ (klinische Symptomatik, Elektrokardiogramm (EKG)-Veränderungen) (Thygesen et al. 2018).

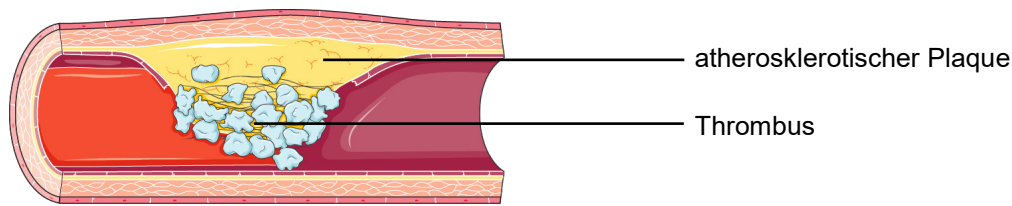


Abbildung 5: Atherothrombose.

Durch die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques, welcher sich in der inneren Wand der Herzkranzarterien eingelagert hat, kommt es zur Bildung von Thromben (Blutgerinnseln), welche das Lumen der Herz-versorgenden Arterien verengen oder komplett verschließen und somit deren Durchblutung und Sauerstoffversorgung behindern (Ischämie). Auf Grund der Ischämie kommt es zur Unterversorgung des Herzmuskels mit Sauerstoff und Nährstoffen, was zum Absterben von Herzmuskelzellen und schließlich zum Herzinfarkt führen kann. Für die Abbildung wurde ein Grafikelement von Servier Medical Art (Servier Medical Art 2022) verwendet und beschriftet.

1.3.1 Wundheilung und kardiales Remodeling

Der geschädigte adulte Herzmuskel heilt nach einem MI durch Ausbildung einer fibrotischen Herzinfarkt Narbe, diese verhindert die Ruptur des Ventrikels (Frangogiannis 2015). Dabei werden nekrotische KMs durch kollagenhaltiges Narbengewebe ersetzt, was zu einem strukturellen und funktionellen Remodeling (Gewebeumbau) des linken Ventrikels führt. Hierbei spielen kFBs eine Schlüsselrolle (Ma et al. 2017). Die Wundheilung ist Teil des kardialen Remodelings (Zamilpa et al. 2013). Sie ist ein multifaktorieller, dynamischer Prozess, der in drei, sich teilweise überlappende Phasen, unterteilt werden kann: (I) Inflammation/Nekrose, (II) Proliferation/Fibrose und (III) Maturation/Remodeling. Die Inflammationsphase beginnt bereits wenige Stunden nach der Myokardschädigung. Sie dauert bei Kleintieren wenige Tage an, bei Großtieren und Menschen bis zu einer Woche oder länger. Diese erste Phase der Wundheilung ist charakterisiert durch das Einwandern von Immunzellen/Leukozyten (Neutrophile, Makrophagen, Lymphozyten), welche pro-inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF α) oder Interleukin 1 β (IL-1 β) bilden. Diese steigern die Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP), welche die geschädigte Extrazellulärmatrix abbauen. Neben Immunzellen sekretieren auch kFBs pro-inflammatorische Botenstoffe, Chemokine und MMPs. Außerdem wird die Expression dieser Zytokine und Chemokine durch den Tod der KMs getriggert. Makrophagen (Fresszellen) beseitigen nekrotische KMs. Außerdem bewirken die von den Leukozyten freigesetzten Signalmoleküle TNF α , IL-1 β sowie Wachstumsfaktoren wie TGF- β oder Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF) die Rekrutierung und Aktivierung von kFBs (Abbildung 6) (Richardson et al. 2015; Daskalopoulos et al. 2012; Frangogiannis 2015; Dobaczewski et al. 2010; Ma et al. 2017). Vorübergehend stabilisiert Granulationsgewebe aus Fibrin,

Fibronectin, Laminin, Glykosaminoglykanen und anderer Matrix den Gewebeschaden, bis mFBs während der Proliferationsphase vermehrt Kollagen sekretieren, welches schließlich zum strukturbildenden Hauptbestandteil der Herzinfarkt Narbe wird. Diese zweite Phase der kardialen Wundheilung erstreckt sich über eine bis mehrere Wochen und ist von der Aktivität der mFBs geprägt. Durch Einwanderung aus dem gesunden Myokard, Proliferation oder Differenzierung aktivierter kFBs zu mFBs steigt ihre Anzahl in dem Infarktbereich während der Proliferationsphase stark an. Sie exprimieren große Mengen an Extrazellulärmatrixproteinen (v.a. verschiedene Kollagentypen) zur strukturellen Stabilisierung sowie ASMAC, welches ihnen kontraktile Eigenschaften zum Wundverschluss verleiht und vorübergehend zur strukturellen Integrität der Ventrikelwand beiträgt, solange das Kollagennetzwerk der reifen Narbe noch nicht ausgebildet ist (siehe Kapitel 1.1.3) (Richardson et al. 2015; Fu et al. 2018). Außerdem werden während der zweiten Phase der Wundheilung entzündungsfördernde Signale unterdrückt, während inhibitorische Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10) und TGF- β vermehrt ausgeschüttet werden, um die Expression von MMP-Inhibitoren (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase, TIMP) zu fördern. Dadurch kann sich die neu gebildete Extrazellulärmatrix anreichern und erhalten bleiben. Zudem kommt es zur Ausbildung neuer Gefäße, um das Infarktgewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen (Abbildung 6) (Dobaczewski et al. 2010). Während der nächsten Wochen (Kleintiere) bis Monate (Großtiere/Menschen) kommt es zur Reifung der Infarkt Narbe durch die Quervernetzung der Kollagenstrukturen (Fibrose). Diese finale Phase der Infarkt Narbenbildung (Maturation/Remodeling) ist außerdem durch die Gefäßreifung und moderate Reduktion der mFBs durch Apoptose (programmierter Zelltod) gekennzeichnet (Abbildung 6) (Richardson et al. 2015).

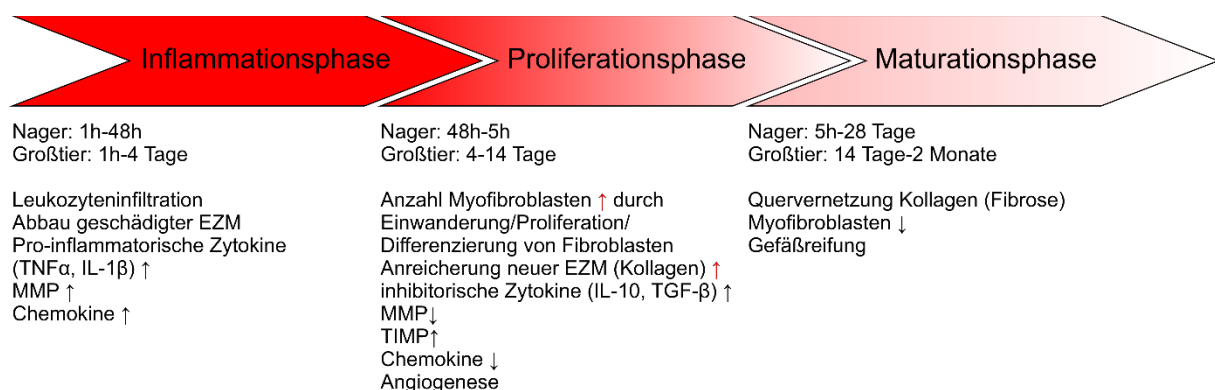


Abbildung 6: Die drei Phasen der Wundheilung post-MI.

Modifiziert nach Dobaczewski et al. (2010).

Der Remodeling-Prozess ist nicht nur auf den ischämischen Bereich des Herzmuskels begrenzt, sondern betrifft nach gewisser Zeit auch das initial nicht betroffene, gesunde Myokard. Durch die fibrotische Infarkttheilung kommt es zur Versteifung des

Herzmuskelgewebes. In Kombination mit dem Verlust kontraktile KMs führt dies zu einer dauerhaft erhöhten Wandspannung, welche eine kompensatorische Dilatation des Ventrikels sowie die Hypertrophie (Zellvergrößerung) nicht-geschädigter KMs hervorrufen kann, um das Schlagvolumen aufrecht zu erhalten. Langfristig kann dies die Deformation des beschädigten Ventrikels, eine eingeschränkte Pumpleistung (verringerte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF)) und schließlich die Ausbildung einer Herzinsuffizienz zur Folge haben („adverse Remodeling“ = nachteiliger Umbau des Herzens) (Leancă et al. 2022). Die Reduktion der Ventrikelwanddicke während der Infarktreifung erhöht außerdem das Risiko einer Ruptur (Sutton und Sharpe 2000) (Abbildung 7B). Neben den mechanischen Komplikationen (strukturelles Remodeling) kommt es durch die Fibrose des Herzmuskelgewebes und den Verlust elektrisch erregbarer KMs zur Störung der Erregungsleitung in der Narbe (elektrisches Remodeling). Dies begünstigt die Ausbildung lebensbedrohlicher ventrikulärer Arrhythmien (Kung et al. 2018).

Die drei Phasen der Wundheilung stellen wichtige Angriffspunkte für die Herzinfarktforschung dar. Durch eine Modulation der Entzündungsprozesse, der Zellmigration sowie der Narbenbildung soll langfristig das strukturelle und elektrische Remodeling sowie die Ausbreitung der Narbe beeinflusst werden. In dieser Arbeit spielt vor allem die Migration der kFBs und ihre Aktivierung zu mFBs sowie der Eingriff in das elektrische Remodeling eine entscheidende Rolle.

Nach einem Herzinfarkt kann das Herz in drei strukturell verschiedene Regionen unterteilt werden: (I) Der Infarktbereich (Narbe), welcher dem ischämischen Ereignis ausgesetzt war, (II) das „gesunde Myokard“ (Remote-Bereich), das von der Ischämie nicht betroffen war, aber unter Umständen den Verlust des infarzierten Herzmuskels kompensiert und (III) der Übergangsbereich vom gesunden Herzmuskelgewebe zur Narbenregion (BZ), welcher teilweise von der Ischämie betroffen war (Kung et al. 2018; Amoni et al. 2021) (Abbildung 7A). Der BZ-Bereich ist heterogen: Intakte KMs sind umgeben von fibrotischen, (m)FBs-reichen Strukturen (Janse et al. 1979; Rutherford et al. 2012). Die Narbe und BZ sind vor allem aufgrund der reduzierten Wanddicke einer erhöhten Wandspannung ausgesetzt. In der Systole ist die Belastung der BZ besonders hoch, da sie mit dem wenig elastischen Infarktgewebe verbunden ist, was zur Ausbildung ungleichmäßiger mechanischer Kräfte und Kontraktionen führt, sodass BZ-KMs sich von Herzmuskelzellen des Remote-Bereichs unterscheiden (Amoni et al. 2021; Ashikaga et al. 2005; Frisk et al. 2016). Außerdem ist die BZ durch eine reduzierte Weiterleitungsgeschwindigkeit elektrischer Impulse charakterisiert und gilt daher als Substrat für die Ausbildung kreisender Erregungen (Reentry), wodurch sie

häufig zum Ausgangspunkt ventrikulärer Tachykardien wird (Bakker et al. 1988; Dillon et al. 1988; Ursell et al. 1985; Yao et al. 2003).

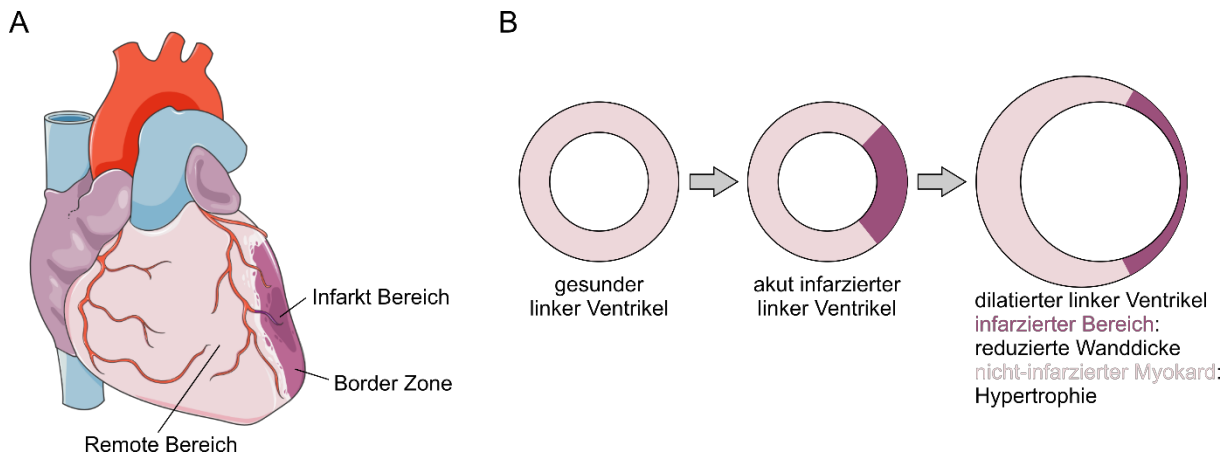


Abbildung 7: Das infarzierte Herz und post-MI Remodeling.

A: Nach einem Herzinfarkt kommt es zur Ausbildung einer Herzinfarktnarbe. Im infarzierten Herzen können drei verschiedene Regionen unterschieden werden: Remote-Bereich („gesundes“ Herzmuskelgewebe, rosa), Infarktbereich (dunkellila), BZ (Übergangsbereich, helllila). **B:** Post-MI Remodeling führt zur Ausbreitung und Ausdünnung des Infarktareals. Dies kann eine kompensatorische Dilatation des Ventrikels und die Hypertrophie des nicht-infarzierten Myokards („adverse Remodeling“) hervorrufen. Für die Abbildung wurde ein Grafikelement von Servier Medical Art (Servier Medical Art 2022) verwendet und beschriftet (**A**). Abbildung **B** ist modifiziert von Toldo et al. 2015 (Toldo et al. 2015).

1.3.2 Ventrikuläre Tachykardien in Folge eines Herzinfarktes

Nach einem Herzinfarkt steigt das Risiko für einen plötzlichen Herztod, da durch die Myokardschädigung (z.B. aufgrund der Infarktnarbe) das Auftreten von ventrikulären Tachykardien (VTs) begünstigt ist. Diese können in Kammerflimmern (besonders schwere Form der VT) übergehen und innerhalb von wenigen Minuten zum Tod führen (Abbildung 8) (Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung e. V. 2022).

Ventrikuläre Extrasystolen (Extraschläge) treten außerhalb des normalen Herzrhythmus auf und können zu Extrakontraktionen des Herzens führen. Einzeln auftretende ventrikuläre Extrasystolen sind in der Regel folgenlos. Fallen diese Extraschläge aber in die vulnerable Phase (relative Refraktärzeit, erster Teil der T-Welle (siehe Kapitel 1.1.4, Abbildung 8D) des Herzzyklus, können sie kreisende Erregungen (Reentry-Mechanismus) initiieren, welche unabhängig von dem normalen Herzrhythmus eine zu schnelle Kontraktion der Herzkammern hervorrufen (Priori et al. 2015; Pape et al. op. 2014). Auf Grund ihrer heterogenen Struktur und Leitungseigenschaften ist die BZ besonders anfällig für das Auftreten solcher kreisenden Erregungen.

Die Entstehung der kreisenden Erregungen wird über den Reentry-Mechanismus erklärt. Trigger- ausgelöste VTs von kleinen Zellverbänden sind wohl im Rahmen von ischämischen

Erkrankungen eher selten. Bei ungehinderter (homogener) und schneller Erregungsleitung im gesunden Herzen trifft die Erregung, nachdem sie eine Kontraktion der Herzmuskelzellen ausgelöst hat, auf refraktäres, nicht erregbares Gewebe und klingt aus. Die absolute Refraktärzeit der Herzmuskelzellen verhindert somit unter normalen Bedingungen den Wiedereintritt der Erregung. Nach einem Herzinfarkt ist die Erregungsleitung im Herzen jedoch gestört. Das elektrisch nicht erregbare Narbengewebe stellt einen zentralen Block dar, welcher von der eintreffenden Erregungsfront umgangen werden kann. Die strukturellen und elektrischen Umbauvorgänge während der Herzinfarktnarbenbildung können in der BZ dazu führen, dass die Erregung mit verlangsamter Reizleitung und verkürzter Refraktärperiode nur in eine Richtung um das Infarktareal (unidirektionaler Block) herumgeleitet werden kann. Der unidirektionale Block kann durch unterschiedliche Refraktärzeit, Leitfähigkeit oder Erregbarkeit der Herzmuskelzellen innerhalb der BZ entstehen, welche auf die Lateralisierung von Cx43, die veränderte Expression verschiedener Ionenkanäle sowie auf die fibrotischen Anteile der BZ zurückgeführt werden können. Während die Erregung die Narbe umkreist, wird der zuvor nicht blockierte Bereich der BZ wieder erregbar, sodass die Depolarisationsfront fortlaufend auf nicht-refraktäres Gewebe trifft und die Kreisbahn fortsetzen kann (Abbildung 8C). Die relativ schnell ablaufende kreisende Bewegung führt zu einer abnormal hohen Herzfrequenz (HF) (Rutherford et al. 2012; EKG & ECHO 2021; Pschyrembel Online | Reentry-Mechanismus 2022). Dadurch ist die Füllungsphase des Herzens verkürzt, sodass die Ventrikel nicht ausreichend mit Blut gefüllt werden können. Demzufolge kann auch nur ein geringeres Blutvolumen gefördert werden und es kommt zur Minderperfusion der Organe. Grundsätzlich spricht man bei Herzrhythmusstörungen mit drei oder mehr aufeinander folgenden Extraschlägen, die ihren Ursprung nicht im Sinusknoten, sondern in den Herzkammern haben von einer VT. Die HF ist dabei auf >100 Schläge/min erhöht (Buxton et al. 2006). VTs können anhand der Form des QRS-Komplexes sowie nach ihrer Dauer klassifiziert werden. Eine anhaltende VT dauert mindestens 30 Sekunden, VTs mit einer Dauer von unter 30 Sekunden werden als nicht anhaltend bezeichnet (AlMahameed und Ziv 2019). Im Fall des Kammerflimmerns (>300 Schläge/min, unregelmäßig, große Schwankungen in der QRS-Zykluslänge, Morphologie und Amplitude) kann gar kein Blut mehr transportiert werden, da die Kontraktion der Herzmuskelzellen völlig unkontrolliert und nicht mehr aufeinander abgestimmt erfolgt. Es kommt zu einem funktionellen Herzstillstand, der ohne Defibrillation zum Tod führt, da das Kammerflimmern nicht selbst-limitierend ist (Abbildung 8D) (Geisslinger et al. 2019; Pape et al. op. 2014). VTs können nicht invasiv anhand von EKG-Aufnahmen identifiziert werden. Sie erscheinen als verbreiterte deformierte QRS-Komplexe. Der Nachweis einer AV-Dissoziation ist ein spezifischer Hinweis auf eine VT. Eine AV-Dissoziation bedeutet, dass die Kontraktion der Vorhöfe und Ventrikel unabhängig voneinander stattfindet. Im EKG zeigt sich

diese Rhythmusstörung durch eine „wandernde“ P-Welle (Vorhof-Rhythmus, der vom Sinusknoten generiert wird), die keine Beziehung mehr zu den QRS-Komplexen (Ventrikel-Rhythmus, der vom AV-Knoten bestimmt wird) aufweist (Abbildung 8E).

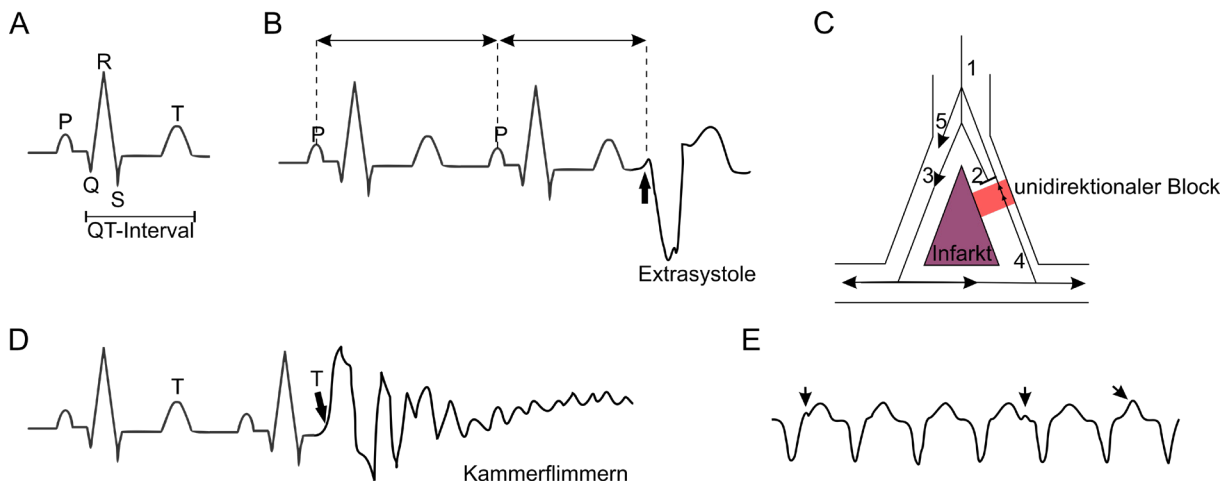


Abbildung 8: Schematische Darstellung ventrikulärer Herzrhythmusstörungen.

A: Gewöhnliches, unauffälliges EKG. **B:** Extrasystole in der linken Herzkammer. Charakterisiert durch einen deformierten, verbreiterten QRS-Komplex. **C:** Schematische Darstellung des Reentry-Mechanismus. **D:** Das Einfallen einer Extrasystole in die aufsteigende T-Welle = vulnerable Phase (R-auf-T-Phänomen) verursacht die Weiterleitung kreisender Bewegungen und kann somit Auslöser des lebensbedrohlichen Kammerflimmerns sein. **E:** AV-Dissoziation. P-Wellen (mit Pfeilen markiert) haben keinen Bezug zu den QRS-Komplexen. Teile der Abbildung sind abgewandelt von Pschyrembel Online (Pschyrembel Online | Reentry-Mechanismus 2022) und Servier Medical Art (Servier Medical Art 2022).

Durch eine invasive elektrophysiologische Untersuchung (EPU) kann das Areal, in dem die VT ihren Ursprung hat, genau lokalisiert werden, indem ein spezieller Elektrodenkatheter z.B. über die Leistenvene in den rechten Vorhof bzw. Ventrikel vorgeschoben wird. Der Katheter kann ein intrakardiales EKG ableiten sowie elektrische Impulse aussenden, die eine Herzrhythmusstörung provozieren sollen. Gelingt dies, können der Ursprungsort und der Mechanismus der Arrhythmie bestimmt werden (Haas und Kleideiter 2011; Bischoff 2013).

Dauerhaft kann die Therapie von VTs mittels Antiarrhythmika, implantierbarer Kardioverter-Defibrillatoren (ICD), Katheterablation oder chirurgischer Ablation erfolgen. Antiarrhythmika werden aufgrund ihrer zahlreichen Nebenwirkungen und teilweise pro-arrhythmischen Eigenschaften mit großer Vorsicht eingesetzt. Sie können anhand ihres Wirkungsmechanismus in vier große Klassen unterteilt werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Antiarrhythmika.

Klasse	Wirkmechanismus	Angriffspunkt Aktionspotenzial	Beispielsubstanz
IA	Natriumkanalblocker	Schnelle Depolarisation	Chinidin, Ajmalin
IB			Lidocain
IC			Flecainid, Propafenon
II	Betablocker	Schrittmacherpotenzial	Esmolol, Propanolol, Atenolol
III	Kaliumkanalblocker	Repolarisation	Amiodaron, Sotalol, Vernakalant
IV	Calciumkanalblocker	Plateauphase	Verapamil, Diltiazem

(Geisslinger et al. 2019)

Bisher konnte in klinischen Studien nur für die Gabe von Betablockern zur chronischen antiarrhythmischen Therapie (z.B. Patienten nach Herzinfarkt oder mit Herzinsuffizienz) eine Reduktion der Mortalität nachgewiesen werden. Antiarrhythmika werden eher ergänzend zu einer nicht medikamentösen Therapie eingesetzt. In Kombination mit einem ICD verbessern Betablocker und der Kaliumkanalblocker Amiodaron die Lebensqualität des Patienten, da sie die Häufigkeit der Elektroschockauslösung durch ICDs reduzieren (Priori et al. 2015; Geisslinger et al. 2019). Zwar können ICDs Arrhythmien beenden, aber sie verhindern nicht ihr Auftreten. Sie mindern somit nur die Symptome, aber behandeln nicht die Grunderkrankung. Die Häufigkeit, mit der ein ICD Elektroschocks auslöst, korreliert zudem mit einer erhöhten Mortalität. Wiederholte Elektroschocks verursachen starken psychischen Stress (Angst, Depression), der die Lebensqualität der Patienten verringert und häufig selbst einer Therapie bedarf. Bei Risikopatienten mit wiederholten ICD-Elektroschocks aufgrund anhaltender VTs wird eine interventionelle Behandlungsoption, die Katheterablation, empfohlen. Bei Patienten, die auf die Therapie mit antiarrhythmischen Substanzen nicht ansprechen und bei denen auch die Katheterablation erfolglos war, sollte eine chirurgische Ablation erfolgen (Priori et al. 2015; Amoni et al. 2021).

Ein Herzinfarkt ist trotz der deutlich verbesserten Therapiemöglichkeiten immer noch eine lebensgefährliche Erkrankung, da trotz Leitlinien-konformer Behandlung etwa 14 % der Patienten innerhalb des ersten Jahres nach dem Herzinfarkt versterben (Szummer et al. 2017), davon ca. die Hälfte an ventrikulären Rhythmusstörungen (Bhar-Amato et al. 2017). Alleine in Deutschland sterben außerhalb des Krankenhauses etwa 65 000 Menschen pro Jahr am plötzlichen Herztod, welcher in 80 % der Fälle auf einen Herzinfarkt zurückzuführen ist (DZHK 2022). In den letzten zwei Jahrzehnten wurden jedoch keine neuen Antiarrhythmika entwickelt, die sich in klinischen Studien durchsetzen konnten, und auch die invasiven Therapien bringen Komplikationen mit sich. Deshalb ist die adäquate Therapie von

VTs/Kammerflimmern weiterhin schwierig und es bedarf weiterer klinischer Forschung zur Entwicklung neuer kausaler Therapieansätze (Amoni et al. 2021). Da auch das häufige Auslösen von ICDs zu einer reduzierten Lebenserwartung betroffener Patienten führt und im Verdacht steht das Myokard auch strukturell zu schädigen (Sood et al. 2014; Tereshchenko et al. 2009), wäre ein biologischer Ansatz zur Reduktion der Entstehung und Aufrechterhaltung von VTs wünschenswert.

Um diesem experimentellen Forschungsansatz nachzugehen, wurden in dieser Arbeit Herzinfarkte im Tiermodell induziert und die Effekte einer Cx43-Überexpression auf die Herzfunktion und Wundheilung nach MI untersucht.

1.4 Experimentelle Herzinfarktmodelle

So wie eine Vielzahl an klinischen Ausgangssituationen und Verläufen einer Ischämie bzw. eines Herzinfarktes bestehen, werden in der Forschung diverse translationale Herzinfarktmodelle genutzt, die je nach Zielsetzung alle ihre Vor- und Nachteile haben. Neben *in vitro*- (Zellkultur von KMs) und *ex vivo* (isolierte, Langendorff-perfundierte Herzen) Modellen sind in der kardiovaskulären Forschung vor allem *in vivo* Tiermodelle notwendig, da ein komplexes Organsystem betrachtet wird. Als Versuchstiere werden Kleintiere wie Mäuse/Ratten/Kaninchen vor allem zur Erforschung zellbiologischer Mechanismen oder molekularer Signalkaskaden eingesetzt. Großtiere wie Schweine/Hund werden bevorzugt für klinische Studien zur Sicherheit und Effektivität genutzt. Typische tierexperimentelle *in vivo* Herzinfarktmodelle sind Ablationen wie z.B. der Kryoinfarkt (Kryo, Abbildung 9C) oder die Okklusion der linken absteigenden Koronararterie (LAD, Abbildung 9A, B) mit oder ohne anschließender Reperfusion. Da die Modelle mechanistisch verschieden sind, kommt es auch bei der Immunantwort und im Remodeling-Prozess zu einigen Unterschieden (Lindsey et al. 2018; Duerr et al. 2011).

In dieser Arbeit wurde das Kryoinfarkt-Modell an genetisch veränderten Mäusen angewandt. Wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, wird die Myokardnekrose bei der Kryoläsion nicht durch eine Ischämie, sondern durch das Aufdrücken eines gefrorenen Kupferstempels (mit definiertem Durchmesser) auf den linken Ventrikel generiert, sodass die Gewebsnekrose durch Gefrierung ausgelöst wird. Dadurch können die Infarktgröße und -position genau kontrolliert werden. Außerdem zeichnen sich die Kryoinfarkte durch ihre Transmuralität (alle Gewebsschichten der Ventrikelwand betreffend) und ihre verlangsamte Infarktbildung aus. Da bei dem LAD- bzw. dem LAD-Reperfusion-Modell die Ischämie des Herzmuskels durch das Abbinden der LAD hervorgerufen wird, ist die Lokalisation sowie das Ausmaß der Läsion individuell abhängig von der Anatomie der Herzkranzgefäße. Des Weiteren sind bei der LAD und besonders häufig bei

der LAD mit Reperfusion (der Faden zum Abbinden der LAD wird nach einer gewissen Zeit wieder entfernt) die Infarkte nicht transmural. Allerdings bilden diese beiden Modelle die klinische Situation eines Herzinfarktes besser ab als der Kryoinfarkt. Die permanente Okklusion der LAD kann auf Patienten übertragen werden, die nicht rechtzeitig reperfundiert werden konnten, die LAD mit anschließender Reperfusion stellt das klinisch häufigste Szenario dar.

Der Kryoinfarkt ist relativ unabhängig von der individuell sehr unterschiedlichen Vaskularisierung und führt deshalb zu einer hohen Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit. Aufgrund der klar abgegrenzten Infarktzone wird er bevorzugt für Langzeit-Beobachtungen des strukturellen und funktionellen Remodelings eingesetzt. Außerdem liefert er dadurch auch robuste Ergebnisse bei der Prüfung von Arzneimitteln und Zelltherapien auf ihre Effektivität (Lindsey et al. 2018). Aufgrund der geringeren Variabilität der Infarktgröße und Transmuralität können zudem die Gruppengrößen der Versuchstiere bei Einsatz des Kryoläsions-Modells kleiner gewählt werden.

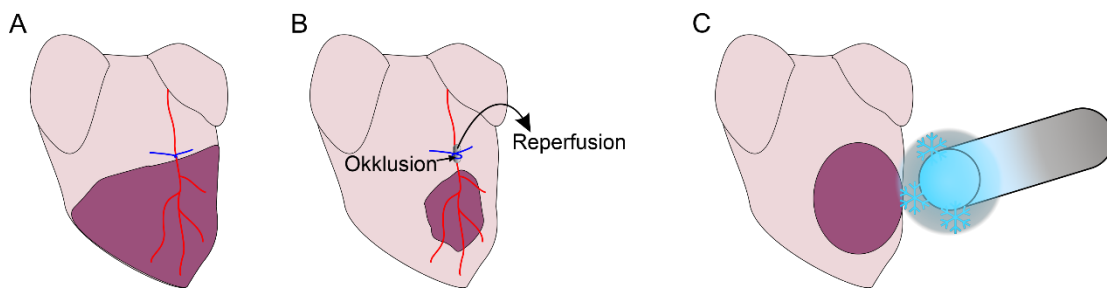


Abbildung 9: In vivo Herzinfarktmodelle.

A: Vollständige Okklusion der LAD. **B:** Okklusion der LAD mit anschließender Reperfusion durch Lockerung des Abbindefadens. **C:** Kryoläsion durch Aufdrücken eines gefrorenen Kupferstempels auf den linken Ventrikel. Der Infarktbereich ist in lila dargestellt.

2 Relevanz und Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wird die Funktion von Cx43, dem wichtigsten GJ-Protein, *in vitro* und im Mausherzen untersucht. Hierzu wurde ein neues genetisches Überexpressions-Modell etabliert, das eine zellspezifische und zeitlich induzierbare Expression von Cx43 und mCherry ermöglicht. Mit Hilfe dieses Modells wurden die zellbiologischen und funktionellen Konsequenzen der Cx43-Überexpression im gesunden und infarzierten Mausherzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten erforscht. Außerdem konnten mittels diesen Modells wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, ob die gezielte Überexpression von Cx43 als biologischer anti-VT Ansatz vielversprechend sein könnte und zukünftig therapeutisch eingesetzt werden könnte.

Im Herzen bilden GJs elektrische Synapsen, sie sind ein kritischer Bestandteil des funktionellen Synzytiums. Der wichtigste Baustein kardialer GJs ist das Cx43, da es eine schnelle und koordinierte Erregung des Herzens ermöglicht. Seine grundlegende Bedeutung für die Herzentwicklung und die Herzfunktion wurde bereits u.a. mit Hilfe von Cx43-KO-Modellen umfangreich untersucht (siehe Kapitel 1.2.2). Es gibt aber weiterhin offene Fragen bezüglich der Bedeutung von Cx43 während verschiedener Stadien der Herzentwicklung und seiner Rolle für die Entstehung von Arrhythmien z.B. nach einem Herzinfarkt. Auch die Konsequenzen einer veränderten zellulären Lokalisation von Cx43 nach einem Herzinfarkt sind noch nicht vollständig aufgeklärt.

So wird vermutet, dass die Lokalisation von Cx43 innerhalb der KM-Membran für die Funktion wichtig ist. In Folge einer Ischämie bzw. eines Herzinfarktes kommt es in KMs der BZ zu einer Lateralisierung von Cx43. Diese wird mit der InfarktgröÙe, negativen zellbiologischen Effekten und auch der Entstehung von Arrhythmien in Verbindung gebracht, da ein verändertes Verteilungsmuster Leitungsinhomogenitäten begünstigen kann.

In diesem Zusammenhang konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Re-Expression von Cx43 in der BZ und der Narbe möglicherweise eine therapeutische Relevanz für die Reduktion der VT-Inzidenz nach einem Herzinfarkt hat.

Generell scheint es möglich zu sein, Leitungsinhomogenitäten zwischen normalem und infarziertem Myokard im Bereich der Herzinfarktnarbe biologisch zu korrigieren und dadurch die VT-Inzidenz zu senken. Hier rücken neben KMs vermehrt auch kFBs in den Fokus der kardialen Forschung, insbesondere bezüglich der Möglichkeit und der Bedeutung von heterozellulärer Kopplung. Bedingt durch die Berichte der Letalität während der Embryonalentwicklung nach ubiquitärer Cx43-Überexpression wurde in dieser Promotionsarbeit, unter Verwendung eines Cre-induzierbaren murinen Cx43-

Überexpressions-Modells, die zellbiologische Bedeutung von Cx43 in KMs des Myokards oder alternativ in (m)FBs der Infarkt Narbe adulter Mäuse untersucht.

Zur Überprüfung des genetischen Cx43-Überexpressions-Modells und zur Kontrolle seiner Funktionalität wurde das Konstrukt zuerst in murinen G4 embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) und in humanen HeLa-Zellen getestet. Eine Vielzahl molekularbiologischer Methoden (Polymerasekettenreaktion (PCR)-Assays, Southern blot, Karyotypisierung, Kopienzahlbestimmung (qPCR), Western blot), die Transduktion der induzierbaren Zelllinien mit einem AAV-Cre Virus (Adeno assoziierter Virus), sowie immunhistochemische Untersuchungen wurden zur Charakterisierung der transgenen Zelllinien eingesetzt. Mit Hilfe der beiden *in vitro* Modelle wurde anhand von Fluoreszenzfarbstoff-Diffusions-Experimenten und fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)-Versuchen die Fähigkeit des exogenen Cx43 zur Ausbildung intakter GJs nachgewiesen.

Anschließend wurde mit Zellen geeigneter transgener G4 ES-Zellklone (CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry) ein *in vivo* Mausmodell mit zeitlich kontrollierbarer Überexpression von Cx43 generiert. Das Einkreuzen zelltypspezifischer Tamoxifen-induzierbarer Mer-Cre-Mer-Deleter-Mauslinien ermöglichte die spezifische Cx43-Überexpression in KMs ($\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$) sowie in mFBs ($\text{Periostin}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$) zu einem ausgewählten Zeitpunkt. Dadurch konnte der Effekt einer Überexpression von Cx43 (I) in KMs im gesunden und Kryo-infarzierten Mausherzen sowie (II) in mFBs der Kryoinfarkt Narbe und BZ auf die Herzfunktion und -morphologie sowie auf die Mortalität adulter Mäuse untersucht werden. Mittels molekularbiologischer Methoden (digitale PCR (dPCR), RNA-Sequenzierung (RNAseq), Western blot), immunhistochemischer Färbungen sowie durch die Bestimmung der Herzinfarktgröße, der Hypertrophie des Herzens und der Überlebenswahrscheinlichkeit der Mäuse wurden die zwei Mauslinien charakterisiert. Es wurde die linksventrikuläre Pumpfunktion der Mäuse mittels Echokardiographie untersucht. EPU's dienen der Bewertung der Arrhythmie-Anfälligkeit der Mäuse.

Auf Grundlage des neu generierten Cx43-Überexpressions-Modells kann die zellbiologische und funktionelle Bedeutung einer Cx43-Überexpression in adulten Mäusen bzw. zu verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht werden. Außerdem können langfristig umfangreiche Untersuchungen durchgeführt werden, welche Aufschluss über die Bedeutung einer zelltypspezifischen Cx43-Überexpression nach einem Herzinfarkt oder während der Embryonalentwicklung geben und das elektrische Zusammenspiel verschiedener Zelltypen des Herzens sowie den Mechanismus zur Entstehung von Rhythmusstörungen näher beleuchten. Zudem können wichtige Erkenntnisse gesammelt werden, um das anti-

arrhythmische Potenzial einer gezielten Cx43-Überexpression in der Herzinfarktnarbe als „biologisches anti-VT-Instrument“ zu bewerten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und gekaufte Lösungen

Tabelle 3: Chemikalien und gekaufte Lösungen

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
30 % Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (19:1)	1610154	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Agarose Standard	3810.3	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ammonium Persulfat	1610700	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Ampuwa® Wasser	PZN: 09235555	Fresenius (Bad Homburg, D)
Aqua-Poly/Mount	18606	Polysciences (Warrington, PA, USA)
BCA-Protein Assay Kit (Pierce™)	23225	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	PZN: 80025161	GP Grenzach Produktions GmbH (Grenzach-Wyhlen, D)
β-Mercaptoethanol	M3148	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Bouin'sche Lösung	HT10132	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Burprenorpin (Buprenovet 0,3 mg/ml)	PZN: 14439113	Richter Pharma AG (Wels, Österreich)
Desoxycholsäure Natriumsalz	D6750	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Direct Red 80	365548	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
DNA Größenstandard (100 bp bis 10000 bp)	SM0334	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
ECL Western Blot Substrat (Pierce™)	32209	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
EDTA 0,5 M pH 8 Lösung	03690	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Entellan®	1.07961.1000	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Enthaarungscreme	dm-Artikelnr: 277948	dm-drogerie markt GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Eselserum	017-000-121	Jackson Immuno Research (Cambridgeshire, UK)
Essigsäure 100 %	6755.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ethanol absolut	A3678,1000	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
Ethanol (70 %)	27669	Otto Fischar (Saarbrücken, D)

Ethidiumbromid	46067	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Fast green FCF	F7258	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Fötale Kälberserum (FKS)	P30-1902	PAN Biotech (Aidenbach, D)
Formaldehyd-Lösung 4 %	1.00496	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Heparin-Natrium	PZN: 15782698	B. Braun SE (Melsungen, D)
Hoechst 33342 (1 mg/ml)	B2261	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
5x Hot firepol® Taq-Polymerase	04-25-00S25	Solis BioDyne (Tartu, Estonia)
IGEPAL CA-630	I8896	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Isopropanol/ 2-Propanol (70 %)	27400	Otto Fischar (Saarbrücken, D)
Isopropanol/2-Propanol (100 %)	9866.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Kochsalzlösung 0,9 %	PZN: 06173569	B. Braun SE (Melsungen, D)
Lauf Puffer (ProSieve EX Running Buffer 10x)	00200307	Lonza (Basel, Schweiz)
Lämmli Probenpuffer (2x)	1610737EDU	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Lämmli Probenpuffer (4x)	1610747	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Leukofix	PZN: 4593422	BSN medical GmbH (Hamburg, D)
L-Glutamin	25030081	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Maisöl	C8267	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Methanol	8388.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Milchpulver	M203	VWR (Radnor, PA, USA)
Natriumchlorid (NaCl)	S7653	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	L3771	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Natriumhydroxid (NaOH)	9356.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Natriumhydroxid (NaOH)	1091371000	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	11140-035	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) Tabletten	11510546	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
PBS in Lösung	11503387	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Penicillin/Streptomycin	15140-122	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	PMSF-RO	Roche (Basel, Schweiz)
Pikrinsäure	AP251049.1610	Applichem (Darmstadt, D)
Precision Plus Protein Western C Standard	1610376	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Protease Inhibitor Tabletten (Pierce™)	A32963	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Proteinase K	158918	Qiagen (Hilden, D)
Red Blood Cell Lysis Solution (10×)	130-094-183	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Rinderserumalbumin	A9418	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
RNAprotect®	76104	Qiagen (Hilden, D)
RNase Zap™	R2020	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Salzsäure (HCL)	4625.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Tamoxifen	T5648	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Tetramethyldiamin (TEMED)	T7024	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	4583	Sakura Finetek (Torrance, CA, USA)
Transfer Puffer (ProSieve EX Western Blot Transfer Buffer 10x)	00200309	Lonza (Basel, Schweiz)
Trizma®Hydrochlorid	10812846001	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Triton X-100	93418	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Trizma Base	T1503	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Trypsin/EDTA 0,05 %	25300-096	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Tween 20	P9416	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Ultraschallgel	PZN: 8825881	P. J. Dahlhausen & Co. GmbH (Köln, D)
Xylol	9713.2	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Zelletten	PZN: 07706016	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG (Neuwied, D)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Deckgläser	VWR (Darmstadt, D)
Dreiwegehahn Discifix C-3	B. Braun SE (Melsungen, D)
Edelstahl Kugeln 5 mm	Qiagen (Hilden, Germany)
Einweg-Rührer für Küvetten	Kartell S.p.A. Labware (Noviglio, Italien)
Filterpapier	VWR (Darmstadt, D)
Gase (Sauerstoff, Lachgas, flüssiger Stickstoff)	Linde Gas Therapeutics GmbH & Co KG (Unterschleißheim, D)
Insulinspritzen	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Isofluran Furene®	Abott GmbH & Co KG (Wiesbaden, D)
Leukosilk®	BSN Medical GmbH (Hamburg, D)
Leukofix®	BSN Medical GmbH (Hamburg, D)
Mikro-Löffelspatel	VWR (Darmstadt, D)
MS Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Objektträger Histobond	Marienfeld (Lauda-Königshoven, D)
Omnifix Luer Lock solo Spritze (10 ml)	B. Braun SE (Melsungen, D)
Original Perfusor Leitung	B. Braun SE (Melsungen, D)
PARAFILM® M Verschlussfolie	Bemis Company (Neenah, WI, USA)
Petrischalen	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Pipettenspitzen mit Filter	Nerbe plus GmbH & Co. KG (Winsen/Luhe, D)
Präparationsbesteck	F.S.T (Heidelberg, D)
Pre-Separation Filters (70 µm)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Prolene Nahtmaterial	Johnson & Johnson (Livington, Schottland)
PVDF Membran	Biozym (Hessisch Oldendorf, D)
QIAshredder Säulen	Qiagen (Hilden, Germany)
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml)	VWR (Darmstadt, D)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, D)

Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
TaKaRa® BioMasher Standard	Takara Bio Inc. (Kusatsu, Japan)
Vasofix® Safety 22G	B. Braun SE (Melsungen, D)
Zählkammer Neubauer	VWR (Darmstadt, D)
Zellkulturplatten (6-well, 24-well, 96-well)	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Zellkulturschalen (60 mm, 10 cm)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, D)
Zentrifugierröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)

3.1.3 Geräte

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Anästhesie-Induktionskammer (Plexiglas Box)	Selbst angefertigt (Granitzer, Bonn, D)
Bioanalyzer 2100	Agilent (Boeblingen, D)
ChemiDoc™ MP Imaging System	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Chip Beladungsstation	Agilent (Boeblingen, D)
CO ₂ - Inkubator HERAcCell 240	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Digitaler Messschieber	Hazet (Remscheid, D)
EPU Katheter (CIB'ER MOUSE™ electrophysiology catheter, 8 Elektroden)	NuMED (Cross Roads, TX, USA)
Feinwaage	Mettler Toledo (Gießen, D)
Gefrierschränke: -20 °C, -80 °C	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Gelgießstand	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Gelkammern für Elektrophorese und Tank Blot (Mini Trans-Blot® Cell)	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Gelkammern für Agarose-Gelelektrophorese (horizontal) mit UV-transparenten Gelträgern und Gelgießstand	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Gel Stick „Touch“ Gelimager	Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen, D)
Glasperlensterilisator Steri250	Simon Keller AG (Burgdorf, Schweiz)

Glasplatte	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Glasplatte mit Abstandshalter (1,5 mm)	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Heizplatte für Mäuse	Eigene Herstellung (Krüger, Bonn, D)
Heizplatte mit Magnetrührfunktion	VWR (Darmstadt, D)
IKA Vortexer (Modell MS3)	Agilent (Boeblingen, D)
Intubierstation	Eigene Herstellung (Granitzer, Bonn, D)
Isolated Pulse-Stimulator Modell 2100	A-M-Systems (USA)
Kaltlichtquelle KL1500LCD	Leica (Wetzlar, D)
Kamm (15-well)	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Konfokales Mikroskop Modell Eclipse Ti mit Nikon A1R MP System und Laser Einheit (LU-N4 (405 nm, 488 nm, 561 nm, 640 nm))	Nikon (Tokio, Japan)
Kühlschränke: 4 °C	Liebherr (Biberach an der Riss, D)
Kryotom CM3050S	Leica (Wetzlar, D)
LED Lichtquelle für Stereolupe LED3000SLI	Leica (Wetzlar, D)
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH & Co KG (Schwabach, D)
Manuelles Operationsmikroskop M651	Leica (Wetzlar, D)
Mikroskop Axiovert A1	Zeiss (Jena, D)
Mikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss (Jena, D)
Mikroskop Axio Observer mit AxioCam 512 mono und HXP 120V, (Übersichtsaufnahmen)	Zeiss (Jena, D)
Mikrowelle	KOS Microwave HistoSTATION (Milestone, D)
MiniVac- Absaugpumpe mit Fluosorber Kanister	Harvard Bioscience (Holliston, MA, USA)
MiniVent Type 845	Hugo Sache Elektronik, Harvard Apparatus (March, D)
NanoDrop 100 Spektrometer	Peqlab (Erlangen, D)
NanoQuant Plate	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Ohrlochzange	ZOONLAB GmbH (Castrop-Rauxel, D)
PCR Gerät	Biometra (Göttingen, D)
pH-Meter 765 Calimatic	Knick (Berlin, D)

Pipetten	Gilson (Limburg, D)
Pipettierhilfe	Integra Bioscience (Fernwald, D)
Rollenmischer SRT9D	Cole-Parmer Ltd (Staffordshire, UK)
Rotlichtlampe	Philips (Hamburg, D)
Spannungsgerät PowerPAC HC	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
SPARK® Multimode-Microplate-Reader	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Stereo Zoom Mikroskop Modell Axio Zoom V16 (Filter: 43 HE DsRed, 38 HE GFP)	Zeiss (Jena, D)
Sterilbank Hera Safe / HERAguard Reinluftwerkbank HPH4	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Stickstoffbehälter	KGW Isotherm (Karlsruhe, D)
Stickstofftank	Tec-lab GmbH (Taunusstein, D)
Thermo Mixer	Hettich AG (Bäch SZ, Schweiz)
TissueLyser LT	Qiagen (Hilden, D)
Ultraschallbad USC 500 T	VWR (Darmstadt, D)
Vakuumpumpe mit Filter	Vacuubrand (Wertheim, D)
Vapor für Isofluran	Drägerwerk AG (Lübeck, D)
Visual Sonics Vevo 3100 Echokardiograph mit MX550D Schallkopf und Vevo® Integrated Rail System III	FUJIFILM Visual Sonics (Toronto, Kanada)
Vortexer	VWR (Darmstadt, D)
Wippe	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Zentrifugen	Eppendorf (Hamburg, D)

3.1.4 Software

Tabelle 6: Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
Adobe	Adobe Inc. (San José, CA, USA)
Axio Vision	Zeiss (Jena, D)
Citavi Literaturverwaltungsprogramm	QSR International (Burlington, MA, USA)
CorelDRAW	Corel Corporation (Ottawa, Kanada)

Clone Manager	Sci Ed Software (Westminster, CO, USA)
Cytoscape 3.9.1 mit ClueGO Plugin 2.5.9	National Institute of General Medical Sciences (NIGMS) (Bethesda, MD, USA)
GraphPad Prism 9	GraphPad Software (San Diego, CA, USA)
i-control™	Tecan (Männedorf, Schweiz)
ImageJ	NIH (Bethesda, MD, USA)
Image Lab	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Intas GDS Touch 2 (V1.1.5.4)	Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen, D)
Labchart	ADInstruments (Dunedin, Neuseeland)
Microsoft Office	Microsoft (Redmond, WA, USA)
NIS-Elements	Nikon (Tokio, Japan)
Stimulus	AG Sasse (Bonn, D)
Vevo® LAB	FUJIFILM VisualSonics (Toronto, Kanada)
Zen	Zeiss (Jena, D)
2100 Expert Software	Agilent (Boeblingen, D)

3.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Agarose Gel 1 %	1 g Agarose 100 ml TAE- Puffer
Ammonium Persulfat (APS) Lösung 10 %	100 mg APS ad 1000 µl H ₂ O bidest.
Buprenorphin Injektionslösung	1 ml Buprenovet (0,3 mg/ml) in 29 ml Kochsalzlösung 0,9 %
Gelatine- Lösung (1 %)	1 g Gelatine in 100 ml PBS Autoklavieren
Gelatine-Lösung (0,1 %)	1 % Gelatine- Lösung 1:10 mit PBS verdünnen
Hoechst- Lösung (1 µg/mL)	1 ml Hoechst 33342 (1 mg/ml) 999 ml PBS
Custodiol® (Kardioplegische Lösung)	15,0 mmol/l NaCl 9,0 mmol/l KCl

	<p>4,0 mmol/l MgCl₂ (6 H₂O) 18,0 mmol/l Histidin HCL (H₂O) 2,0 mmol/l Tryptophan 30,0 mmol/l Mannitol 0,015 mmol/l Calciumchlorid (2 H₂O) 1,0 mmol/l Kaliumhydrogen-2-ketoglutarat</p>
Laufpuffer (Western blot)	10x Laufpuffer-Konzentrat 1:10 in H ₂ O bidest. verdünnen
Modifizierter Ripa Puffer	<p>250 µl 1 M Tris-HCL pH 7,5 500 µl 10 % Nonidet™ P40 125 µl 10 % Desoxycholsäure Natriumsalz 750 µl 1 M NaCl 10 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 5 ml H₂O bidest. Unmittelbar vor Gebrauch hinzugefügen: 5 µl 1 M PMSF (Serin Protease Inhibitor) 250 µl Protease & Phosphatase Inhibitor (Stocklösung: 1 Inhibitor Tablette in 500 µl H₂O bidest. lösen)</p>
PBS	<p>2 PBS Tabletten (je 5 g) in 1000 ml H₂O bidest. lösen</p>
PEB Puffer (Protein Extraktions Puffer)	<p>0.5 % Rinderserumalbumin (BSA) 2 mM EDTA in PBS pH 7,2</p>
Red Blood Cell Lysis Solution (10x)	10x Red Blood Cell Lysis Solution 1:10 mit Ampuwa® verdünnen
Sammelgel 8 %	<p>2,4 ml H₂O bidest. 1,33 ml 30 % Acrylamid/ Bis Lösung 1,25 ml 0,5 M Tris pH 6,8 50 µl 10 % SDS 25 µl 10 % APS 5 µl TEMED</p>
SDS 10 %	<p>10 g SDS ad 100 ml H₂O bidest.</p>
Silica Platten	<p>100 ml Elastomere Base 10 ml Elastomere Curing Agent Petrischalen zu etwa 1/3 befüllen.</p>

TAE Puffer 50x	242 g Trizma Base 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8) ad 1000 ml H ₂ O bidest.
TAE Puffer 1x	20 ml TAE Puffer 50x 980 ml H ₂ O bidest.
Tamoxifen (0,6 mg/ 100 µL)	30 mg Tamoxifen 500 µl Ethanol absolut 4,5 ml Maisöl
Tamoxifen (1 mg/ 100 µL)	50 mg Tamoxifen 500 µl Ethanol absolut 4,5 ml Maisöl
TBS 10x (Tris-gepufferte Salzlösung)	24,2 g Trizma Base 88 g NaCl ad 1000 ml H ₂ O bidest. pH 7,6
TBS-T (Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,1 % Tween20)	50 ml 10x TBS 0,5 ml Tween 20 449,5 ml H ₂ O bidest.
Transferpuffer (Western blot)	10x Transferpuffer-Konzentrat 1:10 in H ₂ O bidest. verdünnen
Trenngel 12 %	3,2 ml H ₂ O bidest. 4,2 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid Lösung 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 100 µl 10 % SDS 50 µl 10 % APS 5 µl TEMED
Tris-Puffer 1,5 M pH 8,8	90,86 g Trizma Base ad 500 ml H ₂ O bidest. pH 8,8
Tris- Puffer 0,5 M pH 6,8	30,29 g Trizma Base ad 500 ml H ₂ O bidest. pH 6,8
0,2 % Triton-X-100- Lösung	100 µl Triton-X-100 49,9 ml PBS

3.1.6 Kits

Tabelle 8: Verwendete Kits

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Kit	5067-1511	Agilent (Boeblingen, D)
BCA Protein Assay Kit	23227	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Gentra Purgene Mouse Tail Kit	158267	Qiagen (Hilden, D)
Neonatal Cardiomyocyte Isolation Kit, mouse	130-100-825	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Neonatal Heart Dissociation Kit, mouse and rat	130-098-373	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
NuGEN Trio RNA-Seq Library Kit	0357-08	NuGEN Technologies (Kalifornien, USA)
OctoMACS™ Starting Kit	130-042-108	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
RNeasy© Plus Micro Kit	74034	Qiagen (Hilden, D)
Superscript™ VILO™ cDNA Kit	11754050	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Kit	01673921	Dow Silicones Deutschland GmbH (Wiesbaden, D)

3.1.7 Zellkulturmedium und Zusätze

Tabelle 9: Zellkulturmedium und Zusätze

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	21980-032	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

3.1.8 Zusammensetzung des Zellkulturmediums

Tabelle 10: Zusammensetzung des Zellkulturmediums

Bezeichnung	Verwendungszweck	Zusammensetzung
20 % IMDM Medium	Isolierung und Kultivierung (ein Tag nach Isolation) von primären neonatalen Kardiomyozyten (NNKMs)	20 % (v/v) FKS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0,1 mM NEAA 0,1 mM β-Mercaptoethanol in IMDM
2 % IMDM Medium	Kultivierung von primären NNKMs ab Tag zwei nach Isolation)	2 % (v/v) FKS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0,1 mM NEAA 0,1 mM β-Mercaptoethanol in IMDM

3.1.9 Versuchstiere

Alle für diese Arbeit erforderlichen Tierversuche wurden vom LANUV (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz), NRW, Deutschland vorab genehmigt und unter dem Aktenzeichen 81-02.04.2019.A385 durchgeführt.

Die verwendeten Mäuse wurden im Haus für experimentelle Therapie, Bonn, D geboren und gehalten. Sie hatten Zugang zu Standard Nager Futter (Ssniff® R/M-H, autoklavierbar, V1534-300 bzw. Ssniff® M-Z, autoklavierbar, V1124-300, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, D) sowie autoklaviertem Wasser *ad libitum*. Als Einstreu wurde Espenstreu (Abedd Espen CLASSIC, H0234-400, LAB & VET Service GmbH, Abedd, Wien, AU) verwendet. Zusätzlich standen den Mäusen pro Woche ein Nestlet (14010, Plexx B.V, Elst, NL) zum Nestbau und postoperativ ein Maushaus (Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, D) als Rückzugsort zur Verfügung.

In den Haltungsräumen herrschte eine standardisierte Lufttemperatur von 22 °C mit 50 – 70 % Luftfeuchte. Die Mäuse wurden in IVC-Systemen gehalten (Tecniplast: Blueline, Greenline) und 1x wöchentlich in frische Käfige umgesetzt.

Die beiden Cx43-Knockin-Mauslinien (Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF}, Klon 29 (K29) und Klon 31 (K31)) wurden von der transgenen Core Facility der Medizinischen Fakultät der

Universität Bonn durch Blastozysteninjektion von Zellen der CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-Ai6 (Cre⁻) G4 ES Zelllinien 29 und 31 generiert (Niemann et al. 2022). Um die Transgenaktivität *in vivo* zu induzieren wurden zwei verschiedene Tamoxifen-induzierbare MerCreMer (MCM)-Mauslinien bei „The Jackson Laboratory“ (Bar Harbor, ME, USA) bestellt und eingekreuzt: Die Periostin-MCM-Mauslinie (B6.129S-Postn^{tm2.1(cre/Esr1*)Jmol/J}, Linie: 029645) wurde bereits von Kanisicak et al. (2016) beschrieben, die αMHC-MCM-Mauslinie (*A1cf^{Tg(Myh6-cre/Esr1*)1Jmk/J}*) von Sohal et al. (2001).

Da davon ausgegangen wurde, dass das Geschlecht der Mäuse keine Auswirkungen auf die Ergebnisse der Experimente hat, wurden für die Analysen sowohl Weibchen als auch Männchen eingesetzt, um den Tierüberschuss möglichst gering zu halten. Außerdem können so geschlechtsübergreifende und allgemeingültige Ergebnisse generiert werden.

3.1.10 Genotypisierungsprimer

Die Genotypisierungsprimer der Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF}-Mauslinie wurden am Institut für Physiologie I (Universitätsklinikum Bonn, D) konzipiert. Für die beiden Cre-Deleter Linien (αMHC-MCM (*A1cf^{Tg(Myh6-cre/Esr1*)1Jmk/J}*), Periostin-MCM (B6.129S-Postn^{tm2.1(cre/Esr1*)Jmol/J}), siehe Kapitel 4.2.4) wurden die von „The Jackson Laboratory“ empfohlenen Genotypisierungsprimer verwendet. Alle Primer wurden über Eurofins Genomics (Ebersberg, D) bestellt.

Tabelle 11: Primersequenzen zur Genotypisierung der transgenen Mauslinien

Bezeichnung	Primersequenz (5' → 3')
Genotyp-Cx43-Maus-rev-common	GAGCGGGAGAAATGGATATG
Ai6-fw	AGCCTCTGTTCCACATACAC
Genotyp-Cx43-Maus-fw-wt	CCCTCTTCCCTCGTGATCTG
Common Postn	CCTTGCAATAAGTAAAACAGCTC
wt Forward Postn	GGTGCTTCTGTAAGGCCATC
Mutant Forward Postn	GGTGGGACATTTGAGTTGCT
Common A1cf	TCTATTGCACACAGCAATCCA
wt-Reverse A1cf	CCAACCTCTTGTGAGAGGAGCA
Mutant-Reverse A1cf	CCAGCATTGTGAGAACAAGG

3.1.11 Adeno-assoziierte Viren

Tabelle 12: AAV2.1-Cre Virus

Bezeichnung	Titer	Plasmidnummer	Hersteller
AAV2.1-Cre Virus (pENN.AAV.CMV _s .PI.Cre.rBG)	1.2×10^{13} GC/mL	105537-AAV1	Addgene (Watertown, MA, USA)

3.1.12 Antikörper

3.1.12.1 Primäre Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Tabelle 13: Primäre Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
α-Aktinin	Maus IgG1	1:400	A7811	Sigma
	Kaninchen IgG	1:100	ZRB1169-25UL	Sigma
α-smooth-muscle actin	Maus IgG2a	1:800	A5228	Sigma
Cx43	Kaninchen IgG	1:3000		Selbsthergestellt, PSL GmbH (Heidelberg, D)
mCherry	Huhn IgY	1:10000	NBP2-25158	Novus Biologicals
Periostin	Kaninchen IgG	1:200	NBP1-30042	Novus Biologicals
P2A	Maus IgG1 _κ	1:500	NBP2-59627	Novus Biologicals
Wheat Germ Agglutinin, Fluorescein		1:1000	FL-1021	Vektor Laboratories

3.1.12.2 Primäre Antikörper zur Western blot Detektion

Tabelle 14: Primäre Antikörper zur Western blot-Detektion

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
β-Actin-555	Maus IgG1	1:1000	A3854	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Cx43	Kaninchen IgG	1:3000		Selbsthergestellt, PSL GmbH (Heidelberg, D)
GAPDH-555	Maus IgG1	1:2000	MA5-15738- A55	Invitrogen

mCherry	Huhn IgY	1:10000	NBP2-25158	Novus Biologicals
P2A	Maus IgG1 _κ	1:700	NBP2-59627	Novus Biologicals

3.1.12.3 Sekundäre Antikörper

Tabelle 15: Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Fluorochrom	Wirt	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
Anti-Huhn IgG	Cy5	Esel	1:400 (IHC) 1:3000 (WB)	703-175-155	Jackson Immuno Research
Anti-Kaninchen IgG	Cy2	Esel	1:200 (ICH) 1:3000 (WB)	711-225-152	Jackson Immuno Research
Anti-Kaninchen IgG	Cy5	Esel	1:400 (IHC)	711-175-152	Jackson Immuno Research
Anti-Maus IgG	HRP	Ziege	1:3000 (WB)	A2304	Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, D)
Anti-Maus IgG	Cy5	Esel	1:3000 (WB)	715-175-151	Jackson Immuno Research
Anti-Maus IgG	Cy2	Esel	1:200 (IHC)	715-225-150	Jackson Immuno Research
Anti-Maus IgG2a	Cy5	Esel	1:400 (IHC) 1:3000 (WB)	115-605-206	Jackson Immuno Research

3.1.13 TaqMan-Assays

Tabelle 16: TaqMan-Assays

Bezeichnung	Farbstoff	Artikelnummer	Hersteller
Cx43 endo- und exogen	FAM	Selbst konzipiert	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Cx43 endogen	FAM	Mm00439105_m1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Cx43 exogen	FAM	Selbst konzipiert	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

mCherry	FAM	Selbst konzipiert	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Hprt	VIC	Mm03024075_m1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
GAPDH	VIC	4352339E	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Zur Gestaltung der Taqman-Sonden wurden bestimmte Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Bereiche des Cx43-Gens (mus musculus) und des Ai6-Klonierungsvektors verwendet:

Chr 10

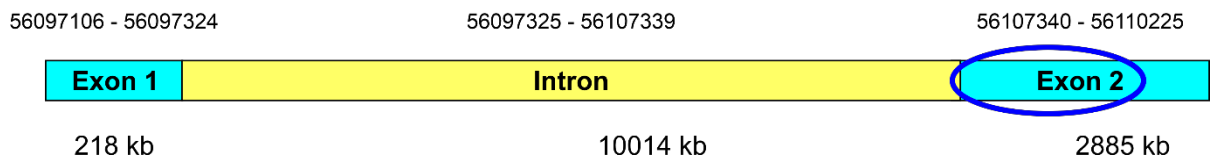


Abbildung 10: Taqman-Sonde zur Detektion von endo- und exogenem Cx43.

Die Sonde bindet an die Cx43 kodierende Genregion in Exon 2.

Chr 10

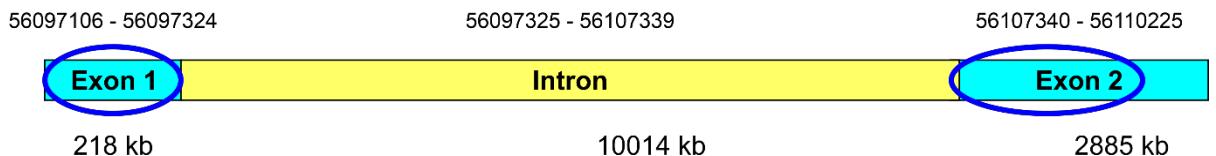


Abbildung 11: Taqman-Sonde zur Detektion von endogenem Cx43.

Die Sonde ist Exon-übergreifend und detektiert ausschließlich das endogene Cx43. Die Sequenz von Exon 1 (ausschließlich 5'-untranslatierte Region von Cx43) ist im Konstrukt nicht vorhanden., da das exogene Cx43 nur die Cx43 cDNA-kodierende Genregion auf Exon 2 umfasst.

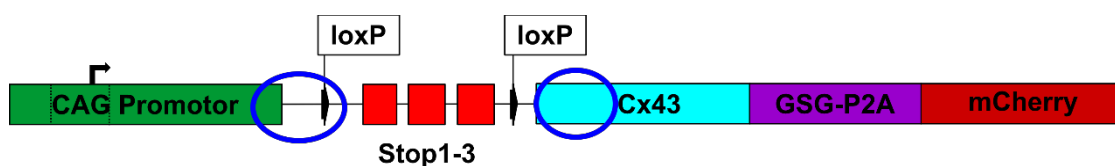


Abbildung 12: Taqman-Sonde zur Detektion von exogenem Cx43.

Die Sonde detektiert nur das exogene Cx43, da die 5'-untranslatierte Region der exogenen Cx43-RNA charakteristisch für das Ai6-Konstrukt ist.



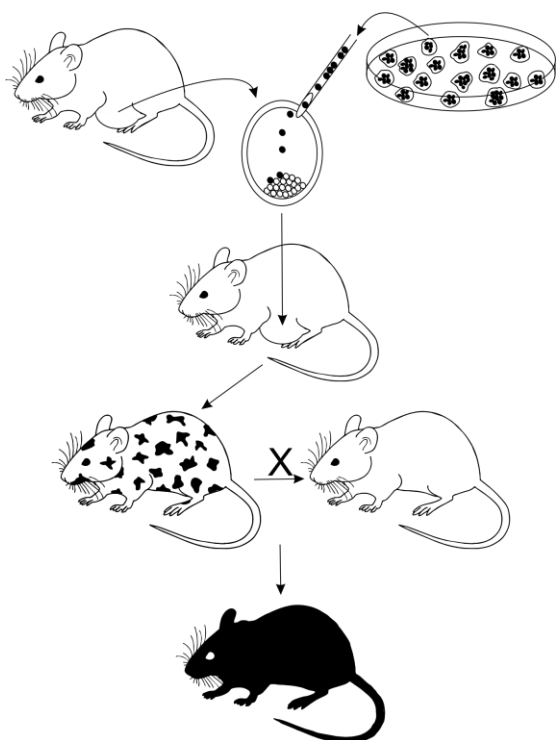
Abbildung 13: Taqman-Sonde zur Detektion von mCherry.

Der Fluoreszenzreporter mCherry ist Teil der Transgenexpressionskassette.

3.2 Methoden

3.2.1 Generierung transgener Mauslinien durch Blastozysteninjektion

Transgene Mäuse wurden mittels Blastozysteninjektion generiert. Dazu wurden murine G4 ES-Zellen, die mit dem CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-Ai6 Vektor stabil transfiziert und charakterisiert (K29, K31) (Niemann et al. 2022) worden waren, vom transgenen Service der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn in Blastozysten von CD1-Mäusen injiziert. Diese Blastozysten wurden scheinchwangeren Leihmüttern transplantiert. Der Grad des Chimärismus der Nachkommen konnte anhand der Fellfarbe abgeschätzt werden. CD1-Mäuse haben eine weiße Fellfarbe. Die murinen G4 ES-Zellen haben hingegen einen gemischten Hintergrund, basierend auf der Verpaarung eines Mausstamms brauner Fellfarbe (129S6) mit Mäusen schwarzer Fellfarbe (C57BL) (George et al. 2007). Um die Keimbahngängigkeit der transgenen Stammzellen zu überprüfen, wurden die chimären (gemischt-zelligen) Männchen, die den größten Anteil an braun/schwarzer Fellfarbe aufwiesen, mit CD1-Wildtyp (WT)-Weibchen verpaart. Entstanden aus dieser Kreuzung Nachkommen mit schwarzer oder brauner Fellfarbe, war dies die Bestätigung der



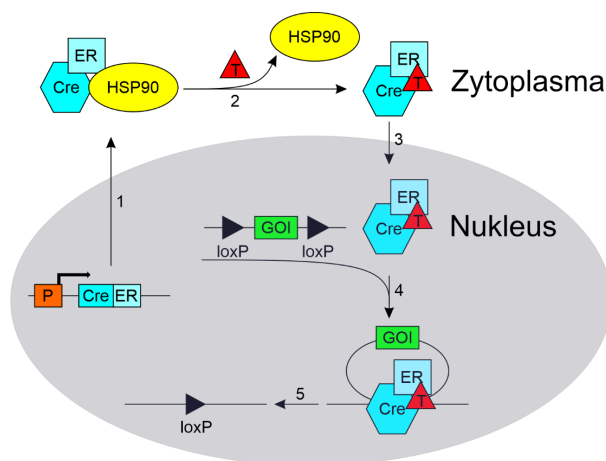
Keimbahngängigkeit der transgenen G4 ES-Zellen (Abbildung 14). Zusätzlich wurde das Vorhandensein des Transgens durch Genotypisierung der DNA aus Schwanzspitzen bzw. Ohrstanzen der Nachkommen überprüft.

Abbildung 14: Generierung transgener Mauslinien durch Blastozysteninjektion und Keimbahngängigkeit.

Blastozysten schwangerer CD1-Mäuse (weiße Fellfarbe) werden entnommen, genetisch veränderte Stammzellen, die von Mäusen mit schwarzer/brauner Fellfarbe abstammen, werden injiziert. Anschließend werden diese Blastozysten CD1-Leihmüttern eingepflanzt. Männliche chimäre Nachkommen (weiß-schwarz-/braun gemischte Fellfarbe) werden dann mit CD1-WT-Weibchen verpaart. Bei Keimbahngängigkeit haben die Nachkommen braunes/schwarzes Fell. Abgewandelt von (Hirsch-Kauffmann und Schweiger 1996).

3.2.2 Cre-loxP-System

Das Cre-loxP-System ist ein Rekombinationssystem, das ein Zeit- und Gewebe-spezifisches Entfernen einer DNA-Sequenz erlaubt und eine kontrollierte Genexpression ermöglicht (Abbildung 15). Es findet breite Anwendung bei der Generierung von KO- / Knockin-Mauslinien. Das System wurde in den 1990er Jahren basierend auf dem rekombinationsfähigen Genom des Bakteriophagen P1 entwickelt (Sternberg und Hamilton 1981; Sauer und Henderson 1988; Kim et al. 2018). Es besteht aus zwei Komponenten: (I) Der Cre-Rekombinase (**c**yclization **r**ecombinase) und (II) den loxP-Sequenzen (**l**ocus **o**f **x**-over, **P**1). Die Cre-Rekombinase erkennt loxP-Sequenzen und katalysiert die ortsspezifische Spaltung und Neuverknüpfung der DNA. Sind die beiden loxP-Stellen in gleicher Richtung orientiert, wird die DNA-Sequenz innerhalb der beiden loxP-Stellen ausgeschnitten und die loxP-Sequenzen werden zu einer loxP-Sequenz miteinander verbunden. Sind die beiden loxP-Stellen in entgegengesetzter Richtung orientiert, wird die Gensequenz invertiert. Je nach Wahl des Cre-treibenden Promotors, können bestimmte Gene bzw. DNA-Sequenzen Zeit- und Zell-spezifisch rekombiniert werden. Um den Zeitpunkt einer Gen- oder DNA-Sequenzdeletion (z.B. Stoppkassette) kontrollieren zu können, wird eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase eingesetzt. Dabei ist das Cre-Protein mit einem bzw. zwei Östrogenrezeptor(en) fusioniert (CreERT / MCM), dessen Ligandenbindungs-Domäne so modifiziert ist, dass körpereigenes Östrogen nicht binden kann, sondern nur das synthetische Antiöstrogen Tamoxifen. Nur nach Bindung von Tamoxifen wird das CreERT-Protein vom Zytoplasma in den Kern transportiert und kann somit zu einem definierten Zeitpunkt mit den loxP-Sequenzen interagieren. Bei dem MCM-System müssen zwei Tamoxifenbindungsstellen



am MCM-Protein besetzt sein. Dadurch ist das System besonders stringent und nicht durchlässig (Verrou et al. 1999).

Abbildung 15: Prinzip des Tamoxifen-induzierbaren CreER-loxP-Systems.

Die mit einem Östrogenrezeptor fusionierte Cre-Rekombinase (CreER) wird unter Kontrolle eines gewebes- / zellspezifischen Promotors (P) exprimiert und ins Zytoplasma transportiert (1). Dort bindet es an das „heat shock protein 90“ (HSP90). Durch Interaktion von Tamoxifen (T) wird das HSP90 abgelöst (2), die Cre-Rekombinase gelangt so in den Zellkern (3), erkennt die loxP-Stellen (4) und kann die Abspaltung des loxP flankierten Zielgens (GOI) katalysieren (5). Abgewandelt von Kim et al. (2018).

3.2.3 Zellkultur neonataler Kardiomyozyten

Neonatale Kardiomyozyten (NNKMs) wurden aus Mausherzen der zwei generierten Mauslinien Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF} (K29, K31) isoliert. Die neonatalen Mäuse gingen aus einer doppelt heterozygoten Verpaarung hervor, sodass nach Mendel ca. 25 % der Mäuse homozygot oder Wildtyp und 50 % der Mäuse heterozygot für den Cx43-Knockin waren.

3.2.3.1 Isolation und Kultivierung neonataler Kardiomyozyten

Herzen neonataler Mäuse wurden zunächst unter Verwendung des „Neonatal Heart Dissociation Kit, mouse and rat“ der Firma Miltenyi Biotec enzymatisch verdaut. Dazu wurden neonatale Mäuse zwei Tage nach der Geburt (P2) durch Dekapitation getötet und ihre Herzen entnommen. Diese wurden auf mehrere mit ca. 750 µl Enzymmix (Komponente 1 und 2)-gefüllte 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und grob mit einer chirurgischen Schere zerschnitten und für 15 min bei 37 °C im Inkubator enzymatisch verdaut. Die einzelnen Verdauungsansätze der Herzen wurden in einem 15er Falcon zusammengeführt und anschließend mechanisch durch Pipettieren weiter zerkleinert. Die 15-minütige Inkubation bei 37 °C und die mechanische Zerkleinerung wurde noch 2-mal wiederholt. Mit 2500 µl Enzymmix konnten bis zu 20 neonatale Herzen verdaut werden. Bevor die beiden Enzymmix-Komponenten zum finalen Enzymmix vermischt werden konnten, musste die Enzymmix-Komponente 1 zunächst für 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert werden.

Tabelle 17: Enzymmix “Neonatal heart Dissociation Kit”

Enzymmix	Zusammensetzung
Enzymmix-Komponente 1	62,5 µl Enzym P
	2300 µl Puffer X
Enzymmix-Komponente 2	12,5 µl Enzym A
	100 µl Enzym D
	25 µl Puffer Y

Die Reaktion wurde mit 5 ml 20 % IMDM Medium abgestoppt und die Suspension über einen 70 µm Pre-Separation Filter gegeben. Es wurde mit 5 ml 20 % IMDM Medium nachgespült und die Einzelzellsuspension für 15 min bei Raumtemperatur (RT) und 0,3 rcf (relative centrifugal force) zentrifugiert. Zur Erythrozyten Lyse wurde das Zell-Pellet in 300 µl PEB Puffer resuspendiert, mit 3 ml 1x Red Blood Cell Lysis Puffer versetzt und nach 2-minütiger Inkubationszeit bei RT für 15 min bei RT und 0,3 rcf zentrifugiert. Nun wurde das Pellet

weiterverwendet. Mit Hilfe des „Neonatal Cardiomyocyte Isolation Kits“, der einen Cocktail von MicroBead-konjugierten Antikörpern enthält, die spezifisch für Nicht-KMs sind, wurden Nicht-KMs direkt magnetisch markiert, sodass sie anschließend über magnetische Säulen von den KMs abgetrennt werden konnten. Dafür wurde das Zell-Pellet in 90 µl PEB Puffer resuspendiert, mit 10 µl „Neonatal Cardiomyocyte Isolation Cocktail, mouse“ der Firma Miltenyi Biotec vermischt und für 15 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte über MS Säulen, die in einen OctoMACS™ Separator eingehängt und mit 500 µl PEB Puffer equilibriert wurden, bevor die magnetisch-markierte Zellsuspension auf die Säule gegeben wurde. Anschließend wurde 3-mal mit jeweils

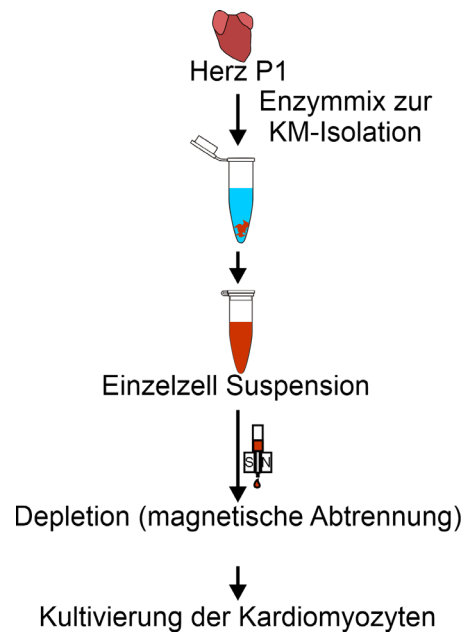


Abbildung 16: Isolation NNKMs aus P2 Mausherzen.
(Niemann et al. 2022)

500 µl PEB Puffer gewaschen und der Durchlauf für 5 min bei RT und 0,3 rcf zentrifugiert. Es wurden je 200 000 aufgereinigte NNKMs in 1 ml 20 % IMDM Medium auf Gelatine (0,1 %)-beschichtete Glasplättchen in 24-well Zellkultur Platten ausgesät (Abbildung 16). Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einem Inkubator (37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Das Medium wurde vor Behandlung der NNKMs auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Die Puffer wurden bei RT verwendet.

3.2.3.2 Transduktion neonataler Kardiomyozyten (Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF}) mit einem AAV2.1-Cre Virus

Zwei Tage nach der Isolierung wurden neonatale NNKMs mit AAV2.1-Cre Virus in 2 % IMDM Medium (pro 200 000 Zellen wurden 2 µl Virus (1.2×10^{13} GC/mL) in 500 µl 2 % IMDM Medium eingesetzt) transduziert. Zwei Tage später wurde 3-mal mit DPBS gewaschen, um das Virus abzuspülen. Die Zellen wurden weiterhin in 2 % IMDM Medium kultiviert. Die Transduktionseffizienz des Virus wurde in mikroskopisch aufgenommenen Bildern als das Verhältnis mCherry-positiver (mCherry⁺) Zellen (mCherry⁺ und Hoechst-positiver (Hoechst⁺) Zellen) zur Gesamtzellzahl (Hoechst⁺ Zellen) ausgezählt.

3.2.4 Generierung eines Kryoinfarkts

Zur Generierung eines MI, wurde das Kryoinfarkt-Modell angewandt (siehe Kapitel 1.4). Dazu wurden gesunde transgene Mäuse (Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)}BF x α MHC-MCM bzw. Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)}BF x Periostin-MCM) im Alter von ca. zehn Wochen 30 min vor Beginn des operativen Eingriffs mit Schmerzmittel (Buprenorphin: 0,1 mg/kg subkutan (s.c.)) behandelt. Die Narkose erfolgte inhalativ durch Einleitung eines Gasgemisches, bestehend aus 0,8 l/min Sauerstoff, 0,5 l/min Lachgas sowie 5 Vol.-% Isofluran, in einer Anästhesie-Induktionskammer. Nach Erreichen einer ausreichend tiefen Narkose (verlangsamte Atmung) wurden die Mäuse an den Vorderzähnen in eine Intubierstation eingehängt und mit einer Vasofix[®] Safety 22G Venenverweilkanüle (nach Entfernen der Nadel) intubiert. Anschließend wurden sie auf eine 37 °C warme Heizplatte transferiert und in Rückenlage fixiert. Zur Erhaltung der Narkose wurden die Mäuse durch einen Kleintierrespirator (Minivent) mit einem Gasgemisch bestehend aus 0,8 l/min Sauerstoff und 1,5-2 Vol.-% Isofluran beatmet (200-300 μ l Atemzugvolumen, 180-200 Atemzüge/min). Um das Austrocknen der Augen während der OP zu verhindern, wurden diese vorsorglich mit Augensalbe benetzt. Vor Beginn der linksventrikulären Thorakotomie wurde das Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes überprüft, um eine ausreichende Narkosetiefe sicherzustellen. Der Brustkorb wurde im OP-Bereich mit einem Einmalrasierer von Haaren befreit und mit 70 % Ethanol desinfiziert. Auf Höhe des unteren Drittels des Brustkorbes wurde ein ca. 1-1,5 cm langer Hautschnitt gesetzt. Die beiden darunter liegenden Pektoral-Muskelschichten wurden durchtrennt und die Interkostal-Muskulatur zwischen der dritten und vierten Rippe zunächst mit einer Pinzette stumpf eröffnet und anschließend durch Einsatz eines Thorax-Spreizers geweitet, sodass das linke Ventrikel zugänglich gemacht wurde. Um das Herz auf einen Löffel luxieren zu können, wurde das Perikard entfernt. Mit Hilfe des Löffels wurde das Herz in Richtung der Thoraxöffnung bewegt, und ein in flüssigem Stickstoff-gekühlter Kupferstempel (ca. -196 °C, 3,5 cm Durchmesser; Abbildung 17) 3-mal für je 15 s auf jeweils dasselbe Areal der linksventrikulären Vorder-Seitenwand gepresst.



Abbildung 17: Kupferstempel.

Zur Generierung eines linksventrikulären Kryoinfarktes wurde ein gekühlter Kupferstempel (Durchmesser von 3,5 mm) verwendet.

Zur kurzen Erholungsphase wurde das Herz zwischen den 3 Kryoläsionen kurzzeitig zurück in den Thorax geschoben (Ottersbach et al. 2018). Die Interkostal-Muskulatur, die zwei Brustmuskelschichten sowie der Hautschnitt wurden in 3 einzelnen Schichten mit einer fortlaufenden Naht aus nicht resorbierbarem chirurgischem Faden (6,0 Prolene Faden) zugenäht. Um in den Thorax eingedrungene Luft und Flüssigkeit zu entfernen, wurde eine

Thoraxdrainage (Vasofix® Safety 22G Venenverweilkanüle) gelegt und für einige Minuten Vakuum gezogen, bevor die Isofluran-Zufuhr der Maus beendet wurde. Bis zum Einsetzen einer regelmäßigen, spontanen Atmung wurden die Mäuse mit reinem Sauerstoff beatmet. Anschließend konnte die Thoraxdrainage entfernt werden und die Mäuse wurden extubiert. Nach der OP konnten sie sich unter Beobachtung in Käfigen mit frischem Einstreu unter einer Rotlicht-Wärmelampe erholen, bevor sie in den Haltungsraum zurück gebracht wurden. Als post-operative Schmerztherapie erhielten die Mäuse für drei Tage Buprenorphin (2-mal täglich 0,1 mg/kg s.c. sowie über Nacht (üN) 1 mg/kg oral im Trinkwasser).

3.2.5 Tamoxifenbehandlung transgener Mäuse

Um die Transgenexpression der Mäuse im Alter von zehn Wochen zu induzieren, wurde ihnen Tamoxifen verabreicht. Die Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF} x Periostin-MCM Linie erhielt an fünf aufeinander folgenden Tagen beginnend am Tag des Kryoinfarkts 80 mg/kg Tamoxifen (1 mg Tamoxifen/100 µl); es wurde das Tamoxifen-Protokoll nach Fu et al. (2018) genutzt. Die Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF} x αMHC-MCM Linie erhielt an drei aufeinander folgenden Tagen (beginnend am Tag des Kryoinfarkts) 30 mg/kg Tamoxifen (0,6 mg Tamoxifen/100 µl); es wurde das Tamoxifen-Protokoll nach Bersell et al. (2013) verwendet. Das Tamoxifen wurde den mit der Hand fixierten Mäusen intra peritoneal (i.p.) mittels Insulinspritzen verabreicht.

3.2.6 Funktionelle *in vivo* Analysen

3.2.6.1 Echokardiographie

Als Echokardiographie wird eine Ultraschalluntersuchung (Sonographie) des Herzens bezeichnet, die zur Analyse der Pumpfunktion des Herzens genutzt werden kann. Die linksventrikuläre Pumpfunktion der transgenen Versuchstiere (Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF} x αMHC-MCM bzw. Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF} x Periostin-MCM) wurde zwei Wochen nach Transgeninduktion / Kryoinfarkt mit Hilfe des hochauflösenden Visual Sonics Vevo 3100 Echokardiograph unter Verwendung eines MX550D Schallkopfes und des Vevo® Integrated Rail System III untersucht. Es wurde die transthorakale Echokardiographie Methode angewandt, bei der der Schallkopf auf den mit Ultraschallgel bedeckten Brustkorb der Maus angelegt wird. Zusätzlich wurden die auf Elektroden liegenden Pfoten der Mäuse mit Ultraschallgel bedeckt, um ein EKG während der Untersuchung aufnehmen zu können (Abbildung 18). Da das Fell der Mäuse die Echoaufnahmen stört, mussten am Vortag die Haare im Bereich des Thorax mit Hilfe von Enthaarungscreme (Einwirkzeit ca. 5 min) entfernt werden. Sowohl die Enthaarung der Mäuse als auch die

Echokardiographie-Untersuchung wurden unter Inhalationsnarkose durchgeführt. Dazu wurde die Maus in einer Box mit einem Gasgemisch aus 0,8-1,0 l/min Sauerstoff und 3-4 Vol.-% Isofluran narkotisiert. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe (verlangsamte Atmung) wurden die Mäuse in Rückenlage mit Leukosilk an ihren Extremitäten auf einer Heizplatte (37 °C) befestigt und über eine Maske weiterhin in Narkose gehalten (0,8-1,0 l/min Sauerstoff und 1-1,5 Vol.-% Isofluran). Da eine solche Inhalationsnarkose mit Isofluran kardiodepressiv wirkt, mussten die Mäuse ca. 24 Stunden vor der eigentlichen echokardiographischen Untersuchung enthaart werden, um negative Einflüsse der Narkose auf die Versuchsergebnisse zu verhindern. Während der Ultraschallaufnahme wurde die Isofluran-Zufuhr so eingestellt, dass die HF der Maus bei mindestens 350 bpm lag. Im B-Mode wurden 2D Bilder der parasternalen Längsachse des Herzens aufgenommen. Dabei wurde sich so orientiert, dass die Herzspitze als auch die Aortenklappen sichtbar waren (Abbildung 19). Die Mäuse konnten sich nach erfolgter Untersuchung oder Enthaarung unter einer Rotlichtlampe von der Narkose erholen. Die 2D Bilder wurden als Videoschleife mittels der Vevo® LAB Software exportiert und analysiert. Als Parameter für die linksventrikuläre Pumpfunktion wurden die LVEF und die linksventrikuläre fraktionelle Verkürzung (englisch: Fractional Shortening, LVFS) bestimmt. Dazu wurde die „LV Trace“ Funktion verwendet, mit der sich die endokardiale Fläche in der Diastole und der darauffolgenden Systole einzeichnen lässt. Die Vevo® LAB Software berechnet anhand dieser Flächen die LVEF und das LVFS (Abbildung 19). Die Vorderwandbewegung wurde im anatomischen M-Mode durch Ausmessung der Vorderwanddicke des linken Ventrikels in der Systole und Diastole bestimmt (Abbildung 20). Pro Maus wurden mindestens drei Diastolen mit darauffolgenden Systolen ausgemessen, sodass daraus anschließend der Mittelwert gebildet werden konnte.

$$LV \text{ Ejektionsfraktion (B - Mode)} = 100 \times \left(\frac{LV \text{ Vol; d} - LV \text{ Vol; s}}{LV \text{ Vol; d}} \right)$$

$$LV \text{ Fraktionelle Verkürzung (B - Mode)} = 100 \times \left(\frac{LVID; d - LVID; s}{LVID; d} \right)$$

$$\Delta \text{ Vorderwandverdickung} = IVS; s - IVS; d$$

LVID; d = linksventrikulärer Innendurchmesser (Diastole) in mm

LVID; s = linksventrikulärer Innendurchmesser (Systole) in mm

Vol; d = diastolische Volumen in μl

Vol; s = systolische Volumen in μl

IVS; s = Dicke der linksventrikulären Vorderwand in der Systole

IVS; d = Dicke der linksventrikulären Vorderwand in der Diastole

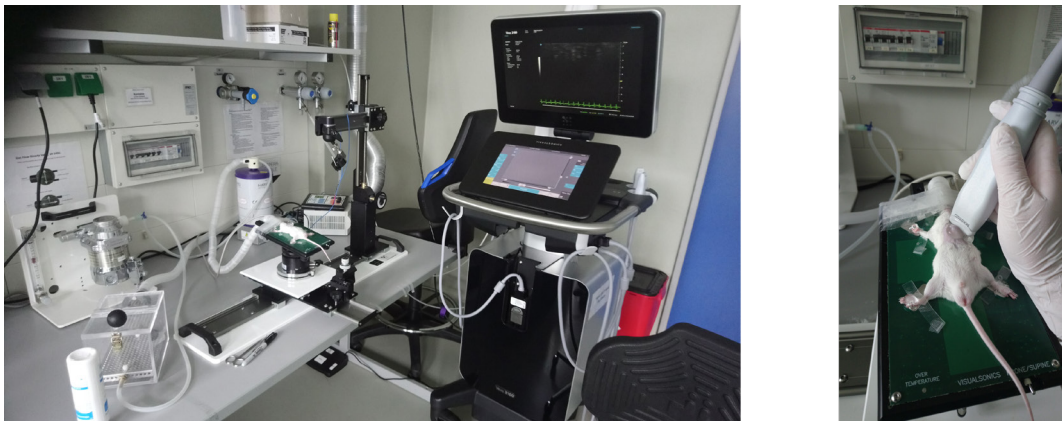


Abbildung 18: Echokardiographie Setup.

Aufbau Visual Sonics Vevo 3100 Echokardiograph mit MX550D Schallkopf und Vevo® Integrated Rail System III, Vapor und Vakuumpumpe für Isofluran, Narkose-Induktionsbox (links). Positionierung der Maus und des Schallkopfes während der Aufnahme des Herzultraschalls (rechts).

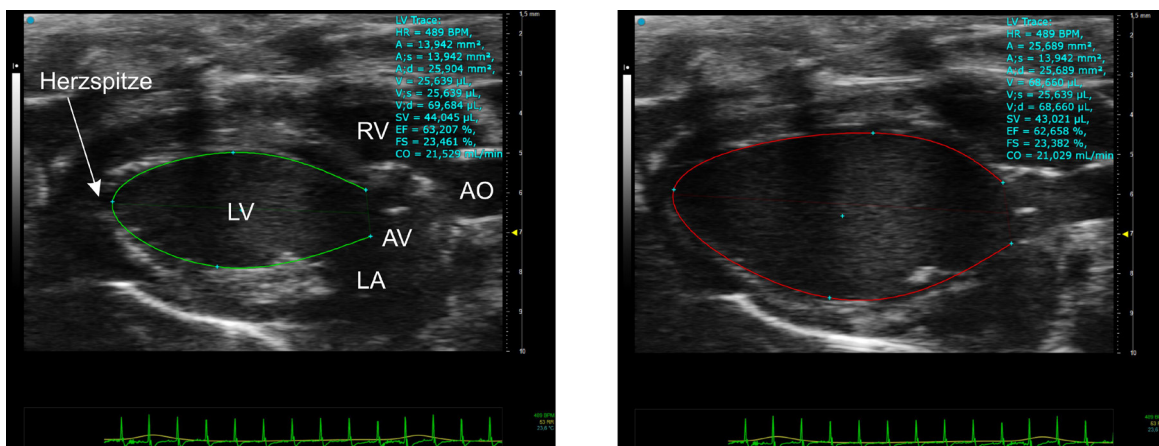


Abbildung 19: Bestimmung der linksventrikulären Pumpfunktion.

Ausmessung des linken Ventrikels in der Systole (links) und Diastole (rechts) mittels Vevo® LAB Software (LV Trace parasternale Längsachsenansicht (PSLAX)) zur Bestimmung der linksventrikulären Pumpfunktion. Es ist die PSLAX abgebildet, welche im B-Mode aufgenommen wurde. LV = linkes Ventrikel, RV = rechtes Ventrikel, LA = linkes Atrium, AO = Aorta, AV = Aortenklappe.

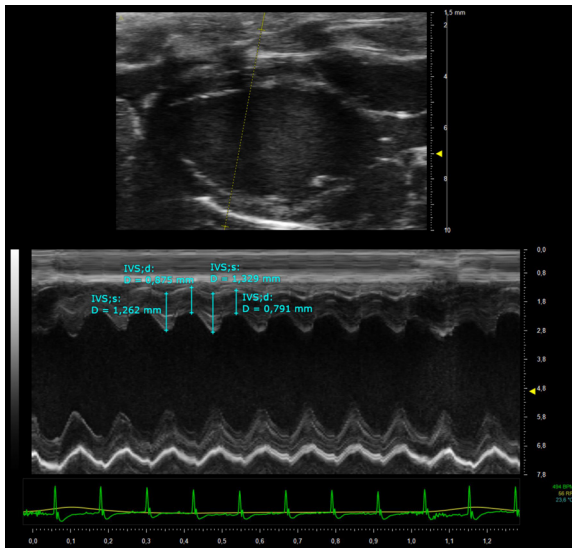


Abbildung 20: Bestimmung der Vorderwandbewegung des linken Ventrikels.

Ausmessung der Vorderwanddicke des linken Ventrikels in der Systole und Diastole im anatomischen M-Mode mittels Vevo® LAB Software. Die Aufnahme wurde im B-Mode erstellt. Die Achse im anatomischen M-Mode wurde durch den Infarktbereich gelegt, um die Bewegung der linksventrikulären Vorderwand zu bestimmen (LV Trace PSLAX).

3.2.6.2 Elektrophysiologische Untersuchung

Mit Hilfe der EPU wurde die Arrhythmie-Empfindlichkeit der transgenen Mäuse getestet, um den Effekt einer Cx43-Überexpression auf die elektrische Reizweiterleitung im gesunden und infarzierten Mauserzen zu untersuchen. Durch den Einsatz eines mit Elektroden besetzten Katheters können im Herzen elektrische Reize gesetzt werden, die als Trigger für das Hervorrufen einer ventrikulären Arrhythmie dienen. Außerdem kann direkt am Herzen ein EKG abgeleitet werden, um den Effekt der elektrischen Stimulation zu analysieren. Diese Katheteruntersuchung ist invasiv und stellt ein finales Experiment dar.

Die EPU transgener Mäuse ($Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)}^{BF} \times \alpha MHC-MCM$ bzw. $Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)}^{BF} \times Periostin-MCM$) wurde zwei Wochen nach Transgeninduktion bzw. Kryoinfarkt durchgeführt. Die Anästhesie der Mäuse erfolgte in einer Anästhesie-Induktionskammer und wurde inhalativ mittels eines Gasgemisches bestehend aus 0,8 l/min Sauerstoff sowie 5 Vol.-% Isofluran eingeleitet. Nach Erreichen einer ausreichend tiefen Narkose (verlangsamte Atmung) wurden die Mäuse in Rückenlage auf einer 37 °C warmen Heizplatte fixiert. Zur Erhaltung der Narkose wurden die Tiere über eine Maske (vorderer abgetrennter Teil einer 2 ml Spritze) mit 0,8 l/min Sauerstoff und 1-2 Vol.-% Isofluran beatmet, sodass der Abstand zweier aufeinander folgender R-Zacken im EKG zwischen 110-130 ms lag. Die Maus wurde im Bereich des Halses mit 70 % Ethanol desinfiziert und ein ca. 2 cm langer Hautschnitt entlang der Mitte des Halses gesetzt. Senkrecht zu diesem wurde rechtsseitig ein weiterer Hautschnitt durchgeführt, sodass der Hautlappen zur Seite geklappt werden konnte. Die rechte Hälfte der Speicheldrüse wurde weggerissen, um die rechte Vena jugularis externa freizupräparieren. Diese wurde mit einer

feinen Pinzette untertunnelt und mit zwei Fäden umschlungen. Der kraniale Faden wurde mit Leukosilk befestigt, der kaudale Faden wurde verknotet und mit einer gewinkelten Klemme fixiert, sodass die Vene auf Spannung gehalten werden konnte, um den Blutfluss zu stoppen. Anschließend wurde mit einer feinen Federschere ein kleiner Schnitt in das Gefäß gesetzt, sodass der EPU Katheter über die Vene bis zur Spitze des rechten Ventrikels vorgeschoben werden konnte. Der elektrophysiologische Katheter weist 8 Elektroden auf, von denen drei Elektrodenpaare intrakardiale EKG Ableitungen auf verschiedenen Ebenen des Herzens aufnehmen (Vorhof, His-Bündel und Ventrikel). Ein Elektrodenpaar kann zur Stimulation des Ventrikels verwendet werden. Zusätzlich wurden Oberflächen-EKGs der Mäuse abgeleitet, sodass die elektrische Aktivität des Herzens während der Messung bestmöglich überwacht werden konnte (Abbildung 21). Anhand der intrakardialen EKG Signale konnte der Katheter in die gewünschte Lage positioniert werden. Über das Apex-nahe Elektrodenpaar wurden die Mäuse elektrisch stimuliert. Dabei wurden verschiedene Protokolle (Programmierte- und Burst-Stimulus-Protokolle) angewandt (Tabellen 18-21, (Roell et al. 2007)).

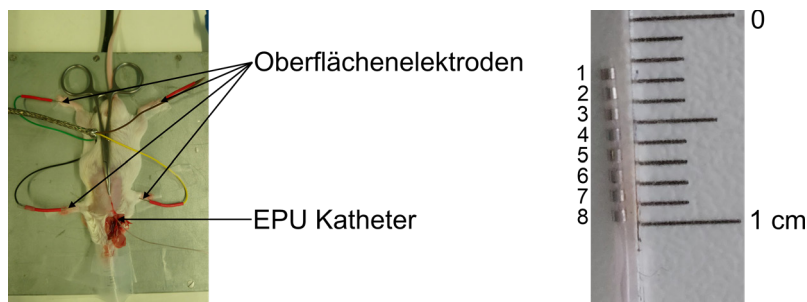


Abbildung 21: Elektrophysiologische Untersuchung.

EKG Ableitungen über vier Oberflächenelektroden sowie direkt am Herzen über einen oktapolaren Katheter (links). Detailaufnahme des oktapolaren EPU Katheters, welcher 3 Aufnahmeelektrodenpaare (3-8) und 1 Apex-nahes Elektrodenpaar trägt, das der Stimulation des Myokards dient (1,2) (rechts).

Programmierte Stimulation

Zur Induktion ventrikulärer Arrhythmien wurde bei der programmierten Stimulation eine Basisstimulation von je 7 Stimuli mit einer Zykluslänge von 48 ms, 44 ms oder 40 ms (S1-S1) angewandt. Daran wurden bis zu drei weitere Extrastimuli mit verkürzter Zykluslänge gekoppelt (S2, S3, S4). Der jeweils letzte Extrastimulus trat mit zunehmender Vorzeitigkeit (Reduktion um je 2 ms) auf, bis eine Zykluslänge von 4 ms erreicht wurde. Zwischen den einzelnen Stimulationsabfolgen wurde jeweils eine Pause von 2000 ms eingebaut. Die Stimulation erfolgte bei einer Stromstärke von 0,5-1 mA und einer Amplitude von 2 V.

Tabelle 18: Runde 1 der programmierten Stimulation

Stimulus	Frequenz
S1-S1	48 ms
S1-S2	36 ms – 2 ms Reduktion bis 4 ms
S1-S1	44 ms
S1-S2	36 ms – 2 ms Reduktion bis 4 ms
S1-S1	40 ms
S1-S2	36 ms – 2 ms Reduktion bis 4 ms

Tabelle 19: Runde 2 der programmierten Stimulation

Stimulus	Frequenz
S1-S1	48 ms
S1-S2	20 ms
S2-S3	36 ms – 2 ms Reduktion bis 4 ms
S1-S1	44 ms
S1-S2	20 ms
S2-S3	36 ms – 2 ms Reduktion bis 4 ms
S1-S1	40 ms
S1-S2	20 ms
S2-S3	36 ms – 2 ms Reduktion bis 4 ms

Tabelle 20: Runde 3 der programmierten Stimulation

Stimulus	Frequenz (Zykluslänge)
S1-S1	48 ms
S1-S2	20 ms
S2-S3	20 ms
S3-S4	36 ms – 2 ms Reduktion bis 4 ms
S1-S1	44 ms
S1-S2	20 ms
S2-S3	20 ms
S3-S4	36 ms – 2 ms Reduktion bis 4 ms
S1-S1	40 ms
S1-S2	20 ms
S2-S3	20 ms
S3-S4	36 ms – 2 ms Reduktion bis 4 ms

Burst-Stimulation

Auf die programmierte Stimulation folgte das aggressivere Burst-Stimulations-Protokoll. Dabei wurde jeweils 3-mal für je 400 ms mit einer konstanten Zykluslänge stimuliert. Diese wurde anschließend um je 4 ms reduziert bis nur noch 4 ms zwischen den einzelnen Stimuli lagen. Nach jeder Stimulationsabfolge wurde eine Pause von 4000 ms eingehalten. Die Burst-Stimulation erfolgte bei einer Amplitude von 5 V. Zunächst wurden alle 5 Stimulations-Stufen bei einer Stromstärke von 1 mA durchgeführt, anschließend wurde die gesamte Stimulations-Abfolge bei doppelter Stromstärke durchlaufen.

Tabelle 21: Burst-Stimulations-Protokoll

Dauer zwischen den Stimuli (Zykluslänge)	Anzahl der Stimuli
20 ms	20
16 ms	25
12 ms	33
8 ms	50
4 ms	100

Folgten auf die Stimulation mindestens vier Extrasystolen, wurden diese als VT definiert. Da durch die programmierte Stimulation nur in sehr wenigen Fällen eine Arrhythmie ausgelöst werden konnte, wurde das aggressivere Burst-Protokoll zur Analyse der Induzierbarkeit von VTs ausgewertet. Bei dem Auftreten von mindestens einer VT während der gesamten Burst-Stimulation, wurde der Maus eine VT-Inzidenz von 100 % zugeschrieben.

Alle Echo- und Katheter-Untersuchungen erfolgten verblindet.

3.2.7 Organentnahme und Präparation der Proben

Im Anschluss an die finalen Katheteruntersuchungen wurden die noch narkotisierten Mäuse durch eine zervikale Dislokation schmerzfrei getötet. Anschließend wurden die Tiere auf einer Styropor Platte an ihren Extremitäten fixiert. Der Bauchraum wurde eröffnet, das Zwerchfell durchtrennt und der Thorax entlang des Brustbeins aufgetrennt, sodass alle Organe zugänglich waren. Es wurden Herz, Skelettmuskel, Lunge und Gehirn für weitere Untersuchungen (makroskopische und mikroskopische Untersuchung, RNA-, Proteinanalysen) entnommen, die Schwanzspitzen der Mäuse wurden für eine mögliche Nachgenotypisierung abgetrennt. Das Herz wurde in kalte Kardioplegielösung eingebracht. Diese hyperkaliämische Lösung bewirkt eine permanente Membrandepolarisation und führt

somit schnell zum Herzstillstand, sodass makroskopische Übersichtsaufnahmen (siehe Kapitel 3.2.9) aufgenommen werden konnten. Zur histologischen Untersuchung bestimmte Maus Herzen wurden anschließend wie in Kapitel 3.2.8 beschrieben fixiert und kryokonserviert. Herzen, die zur RNA- oder Proteinanalyse verwendet wurden, mussten zunächst zerteilt werden, um linkes Ventrikel, rechtes Ventrikel sowie den Narbenbereich zu separieren und in getrennten Reaktionsgefäßen schnellst möglich in flüssigem Stickstoff wegzufrieren. Die Langzeit-Lagerung bis zur Aufarbeitung der Proben erfolgte bei -80 °C.

3.2.8 Immunhistochemische und histologische Methoden

3.2.8.1 Fixierung neonataler Kardiomyozyten

Das Zellkultur Medium wurde abgesaugt und die Zellen 3-mal mit DPBS gewaschen, um sie anschließend mit 4 %-igem Formaldehyd (FA) für 20 min bei RT zu fixieren. Anschließend wurden die Zellen 3-mal mit DPBS gewaschen und bedeckt, um sie bei 4 °C zu lagern.

3.2.8.2 Fixierung von Mauserherzen

Die Fixierung entnommener Mauserherzen erfolgte durch eine 2-stündige Inkubation der Herzen in 4 %-igem FA bei 4 °C. Dabei wurden die Organe in 15 ml Röhrchen auf einem Rollenmischer gedreht. Die FA Rückstände wurden durch dreimaliges Waschen mit kaltem DPBS entfernt und das Herz in 20 %-iger Sukroslösung üN bei 4 °C entwässert.

3.2.8.3 Kryokonservierung von Mauserherzen

Die entwässerten Herzen wurden mit Tissue-Tek Einfriermedium benetzt und mit dem Apex nach unten zeigend in ein mit Tissue-Tek Einfriermedium befülltes Gefriergefäß platziert. Um die Herzen einzufrieren, wurden die befüllten Gefriergefäße in ein mit Isopentan gefülltes, auf Trockeneis stehendes Becherglas eingebracht und im Anschluss bei -80 °C gelagert.

3.2.8.4 Präparation von Kryoschnitten

Zur Anfertigung von 10 µm oder 30 µm dicken Kryoschnitten wurden die in Tissue-Tek eingefrorenen Herzblöcke mit einem Tropfen Tissue-Tek auf einem Schnittstempel durch Anfrieren befestigt und auf den Schneidearm des Kryotoms aufgesteckt. Zum Schneiden wurde die Kammertemperatur auf -23 °C und die Objekttemperatur auf -21 °C eingestellt. Die Kryoschnitte wurden auf speziell beschichtete Objektträger aufgezogen und entweder kurzzeitig (einige Wochen) bei -20 °C oder langfristig (mehrere Jahre) bei -80 °C gelagert.

3.2.8.5 Immunfluoreszenzfärbung neonataler Kardiomyozyten und kryokonservierter Mausherzen

Zum Nachweis des Targetproteins (Cx43, endogenes und exogenes), des Fluoreszenzmarkers mCherry und verschiedener Struktur- und Extrazellulärmatrrixproteine, die eine wichtige Rolle für die Infarktentwicklung und Zellcharakteristik spielen, wurden verschiedene Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Alle Färbungen wurden in einer mit befeuchtetem Zellstoff ausgelegten Schnittbox durchgeführt, um das Austrocknen der fixierten NNKMs und der Kryoschnitte während des Färbevorgangs zu verhindern. Direkter Kontakt der mit Zellen bewachsenen Glasplättchen mit dem Zellstoff wurde durch Unterlegen eines Parafilmstreifens vermieden. Kryoschnitte auf den Objektträgern wurden ca. 5 min aufgetaut und dann einzeln mit einem Fettstift umkreist, sodass verschiedene Färbungen auf einem Objektträger möglich waren und Antikörperlösung eingespart werden konnte. Anschließend wurden die NNKMs und die Kryoschnitte für 5 min mit PBS gewaschen und mit 0,2 % TritonX in PBS für 10 min permeabilisiert. Danach erfolgten drei Waschschrirte für je 5 min mit PBS und eine Maskierung der unspezifischen Bindungsstellen durch eine 20 minütige Inkubation mit 5 %-igem Eselserum. Die primären Antikörper wurden üN bei 4 °C aufgebracht. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je 5 min wurden die sekundären Antikörper in einer 1 µg/mL Hoechst/PBS Lösung verdünnt und die Zellen oder Schnitte für eine Stunde bei RT in dieser Lösung inkubiert. Hoechst ist ein DNA interkalierender Farbstoff, der das Anfärben von Zellkernen ermöglicht. Die Sekundärantikörper-Lösung wurde 3-mal für jeweils 5 min mit PBS abgewaschen, die NNKMs oder Kryoschnitte mit Aqua-Poly/Mount Eindeckmedium luftblasenfrei eingedeckt und üN bei RT in Dunkelheit getrocknet.

3.2.8.6 Sirius-red/Fast-green Färbung

Zur semiquantitativen Bestimmung des Anteils kollagenhaltiger und nicht kollagenhaltiger Proteine in Herzgewebeschnitten wurde eine Sirius-red/Fast-green Doppelfärbung durchgeführt. Sirius-red bindet an alle Arten von Kollagen und färbt das betreffende Gewebe rot, während Fast-green nicht kollagene Proteine grün anfärbt, sodass kollagenhaltige infarzierte Gewebeabschnitte vom gesunden, nicht kollagenhaltigen Myokard differenziert werden können. Vor der Färbung wurden die 10 µm dicken Kryoschnitte für 5 min in Aqua dest. gewässert und durch einstündige Inkubation in einer vorgewärmten Bouin'schen Lösung bei 55 °C erneut fixiert, da sie im Vergleich zu der bereits erfolgten Formaldehydfixierung eine kontrastreichere Färbung erlaubt. Anschließend wurde die gelbe Fixierlösung für 10 min unter laufendem Wasser ausgewaschen und die Kryoschnitten 10 min mit 0,1 % Fast green Lösung bei RT gefärbt. Überschüssige Fast-green Färbelösung wurde kurz mit Aqua dest.

Abgewaschen, dann erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte für 2 min in 1 % Essigsäure. Auf drei kurze Waschvorgänge mit Aqua dest. folgte die 30-minütige Färbung der Kryoschnitte mit 0,1 % Sirius-red Lösung. Nach vollständiger Auswaschung überschüssiger Sirius-red Färbelösung unter fließendem Aqua dest. erfolgte die Entwässerung der Gewebeschnitte durch das Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 3 min (70 % Isopropanol, 90 % Isopropanol, 2x 100 % Isopropanol). Nach dem letzten Alkoholschritt und vor der Einbettung wurden die Kryoschnitte 3x für je 5 min in Xylol getränkt und schließlich mit Xylol-haltigem Medium (Entellan) nach kurzer Abtrocknung des Xylols eingedeckt.

3.2.9 Mikroskopie

Nicht fixierte NNKMs wurden mit einem Zellkultur Fluoreszenzmikroskop (Axio Vert A1) unter Verwendung eines Cy3 Filters und 10× and 20× Luft-Objektiven angeschaut und aufgenommen. Detailaufnahmen von fixierten und gefärbten Zellen oder von Herzschnitten erfolgten mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops (Nikon Eclipse Ti) mit DAPI, Cy2, Cy3, und Cy5 Filtern, 20×, 40×, und 60× Wasser-Objektiven, mehrerer Laser (LU-N4 laser unit (405 nm, 488 nm, 561 nm, 640 nm)) und der NIS-Elements AR 5.11.01 Software. Mikroskopische Übersichtsaufnahmen der Herzschnitte wurden mit einem Axio Observer Z1 Mikroskop angefertigt. Für makroskopische Bilder des gesamten Herzens sowie die Übersichtsaufnahmen Sirius-red / Fast-green gefärbter Herzschnitte wurde ein Stereo-Zoom Mikroskop (Axio Zoom V16) mit Cy2 und Cy3 Filtern genutzt.

3.2.9.1 Infarktgrößenbestimmung

Wie in Kapitel 1.4 dargestellt liefert der Kryoinfarkt eine in seiner Größe definierte und dadurch gut vergleichbare Läsion. Um den Einfluss einer Cx43-Überexpression (I) in KMs der BZ und des verbleibenden gesunden Myokards, sowie in (II) mFBs der BZ und des Infarktareals zu untersuchen, wurden infarzierte Mauserzen makroskopisch und histologisch analysiert.

3.2.9.1.1 Makroskopische Bestimmung der Infarktfläche

Vor der Fixierung der entnommenen Maus Herzen, wurden makroskopische Bilder des gesamten Herzens mit dem Stereo-Zoom Mikroskop aufgenommen (7-fache Vergrößerung, Durchlicht, Abbildung 22). Mit Hilfe des Werkzeugs „Kontur (Spline) zeichnen“ der Zen Software wurde das äußerlich sichtbare Infarktareal eingezeichnet und dessen Fläche in mm^2 berechnet. So konnte relativ schnell und unkompliziert die Infarktfläche bestimmt werden.

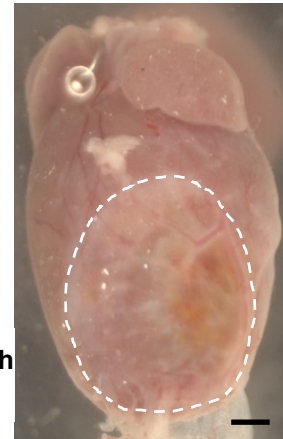


Abbildung 22: Makroskopische Aufnahme eines Herzens 2 Wochen nach Kryoläsion.

Die äußerlich sichtbare Kryoinfarktfläche wurde durch eine weiße gestrichelte Linie markiert. Größenbalken 1 mm.

3.2.9.1.2 Histologische Bestimmung der Infarktfläche und des Infarktvolumens

Um eine präzisere Bestimmung der Infarktfläche als in 3.2.9.1.1 durchzuführen, wurden von dem gesamten Herzen alle $600\ \mu\text{m}$ Sirius-red/Fast-green gefärbte $10\ \mu\text{m}$ dicke Herzquerschnitte mit dem Stereo-Zoom Mikroskop (32-fache Vergrößerung, Durchlicht) aufgenommen und mittels der ImageJ Software analysiert. Dazu wurde die Fläche des linken Ventrikels manuell umkreist und ausgewählt. Mit Hilfe der „Color Threshold“ Funktion wurden die Flächen des rot gefärbten, infarzierten Gewebes (Hue:172, 255; Saturation: 0, 255; Brightness: 157, 208) und die des grün gefärbten, gesunden Bereichs (Hue:0, 172; Saturation: 0, 255; Brightness: 47, 199) des linken Ventrikels in mm^2 bestimmt.

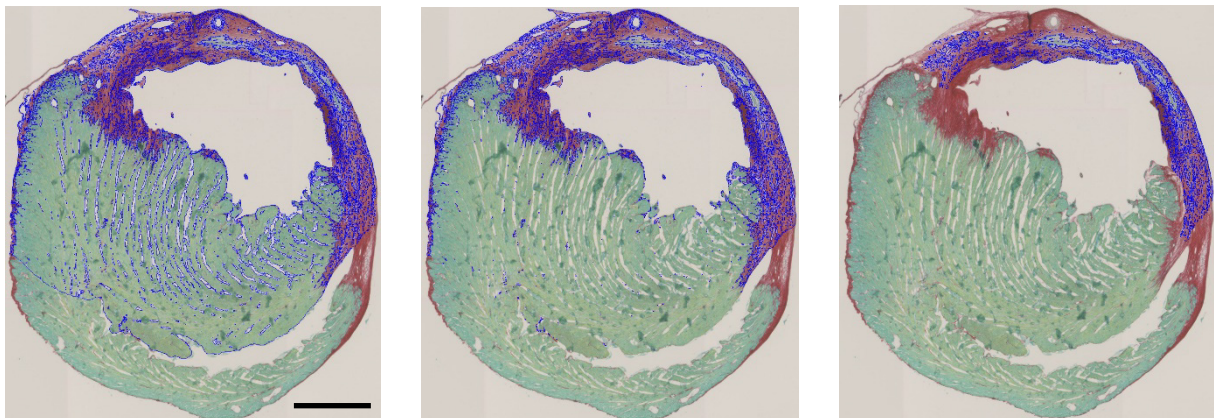


Abbildung 23: Bestimmung der Infarktfläche mittels ImageJ Software in Sirius-red / Fast-green gefärbten Herzquerschnitten.

Die Flächen des grün gefärbten gesunden Gewebes des linken Ventrikels (links), des rot gefärbten infarzierten Gewebes des linken Ventrikels (Mitte) sowie die Fläche der grün gefärbten Inseln abgestorbener KMs (rechts) wurden von der ImageJ Software erkannt (blau) und quantifiziert. Größenbalken 1 mm.

Zwei Wochen nach MI waren die abgestorbenen KMs im Zentrum der Narbe noch nicht vollständig abgebaut. Sie zeigten keine charakteristische Querstreifung mehr und erscheinen in der Sirius-red / Fast-green Färbung als grün gefärbte Inseln innerhalb des Infarktbereichs. Die Fläche dieser Areale wurde wie oben beschrieben berechnet, zur Infarktfläche addiert und von der Fläche des gesunden Gewebes abgezogen. Zur Berechnung des Infarktvolumens wurde die Höhe des linken Ventrikels miteingerechnet.

Infarktfläche (%)

$$= \frac{\text{Infarktfläche (mm}^2\text{)}}{\text{Gesamtfläche LV (Infarktfläche (mm}^2\text{) + Fläche gesundes Myokard (mm}^2\text{))}} * 100$$

$$\text{Infarktvolumen (\%)} = \frac{\text{Infarktfläche (mm}^2\text{)} * \text{Höhe LV (mm)}}{\text{Gesamtfläche LV * Höhe LV (mm)}} * 100$$

$$\text{Höhe linker Ventrikel (mm)} = (\text{Anzahl gezählter Schnitte} - 1) * 0,6 \text{ mm}$$

$$\text{transmuraler Anteil der Narbe (\%)} = \frac{\text{Anzahl transmuraler Schnitte der Narbe}}{\text{Anzahl aller Schnitte der Narbe}} * 100$$

3.2.10 DNA-Methoden

DNA-Analysen wurden durchgeführt um den Genotyp transgener Mäuse (Cx43-Knockin-Mauslinie (K31) x Periostin-MCM- oder α MHC-MCM-Mauslinie) zu bestimmen und um die Kopienzahl der Expressionskassette (Cx43-P2A-mCherry) der neu generierten Cx43-Knockin-Mauslinien (Gt(ROSA)26Sor^{tm1}(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)^{BF}, K29, K31) zu bestimmen.

3.2.10.1 Genotypisierung

Mit Hilfe einer Ohrlochzange wurden die Mäuse im Alter von ca. 3-4 Wochen markiert. Das ausgestanzte Gewebe sowie Schwanzspitzen konnten zur Genotypisierung der Mäuse verwendet werden.

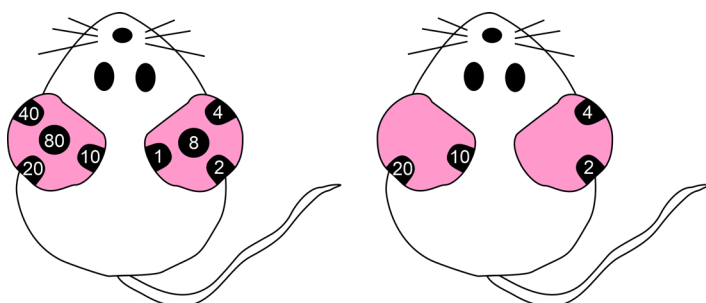


Abbildung 24: Schema zur Ohrlochmarkierung der Mäuse.

Durch die Kombination/ Addition verschiedener Ohrloch-Kombinationen wurden die Mäuse mit Markierungen von 1 bis 99 versehen (links). Beispielhaft ist rechts die Ohrlochmarkierung für die Maus Nummer 36 (10 + 20 = 30 und 2 + 4 = 6; 30 + 6 = 36) gezeigt.

Dazu wurde zunächst unter Verwendung des Genra Purgene Mouse Tail Kits von Qiagen, wie vom Hersteller beschrieben, genomische DNA (gDNA) aus den Biopsien isoliert.

Anschließend wurden Transgen- und Wildtyp (WT)-spezifische DNA-Abschnitte mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) und ausgewählter Primer amplifiziert.

Tabelle 22: Genotypisierungs-PCR der Gt(ROSA)26Sor^{tm1}(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)^{BF}-Mauslinie

Bezeichnung	Volumen (µl)
Ampuwa	11 µL
Genotyp-Cx43-Maus-rev-common	2 µL
Genotyp-Cx43 Maus-fw-wt (WT)	1 µL
Ai6-fw (Mutant)	1 µL
Enzym HotFirepol*	4 µL
gDNA	1 µL

Tabelle 23: Genotypisierungs-PCR Reaktion A der αMHC-MCM-Mauslinie

Bezeichnung	Volumen (µl)
Ampuwa	13 µL
Common A1cf	1 µL
wt-Reverse A1cf	1 µL
Enzym HotFirepol*	4 µL
gDNA	1 µL

Tabelle 24: Genotypisierungs-PCR Reaktion B der αMHC-MCM-Mauslinie

Bezeichnung	Volumen (µl)
Ampuwa	13 µL
Common A1cf	1 µL
Mutant-Reverse A1cf	1 µL
Enzym HotFirepol*	4 µL
gDNA	1 µL

Tabelle 25: Genotypisierungs-PCR der Periostin-MCM-Mauslinie

Bezeichnung	Volumen (μL)
Ampuwa	11 μL
Genotyp-Cx43-Maus-rev-common	2 μL
Genotyp-Cx43 Maus-fw-wt (WT)	1 μL
Ai6-fw (Mutant)	1 μL
Enzym HotFirepol*	4 μL
gDNA	1 μL

Tabelle 26: PCR Programm zur Genotypisierung transgener Mauslinien

PCR-Schritt	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit
Aktivierung der Hot-Start-Polymerase	95	15 min
Denaturierung	95	20 s
Annealing/Primerhybridisierung	60	1 min
Elongation	72	2 min
Abschließende Elongation	72	10 min
Pause	4	∞

} 24 Zyklen

3.2.10.2 Agarose-Gelelektrophorese

Nach erfolgter PCR Reaktion wurden die amplifizierten DNA-Sequenzen mittels Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und visualisiert. Dazu wurden mit Hilfe einer Mikrowelle (40P, 5 min) 2 %-ige Agarose Lösungen in 1x TAE Puffer hergestellt. Nach kurzem Abkühlen wurden die Agarose Lösungen mit Ethidiumbromid (250 $\mu\text{g/ml}$; 2 Tropfen pro 50 ml Agarose Gel) versetzt und in Gelträger gegossen. Die Polymerisation der Gele dauerte ca. 20 min. Anschließend wurden die Gele in die mit 1x TAE Puffer befüllten Apparaturen eingesetzt und mit DNA-Größenstandards und Proben beladen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte bei 500 mA und einer konstanten Spannung von 100 V und RT. Die DNA-Banden wurden mittels UV Licht unter Verwendung eines Geldokumentationssystems mit zugehöriger intas Software detektiert. Anhand der ermittelten Bandengrößen konnte der Genotyp der Mäuse bestimmt werden.

Tabelle 27: Bandengrößen der Genotypisierungs-PCRs

Bezeichnung	Genotyp	Bandengröße (bp)
Gt(ROSA)26Sor ^{tm1} (CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF	WT	436
	Mutant	526
α MHC-MCM	WT	295
	Mutant	300
Periostin-MCM	WT	380
	Mutant	270

3.2.10.3 Bestimmung der Transgen-Kopienzahl mittels digitaler Polymerase Kettenreaktion

Die dPCR ist eine sehr präzise und sensitive Methode zur absoluten Quantifizierung (Kopien/ μ l) von Nukleinsäuren. Dazu wird die Probe zufällig auf tausende Partitionen aufgeteilt, in denen jeweils einzelne Reaktionen stattfinden. Unter optimalen Bedingungen liegt pro Partition ein oder kein Target Nukleinsäure Molekül vor. Nach Ablauf einer Endpunkt PCR wird das Fluoreszenzsignal (positiv/negativ) jeder einzelnen Partition bestimmt und daraus die absolute Menge der Target Nukleinsäure der Probe berechnet. Die Berechnung beruht auf der Poisson-Verteilung, welche die durchschnittliche Anzahl an Nukleinsäure Molekülen pro Partition (0, 1, >1) abschätzt, sodass die Kopienzahl der Target Nukleinsäure berechnet werden kann.

Zur Bestimmung der Transgen-Kopienzahl (Copy number variation, CNV) wurde gDNA eingesetzt. Diese musste zunächst durch Zugabe eines Restriktionsenzym (XbaI) zum Reaktionsgemisch in kürzere Fragmente gespalten werden, um eine gleichmäßige Verteilung des Targets auf die Partitionen zu ermöglichen. Das Enzym wurde gewählt, weil es nicht innerhalb der Transgenkassette schneidet. Als Target-Gene wurden mCherry und Cx43 ausgewählt, welche mit Hilfe von FAM-markierten Taqman-Sonden (mCherry-Sonde, Cx43 endo- und exogen-Sonde) nachgewiesen werden konnten. Das Tfrs Gen wurde als Referenzgen verwendet, da es eine bekannte Anzahl von zwei Kopien aufweist. Es wurde mittels einer VIC-markierten Taqman-Sonde detektiert.

Die gut durchmischten Reaktionsansätze wurden in eine „QIAcuity Nanoplate 8.5 k 24-well“ pipettiert. Diese wurde anschließend mit einer Folie verschlossen und zur Fragmentierung der

gDNA für 10 min bei RT inkubiert. Die Partitionierung, die Endpunkt PCR sowie das Imaging (Belichtungszeit: 500 ms, Gain: 6) erfolgten automatisch im QIAcuity One Gerät.

Tabelle 28: CNV-Assay dPCR

	1 Reaktion
4x QIAcuity Probe PCR Master Mix	3 µl
20x Taqman-Sonde-FAM	0,6 µl
20x Taqman-Sonde-VIC	0,6 µl
Anza 12 Xbal (10U/µl)	0,04 µl
RNase freies Wasser	variabel
Template DNA (75 ng)	variabel
Reaktionsvolumen	12 µl

Tabelle 29: dPCR Programm zur Bestimmung der CNV

Temperatur (°C)	Zeit	
95	2 min	} 40 Zyklen
95	15 s	
60	30 s	

Die Kopienzahl des Transgens wurde auf das Referenzgen Tfrc bzw. auf die Kopienzahl einer WT Maus normalisiert:

$$\text{Kopienzahl (mCherry Sonde)} = \frac{\text{Konzentration (mCherry)} \left(\frac{\text{Kopien}}{\mu\text{l}} \right)}{\text{Konzentration (Tfrc)} \left(\frac{\text{Kopien}}{\mu\text{l}} \right)} * 2$$

$$\text{Kopienzahl (Cx43 endo\&exo Sonde)} = \frac{\frac{\text{Konzentration Probe (Cx43)} \left(\frac{\text{Kopien}}{\mu\text{l}} \right)}{\text{Konzentration Probe (Tfrc)} \left(\frac{\text{Kopien}}{\mu\text{l}} \right)}}{\frac{\text{Konzentration WT Maus (Cx43)} \left(\frac{\text{Kopien}}{\mu\text{l}} \right)}{\text{Konzentration WT Maus (Tfrc)} \left(\frac{\text{Kopien}}{\mu\text{l}} \right)}} * 2$$

3.2.11 RNA-Methoden

3.2.11.1 RNA-Isolation aus Herzgewebe

Mit Hilfe des RNeasy[®] Plus Micro Kits der Firma Qiagen wurde RNA aus tiefgefrorenen (-80 °C) Herzgewebeproben isoliert. Zur Homogenisierung wurden die Gewebeproben zunächst mit dem TissueLyser LT unter Verwendung von RLT Plus Puffer und je einer 5 mm großen Edelstahl Kugel pro Eppi (5 min, Stufe 50) lysiert. RLT Puffer enthält als wesentliche Komponente Guanidinisothiocyanat, das die Bindung der RNA an die Silikamembran der Elutionssäulen unterstützt und auch als RNase-Inhibitor wirkt. Zusätzlich wird unmittelbar vor Gebrauch dem RLT Puffer β -Mercaptoethanol zugesetzt, um die RNAsen im Lysat wirksam zu inaktivieren (10 μ l β -Mercaptoethanol pro 1 ml Puffer RLT). Anschließend wurden verbliebene unlösliche Rückstände mittels QIAshredder Säulen (Zentrifugation des Lysats: 2 min, 13000 rpm) herausgefiltert. Danach wurde das von Qiagen bereitgestellte Protokoll des RNeasy[®] Plus Micro Kits befolgt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine NanoQuant Platte mit je 2 μ l der RNA-Proben beladen und am SPARK[®] Multimode-Microplate-Reader und zugehöriger i-control[™] Software vermessen. Die Qualität der RNA (RIN Nummer) wurde mit dem Bioanalyzer 2100 unter Verwendung des Agilent RNA 6000 Nano Kits überprüft. Dabei wurden die Angaben des Herstellers befolgt und eine Chip Beladungsstation, ein IKA Vortexer sowie die 2100 Expert Software gebraucht.

3.2.11.2 Synthese der komplementären DNA

Je 250 ng der isolierten einzelsträngigen mRNA wurden unter Verwendung des Superscript[™] VILO[™] cDNA Kits mittels reverser Transkription in doppelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

Tabelle 30: cDNA Synthese

Bezeichnung	Volumen (μ l)
5x VILO [™] Reaction Mix	4
10x SuperScript [™] Enzyme Mix	2
RNA (250 ng)	x
Ampuwa	Ad 20

Tabelle 31: cDNA Synthese Programm

Temperatur (°C)	Zeit (min)
25	10
42	60
85	5

3.2.11.3 Genexpressionsanalyse mittels digitaler Polymerase Kettenreaktion

Die Transgenexpressionsanalyse auf mRNA-Ebene wurde mit Hilfe der dPCR (siehe Kapitel 3.2.10) durchgeführt. Es wurden vier verschiedene FAM-markierte Taqman-Sonden verwendet, um (I) die Transgenexpression nachzuweisen (mCherry-Sonde, Cx43 exogen-Sonde), (II) die Cx43-Überexpression zu quantifizieren (Cx43 endo- und exogen-Sonde), sowie die Regulation des endogenen Cx43 während der Cx43-Überexpression zu analysieren (Cx43 endo-Sonde). Um die mRNA-Expression zwischen verschiedenen Proben vergleichen zu können, wurde das Hprt Gen als Housekeeping-Gen (internes Referenzgen) gewählt, da dieses im infarzierten Gewebe keiner Regulation unterliegt (Svingen et al. 2015). Es wurde mittels einer VIC-markierten Taqman-Sonde detektiert.

Tabelle 32: Genexpression-Assay dPCR

	1 Reaktion
4x QIAcuity Probe PCR Master Mix	3 µl
20x Taqman-Sonde-FAM	0,6 µl
20x Taqman-Sonde-VIC	0,6 µl
RNase freies Wasser	6,8 µl
Template cDNA	1 µl
Reaktionsvolumen	12 µl

Tabelle 33: dPCR Programm zur Genexpressionsanalyse

Temperatur (°C)	Zeit	
95	2 min	} 40 Zyklen
95	15 s	
60	30 s	

Die Kopienzahl der cDNA des Transgens wurde auf den Housekeeper Hprt normalisiert:

$$\text{relative Kopienzahl} = \frac{\text{Konzentration (Ziel Gen)} \left(\frac{\text{Kopien}}{\mu\text{l}} \right)}{\text{Konzentration (Hprt)} \left(\frac{\text{Kopien}}{\mu\text{l}} \right)}$$

3.2.11.4 Bulk-RNAseq-Analyse

Um einen Vergleich der Transkriptome von Kontroll- und transgenem Narbengewebe der Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF} x Periostin-MCM-Mauslinie zu ermöglichen, wurden Bulk-RNAseq-Analysen makroskopisch isolierter Kryoinfarkte durchgeführt.

3.2.11.4.1 RNAseq Library Präparation

Die Library der RNA-Proben wurde unter Verwendung des Trio RNA-Seq Kits (NuGEN) anhand des vom Hersteller bereitgestellten Protokolls generiert und zur Sequenzierung nach Heidelberg zum „European Molecular Biology Laboratory“ (EMBL) verschickt. Bei der Library Präparation wurde die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Diese wurde fragmentiert. Die Fragmente wurden beidseitig mit speziellen Adaptern ligiert, sodass eine sogenannte „Paired-end-Sequenzierung“ erfolgen konnte, das bedeutet, dass die Sequenzierung von beiden Leserichtungen aus durchgeführt wurde, was eine besonders genaue Analyse ermöglicht. Die Sequenzierung umfasste 21 - 49 Millionen gelesene Fragmente (=“reads“) vor der Bearbeitung des Datensatzes.

3.2.11.4.2 RNAseq Bioinformatik-Analyse

Die Analyse der Sequenzierungsergebnisse erfolgte mit Hilfe der Plattform usegalaxy.eu/. Zuerst wurde eine Qualitätskontrolle mit dem „FastQC“ und „MultiQC“ Werkzeug durchgeführt. Die Adapter wurden mit dem Befehl „Trim Galore!“ (paired-end library) getrimmt. Um die erhaltenen Reads bestimmten Genen zuordnen zu können, wurden sie mit einem Maus-Referenzgenom abgeglichen. Dieses Mapping erfolgte mit dem „RNA Star“ Werkzeug (paired-ended reads; reference genome: Mouse (Mus Musculus): mm10 Full; Length of the genomic sequence around annotated junctions: 59 (Read Länge -1)). Die „RNA Star“ Ergebnisse wurden mit dem „MultiQC“ Werkzeug zusammengefasst. PCR Duplikate wurden mit dem Befehl „RmDup“ entfernt und die Qualität der Reads mit dem „FastQC“ und „MultiQC“ Werkzeug überprüft. „Samtools idxstats“ wurde genutzt, um die Verteilung der Reads über die Chromosomen anzugeben. Die Ergebnisse wurden mittels „MultiQC“ zusammengefasst Die Anzahl an Reads pro annotiertem Gen wurden mit dem Werkzeug „featureCounts“ bestimmt (Gene annotation file: featureCounts built-in (mm10); Create gene-length file: Yes; Count

fragments instead of reads: Enabled; Minimum mapping quality per read: 10). Die featureCounts Ergebnisse wurden mit dem „MultiQC“ Befehl zusammengefasst. Mittels „DeSeq2“ wurden die Proben bezüglich ihrer Sequenzierungs-Tiefe und der Library Zusammensetzung normalisiert und eine differenzielle Genexpressionsanalyse durchgeführt (Output normalised counts: Yes). Das Werkzeug „Filter“ diente der Selektion aller signifikant unterschiedlich exprimierten Gene ($p < 0,05$) (With following condition: $c7 < 0.05$). Um die Ergebnisse der RNAseq-Analyse in einer Heatmap zu visualisieren, wurden zunächst mit Hilfe des Befehls „annotateMyIDs“ den Gen IDs (Entrez ID) die entsprechenden Ensembl IDs, Gennamen und Gensymbole zugeordnet (Organism: Mouse; ID Type: Entrez; Output columns: ENSEMBL, SYMBOL, GENENAME). Die Tabelle der annotierten Gen IDs konnte mit dem Werkzeug „Join two Datasets“ mit der Tabelle der signifikant unterschiedlich exprimierten Gene zusammengeführt werden (using column: Column: 1 and column: 1 (jeweils die Entrez ID Spalten); Keep lines of first input that do not join with second input: Yes; Keep the header lines: Yes). Der Befehl „Cut“ wurde verwendet, um die Tabellenspalten der Gensymbole und die der normalisierten Werte für die Gene zu extrahieren. Um die Expression eines Genes zwischen den einzelnen Proben zu vergleichen wurden die Z-scores mittels „Table Compute“ berechnet (2x Anwendung von „Table Compute“: I: Input Single or Multiple Tables: Single Table; Type of table operation: Perform a full table operation; Operation: Custom; Custom expression on 'table', along 'axis' (0 or 1): $table.sub(table.mean(1), 0)$; II: Input Single or Multiple Tables: Multiple Tables; Custom expression on 'tableN': $table2.div(table1.std(1),0)$). Der Z-score einer Probe gibt an, um wie viele Standardabweichungen die Expression eines Gens dieser Probe von dem Mittelwert der Expression desselben Gens aller Proben abweicht. Die Z-scores der signifikant unterschiedlich exprimierten Gene wurden in einer Heatmap dargestellt. Dazu wurde das Werkzeug „heatmap2“ (Type of colormap to use: Gradient with 3 colors) verwendet. Zudem wurde ein Volcano plot der differenziell exprimierten Gene mittels „Volcano Plot“ erstellt. Als Input dienten der $\log_2(FC)$, das P-value sowie das P-adj-value der „DeSeq2“-Analyse, es wurden alle signifikant differenziell exprimierten Gene farblich markiert und beschriftet.

Für die Analysen wurden überwiegend die Standardeinstellungen der Galaxy-Werkzeuge verwendet. Abweichungen von den Grundeinstellungen wurden angegeben.

3.2.12 Protein-Methoden

3.2.12.1 Protein-Isolation aus Herzgewebe

Zur Extraktion der Proteine wurde das Herzgewebe auf Eis mit Hilfe von TaKaRa® BioMasher Standard Homogenisatoren in kaltem modifiziertem Ripa Puffer vollständig lysiert (ca. 10 μ l

Ripa Puffer pro 1 mg Herzgewebe). Das Lysat wurde 20 min auf Eis inkubiert und im Anschluss 5 min bei 4 °C und 3600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für eine Proteinbestimmung und die Western blot-Analysen verwendet. Die Langzeit-Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.2.12.2 Proteinquantifizierung

Die Menge an Gesamtprotein wurde kolorimetrisch unter Verwendung des BCA Protein Assay Kits von Thermo Scientific nach Protokoll des Herstellers bestimmt. In alkalischer Lösung formen Proteine über die Stickstoffatome mit zweiwertigen Kupfer-Ionen blau-violette Komplexe (Biuretreaktion). Dabei werden zweiwertige Kupfer-Ionen zu einwertigen Kupferionen reduziert. Um die Farbreaktion zu verstärken wird Bicinchoninsäure (BCA) beigeetzt, welche mit den einwertigen Kupfer-Ionen (2:1) einen stark violetten wasserlöslichen Chelatkomplex bildet und eine starke Absorption bei 562 nm aufweist, die mit steigender Proteinkonzentration nahezu linear ist (Smith et al. 1985). Die Doppelbestimmungen der 1:10 verdünnten Proteinproben (3 µl Proteinlysat + 27 µl Ampuwa) erfolgten in 96-well Zellkulturplatten. Nach Zugabe von je 200 µl eines Mastermixes (Reagenz A und B, 50:1) zu 10 µl der Proteinverdünnung pro well erfolgte eine 30 -minütige Inkubation bei 37 °C. Schließlich wurde die Absorption der Proteinlysate bei 562 nm am SPARK® Multimode-Microplate-Reader gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Proteinstandard Kurve berechnet, welche durch systematische Verdünnung eines Albumin Standards erstellt wurde.

3.2.12.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dazu wurden je 20 µg Gesamtprotein pro Probe 1:1 mit 2x Laemmli Ladepuffer vermischt. Der Ladepuffer wurde zuvor mit β-Mercaptoethanol (1:20) versetzt, um Disulfidbrücken der Proteine durch Reduktion zu spalten. Um die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine durch das Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen aufzulösen, wurden die Proben bei 100 °C für 10 min denaturiert. Das negativ geladene SDS im Ladepuffer lagert sich in einem bestimmten Verhältnis an die Proteine (1 SDS Molekül pro 2 Aminosäuren), überdeckt deren eigene Ladung und bewirkt, dass die Ladung der Proteine proportional zu ihrer Masse wird. Dadurch kann eine Auftrennung der linearisierten/denaturierten Proteine ausschließlich anhand ihrer Größe erfolgen. Die Auftrennung in einem Polyacrylamidgel erfolgte durch Anlegen eines elektrischen Feldes. In diesem wandern kleine Proteine schneller durch die Poren des Gels als große Proteine. Die Gele wurden in einem Gelgießstand in Sandwich-

Kassetten, zusammengesetzt aus einer Glasplatte mit 1,5 mm Abstandhalter und einer planen Glasplatte, gegossen. Zuerst wurden 2/3 der Kassette mit 12 %-igem Trenngel befüllt und mit 100 %-igem Isopropanol überschichtet, sodass ein blasenfreier Meniskus entstand. Nach 45 min Polymerisationszeit bei RT konnte das Isopropanol abgeschüttet werden und ein 8 %-iges Sammelgel auf das Trenngel geschichtet werden, in welches ein 15-well Kamm eingesetzt wurde. Die Polymerisationszeit betrug 15 min bei RT. Anschließend wurden die Gele mit den aufgekochten Proteinlysaten beladen und 1,5 - 2 h bei 70 V und RT in einer mit 1x Laufpuffer gefüllten Gelelektrophorese Kammer aufgetrennt. Die Proteine wandern zunächst durch das Sammelgel, in dem sie konzentriert werden. Die eigentliche Größenauftrennung erfolgt anschließend beim Durchlaufen des Trenngels.

3.2.12.4 Western blot

Die in der SDS-PAGE nach Größe aufgetrennten Proteine wurden per Tank-blot Verfahren auf eine PVDF-FL Membran (22 µm) übertragen, welche durch ihre geringe Autofluoreszenz besonders gut zur Fluoreszenzdetektion geeignet ist und auch bei langer Belichtungszeit wenig Hintergrund hat. Für das Blotting wurden die Gele zunächst für 5 min bei RT in H₂O bidest. von überschüssigem Laufpuffer befreit und anschließend in 4 °C kaltem 1x Transferpuffer inkubiert. Die PVDF-FL Membran wurde zur Aktivierung kurz in Methanol getränkt und ebenfalls in 4 °C kaltem 1x Transferpuffer überführt. Die Membran wurde auf das Gel gelegt. Beides wurde zwischen je zwei in 4 °C kaltem 1x Transferpuffer getränkten Filterpapieren und Schwämmen platziert und in ein Tank-blot Kammer Setup (Mini Trans-Blot[®] Cell system) eingesetzt. Das Blotting erfolgte für 1 h 15 min bei 100 V in eisgekühltem 1x Transfer Puffer. Anschließend wurde die Membran in 1x Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) für 5 min bei RT gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Membran für 1 h bei RT in 5 % Milchpulver (MP) in 1x Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,1 % Tween20 (TBS-T) blockiert. Zur Immundetektion bestimmter Proteine wurde die Membran nacheinander mit verschiedenen Erstantikörpern jeweils einzeln in 4 °C in 5 % MP/TBS-T inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3-mal bei RT für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Die Zweitantikörper wurden ebenfalls einzeln, in 5 % MP/TBS-T verdünnt für 1 h bei RT, appliziert. Danach wurde die Membran erneut 5-mal bei RT für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Während aller Wasch- und Inkubationsschritte wurden die Flüssigkeiten durch eine Wippe in Bewegung gehalten. Zur semiquantitativen Auswertung wurde auf jedem Gel ein Housekeeper detektiert. Im gesunden Herzgewebe wurde GAPDH eingesetzt, im infarzierten Gewebe ist dieses Protein jedoch (herunter-)reguliert, sodass für Lysate der Herzinfarkt Narbe β-Aktin eingesetzt wurde. Die Proteinbanden wurden am ChemiDoc[™] MP Imaging System über Fluoreszenz- oder HRP-gekoppelte Zweitantikörper detektiert. Zur Detektion

HRP(Meerrettich-Peroxidase)-konjugierter Zweitantikörper musste die Membran nach dem 5. Waschschrift zusätzlich für 1 min mit Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (1:1 Mischung der Reagenzien 1 und 2) behandelt werden, um die HRP katalysierte Chemilumineszenzreaktion ablaufen zu lassen. Die semiquantitative Auswertung erfolgte mit dem „Volumen Werkzeug“ der Image Lab Software von Bio-Rad. Dabei wurden zunächst die größte Proteinbanden mit einem möglichst kleinen Rechteck umrahmt. Anschließend wurden die Proteinbanden aller weiteren Proben mit Rechtecken derselben Fläche umrahmt. Die Software konnte so die Intensität der Probenbanden innerhalb der Rechtecke kalkulieren.

relative Protein Expression (normalisiert auf den Housekeeper)

$$= \frac{\text{Hintergrund bereinigte Intensität der Probenbande}}{\text{Hintergrund bereinigte Intensität der Housekeeperbande}} * 100$$

3.2.13 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden unter Verwendung der GraphPad Prism 9 Software durchgeführt. Bei der Auswertung nominal skalierten Daten (EPU; qualitative, dichotome Merkmale) wurde der Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Anschließend wurden die verschiedenen Gruppen paarweise durch einen Exakten Fisher Test miteinander verglichen. Die statistische Untersuchung metrisch skalierten Daten erfolgte bei dem Vergleich von zwei Gruppen mit Hilfe eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests, bei dem Vergleich von mehr als zwei Gruppen mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA und anschließendem Tukey's post-hoc Test, um die verschiedenen Gruppen paarweise untereinander zu vergleichen. Alle Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Stichprobengröße (n) gibt die Anzahl untersuchter Mäuse pro Vergleichsgruppe an.

3.3 Kooperationsübersicht

Die Generierung transgener Zell- und Mauslinien wurde von Caroline Geisen (Herzchirurgische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Bonn; Institut für Physiologie I, Universität Bonn), Michael Hesse (Institut für Physiologie I, Universität Bonn) und Sabine Grünberg (Institut für Physiologie I, Universität Bonn) unterstützt.

Eine humane Zervixkarzinomzelllinie HeLa wurden von K. Hoppe-Seyler (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Cx43-P2A-mCherry transfizierte HeLa-Zellen wurden in Farbstoff-Transfer-Versuchen von Daniela Malan (Institut für Physiologie I, Universität Bonn) gepatched.

Die FRAP-Messung an G4 ES-Stammzellen und 3T3-FBs wurden von Miriam Schiffer (Herzchirurgische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Bonn; Institut für Physiologie I, Universität Bonn) durchgeführt.

Die Blastozysteninjektionen transgener G4 ES-Zellen wurde vom transgenen Service der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn von Dr. David-Marian Otte und Jürgen Schmidt durchgeführt.

Die Kryoinfarkt Operationen und die praktische Durchführung der EPUs wurden von Miriam Schiffer (Herzchirurgische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Bonn; Institut für Physiologie I, Universität Bonn) und Esther Carls (Herzchirurgische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt.

Die Aufnahme und Analyse der echokardiographischen Untersuchungen wurden von Mona Melek Mohammadi (Institut für Physiologie I, Universität Bonn) unterstützt.

Die RNAseq Library wurde von Patricia Freitag (Institut für Physiologie I, Universität Bonn) erstellt.

Die RNA-Sequenzierung wurde vom European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Heidelberg) durchgeführt.

Die RNAseq-Datenanalyse wurde von Michael Hesse (Institut für Physiologie I, Universität Bonn) unterstützt.

4 Ergebnisse

4.1 Generierung und Charakterisierung transgener Mausstammzelllinien, die das murine Connexin 43 und das Fluoreszenzreporterprotein mCherry Cre-induzierbar überexprimieren

In diesem Kapitel der Doktorarbeit sind die Ergebnisse der folgenden Publikation zusammengefasst:

Niemann, Pia; Schiffer, Miriam; Malan, Daniela; Grünberg, Sabine; Roell, Wilhelm; Geisen, Caroline; Fleischmann, Bernd K. (2022): Generation and Characterization of an Inducible Cx43 Overexpression System in Mouse Embryonic Stem Cells. In: *Cells* 11 (4). DOI: 10.3390/cells11040694.

Das Ziel dieser Promotionsarbeit war ein murines *in vitro* und *in vivo* Modell zur Überexpression von Cx43 zu entwickeln, um die zellbiologische Bedeutung von Cx43 im gesunden sowie im infarzierten Herzen zu untersuchen. Dabei wurde ein Cre-induzierbares System gewählt, da von Ewart et al. (1997) bei der konstitutiven, nicht induzierbaren Überexpression von Cx43 postnatal ein letaler Phänotyp mit Neuralrohrdefekten und Fehlbildungen des Herzens beobachtet wurde. Außerdem scheint die Menge und das Verteilungsmuster von Cx43 während der Embryonalentwicklung eine kritische Rolle zu spielen (Delorme et al. 1997; Ruangvoravat und Lo 1992; Shin et al. 2020), sodass die Ergebnisse bei bereits embryonaler Überexpression von Cx43 schwer zu interpretieren sind.

Für die Entwicklung der zeitlich induzierbaren Cx43 *in vitro* und *in vivo* Überexpressions-Modelle wurden zunächst transgene G4 ES-Zellen der Maus generiert. Dazu wurde die cDNA des murinen Cx43, die DNA-Sequenz des selbstschneidenden GSG-P2A-Peptids und die Sequenz des Fluoreszenzreportergens mCherry hinter die loxP flankierte Stop-Kassette (drei SV40 Polyadenylierungs Signale) des Ai6 Vektors (Addgene) kloniert (Abbildung 25A). Die Transgenexpression wird durch den ubiquitären CAG-Promotor kontrolliert, welcher eine starke Expression in Muskelzellen in allen Stadien der embryonalen Entwicklung der Maus und nach der Geburt zeigt (Biankin et al. 2007; Hesse et al. 2012; Kimura et al. 2021). Die Expression des Transgens ist solange inhibiert, bis die Stop-Kassette von einer Cre-Rekombinase ausgeschnitten wird. Für die Koexpression von Cx43 und mCherry wurde das selbstschneidende P2A-Peptid anstatt eines Fusionsproteins aus Cx43 und mCherry oder einer IRES-Sequenz (interne ribosomale Eintrittsstelle) gewählt, da die Fusion von Proteinen an den N-Terminus des Cx43 defekte Hemikanäle und GJs bewirkt (Contreras et al. 2003) und

die C-terminale Fusion die Eigenschaften sowie Regulierungsmechanismen von Connexinen und GJs verändert (Brokamp et al. 2012). Ein Vorteil gegenüber der IRES-Sequenz ist, dass kotranslatierte, 2A-gekoppelte Gene gleichermaßen exprimiert werden (Kuzmich et al. 2013). Es gibt verschiedene 2A-Peptide, die von unterschiedlichen Viren stammen. Das P2A-Peptid stammt vom Porcinen Teschovirus Serotyp 1 ab und weist die höchste Spaltungseffizienz in menschlichen Zelllinien, Zebrafischen und Mäusen auf (Kim et al. 2011). Während der Translation überspringt das Ribosom die Bildung der Glycyl-Propyl-Peptidbindung am C-Terminus des P2A-Peptids, sodass das P2A-Peptid von seinem nachgeschalteten Protein getrennt wird. Dadurch erhält hier das exogene Cx43 einen C-terminalen Anhang von 21 Aminosäuren des GSG-P2A. Das Fluoreszenzprotein mCherry trägt ein zusätzliches Prolin an seinem N-Terminus (Donnelly et al. 2001) (Abbildung 25B). Die Effizienz des P2A wurde durch einen Glycin-Serin-Glycin-Spacer (GSG) verbessert (Wang et al. 2015). Um zufällige Integrationen mehrerer Transgenkopien zu vermeiden, wurden der Rosa26 (Rs26)-Lokus gewählt, da er für Gen-Targeting leicht zugänglich ist und nur eine geringe transkriptionelle Aktivität aufweist (Perez-Pinera et al. 2012; Soriano 1999). Über die Rs26-Sequenzen des Ai6 Vektors und die Kotransfektion spezifischer Zinkfinger Nukleasen wurde eine einzelne Kopie der oben beschriebenen Expressionskassette durch homologe Rekombination in den Rs26-Lokus von G4 ES-Zellen integriert. Mit Hilfe verschiedener PCR-Assays und Southern blot-Analysen, sowie der Karyotypisierung und Kopienzahlbestimmung (qPCR) mehrerer unabhängiger CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry G4 ES-Zellklone, konnten zwei besonders geeignete Klone identifiziert werden: K29 und K31. Die Funktionalität des Cre-loxP-Systems in Zellen dieser beiden Klone konnte durch die Transduktion mit einem AAV2.1-Cre Virus demonstriert werden. Drei Tage nach der Transduktion undifferenzierter Zellen von K29 und K31 konnten diverse mCherry⁺ ES-Zellkolonien detektiert und aufgereinigt werden. Für die folgenden *in vitro* Experimente wurde der G4 ES-Zellklon 31 verwendet.

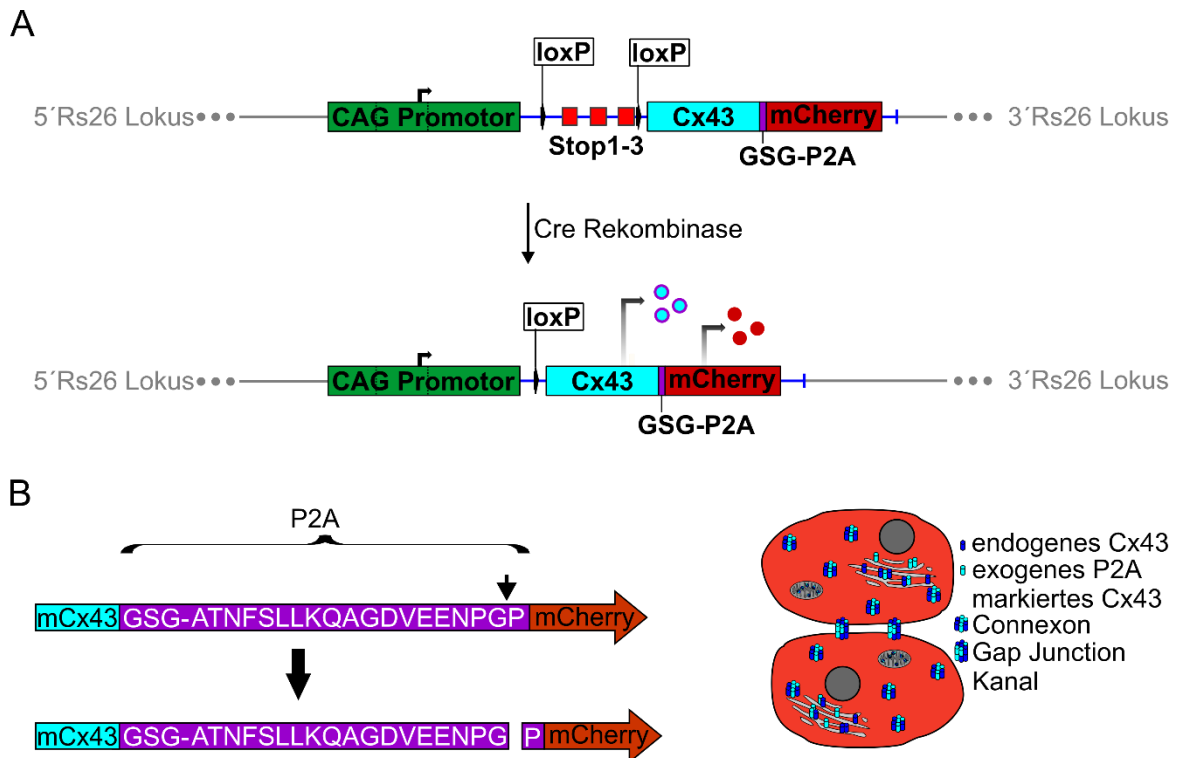
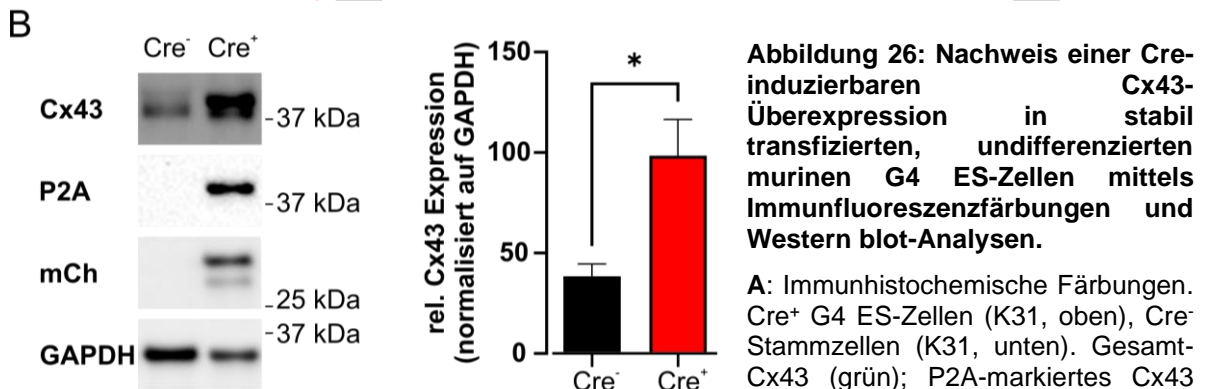
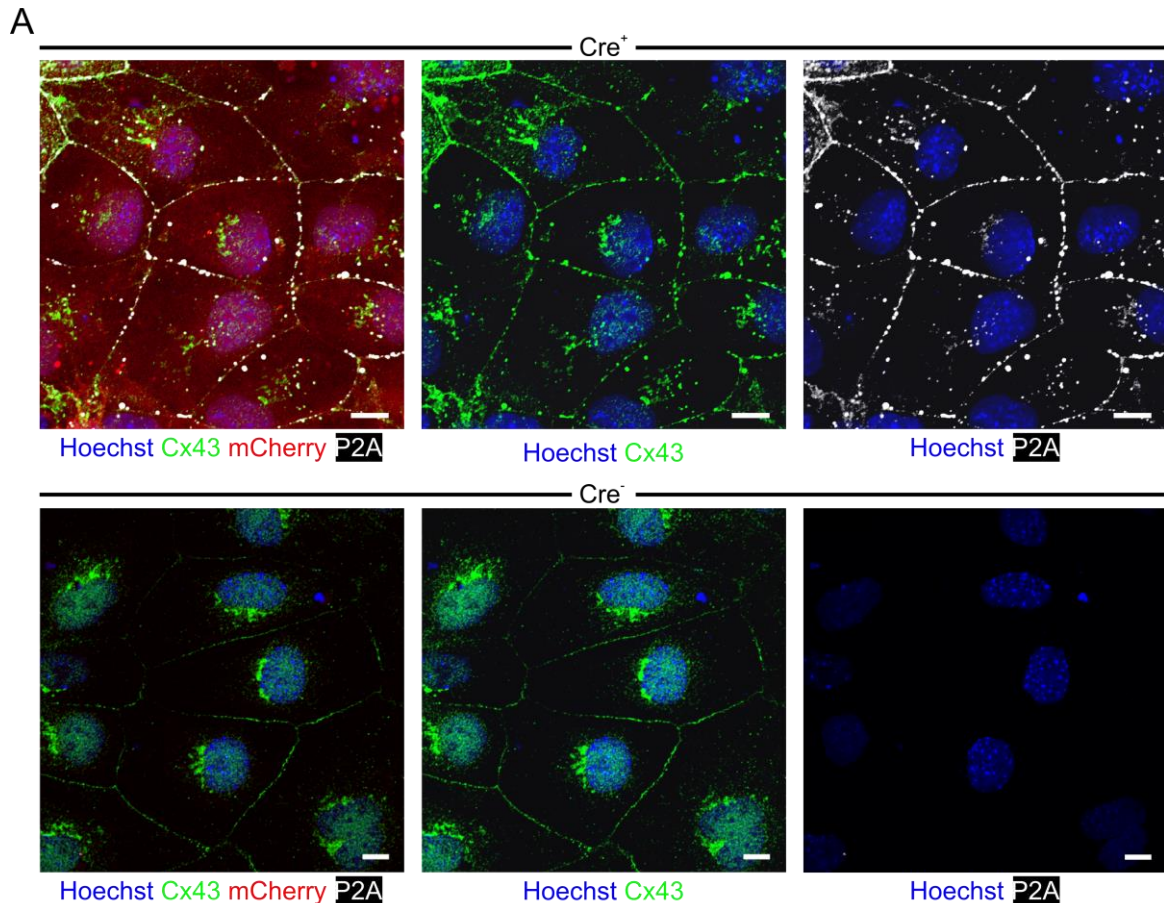


Abbildung 25: Cx43-Überexpressions-Modell.

A: Schematische Darstellung des CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry Konstrukts, welches über homologe Rekombination in den Rs26-Lokus integriert wurde. Die Transgenexpression ist durch die vorgeschaltete, loxP gefloxt Stop-Kassette inhibiert. Diese kann durch eine Cre-Rekombinase entfernt werden, sodass der CAG-Promotor die Expression von Cx43 und mCherry kontrolliert. Das exogene Cx43 ist C-terminal mit 21 Aminosäuren des P2A markiert. **B:** Mit Hilfe des selbst-schneidenden P2A-Peptids werden während der Translation zwei einzelne Proteine gebildet (links). Schematische Darstellung der Transgenexpression und GJ-Bildung in zwei benachbarten Zellen (rechts).

Die Transgenexpression in Zellen der G4 ES-Zelllinie (K31) wurde mittels immunhistochemischer Färbungen und Western blot-Analysen von Cx43, P2A und mCherry untersucht. Es konnte eine induzierte, spezifische Expression von exogenem, P2A-markiertem Cx43 und mCherry in Cre-positiven (Cre⁺) Stammzellen nachgewiesen werden, wohingegen Cre-negative (Cre⁻) G4 ES-Zellen weder P2A-markiertes Cx43 noch mCherry exprimierten (Abbildung 26A, B). Die zelluläre Verteilung des exogenen Cx43 war identisch mit der des endogenen Cx43. Beide Proteine waren sowohl in der Membran als auch im Zytoplasma zu finden (Abbildung 26A). Insgesamt konnte im Western blot eine etwa 2,5-fache Überexpression von Cx43 bestimmt werden (Abbildung 26B).



Trotz der Membran-Lokalisation des P2A-markierten Cx43 musste überprüft werden, ob das exogene Cx43 intakte GJs ausbilden kann, da in der Literatur beschrieben ist, dass getaggte Cx43-GJs veränderte biologische Eigenschaften aufweisen können (Contreras et al. 2003; Brokamp et al. 2012). Dazu wurde eine transgene CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry HeLa-Zelllinie etabliert. HeLa-Zellen wurden für die Funktionsanalyse von GJs aus exogenem Cx43 ausgewählt, da sie kein endogenes Cx43 exprimieren (Abbildung 27A). Nach der Transduktion von Cre⁻ HeLa-Zellen mit einem AAV2.1-Cre Virus, wurde die Transgenexpression in Cre⁺

HeLa-Zellen induziert. Aus einer einzelnen mCherry⁺ HeLa-Zelle wurde eine Cre⁺ HeLa-Zelllinie herangezogen. Das Expressionsmuster von exogenem Cx43 und mCherry wurde mittels Western blot und immunhistochemischen Färbungen analysiert (Abbildung 27A, B). Auch in Cre⁺ HeLa-Zellen war das exogene, P2A-markierte Cx43 sowohl in der Zellmembran als auch im Zytoplasma zu finden (Abbildung 27B). WT sowie Cre⁻ HeLa-Zellen exprimierten weder Cx43 noch mCherry (Abbildung 27A, B).

Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-Diffusions-Versuchen wurde nun in den transgenen Cre⁻ und Cre⁺ HeLa-Zellen die Bildung funktioneller Cx43-GJs untersucht. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Alexa 350 (MW = 349 Da; 0,5 µg/µl) und Alexa 647 (MW = 10 kDa; 0,5 µg/µl) eingesetzt. Im Gegensatz zum Alexa 647 Farbstoff ist der Alexa 350 Farbstoff klein genug, um über GJs transportiert zu werden. Der größere Alexa 647 Farbstoff wurde zusätzlich verwendet, um die Bildung zytoplasmatischer Brücken ausschließen zu können. Wenn eine einzelne Cre⁺ HeLa-Zelle mikroskopisch mit einer Patch-Clamp-Pipette durchstoßen und mit Alexa 350 Farbstoff beladen wurde, konnte der Farbstoff innerhalb von ca. 0,5 Minuten ins Zytoplasma der benachbarten Zellen diffundieren. Nach etwa fünf Minuten war die gesamte Zellinsel (10-20 Zellen) mit dem Fluoreszenzfarbstoff beladen (Abbildung 27C obere Bilderserie; n = 4). In den Cre⁻ HeLa-Zellen konnte keine Diffusion des Fluoreszenzfarbstoffes in benachbarte Zellen beobachtet werden. Auch nach fünf Minuten fluoreszierte allein die einzelne ursprünglich beladene Cre⁻ HeLa-Zelle (Abbildung 27C untere Bilderserie; n = 5). Ebenso diffundierte der große Alexa 647 Farbstoff (MW = 10 kDa) in keine der benachbarten Cre⁺ (n = 4) oder Cre⁻ (n = 3) HeLa-Zellen, sodass die Bildung von zytosolischen Brücken ausgeschlossen werden konnte.

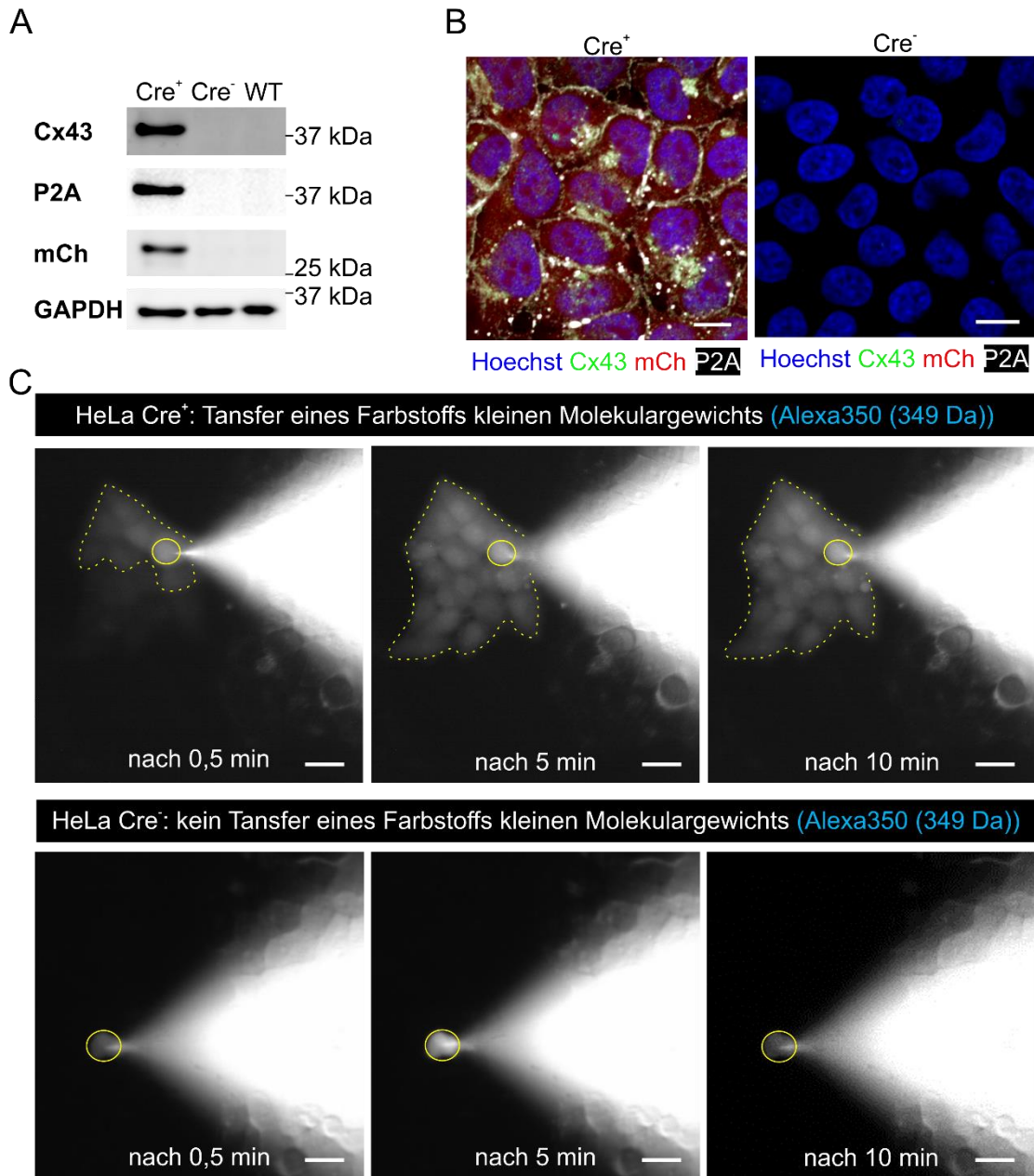


Abbildung 27: Induzierbare Cx43-Expression und Ausbildung funktioneller GJs in stabil transfizierten HeLa-Zellen.

A: Western blot der Cx43-, P2A- und mCherry-Expression in AAV2.1-Cre-behandelten HeLa-Zellen (Cre⁺), sowie Cre⁻ und WT-HeLa-Zellen. **B:** Mikroskopische Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen. Cx43 (grün); P2A (weiß); mCherry (rot); Hoechst (blau). Größenbalken = 10 µm. **C:** Mikroskopische Aufnahmen von einzelnen Cre⁺ oder Cre⁻ HeLa-Zellen, die mit einer Patch-Pipette angestochen und mit einem kleinen Alexa 350 (MW = 349 Da) Farbstoff beladen wurden. In Cre⁺ HeLa Zellen konnte die Diffusion des Farbstoffes zu den umliegenden Zellen beobachtet werden (obere Bilderserie; n = 4). Im Gegensatz dazu wurde in Cre⁻ Kontrollzellen kein Transport des Farbstoffes in benachbarte HeLa-Zellen festgestellt (untere Bilderserie; n = 5). Die einzelne angestochene HeLa-Zelle ist mit einer durchgehenden gelben Linie umkreist; durch die Diffusion des Farbstoffes konnten Alexa 350-positive Zellkolonien beobachtet werden, welche mit einer gelb-gestrichelten Linie umrandet sind. Größenbalken = 100 µm.

Im Gegensatz zu HeLa-Zellen exprimieren G4 ES-Zellen endogenes Cx43. Als Nächstes wurde nun untersucht, ob die Überexpression von Cx43, bei bereits in gewissem Maße endogen exprimiertem Cx43, einen Effekt auf die Zell-Zell-Verbindungen aufweist. Dazu wurden FRAP-Experimente in transgenen, undifferenzierten Cre⁺ sowie Cre⁻ G4 ES-Zellen (K31) durchgeführt. Für die Untersuchung dieser Fragestellung waren FRAP-Experimente vorteilhaft, da hierbei, im Gegensatz zu den Fluoreszenzfarbstoff-Diffusions-Versuchen, eine Quantifizierung der Diffusionsgeschwindigkeit des Calcein AM-Farbstoffes möglich war. Die Stammzellen wurden mit Calcein AM-Fluoreszenzfarbstoff beladen. Eine einzelne Zelle der Kolonie wurde mit einem 561 nm Laser für fünf Sekunden mit einer Intensität von 2,5 mW bestrahlt, sodass die Fluoreszenz in dieser Zelle zerstört wurde. In den ersten zehn Minuten nach dieser Photobleichung wurden in kurzen zeitlichen Abständen Fluoreszenzaufnahmen generiert, um die Diffusionsgeschwindigkeit des Farbstoffes aus den umliegenden Zellen zurück in die Calcein-negative Zelle quantifizieren zu können (Abbildung 28A). Diese Experimente zeigten, dass Cre⁺ Stammzellen im Vergleich zu Cre⁻ Zellen nach der Photobleichung den Fluoreszenzfarbstoff signifikant schneller wiederaufnehmen (Abbildung 28B) (4 min nach Photobleichung: $p(\text{Cre}^- \text{ vs. } \text{Cre}^+) < 0,0005$). Erst zehn Minuten nach der Photobleichung war auch in den Kontrollzellen eine deutliche Wiederherstellung der Fluoreszenzintensität zu beobachten (Abbildung 28B) ($p(\text{Cre}^- \text{ vs. } \text{Cre}^+) < 0,4905$), da eine Grundexpression an endogenem Cx43 verfügbar war. Somit konnte durch die Überexpression von Cx43 ein zusätzlicher Effekt auf die Zell-Zell-Verbindungen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte ein funktionelles, induzierbares Cx43-Überexpressions-Modell in murinen G4 ES-Zellen sowie in HeLa-Zellen etabliert werden. In HeLa-Zellen wurde gezeigt, dass P2A-markiertes Cx43 funktionelle GJs ausbildet. Dies wurde durch FRAP-Experimente in transgenen G4 ES-Zellen untermauert. Diese Experimente zeigten eine beschleunigte Diffusionsgeschwindigkeit in Cx43-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Cre⁻ G4 ES-Zellen, welche ausschließlich das endogene Cx43 exprimierten (K31). Anhand verschiedener Assays konnten zwei besonders gut geeignete CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry G4 ES-Zellklone (K29, K31) identifiziert werden, welche alle Voraussetzungen für die Generierung einer Cx43-Überexpressions-Mauslinie erfüllten.

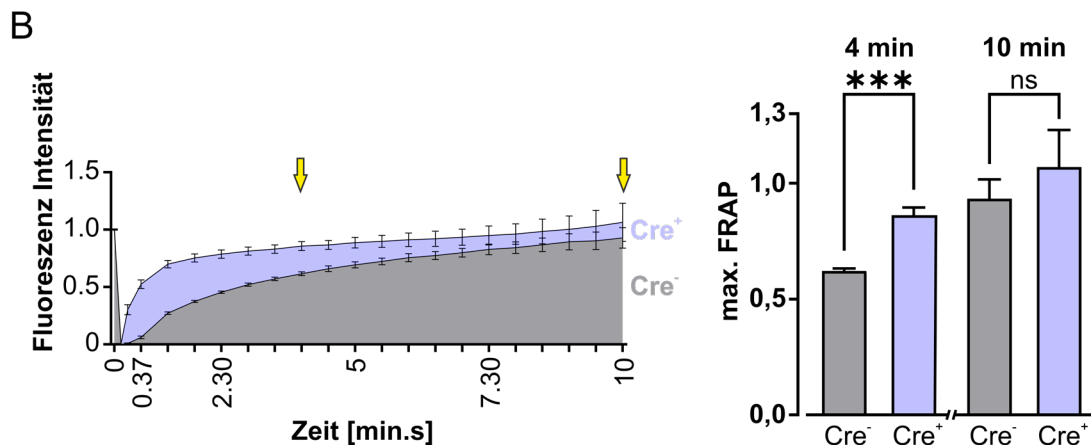
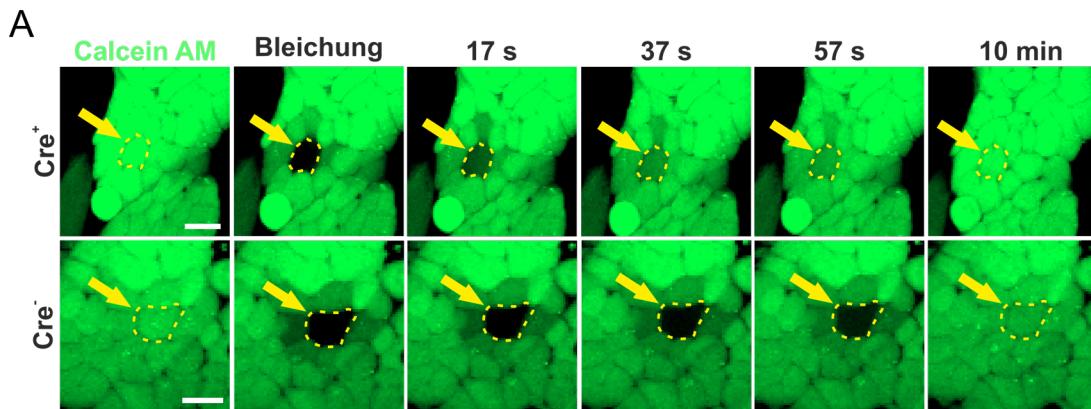


Abbildung 28: Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)-Experimente zeigen die Ausbildung funktioneller GJs in stabil transfizierten Cx43-überexprimierenden G4 ES-Zellen.

A: Fluoreszenzaufnahmen Cre⁺ und Cre⁻ transgener G4 ES-Zellen (K31) nach Calcein AM-Beladung (0,38 μ M), Photobleichung einer einzelnen G4 ES-Zelle des Zellclusters (die gebleichte Zelle ist mit einer gelb-gestrichelten Linie umrandet und mit einem gelben Pfeil markiert) und während der Fluoreszenzwiederaufnahme 17 s, 37 s, 57 s und 10 min nach Photobleichung. Calcein AM Farbstoff (grün). Größenbalken = 20 μ m. **B:** Zeitverlauf und Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von Cre⁺ und Cre⁻ transgenen G4 ES-Zellen (K31; n = 5) nach 4- und 10 min. Die Quantifizierungszeitpunkte sind mit einem gelben Pfeil markiert. Photobleichung für 5 s mit einem 56 nm Laser mit einer Intensität von 2,5 mW. Alle Werte sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Zweiseitiger ungepaarter t-Test; n = 5; ***p \leq 0,001, nicht signifikant unterschiedlich: p > 0,05.

4.2 Generierung transgener Mauslinien, die das murine Connexin 43 und das Fluoreszenzreporterprotein mCherry Cre-induzierbar überexprimieren

Die Erzeugung genetisch modifizierter Mauslinien erfolgte durch den transgenen Service der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn mittels Blastozysteninjektion muriner transgener embryonaler Stammzellen. Die erzeugten chimären Mäuse wurden auf Keimbahngängigkeit und Induzierbarkeit des Transgens überprüft. Das Einkreuzen bestimmter Tamoxifen-induzierbarer MCM-Mauslinien ermöglichte eine zellspezifische und zeitlich kontrollierte Überexpression von Cx43.

4.2.1 Blastozysteninjektion transgener CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry G4-Mausstammzellen

Zur Generierung chimärer Mäuse wurden CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry transgene G4 ES-Zellen der beiden Klone: 29 und 31 in die Blastozysten von CD1-WT-Mäusen injiziert (siehe Kapitel 4.1). Die Blastozysteninjektionen waren erfolgreich und brachten jeweils einige Männchen mit einem hohen Grad an Chimärismus hervor (Tabelle 34). Die Rückkreuzung dieser chimären Männchen mit CD1-WT-Weibchen bestätigte die Keimbahngängigkeit des Transgens sowohl anhand der Fellfarbe (Abbildung 29) der Nachkommen, als auch durch transgen-positive Genotypisierungsergebnisse (nicht gezeigt). Somit wurden zwei neue $Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF}$ -Mauslinien (K29 und K31) zur Cre-induzierbaren Überexpression von Cx43 und mCherry generiert.

Tabelle 34: Männliche Chimären nach Blastozysteninjektion.

G4 ES-Klon	Anzahl männlicher Chimären	Chimärismus
29	9	2x 100 %, 1x 90 %, 2x 85 %, 1x 80 %, 1x 50 %, 2x 40 %
31	5	3x 100 %; 1x 95 %; 1x 90 %



Abbildung 29: Nachweis der Keimbahngängigkeit des Transgens mittels Fellfarbe.

Nachkommen der F1 Generation chimärer Männchen und CD1-WT-Weibchen wiesen eine schwarze (K29, links) bzw. braune (K31, rechts) Fellfarbe auf. Diese Fellfarben belegten die Keimbahngängigkeit des Transgens beider Foundermauslinien, die aus den genetisch modifizierten G4 ES-Zellen der Klone 29 und 31 hervorgegangen waren.

4.2.2 AAV-Cre2.1-Transduktion neonataler Kardiomyozyten der $Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF}$ -Mauslinien

In Kapitel 4.1 konnte bereits die Induzierbarkeit transgener CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-Zelllinien mittels AAV-Cre-Transduktion gezeigt werden. Im Anschluss daran wurde nun die Induzierbarkeit von exogenem Cx43 und mCherry in den

beiden Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF}-Mauslinien (K29 und K31) zunächst *in vitro* untersucht. Dazu wurden primäre KMs aus neonatalen Mausherzen (P2) beider Mauslinien isoliert (siehe Kapitel 3.2.3) und zwei Tage später mit AAV2.1-Cre Virus transduziert. Eine Cre-induzierte Transgenexpression konnte bei beiden Mauslinien zwei Tage nach der Transduktion anhand der mCherry-Fluoreszenz der Cre⁺ NNKMs und mittels Immunfluoreszenzfärbungen des P2A-markierten Cx43 nachgewiesen werden. Exemplarisch wird hier K31 gezeigt, die Untersuchung von K29 erzielte identische Ergebnisse (Abbildung 30). Cre⁻ NNKMs zeigten hingegen weder eine mCherry- noch eine P2A-Expression, sie exprimierten ausschließlich endogenes Cx43. Ebenso wie das endogene Cx43, war das exogene, P2A-markierte Cx43 in Cre⁺ Zellen sowohl in der Membran als auch im Zytoplasma lokalisiert. Die Transduktionseffizienz des AAV2.1-Cre Virus lag zwischen 56 % (K31) und 77 % (K29) (Abbildung 31A). Die Überexpression von Cx43 sowie die Expression von P2A-markiertem exogenem Cx43 wurde in Cre⁺ NNKMs mit Hilfe von Western blot-Analysen bestätigt (Abbildung 31B, K31). Auch das Fehlen der mCherry- und P2A-Expression in Cre⁻ NNKMs belegte das Vorliegen eines intakten und nicht durchlässigen Cre-loxP-Systems.

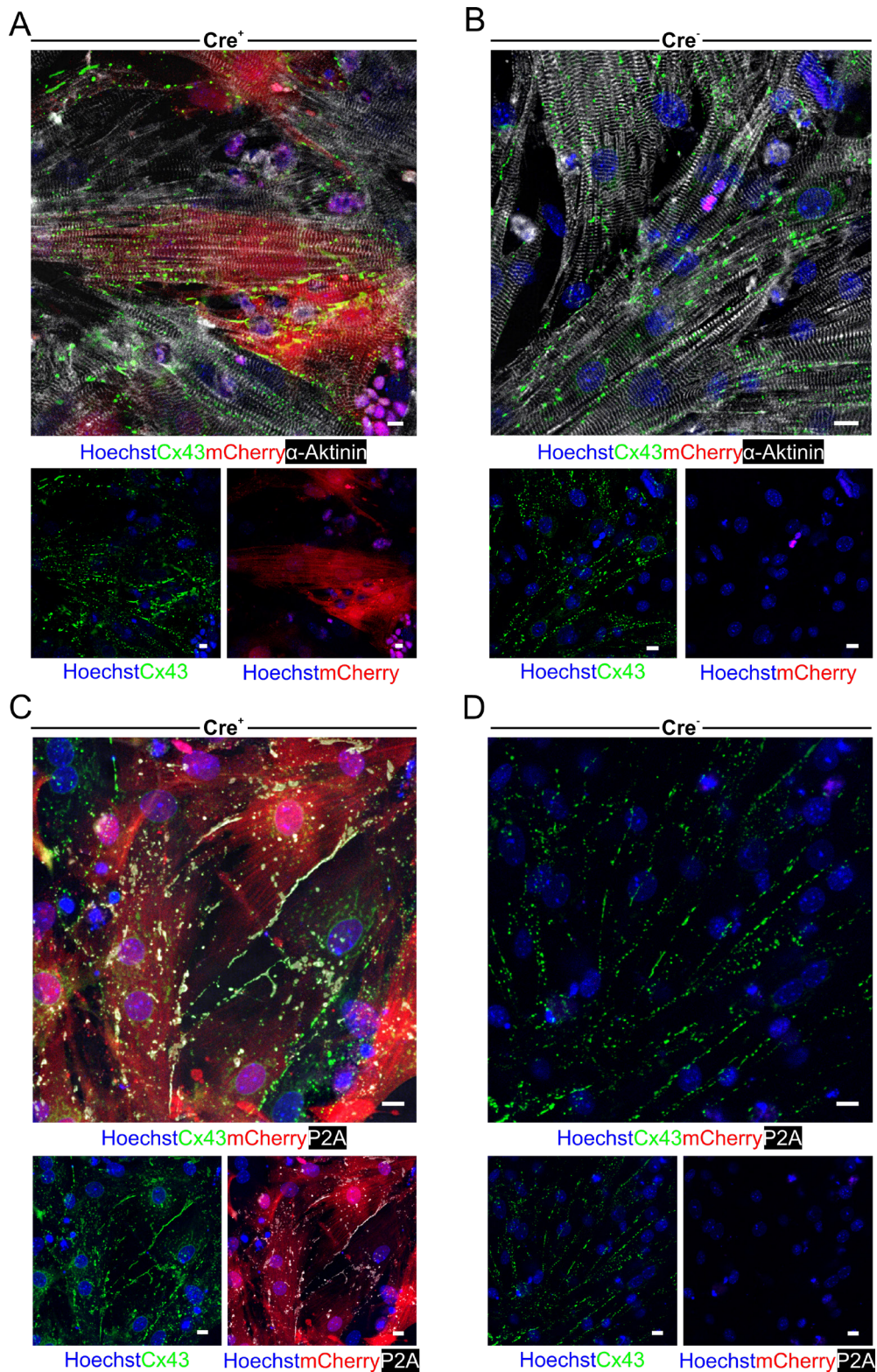


Abbildung 30: Nachweis der Transgenexpression nach AAV2.1-Cre Virus-Transduktion NNKMs der $Gt(ROSA)26Sor^{tm1}(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF$ -Mauslinie (K31) mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen.

NNKMs zwei Tage nach AAV2.1-Cre Virus-Transduktion (A, C) sowie Cre⁻ Kontrollen derselben KM-Isolation (B, D). A, B: Zellkernfärbung (Hoechst, blau), Cx43 (grün), mCherry (rot), α -Aktinin (KM-Marker, weiß). C, D: Zellkernfärbung (Hoechst, blau), Cx43 (grün), mCherry (rot), P2A (weiß). Größenbalken = 10 μ m.

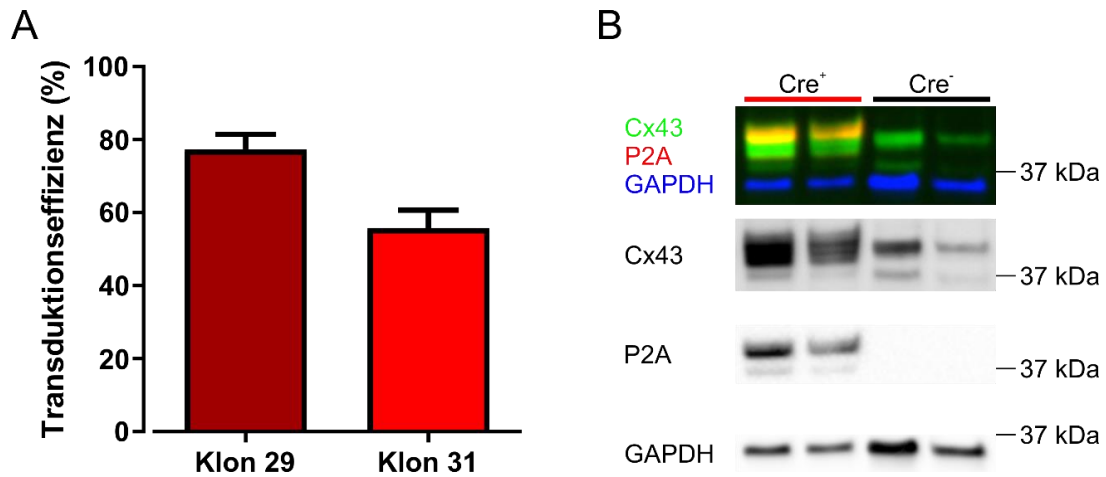


Abbildung 31: Transduktionseffizienz des AAV2.1-Cre Virus und Western blot-Analysen transduzierter NNKMs.

A: Die Transduktionseffizienz des AAV2.1-Cre Virus wurde zwei Tage nach der Transduktion mikroskopisch als das Verhältnis mCherry⁺ Zellen (mCherry⁺/Hoechst⁺ Zellen) zur Gesamtzellzahl (Hoechst⁺ Zellen) bestimmt. Technisches N = 9, biologisches n = 1. Alle Werte sind als Mittelwert + SEM gezeigt. **B:** Western blot AAV2.1-Cre transduzierter (Cre⁺) und Cre⁻ negativer NNKMs (K31) zwei Tage nach Transduktion. Overlay der Cx43- (grün)/P2A- (rot) Protein-Expression und des Housekeepers GAPDH (blau) (obere Spur), sowie Einzelkanäle der drei Proteine (Spur 2-4). Technisches N = 2, biologisches n = 1.

4.2.3 Bestimmung der Kopienzahl der Transgenkassette in den Gt(ROSA)26Sor^{tm1}(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)^{BF}-Mauslinien (K29 und K31)

Die DNAs der G4 ES-Zellen von K29 und K31 enthalten jeweils eine Kopie der Transgenkassette (siehe Kapitel 4.1). Im Folgenden sollte mittels dPCR-Analysen genomischer DNA der beiden Gt(ROSA)26Sor^{tm1}(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)^{BF}-Mauslinien (K29, K31) überprüft werden, ob auch die entstandenen Mauslinien stabil eine Kopie des Transgens enthalten. Zur Bestimmung der Transgen-Kopienzahl wurde zunächst ein mCherry Taqman-Assay verwendet. Mit Hilfe dieses Assays wurden für Cx43-heterozygote Mäuse beider Mauslinien (K29, K31) jeweils eine Kopie des Transgens nachgewiesen. Für WT-Geschwistertiere (K31) wurde keine Kopie bestimmt, für homozygote Mäuse (K31) zwei Kopien (Abbildung 32A). Mit Hilfe eines zweiten Taqman-Assays (Cx43 endo- und exogen-Sonde), der sowohl endogenes als auch exogenes Cx43 detektiert, konnte die Anzahl der Cx43-Kopien ermittelt werden. Die WT-Geschwistertiere (K31) zeigten erwartungsgemäß zwei endogene Cx43-Kopien, heterozygote Mäuse beider Cx43-Überexpressions-Linien (K29, K31) wiesen eine zusätzliche Cx43-Kopie und homozygote Mäuse (K31) wiesen insgesamt vier Cx43-Kopien auf (Abbildung 32B).

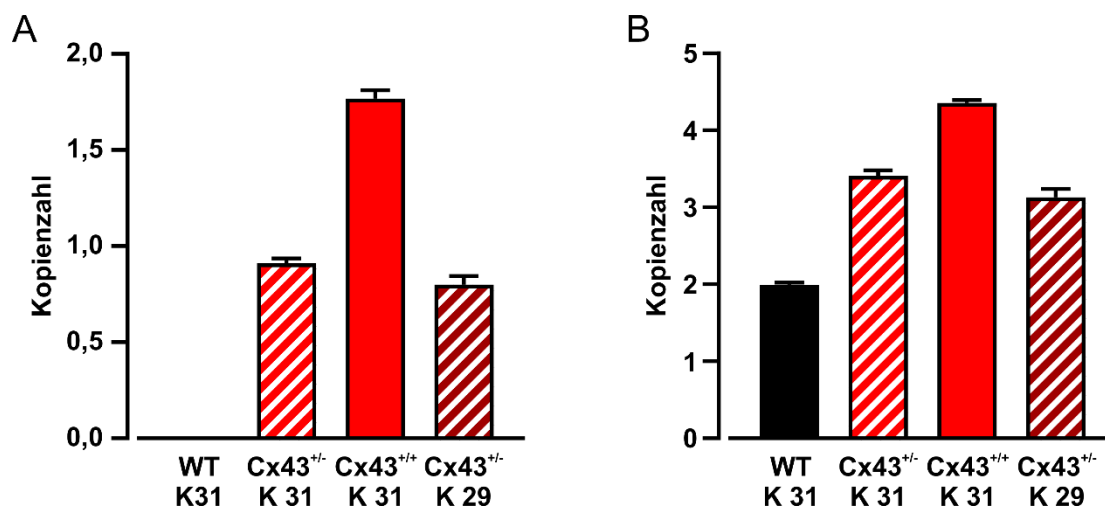


Abbildung 32: Kopienzahlbestimmung des Transgens in DNA Proben von WT-Geschwistertieren, Cx43-heterozygoten- und homozygoten Mäusen der Gt(ROSA)26Sor^{tm1}(CAG-Cx43-P2A-mCherry)^{BF}-Mauslinien.

Bestimmung der Anzahl an mCherry- (A) bzw. Cx43-Kopien (B) mittels dPCR-Analysen. n = 5. Alle Werte sind als Mittelwert + SEM gezeigt.

Die Ergebnisse der AAV2.1-Cre-Transduktion und die der dPCR zeigen, dass zwei gleichermaßen geeignete Cx43-P2A-mCherry-Knockin-Mauslinien (K29, K31) generiert wurden, die heterozygot je eine Kopie der Transgenkassette besitzen. Für alle weiteren Versuche wurde die aus dem G4 ES-Zellklon 31 entstandene Gt(ROSA)26Sor^{tm1}(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)^{BF}-Mauslinie verwendet. Die Cx43-P2A-mCherry-Transgenkassette wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Cx43-Transgen zusammengefasst.

4.2.4 Einkreuzung verschiedener Tamoxifen-induzierbarer MerCreMer-Deleter-Mauslinien

Um die Transgenexpression *in vivo* zu induzieren, wurde die Cx43-Knockin-Mauslinie (Gt(ROSA)26Sor^{tm1}(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)^{BF}, K31) mit zwei verschiedenen Tamoxifen (Tx)-induzierbaren MCM-Mauslinien verpaart, welche eine zellspezifische und zeitlich kontrollierbare Aktivierung der Cx43-Überexpression/mCherry-Expression ermöglichten. Es wurde eine KM- und eine mFB-spezifische MCM-Mauslinie gewählt, um die zellbiologische Bedeutung von Cx43 im gesunden Herzen, sowie sein anti-arrhythmisches Potenzial nach einem Herzinfarkt zu untersuchen. Wie in Kapitel 1.3 beschrieben sterben nach einem Herzinfarkt die von der Ischämie betroffenen KMs ab und es entwickelt sich eine fibrotische Narbe, in der kFBs vorherrschen. Dadurch können in Folge eines Herzinfarktes vermehrt lebensbedrohliche VTs auftreten. Sie sind vor allem in Bereichen mit verzögerter bzw. inhomogener Reizweiterleitung zu beobachten - typischerweise in der BZ oder der

Infarkt Narbe. In der BZ treffen KMs und FBs aufeinander, daher ist es von großem Interesse, die spezifischen Zelltypen und Bereiche der Narbe zu identifizieren, die für den Schutz vor VTs anvisiert werden sollten und Einblicke in die zugrundeliegenden Mechanismen zu gewinnen.

Die α MHC-MCM-Mauslinie ($A1cf^{Tg(Myh6-cre/Esr1^*)1Jmk/J}$) exprimiert, kontrolliert durch den KMs-spezifischen α MHC-Promotor, eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase. Durch Einkreuzen dieser MCM-Mauslinie wurde nach Tamoxifengabe ausschließlich in KMs exogenes Cx43 und mCherry exprimiert (α MHC^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}) (Abbildung 33A).

Die Periostin-MCM-Mauslinie (B6.129S-Postn^{tm2.1(cre/Esr1^*)Jmol/J}) exprimiert eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Periostin-Promotors. Periostin wird vor allem von mFBs infolge eines Gewebeschadens gebildet. Daher kann durch Einkreuzen dieser MCM-Mauslinie und Tamoxifengabe eine mFBs-spezifische Transgenexpression (Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}) induziert werden (Abbildung 33B).

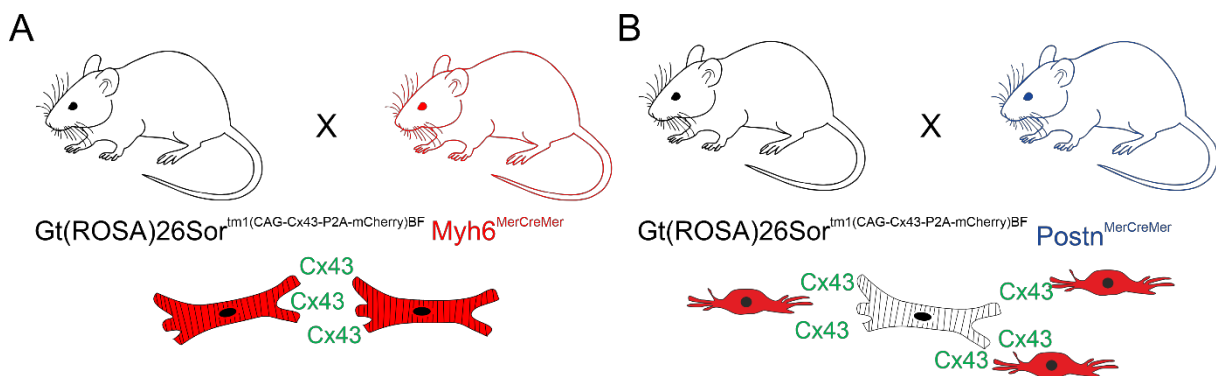


Abbildung 33: Einkreuzung Tamoxifen-induzierbarer MerCreMer-Mauslinien für die gezielte Überexpression von Cx43 in KMs und mFBs.

Um die Cx43-Expression *in vivo* zellspezifisch und zeitlich kontrolliert induzieren zu können, wurde die Cx43-Knockin-Mauslinie (Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF}, K31) mit einer KMs-spezifischen MCM-Mauslinie (A) oder mit einer mFBs-spezifischen MCM-Mauslinie (B) verpaart.

Beide Cx43-Überexpressions-Mauslinien hatten einen Mischhintergrund aus CD1/C57BL/6/129S. Der genetische Hintergrund von Mäusen ist für wissenschaftliche Untersuchungen wichtig, da Mäuse unterschiedlicher genetischer Hintergründe Unterschiede in z.B. Fellfarbe, Metabolismus, Immunfunktion, Fertilität sowie physiologischen Merkmalen aufweisen. Erfahrungswerte unserer Arbeitsgruppe und Befunde in der Literatur zeigen, dass die VT-Auslösbarkeit in elektrophysiologischen Untersuchungen unter anderem von dem Mausstamm abhängig ist (Maguire et al. 2003). Ein CD1-Hintergrund ist für die EPU besonders gut geeignet, während ein C57BL/6-Hintergrund für diese funktionellen Untersuchungen ungeeignet ist. Deshalb wurden beide Mausmodelle auf CD1-Hintergrund zurückgekreuzt

(mindestens 6x), sodass alle weiteren funktionellen und zellbiologischen Untersuchungen auf dem genetischen Hintergrund dieses Auszuchtstammes durchgeführt wurden.

4.3 Cx43-Überexpression in Kardiomyozyten des gesunden Mausherzens

Eine gezielte Überexpression von Cx43, und ihre Auswirkungen auf das gesunde Herz sind im Gegensatz zu Cx43-KO-Modellen bisher wenig erforscht (siehe Kapitel 1.2.2).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine KMs-spezifische homogene Überexpression von Cx43 im gesunden Mausherzen nach Kreuzung der Gt(ROSA)26Sor^{tm1}(CAG-Cx43-P2A-mCherry/loxP)^{BF} (K31)-Mauslinie mit der α MHC-MCM-Mauslinie (*A1cf^{Tg}(Myh6-cre/Esr1*)1Jmk/J*) analysiert. Zunächst wurden verschiedene Parameter (Phänotyp, Körpergewicht, Überlebenswahrscheinlichkeit, hypertrophe Veränderungen des Herzens) zur Beurteilung der Lebensfähigkeit der transgenen Mäuse bestimmt. Zur Induktion der Transgenexpression wurden zehn Wochen alten Mäusen, wie von Bersell et al. (2013) publiziert, an drei aufeinander folgenden Tagen je 30 mg/kg Tamoxifen (0,6 mg Tamoxifen/100 μ l) i.p. injiziert.

4.3.1 Phänotypische Charakterisierung der α MHC^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie

Bei der genetischen Veränderung von Organismen besteht immer ein gewisses Risiko, dass diese zu verschiedenen Abnormalitäten, Krankheiten oder auch einer verringerten Lebenserwartung führen können. Daher wurde das Verhalten der transgenen Mäuse beobachtet und es wurden verschiedene Kenngrößen bezüglich der Lebensfähigkeit der Mäuse bestimmt.

4.3.1.1 Körpergewicht

Vor der Tamoxifen-induzierten Überexpression von Cx43 zeigten Cx43-homo- und -heterozygote Mäuse keine Verhaltensauffälligkeiten oder sichtbaren Krankheitsanzeichen, es kam auch nicht zu plötzlichen Todesfällen. Außerdem unterschied sich ihr Körpergewicht im Alter von zehn Wochen nicht von dem der WT-Geschwistertiere (Gewicht: WT ♂ = 41,47 g \pm 1,87 g; WT ♀ = 29,44 g \pm 1,81 g; Cx43^{+/-} ♂ = 36,43 g \pm 0,48 g; Cx43^{+/-} ♀ = 31,51 g \pm 0,56 g; Cx43^{+/+} ♂ = 36,83 g \pm 4,34 g; Cx43^{+/+} ♀ = 28,19 g \pm 0,95 g) (Abbildung 34).

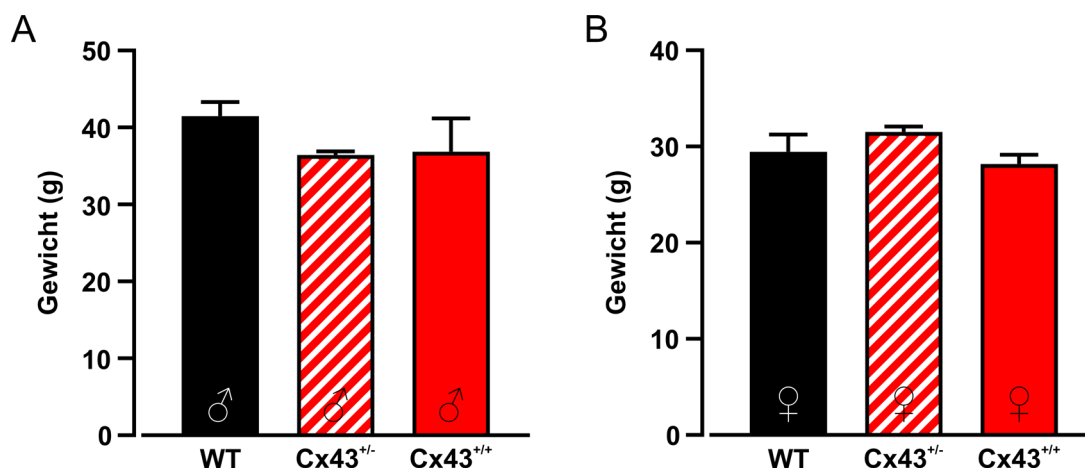


Abbildung 34: Geschlechtsspezifisches Körpergewicht von Mäusen der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie im Alter von 10 Wochen.

Es wurde das Körpergewicht von Cx43-homozygoten, MCM-heterozygoten Mäusen (Cx43^{+/+}) mit dem von Cx43-heterozygoten, MCM-heterozygoten Mäusen (Cx43^{+/-}) und WT-Geschwistertieren (WT, Cx43-negativ, MCM-negativ) verglichen: Separater Vergleich der weiblichen (A) und männlichen (B) Mäuse. Alle Werte sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Einfaktorielle ANOVA; n(WT ♂) = 3; n(WT ♀) = 5; n(Cx43^{+/-} ♂) = 54; n(Cx43^{+/-} ♀) = 58; n(Cx43^{+/+} ♂) = 3; n(Cx43^{+/+} ♀) = 7; nicht signifikant unterschiedlich: $p > 0,05$.

4.3.1.2 Kaplan Meier Überlebenskurve

Auch nach der Überexpression von Cx43 konnte keine Beeinträchtigung der Vitalität der Mäuse beobachtet werden. Dieser Befund spiegelte sich auch in der Überlebenswahrscheinlichkeit der Mäuse nach Transgeninduktion wider. Nur eine von 42 (2,4 %) untersuchten heterozygoten Cx43-überexprimierenden Mäuse verstarb an Tag 7 nach Transgeninduktion (Abbildung 35).

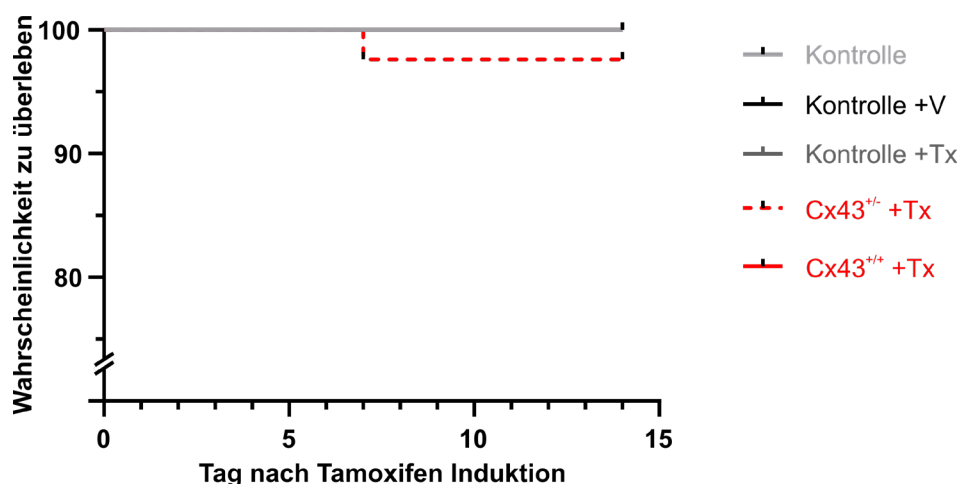


Abbildung 35: Kaplan Meier Überlebenskurve von $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mäusen zwei Wochen nach Tamoxifen-induzierter Transgenexpression.

n(Kontrolltiere) = 22; n(Kontrolltiere Vehikel-behandelt) = 29; n(Kontrolltiere Tamoxifen-behandelt) = 10; n(Cx43^{+/-} Mäuse Tamoxifen-behandelt) = 42; n(Cx43^{+/+} Mäuse Tamoxifen-behandelt) = 7.

4.3.1.3 Berechnung des Quotienten aus Herzgewicht (HW) und Tibiallänge (TL) zur Hypertrophie-Analyse des Herzens

Um auszuschließen, dass als möglicher unerwünschter Effekt einer Cx43-Überexpression die Größe von KMs zunimmt, wurde der Quotient aus Herzgewicht (HW) und Tibiallänge (TL) berechnet, welcher als Indikator für eine Hypertrophie des Herzens dient.

Bei dem Vergleich des HW/TL-Quotienten der Kontrollgruppe ($HW / TL = 0,1014 \pm 0,0033$) mit dem der Cx43-überexprimierenden Mäuse ($HW/TL(Cx43^{+/-} + Tx) = 0,1005 \pm 0,0074$; $HW/TL(Cx43^{+/+} + Tx) = 0,1191 \pm 0,0125$) konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Überexpression von Cx43 in KMs zu keiner Hypertrophie des Herzens führt (Abbildung 36).

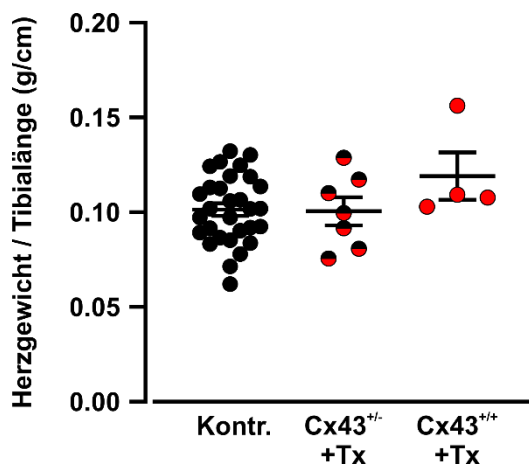


Abbildung 36: Bestimmung des Quotienten von Herzgewicht (HW) und Tibiallänge (TL) von $\alpha MHC^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}$ -Mäusen zwei Wochen nach Transgeninduktion zum Ausschluss einer Hypertrophie des Herzens.

Vergleich des Quotienten von Herzgewicht (HW) und Tibiallänge (TL) der Kontrollgruppe ($n = 30$) mit den beiden Cx43-überexprimierenden Gruppen ($n(Cx43^{+/-} + Tamoxifen) = 7$; $n(Cx43^{+/+} + Tamoxifen) = 4$). Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Einfaktorielle ANOVA, nicht signifikant unterschiedlich: $p > 0,05$.

4.3.2 Charakterisierung der Cx43-Überexpression in Kardiomyozyten zwei Wochen nach Transgeninduktion

Zwei Wochen nach Tamoxifen-Induktion wurde die Cx43-, P2A- und mCherry-Expression in Herzen der $\alpha MHC^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}$ -Mauslinie makroskopisch, immunhistochemisch sowie auf RNA- und Protein-Ebene analysiert. Es wurden Tamoxifen-induzierte Cx43-homozygote, MCM-heterozygote ($Cx43^{+/+} + Tx$) sowie Tamoxifen-induzierte Cx43-heterozygote, MCM-heterozygote ($Cx43^{+/-} + Tx$) Mäuse mit Kontrollmäusen, welche entweder unbehandelt oder Vehikel-injiziert waren (Geschwistertiere mit gemischtem Genotyp) verglichen.

4.3.2.1 Makroskopische Analyse der Transgenexpression

Die Durchlichtaufnahmen transgener Herzen der $\alpha MHC^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}$ -Mauslinie zwei Wochen nach Tamoxifen-Induktion zeigten keine Auffälligkeiten (Abbildung 37, oben). Anhand der mCherry-Fluoreszenz der induzierten-Hezen, konnte die Transgenexpression *in vivo* nachgewiesen werden. Cx43-homozygote Herzen zeigten eine deutlich intensivere mCherry-

Fluoreszenz als Cx43-heterozygote Herzen, während nicht mit Tamoxifen behandelte Cx43-heterozygote Kontrollherzen mCherry⁻ waren. Diese Befunde deuten darauf hin, dass das Cre-loxP-System in dem Mausmodell nicht durchlässig war und kein Cre-Protein unspezifisch in den Kern der KMs gelangt war (Abbildung 37, unten).

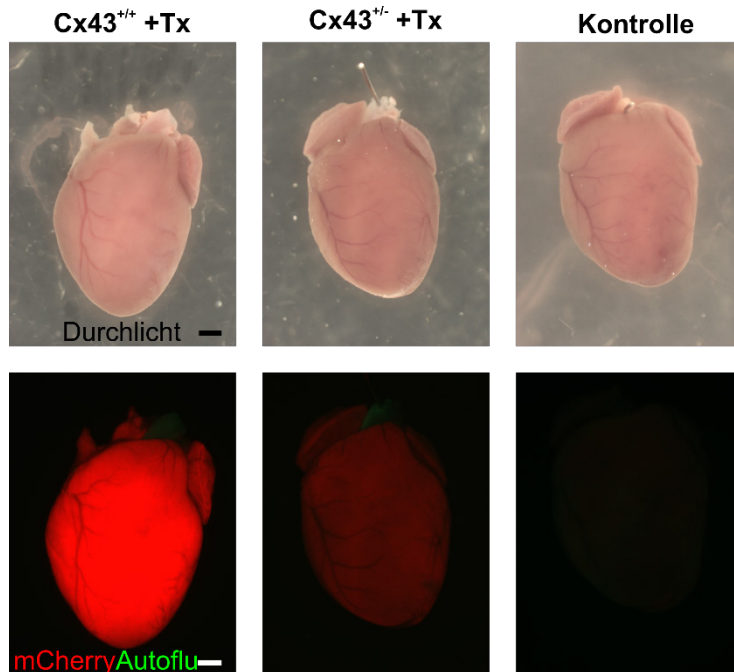


Abbildung 37: Makroskopische Aufnahmen transgener Herzen der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie zwei Wochen nach Tamoxifen-Induktion.

Makroskopische Aufnahmen Tamoxifen-induzierter Cx43-homo- und -heterozygoter- sowie unbehandelter Kontrollherzen; auffallend ist die deutlich unterschiedliche mCherry-Fluoreszenzintensität zwischen Cx43-homozygoten Tamoxifen-induzierten Herzen und Cx43-heterozygoten Tamoxifen-induzierten Herzen. Größenbalken = 1 mm; 7x Vergrößerung; 2 s Belichtungszeit mCherry (43 HE DsRed Filter) und Autofluoreszenz (38 HE GFP Filter).

4.3.2.2 Nachweis der mRNA-Expression des Transgens mittels dPCR-Analysen

Die quantitative Expression der mRNA von Cx43 und mCherry im Ventrikel transgener $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ Herzen wurde zwei Wochen nach Tamoxifen-Induktion mittels dPCR untersucht. Dazu wurden eine mCherry-spezifische Taqman-Sonde, sowie drei verschiedene Taqman-Sonden für die Detektion von Cx43-mRNA eingesetzt. Dies erlaubte es zwischen endogener, exogener und der gesamten Cx43-mRNA zu unterscheiden und somit auch mögliche kompensatorische Effekte zu detektieren (siehe Kapitel 3.1.13).

Sowohl in Cx43-homozygoten, als auch in den Cx43-heterozygoten Tamoxifen-induzierten Herzen war die Menge an Gesamt-Cx43-mRNA signifikant höher als in den unbehandelten Kontrollherzen (rel. gesamt Cx43 Kopienzahl: Kontrolle = $10,1 \pm 0,8$; Cx43^{+/-} + Tx = $34,8 \pm 4,1$; Cx43^{+/+} + Tx = $49,8 \pm 7,4$). In der Cx43-homozygoten Gruppe war der Gesamt-Cx43-Expressionswert tendenziell etwas höher als in der Cx43-heterozygoten Gruppe. Allerdings war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant (Abbildung 38A). In den Tamoxifen-induzierten Cx43-homozygoten Herzen war das endogene Cx43 im Vergleich zu den Kontrollherzen signifikant niedriger exprimiert. Tamoxifen-induzierte Cx43-heterozygote

Herzen zeigten gegenüber der Kontrolle keine signifikant erniedrigte Expression der endogenen Cx43-mRNA (rel. endogene Cx43 Kopienzahl Kontrolle = $10,4 \pm 0,6$; Cx43^{+/-} + Tx = $10,2 \pm 0,7$; Cx43^{+/+} + Tx = $7,7 \pm 0,9$) (Abbildung 38B). Exogenes Cx43 (Abbildung 38C) und mCherry (Abbildung 38D) wurden in beiden Tamoxifen-induzierten Cx43-Gruppen stark exprimiert, während in der Kontrollgruppe hingegen keine oder lediglich einzelne Kopien nachweisbar waren. Ein Vergleich der Kopienzahlen demonstrierte somit eine deutlich signifikant erhöhte Expression von exogener Cx43- und mCherry-mRNA in beiden Cx43-Gruppen gegenüber den Kontrollherzen. Tamoxifen-induzierte, Cx43-homozygote Mäuse exprimierten dabei signifikant mehr exogenes Cx43 und mCherry als Tamoxifen-induzierte Cx43-heterozygote Mäuse (Abbildung 38C; rel. Kopienzahl exogenes Cx43: Kontrolle = $0,6 \pm 0,3$; Cx43^{+/-} + Tx = $25,0 \pm 2,9$; Cx43^{+/+} + Tx = $40,8 \pm 5,6$; Abbildung 38D; rel. Kopienzahl mCherry: Kontrolle = $0,7 \pm 0,4$; Cx43^{+/-} + Tx = $18,1 \pm 2,0$; Cx43^{+/+} + Tx = $29,0 \pm 5,3$). Wie in Abbildung 38 zu sehen, wurde von den Tamoxifen-induzierten Cx43-homozygoten Mäusen etwa 5-mal (40:7,5) so viel exogenes Cx43 wie endogenes Cx43 exprimiert, von den Cx43-heterozygoten Mäusen etwa 2,5-mal (24:10) so viel. Summiert man die Menge an exogenem und endogenem Cx43 für jede der drei Gruppen auf, ergibt sich in etwa die rel. Gesamt-Cx43-Expression (Abbildung 38A, B, C).

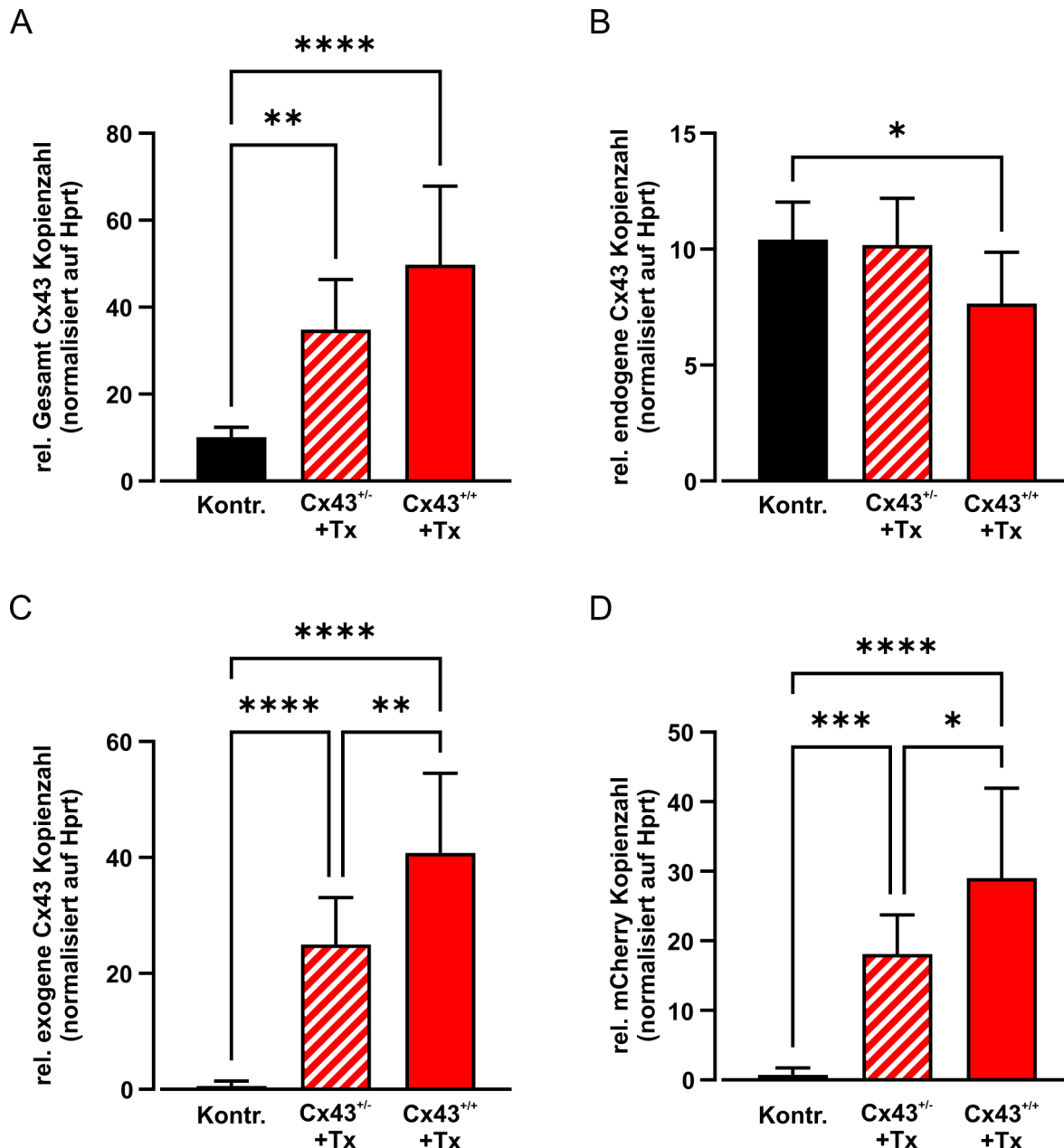


Abbildung 38: Digitale PCR für Cx43 und mCherry von Ventrikelgewebe transgener $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ Herzen zwei Wochen nach Tamoxifen-Induktion.

A: Relative Gesamtkopienzahl von Cx43. **B:** Relative endogene Kopienzahl von Cx43. **C:** Relative exogene Kopienzahl von Cx43. **D:** Relative mCherry-Kopienzahl. Die jeweils ermittelte Kopienzahl wurde auf den Housekeeper Hprt normalisiert. Alle Werte sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Einfaktorielle ANOVA; $n(\text{Kontrolle}) = 8$; $n(\text{Cx43}^{-/-} + \text{Tx}) = 8$; $n(\text{Cx43}^{+/+} + \text{Tx}) = 6$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$; nicht signifikant unterschiedlich: $p > 0,05$.

4.3.2.3 Nachweis der Transgenexpression auf Protein-Ebene durch Western blot-Analysen

Nach den Analysen der mRNA wurde auch das Cx43-Protein analysiert, um zu zeigen, dass neben dem endogenen auch exogenes Protein exprimiert wird. Western blot-Analysen dienten

dabei zur Quantifizierung der Cx43- und mCherry-Expression auf Protein-Ebene. Die Expression des exogenen Cx43 konnte mit Hilfe des C-terminalen P2A-Anhangs von 21 Aminosäuren (siehe Kapitel 4.1) detektiert werden. Zwei Wochen nach Tamoxifen-Induktion wurden Ventrikelsate aus Mausherzen der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Linie gewonnen. Die Cx43-Expression (ca. 40-45 kDa) war in Cx43-homo- und -heterozygoten Tamoxifen-induzierten Herzen im Vergleich zu den nicht induzierten Kontrollherzen stark erhöht. Zwischen den beiden Tamoxifen-induzierten Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied in der exprimierten Cx43-Menge (rel. Cx43-Expression: Kontrolle = $137,0 \pm 24,1$; Cx43^{+/-} + Tx = $412,5 \pm 46,7$; Cx43^{+/+} + Tx = $361,9 \pm 57,1$) (Abbildung 39A, B). Das exogene P2A-markierte Cx43 (ca. 40-45 kDa) sowie das mCherry-Protein wurden ausschließlich in den beiden Tamoxifen-induzierten Gruppen (Cx43^{+/+} + Tx, Cx43^{+/-} + Tx) detektiert (rel. P2A-Expression: Kontrolle = $-1,1 \pm 1,1$; Cx43^{+/-} + Tx = $500,6 \pm 104,4$; Cx43^{+/+} + Tx = $663,1 \pm 228,7$; rel. mCherry-Expression: Kontrolle = $2,4 \pm 0,9$; Cx43^{+/-} + Tx = $63,4 \pm 9,5$; Cx43^{+/+} + Tx = $210,0 \pm 64,7$) (Abbildung 39A, C, D), sodass jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Cx43-überexprimierenden Gruppen (Cx43^{+/+} + Tx, Cx43^{+/-} + Tx) auszumachen war. Diese Befunde zeigten, dass das Cre-loxP-System intakt und nicht durchlässig war. Die mittels semiquantitativer Analyse der Western blots ermittelte signifikant erhöhte mCherry-Expression in den Cx43-homozygoten Tamoxifen-induzierten Herzen im Vergleich zu den Cx43-heterozygoten Tamoxifen-induzierten Herzen (Abbildung 39D) stand im Einklang mit den makroskopischen Analysen, die eine deutlich intensivere mCherry-Fluoreszenz Cx43-homozygoter Herzen im Vergleich zu Cx43-heterozygoten Herzen aufwiesen (siehe Kapitel 4.3.2.1).

Zusammenfassend zeigen die Western blot-Analysen zwei Wochen nach Tamoxifen-Induktion eine klare Überexpression von Cx43-Protein in den Cx43-hetero- und -homozygoten Mausherzen. Ähnlich den mRNA-Ergebnissen (dPCR) war auch auf Protein-Ebene kein signifikanter Unterschied in der Gesamt-Cx43-Expression homo- und heterozygoter Cx43-überexprimierender Mausherzen zu sehen. Interessanterweise wurde aber ebenfalls signifikant mehr mCherry in den Cx43-homozygoten Tamoxifen-induzierten Mäusen exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass die Cx43-Expression im Herzen reguliert ist und nicht unbegrenzt gesteigert werden kann. Das P2A-markierte exogene Cx43 und auch das mCherry-Protein wurden nur nach Tamoxifen-Induktion detektiert. Diese Daten zeigen, dass ein zellspezifisches und zeitlich kontrolliertes funktionelles Cx43-überexprimierendes-Mausmodell generiert wurde.

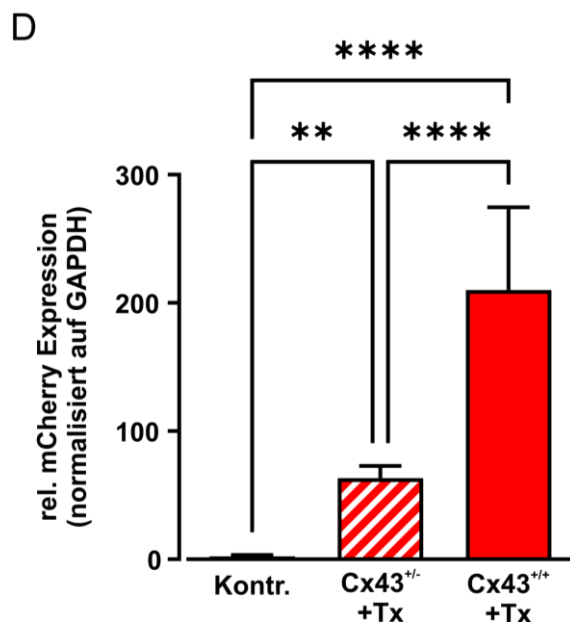
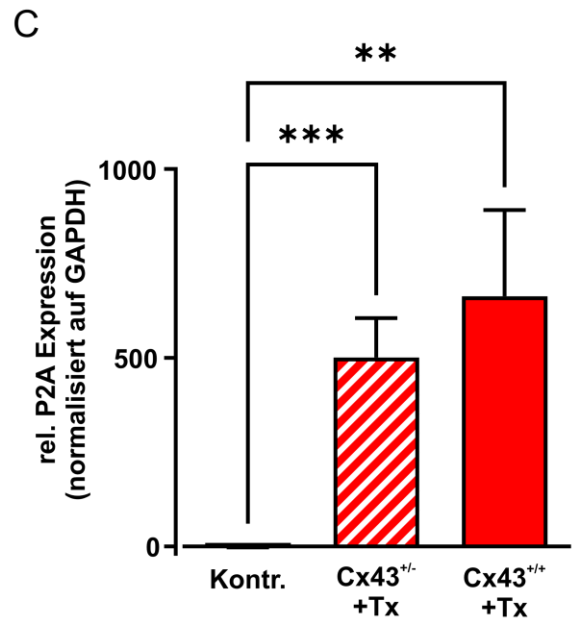
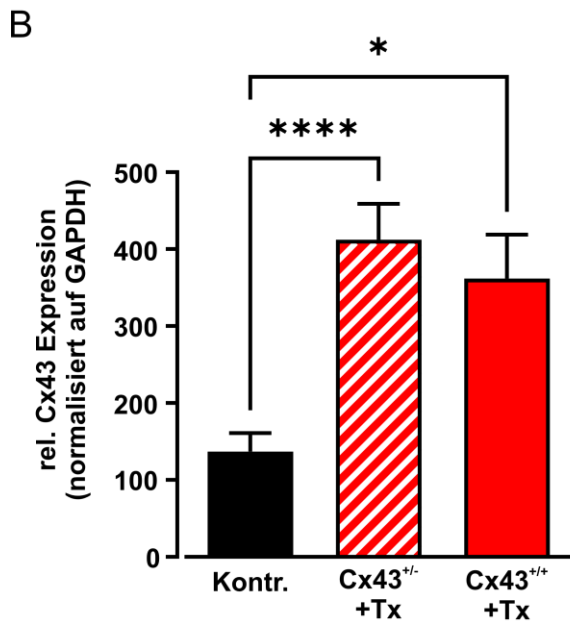
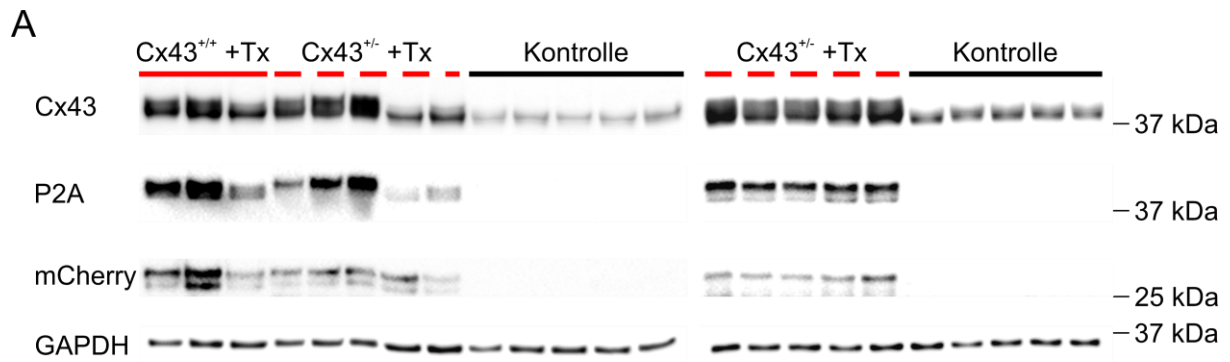


Abbildung 39: Western blots von Ventrikellysaten der α MHC^{CAG}-Cx43-P2A-mCherry₊ Mauslinie zwei Wochen nach Tamoxifen-Induktion.

A: Western blot-Analysen von Cx43-homo- und -heterozygoten Herzen sowie von Kontrollherzen für Cx43 (40-45 kDa), P2A-markiertes Cx43 (40-45 kDa) und mCherry (25-28 kDa). GAPDH (36 kDa) wurde als Housekeeper eingesetzt. **B, C, D:** Quantifizierung der relativen Cx43- (**B**), P2A- (**C**) und mCherry- (**D**) Expression. Die Expressionswerte wurden auf den Housekeeper GAPDH normalisiert. $n(\text{Kontrolle}) = 10$; $n(\text{Cx43}^{+/-} + \text{Tamoxifen}) = 10$; $n(\text{Cx43}^{+/+} + \text{Tamoxifen}) = 3$. Alle Werte sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Einfaktorielle ANOVA; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$; nicht signifikant unterschiedlich: $p > 0,05$.

4.3.2.4 Bestimmung der zellulären Lokalisation des Cx43-Proteins in Kardiomyozyten durch immunhistologische Untersuchungen

Als nächstes wurde das Verteilungsmuster von Cx43 in den transgenen Herzen untersucht, da in der Literatur unter pathologischen Einflüssen, wie z.B. einer Ischämie, die Lateralisierung von Cx43 in KMs beschrieben ist und diese veränderte Lokalisation von Cx43 in Zusammenhang mit dem Auftreten von ventrikulären Arrhythmien gebracht wird (Smith et al. 1991; Dhein und Salameh 2021). Deshalb wurde untersucht, ob bedingt durch eine Cx43-Überexpression Änderungen der typischen Cx43-Lokalisation in den Glanzstreifen hin zu den lateralen Seiten der KM-Membran zu beobachten sind.

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen von Herzquerschnitten, wurde das Verteilungsmuster des gesamt Cx43 sowie des exogenen, P2A-markierten Cx43 zwei Wochen nach Transgen-Induktion untersucht.

Tamoxifen-induzierte Herzen zeigten nach immunhistologischen Färbungen von Herzquerschnitten und konfokaler Mikroskopie eine deutliche Überexpression von Cx43 und mCherry in KMs, die durch die Kofärbung mit dem KM-Marker α -Aktinin identifiziert wurden (Abbildungen 40). Somit konnte die Cx43- und mCherry-(Über-)Expression in dem angestrebten Zelltyp, den KMs, bestätigt werden. In Kontrollherzen war Cx43 fast ausschließlich in den Glanzstreifen und nur in geringem Maße im Zytoplasma zu sehen (Abbildungen 40B, D, 41B, D). In Tamoxifen-induzierten Herzen hingegen war das Verteilungsmuster von Cx43 stark verändert, da das Cx43-Protein nicht nur in den Glanzstreifen der KMs sondern auch in ihrer lateralen Membran sowie in großen Mengen im Zytoplasma zu finden war (Abbildungen 40A, C, 41A, C). Darüber hinaus konnten die zytoplasmatische mCherry-Fluoreszenz sowie die Expression von P2A nur in Tamoxifen-induzierten Herzen detektiert werden (Abbildungen 40, 41). Analysen mit dem konfokalen Mikroskop ergaben, dass das exogene Cx43 in diesen Herzen trotz P2A-Markierung nicht von dem endogenen unterschieden werden konnte. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich vermutlich heteromere Connexone und/oder heterotypische GJs gebildet hatten, wodurch alle Cx43-Signale mit P2A-Signalen überlagerten (Abbildungen 40C).

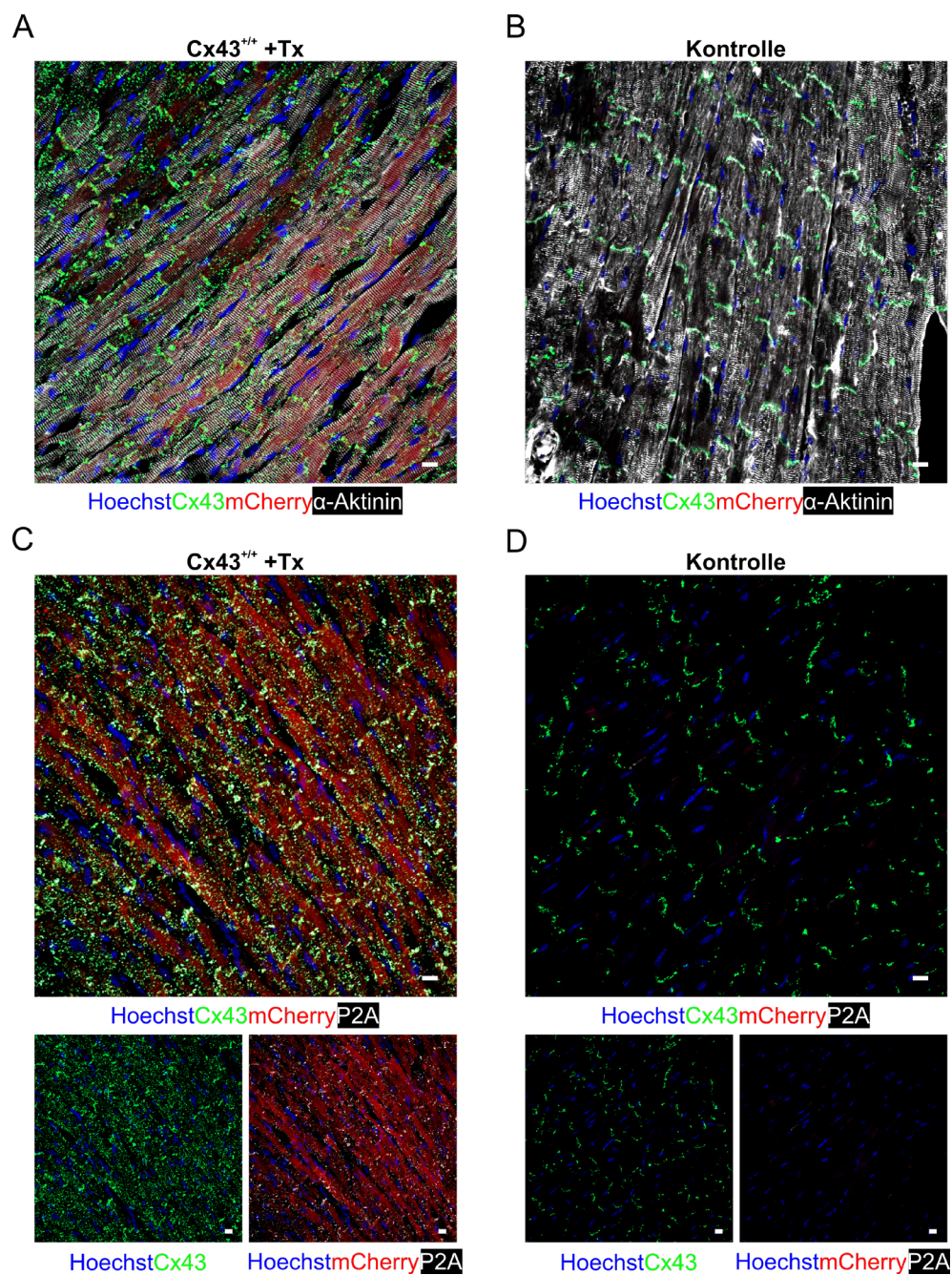


Abbildung 40: Charakterisierung des Verteilungsmusters des endogenen und exogenen Cx43-Proteins in den Herzen der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie zwei Wochen nach Tamoxifen-Induktion mit Hilfe von Immunfärbungen.

A: Deutlich stärkere (Über-)Expression von Cx43 und mCherry nach Tamoxifen-Induktion in α -Aktinin-positiven (α -Aktinin⁺) KMs, auch das Verteilungsmuster von Cx43 war nach der Überexpression verändert, Cx43 wurde neben der typischen Anordnung in den End-zu-End-Kontakten (Glanzstreifen) der KMs auch in ihrer lateralen Membran und in großen Mengen im Zytoplasma detektiert. **C:** (Über-)Expression von Cx43, P2A und mCherry nach Tamoxifen-Induktion. **B, D:** Expression von Cx43, P2A, mCherry und α -Aktinin in Kontrollherzen. **A, B:** Zellkernfärbung (Hoechst, blau), Cx43 (grün), mCherry (rot), α -Aktinin (KM-Marker, weiß); **C, D:** Zellkernfärbung (Hoechst, blau), Cx43 (grün), mCherry (rot), P2A (weiß); 10 μm Kryoschnitte; Größenbalken = 10 μm .

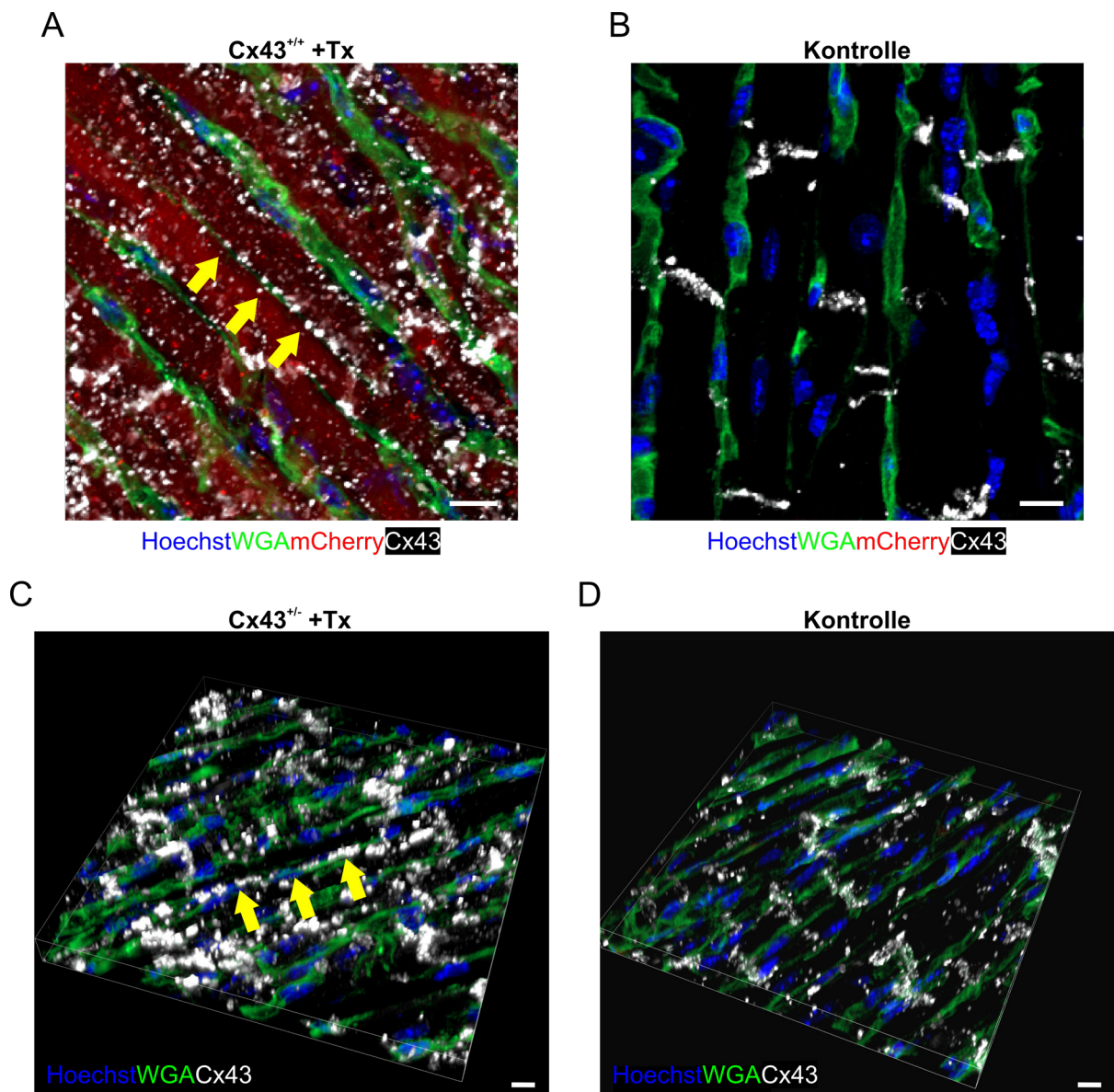


Abbildung 41: Konfokale Aufnahmen Immunfluoreszenz-gefärbter Herzquerschnitte von $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mäusen zeigten zwei Wochen nach Tamoxifen-Induktion in Folge der Cx43-Überexpression eine Lateralisierung des Proteins in der KM-Membran.

Neben der typischen Anordnung von Cx43 in den Glanzstreifen der Zellpole ist auch eine abnormale Lokalisation von Cx43 hin zu den lateralen Membranseiten der KMs zu beobachten (A, C), siehe gelbe Pfeile. Typisches Verteilungsmuster der Cx43-Expression in Kontrollherzen (B, D). Zellkernfärbung (Hoechst, blau), Zellmembranfärbung (Wheat Germ Agglutinin (WGA), grün), mCherry (rot), Cx43 (weiß). 10 μm Kryoschnitte (A, B); 3D-rekonstruierte Z-Stapel (11,2 μm) von 30 μm Kryoschnitten (C, D). Größenbalken = 10 μm .

4.3.3 *In vivo* Analyse der Herzfunktion zwei Wochen nach Transgeninduktion

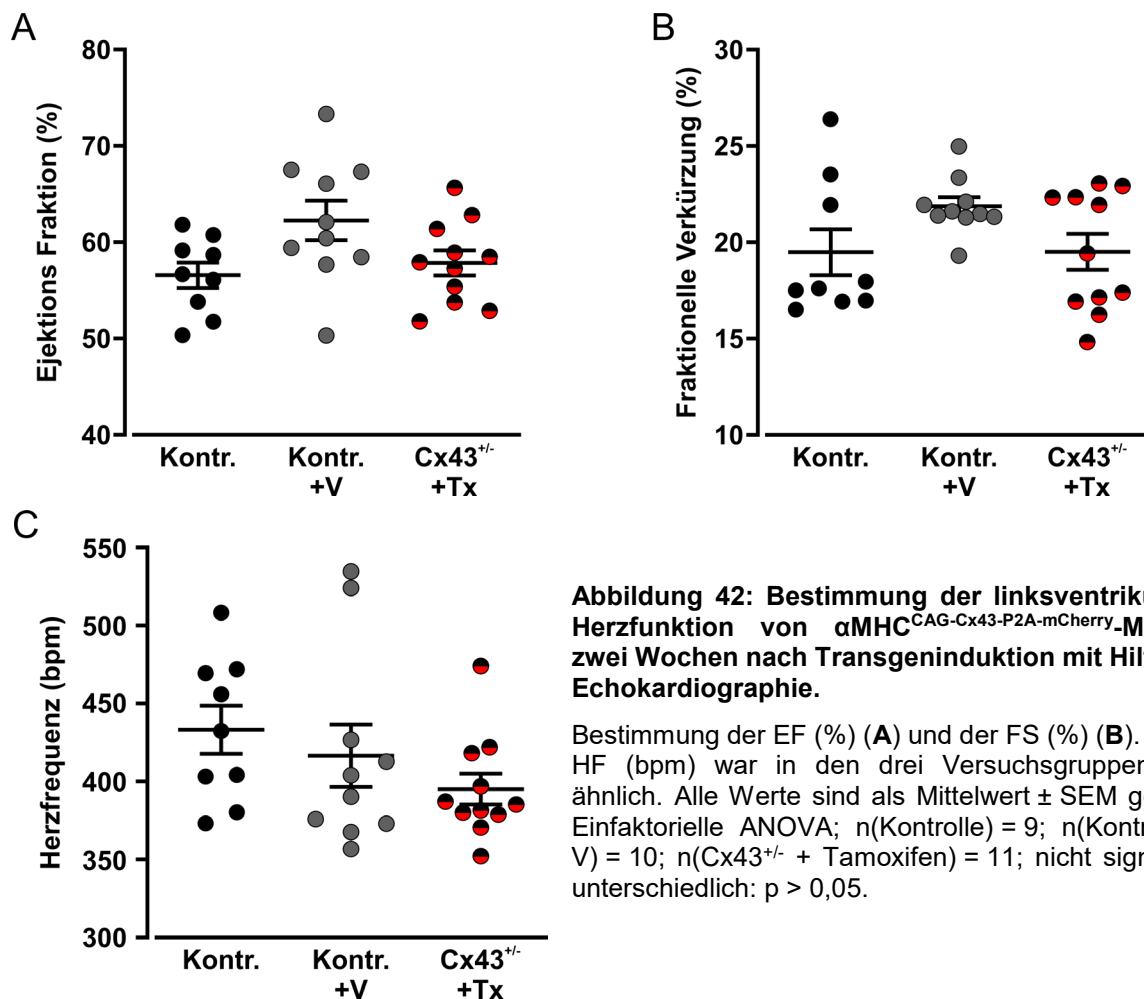
Um die Bedeutung der zellbiologischen Befunde (starke Cx43-Überexpression in KMs, Lateralisierung von Cx43) auf die Herzfunktion zu untersuchen, wurde diese zwei Wochen

nach Versuchsbeginn in den $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mäusen *in vivo* getestet: Die linksventrikuläre Pumpfunktion wurde mittels hochauflösender Echokardiographie untersucht. Die Mäuse wurden zusätzlich auch einer EPU unterzogen, um die Arrhythmie-Empfindlichkeit zu testen. Diese Untersuchung war insbesondere im Kontext der oben beschriebenen Lateralisierung des exogenen Cx43 wichtig (siehe Kapitel 4.3.2.4). Dieses Phänomen ist in der Literatur auch als pathologische Veränderung in Folge einer Herzschädigung (z.B. Ischämie) beschrieben (Smith et al. 1991). Es wird nämlich vermutet, dass durch die Lateralisierung von Cx43 in KMs veränderte Leitungsbahnen entstehen und die Anisotropie (richtungsgebundene Erregungsleitung in Längsrichtung der KMs über Glanzstreifen an den Zellpolen) beeinträchtigt und die Ausbildung von Arrhythmien begünstigt werden kann (Dhein und Salameh 2021). Interessanterweise berichten andere Arbeitsgruppen über eine Lateralisierung von Cx43 nach einem Infarkt. Dies hatte aber keinen Effekt auf die Leitungsgeschwindigkeit, sodass die lateralisierten GJs als funktionslos vermutet wurden (Cabo et al. 2006). Daher sollte in dieser Arbeit geprüft werden, ob die ausgeprägte Lateralisierung von Cx43 nach genetischer Überexpression die elektrische Vulnerabilität erhöht.

4.3.3.1 Echokardiographie

Die linksventrikuläre Pumpfunktion des Mausherzens wurde zwei Wochen nach Versuchsbeginn mittels nicht-invasiver, hochauflösender Echokardiographie unter Isofluran-Narkose untersucht. Als Parameter wurden die Ejektionsfraktion (EF; %) sowie die Fraktionelle Verkürzung (FS, %) bestimmt, welche im B-Mode (PSLAX) aufgenommen und ausgewertet wurden. Neben diesen Parametern wurde auch die HF (bpm) der Versuchstiere engmaschig kontrolliert, um die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Gruppen zu gewährleisten. Die EF, die FS und auch die HF waren weder innerhalb der beiden Kontrollgruppen (Kontrolle (EF = 56,6 % \pm 1,3 %; FS = 19,5 % \pm 1,2 %; HF = 433 bpm \pm 15 bpm), Kontrolle + Vehikel (EF = 62,3 % \pm 2,1 %; FS = 21,9 % \pm 0,5 %; HF = 417 bpm \pm 20 bpm)) noch bei dem Vergleich der Kontrollgruppen mit den heterozygoten Cx43-überexprimierenden Mäusen (Cx43^{+/-} + Tx (EF = 57,8 % \pm 1,3 %; FS = 19,5 % \pm 0,9 %; HF = 395 bpm \pm 10 bpm)) signifikant unterschiedlich (Abbildung 42).

Diese Daten zeigen, dass die KMs-spezifische Überexpression von Cx43 im gesunden Mausherzen keine Auswirkungen auf die linksventrikuläre Pumpfunktion hat.



4.3.3.2 Elektrophysiologische Untersuchungen *in vivo* (EPU)

Wie zu Beginn von Kapitel 4.3.3 erläutert, wurde eine durch die Lateralisierung von Cx43 möglicherweise erhöhte elektrische Vulnerabilität der Mäuse *in vivo* in einer invasiven EPU unter Isofluran-Narkose getestet. Dazu wurden die Mäuse über einen in den rechten Ventrikel vorgeschobenen Katheter mit einem Burst-Protokoll stimuliert (5 V, 1 & 2 mA siehe Kapitel 3.2.6.2). Das Auftreten von mindestens vier aufeinander folgenden Extrasystolen nach der elektrischen Stimulation wurde als VT definiert. Trat mindestens eine VT während der gesamten Burst-Stimulation auf, wurde die Maus als 100 % auslösbar gewertet. Trat keine VT während der Burst-Stimulation auf, wurde der Maus eine VT-Inzidenz von 0 % zugewiesen.

Bei dem Vergleich der Vehikel-behandelten Kontrollgruppe mit den Tamoxifen-behandelten, Cx43-überexprimierenden Mäusen war kein signifikanter Unterschied in der VT-Inzidenz festzustellen (Abbildung 43) (Kontrolle + V = 45,0 %; Cx43^{+/-} + Tx = 33,3 %).

Folglich hatte eine KMs-spezifische Überexpression von Cx43 im gesunden Mauserzen keine Auswirkungen auf die Arrhythmie-Inzidenz nach Burst-Stimulation.

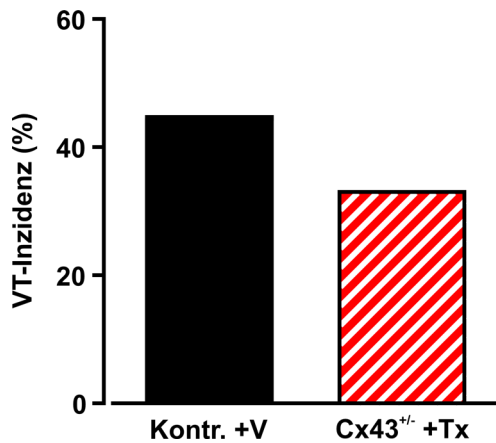


Abbildung 43: Untersuchung der elektrischen Vulnerabilität mittels EPU von $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ Mäusen zwei Wochen nach Transgeninduktion.

VT-Inzidenz (%) während einer Burst-Stimulation (5 V, 1 & 2 mA). Exakter Fisher Test; $n(\text{Kontrolle} + \text{V}) = 20$; $n(\text{Cx43}^{+/-} + \text{Tx}) = 12$; nicht signifikant unterschiedlich: $p > 0,05$. Die EPUs wurden von Miriam Schiffer (Herzchirurgische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Bonn; Institut für Physiologie I, Universität Bonn) und Esther Carls (Herzchirurgische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt.

4.4 Cx43-Überexpression in Kardiomyozyten des Herzens zwei Wochen nach Kryoinfarkt

Nachdem die Effekte einer KMs-spezifischen Cx43-Überexpression im gesunden Herzen untersucht worden waren (siehe Kapitel 4.3), sollten im Anschluss auch die zellbiologischen und funktionellen Auswirkungen der KMs-spezifischen Cx43-Überexpression nach Herzinfarkt analysiert werden, um Hinweise auf potenzielle protektive Effekte einer erhöhten Kopplung von BZ-KMs und KMs des gesunden Myokards zu erforschen. Dazu wurden zehn Wochen alte Mäuse der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie mit einem in Stickstoff-gekühlten Kupferstempel linksventrikulär infarziert (siehe Kapitel 3.2.4). Zur Transgeninduktion wurde ihnen am Tag der Infarkt-OP sowie an den zwei darauffolgenden Tagen je 30 mg/kg Tamoxifen (0,6 mg Tamoxifen/100 μl) i.p. injiziert (Bersell et al. 2013). Zunächst wurden verschiedene Parameter (Phänotyp, Überlebenswahrscheinlichkeit, hypertrophe Veränderungen des Herzens) zur Beurteilung der Lebensfähigkeit der transgenen Mäuse bestimmt.

4.4.1 Phänotypische Charakterisierung der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Transgeninduktion

Nachdem unter einer Überexpression von Cx43 im gesunden Mauserz (siehe Kapitel 4.3.1) keine Verhaltensauffälligkeiten und keine Einschränkung in der Vitalität gesunder transgener Mäuse beobachtet worden waren, wurden als nächstes verschiedene Kenngrößen für die Lebensfähigkeit Kryo-infarzierter Cx43-überexprimierender Mäuse bestimmt.

4.4.1.1 Kaplan Meier Überlebenskurve

Um potenzielle negative Einflüsse einer KMs-spezifischen Überexpression von Cx43 nach Herzinfarkt auf die Vitalität der Mäuse zu untersuchen, wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit der Mäuse zwei Wochen nach OP analysiert.

Die Sterblichkeit der Kryo-infarzierten Vehikel-behandelten- und der Kryo-infarzierten Cx43-heterozygoten Tamoxifen-behandelten Gruppe war im Vergleich zur Sham („Schein-operiert“)-operierten Gruppe (Sham + Vehikel) erhöht. Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Kryo-infarzierten Cx43-homozygoten Tamoxifen-induzierten Mäuse war auf Sham-Niveau. Es gab keinen Unterschied in der Sterblichkeit zwischen der Kryo-infarzierten Vehikel-behandelten- und der Kryo-infarzierten Cx43-heterozygoten Tamoxifen-behandelten Gruppe (Sterblichkeit: Sham +V = 15,4 %; Kryo +V = 32,4 %; Kryo Cx43^{+/-} + Tx = 29,1 %; Kryo Cx43^{+/+} + Tx = 14,3 %). Generell starben die Mäuse in der Regel ab Tag 6 post-MI, was darauf hinweist, dass die Mäuse nicht unmittelbar durch die OP verstarben, sondern auf Grund von Herzinfarktfolgen wie Herzinsuffizienz oder das Auftreten von Arrhythmien (Abbildung 44).

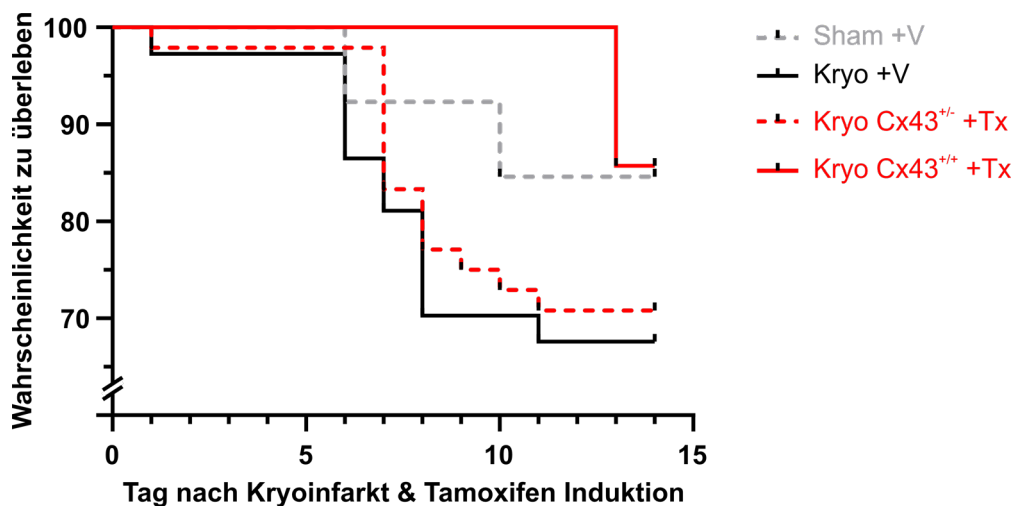


Abbildung 44: Kaplan Meier Überlebenskurve von $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mäusen zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.

$n(\text{Sham} + \text{Vehikel}) = 13$; $n(\text{Kryo} + \text{Vehikel}) = 37$; $n(\text{Kryo Cx43}^{+/-} + \text{Tamoxifen}) = 48$; $n(\text{Kryo Cx43}^{+/+} + \text{Tamoxifen}) = 7$.

4.4.1.2 Berechnung des Quotienten aus Herzgewicht (HW) und Tibiallänge (TL) zur Hypertrophie-Analyse des Herzens

Durch das Postinfarkt-Remodeling kommt es wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben zur Dilatation und Ausdünnung des Gewebes im Bereich des Infarktes. Dies hat eine Erhöhung der systolischen Wandspannung und des linksventrikulären Volumens zur Folge, wodurch es zur kompensatorischen Hypertrophie der überlebenden KMs und damit zur Abnahme der

Pumpfunktion kommt. Um auszuschließen, dass als möglicher unerwünschter Effekt einer Cx43-Überexpression in KMs ihre Zellgröße nach Infarkt übermäßig zunimmt, wurde der Quotienten aus Herzgewicht (HW) und Tibiallänge (TL) berechnet, da er als Indikator für die Bestimmung der Hypertrophie des Herzens nach Infarkt etabliert ist.

Bei dem Vergleich der Vehikel-behandelten Sham-Gruppe (HW/TL = 0,09939 g/cm ± 0,004093 g/cm) mit der Vehikel-behandelten Kryo-Kontrollgruppe (HW/TL = 0,1214 g/cm ± 0,003460 g/cm) wurde eine Hypertrophie des Herzens in den Kryo-Kontrollmäusen festgestellt. Die Cx43-überexprimierenden Kryo-infarzierten Mäuse (HW/TL(Kryo Cx43^{+/-} + Tamoxifen) = 0,1164 g/cm ± 0,003272 g/cm; HW/TL(Kryo Cx43^{+/+} + Tamoxifen) = 0,1181 g/cm ± 0,003305 g/cm) zeigten im Vergleich zur Sham- und Kryo-Kontrollgruppe kein statistisch signifikant unterschiedliches Verhältnis von Herzgewicht zu Tibiallänge, der Quotient war aber tendenziell erhöht im Vergleich zur Sham-Gruppe (Abbildung 45).

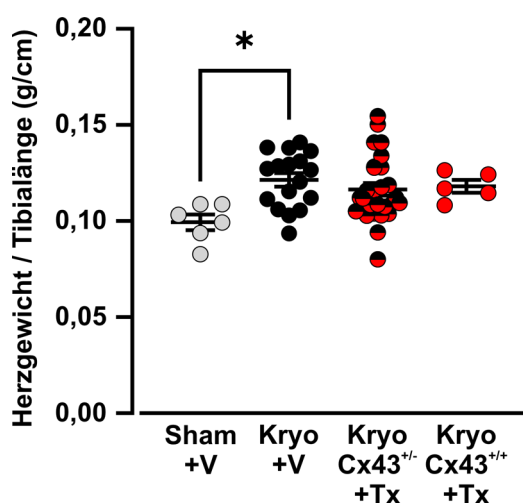


Abbildung 45: Bestimmung des Quotienten von Herzgewicht (HW) und Tibiallänge (TL) von α MHC^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mäusen zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Transgeninduktion als Indikator für die kompensatorische Hypertrophie des Herzens nach Infarkt.

Vergleich des Quotienten von HW und TL von Vehikel-behandelten Sham-Mäusen, Kryo-Kontrollmäusen (Kryo + Vehikel) und den beiden Kryo-infarzierten Cx43-überexprimierenden Gruppen (Kryo Cx43^{+/-} + Tamoxifen, Kryo Cx43^{+/+} + Tamoxifen). Alle Werte sind als Mittelwert ± SEM gezeigt. Einfaktorielle ANOVA; n(Sham + Vehikel) = 6; n(Kryo + Vehikel) = 17; n(Kryo Cx43^{+/-} + Tx) = 27; n(Kryo Cx43^{+/+} + Tx) = 5; * p ≤ 0,05; nicht signifikant unterschiedlich: p > 0,05.

4.4.2 Charakterisierung der Cx43-Überexpression in Kardiomyozyten zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Transgeninduktion

Die Cx43-, P2A- und mCherry-Expression im Herzen der KMs-spezifischen Cx43-Überexpressions-Mauslinie (α MHC^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}) wurde zwei Wochen nach linksventrikulärem Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion makroskopisch und mikroskopisch untersucht. Außerdem wurde die linksventrikuläre Pumpfunktion der Mäuse *in vivo* mittels Echokardiographie getestet. Es wurden infarzierte, Tamoxifen-induzierte, Cx43-homozygote, MCM-heterozygote (Cx43^{+/+} + Tx) sowie infarzierte, Tamoxifen-induzierte, Cx43-heterozygote, MCM-heterozygote (Cx43^{+/-} + Tx) Mäuse mit infarzierten- als auch mit Sham-behandelten

Kontrollmäusen, welche mit Vehikel injiziert worden waren (Geschwistertiere mit gemischtem Genotyp), verglichen.

4.4.2.1 Makroskopische Analyse der Transgenexpression

Mit Hilfe des mCherry-Proteins als Fluoreszenzreporter konnte die Transgenexpression *in vivo* bereits makroskopisch untersucht werden und so einen ersten Hinweis auf das Überleben von mCherry⁺ KMs im Bereich der Herzinfarkt Narbe liefern.

Makroskopische Aufnahmen der Herzen zeigten, dass in Herzen transgener $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mäuse zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion die mCherry-Fluoreszenz und somit die Cx43-Überexpression auf den Bereich des gesunden Ventrikels und den Übergang zur Herzinfarkt Narbe (BZ) begrenzt war, in der Narbe waren keine intakten mCherry-exprimierenden KMs zu finden. Die Herzen unbehandelter Kontrolltiere waren mCherry-negativ (mCherry⁻) (Abbildung 46).

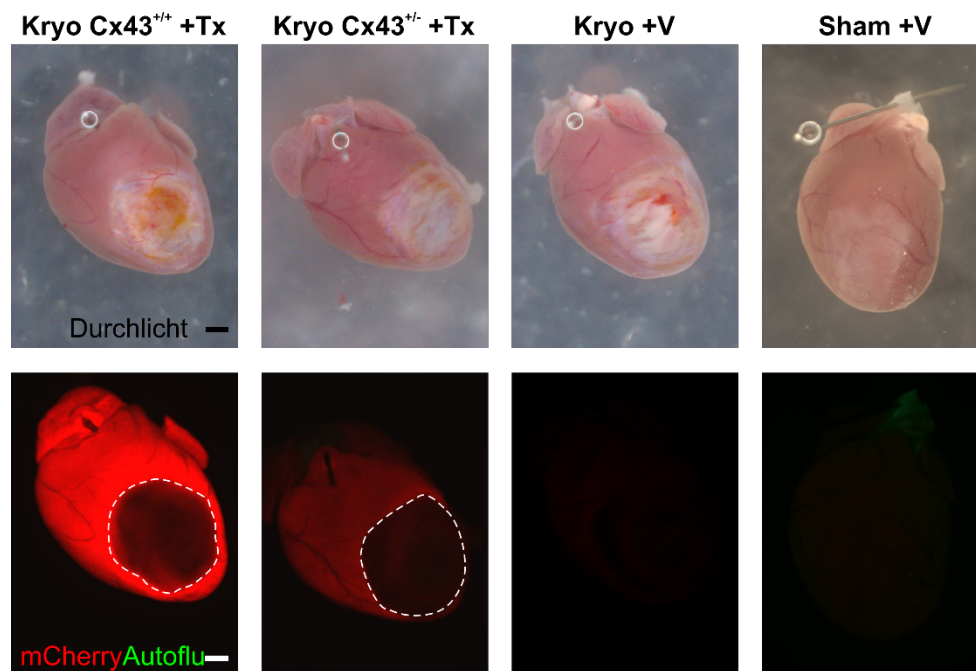


Abbildung 46: Makroskopische Aufnahmen transgener Herzen der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.

Makroskopische Aufnahmen Cx43-homo- und -heterozygoter, Tamoxifen-induzierter- sowie Vehikel-behandelter Kryo-Kontroll- und Sham-Hezen. Die Infarkt Narbe ist durch die weiß-gestrichelte Linie markiert. Größenbalken = 1 mm; 7x Vergrößerung; 2 s Belichtungszeit mCherry (43 HE DsRed Filter) und Autofluoreszenz (38 HE GFP Filter).

4.4.2.2 Mikroskopische Untersuchung der Transgenexpression in Immunfluoreszenz-gefärbten Herzquerschnitten

Zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Transgen-Induktion im Herzen wurde die Expression von Cx43, P2A und mCherry durch Immunfluoreszenzfärbungen von Herzquerschnitten untersucht, um die Expression und zelluläre Lokalisation von Cx43 in den BZ-KMs genauer zu analysieren. Die BZ ist ein besonderer Bereich, hier sind intakte KMs umgeben von fibrotischen, (m)FBs-reichen Strukturen (Janse et al. 1979; Rutherford et al. 2012). Diese heterogene Struktur der BZ führt dazu, dass sich BZ-KMs strukturell von denen des ungeschädigten Myokards unterscheiden (Amoni et al. 2021; Ashikaga et al. 2005; Frisk et al. 2016). Es kommt in diesem Bereich auch zu einer reduzierten Weiterleitungsgeschwindigkeit elektrischer Impulse, dies erklärt auch, dass im Bereich der BZ häufig VTs entstehen (Bakker et al. 1988; Dillon et al. 1988; Ursell et al. 1985; Yao et al. 2003) (siehe Kapitel 1.3.2).

Tamoxifen-induzierte Herzen zeigten eine deutliche Überexpression von Cx43 und mCherry in KMs der BZ. Das Expressionsmuster beider Proteine entsprach dem der nicht-infarzierten Tiere (Abbildung 47; vgl. im ungeschädigten Herzen Abbildung 40). Im Narbenbereich wurde weder bei den Tamoxifen-induzierten noch bei den Kontrollherzen mCherry oder P2A detektiert. Auch die KMs-charakteristische Querstreifung in der α -Aktinin Färbung wurde in Zellen der Narbe beider Vergleichsgruppen nicht beobachtet, da die KMs in diesem Bereich in Folge des Kryoinfarktes komplett abgestorben waren. Sowohl in der heterozygoten Cx43-überexprimierenden Gruppe als auch in der Kontrollgruppe war eine, im Vergleich zum gesunden Gewebe bzw. BZ-Bereich, sehr viel geringere und diffusere Expression von Cx43 im Bereich der Narbe zu beobachten (Abbildung 47; Daten zum Narbenbereich der Kryo-Kontrollgruppe werden nicht gezeigt; vgl. im ungeschädigten Herzen Abbildung 40). Es ist zu vermuten, dass das Cx43 aufgrund der Zellform von FBs stammt. Dies ist außerdem wahrscheinlich, da sie der vorherrschende Zelltyp der Herzinfarktnarbe sind und geringe Mengen an Cx43 exprimieren (siehe Kapitel 1.1.3; 1.2.2).

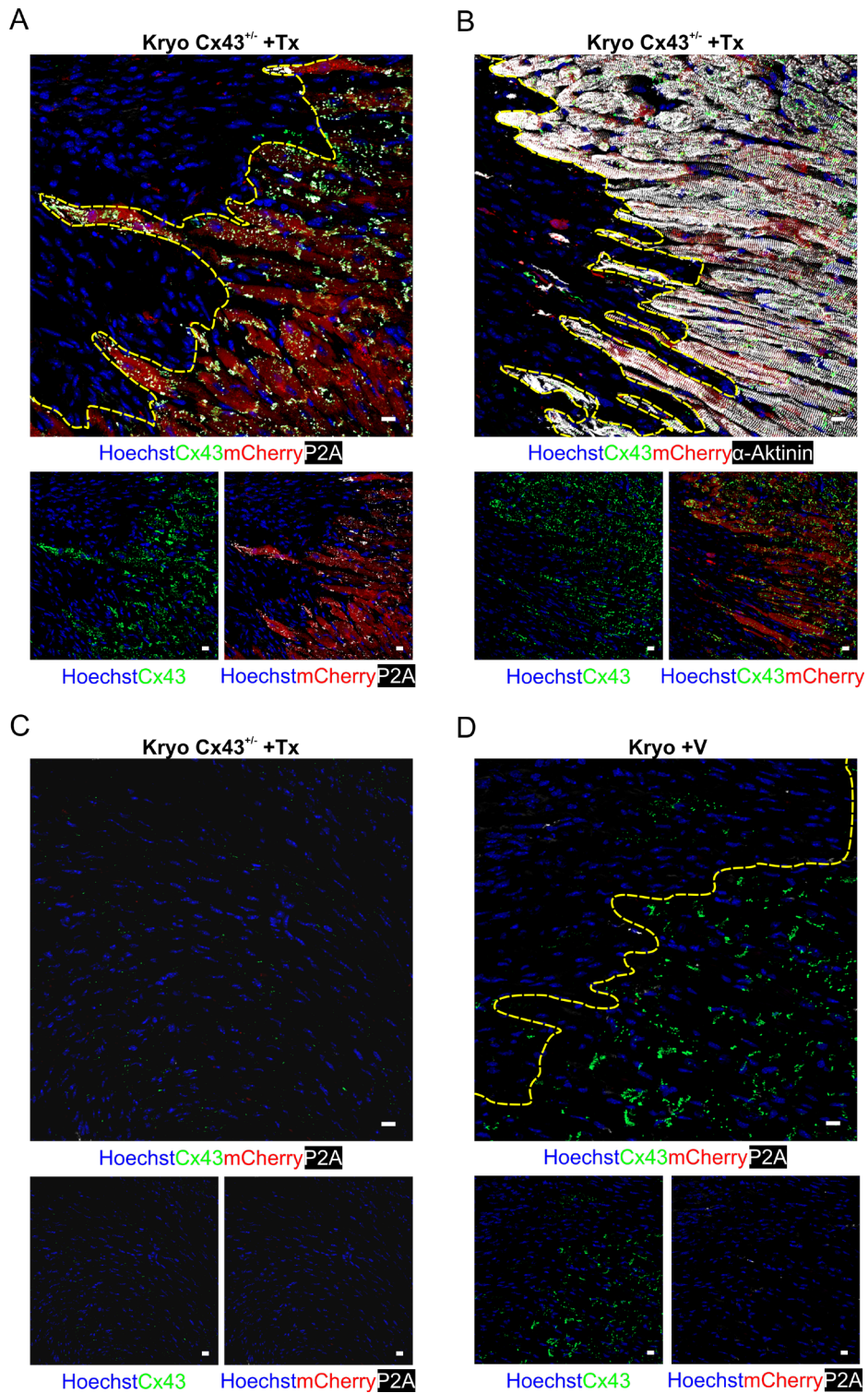


Abbildung 47: Lokalisation der Cx43-Expression mittels konfokaler Mikroskopie in Immunfluoreszenz-gefärbten Herzquerschnitten der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.

(Über-)Expression von Cx43, P2A und mCherry in Cx43-heterozygoten, Tamoxifen-induzierten Herzen im Bereich der BZ (**A**) und Narbe (**C**). **B**: Expression von Cx43 und mCherry in α -Aktinin-markierten KMs der BZ. **D**: Expression von Cx43, P2A und mCherry in Kontrollherzen im Bereich der BZ. Zellkernfärbung (Hoechst, blau), Cx43 (grün), mCherry (rot), P2A (**A, C, D**) (weiß), α -Aktinin (**B**) (weiß). Der Übergangsbereich von der Narbe zum gesunden Gewebe ist mit einer gelb-gestrichelten Linie eingezeichnet (**A, B, D**). 10 μm Kryoschnitte; Größenbalken = 10 μm .

4.4.2.3 Infarktgrößenbestimmung

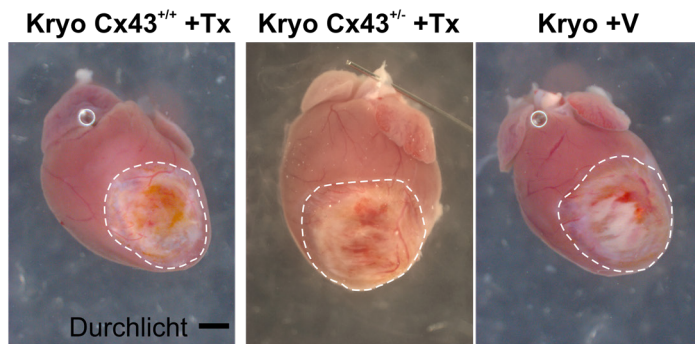
Im Folgenden wurde einer weiteren Frage nachgegangen, nämlich, ob sich die Überexpression von Cx43 negativ auf die Infarktgröße auswirkt. In der Tat wurde in der Literatur beschrieben, dass der Knockout von Cx43 und der Einsatz verschiedener pharmakologischer GJ-Blocker während der Ischämie eine signifikant geringere Infarktgröße und Nekrose bewirkten (Fontes et al. 2012; Garcia-Dorado et al. 1997; Kanno et al. 2003). Interessanterweise hatte aber auch Rotigaptid, welches den gegenteiligen Effekt bewirkt, nämlich eine Förderung der Zell-Zell-Kommunikation, oder die Verpflanzung Cx43-überexprimierender Diaphragma-Myoblasten eine Reduktion der Infarktgröße zur Folge (Giménez et al. 2018; Hennan et al. 2006). Dies ist relevant, da größere Herzinfarktfolgen in einer stärker reduzierten Pumpfunktion des Herzens resultieren. Um den Einfluss der Überexpression von Cx43 in KMs auf die Größe der Infarktfolge zu untersuchen, wurde zwei Wochen nach Kryoläsion die Infarktgröße in den Herzen der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mäuse makroskopisch (Abbildung 48) und mikroskopisch (Abbildung 49) bestimmt. Da der Infarkt durch einen Kryostempel mit definiertem Durchmesser (3,5 mm) generiert wurde, mussten Unterschiede in der Infarktgröße auf die Überexpression von Cx43 in BZ- und Remote-KMs zurückzuführen sein.

Die Infarktgröße wurde mit zwei verschiedenen Methoden analysiert. Es wurde (I) eine makroskopische Bestimmung der Infarktfläche (Abbildung 48; vgl. Kapitel 3.2.9.1.1) und (II) eine mikroskopische Analyse des Infarktolumens mittels Sirius-red/Fast-green Färbungen der Herzquerschnitte (Abbildung 49; vgl. Kapitel 3.2.9.1.2) durchgeführt.

Beide Bestimmungsmethoden zeigten keinen signifikanten Unterschied der Infarktgrößen bei dem Vergleich der Kryo-Kontrollgruppe (Kryo + V) und der beiden Cx43-überexprimierenden Gruppen (Kryo Cx43^{+/-}; Kryo Cx43^{+/+}). (Infarktfläche: Kryo + V = 19,50 % ± 0,59 %; Kryo Cx43^{+/-} + Tx = 19,73 % ± 0,58 %; Kryo Cx43^{+/+} + Tx = 18,02 % ± 1,57 %; Infarktolumen: Kryo + V = 10,81 % ± 2,10 %; Kryo Cx43^{+/-} + Tx = 9,34 % ± 1,51 %; Kryo Cx43^{+/+} + Tx = 8,98 % ± 1,53 %). Auch der transmurale Anteil der Narbe war zwischen den drei Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Transmuraler Anteil der Narbe: Kryo + V = 55,13 % ± 8,62 %; Kryo Cx43^{+/-} + Tx = 66,80 % ± 3,78 %; Kryo Cx43^{+/+} + Tx = 78,70 % ± 2,44 %). Sirius-red/Fast-green Färbungen der Herzquerschnitte zeigten außerdem, dass die Narbe zwei Wochen nach Infarkt noch kleine Bereiche toter KMs beinhaltete (grün) (Abbildung 49A).

Folglich hatte die Überexpression von Cx43 in KMs des gesunden Myokards- und der BZ zwei Wochen nach Kryoläsion keine Auswirkungen auf die Infarktgröße.

A



B

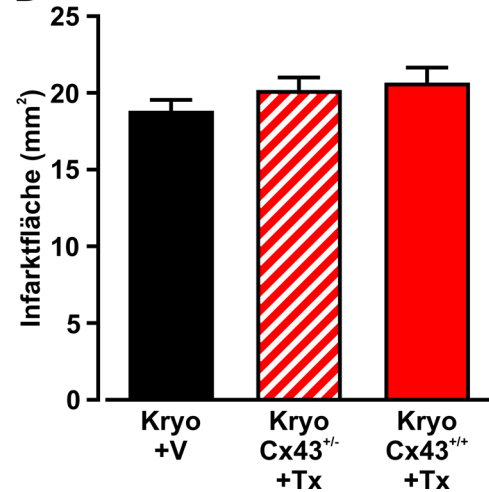


Abbildung 48: Makroskopische Bestimmung der Infarktfläche transgener Herzen der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.

A: Makroskopische Aufnahmen Kryo-infarzierter Herzen. Größenbalken = 1 mm; 7x Vergrößerung. **B:** Vergleich der Infarktfläche der Cx43-überexprimierenden Herzen (Kryo Cx43^{+/-} + Tamoxifen, Kryo Cx43^{+/+} + Tamoxifen) mit der Infarktfläche Vehikel-behandelter Kryo-Kontrollherzen. Alle Werte sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Einfaktorielle ANOVA; n(Kryo + V) = 18; n(Kryo Cx43^{+/-} + Tx) = 18; n(Kryo Cx43^{+/+} + Tx) = 5; nicht signifikant unterschiedlich: p > 0,05.

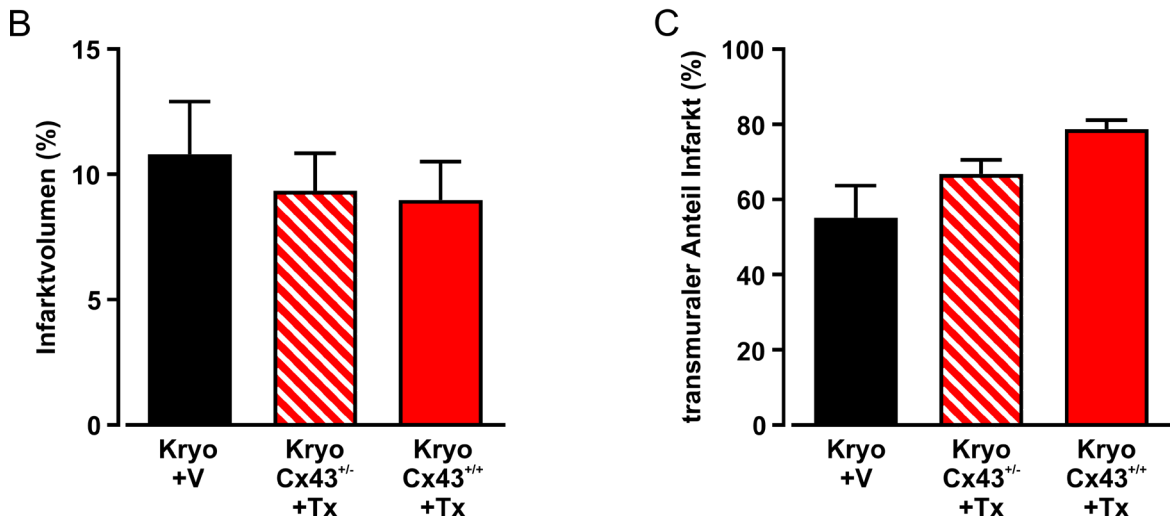
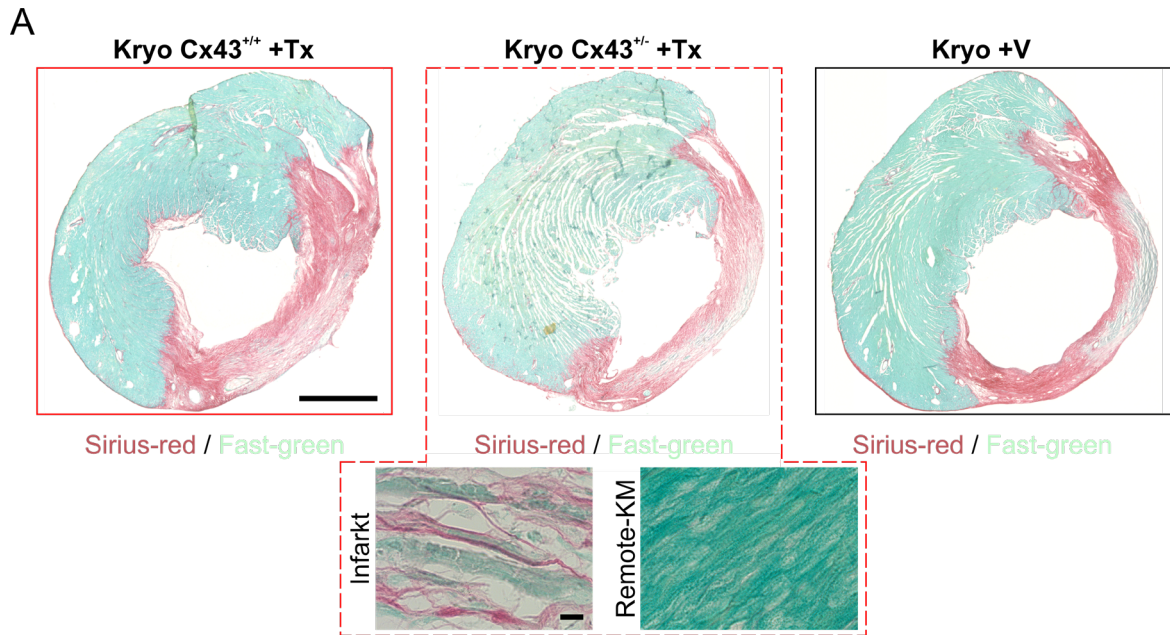


Abbildung 49: Mikroskopische Bestimmung des Infarkt volumens transgener Herzen der α MHC^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.

A: Übersichtsaufnahmen Sirius-red/Fast-green-gefärbter Herzquerschnitte. Größenbalken = 1 mm; Größenbalken = 10 μ m (Detailaufnahme). Infarkt volumens (%) (**B**) und transmuraler Anteil der Narbe (%) (**C**) von Cx43-überexprimierenden Herzen (Kryo Cx43^{+/-} + Tamoxifen, Kryo Cx43^{+/+} + Tamoxifen) und Vehikel-behandelten Kryo-Kontrollherzen. Alle Werte sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Einfaktorielle ANOVA; n(Kryo + V) = 4; n(Kryo Cx43^{+/-} + Tx) = 5; n(Kryo Cx43^{+/+} + Tx) = 3; nicht signifikant unterschiedlich: $p > 0,05$.

4.4.3 *In vivo* Analyse der Herzfunktion zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Transgeninduktion

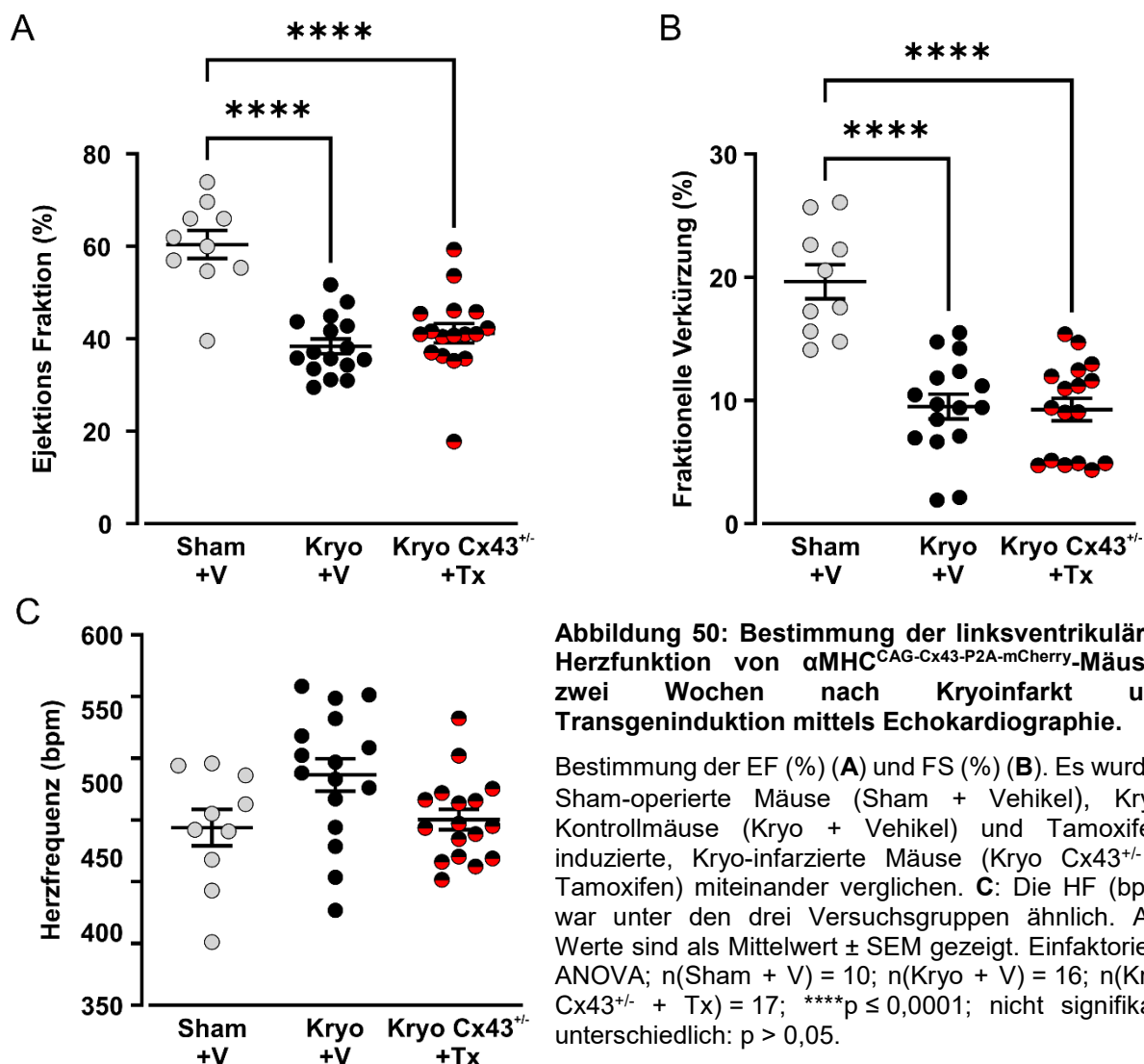
Zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion wurde die Herzfunktion der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mäuse mittels Echokardiographie in Analogie zu Kapitel 4.3.3 *in vivo* getestet, um auszuschließen, dass die zellbiologischen Befunde (starke Überexpression und Lateralisierung von Cx43 in KMs der BZ und des gesunden Myokards) einen potenziell negativen Einfluss auf die Pumpfunktion des Herzens haben.

4.4.3.1 Echokardiographie

Die linksventrikuläre Pumpfunktion des Mausherzens wurde wie in Kapitel 4.3.3.1 mittels nicht-invasiver, hochauflösender Echokardiographie unter Isofluran-Narkose untersucht.

Die EF sowie die FS waren bei den beiden infarzierten Gruppen (Kryo + V; Kryo Cx43^{+/-} + Tx) im Vergleich zur Sham-behandelten Gruppe (Sham + V), wie erwartet deutlich erniedrigt. Beim Vergleich der infarzierten Kontrollmäuse (Kryo + V) mit den Tamoxifen-induzierten, Cx43-überexprimierenden Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied in ihrer Pumpfunktion gefunden werden (Sham + V: EF = 60,4 % ± 3,0 %; FS = 19,7 % ± 1,4 %; Kryo + V: EF = 38,4 % ± 1,6 %; FS = 9,5 % ± 1,0 %; Kryo Cx43^{+/-} + Tx: EF = 41,2 % ± 2,1 %; FS = 9,3 % ± 0,9 %) (Abbildung 50A, B). Die HF war in allen drei untersuchten Gruppen nicht signifikant unterschiedlich, sodass die Befunde der Pumpfunktion nicht auf Unterschiede in der HF zurückzuführen sind (Sham + V: HF = 444 bpm ± 15 bpm; Kryo + V: HF = 487 bpm ± 13 bpm; Kryo Cx43^{+/-} + Tx: HF = 450 bpm ± 8 bpm) (Abbildung 50C).

Die KMs-spezifische Überexpression von Cx43 im infarzierten Mausherzen zeigte somit keine Auswirkungen auf die linksventrikuläre Pumpfunktion nach Infarkt.



Nachdem die Effekte einer Cx43-Überexpression in KMs des gesunden und infarzierten Herzens untersucht worden waren, fokussiert sich der folgende Teil der Dissertation auf den im Infarkt vorherrschenden Zelltyp, den FBs. Im Gegensatz zu KMs sind FBs spontan nicht elektrisch aktiv, sie können aber über GJs mit KMs kommunizieren und elektrische Signale passiv über eine gewisse Distanz weiterleiten (Gaudesius et al. 2003). Daher sind sie interessante Zielzellen, um mittels Überexpression von Cx43 die Narbe stärker mit den KMs des gesunden Myokards zu koppeln und so die gestörte elektrische Weiterleitung nach einem Herzinfarkt wenigstens teilweise wiederherzustellen.

4.5 Cx43-Überexpression in Myofibroblasten der Infarkt Narbe und Border Zone nach Kryoinfarkt

Eine mFB-spezifische, homogene Überexpression von Cx43 im Mausherzen wurde durch Kreuzung der Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF-(K31)}-Mauslinie mit einer Periostin-MCM-Mauslinie (B6.129S-Postn^{tm2.1(cre/Esr1*)Jmol/J}) erzielt. Um die zellbiologischen und funktionellen Auswirkungen einer Überexpression von Cx43 in (m)FBs nach Herzinfarkt untersuchen zu können, wurden zehn Wochen alte Mäuse (Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}) mit einem Stickstoff-gekühlten Kupferstempel linksventrikulär infarziert (siehe Kapitel 3.2.4). Zur Transgeninduktion wurde ihnen am Tag der Infarkt-OP sowie an den vier darauffolgenden Tagen je 80 mg/kg Tamoxifen (1 mg Tamoxifen/100 µl) i.p. injiziert (Abbildung 56). Das Tamoxifen-Behandlungsschema wurde von Fu et al. (2018) übernommen.

Zunächst aber wurde überprüft, ob das Transgen auch unspezifisch im nicht-infarzierten Herzen oder in anderen Organen exprimiert wird. Außerdem wurden verschiedene Parameter zur Beurteilung der Lebensfähigkeit der transgenen Mäuse bestimmt.

4.5.1 Analyse der Transgenexpression im nicht-infarzierten Herzen und anderen Organen

Wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben exprimiert die Periostin-MCM-Mauslinie eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Periostin-Promotors. Da Periostin überwiegend von mFBs nach einem Gewebeschaden produziert wird, sollte daher die Transgenexpression nur nach linksventrikulärem Kryoinfarkt stattfinden und auf die mFBs-reichen Bereiche der BZ und Narbe begrenzt sein. Um die Spezifität der Transgenexpression nach Gewebeschaden zu überprüfen, wurden daher Cx43-heterozygote, nicht-infarzierte Herzen der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie eine Woche nach Tamoxifen-Induktion makroskopisch und mikroskopisch nach Immunfluoreszenzfärbung auf ihre mCherry- bzw. P2A-Expression untersucht. Weder in makroskopischen Fluoreszenzaufnahmen des gesamten Herzens noch in konfokalen Bildern von Herzquerschnitten konnte mCherry nachgewiesen werden. Immunfluoreszenzfärbungen gegen P2A waren ebenfalls negativ (Abbildung 51).

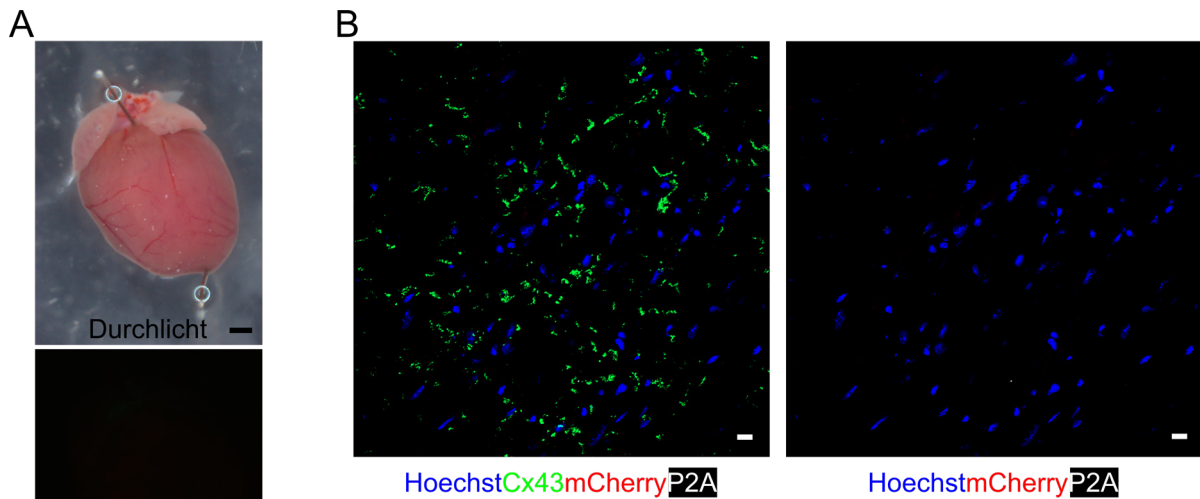


Abbildung 51: Makroskopische und konfokale Aufnahmen eines Cx43-heterozygoten, nicht-infarzierten Herzens der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie eine Woche nach Tamoxifen-Induktion.

(A) Makroskopische Aufnahmen. Größenbalken 1 mm; 7x Vergrößerung; 1 s Belichtungszeit mCherry (43 HE DsRed Filter) und 500 ms Belichtungszeit Autofluoreszenz (38 HE GFP Filter). (B) Konfokale Aufnahmen Immunfluoreszenz-gefärbter Herzquerschnitte. Zellkernfärbung (Hoechst, blau), Cx43 (grün), mCherry (rot), P2A (weiß); 10 µm Kryoschnitte; Größenbalken = 10 µm.

Periostin wird allerdings nicht ausschließlich in Folge eines Gewebeschadens exprimiert. Im „Expressions Atlas“ (EMBL-EBI Gene Expression Team 2022) sowie im „The Human Protein Atlas“ (The Human Protein Atlas 2022) wird von einer Expression von Periostin in vielen verschiedenen Geweben (wie z.B. Gehirn, Lunge, Skelettmuskel) berichtet. Um zu überprüfen, ob eine Transgenexpression grundsätzlich auch in Organen mit erhöhter Periostin-Expression stattfindet, oder nur nach Gewebeschaden, wurden exemplarisch Gehirn, Lunge und Skelettmuskel makroskopisch auf ihre jeweilige mCherry-Fluoreszenz untersucht. Eine Woche nach Kryoläsion konnte weder im Gehirn noch in der Lunge oder im Skelettmuskel Tamoxifen-induzierter, Cx43-überexprimierender Mäuse eine mCherry-Fluoreszenz detektiert werden (Abbildung 52).

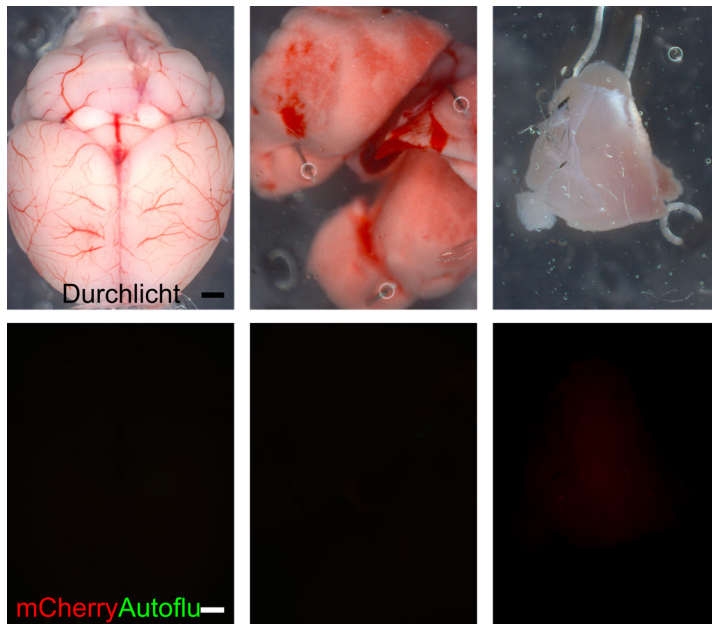


Abbildung 52: Makroskopische Aufnahmen verschiedener Organe einer Cx43-homozygoten Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Maus eine Woche nach Tamoxifen-Induktion.

Aufnahmen von Gehirn (links), Lunge (Mitte) und Skelettmuskel (rechts). Größenbalken = 1 mm; 7x Vergrößerung; 1 s Belichtungszeit mCherry (43 HE DsRed Filter) und 500 ms Belichtungszeit Autofluoreszenz (38 HE GFP Filter).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Transgenexpression trotz Tamoxifen-Induktion weder im nicht-infarzierten Myokard noch in anderen Organen detektiert wird.

4.5.2 Phänotypische Charakterisierung der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie

Wie auch in Kapitel 4.3.1 beschrieben, wurde zunächst das Verhalten der transgenen Mäuse beobachtet und es wurden verschiedene Kenngrößen (Phänotyp, Körpergewicht, Überlebenswahrscheinlichkeit, hypertrophe Veränderungen des Herzens) bezüglich der Lebensfähigkeit der Mäuse bestimmt.

4.5.2.1 Körpergewicht

Vor der Tamoxifen-induzierten Überexpression von Cx43 zeigten Cx43-homo- und -heterozygote Mäuse keine Verhaltensauffälligkeiten oder sichtbare Krankheitsanzeichen, es traten auch keine plötzlichen Todesfälle auf. Außerdem unterschied sich ihr Körpergewicht im Alter von zehn Wochen nicht von dem der WT-Geschwistertiere (Gewicht: WT ♂ = 35,87 g ± 1,45 g; WT ♀ = 30,03 g ± 0,86 g; Cx43^{+/-} ♂ = 38,17 g ± 0,42 g; Cx43^{+/-} ♀ = 30,99 g ± 0,49 g; Cx43^{+/+} ♂ = 37,40 g ± 4,30 g; Cx43^{+/+} ♀ = 28,75 g ± 0,93 g) (Abbildung 53).

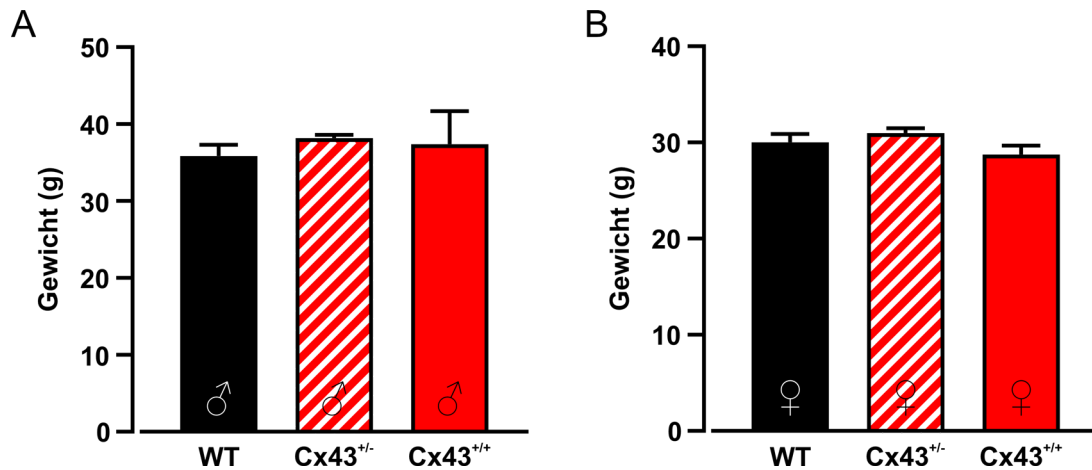


Abbildung 53: Geschlechtsspezifisches Körpergewicht von Mäusen der Periostin^{CAG-Cx43-P2A}-mCherry-Mauslinie im Alter von 10 Wochen.

Es wurde das Körpergewicht von Cx43-homozygoten, MCM-heterozygoten Mäusen (Cx43^{+/+}) mit dem von Cx43-heterozygoten, MCM-heterozygoten Mäusen (Cx43^{+/-}) und WT-Geschwistertieren (WT, Cx43-negativ, MCM-negativ) verglichen. Alle Werte sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Einfaktorielle ANOVA; n(WT ♂) = 6; n(WT ♀) = 7; n(Cx43^{+/-} ♂) = 57; n(Cx43^{+/-} ♀) = 56; n(Cx43^{+/+} ♂) = 2; n(Cx43^{+/+} ♀) = 11; nicht signifikant unterschiedlich: p > 0,05.

4.5.2.2 Kaplan Meier Überlebenskurve

Um potenzielle negative Einflüsse einer mFBs-spezifischen Überexpression von Cx43 nach Herzinfarkt auf die Vitalität der Mäuse zu untersuchen, wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit der Mäuse zwei Wochen nach der Kryoinfarkt-OP analysiert.

Die Sterblichkeit der infarzierten Gruppen (Kryo + V, Kryo Cx43^{+/-} + Tx, Kryo Cx43^{+/+} + Tx) war im Vergleich zu den Sham-behandelten Gruppen (Sham + V, Sham + Tx) erhöht. Die Überlebenswahrscheinlichkeit Kryo-infarzierter, Cx43-überexprimierender Mäuse (Kryo Cx43^{+/-} + Tx, Kryo Cx43^{+/+} + Tx) war verglichen mit den Kryo-Kontrollmäusen (Kryo +V) nicht auffallend unterschiedlich (Sterblichkeit: Sham +V = 5,3 %; Sham +Tx = 0 %; Kryo +V = 21,4 %; Kryo Cx43^{+/-} + Tx = 17,0 %; Kryo Cx43^{+/+} + Tx = 14,3 %). Generell starben die Mäuse ab Tag 6 post-MI, sodass auch bei dieser Mauslinie vermutet wurde, dass die Mäuse nicht unmittelbar durch die OP verstarben, sondern auf Grund von Herzinfarktfolgen wie Herzinsuffizienz oder dem Auftreten von Arrhythmien (Abbildung 54).

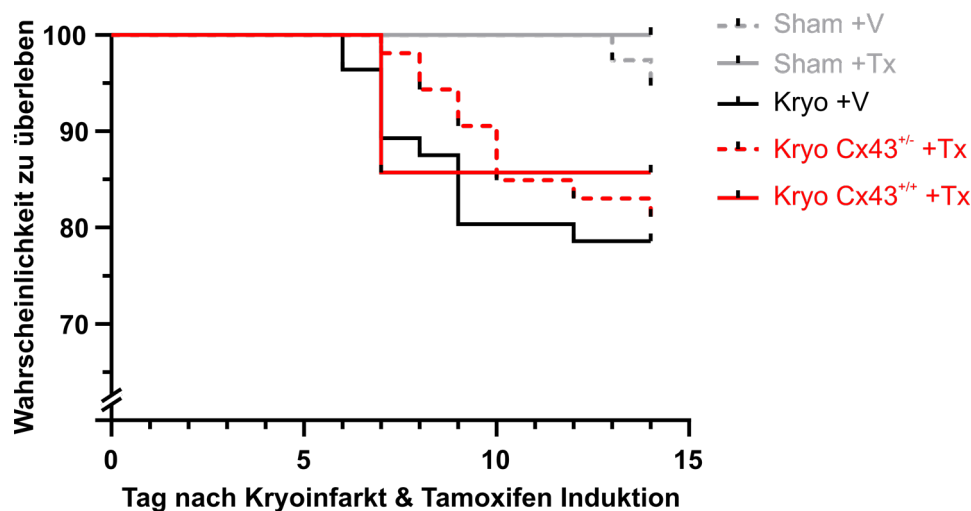


Abbildung 54: Kaplan Meier Überlebenskurve von Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mäusen zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.

n(Sham + Vehikel) = 38; n(Sham + Tamoxifen) = 7; n(Kryo + Vehikel) = 56; n(Kryo Cx43^{+/-} + Tamoxifen) = 53; n(Kryo Cx43^{+/+} + Tamoxifen) = 7.

4.5.2.3 Berechnung des Quotienten aus Herzgewicht (HW) und Tibiallänge (TL) zur Hypertrophie-Analyse des Herzens

In Folge eines Herzinfarktes kommt es zur kompensatorischen Hypertrophie des Herzens (siehe Kapitel 4.4.1.2). Um auszuschließen, dass eine Cx43-Überexpression in mFBs einen Einfluss auf die Zellgröße der verbliebenen KMs nach Infarkt hat und die verbliebenen KMs über das übliche Maß hypertrophieren, wurde der Quotienten aus Herzgewicht (HW) und Tibiallänge (TL) als Indikator für die Bestimmung der Hypertrophie des Herzens nach Infarkt berechnet.

Kryo-infarzierte, Cx43-überexprimierende Mäuse (Kryo Cx43^{+/-} + Tx) und auch Kryo-Kontrollmäuse (Kryo + V) wiesen im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Sham-Mäusen (Sham + V) signifikant erhöhte Quotienten aus Herzgewicht und Tibiallänge auf. Dies deutet, wie erwartet, auf eine grundsätzliche Hypertrophie Kryo-infarzierter Herzen hin. (HW/TL: Sham + V = 0,09204 g/cm ± 0,002627 g/cm; Sham + Tx = 0,09871 g/cm ± 0,004379 g/cm; Kryo + V = 0,1090 g/cm ± 0,003832 g/cm; Kryo Cx43^{+/-} + Tx = 0,11740 g/cm ± 0,002383 g/cm) (Abbildung 55). Vehikel-behandelte Sham-Mäuse (Sham + V) zeigten verglichen mit Tamoxifen-behandelten Sham-Mäusen (Sham + Tx) keinen signifikanten Unterschied, wodurch sich ein Effekt von Tamoxifen auf die Hypertrophie-Entwicklung des Herzens nach Infarkt ausschließen lässt.

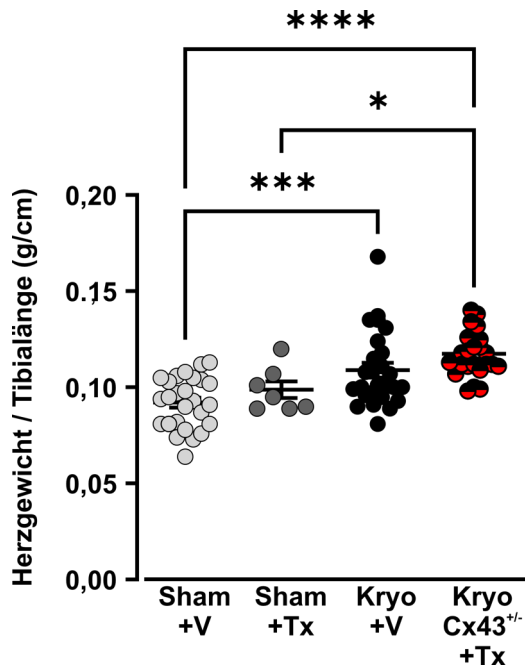


Abbildung 55: Bestimmung des Quotienten von Herzgewicht (HW) und Tibialänge (TL) von Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mäusen zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Transgeninduktion als Indikator für die kompensatorische Hypertrophie des Herzens nach Infarkt.

Vergleich Kryo-infarzierter Cx43-überexprimierender Mäuse (Kryo Cx43^{+/-} + Tamoxifen) mit Sham-behandelten- (Sham + Vehikel, Sham + Tamoxifen) und Kryo-Kontrollmäusen. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Einfaktorielle ANOVA; n(Sham +V) = 26; n(Sham + Tamoxifen) = 7; n(Kryo + Vehikel) = 26; n(Kryo Cx43^{+/-} + Tamoxifen) = 24; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$; nicht signifikant unterschiedlich: $p > 0,05$.

Nachdem eine unspezifische Expression des Transgens ausgeschlossen werden konnte, soll im Folgenden auf die Transgenexpression nach Herzinfarkt eingegangen werden.

4.5.3 Charakterisierung der Cx43-Überexpression in Myofibroblasten nach Kryoinfarkt und Transgeninduktion

Die Cx43-, P2A- und mCherry-Expression der mFBs-spezifischen Cx43-Überexpressions-Mauslinie wurde ein, zwei und 12 Wochen nach linksventrikulärem Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion makroskopisch und mikroskopisch untersucht (Abbildung 56). Die drei Zeitpunkte wurden gewählt, um die Effekte einer mFB-spezifischen Cx43-Überexpression während verschiedener Stadien nach der Schädigung des Herzens untersuchen zu können. Eine Woche nach Infarkt herrscht die Proliferationsphase vor, wobei sich die FBs der Narbe vor allem im mFB-Differenzierungsstadium befinden, zwei Wochen nach Infarkt ist diese weitgehend abgeschlossen. Darauf folgt die finale Phase der Infarktnarbenbildung (Maturation/Remodeling), sodass nach ca. 12 Wochen die Narbenbildung abgeschlossen ist. Es wurden infarzierte, Tamoxifen-induzierte, Cx43-homozygote, MCM-heterozygote (Cx43^{+/+} + Tx) sowie infarzierte, Tamoxifen-induzierte, Cx43-heterozygote, MCM-heterozygote (Cx43^{+/-} + Tx) Mäuse mit infarzierten Kontrollmäusen, welche Vehikel-injiziert oder unbehandelt waren (Geschwistertiere mit gemischtem Genotyp), verglichen.

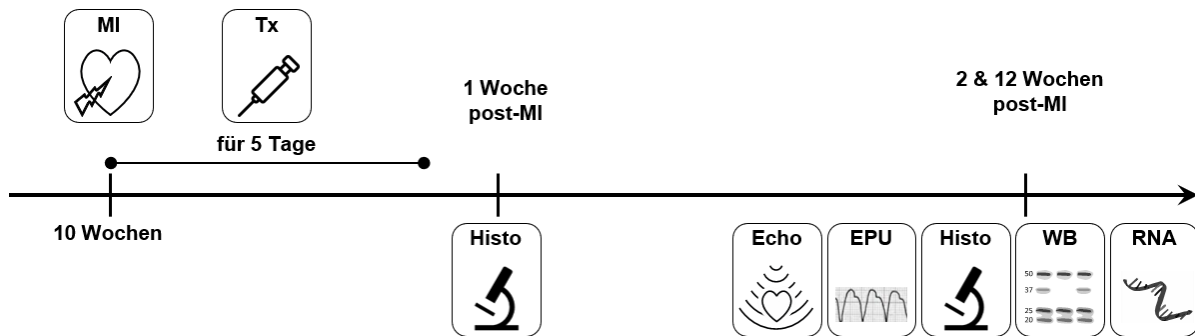


Abbildung 56: Versuchsablauf infarzierter Mäuse der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie.

Im Alter von zehn Wochen wurde den Mäusen mit einem Stickstoff-gekühlten Kupferstempel ein linksventrikulärer Kryoinfarkt gesetzt. Am Tag der OP sowie an den folgenden vier Tagen wurden die Mäuse mit Tamoxifen i.p. injiziert, um die Transgenexpression zu induzieren. Zwei Wochen danach wurde die linksventrikuläre Pumpfunktion (Echo) sowie die Arrhythmie-Empfindlichkeit (EPU) der Mäuse *in vivo* getestet. Außerdem wurde die Transgenexpression im Herzen auf RNA- und Protein-Ebene untersucht. Die Herzen wurden ein-, zwei- und 12 Wochen nach Infarkt makroskopisch sowie mikroskopisch untersucht.

4.5.3.1 Makroskopische Analyse der Transgenexpression ein-, zwei- und 12 Wochen nach Kryoinfarkt

Bereits eine Woche nach Kryoläsion war in den Cx43-homo- und -heterozygoten, Tamoxifen-induzierten Herzen die Expression von mCherry in der BZ sowie in BZ-nahen Bereichen der Narbe zu beobachten. Die mCherry-Fluoreszenz war bei Cx43-homozygoten, Tamoxifen-induzierten Herzen deutlich intensiver ausgeprägt als bei Cx43-heterozygoten, Tamoxifen-induzierten Herzen. Das Zentrum der Narbe war mCherry⁺ (Abbildung 57A). Zwei- und 12 Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion zeigten Cx43-homo- und -heterozygote, Tamoxifen-induzierte Herzen im gesamten Narben- und BZ-Bereich mCherry-Fluoreszenz. (Abbildung 57B, C). Im Bereich des gesunden Ventrikels war zu keinem der Zeitpunkte eine mCherry-Fluoreszenz detektierbar. Alle Herzen der Kryo-Kontrolltiere waren mCherry⁻ (Abbildung 57). Diese Daten demonstrieren, dass die mFBs-spezifische Expression des Cre-Proteins nach Tamoxifengabe im Herzen zu einer Expression des Transgens ausschließlich in mFBs-reichen Bereichen, wie der BZ und der Narbe führt. Außerdem zeigt die Langzeit-Analyse (12 Wochen post-MI), dass einmal aktivierte mFBs, in einem hier nicht genauer definierten Differenzierungsstadium, in der Narbe verbleiben.

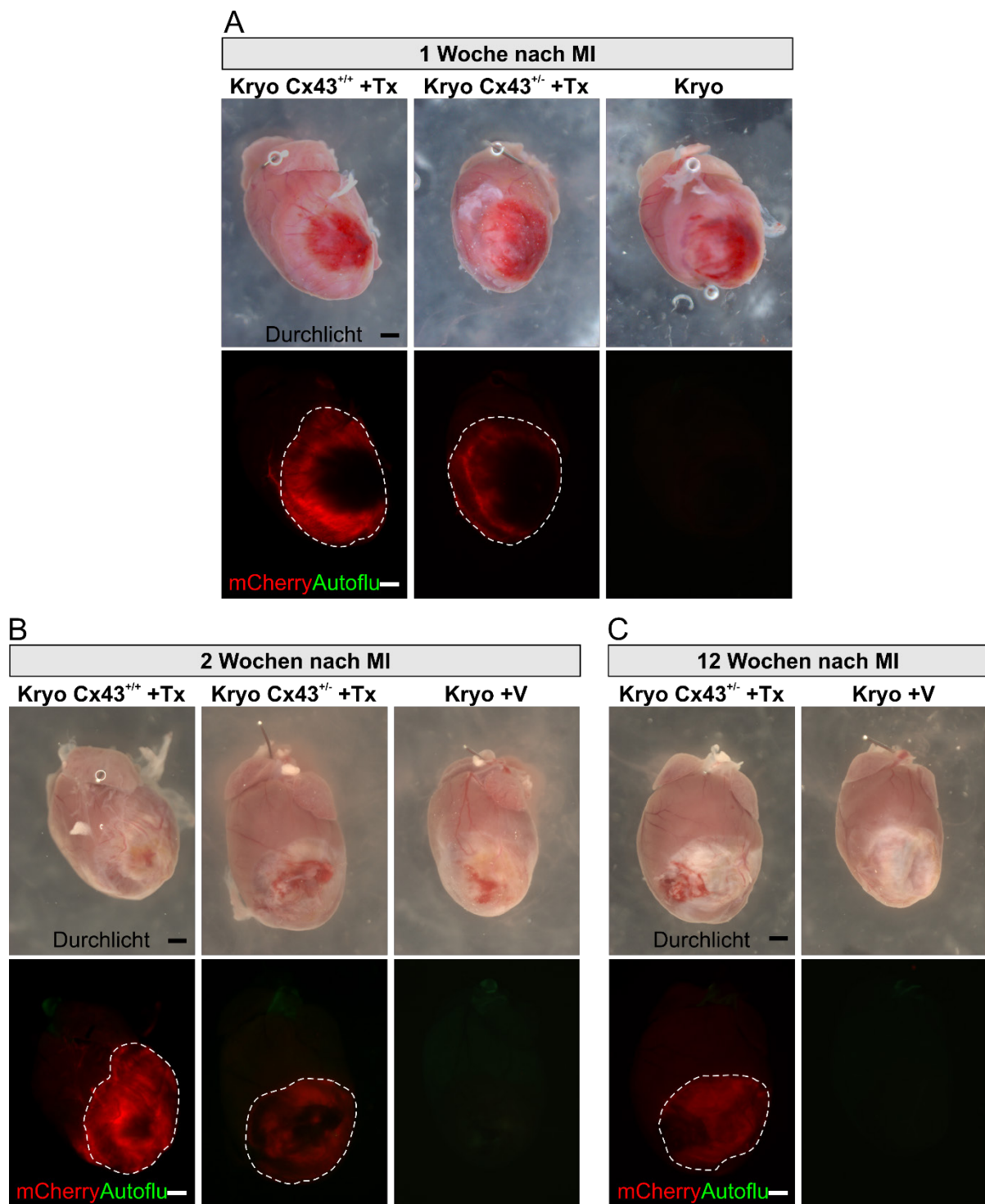


Abbildung 57: Makroskopische Aufnahmen transgener Herzen der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.

mCherry-Expressionsmuster ein- (A), zwei- (B) und 12 Wochen (C) nach Kryoläsion und Tamoxifen-Induktion Cx43-homo- und -heterozygoter Mäuse sowie Vehikel-behandelter- oder unbehandelter Kontrollmäuse. Der Bereich der Herzinfarkt Narbe ist durch eine weiß-gestrichelte Linie markiert; Größenbalken = 1 mm; 7x Vergrößerung; 2 s Belichtungszeit mCherry (43 HE DsRed Filter) und Autofluoreszenz (38 HE GFP Filter).

4.5.3.2 Nachweis der mRNA-Expression des Transgens mittels dPCR-Analysen

Um die mRNA-Expression von Cx43 und mCherry quantitativ zu bestimmen, wurden dPCR-Analysen von isolierten Narben (makroskopisches Herausschneiden des Narbenbereichs) bzw. linkem Ventrikel Sham-behandelter Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Herzen zwei Wochen nach Tamoxifen-Induktion durchgeführt. Es wurden ein mCherry-spezifischer Taqman-Assay, sowie drei verschiedene Taqman-Assays für Cx43 eingesetzt, sodass endogene-, exogene- und Gesamt-Cx43-mRNA unabhängig voneinander quantifiziert werden konnten (siehe Kapitel 3.1.13).

In dem Narbengewebe Kryoinfarzierter, Cx43-homozygoter und -heterozygoter, Tamoxifen-induzierter Herzen wurde eine deutlich erhöhte Menge an Gesamt-Cx43 im Vergleich zu den Narben von Kryokontrollherzen oder sogar dem linken Ventrikel Sham-behandelter Mäuse gemessen (rel. gesamt Cx43 Kopienzahl: Sham + V = $9,8 \pm 0,4$; Kryo + V = $2,2 \pm 0,2$; Kryo Cx43^{+/-} +Tx = $30,9 \pm 3,8$; Kryo Cx43^{+/+} +Tx = $65,1 \pm 7,5$). In der Cx43-homozygoten Gruppe war die Cx43-mRNA-Expression etwa doppelt so hoch wie in der Cx43-heterozygoten Gruppe (Abbildung 58A). In allen drei Kryoinfarkt-Gruppen, wurden im Narbengewebe stark erniedrigte Expressionswerte für die endogene Cx43-mRNA im Vergleich zu den linken Ventrikeln der Sham-Gruppe gemessen. Es zeigte sich kein Unterschied in der Expression von endogener Cx43-mRNA in den Narben Kryo + Vehikel-, Kryo Cx43^{+/-} +Tamoxifen oder Kryo Cx43^{+/+} +Tamoxifen-behandelter Mäuse (rel. endogene Cx43 Kopienzahl: Sham + V = $11,6 \pm 0,6$; Kryo + V = $1,9 \pm 0,1$; Kryo Cx43^{+/-} +Tx = $2,0 \pm 0,1$; Kryo Cx43^{+/+} +Tx = $2,2 \pm 0,3$) (Abbildung 58B). In den beiden Kryoinfarzierten Tamoxifen-induzierten Gruppen war die Menge an exogener Cx43- und mCherry-mRNA im Narbenbereich deutlich hochreguliert verglichen zum Narbengewebe der Kryokontrollgruppe oder den linken Ventrikeln der Sham-Gruppe. Es wurden im Narbengewebe der Kryokontrollgruppe sowie in linken Ventrikeln der Sham-Gruppe keine bzw. wenige Kopien exogener Cx43- und mCherry-mRNAs nachgewiesen und damit die Funktionalität der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Linie bestätigt (rel. Kopienzahl exogenes Cx43: Sham + V = 0 ± 0 ; Kryo + V = $0,18 \pm 0,05$; Kryo Cx43^{+/-} +Tx = $26,77 \pm 3,5$; Kryo Cx43^{+/+} +Tx = $51,18 \pm 3,2$) (Abbildung 58C); rel. Kopienzahl mCherry: Sham + V = $0,002 \pm 0$; Kryo + V = $0,7 \pm 0,2$; Kryo Cx43^{+/-} +Tx = $22,3 \pm 3,5$; Kryo Cx43^{+/+} +Tx = $50,52 \pm 5,8$) (Abbildung 58D). Kryoinfarzierte Cx43-homozygote Tamoxifen-induzierte Mäuse zeigten etwa doppelt so hohe Werte an exogener Cx43- und mCherry-mRNA wie Kryoinfarzierte Cx43-heterozygote Tamoxifen-induzierte Mäuse. Von den Zellen der Infarktnarbe der Kryoinfarzierten, Tamoxifen-induzierten, Cx43-homozygoten Mäuse wurde etwa 25-mal so viel exogenes wie endogenes

Cx43 exprimiert, Cx43-heterozygote, Kryo-infarzierte, Tamoxifen-induzierte Mäuse zeigten etwa 13-fache Expressionswerte (Abbildung 58B, C).

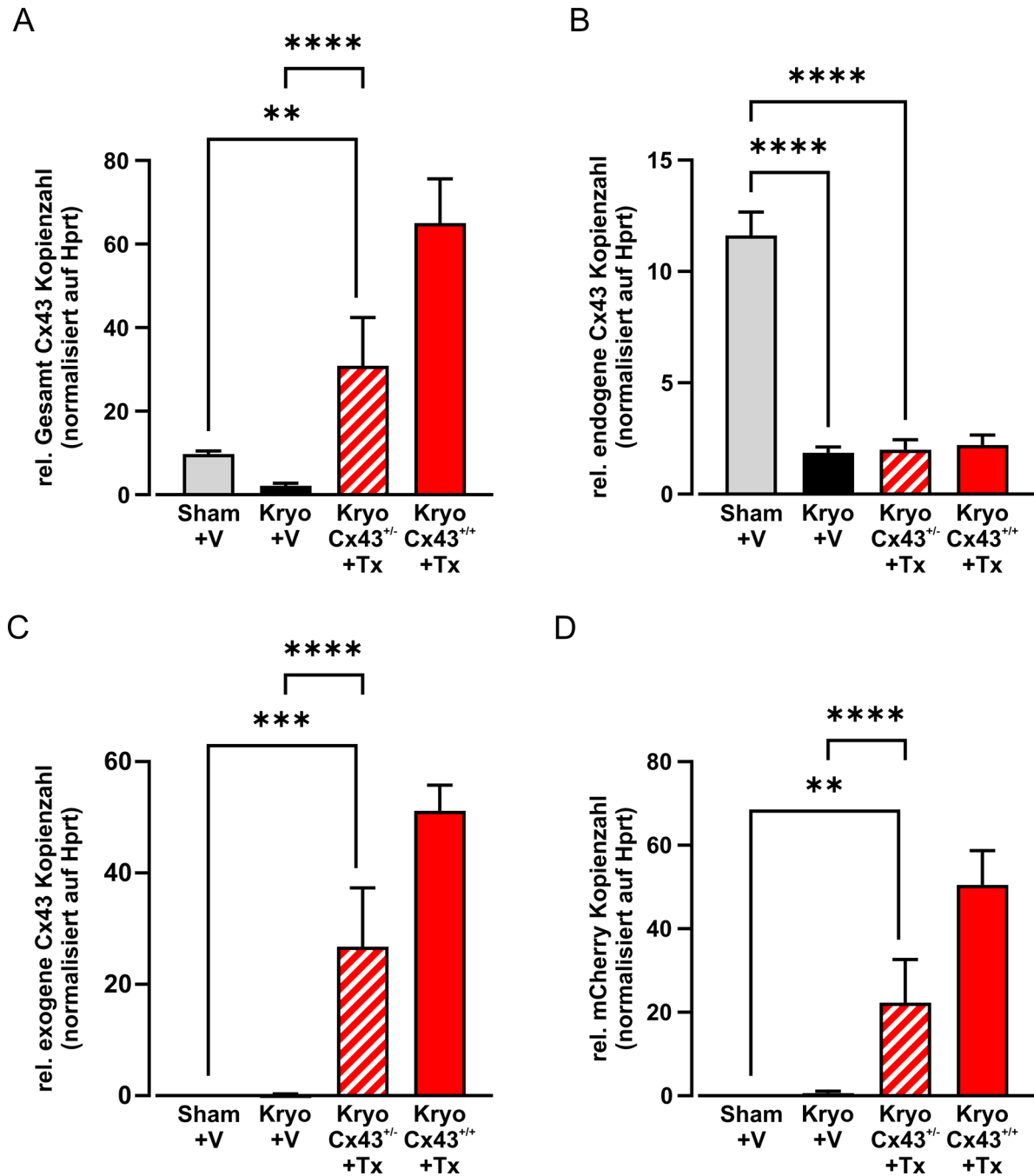


Abbildung 58: Digitale PCR für Cx43 und mCherry von Narbengewebe transgener Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Herzen zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.

Relative Kopienzahl von Gesamt-Cx43 (A), endogenem Cx43 (B), exogenem Cx43 (C) und mCherry (D) in Sham-operierten, Vehikel-behandelten-, Kryo-infarzierten Vehikel-injizierten- sowie Cx43-homo- und -heterozygoten Mäusen. Die jeweils ermittelte Kopienzahl wurde auf den Housekeeper Hprt normalisiert. Alle Werte sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Einfaktorielle ANOVA; n(Sham +V) = 3; n(Kryo + Vehikel) = 8; n(Kryo Cx43^{-/-} + Tamoxifen) = 9; n(Kryo Cx43^{+/-} + Tamoxifen) = 2; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001; ****p ≤ 0,0001; nicht signifikant unterschiedlich: p > 0,05.

4.5.3.3 Nachweis der Transgenexpression auf Protein-Ebene durch Western blot-Analysen

Nach den RNA-Analysen wurde auch das Cx43-Protein analysiert, um zu zeigen, dass neben endogenem- auch tatsächlich exogenes Protein exprimiert wird. Für die Quantifizierung der Cx43- und mCherry-Expression auf Protein-Ebene wurde der Narbenbereich der Mausherzen der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Linie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion makroskopisch ausgeschnitten und lysiert. Für die Sham-Gruppe wurden Gewebeproben linker Ventrikel eingesetzt. Die Cx43-Expression (ca. 40-45 kDa) war in den Narben Cx43-heterozygoter, Tamoxifen-induzierter Herzen im Vergleich zu Narben von Kryo-Kontrollherzen stark erhöht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen auf RNA-Ebene (siehe Kapitel 4.5.3.2), exprimierten Cx43-heterozygote, Tamoxifen-induzierte Mäuse ebenso viel Cx43 in der Narbe wie homozygote, Kryo-infarzierte, Tamoxifen-induzierte Mäuse (rel. Cx43-Expression: Kryo + V = $7,6 \pm 0,9$; Kryo Cx43^{+/-} + Tx = $140,1 \pm 39,4$; Kryo Cx43^{+/+} +Tx = $143,4 \pm 41,0$). Die Cx43-Expression im linken Ventrikel Sham-behandelter Mäuse war im Vergleich zum Narbengewebe der drei Kryo-infarzierten Gruppen erwartungsgemäß deutlich erhöht (Abbildung 59A, B). Das mCherry-Protein wurde ausschließlich in den beiden Tamoxifen-induzierten Gruppen (Kryo Cx43^{+/+} + Tx, Kryo Cx43^{+/-} + Tx) detektiert (rel. mCherry-Expression: Kryo + V = $1,6 \pm 0,8$; Kryo Cx43^{+/-} + Tx = $40,1 \pm 5,2$; Kryo Cx43^{+/+} + Tx = $40,8 \pm 15,2$) (Abbildung 59A, C). Dieser Befund bestätigte, dass das Cre-loxP-System intakt und nicht durchlässig war.

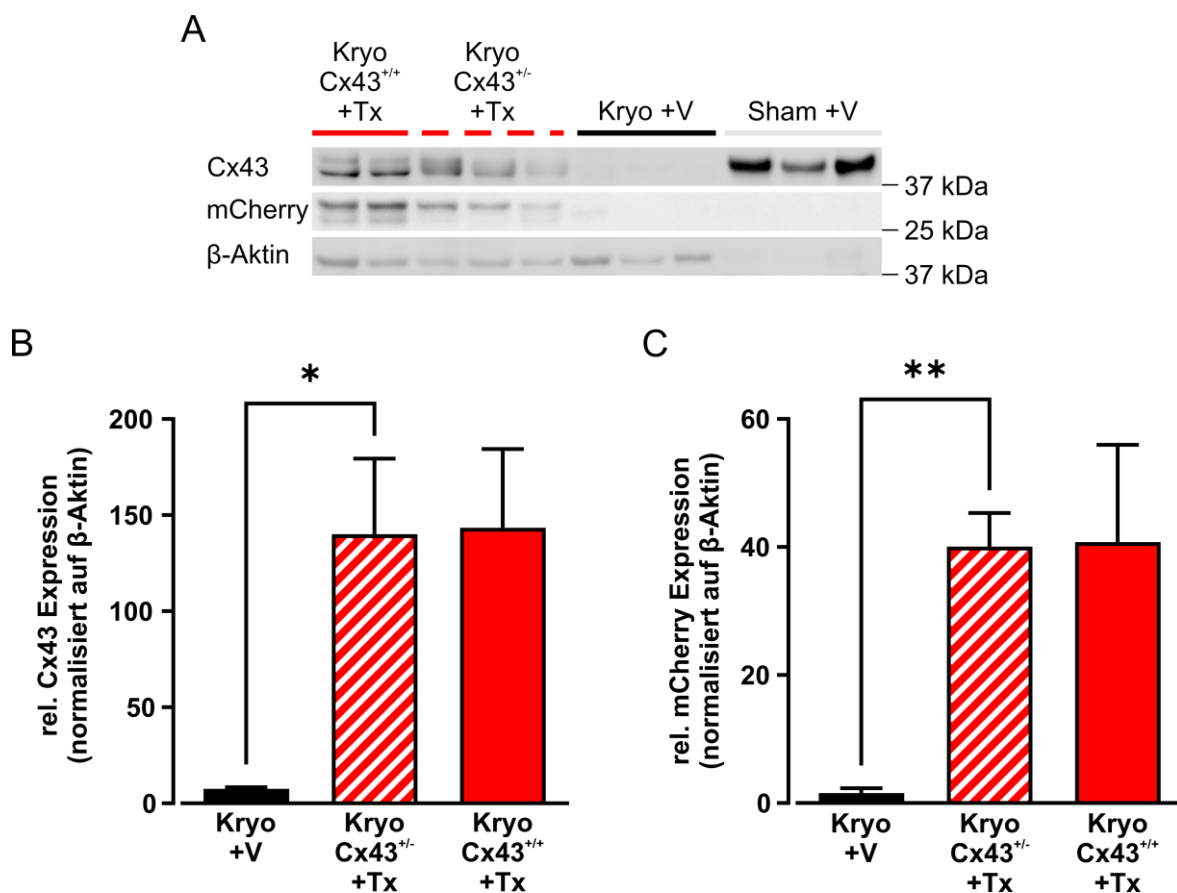


Abbildung 59: Western blot der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.

A: Analysen von Cx43-homo- und -heterozygoten, Tamoxifen-induzierten sowie Vehikel-behandelten Kontrollherzen für Cx43 (40-45 kDa) und mCherry (25-28 kDa). Als Housekeeper wurde β -Aktin (42 kDa) eingesetzt. **B, C:** Quantifizierung der relativen Cx43- (**B**) und mCherry-Expression (**C**). Die Expressionswerte wurden auf den Housekeeper β -Aktin normalisiert. $n(\text{Kryo} + \text{V}) = 4$; $n(\text{Kryo Cx43}^{+/-} + \text{Tx}) = 5$; $n(\text{Kryo Cx43}^{+/+} + \text{Tx}) = 2$. Alle Werte sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Einfaktorielle ANOVA; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; nicht signifikant unterschiedlich: $p > 0,05$.

4.5.3.4 RNA-Sequenzierung des Infarktbereiches von Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mäusen zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion

Um mögliche Auswirkungen der Cx43-Überexpression in mFBs nach Herzinfarkt auf die Expression anderer Gene und damit die potenzielle Beeinflussung von Signalwegen zu überprüfen, wurde eine Sequenzierung der RNA des Narbengewebes durchgeführt.

Überraschenderweise wurden beim Vergleich der Kryo-infarzierten, Tamoxifen-behandelten Cx43-heterozygoten-Gruppe mit der Vehikel-behandelten Kryo-Kontrollgruppe nur fünf signifikant unterschiedlich exprimierte Gene gefunden: Cx43, Prostaglandin F Receptor (Ptgfr), ALF Transcription Elongation Factor 3 (Aff3), Interferon Induced Protein With

Tetratricopeptide Repeats 1 (Ifit1), Kalirin RhoGEF Kinase (Kalrn) (Abbildung 60). Das am deutlichsten differenziell exprimierte Gen der RNA-Sequenzierung war Cx43 mit einem $\log_2(\text{FC})$ von 2,33598 (Abbildung 60B). Nur Cx43 war eindeutig in allen Cx43-überexprimierenden Herzinfarkt Narben im Vergleich zu allen Herzinfarkt Narben der Kryo-Kontrollgruppe hochreguliert. Dies bestätigt zusätzlich die Funktionalität des neu generierten Mausmodells. Die signifikant erhöhte Cx43-Expression in Herzinfarkt Narben der Tamoxifen-behandelten Cx43-heterozygoten Mäuse wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits mittels dPCR und Western blot nachgewiesen (siehe Kapitel 4.5.3.2 und 4.5.3.3). Entsprechende Analysen müssen auch für Ptgfr, Aff3, Ifit1 und Kalrn durchgeführt werden, um das Ergebnis der RNAseq-Analyse zu verifizieren.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung des Infarktbereiches von Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mäusen zwei Wochen nach Kryoinfarkt, dass die Überexpression von Cx43 in mFBs des Infarktbereichs die Expression anderer Gene als Cx43 nur in geringem Maße verändert.

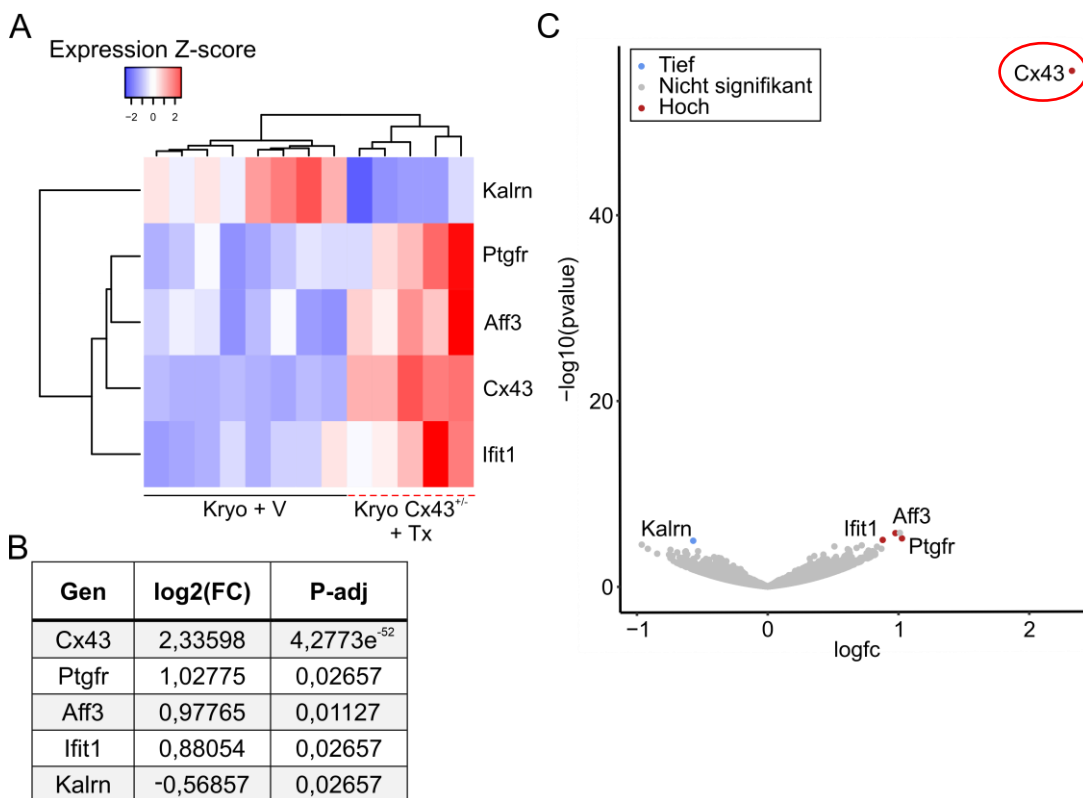


Abbildung 60: RNA-Sequenzierung (RNAseq) des Infarktbereiches infarzierter Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mäuse zwei Wochen nach Kryoinfarkt.

Es wurden die Herzinfarkt Narben Kryo-infarzierter, Tamoxifen-behandelter Cx43^{+/-}-Mäuse mit den Narben von Vehikel-behandelten Kryo-Kontrollmäusen verglichen. **A:** Heat map aller signifikant differenziell exprimierten Gene. **B:** Log₂(FC) und der korrigierte P-Wert (adjusted P value) der signifikant unterschiedlich exprimierten Gene. **C:** Volcano plot der differenziell exprimierten Gene (statistische Signifikanz (y-Achse) vs. Ausmaß der Änderung (x-Achse, fold-change)). Die rot-markierten Punkte

zeigen Gene, die in der Kryo Cx43^{+/-} + Tx-Gruppe im Vergleich zur Vehikel-injizierten Kryo-Kontrollgruppe signifikant höher exprimiert sind, blau-markierte Punkte stellen signifikant niedriger exprimierte Gene dar. Liegen keine Änderung bzw. kein signifikanter Unterschied in der Expression eines Gens vor, wird es als grauer Punkt abgebildet. n(Kryo + V) = 8; n(Kryo Cx43^{+/-} + Tx) = 5.

4.5.3.5 Bestimmung der zellulären Lokalisation des Cx43-Proteins in Myofibroblasten durch immunhistologische Untersuchungen

Nachdem die Transgenexpression im Bereich des geschädigten Myokards nachgewiesen werden konnte, wurde das Expressionsmuster von Cx43, P2A-markiertem Cx43 sowie mCherry genauer analysiert. Dazu wurden mikroskopische Übersichtsaufnahmen eines gesamten Herzquerschnitts sowie konfokale Detailaufnahmen von BZ und Narbe nach Immunfluoreszenzfärbungen aufgenommen.

4.5.3.5.1 Übersichtsaufnahmen ein-, zwei- und 12 Wochen nach MI

Fluoreszenzübersichtsaufnahmen von Herzquerschnitten der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie zeigten eine Woche (Abbildung 61, links und 62, links) nach Kryoläsion und Tamoxifen-Induktion eine Expression des mCherry-Reporterproteins in der BZ und in BZ-nahen Bereichen der Narbe. Das Zentrum der Narbe war mCherry⁻. Zwei Wochen (Abbildung 61, Mitte und 62, Mitte) nach dem Infarkt war die mCherry-Fluoreszenz über die gesamte Narbe verteilt zu beobachten. Auch 12 Wochen nach Kryoinfarkt (Abbildung 61, rechts und 62, rechts) konnte die mCherry-Expression noch im Bereich der BZ und in der gesamten Narbe nachgewiesen werden. In dem mCherry⁺ Bereichen war mit Hilfe von Cx43-Immunfärbungen zu allen drei Zeitpunkten eine erhöhte Cx43-Expression zu beobachten. Im Gegensatz dazu war der Narbenbereich aller Kryo-Kontrollherzen mCherry⁻ und zeigte nur eine sehr schwache Cx43-Expression auf (Abbildung 61). Das beobachtete Transgen-Expressionsmuster bestätigte die Ergebnisse der makroskopischen Untersuchung der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Herzen (vgl. Kapitel 4.5.3.1). In mCherry⁺ Bereichen der BZ und der Narbe wurden eine Woche nach Kryoläsion und Tamoxifen-Induktion der mFBs-Marker ASMAC und der allgemeine FBs-Marker Vimentin detektiert (Abbildung 62, links; Abbildung 63 oben), das Zentrum der Narbe war ASMAC-negativ (ASMAC⁻) und Vimentin-negativ (Vimentin⁻). Zwei Wochen nach Infarkt war die mFBs-charakteristische ASMAC-Expression nur noch im Zentrum der Narbe zu beobachten (Abbildung 62, Mitte; Abbildung 63, Mitte). In Langzeit-Untersuchungen 12 Wochen nach Infarkt und Transgen-Induktion war der gesamte Narbenbereich ASMAC⁻. Es waren ausschließlich ASMAC-positiv (ASMAC⁺) Blutgefäße im Narbenbereich zu sehen (Abbildung 62, rechts, Abbildung 63, unten). Dies deutet darauf hin, dass sich die FBs während der ersten zwei Wochen nach Infarkt im aktivierten mFBs-Differenzierungsstadium befinden und bei Ausreifung des Infarktes, wie von Fu et al. (2018) beschrieben, in den Zustand der

ASMAC⁻ Matrifibrozyten übergehen. Im Gegensatz zu ASMAC wurde die Expression von Vimentin, einem allgemeinen FBs-Marker, sowohl zwei- als auch 12 Wochen nach Kryoläsion über den gesamten Narbenbereich verteilt detektiert (Abbildung 62, Mitte, rechts). Das beschriebene Expressionsmuster von ASMAC und Vimentin war auch in den Kryo-Kontrollherzen zu finden (Abbildung 62). Aufgrund dieser Befunde kann davon ausgegangen werden, dass die Überexpression von Cx43 keinen Einfluss auf den Differenzierungsstatus der FBs während der Infarktbildung hat. Mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki67 wurde die Zellproliferation im Narbenbereich Kryo-infarzierter Cx43-heterozygoter Mäuse untersucht. Detailaufnahmen von der BZ und dem Infarktzentrum zeigen eine Woche nach Kryoinfarkt in BZ-nahen Infarktbereichen zahlreiche Ki67-positive (Ki67⁺) Zellkerne. Einige dieser proliferierenden Zellen sind sowohl mCherry⁺ als auch ASMAC⁺ und sind somit mFBs (Abbildung 63, oben links). Bei den übrigen mCherry⁻ und ASMAC⁻ Zellen könnte es sich z.B. um Immunzellen handeln. Im Infarktzentrum befanden sich nur sehr wenige Ki67⁺ proliferierende Zellen, die weder mCherry⁺ noch ASMAC⁺ waren (Abbildung 63, oben rechts). Zwei Wochen nach Infarkt wurden nur noch vereinzelt Ki67⁺ Zellkerne im Bereich der BZ und im Infarktzentrum detektiert, was darauf hindeutet, dass die Proliferationsphase der Infarktbildung weitgehend abgeschlossen war (Abbildung 63, Mitte). Zu diesem Zeitpunkt war die ASMAC-Expression nicht mehr in der BZ zu beobachten, sondern nur noch im Zentrum der Narbe. Der gesamte Narbenbereich war, wie auch in Abbildung 61 und 62 gezeigt, von mCherry⁺ (m)FBs besiedelt (Abbildung 63, Mitte). Langzeit-Untersuchungen zeigten 12 Wochen nach Infarkt keine Proliferation oder ASMAC-Expression mehr im gesamten BZ- und Narbenbereich (Abbildung 63, unten). Bei Proliferationsanalysen von Kryo-Kontrollherzen wurden gleiche Ergebnisse beobachtet (nicht gezeigt).

Insgesamt kann somit während der Infarktausbildung eine Migration der mFBs von der BZ aus (eine Woche nach Infarkt) bis hin zum Zentrum der Narbe (zwei- und 12 Wochen nach Infarkt) beobachtet werden (Abbildungen 61, 62). Proliferationsanalysen unterstützen diese Migrationsbeobachtungen (Abbildung 63).

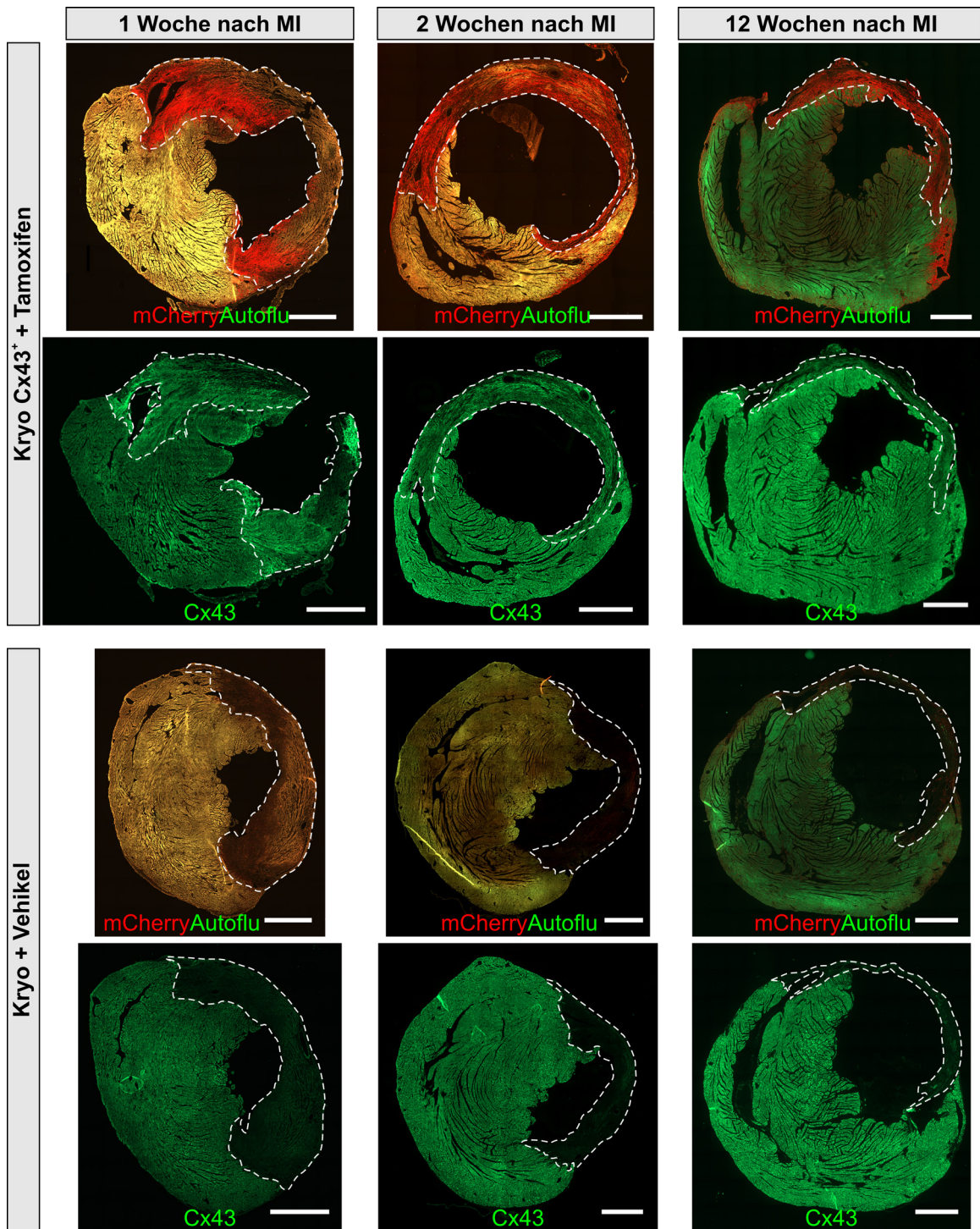


Abbildung 61: Analyse der Transgenexpression in Übersichtsaufnahmen von Herzquerschnitten der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie ein-, zwei- und 12 Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.

Mikroskopische Aufnahmen von Herzquerschnitten eine- (links) zwei- (Mitte) und 12 Wochen (rechts) nach Kryoläsion und Tamoxifen-Induktion. mCherry- und Autofluoreszenz (oben), Cx43-Expression (unten). Der Narbenbereich ist mit einer weiß-gestrichelten Linie markiert; Autofluoreszenz (oben) bzw. Cx43 (unten) (grün), mCherry (rot). 10 µm Kryoschnitte; Größenbalken = 1 mm.

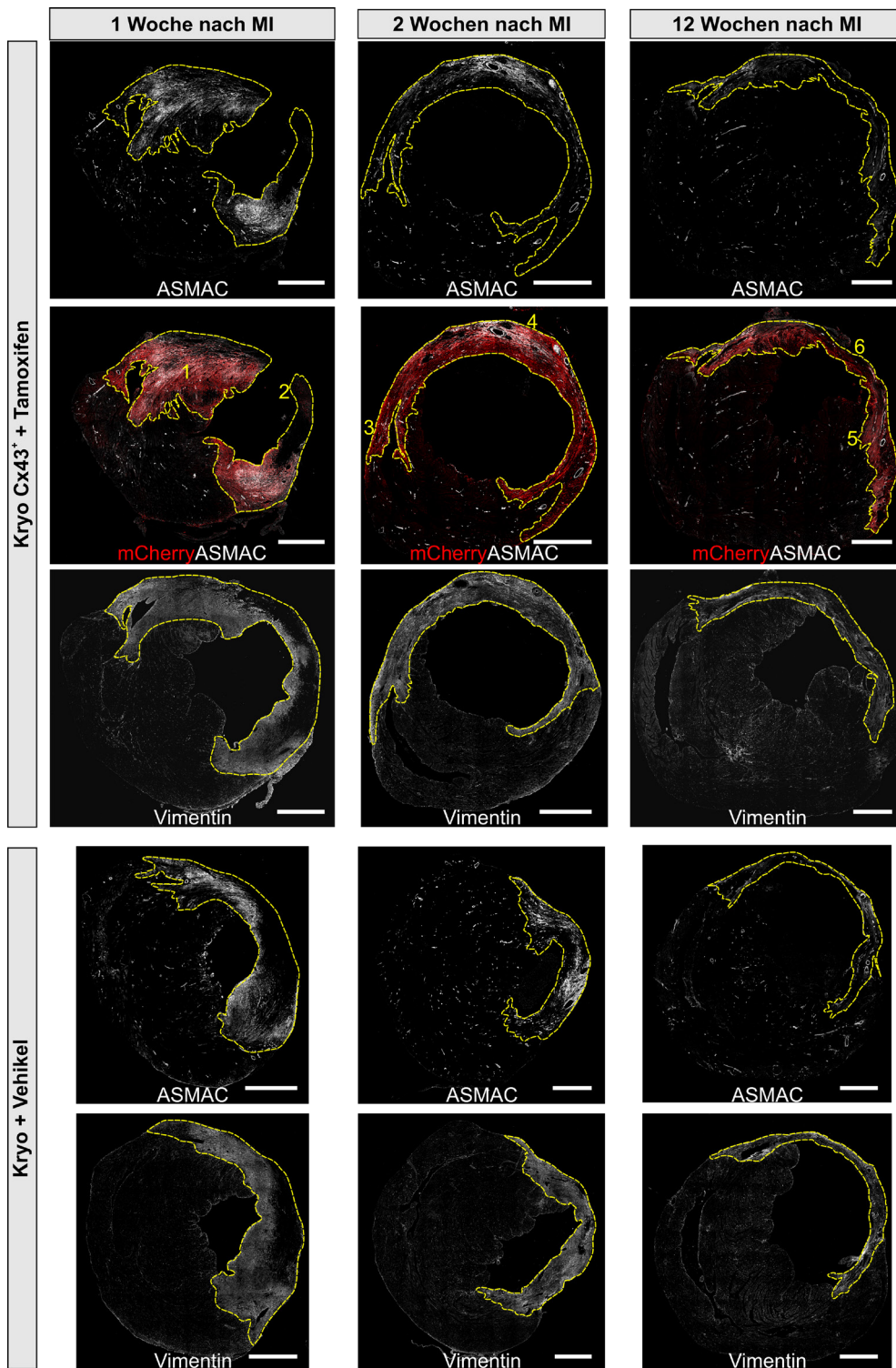


Abbildung 62: Mikroskopische Dokumentation der Migration von mFBs während der Wundheilung bzw. des kardialen Remodelings mit Hilfe von Übersichtsaufnahmen von Herzquerschnitten der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie ein-, zwei- und 12 Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.

Tamoxifen-induzierte transgene- sowie Vehikel-behandelte Kryo-Kontrollherzen eine- (links), zwei (Mitte) und 12 Wochen (rechts) nach Kryoläsion. ASMAC-Expression (oben, weiß), Kofärbung von ASMAC (weiß) und mCherry (rot) (Mitte), Vimentinfärbung (unten, weiß) von Kryo Cx43^{+/+} + Tamoxifen-Herzen. Der Narbenbereich ist mit einer gelb-gestrichelten Linie markiert; gelbe Zahlen kennzeichnen die Bereiche der Detailaufnahmen in Abbildung 63. 10 µm Kryoschnitte; Größenbalken = 1 mm.

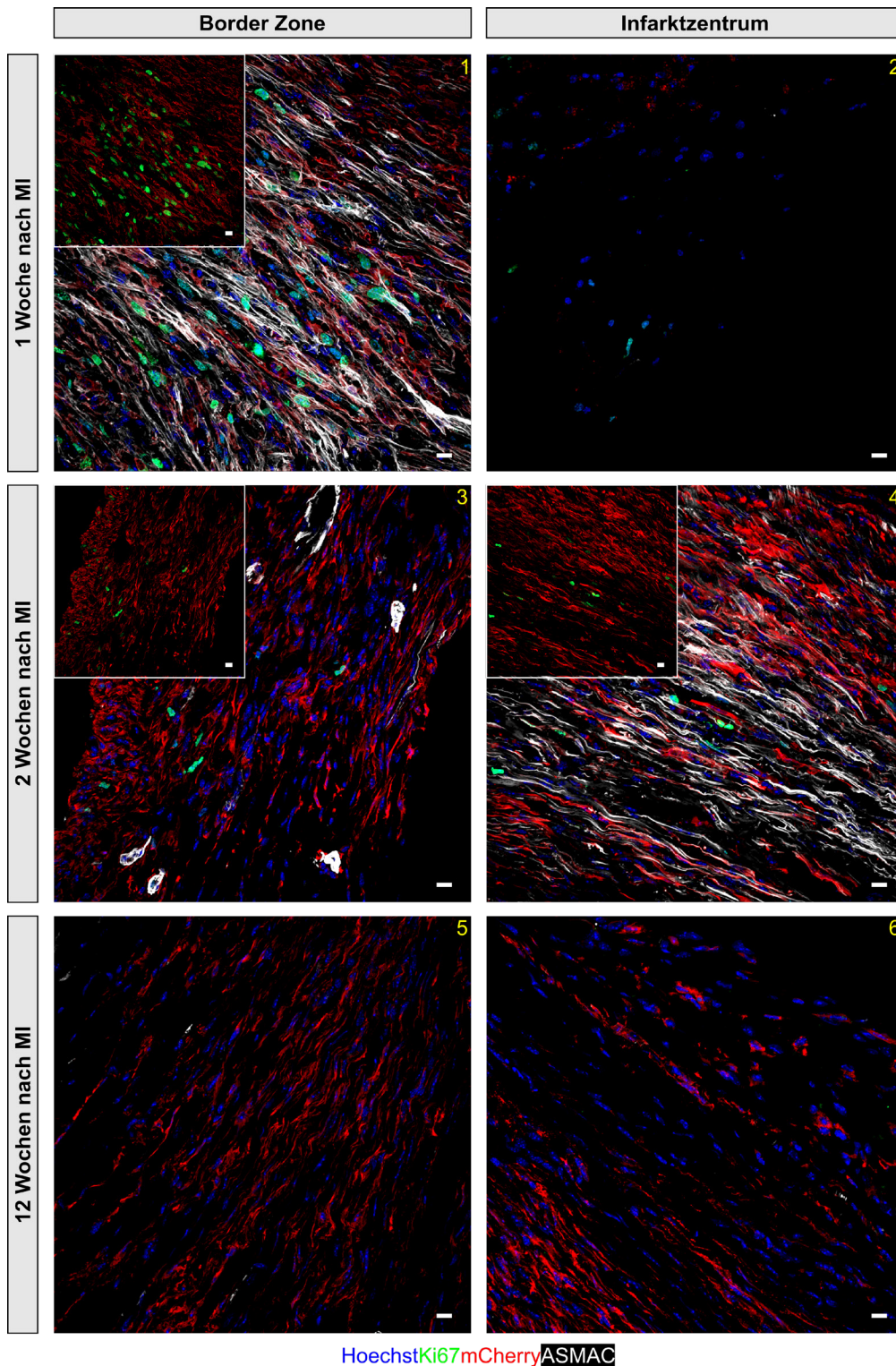


Abbildung 63: Konfokale Analyse der Proliferation im BZ- und Infarktbereich der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie während der Wundheilung bzw. des kardialen Remodelings ein-, zwei- und 12 Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.

Aufnahmen von Immunfluoreszenz-gefärbten Herzquerschnitten von Cx43-heterozygoten Mäusen ein- (oben), zwei- (Mitte) und 12 Wochen (unten) nach Kryoläsion und Tamoxifen-Induktion. Die gelben Zahlen zeigen die in den Übersichtsaufnahmen in Abbildung 62 gekennzeichneten Infarkt- und BZ-Bereiche. Zellkernfärbung (Hoechst, blau), Ki67 (Proliferationsmarker, grün), ASMAC (mFB-Marker, weiß), mCherry (rot). 10 µm Kryoschnitte; Größenbalken = 10 µm.

4.5.3.5.2 Mikroskopische Aufnahmen ein- und zwei Wochen nach Kryoinfarkt

In den oben beschriebenen Übersichtsaufnahmen war die Transgenexpression auf die BZ und den Infarktbereich begrenzt, daher wurden diese Bereiche anschließend im Detail mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Von besonderem Interesse war, ob es zur Ausbildung von Cx43-GJs zwischen Cx43-überexprimierenden mFBs und KMs der BZ kommt, was potenziell auf eine heterozelluläre Kopplung hindeuten würde.

Fluoreszenzfärbungen von Herzquerschnitten der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie zeigten bereits eine Woche nach Kryoläsion und Tamoxifen-Induktion die Expression des mCherry-Fluoreszenzreporterproteins in der BZ und in BZ-nahen Bereichen der Narbe (Abbildung 64A). Das Zentrum der Narbe war mCherry⁻ (Abbildung 64C). In den mCherry⁺-Bereichen war zudem eine erhöhte Cx43-Expression zu beobachten (Abbildung 64A). In der BZ und Narbe von Kryokontrollherzen war Cx43 vereinzelt in sehr geringem Maße detektierbar, die Expression von mCherry war nicht zu beobachten (Abbildung 64B, D). Im Zentrum der Narbe des transgenen Tamoxifen-induzierten Herzens wurde Cx43 detektiert. In diesem Bereich war aber keine mCherry- oder P2A-Expression zu sehen, sodass das Cx43 vermutlich endogen von absterbenden KMs exprimiert wurde (Abbildung 64C, unten). Das beobachtete Transgen-Expressionsmuster bestätigte die Ergebnisse der makroskopischen und mikroskopischen Untersuchung der transgenen Herzen (vgl. Kapitel 4.5.3.1, Kapitel 4.5.3.5.1).

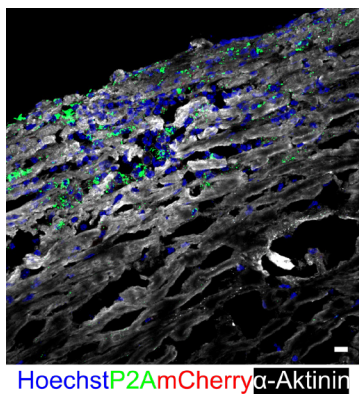
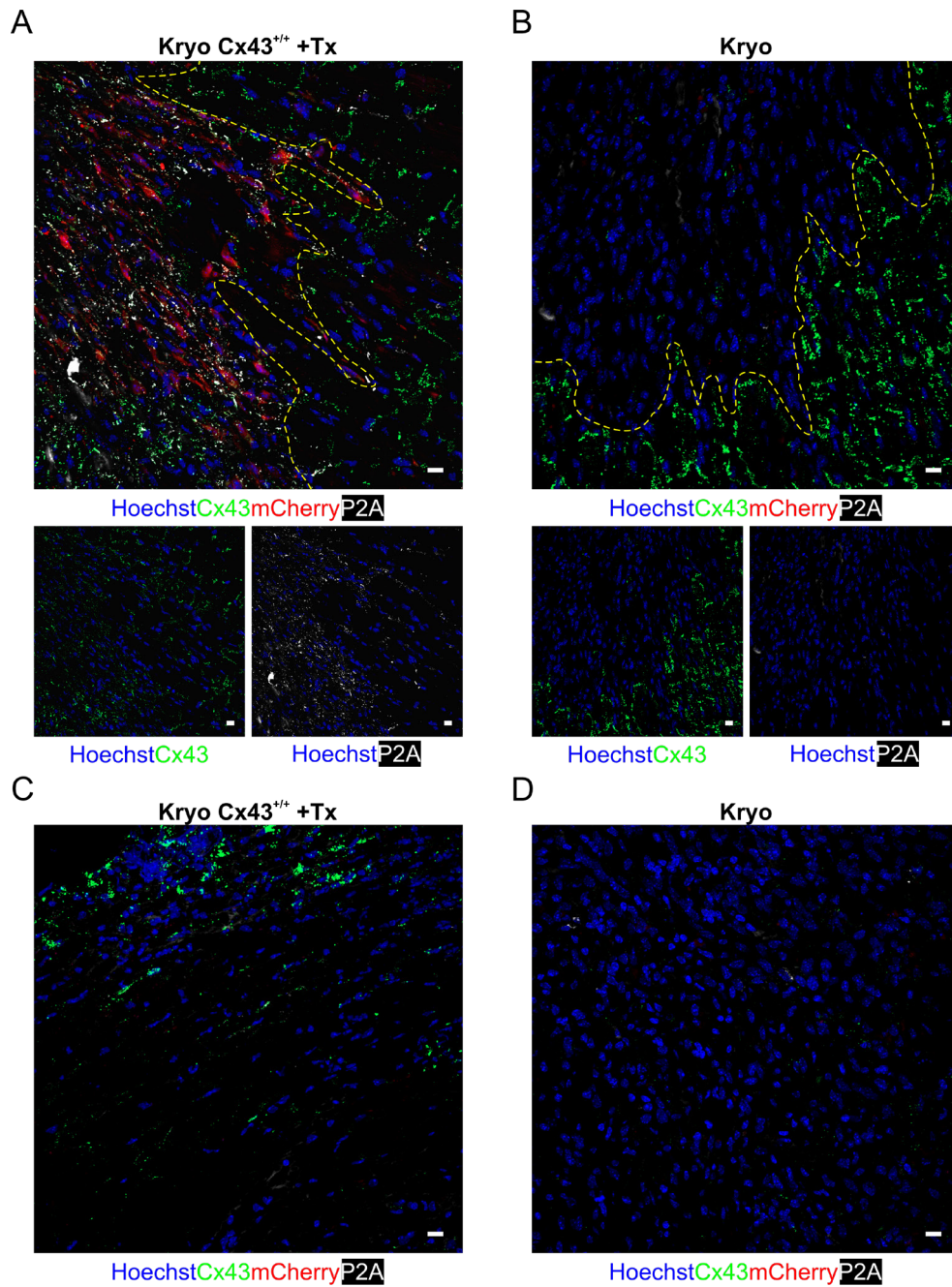


Abbildung 64: Bestimmung der zellulären Lokalisation der Cx43- und mCherry-Expression mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen in Herzquerschnitten der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie eine Woche nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.

Konfokale Aufnahmen der (Über-)Expression von Cx43, P2A und mCherry in der BZ (**A**) und im Zentrum der Narbe (**C**) transgener Tamoxifen-induzierter Herzen sowie in Kryo-Kontrollherzen im Bereich der BZ (**B**) und dem Zentrum der Narbe (**D**). Der Übergangsbereich von Narbe zu gesundem Gewebe (BZ) ist mit einer weiß-gestrichelten Linie markiert; Zellkernfärbung (Hoechst, blau), Cx43 (grün), mCherry (rot), P2A (**A, B, C** oben) und α -Aktinin (**C** unten) (weiß). 10 μ m Kryoschnitte; Größenbalken = 10 μ m.

Zwei Wochen nach Kryoläsion konnte im gesamten Narbenbereich transgener Tamoxifen-induzierter Mäuse mCherry-Fluoreszenz und eine erhöhte Cx43-Expression beobachtet werden (Abbildung 65A, C). Der (m)FB-reiche Narben- und BZ-Bereich der Kryokontrollherzen war mCherry und wies nur sehr wenig Cx43-Protein auf (Abbildung 65B, D). Das beobachtete Transgen-Expressionsmuster bestätigte die Ergebnisse der makroskopischen- und mikroskopischen Übersichts-Untersuchung der transgenen Herzen (vgl. Kapitel 4.5.3.1, Kapitel 4.5.3.5.1).

Die Einwanderung Cx43-überexprimierender mFBs lässt die Frage zu, ob es zur heterozellulären Kopplung von (m)FBs mit KMs der BZ über Cx43 kommt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zwei Wochen nach der Kryoläsion verschiedene Immunfluoreszenzfärbungen an Herzquerschnitten transgener Tamoxifen-induzierter Mäuse der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie durchgeführt. Durch eine α -Aktinin Färbung wurden KMs (Querstreifung) angefärbt (Abbildung 66A, B). mCherry diente als Marker der (m)FBs und WGA wurde als Zellmembranmarker eingesetzt (Abbildung 66C), sodass KMs und (m)FBs anhand ihrer Färbung und Zellform voneinander unterschieden wurden. Gleichzeitig wurde gegen Cx43 gefärbt und es zeigte sich, dass Cx43 nicht nur in den End-zu-End-Kontakten benachbarter KMs, sondern auch an Berührungspunkten von mCherry⁺ (m)FBs und KMs beobachtet werden konnte (Abbildung 66). Eine heterozelluläre Kopplung von KMs und (m)FBs über Cx43-GJs wäre somit potenziell möglich.

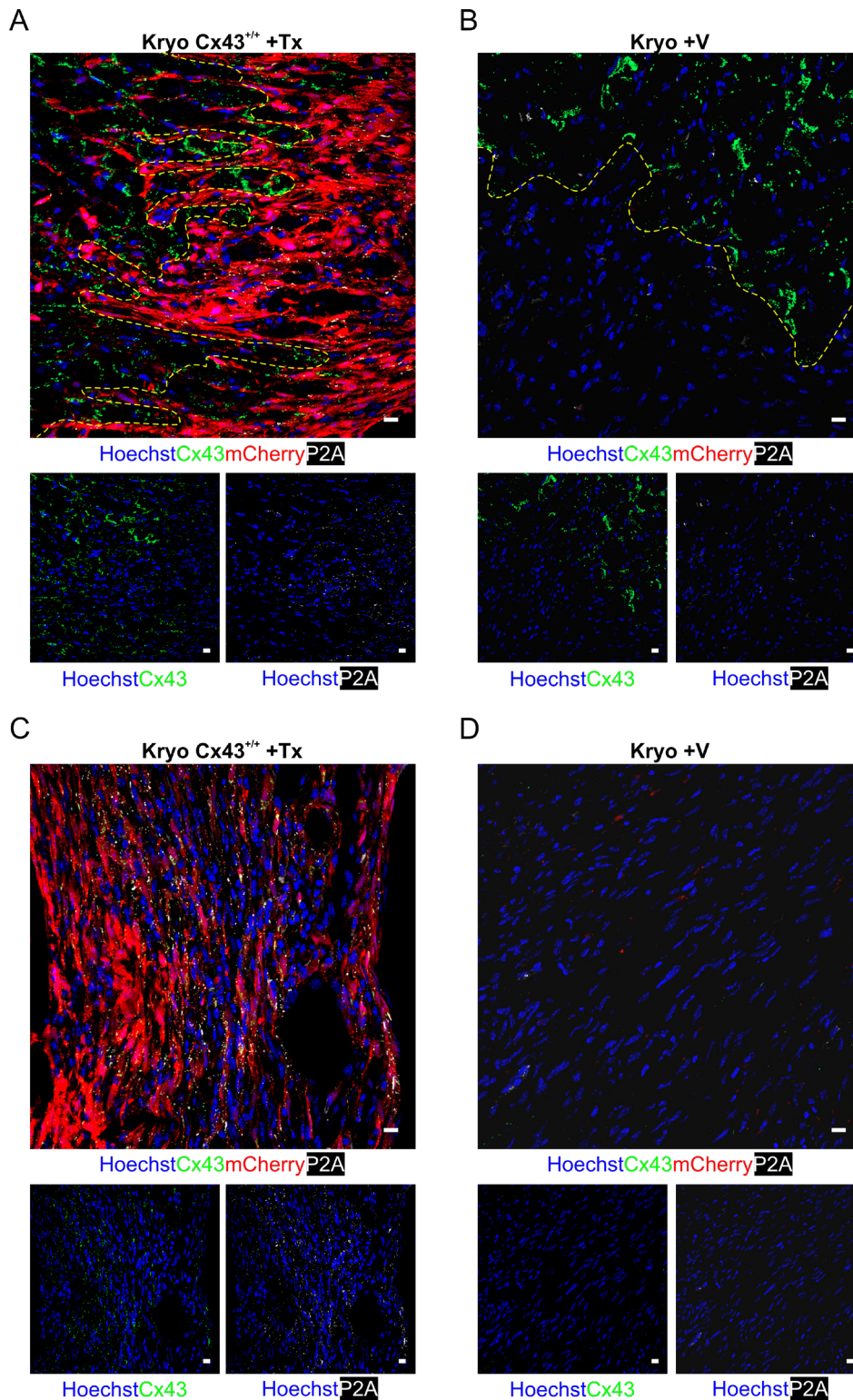


Abbildung 65: Bestimmung der zellulären Lokalisation der Cx43- und mCherry-Expression mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen in Herzquerschnitten der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.

Konfokale Aufnahmen der (Über-)Expression von Cx43, P2A und mCherry in der BZ (A) und im Zentrum der Narbe (C) transgener Tamoxifen-induzierten Herzen sowie in Kryo-Kontrollherzen im Bereich der BZ (B) und dem Zentrum der Narbe (D). Der Übergangsbereich von Narbe zu gesundem Gewebe (BZ) ist mit einer weiß-gestrichelten Linie eingezeichnet; Zellkernfärbung (Hoechst, blau), Cx43 (grün), mCherry (rot), P2A (weiß). 10 μm Kryoschnitte; Größenbalken = 10 μm.

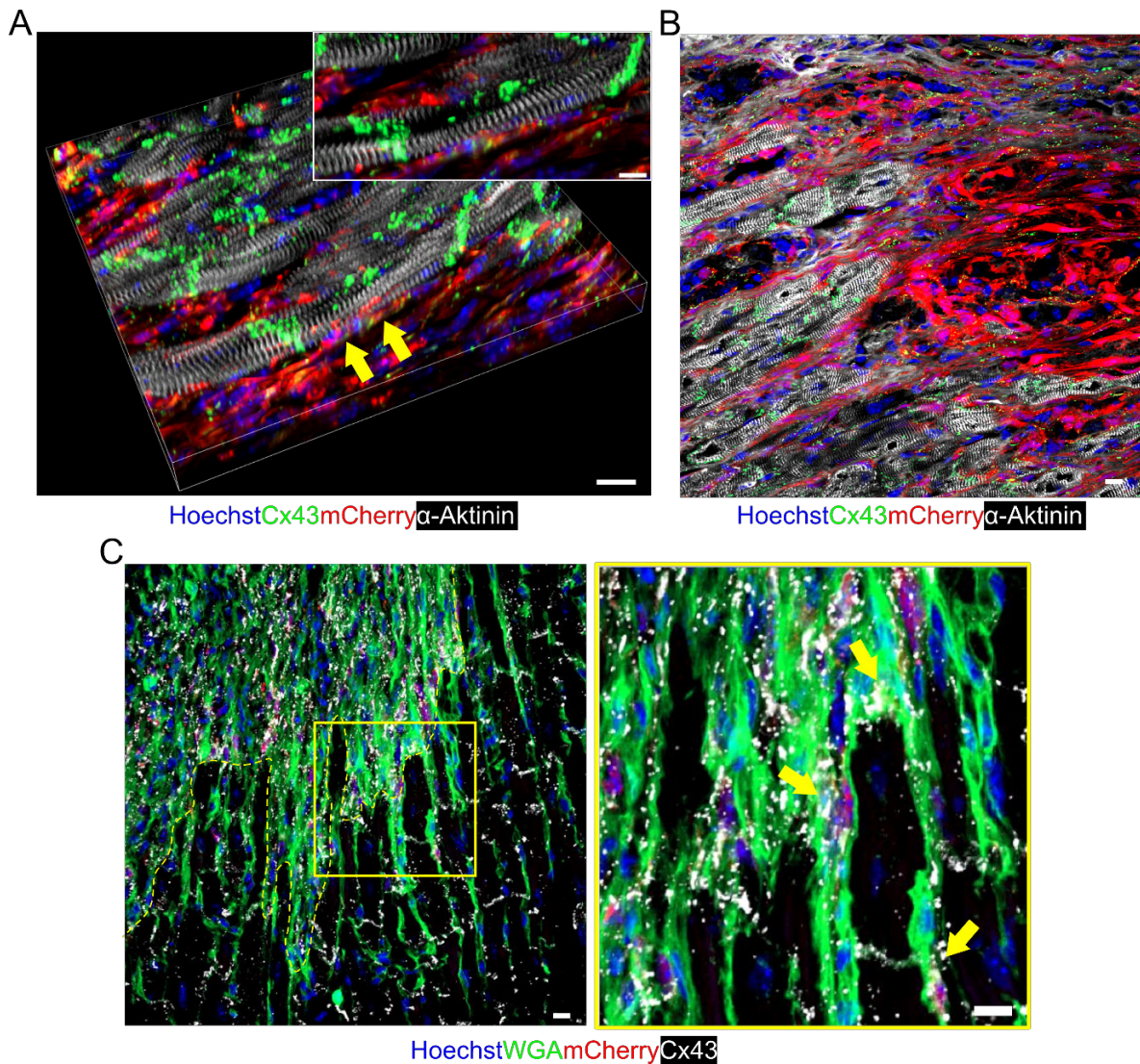


Abbildung 66: Mikroskopische Untersuchung einer möglichen heterozellulären Kopplung von (m)FBs und KMs via Cx43 mit Hilfe von Immunfluoreszenz-gefärbten Herzquerschnitten der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.

A: 3-D Rekonstruktion eines konfokalen Z-Stapels (11,2 μm) von 30 μm Kryoschnitten des Herzgewebes. Zellkernfärbung (Hoechst, blau), Cx43 (grün), mCherry (rot), P2A (weiß). Größenbalken = 10 μm ; eine potenzielle heterozelluläre Kopplung über Cx43 ist mit gelben Pfeilen markiert. **B, C:** Konfokale Detailaufnahmen. 10 μm Kryoschnitte; Größenbalken = 10 μm . **B:** Zellkernfärbung (Hoechst, blau), Cx43 (grün), mCherry (rot), α -Aktinin (weiß). **C:** Zellkernfärbung (Hoechst, blau), WGA (grün), mCherry (rot), Cx43 (weiß); eine potenzielle heterozelluläre Kopplung über Cx43 ist mit gelben Pfeilen markiert.

4.5.3.6 Infarktgrößenbestimmung

Die Größe des Infarkts ist, wie in Kapitel 4.4.2.3 beschreiben, relevant für die Herzfunktion und kann auch die Inzidenz von VTs beeinflussen. Daher wurde zwei Wochen nach Kryoläsion die Infarktgröße in den Herzen der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mäuse makroskopisch (Abbildung 67) und mikroskopisch (Abbildung 68) bestimmt. Da ein Kryostempel mit definiertem

Durchmesser (3,5 mm) verwendet wurde, sollten Unterschiede in der Infarktgröße auf die Überexpression von Cx43 in (m)FBs der Narbe zurückzuführen sein.

Sowohl bei der makroskopischen Bestimmung der Infarktfläche (Abbildung 67; vgl. Kapitel 3.2.9.1.1), als auch bei der mikroskopischen Analyse des Infarktvolumens mittels Sirius-red/Fast-green Färbungen von Herzquerschnitten (Abbildung 68; vgl. Kapitel 3.2.9.1.2) konnte kein signifikanter Unterschied in der Infarktgröße bei dem Vergleich der Kryo-Kontrollgruppe (Kryo + V) und den beiden Cx43-überexprimierenden Gruppen gefunden werden (Infarktfläche: Kryo + V = 18,85 % ± 0,70 %; Kryo Cx43^{+/-} + Tx = 20,21 % ± 0,81 %; Kryo Cx43^{+/+} + Tx = 20,68 % ± 0,98 %; Infarktvolumen: Kryo + V = 8,98 % ± 1,08 %; Kryo Cx43^{+/-} + Tx = 8,96 % ± 0,34 %; Kryo Cx43^{+/+} + Tx = 10,22 % ± 0,22 %). Auch der transmurale Anteil der Narbe war zwischen den drei Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Transmuraler Anteil der Narbe: Kryo + V = 63,34 % ± 4,04 %; Kryo Cx43^{+/-} + Tx = 66,12 % ± 3,84 %; Kryo Cx43^{+/+} + Tx = 69,03 % ± 5,97 %). Sirius-red/Fast-green Färbungen der Herzquerschnitte zeigten außerdem, dass die Narbe zwei Wochen nach Infarkt noch kleine Bereiche toter KMs beinhaltete (grün) (Abbildung 68A). Diese waren 12 Wochen nach Infarkt nicht mehr zu sehen (Abbildung 68B).

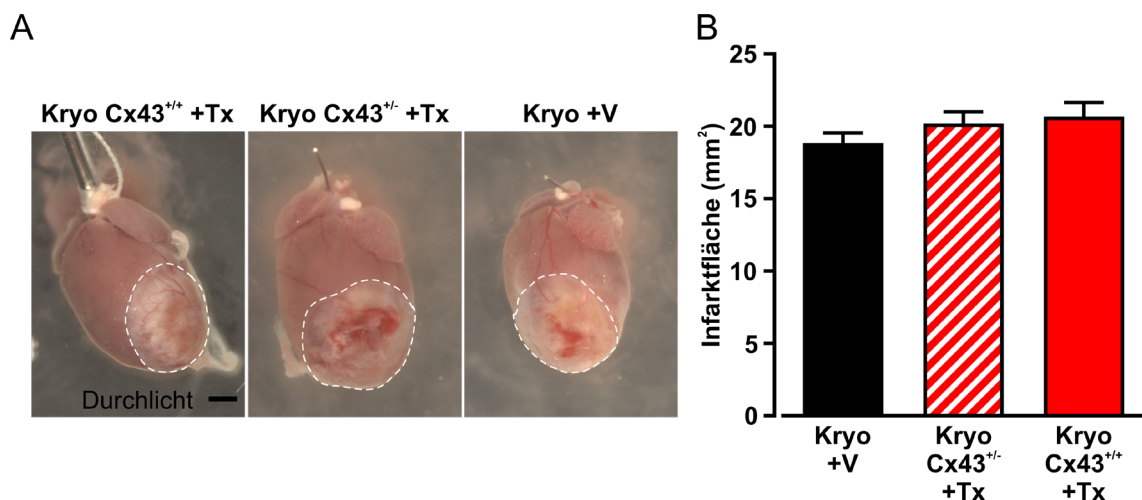


Abbildung 67: Makroskopische Bestimmung der Infarktfläche transgener Herzen der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.

A: Makroskopische Aufnahmen Kryo-infarzierter Herzen. Größenbalken = 1 mm; 7x Vergrößerung. **B:** Vergleich der Infarktfläche der Cx43-überexprimierenden Herzen (Kryo Cx43^{+/-} + Tamoxifen, Kryo Cx43^{+/+} + Tamoxifen) mit der Infarktfläche Vehikel-behandelter Kryo-Kontrollherzen. Alle Werte sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Einfaktorielle ANOVA; n(Kryo + V) = 18; n(Kryo Cx43^{+/-} + Tx) = 16; n(Kryo Cx43^{+/+} + Tx) = 6; nicht signifikant unterschiedlich: p > 0,05.

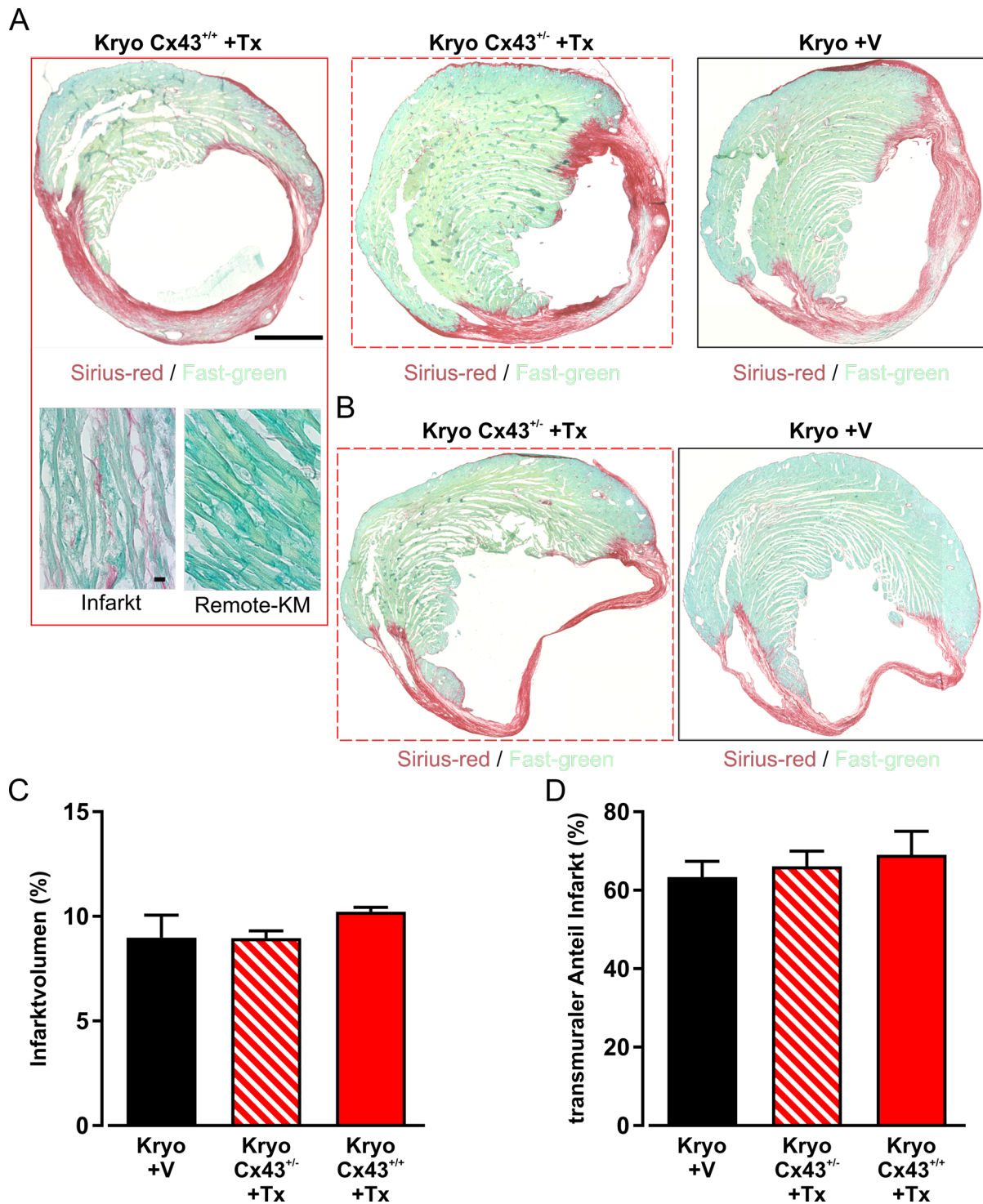


Abbildung 68: Mikroskopische Bestimmung des Infarkt volumens transgener Herzen der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.

Übersichtsaufnahmen Sirius-red/Fast-green-gefärbter Herzquerschnitte zwei- (A) und 12 Wochen (B) nach Kryoläsion und Tamoxifen-Induktion. Größenbalken = 1 mm; Größenbalken = 10 µm (Detailaufnahme). Infarkt volumen (%) (C) und transmuraler Anteil der Narbe (%) (D) von Cx43-überexprimierenden Herzen (Kryo Cx43^{+/-} + Tamoxifen, Kryo Cx43^{+/+} + Tamoxifen) und Vehikel-behandelten Kryo-Kontrollherzen. Alle Werte sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Einfaktorielle ANOVA; n(Kryo + V) = 5; n(Kryo Cx43^{+/-} + Tx) = 5; n(Kryo Cx43^{+/+} + Tx) = 3; nicht signifikant unterschiedlich: p > 0,05.

4.5.4 *In vivo* Analyse der Herzfunktion zwei Wochen nach Kryoinfarkt

Um den Einfluss der Cx43-Überexpression in mFBs nach Kryoinfarkt auf die Herzfunktion zu analysieren, wurde diese bei Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mäusen zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion in Analogie zu Kapitel 4.3.3 *in vivo* getestet.

4.5.4.1 Echokardiographie

Zwei Wochen nach Versuchsbeginn wurde die linksventrikuläre Pumpfunktion des Mausherzens, wie in Kapitel 4.3.3.1 detailliert beschrieben, mittels nicht-invasiver, hochauflösender Echokardiographie unter Isofluran-Narkose untersucht.

Beide infarzierten Gruppen (Kryo + V; Kryo Cx43^{+/-} + Tx) wiesen verglichen mit den Sham-behandelten Gruppen (Sham + V, Sham + Tx) signifikant erniedrigte Werte sowohl für die EF als auch für die FS auf. Im Vergleich zu infarzierten Kontrollmäusen zeigten Tamoxifen-induzierte, Cx43-überexprimierende Mäuse jedoch eine signifikant bessere EF sowie FS (Sham + V: EF = 61,1 % ± 1,6 %; FS = 20,87 % ± 0,8 %; Sham + Tx: EF = 57,5 % ± 2,5 %; FS = 18,62 % ± 0,9 %; Kryo + V: EF = 38,1 % ± 1,7 %; FS = 8,7 % ± 0,7 %; Kryo Cx43^{+/-} + Tx: EF = 46,6 % ± 1,5 %; FS = 13,2 % ± 0,7 %) (Abbildung 69A, B). Neben diesen Parametern wurde auch die HF (bpm) der Versuchstiere engmaschig kontrolliert, um die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Gruppen zu gewährleisten (Sham + V: HF = 453 bpm ± 7 bpm; Sham + Tx: HF = 457 bpm ± 15 bpm; Kryo + V: HF = 470 bpm ± 9 bpm; Kryo Cx43^{+/-} + Tx: HF = 452 bpm ± 8 bpm) (Abbildung 69C). Um eine mögliche Erklärung für die anhand EF und FS festgestellte verbesserte Pumpfunktion nach Überexpression von Cx43 in (m)FBs der Narbe und BZ zu finden, wurde die Beweglichkeit der infarzierten Vorderwand geprüft. Dazu wurde die Differenz aus der Vorderwanddicke während der Systole und der Vorderwanddicke während der Diastole berechnet. Diese Differenz war bei den Kryo-Kontrollmäusen signifikant niedriger als bei den Cx43-überexprimierenden, Kryo-infarzierten Mäusen (Δ Vorderwandverdickung: Sham + V = 0,51 mm ± mm; Sham + Tx = 0,42 mm ± mm; Kryo + V = 0,04 mm ± mm; Kryo Cx43^{+/-} + Tx = 0,21 mm ± mm). Dieses Ergebnis deutet an, dass die Überexpression von Cx43 in (m)FBs nach einem Herzinfarkt eine verbesserte Beweglichkeit der Vorderwand und somit eine bessere Pumpfähigkeit des Herzens zur Folge hat (Abbildung 69D, E).

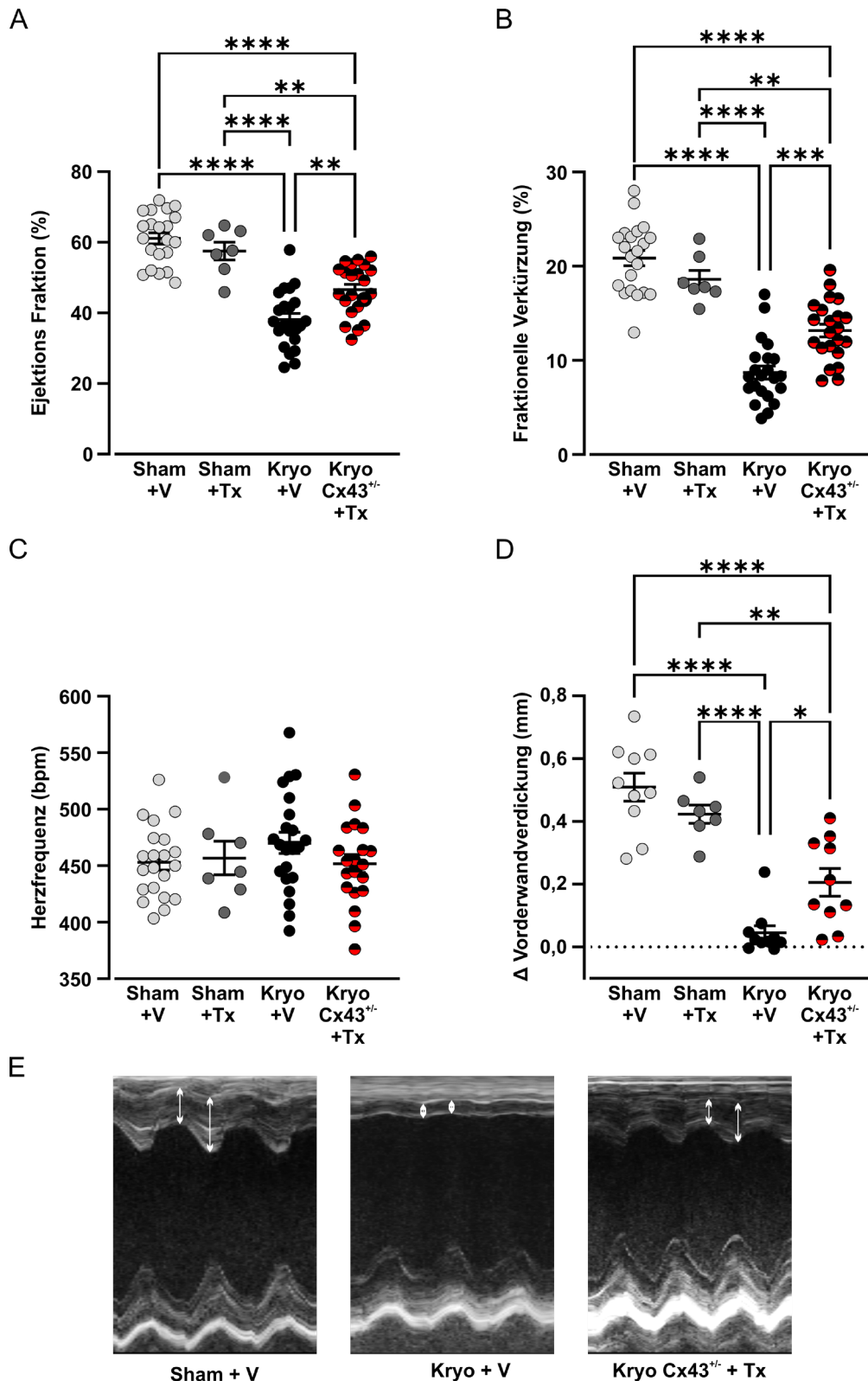


Abbildung 69: Analyse der linksventrikulären Pumpfunktion von Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mäusen zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Transgeninduktion mittels Echokardiographie.

EF (%) (**A**) und FS (%) (**B**) in Sham-operierte Mäusen (Sham + Vehikel, Sham + Tamoxifen), Kryo-Kontrollmäusen (Kryo + Vehikel) und Tamoxifen-induzierten Kryo-infarzierten Mäusen (Kryo Cx43^{+/-} + Tamoxifen). n(Sham + V) = 21; n(Sham + Tx) = 7; n(Kryo + V) = 22; n(Kryo Cx43^{+/-} + Tx) = 22. **C**: Die HF (bpm) war unter den vier Versuchsgruppen nicht signifikant unterschiedlich. n(Sham + V) = 21;

n(Sham + Tx) = 7; n(Kryo + V) = 22; n(Kryo Cx43^{+/-} + Tx) = 20. **D:** Bestimmung der Differenz aus der Vorderwanddicke während der Systole und der Vorderwanddicke während der Diastole (Δ Vorderwandverdickung (mm)). n(Sham + V) = 10; n(Sham + Tx) = 7; n(Kryo + V) = 10; n(Kryo Cx43^{+/-} + Tx) = 10. **E:** M-Mode Bilder: Sham + V (links), Kryo + V (Mitte), Kryo Cx43^{+/-} + Tx (rechts) zeigen die Beweglichkeit der jeweiligen Vorderwand. Die Dicke der Vorderwand in Systole und Diastole ist mit einem weißem Doppelpfeil markiert. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Einfaktorielle ANOVA; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$; nicht signifikant unterschiedlich: $p > 0,05$.

4.5.4.2 Elektrophysiologische Untersuchungen *in vivo* (EPU)

Die VT-Empfindlichkeit der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mäuse für VTs wurde in Analogie zu Kapitel 4.3.3.2 *in vivo* in einer invasiven EPU unter Isofluran-Narkose getestet. Dabei wurden die Mäuse über einen in den rechten Ventrikel vorgeschobenen Katheter mit einem Burst-Protokoll elektrisch stimuliert (5 V, 1 & 2 mA siehe Kapitel 3.2.6.2).

Der Vergleich der Vehikel-behandelten Kryo-Kontrollgruppe mit der Kryo-infarzierten, Tamoxifen-behandelten Gruppe sowie den beiden Sham-Gruppen (Sham + V, Sham + Tx) zeigte zwei Wochen nach Kryoinfarkt eine signifikant erniedrigte VT-Inzidenz von Mäusen, die Cx43 spezifisch in mFBs der Narbe überexprimierten oder Sham-behandelt worden waren (VT-Inzidenz: Sham + V = 46,7 %; Sham + Tx = 42,9 %; Kryo + V = 94,4 %; Kryo Cx43^{+/-} +Tx = 57,9 %) (Abbildung 70A). Die Anzahl der VTs pro 30 Stimuli (Abbildung 70B) sowie die Dauer der VTs (Abbildung 70C) im Verlauf des Burst-Protokolls war unter den vier miteinander verglichenen Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (VTs pro 30 Stimuli: Sham + V = 12,5 % \pm 5,3 %; Sham + Tx = 27,78 % \pm 1,1 %; Kryo + V = 19,22 % \pm 3,9 %; Kryo Cx43^{+/-} +Tx = 30 % \pm 7,9 %; VT Dauer: Sham + V = 0,62 s \pm 0,13 s; Sham + Tx = 0,47 s \pm 0,12 s; Kryo + V = 0,80 s \pm 0,10 s; Kryo Cx43^{+/-} +Tx = 0,97 s \pm 0,23 s).

Somit hatte eine spezifische Überexpression von Cx43 in mFBs der Narbe und der BZ zwei Wochen nach Kryoinfarkt eine protektive Auswirkung auf die Arrhythmie-Inzidenz nach Burst-Stimulation.

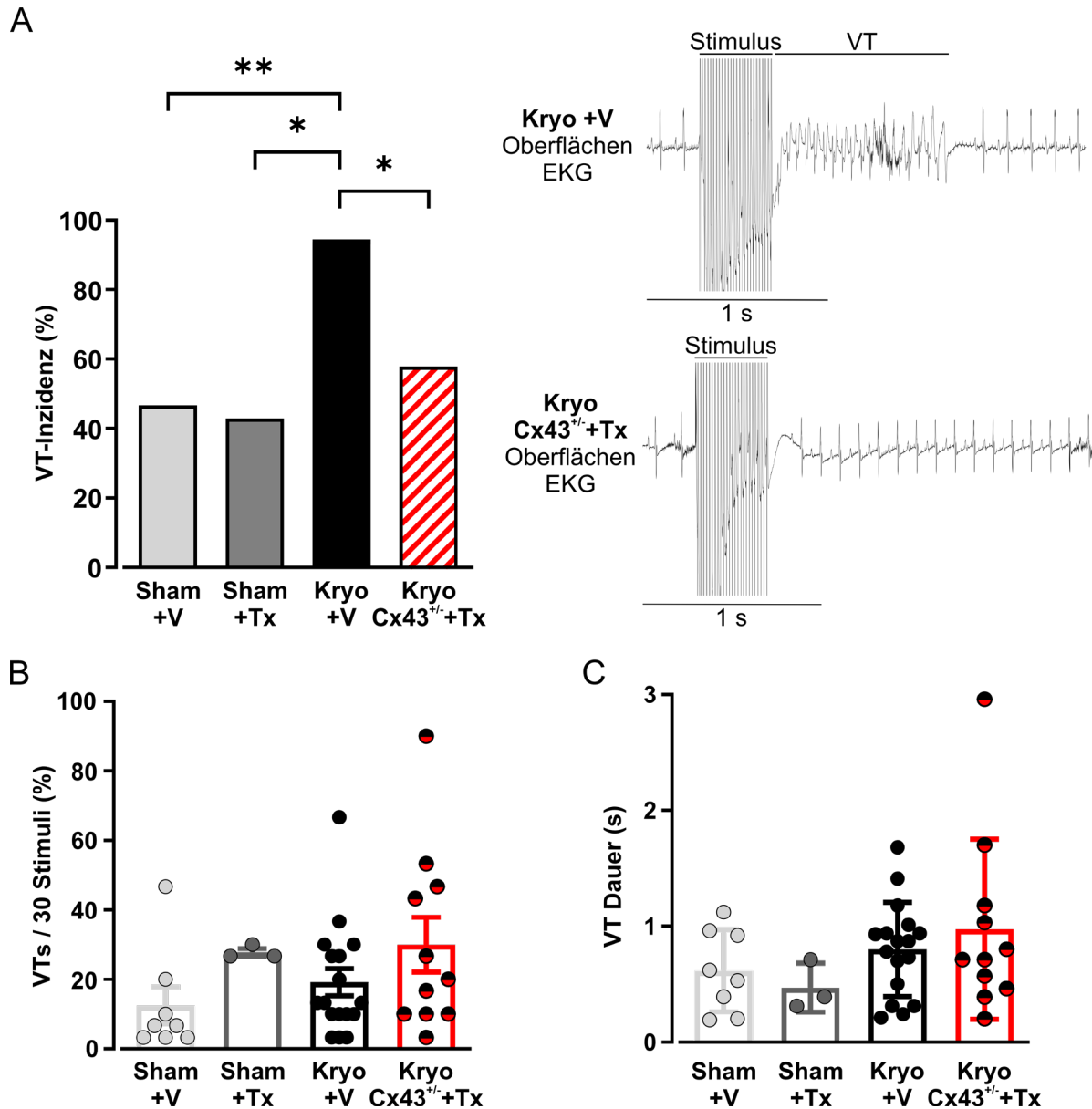


Abbildung 70: Untersuchung der elektrischen Vulnerabilität von Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mäusen zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Transgeninduktion mittels EPU.

A: VT-Inzidenz (%) während einer Burst-Stimulation (5 V, 1 & 2 mA). Beispielhafte Oberflächen EKG Ableitungen einer Kryo-Kontrollmaus und einer Kryo-infarzierten, Cx43-heterozygoten, Tamoxifen induzierten Maus (rechts). Exakter Fisher Test; $n(\text{Sham} + \text{V}) = 15$; $n(\text{Sham} + \text{Tx}) = 7$; $n(\text{Kryo} + \text{V}) = 18$; $n(\text{Kryo Cx43}^{+/-} + \text{Tx}) = 19$; $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; nicht signifikant unterschiedlich: $p > 0,05$. **B, C:** Qualitative Untersuchung der VTs während einer Burst-Stimulation (5 V, 1 & 2 mA). Der Prozentuale Anteil an VTs bei insgesamt 30 Stimuli (**B**) und die VT Dauer (s) (**C**) beim Ablauf des Burst-Protokolls. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Einfaktorielle ANOVA; $n(\text{Sham} + \text{V}) = 8$; $n(\text{Sham} + \text{Tx}) = 3$; $n(\text{Kryo} + \text{V}) = 17$; $n(\text{Kryo Cx43}^{+/-} + \text{Tx}) = 11$; nicht signifikant unterschiedlich: $p > 0,05$. Die EPUs wurden von Miriam Schiffer (Herzchirurgische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Bonn; Institut für Physiologie I, Universität Bonn) und Esther Carls (Herzchirurgische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es transgene Überexpressions-Modelle für Cx43 zuerst *in vitro* und dann in der Maus zu etablieren. Dieser Ansatz wurde gewählt, da aus früheren Publikationen bekannt ist, dass die ubiquitäre nicht induzierbare Überexpression von Cx43 embryonal letal ist. Mit diesen Modellen soll durch eine zelltypspezifische und zeitlich kontrollierte Induktion der Cx43-Überexpression die zellbiologische Bedeutung und die Funktion von Cx43 im Herzen untersucht werden. Dieses elegante genetische System kann darüber hinaus zur Erforschung des anti-arrhythmischen Potenzials einer gesteigerten Cx43-Expression in der Herzinfarkttnarbe und der BZ sowie zur Detektion unerwünschter Nebenwirkungen eingesetzt werden.

Es wurden neue genetische *in vitro* Modelle in murinen G4 ES- und HeLa-Zellen zur zeitlich induzierbaren Überexpression von Cx43 entwickelt. Mit Hilfe der transgenen G4 ES-Zellen wurde via Blastozysteninjektion ein entsprechendes *in vivo* Modell in Mäusen generiert, welches durch Einkreuzung verschiedener MCM-Deleter-Mauslinien eine zeitlich induzierbare Überexpression von Cx43 in KMs und mFBs erlaubt. Anhand der *in vitro* Modelle konnte demonstriert werden, dass das exogene, P2A-markierte Cx43 funktionelle GJs ausbildet. Diese hatten in Gegenwart von endogenem Cx43 sogar einen zusätzlichen Effekt auf die Diffusionsgeschwindigkeit eines Farbstoffes über die Zell-Zell-Verbindungen. Die Mauslinien (α MHC^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}, Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}) zeigten *in vivo* die gewünschte spezifische, Tamoxifen-induzierbare Transgenexpression in KMs bzw. mFBs. Interessanterweise wurde in Folge der KMs-spezifischen Cx43-Überexpression im gesunden Herzen eine Lateralisierung von Cx43 beobachtet. Diese hatte aber keine funktionellen Auswirkungen, da die Pumpfunktion der Herzen und insbesondere die Arrhythmie-Inzidenz der Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht verändert war. Diese wichtige Erkenntnis deutet darauf hin, dass die Korrelation von Lateralisierung und Post-Infarkt-Arrhythmien in diesem Mausmodell nicht besteht. Einer der wichtigsten Befunde ist, dass die mFBs-spezifische Überexpression von Cx43 zur Reduktion der VT-Inzidenz nach einem Herzinfarkt führt. Die zugrunde liegenden Mechanismen werden zurzeit noch untersucht (siehe Kapitel 5.5). Immunhistochemisch konnten im Bereich der BZ/Infarkttnarbe Anzeichen für eine mögliche heterozelluläre Kopplung von KMs und mFBs über Cx43 gefunden werden. Ferner führte die Überexpression in mFBs zu einer verbesserten Pumpfunktion der Mäuse nach MI. RNAseq-Analysen der Infarkttnarbe lassen darauf schließen, dass die mFBs-spezifische Überexpression von Cx43 nur einen verhältnismäßig geringen Einfluss auf die Expression anderer Gene hat.

5.1 Limitationen der ubiquitären Überexpression von Cx43 in der Maus

In der Literatur ist nur ein murines, genetisches Modell zur *in vivo* Überexpression von Cx43 zu finden (Ewart et al. 1997). Die ubiquitäre Überexpression von Cx43 führte bei den transgenen Mäusen zu einer verminderten postnatalen Lebensfähigkeit, welche durch Neuralrohrdefekte und Fehlbildungen des Herzens (Verengung des pulmonalen Ausflusstraktes, Anomalie der rechtsventrikulären konotrunkalen Region) begründet ist (Ewart et al. 1997). Diese interessanten Befunde sind aber schwierig zu interpretieren, da dieser Ansatz nach heutigen wissenschaftlichen Vorstellungen einige Nachteile birgt, wie u.a. die zufällige Integration des CMV-Cx43-Vektors in das Mausgenom, wodurch Mäuse mit unterschiedlicher Kopienzahl des Transgens entstanden. Ein Fluoreszenzreporterprotein oder eine andere Markierung des Cx43 zur Nachverfolgung der Transgenexpression wurden nicht angehängt. Außerdem war die Cx43-Überexpression weder zelltypspezifisch noch zeitlich kontrolliert induzierbar, sondern ubiquitär und durch die frühe Aktivität des CMV-Promotors bereits embryonal vorhanden, was zu der Ausprägung des oben beschriebenen Phänotyps führte. Dieser Phänotyp ähnelt dem von Cx43-KO-Mäusen (Rodríguez-Sinovas et al. 2021; Ya et al. 1998). Da die Menge an Cx43 bereits während der Embryonalentwicklung eine kritische Rolle zu spielen scheint (Delorme et al. 1997; Ruangvoravat und Lo 1992; Shin et al. 2020), ist es wie oben erläutert, schwierig die Ergebnisse zu interpretieren.

5.2 Generierung des induzierbaren Cx43-Überexpressions-Modells *in vitro* und *in vivo*

Um die oben beschriebenen Fehlbildungen des Herzens und die erhöhte Sterblichkeit der Mäuse zu verhindern, wurde daher ein zeitlich induzierbares CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-System entwickelt. Dies erlaubt die Überexpression von Cx43 erst nach der regulären Entwicklung des Herzens. Ein weiterer Vorteil dieses Modells ist auch die gezielte Integration einer einzigen Kopie der CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-Sequenz über homologe Rekombination in den Rs26-Lokus muriner G4 ES-Zellen. Der Rs26-Lokus ist für Gen-Targeting leicht zugänglich und weist nur eine geringe transkriptionelle Aktivität auf. Dies ermöglicht die gezielte Überexpression und es besteht im Gegensatz zur zufälligen Integration nicht die Gefahr, dass durch die Integration des Transgens in andere Gene bzw. Kontrollregionen (Silencer/Enhancer) unerwünschte Nebeneffekte entstehen. Darüber hinaus führt die Insertion von Genen in diesen Locus per se zu keiner phänotypischen Beeinträchtigung der Mäuse. Auch durch seine hohe Rate homologer Rekombination und der ubiquitär erreichbaren Expression des Zielgens während verschiedener Entwicklungsstufen,

ist der Rs26-Lokus im Mausgenom besonders geeignet für eine gezielte Integration eines Zielgens (Soriano 1999; Perez-Pinera et al. 2012). Für die Kontrolle der Transgenexpression wurde der CAG-Promotor verwendet, da er in Arbeiten unserer Gruppe und auch in der Literatur eine starke Expression in Muskelzellen in allen Stadien der embryonalen Entwicklung der Maus und nach der Geburt zeigt (Hesse et al. 2012; Kimura et al. 2021; Biankin et al. 2007). Durch die simultane Expression zweier Reportersequenzen werden Cx43-überexprimierende Zellen durch das Fluoreszenzreporterprotein mCherry markiert und gleichzeitig kann das exogene Cx43-Protein über den C-terminalen P2A-Anhang, welcher mittels Antikörper detektierbar ist, eindeutig lokalisiert werden. Es ist aber bekannt, dass die Markierung von Cx43 problematisch ist, da dies häufig die Expression, sowie die molekularen und funktionellen Eigenschaften der Cx43-GJs beeinflussen kann: Die interzelluläre Kommunikation von Zellen über GJs (GJIC) unterliegt einer strengen Kontrolle über verschiedene Mechanismen. GJs sind dynamische Strukturen. Um die Anzahl der GJs in ihrer Plasmamembran zu verändern, können Zellen die Geschwindigkeit der Connexin-Biosynthese, des Zusammenbaus zu GJs oder der Endozytose sowie des Abbaus von Connexinen modifizieren (Goodenough und Paul 2009). Cx43 hat eine relativ kurze Halbwertszeit von nur 1,5-5 Stunden (Leithe et al. 2018). Eine deutlich schnellere Regulation der GJIC kann über die Öffnung bzw. den Verschluss einzelner GJ-Kanäle erfolgen. Die Öffnungswahrscheinlichkeit von GJs kann durch zahlreiche Stimuli gesteuert werden wie z.B. durch Veränderungen der Spannung, des pH-Werts, der Kalziumkonzentration sowie der Phosphorylierung an Serin- oder Tyrosinresten des C-Terminus von Cx43 (Nielsen et al. 2012; Sosinsky und Nicholson 2005; Leithe et al. 2018). Phosphorylierungen durch verschiedene Protein-Kinasen (mitogen-activated protein kinase (MAPK), Proteinkinase C (PKC), Protein-Tyrosinkinase v-Src) an bestimmten Phosphorylierungsstellen des Cx43-C-Terminus inhibieren die GJIC, da sie z.B. den Connexin-Transport zur Membran und den Zusammenschluss zu GJs sowie die Leitfähigkeit und den Abbau von GJs beeinflussen. Beardslee und Lerner (2000) berichten außerdem, dass die bei ischämischen Herzerkrankungen beobachtete pro-arrhythmische elektrische Entkopplung der ventrikulären KMs mit der Dephosphorylierung von Cx43 in Zusammenhang stehen könnte.

Der C-Terminus von Cx43 ist aber nicht nur aufgrund seiner zahlreichen Phosphorylierungsstellen eine wichtige Domäne des Cx43-Proteins. Er bietet darüber hinaus auch eine Vielzahl an Interaktionsstellen für Proteine des Zytoskeletts (zonula occludens-1 (ZO-1), Tubulin) und für regulatorische Proteine des Zellwachstums, der Differenzierung und Migration (β -Catenin, Cellular Communication Network Factor 3 (CCN3), Cyclin E).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein genetisches Konstrukt gewählt, bei dem das sehr kurze P2A-Peptid an den C-Terminus des Cx43 fusioniert wird. Im Gegensatz zur IRES-Sequenz ermöglicht es die Expression des vor- und nachgeschalteten Gens in gleicher Menge (Mizuguchi et al. 2000). Neben der oben beschriebenen Reporterfunktion (P2A-Markierung am exogenen Cx43-Protein) ist das P2A ein besonders effektives Instrument zur kotranslationalen Expression von P2A-verknüpften Genen. Jedoch ist auch bekannt, dass die Markierung von Cx43 anspruchsvoll ist, da durch die Fusion von Proteinen an den N-Terminus nicht funktionale Hemikanäle und GJs exprimiert wurden (Contreras et al. 2003) und die Fusion an den C-Terminus zu veränderten Schließ-Eigenschaften der GJs (Bukauskas et al. 2000) und zu einer veränderten Regulation von Hemikanälen und GJs (Hunter et al. 2003; Brokamp et al. 2012) führte. *In vitro* und *in vivo* Daten des Cx43-Überexpressions-Modells demonstrieren die Ausbildung funktionsfähiger GJs unter Beteiligung des exogenen, P2A-markierten Cx43-Proteins. Mikroskopisch wurde membranständiges exogenes Cx43 nachgewiesen (siehe Kapitel 4.1, 4.3.2.4, 4.5.3.5.2). Außerdem bestätigen Farbstoff-Diffusions-Versuche in HeLa-Zellen und FRAP-Experimente in G4 ES-Zellen die Bildung funktionaler GJ-Kanäle durch exogenes Cx43 (siehe Kapitel 4.1). Auch die Beobachtung funktioneller Effekte (verbesserte Pumpfunktion und/oder verringerte VT-Inzidenz) einer Cx43-Überexpression in mFBs *in vivo* deutet auf die Fähigkeit des exogenen Cx43 zur Ausbildung intakter GJs hin (siehe Kapitel 4.5.4). Dennoch muss in Zukunft erforscht werden, ob der C-terminale P2A-Anhang Auswirkungen auf das Phosphorylierungsmuster von exogenem Cx43 oder die Interaktion mit anderen Proteinen hat. Zur Untersuchung des Phosphorylierungszustands wären Phospho-spezifische Antikörper und Western blot-Analysen sowie Massenspektrometrie-basierte Phospho-Proteomics geeignet (Solan und Lampe 2020; Dudley und Bond 2014). Die Interaktionsfähigkeit des exogenen Cx43 mit anderen Proteinen könnte mittels spezifischer biochemischer Assays erfolgen (Rhett et al. 2011; Musil und Goodenough 1991).

Im Gegensatz zum ubiquitären Cx43-Überexpressions-Modell führte die gezielte Überexpression von Cx43 im adulten Stadium im Herzen zu keiner phänotypischen Veränderung der Mäuse und hatte keine nachteiligen Effekte auf ihre Mortalität. Außerdem ist das neu entwickelte Modell konditional, d.h. durch das Einkreuzen bestimmter Cre-Deleter-Mauslinien können die Effekte von Cx43 in spezifischen Zelltypen untersucht werden, ohne dass weitere, nicht herzspezifische Gewebe/Zelltypen beeinflusst werden, die die Untersuchungsergebnisse verfälschen könnten.

5.3 Regulation der KMs- bzw. mFBs-spezifischen Cx43-Überexpression im gesunden und infarzierten Mauserzen

mRNA- und Protein-Analysen der α MHC^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie deuten darauf hin, dass die Cx43-(Über-)Expression molekular streng reguliert wird, da dPCR-Untersuchungen zwar eine deutlich höhere Gesamt-Cx43-Expression in Cx43-homo- und -heterozygoten Mäusen verglichen mit Kontrollmäusen, aber keinen signifikanten Unterschied in der Gesamt-Cx43-Expression untereinander zeigten. Da homozygote Mäuse noch ein viertes Allel (zwei endogene und zwei transgene) zur Cx43-(Über-)Expression besitzen, könnte man davon ausgehen, dass homozygote Mäuse durch das zusätzliche Allel auch mehr Gesamt-Cx43-Transkripte und Protein als heterozygote Mäuse generieren. Die exogene Cx43-mRNA-Menge der Cx43-homozygoten Mäuse war im Vergleich zu den heterozygoten Mäusen signifikant höher, während die endogene Cx43-mRNA-Menge in Cx43-homozygoten Mäusen jedoch signifikant niedriger war als bei den Kontrolltieren. Die Menge an endogener Cx43-mRNA in den Cx43-heterozygoten- und Kontrollmäusen hingegen war ähnlich. Insgesamt zeigen diese beiden Beobachtungen auf RNA-Ebene eine Regulation der endogenen Cx43-Expression bei massiver homozygoter Cx43-Überexpression. Es scheint als wäre bei der heterozygoten Cx43-Überexpression bereits das Maximum an Cx43-Transkripten erreicht, die gleichzeitig in KMs vorliegen können (siehe Kapitel 4.3.2.2). Auch in den Western blot-Analysen war kein signifikanter Unterschied in der Gesamt-Cx43-Expression von Cx43-homo- und -heterozygoten Mäusen zu sehen. Sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene wurde jedoch ein signifikanter Unterschied in der mCherry-Expression Cx43-homo- und -heterozygoter Mäuse detektiert. Eine mögliche Interpretation dieser Daten ist, dass die Überexpression von Cx43 in KMs limitiert ist, weil Cx43 ein endogenes Protein mit spezifischen Aufgaben in den KMs des Herzens ist, sodass eine zu starke Cx43-Überexpression letztendlich über negative Rückkopplung zur Herunterregulation der endogenen Cx43-Expression führt. Im Gegensatz dazu kann „zellfremdes“ mCherry, welches keine spezifische Funktion in den KMs übernimmt, ohne regulatorische Mechanismen exprimiert werden.

Cx43 ist ein Transmembranprotein. Seine Funktion kann nicht nur über sein Expressionsniveau und seine Abbaugeschwindigkeit bestimmt werden, sondern auch über die Regulation von Transportprozessen. Mikroskopische Aufnahmen nach Cx43-Überexpression zeigen eine große Menge des Cx43-Proteins im Zytoplasma (siehe Kapitel 4.3.2.4). Dies könnte darauf hindeuten, dass es nicht nur einen Schwellenwert für die Cx43-Gesamt-Expression, sondern auch für seine Membran-Lokalisation gibt, was auch im Zusammenhang mit einem erhöhten Abbau des Proteins stehen könnte.

Interessanterweise zeigten Analysen von Narbengewebe der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie hingegen keine Regulation von Cx43 auf mRNA-Ebene. Während keine signifikanten Unterschiede in der endogenen Cx43-RNA-Menge beim Vergleich der Cx43-überexprimierenden Kryo-infarzierten Gruppen und der Kryo-Kontrollgruppe detektiert wurden, zeigten die Untersuchungen auf, dass die exogene Cx43-RNA-Menge bei den Cx43-homozygoten Mäusen im Vergleich zu den heterozygoten Mäusen signifikant höher (etwa verdoppelt) (siehe Kapitel 4.5.3.2) war. Auf Protein-Ebene war jedoch kein Unterschied in der Cx43-Menge zwischen den Herzen Cx43-homozygoter und -heterozygoter Mäuse zu beobachten (siehe Kapitel 4.5.3.3). Diese Befunde deuten darauf hin, dass auch in mFBs, die im Gegensatz zu KMs endogen nur sehr geringen Mengen an Cx43 exprimieren, eine Regulation der Cx43-Proteinexpression stattfindet. In der Tat war auch bei mFB-spezifischer Cx43-Überexpression der Fluoreszenzreporter mCherry im Gegensatz zum Cx43 nicht reguliert, obwohl beide Proteine vom selben Promotor kontrolliert werden, was auf eine Art negativen Feedback-Mechanismus auf Protein-Ebene hindeutet.

Bisher ist in der Literatur nichts zu einem Schwellenwert zur maximalen Cx43-Expression beschrieben. Durch die gezielte Integration nur einer Kopie der Transgenkassette in den Rosa26-Lokus des Mausgenoms bzw. durch Kreuzung heterozygoter- zu homozygoten Mäusen bietet das neu generierte Cx43-Überexpressions-Modell die Möglichkeit dieses Phänomen weiter zu untersuchen.

5.4 Zellbiologische und funktionelle Effekte einer KMs- bzw. mFBs-spezifischen Überexpression von Cx43

Herzmuskelzellen (KMs) sind durch eine lange Achse und einen vergleichsweise viel kleineren Durchmesser gekennzeichnet. Dies ist für die in Kapitel 1.1.2 beschriebene richtungsgebundene Erregungsleitung (Anisotropie) wichtig, da aufgrund dieser Morphologie der Längswiderstand der Zellen im Vergleich zum Querwiderstand geringer ist. Die GJ-Kanäle befinden sich überwiegend an den End-zu-End-Kontakten (Zellpolen) der KMs, sodass sich ein AP in Längsrichtung schneller ausbreitet als in Querrichtung. Es ist bekannt, dass in Folge verschiedener Herzerkrankungen (z.B. Vorhofflimmern, Herzinfarkt, Kardiomyopathie) auch GJs vom kardialen Remodeling (siehe Kapitel 1.3.1) betroffen sind. Durch die Remodelingvorgänge kann die Menge und Isoform der exprimierten Connexine sowie die Lokalisation der GJs verändert sein. Es wird vermutet, dass insbesondere das Abweichen der Connexin-Lokalisation von den End-zu-End-Kontakten der KMs hin zu den lateralen Seiten der Zellmembran (Lateralisierung) zu veränderten Leitungsbahnen und einer Beeinträchtigung der Anisotropie führen kann und somit die Ausbildung von Arrhythmien begünstigt (Dhein und

Salameh 2021). Cabo et al. (2006) hingegen konnten zwar eine Lateralisierung von Cx43 nach Infarkt beobachten, jedoch hatte diese keinen Effekt auf die transversale oder longitudinale Leitungsgeschwindigkeit, sodass vermutet wurde, dass die lateralisierten GJs funktionslos sind.

Trotzdem ist die Lateralisierung von Cx43-GJs nach einem Herzinfarkt ein auffälliges Merkmal von KMs der BZ (Smith et al. 1991). Ihr Auftreten scheint mit der Dephosphorylierung bestimmter Serin-Reste des Cx43-C-Terminus in Folge einer ischämischen Herzerkrankung assoziiert zu sein (Lampe et al. 2006). Die genauen Folgen einer Lateralisierung von Cx43 sind allerdings weiterhin noch unklar. Es ist aber bekannt, dass Connexine nicht nur als elektrische Synapse zwischen benachbarten Zellen von Bedeutung sind, sondern auch Teil eines interagierenden Proteinnetzwerks (Connexom) sind. So ist Cx43 z.B. an der Organisation des Mikrotubuli-Netzwerks beteiligt (Delmar et al. 2018). Daher könnten Abweichungen von der typischen Anordnung des Cx43 in den Glanzstreifen die Interaktion von Cx43 mit verschiedenen Bindungspartnern beeinflussen und so den gerichteten Transport verschiedener Proteine innerhalb der Zelle stören. Ein wichtiger Bindungspartner in den peripheren Bereichen der GJ-Plaques (Perinexus) ist z.B. das Gerüstprotein ZO-1, welches den Übergang von Cx43-Hemikanälen zu GJs reguliert und somit die Größe der GJ-Plaques bestimmt (Thévenin et al. 2017). Studien haben gezeigt, dass eine gestörte Interaktion zwischen Cx43 und ZO-1 zu größeren GJ-Plaques führt (Hunter et al. 2005). Ebenfalls Teil des Connexosoms und im Perinexus mit Cx43 ko-lokalisiert ist der $\text{Na}_v1.5$ Natriumkanal (Veeraraghavan et al. 2015). Er ist wesentlich an der Erzeugung und Ausbreitung von APs beteiligt und scheint stark abhängig von der Cx43-Expression zu sein. So konnte in Cx43-Knockdown-Studien oder durch die Mutation der PDZ-Bindungsdomäne von Cx43 (wichtige Sequenz im C-Terminus für die Interaktion von Cx43 mit ZO-1) ein verminderter Einbau von $\text{Na}_v1.5$ in den Glanzstreifen beobachtet werden, was zu einem verringerten Natriumstrom in den KMs und dem Auftreten von letalen Arrhythmien führte (Delmar et al. 2018; Lübke et al. 2013).

Bisher ist das Auftreten lateralisierter GJs in der Literatur nur im Zusammenhang mit pathologischen Veränderungen des Herzens beschrieben. Ob auch eine Überexpression von Cx43 *in vivo* Auswirkungen auf die Lokalisation der GJs in KMs des gesunden Herzens hat und die möglichen Folgen sind bislang nicht bekannt. Potenziell könnte die Lateralisierung zu unerwünschten Nebeneffekten führen, falls die Reizweiterleitung oder die Interaktion mit anderen Proteinen beeinträchtigt ist. Deshalb wäre es auch für die Zukunft interessant zu untersuchen, ob im Gegensatz zu einem Cx43-KO eine Überexpression von Cx43 auch zu einer vermehrten Expression von ZO-1 und $\text{Na}_v1.5$ führt. Hierfür wurde das in dieser Arbeit

generierte Mausmodell zur KMs-spezifischen Überexpression von Cx43 eingesetzt. Immunhistologische Untersuchungen transgener Tamoxifen-induzierter Herzen zeigten eine klare Lateralisierung von Cx43 (siehe Kapitel 4.3.2.4). Interessanterweise konnte mittels EPU festgestellt werden, dass die Lateralisierung von Cx43 im gesunden Herzen keine Auswirkungen auf die Arrhythmie-Empfindlichkeit der Mäuse nach Burst-Stimulation hatte (siehe Kapitel 4.3.3.2). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die lateralisierten Cx43-GJs in KMs des gesunden Myokards funktionslos sein könnten und bekräftigt somit die Vermutung von Cabo et al. (2006). In Proteom-Untersuchungen von linken Ventrikeln der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie (nicht gezeigt) wurde bei KMs-spezifischer Cx43-Überexpression im Vergleich zu nicht-induzierten Kontrollmäusen eine signifikant erhöhte Expression von ZO-1 und $\text{Nav}1.5$ gefunden. Mittels konfokaler Mikroskopie wäre es möglich die GJ-Plauegröße zu bestimmen, und zu untersuchen, ob das lateralisierte Cx43 ebenfalls mit ZO-1 und $\text{Nav}1.5$ koloalisiert ist. Die EPU-Daten lassen allerdings eher vermuten, dass die Lateralisierung von Cx43 nicht auf Kosten der in den Glanzstreifen ansässigen Cx43-GJs abläuft, da im Gegensatz zu Cx43-Knockdown-Mäusen keine erhöhte Arrhythmie-Anfälligkeit besteht.

Erste EPUs Kryo-infarzierter $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mäuse (nicht gezeigt) deuten sogar darauf hin, dass die KM-spezifische Überexpression von Cx43 die VT-Inzidenz nach Herzinfarkt trotz Cx43-Lateralisierung positiv beeinflusst.

Die kritische Frage ist daher: Sind die exogenen Cx43-GJs generell funktional und welcher Anteil des lateralisierten Cx43-Signals in der Zellmembran ist auf potenziell funktionsfähige GJs zurückzuführen, die benachbarte KMs verbinden, und welcher Anteil stellt nicht koppelnde Hemikanäle oder Vesikel-verpackte GJs dar, die infolge von Stress internalisiert werden (Severs et al. 2008). Um diese Frage beantworten zu können, reichen die bisherigen mikroskopischen Bilder nicht aus. Höherauflösende Mikroskopie könnte zeigen, ob die Hemikanäle/GJs heteromerisch/heterotypisch aus endogenem und exogenem Cx43 zusammengesetzt sind.

Bereits durchgeführte funktionale Assays wie die Fluoreszenzfarbstoff-Diffusions-Versuche in transgenen Cre^+ sowie Cre^- HeLa-Zellen sowie FRAP-Experimente in transgenen, undifferenzierten Cre^+ sowie Cre^- G4 ES-Zellen (K31) bestätigten die Ausbildung funktionaler exogener Cx43-GJs *in vitro* (siehe Kapitel 4.1). Um die Funktion *in vivo* zu analysieren, müssen aber weitere funktionale Untersuchungen im Gewebeverband durchgeführt werden, wie z.B. FRAP-Experimente in Gewebeschnitten. Um auf direktem Wege die elektrische Leitfähigkeit der lateralisierten GJs zu überprüfen, könnte zukünftig die Dual-Whole-Cell-Patch-Clamp-Technik an Myozytenpaaren von enzymatisch verdautem Myokard angewendet werden (Yao et al. 2003), sodass man die GJ-Leitfähigkeit End-zu-End-gekoppelter sowie Seite-an-Seite-

gekoppelter KMs bestimmen und den Vergleich zwischen Vehikel-behandelten Kontrolltieren und Tamoxifen-induzierten Mäusen ziehen könnte.

Als ein weiteres pro-arrhythmisches Phänomen in Folge einer Cx43-Überexpression könnte der vermehrte Einbau durchlässiger Hemikanäle denkbar sein. Unter normalen Bedingungen koppeln benachbarte Zellen über den Zusammenschluss von zwei Hemikanälen zu einem GJ-Kanal. Ungepaarte Hemikanäle bleiben verschlossen. Cx43-Hemikanäle können unter pathologischen Bedingungen, durch Veränderungen der Phosphorylierung, aufgrund erniedrigter extrazellulärer oder erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration oder durch elektrische Stimulation öffnen. Sie bilden große nicht-selektive Poren, die den Transmembranaustausch von Ionen und kleinen Molekülen (z.B. Ca^{2+} , ATP) ermöglichen und somit das elektrochemische und metabolische Gleichgewicht der Zellen stören können (Lissoni et al. 2021; Smet et al. 2021). Die bisherigen funktionellen Untersuchungen beider Mausmodelle deuten auf keine verstärkte Öffnung von Cx43-Hemikanälen hin, da die Cx43-Überexpression in KMs des gesunden Herzens keinen Effekt auf die Arrhythmie-Inzidenz zeigt und die mFBs-spezifische Überexpression von Cx43 VT-protektiv wirkt. Der Nachweis von Hemikanälen ist sehr anspruchsvoll. Mittels Patch-Clamp-Versuchen oder Ca^{2+} -Imaging in Kombination mit selektiven Hemikanal Blockern (z.B. Gap19) könnte die Existenz geöffneter Hemikanäle überprüft werden (Smet et al. 2021; Lissoni et al. 2021).

Verschiedene Arbeiten belegen, dass im Herzen eine heterozelluläre Kopplung von Nicht-Myozyten und KMs via GJs und Tunneling Nanotubes besteht, welche vor allem nach einem Herzinfarkt die elektrische Kopplung im Herzen beeinflusst (Kohl und Gourdie 2014; McArthur et al. 2015; Quinn et al. 2016). Dabei scheint Cx43 eine besonders wichtige Rolle zu spielen, da in Folge eines Nicht-Myozyten-spezifischen Cx43-KO eine stark reduzierte elektrische Kopplung zwischen dem gesunden Myokard und dem Narbenbereich beobachtet wurde (Mahoney et al. 2016). Bisher wurde die heterozelluläre Kopplung vor allem mit pro-arrhythmischen Effekten und einer vergrößerten Infarktfläche assoziiert (Camelliti et al. 2004; McArthur et al. 2015).

Das Periostin-abhängige Modell ermöglicht die induzierbare Überexpression von Cx43 speziell in mFBs nach einem Herzinfarkt, da die Transgenexpression von einer Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase abhängig ist, die unter der Kontrolle des Periostin-Promotors steht. Periostin wird in adulten FBs erst in Folge eines Gewebeschadens exprimiert, d.h. residente FBs des gesunden Myokards sind von der Cx43- und mCherry-(Über-)Expression nicht betroffen. Fu et al. (2018) konnten im Mausmodell zeigen, dass in Folge eines Herzinfarktes zunächst residente FBs aktiviert werden (d2-d4), anschließend differenzieren diese zu mFBs (d4-d7) und gehen etwa 10-14 Tagen nach Infarkt in einen seneszenten Status,

den der Matrifibrozyten, über. Dementsprechend konnte in unserem genetischen Mausmodell die (Über-)Expression von Cx43 und mCherry makroskopisch sowie mikroskopisch vor allem im Bereich der Narbe und der BZ beobachtet werden (siehe Kapitel 4.5.3.5). Mikroskopische Aufnahmen Tamoxifen-induzierter, Kryofarzierter Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mäuse zeigten zudem lange Stränge Cx43-überexprimierender (m)FBs, die von der BZ bis weit in den gesunden Ventrikel ragten (siehe Kapitel 4.5.3.5.2). Außerdem zeigte die Mehrfachfärbung von Zellmembran- (WGA) bzw. alpha-Aktinin- mit Cx43 und mCherry eine Ko-Lokalisation von Cx43 an Berührungspunkten von KMs und mFBs (siehe Kapitel 4.5.3.5.2). Diese interessanten histologischen Befunde sind ein Hinweis für eine mögliche heterozelluläre Kopplung von (m)FBs und KMs und zeigen, dass der Narbenbereich auch mit dem gesunden Gewebe interagieren kann. Diese Annahmen werden auch durch funktionelle *in vivo* EPU-Ergebnisse unterstützt, welche bei einer mFBs-spezifischen Überexpression von Cx43 einen protektiven Effekt auf die elektrische VT-Vulnerabilität nach einem Herzinfarkt aufwiesen (siehe Kapitel 4.5.4.2).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe. 2007 berichtete Roell et al., dass die Transplantation von entweder embryonalen KMs oder genetisch modifizierten, Cx43-exprimierenden Skelettmyoblasten die VT-Inzidenz post-MI signifikant reduzierte. Im Gegensatz dazu trat bei der Transplantation genetisch unveränderter Myoblasten, Knochenmarkzellen oder mFBs kein protektiver Effekt auf die VT-Anfälligkeit der Mäuse nach Infarkt auf. Auch die direkte Transduktion der Infarktnarbe mit Hilfe einer gezielten Injektion eines Cx43-Lentivirus führte durch die Überexpression von Cx43 in mFBs zu einer Reduktion der Arrhythmie-Inzidenz nach Infarkt. „Optical Mapping“-Versuche zeigten eine erhöhte Weiterleitungsgeschwindigkeit im Übergang von dem gesunden Myokard zur Narbenregion, wahrscheinlich vermittelt durch eine erhöhte heterozelluläre Kopplung von KMs und mFBs (Roell et al. 2018; Quinn et al. 2016).

Ein weiterer interessanter funktioneller Befund der Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mauslinie ist die verbesserte linksventrikuläre Pumpfunktion nach mFBs-spezifischer Cx43-Überexpression post-Infarkt (siehe Kapitel 4.5.4.1). Bisher ist ein solcher Effekt noch nicht publiziert. Frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass ein lentiviraler Cx43-Gentransfer in die Herzinfarktnarbe keinen Effekt auf die linksventrikuläre Pumpfunktion hat (Roell et al. 2018). Allerdings waren bei der Lentivirus-basierten Cx43-Überexpression nur 1,1 bis 2,8 % der Infarktzellen transduziert. Im Gegensatz dazu ist bei dem vorliegenden genetischen Mausmodell jeder mFB der Herzinfarktnarbe von der Cx43-Überexpression betroffen. Dies legt nahe, dass der Effekt auf die Pumpfunktion von der vorliegenden Cx43-Menge abhängen könnte. Einen weiteren Hinweis darauf, dass die Cx43-Expression einen Einfluss auf die

Pumpfunktion des Herzens hat, lieferten Gutstein et al. (2005). Sie generierten durch die Einführung von Cx43-defizienten G4 ES-Zellen in Wildtyp-Empfänger-Blastozysten ein Mausmodell mit heterogener GJ-Expression. Chimäre Mäuse zeigten im Gegensatz zu einem traditionellen konditionalen Cx43-KO, nicht in jedem KM den Cx43-KO, sondern ein stark abnormales Cx43-Expressionsmuster im Herzen, welches durch klar abgegrenzte Herde Cx43-negativer KMs inmitten eines sonst gut gekoppelten Myokards charakterisiert war. Diese Mäuse wiesen im Vergleich zu Kontrollmäusen eine signifikant schlechtere kardiale Pumpfunktion und Kontraktilität des Herzens auf. Bislang kann allerdings nur über den zugrunde liegenden Mechanismus der verbesserten Pumpfunktion bei mFBs-spezifischer Cx43-Überexpression post-MI spekuliert werden. Z.B. könnten die Infarktgröße (auch Ausdünnung der Narbe), die Eigenschaften der genetisch veränderten (m)FBs, die strukturelle Beschaffenheit der Narbe, sowie die Beweglichkeit und das Bewegungsmuster der infarzierten linken Vorderwand Einfluss auf die kardiale Pumpfunktion haben. Diesbezüglich konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass die Cx43-Überexpression in mFBs der Infarktnarbe keinen Effekt auf das Infarktvolumen hat (siehe Kapitel 4.5.3.6). Erste Ergebnisse der RNA-Sequenzierung des Infarktgebietes von Periostin^{CAG-Cx43-P2A-mCherry}-Mäusen zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion deuten darauf hin, dass die Überexpression von Cx43 nur einen verschwindend geringen Einfluss auf die Expression anderer Gene hat (siehe Kapitel 4.5.3.4). So wurden neben der beabsichtigten Überexpression von Cx43 nur vier weitere Gene (Ptgfr, Aff3, Ifit1, Kalrn) im Narbengebiet Cx43-überexprimierender Mäuse differenziell exprimiert. Keines dieser Gene weist auf eine Modulation kontraktile Eigenschaften der Narbe hin. Interferone und Prostaglandine wirken immunmodulierend. Sie sind an entzündlichen Prozessen, wie der Wundheilung nach einem Herzinfarkt, beteiligt. Eine aktuelle Studie zeigt, dass Ptgfr eine wichtige Rolle in der Prostaglandin D2 (PGD2)-vermittelten kardioprotektiven Wirkung von Glukokortikoiden nach Ischämie-Reperfusion-Verletzungen spielt (Katsumata et al. 2014). Da Ptgfr in der vorliegenden RNAseq-Analyse in der Kryo-infarzierten, Tamoxifen-behandelten Cx43-heterozygoten-Gruppe im Vergleich zur Vehikel-behandelten Kryo-Kontrollgruppe hochreguliert war, könnte dies ein Hinweis auf eine potenzielle Modulation des kardioprotektiven PGD2-Ptgfr-Signalwegs in Folge einer Cx43-Überexpression sein. Kalrn ist für verschiedene neurologische Defekte bekannt. Genetische Variationen des Kalrn werden aktuell aber auch als potenzielle genetische Marker für KHK untersucht. Shafiei et al. (2018) demonstrierte, dass KHK Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ein erhöhtes Kalirin Serumlevel aufweisen. Die RNA-Sequenzierungsergebnisse zeigen allerdings eine Herunterregulierung der Kalrn-Genexpression in Cx43-überexprimierenden Herzinfarktnarben. Weiterhin wurde mittels immunhistologischer Untersuchungen der Differenzierungsstatus der mFBs untersucht. Dabei

war im ASMAC (mFB-Marker)- und Ki67 (Proliferationsmarker)-Expressionsmuster ebenfalls kein Unterschied bei dem Vergleich von infarzierten, Cx43-überexprimierenden Herzen und Kryo-Kontrollherzen zu beobachten (siehe Kapitel 4.5.3.5). Echokardiographie-Analysen deuten jedoch auf eine verbesserte Beweglichkeit der linksventrikulären Vorderwand hin (siehe Kapitel 4.5.4.1), sodass die verbesserte Pumpfunktion auf veränderten passiven Eigenschaften der Narbe (z.B. verringerte Steifheit) beruhen könnte (Sasse et al. 2008). Daher soll die links- und rechtsventrikuläre Pumpfunktion sowie die Kontraktilität des Herzens in Kooperation mit der AG von Prof. Dr. Verena Hörr vom Herzzentrum des Universitätsklinikums Bonn mittels Magnetresonanztomographie (MRT) detailliert untersucht werden. Zusätzlich sollen genaue Messungen des Blutflusses mittels zeitaufgelöster 3D-Bildgebung (4D phase contrast (PC) MRI) im Herzen und den großen Gefäßen (Bovenkamp et al. 2015; Krämer et al. 2017) durchgeführt werden.

Zwar konnten die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung, wie oben beschrieben nicht zur mechanistischen Aufklärung der verbesserten Pumpfunktion beitragen, jedoch sind sie für die Bewertung einer neuen potenziellen anti-arrhythmischen Therapieoption von großem Wert, da geringe Veränderungen des Transkriptoms in Folge einer Cx43-Überexpression wenig unerwünschte Wirkungen einer solchen Therapie vermuten lassen. Um auch auf Protein-Ebene zu überprüfen, ob im Wesentlichen lediglich das gewünschte Cx43 überexprimiert wird, oder ob auch andere Proteine beeinflusst werden, werden zur Zeit umfassende Proteom-Analysen in Zusammenarbeit mit Dr. Winter vom Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Bonn ausgewertet; entsprechende Analysen sollen auch für das $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mausmodell erfolgen.

Weitere relevante Aspekte, die bezüglich der Therapiesicherheit überprüft wurden, waren die Auswirkung der Cx43-Überexpression auf die Hypertrophie des Herzens und die Infarktgröße:

Ein wichtiger Aspekt des kardialen Remodelings in Folge einer ischämischen Herzerkrankung ist die kompensatorische hypertrophe Veränderung der überlebenden KMs, welche langfristig zur kontraktile Dysfunktion und zur Herzinsuffizienz führt (Nakamura und Sadoshima 2018) (siehe Kapitel 1.3.1). Außerdem scheinen hypertrophe Herzen zu verlängerten QT-Intervallen zu neigen, wodurch Arrhythmien begünstigt werden und das Risiko für einen plötzlichen Herztod steigt (Swynghedauw et al. 2003; George 2009). Daher war es wichtig zu untersuchen, ob die Überexpression von Cx43 in KMs per se zur Hypertrophie des gesunden Herzens führt und ob die KMs- oder mFBs-spezifische Überexpression von Cx43 einen Einfluss auf die Hypertrophie des Herzens nach Herzinfarkt hat. Die Quotienten aus Herzgewicht und Tibialänge lieferten im gesunden Herzen keine Hinweise auf eine Hypertrophie in Folge der KMs-spezifischen Überexpression von Cx43 und zeigten auch nach

Infarkt im Vergleich zur infarzierten Kontrollgruppe keine Auswirkungen der KMs- und mFBs-spezifischen Cx43-Überexpression auf die Hypertrophie des Herzens (siehe Kapitel 4.3.1.3, 4.4.1.2, 4.5.2.3). Der Quotient aus Herzgewicht und Tibiallänge ist aber nur ein grober Indikator für die Bestimmung der Hypertrophie des Herzens. Deshalb soll zukünftig eine genauere mikroskopische Ausmessung der KMs nach WGA-Färbung erfolgen. So kann zudem analysiert werden, ob sich das Remodeling nach Herzinfarkt nur auf Infarkt-nahe BZ-KMs oder auch auf die übrigen KMs des gesunden Gewebes auswirkt.

Das langfristige Ziel für die Entwicklung der beiden in dieser Arbeit charakterisierten Mauslinien soll die Überprüfung folgender Hypothese sein: Die Inzidenz von post-Infarkt-Arrhythmien kann durch eine Verbesserung der elektrischen Kopplung mittels Cx43-Überexpression im Bereich der Herzinfarkttnarbe und der BZ reduziert werden.

Eine verstärkte Zell-Zell-Kopplung könnte bei ischämischen Herzerkrankungen jedoch auch andere unerwünschte Folgen haben. Denn auf Grundlage von Cx43-KO-Modellen und durch den Einsatz verschiedener pharmakologischer GJ-Blocker konnte durch die Reduktion der GJIC während der Ischämie eine signifikant geringere Infarktgröße und Nekrose beobachtet werden (Fontes et al. 2012; Garcia-Dorado et al. 1997; Kanno et al. 2003). Andererseits resultierten auch der Einsatz von Rotigaptid, welches die GJIC fördert, im Hunde-Modell oder die Verpflanzung Cx43-überexprimierender Diaphragma-Myoblasten im Schaf zu einer Reduktion der Infarktgröße (Giménez et al. 2018; Hennan et al. 2006).

Daher stellte sich die Frage: Wirkt sich eine potenziell anti-arrhythmische Therapie, basierend auf einer gesteigerten GJIC, auf Kosten einer größeren Infarktfläche aus? Durch eine pharmakologische Beeinflussung der GJIC mittels Rotigaptid und durch den Mischeffekt einer Cx43-Überexpression in Kombination mit einer Myoblasten-Implantation konnte noch kein eindeutiger Effekt einer isolierten Cx43-Überexpression auf die Infarktgröße erforscht werden. Dies wird aber durch die neu entwickelten zellspezifischen Cx43-Überexpressions-Modelle ermöglicht. Dabei zeigte sich nach mFBs-spezifischer Cx43-Überexpression ein anti-arrhythmischer Effekt, ohne dass eine signifikante Veränderung der Infarktgröße analysiert wurde (siehe Kapitel 4.5.4.2, Kapitel 4.5.3.6). Auch die KMs-spezifische Überexpression von Cx43 scheint sich ersten Ergebnissen zufolge positiv auf die VT-Inzidenz post-Infarkt auszuwirken (nicht gezeigt) und zeigte keinen Einfluss auf die Infarktgröße (siehe Kapitel 4.4.2.3). Zukünftig müsste allerdings auch in anderen, verstärkt klinisch-orientierten Infarktmodellen (LAD oder Ischämie-Reperfusion) die Infarktgröße nach Cx43-Überexpression überprüft werden.

Insgesamt scheint die KMs-spezifische Cx43-Überexpression im gesunden Herzen und post-Infarkt als auch die mFBs-spezifische Überexpression von Cx43 nach Infarkt keine bedeutenden unerwünschten Folgen zu haben. Diese Beobachtung wird zudem dadurch unterstützt, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Sterblichkeit der Mäuse nach Cx43-Überexpression gab (siehe Kapitel 4.3.1.2, 4.4.1.1, 4.5.2.2).

5.5 Mechanistische Grundlage des anti-arrhythmischen Effekts durch die KMs- bzw. mFBs-spezifische Überexpression von Cx43 nach einem Herzinfarkt

Bei einer mFBs-spezifischen Überexpression von Cx43 wurde ein protektiver Effekt auf die elektrische Stabilität/VT-Vulnerabilität nach einem Herzinfarkt beobachtet (siehe Kapitel 4.5.4.2). Unsere ersten Untersuchungen deuten darauf hin, dass dieser anti-arrhythmische Effekt auch bei einer KMs-spezifischen Cx43-Überexpression auftritt. Um eine potenzielle heterozelluläre Kopplung von KMs und (m)FBs nachzuweisen, die Reentryentwicklung zu untersuchen und die funktionellen Ergebnisse wie die VT-protektiven Mechanismen einer homogenen Überexpression von Cx43 in KMs und mFBs der BZ und der Narbe weiter aufzuklären, sind bildgebende Verfahren, wie das Voltage Mapping notwendig. Von besonderem Interesse wäre bei dieser Analyse die Betrachtung der BZ, denn gerade dieses Areal ist durch seine inhomogenen Leitungseigenschaften häufig der Ursprung einer kreisenden Bewegung (siehe Kapitel 1.3.2).

Folgende Theorien zum protektiven Mechanismus von Cx43 sind denkbar:

- (I) Die KMs-spezifische Überexpression könnte dazu führen, dass die Hyperpolarisation von KMs der BZ durch die stärkere Kopplung mit den Remote-KMs des gesamten Herzens (Elektrischer Sink) zunimmt, sodass die elektrische Stabilität der BZ-KMs zunimmt.
- (II) Die mFBs-spezifische Überexpression könnte dazu führen, dass die Reizweiterleitung innerhalb der Narbe und der BZ verbessert wird. Dadurch könnte das Auftreten unidirektionaler Leitungsblöcke innerhalb der BZ reduziert werden. Die Erregung könnte bis in die Narbe weitergeleitet und dort terminiert werden, sodass das Auftreten kreisender Erregungen unterbunden bzw. zumindest verringert wird. Darüber hinaus wäre es auch interessant zu untersuchen, ob das Ruhemembranpotenzial der mFBs negativer und/oder das der BZ-KMs durch die verstärkte Kopplung positiver wird.

Des Weiteren könnten Voltage Mapping-Versuche, wie oben beschrieben, wichtige Informationen bezüglich der Funktionalität der lateralisierten Cx43-GJ im gesunden Ventrikel liefern. Daher werden derzeit in Kooperation mit Prof. Dr. Peter Kohl, Callum Zgierski-Johnston, PhD und Thomas Kok vom Institut für Experimentelle Kardiovaskuläre Medizin des Universitätsklinikums Freiburg Voltage Mapping-Untersuchungen beider Cx43-Überexpressions-Mauslinien ($\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$, $\text{Periostin}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$) durchgeführt.

5.6 Alternative Methoden zur Überexpression von Cx43 im Infarktareal

Neben einem genetischen Modell gibt es noch weitere Möglichkeiten exogenes Cx43 *in vivo* zu exprimieren bzw. in die Herzinfarkt Narbe einzubringen. Dazu gehören die Transplantation Cx43-exprimierender Zellen in die Narbe sowie ein Virus-vermittelter lokaler Cx43-Gentransfer in residente Zellen der Narbe. So konnte im murinen Modell bereits gezeigt werden, dass die Transplantation embryonaler KMs sowie genetisch modifizierter, Cx43-exprimierender Myoblasten die VT-Inzidenz post-MI signifikant reduzieren. Die Transplantation genetisch unveränderter Myoblasten, Knochenmarkzellen oder mFBs zeigte hingegen keine positiven Auswirkungen auf die VT-Anfälligkeit der Mäuse nach Infarkt (Roell et al. 2007). Die Transplantation embryonaler KMs ist beim Menschen jedoch aus ethischen Gründen nicht möglich und das Einwachsen sowie das Langzeit-Überleben transplanteder Zellen im Herzen (Skelettmuskelzellen/KMs in Mäusen/Ratten/Kaninchen) ist schwierig (Suzuki et al. 2004; Ottersbach et al. 2018). Daher ist der virale Gentransfer Narben-ansässiger Zellen eine weitere wichtige Option. So konnten in einer weiteren Studie kFBs/mFBs, welche in der Herzinfarkt Narbe den vorherrschenden Zelltyp darstellen, durch Transduktion mit einem lentiviralen Cx43-Konstrukt infiziert werden. Dabei stellten sich auch die modifizierten, Cx43-exprimierenden kFBs/mFBs als wirkungsvolles Instrument zur Reduktion von post-MI VTs heraus. Und das, obwohl sie im Gegensatz zu den transplantierten Muskelzellen keine APs ausbilden können. Der virale Gentransfer war allerdings durch die geringe Transduktionsrate limitiert (Roell et al. 2018).

Die Zelltransplantation Cx43-exprimierender Zellen sowie der virale Gentransfer von Cx43 stellen klinisch anwendbare Therapieansätze dar. Um das therapeutische Potenzial, den Mechanismus sowie mögliche unerwünschte Auswirkungen einer Cx43-Überexpression zur Prophylaxe von post-MI VTs umfassend zu untersuchen und aufzuklären, ist ein genetisches Modell notwendig. Es hat den Vorteil einer homogenen, dosierbaren und gut reproduzierbaren Überexpression von Cx43, welche ausschließlich auf den gewünschten Zelltyp begrenzt ist. Dies ist durch eine intra-kardiale virale Transduktion nicht zu erreichen, da hierbei nur kleine

Inseln transduzierter Zellen entstehen und trotz Optimierung der verwendeten Viren (z.B. Moloney Murine Leukemia Virus, AAV) neben dem gewünschten Zelltyp zusätzlich auch andere Zellen infiziert werden. Außerdem ermöglicht es die zielgerichtete Untersuchung des reinen Cx43-Effekts ohne Verfälschung durch das Einbringen von Zellen oder Viren in den Bereich der Herzinfarkttnarbe.

Insgesamt zeigten sowohl die Zelltransplantation Cx43-exprimierender Zellen, als auch der virale Gentransfer von Cx43 sowie das genetische Cx43-Überexpressionsmodell in der Maus einen positiven Effekt auf die post-MI VT-Inzidenz. Da das Herz der Maus aber deutlich kleiner ist und mit einer viel höheren HF (400-660 bpm) schlägt als das humane Herz, müssen die beobachteten Effekte, bevor sie evtl. in die Klinik übertragen werden können, zunächst noch im Großtier (z.B. Hund oder Schwein) überprüft werden. Vor allem das Schwein kommt dem Menschen in Hinblick auf die Herzgröße, HF (55-135 bpm), Gefäßanatomie, den Blutdruck und die Infarktentwicklung sehr nahe und wäre somit geeignet (Martin et al. 2022; Heusch et al. 2011). Es ist zwar möglich genetisch veränderte Schweine zu generieren (Prather et al. 2008; Waghmare et al. 2011), allerdings würde sich im Hinblick auf einen translationalen Ansatz im Menschen die klinisch besser anwendbare Transduktion der Infarkttnarbe mit einem lentiviralen Cx43-Konstrukt (intramyokardial, über einen Herzkatheter) anbieten.

5.7 Ausblick

Die bisher berichteten zellbiologischen und funktionellen Ergebnisse einer zelltypspezifischen Cx43-Überexpression wurden zwei Wochen nach Transgen-Induktion bzw. Kryoläsion erhoben. Zukünftig sollen aber auch Langzeit-Untersuchungen beider Mausmodelle durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob die gefundenen Effekte auch langfristig, nach der vollständigen Ausreifung der Herzinfarkttnarbe, fortbestehen. Außerdem sollen unter Einsatz des neuen Mausmodells weitere Untersuchungen (z.B. Voltage Mapping-Versuche, Implantationen von EKG Transmittern, um das Auftreten spontaner Arrhythmien zu untersuchen) durchgeführt werden, um das anti-arrhythmische Potenzial einer gezielten Cx43-Überexpression in der Herzinfarkttnarbe zu bewerten und wichtige Sicherheitsaspekte einer biologischen Anti-VT-Therapie zu überprüfen.

Zudem kann durch das Einkreuzen von Cre-Deleter-Mauslinien mit früh-embryonal aktiven ubiquitären Promotoren in die neu generierte $Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)BF}$ Mauslinie untersucht werden, in welchen Stadien der Embryonalentwicklung die Überexpression von Cx43 zu dem letalen Phänotyp führt, der im nicht-induzierbaren Mausmodell von Ewart et al. (1997) beobachtet wurde. Außerdem kann im globalen Knockin-Modell analysiert werden, ob der letale Phänotyp verstärkt bzw. früher als bei der KMS-

spezifischen Cx43-Überexpression auftritt oder evtl. ein kompensatorischer Effekt auftritt, dadurch, dass auch andere Zelltypen während der Embryonalentwicklung vermehrt Cx43 exprimieren.

Interessanterweise ist das Cx43-Protein nicht nur in der Zellmembran lokalisiert, sondern wird auch in die Membran kardialer Mitochondrien eingebaut. Dort kommt es in Folge alternativer mRNA-Translation in verschiedenen C-Termini-Varianten vor: Cx43-43kDa und Cx43-20kDa. Funktionell scheint Cx43 und insbesondere die Cx43-20kDa Variante eine kardio-protective Wirkung im Falle eines Herzinfarkts zu haben (Boengler et al. 2013; Basheer et al. 2018; Rodríguez-Sinovas et al. 2021). Daher untersuchen wir derzeit in Kooperation mit der AG von Prof. Heusch/Prof. Kleinbongard vom Institut für Pathophysiologie des Universitätsklinikums Essen, ob das $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mausmodell die Überexpression von Cx43 in den Mitochondrien ermöglicht und ob dies zu Veränderungen der mitochondrialen Funktion vor oder nach einem Herzinfarkt führt.

In dieser Doktorarbeit wurde das murine Cx43-Überexpressions-Modell im Hinblick auf seine zellbiologische und funktionelle Bedeutung im Herzen untersucht, wobei der Fokus auf KMs und mFBs der BZ und der Herzinfarkt Narbe lag. Cx43 spielt aber auch in anderen Zelltypen wie z.B. Astrozyten (Binder und Steinhäuser 2021), glatten Muskelzellen (Tong et al. 2009) oder Epithelzellen (Yeh et al. 2007) eine wichtige Rolle. Klinisch scheint das Protein nicht nur im Zusammenhang mit Arrhythmien zu stehen, sondern auch im Hinblick auf Krebs, Entzündungen, die kutane Wundheilung oder Epilepsie relevant zu sein (Montgomery et al. 2018; Marsh et al. 2021; Binder und Steinhäuser 2021). Abhängig von der Einkreuzung weiterer Cre-Deleter-Mauslinien ermöglicht das neu generierte Mausmodell das therapeutische Potenzial einer Cx43-Überexpression in jedem Zelltyp/Organ zu untersuchen. So könnte das Modell z.B. auch in der Epilepsieforschung eingesetzt werden, da die Ergebnisse aktueller Studien darauf hinweisen, dass einige Formen der Epilepsie von der vermehrten Öffnung von Cx43-GJ-Kanälen profitieren könnten (Binder und Steinhäuser 2021).

In diesem Zusammenhang stellen die *in vitro* und *in vivo* Cx43-Überexpressions-Modelle auch interessante Werkzeuge für die Pharmaforschung dar. Die Modulation der Funktion von GJs mittels therapeutischer Peptide, welche spezielle Sequenzabschnitte des Cx43 imitieren bzw. an diese binden, rücken zunehmend in den Fokus der pharmakologischen Connexin-Forschung (Marsh et al. 2021). Bislang fehlt es allerdings sowohl an spezifischen Aktivatoren als auch an spezifischen Inhibitoren von GJs und Hemikanälen. Die CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry HeLa- und -G4 ES-Zelllinien können als sensitive Assays zum Screening neuer Cx43-GJ-Modulatoren eingesetzt werden. Hits können anschließend im Mausmodell auf ihre Wirksamkeit und auf potenzielle Nebeneffekte überprüft werden.

Literaturverzeichnis

AlMahameed, Soufian T.; Ziv, Ohad (2019): Ventricular Arrhythmias. In: *The Medical clinics of North America* 103 (5), S. 881–895. DOI: 10.1016/j.mcna.2019.05.008.

Amoni, Matthew; Dries, Eef; Ingelaere, Sebastian; Vermoortele, Dylan; Roderick, H. Llewelyn; Claus, Piet et al. (2021): Ventricular Arrhythmias in Ischemic Cardiomyopathy-New Avenues for Mechanism-Guided Treatment. In: *Cells* 10 (10). DOI: 10.3390/cells10102629.

Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin (2022): Nationale Versorgungsleitlinie Chronische KHK. Online verfügbar unter <https://www.leitlinien.de/themen/khk/version-6>, zuletzt geprüft am 30.08.2023.

Ashikaga, Hiroshi; Mickelsen, Steven R.; Ennis, Daniel B.; Rodriguez, Ignacio; Kellman, Peter; Wen, Han; McVeigh, Elliot R. (2005): Electromechanical analysis of infarct border zone in chronic myocardial infarction. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 289 (3), H1099-105. DOI: 10.1152/ajpheart.00423.2005.

Bakker, J. M. de; van Capelle, F. J.; Janse, M. J.; Wilde, A. A.; Coronel, R.; Becker, A. E. et al. (1988): Reentry as a cause of ventricular tachycardia in patients with chronic ischemic heart disease: electrophysiologic and anatomic correlation. In: *Circulation* 77 (3), S. 589–606. DOI: 10.1161/01.cir.77.3.589.

Basheer, Wassim A.; Fu, Ying; Shimura, Daisuke; Xiao, Shaohua; Agvanian, Sosse; Hernandez, Diana M. et al. (2018): Stress response protein GJA1-20k promotes mitochondrial biogenesis, metabolic quiescence, and cardioprotection against ischemia/reperfusion injury. In: *JCI insight* 3 (20). DOI: 10.1172/jci.insight.121900.

Baudino, Troy A.; Carver, Wayne; Giles, Wayne; Borg, Thomas K. (2006): Cardiac fibroblasts: friend or foe? In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 291 (3), H1015-26. DOI: 10.1152/ajpheart.00023.2006.

Beardslee, M. A.; Lerner, D. L.; Tadros, P. N.; Laing, J. G.; Beyer, E. C.; Yamada, K. A. et al. (2000): Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. In: *Circulation research* 87 (8), S. 656–662. DOI: 10.1161/01.res.87.8.656.

Bergmann, Olaf; Bhardwaj, Ratan D.; Bernard, Samuel; Zdunek, Sofia; Barnabé-Heider, Fanie; Walsh, Stuart et al. (2009): Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. In: *Science (New York, N.Y.)* 324 (5923), S. 98–102. DOI: 10.1126/science.1164680.

- Bergmann, Olaf; Zdunek, Sofia; Felker, Anastasia; Salehpour, Mehran; Alkass, Kanar; Bernard, Samuel et al. (2015): Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. In: *Cell* 161 (7), S. 1566–1575. DOI: 10.1016/j.cell.2015.05.026.
- Bermudez-Fajardo, Alexandra; Ylihärtilä, Minna; Evans, W. Howard; Newby, Andrew C.; Oviedo-Orta, Ernesto (2007): CD4+ T lymphocyte subsets express connexin 43 and establish gap junction channel communication with macrophages in vitro. In: *Journal of leukocyte biology* 82 (3), S. 608–612. DOI: 10.1189/jlhb.0307134.
- Bernstein, Scott A.; Morley, Gregory E. (2006): Gap junctions and propagation of the cardiac action potential. In: *Advances in cardiology* 42, S. 71–85. DOI: 10.1159/000092563.
- Bersell, Kevin; Choudhury, Sangita; Mollova, Mariya; Polizzotti, Brian D.; Ganapathy, Balakrishnan; Walsh, Stuart et al. (2013): Moderate and high amounts of tamoxifen in α MHC-MerCreMer mice induce a DNA damage response, leading to heart failure and death. In: *Disease models & mechanisms* 6 (6), S. 1459–1469. DOI: 10.1242/dmm.010447.
- Bhar-Amato, Justine; Davies, William; Agarwal, Sharad (2017): Ventricular Arrhythmia after Acute Myocardial Infarction: 'The Perfect Storm'. In: *Arrhythmia & electrophysiology review* 6 (3), S. 134–139. DOI: 10.15420/aer.2017.24.1.
- Biankin, Sandra A.; Collector, Michael I.; Biankin, Andrew V.; Brown, Lindsey J.; Kleeberger, Wolfram; Devereux, Wendy L. et al. (2007): A histological survey of green fluorescent protein expression in 'green' mice: implications for stem cell research. In: *Pathology* 39 (2), S. 247–251. DOI: 10.1080/00313020701230807.
- Binder, Devin K.; Steinhäuser, Christian (2021): Astrocytes and Epilepsy. In: *Neurochemical research* 46 (10), S. 2687–2695. DOI: 10.1007/s11064-021-03236-x.
- Bischoff, Dagmar (2013): Elektrophysiologische Untersuchung (EPU). In: *Apotheken Umschau*, 03.12.2013. Online verfügbar unter <https://www.apotheken-umschau.de/diagnose/diagnoseverfahren/elektrophysiologische-untersuchung-epu-743531.html>, zuletzt geprüft am 30.08.2023.
- Boengler, Kerstin; Rohrbach, Susanne; Weissmann, Norbert; Schulz, Rainer (2021): Importance of Cx43 for Right Ventricular Function. In: *International journal of molecular sciences* 22 (3). DOI: 10.3390/ijms22030987.
- Boengler, Kerstin; Stahlhofen, Sabine; van de Sand, Anita; Gres, Petra; Ruiz-Meana, Marisol; Garcia-Dorado, David et al. (2009): Presence of connexin 43 in subsarcolemmal, but not in interfibrillar cardiomyocyte mitochondria. In: *Basic research in cardiology* 104 (2), S. 141–147. DOI: 10.1007/s00395-009-0007-5.

Boengler, Kerstin; Ungefug, Elvira; Heusch, Gerd; Leybaert, Luc; Schulz, Rainer (2013): Connexin 43 impacts on mitochondrial potassium uptake. In: *Frontiers in pharmacology* 4, S. 73. DOI: 10.3389/fphar.2013.00073.

Bovenkamp, Philipp Rene; Brix, Tobias; Lindemann, Florian; Holtmeier, Richard; Abdurrachim, Desiree; Kuhlmann, Michael T. et al. (2015): Velocity mapping of the aortic flow at 9.4 T in healthy mice and mice with induced heart failure using time-resolved three-dimensional phase-contrast MRI (4D PC MRI). In: *Magma (New York, N.Y.)* 28 (4), S. 315–327. DOI: 10.1007/s10334-014-0466-z.

Brokamp, Cole; Todd, Jacob; Montemagno, Carlo; Wendell, David (2012): Electrophysiology of single and aggregate Cx43 hemichannels. In: *PloS one* 7 (10), Artikel e47775. DOI: 10.1371/journal.pone.0047775.

Bukauskas, F. F.; Jordan, K.; Bukauskiene, A.; Bennett, M. V.; Lampe, P. D.; Laird, D. W.; Verselis, V. K. (2000): Clustering of connexin 43-enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (6), S. 2556–2561. DOI: 10.1073/pnas.050588497.

Buxton, Alfred E.; Calkins, Hugh; Callans, David J.; DiMarco, John P.; Fisher, John D.; Greene, H. Leon et al. (2006): ACC/AHA/HRS 2006 key data elements and definitions for electrophysiological studies and procedures: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Data Standards (ACC/AHA/HRS Writing Committee to Develop Data Standards on Electrophysiology). In: *Circulation* 114 (23), S. 2534–2570. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.180199.

Cabo, Candido; Yao, Jianan; Boyden, Penelope A.; Chen, Shan; Hussain, Wajid; Duffy, Heather S. et al. (2006): Heterogeneous gap junction remodeling in reentrant circuits in the epicardial border zone of the healing canine infarct. In: *Cardiovascular research* 72 (2), S. 241–249. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.07.005.

Camelliti, Patrizia; Devlin, Gerard P.; Matthews, Kenneth G.; Kohl, Peter; Green, Colin R. (2004): Spatially and temporally distinct expression of fibroblast connexins after sheep ventricular infarction. In: *Cardiovascular research* 62 (2), S. 415–425. DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.01.027.

Contreras, Jorge E.; Sáez, Juan C.; Bukauskas, Feliksas F.; Bennett, Michael V. L. (2003): Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (20), S. 11388–11393. DOI: 10.1073/pnas.1434298100.

Costa-Almeida, Raquel; Soares, Raquel; Granja, Pedro L. (2018): Fibroblasts as maestros orchestrating tissue regeneration. In: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 12 (1), S. 240–251. DOI: 10.1002/term.2405.

Danik, Stephan B.; Liu, Fangyu; Zhang, Jie; Suk, H. Jacqueline; Morley, Gregory E.; Fishman, Glenn I.; Gutstein, David E. (2004): Modulation of cardiac gap junction expression and arrhythmic susceptibility. In: *Circulation research* 95 (10), S. 1035–1041. DOI: 10.1161/01.RES.0000148664.33695.2a.

Danik, Stephan B.; Rosner, Gregg; Lader, Joshua; Gutstein, David E.; Fishman, Glenn I.; Morley, Gregory E. (2008): Electrical remodeling contributes to complex tachyarrhythmias in connexin43-deficient mouse hearts. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (4), S. 1204–1212. DOI: 10.1096/fj.07-8974com.

Daskalopoulos, Evangelos P.; Janssen, Ben J. A.; Blankesteyn, W. Matthijs (2012): Myofibroblasts in the infarct area: concepts and challenges. In: *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 18 (1), S. 35–49. DOI: 10.1017/S143192761101227X.

Delmar, Mario; Laird, Dale W.; Naus, Christian C.; Nielsen, Morten S.; Verselis, Vytautas K.; White, Thomas W. (2018): Connexins and Disease. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 10 (9). DOI: 10.1101/cshperspect.a029348.

Delorme, B.; Dahl, E.; Jarry-Guichard, T.; Briand, J. P.; Willecke, K.; Gros, D.; Théveniau-Ruissy, M. (1997): Expression pattern of connexin gene products at the early developmental stages of the mouse cardiovascular system. In: *Circulation research* 81 (3), S. 423–437. DOI: 10.1161/01.res.81.3.423.

Denoyelle, F.; Lina-Granade, G.; Plauchu, H.; Bruzzone, R.; Chaïb, H.; Lévi-Acobas, F. et al. (1998): Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. In: *Nature* 393 (6683), S. 319–320. DOI: 10.1038/30639.

Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung e. V. (2022): Plötzlicher Herztod – Ursachen verstehen, Vorboten erkennen und wirksame Therapien entwickeln. Online verfügbar unter <https://dzhk.de/aktuelles/news/artikel/ploetzlicher-herztod-ursachen-verstehen-vorboten-erkennen-und-wirksame-therapien-entwickeln/>, zuletzt aktualisiert am 12.11.2019, zuletzt geprüft am 30.08.2023.

- Dhein, Stefan; Salameh, Aida (2021): Remodeling of Cardiac Gap Junctional Cell-Cell Coupling. In: *Cells* 10 (9), Artikel 2422. DOI: 10.3390/cells10092422.
- Dillon, S. M.; Alessie, M. A.; Ursell, P. C.; Wit, A. L. (1988): Influences of anisotropic tissue structure on reentrant circuits in the epicardial border zone of subacute canine infarcts. In: *Circulation research* 63 (1), S. 182–206. DOI: 10.1161/01.res.63.1.182.
- Dobaczewski, Marcin; Gonzalez-Quesada, Carlos; Frangogiannis, Nikolaos G. (2010): The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 48 (3), S. 504–511. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.07.015.
- Dobrowolski, Radoslaw; Sasse, Philipp; Schrickel, Jan W.; Watkins, Marcus; Kim, Jung-Sun; Rackauskas, Mindaugas et al. (2008): The conditional connexin43G138R mouse mutant represents a new model of hereditary oculodentodigital dysplasia in humans. In: *Human molecular genetics* 17 (4), S. 539–554. DOI: 10.1093/hmg/ddm329.
- Donnelly, Michelle L. L.; Luke, Garry; Mehrotra, Amit; Li, Xuejun; Hughes, Lorraine E.; Gani, David; Ryan, Martin D. (2001): Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. In: *The Journal of general virology* 82 (Pt 5), S. 1013–1025. DOI: 10.1099/0022-1317-82-5-1013.
- Dudley, Ed; Bond, A. Elizabeth (2014): Phosphoproteomic techniques and applications. In: *Advances in protein chemistry and structural biology* 95, S. 25–69. DOI: 10.1016/B978-0-12-800453-1.00002-6.
- Duerr, Georg D.; Elhafi, Naziha; Bostani, Toktam; Ellinger, Joerg; Swieny, Louay; Kolobara, Elvis et al. (2011): Comparison of myocardial remodeling between cryoinfarction and reperfused infarction in mice. In: *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, S. 961298. DOI: 10.1155/2011/961298.
- DZHK (2022): Plötzlicher Herztod. Online verfügbar unter <https://dzhk.de/herz-kreislauf-erkrankungen/herz-kreislauf-erkrankungen/ploetzlicher-herztod/>, zuletzt aktualisiert am 06.06.2023, zuletzt geprüft am 30.08.2023.
- EKG & ECHO (2021): Mechanismen von Arrhythmien: von der Automatizität zum Reentry – EKG & ECHO. Online verfügbar unter <https://ekgecho.de/thema/mechanismen-arrhythmien-automatizitaet-reentry/>, zuletzt aktualisiert am 28.11.2021, zuletzt geprüft am 30.08.2023.
- EMBL-EBI Gene Expression Team (2022): Baseline expression ensmusg00000027750 (Postn). Online verfügbar unter

https://www.ebi.ac.uk/gxa/genes/ensmusg00000027750?bs=%7B%22mus%20musculus%22%3A%5B%22ORGANISM_PART%22%2C%22CELL_TYPE%22%5D%7D&ds=%7B%22kingdom%22%3A%5B%22animals%22%5D%7D#baseline, zuletzt aktualisiert am 19.10.2022, zuletzt geprüft am 30.08.2023.

Epifantseva, Irina; Shaw, Robin M. (2018): Intracellular trafficking pathways of Cx43 gap junction channels. In: *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes* 1860 (1), S. 40–47. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.05.018.

Ewart, J. L.; Cohen, M. F.; Meyer, R. A.; Huang, G. Y.; Wessels, A.; Gourdie, R. G. et al. (1997): Heart and neural tube defects in transgenic mice overexpressing the Cx43 gap junction gene. In: *Development* 124 (7), S. 1281–1292. DOI: 10.1242/dev.124.7.1281.

Fontes, Magda S. C.; van Veen, Toon A. B.; Bakker, Jacques M. T. de; van Rijen, Harold V. M. (2012): Functional consequences of abnormal Cx43 expression in the heart. In: *Biochimica et biophysica acta* 1818 (8), S. 2020–2029. DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.07.039.

Frangogiannis, Nikolaos G. (2015): Pathophysiology of Myocardial Infarction. In: *Comprehensive Physiology* 5 (4), S. 1841–1875. DOI: 10.1002/cphy.c150006.

Frisk, Michael; Ruud, Marianne; Espe, Emil K. S.; Aronsen, Jan Magnus; Røe, Åsmund T.; Zhang, Lili et al. (2016): Elevated ventricular wall stress disrupts cardiomyocyte t-tubule structure and calcium homeostasis. In: *Cardiovascular research* 112 (1), S. 443–451. DOI: 10.1093/cvr/cvw111.

Fu, Xing; Khalil, Hadi; Kanisicak, Onur; Boyer, Justin G.; Vagnozzi, Ronald J.; Maliken, Bryan D. et al. (2018): Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. In: *The Journal of clinical investigation* 128 (5), S. 2127–2143. DOI: 10.1172/JCI98215.

Gao, Rui-Juan; Zhang, Ai-Mei; Jia, Qi-Hua; Dang, Zi-Ting; Tian, Tian; Zhang, Jing-Rong et al. (2021): The promoting role of Cx43 on the proliferation and migration of arterial smooth muscle cells for angiotensin II-dependent hypertension. In: *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 70, S. 102072. DOI: 10.1016/j.pupt.2021.102072.

Garcia-Dorado, D.; Inserte, J.; Ruiz-Meana, M.; González, M. A.; Solares, J.; Juliá, M. et al. (1997): Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. In: *Circulation* 96 (10), S. 3579–3586. DOI: 10.1161/01.cir.96.10.3579.

Gaudesius, Giedrius; Miragoli, Michele; Thomas, Stuart P.; Rohr, Stephan (2003): Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. In: *Circulation research* 93 (5), S. 421–428. DOI: 10.1161/01.RES.0000089258.40661.0C.

Geisslinger, Gerd; Menzel, Sabine; Gudermann, Thomas; Hinz, Burkhard; Ruth, Peter; Mutschler, Ernst (2019): Mutschler Arzneimittelwirkungen. Pharmakologie, klinische Pharmakologie, Toxikologie. 11., völlig neu bearbeitete Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. Online verfügbar unter <https://elibrary.hirzel.de/textbook/99.105015/9783804740549>.

George, Alfred L. (2009): Common genetic variants in sudden cardiac death. In: *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 6 (11 Suppl), S3-9. DOI: 10.1016/j.hrthm.2009.08.024.

George, Sophia H. L.; Gertsenstein, Marina; Vintersten, Kristina; Korets-Smith, Ella; Murphy, John; Stevens, Mary E. et al. (2007): Developmental and adult phenotyping directly from mutant embryonic stem cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (11), S. 4455–4460. DOI: 10.1073/pnas.0609277104.

Giménez, Carlos Sebastián; Olea, Fernanda Daniela; Locatelli, Paola; Dewey, Ricardo A.; Abraham, Gustavo Abel; Montini Ballarin, Florencia et al. (2018): Effect of poly (l-lactic acid) scaffolds seeded with aligned diaphragmatic myoblasts overexpressing connexin-43 on infarct size and ventricular function in sheep with acute coronary occlusion. In: *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* 46 (sup3), S717-S724. DOI: 10.1080/21691401.2018.1508029.

Goodenough, Daniel A.; Paul, David L. (2009): Gap junctions. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1 (1), a002576. DOI: 10.1101/cshperspect.a002576.

Gutstein, David E.; Danik, Stephan B.; Lewitton, Steve; France, David; Liu, Fangyu; Chen, Franklin L. et al. (2005): Focal gap junction uncoupling and spontaneous ventricular ectopy. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 289 (3), H1091-8. DOI: 10.1152/ajpheart.00095.2005.

Haas, Nikolaus A.; Kleideiter, Ulrich (Hg.) (2011): Kinderkardiologie. Klinik und Praxis der Herzerkrankungen bei Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen ; 110 Tabellen ; [inklusive DVD]. Stuttgart, New York, NY: Thieme.

Hennan, James K.; Swillo, Robert E.; Morgan, Gwen A.; Keith, James C.; Schaub, Robert G.; Smith, Robert P. et al. (2006): Rotigaptide (ZP123) prevents spontaneous ventricular arrhythmias and reduces infarct size during myocardial ischemia/reperfusion injury in open-

chest dogs. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 317 (1), S. 236–243. DOI: 10.1124/jpet.105.096933.

Hesse, Michael; Raulf, Alexandra; Pilz, Gregor-Alexander; Haberlandt, Christian; Klein, Alexandra M.; Jabs, Ronald et al. (2012): Direct visualization of cell division using high-resolution imaging of M-phase of the cell cycle. In: *Nature communications* 3, Artikel 1076. DOI: 10.1038/ncomms2089.

Hesse, Michael; Welz, Armin; Fleischmann, Bernd K. (2018): Heart regeneration and the cardiomyocyte cell cycle. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 470 (2), S. 241–248. DOI: 10.1007/s00424-017-2061-4.

Heusch, Gerd; Skyschally, Andreas; Schulz, Rainer (2011): The in-situ pig heart with regional ischemia/reperfusion - ready for translation. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 50 (6), S. 951–963. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.02.016.

Hirsch-Kauffmann, Monica; Schweiger, Manfred (1996): *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 3., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme.

Hunter, Andrew W.; Barker, Ralph J.; Zhu, Ching; Gourdie, Robert G. (2005): Zonula occludens-1 alters connexin43 gap junction size and organization by influencing channel accretion. In: *Molecular biology of the cell* 16 (12), S. 5686–5698. DOI: 10.1091/mbc.e05-08-0737.

Hunter, Andrew W.; Jourdan, Jane; Gourdie, Robert G. (2003): Fusion of GFP to the carboxyl terminus of connexin43 increases gap junction size in HeLa cells. In: *Cell communication & adhesion* 10 (4-6), S. 211–214. DOI: 10.1080/cac.10.4-6.211.214.

Ieda, Masaki; Fu, Ji-Dong; Delgado-Olguin, Paul; Vedantham, Vasanth; Hayashi, Yohei; Bruneau, Benoit G.; Srivastava, Deepak (2010): Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. In: *Cell* 142 (3), S. 375–386. DOI: 10.1016/j.cell.2010.07.002.

Ivanova, Elena; Kovacs-Oller, Tamas; Sagdullaev, Botir T. (2017): Vascular Pericyte Impairment and Connexin43 Gap Junction Deficit Contribute to Vasomotor Decline in Diabetic Retinopathy. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 37 (32), S. 7580–7594. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0187-17.2017.

Janse, M. J.; Cinca, J.; Moréna, H.; Fiolet, J. W.; Kléber, A. G.; Vries, G. P. de et al. (1979): The "border zone" in myocardial ischemia. An electrophysiological, metabolic, and histochemical correlation in the pig heart. In: *Circulation research* 44 (4), S. 576–588. DOI: 10.1161/01.res.44.4.576.

Jansen, John A.; Noorman, Maartje; Musa, Hassan; Stein, Mèra; Jong, Sanne de; van der Nagel, Roel et al. (2012): Reduced heterogeneous expression of Cx43 results in decreased Nav1.5 expression and reduced sodium current that accounts for arrhythmia vulnerability in conditional Cx43 knockout mice. In: *Heart rhythm* 9 (4), S. 600–607. DOI:

10.1016/j.hrthm.2011.11.025.

Kanisicak, Onur; Khalil, Hadi; Ivey, Malina J.; Karch, Jason; Maliken, Bryan D.; Correll, Robert N. et al. (2016): Genetic lineage tracing defines myofibroblast origin and function in the injured heart. In: *Nature communications* 7, S. 12260. DOI: 10.1038/ncomms12260.

Kanno, Shigeto; Kovacs, Attila; Yamada, Kathryn A.; Saffitz, Jeffrey E. (2003): Connexin43 as a determinant of myocardial infarct size following coronary occlusion in mice. In: *Journal of the American College of Cardiology* 41 (4), S. 681–686. DOI: 10.1016/s0735-1097(02)02893-0.

Karperien, Lucas; Navaei, Ali; Godau, Brent; Dolatshahi-Pirouz, Alireza; Akbari, Mohsen; Nikkhah, Mehdi (2019): Nanoengineered biomaterials for cardiac regeneration. In: Masoud Mozafari, Jayakumar Rajadas und David Kaplan (Hg.): *Nanoengineered biomaterials for regenerative medicine*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier (Micro & nano technologies series), S. 95–124.

Katsumata, Yoshinori; Shinmura, Ken; Sugiura, Yuki; Tohyama, Shugo; Matsushashi, Tomohiro; Ito, Hideyuki et al. (2014): Endogenous prostaglandin D2 and its metabolites protect the heart against ischemia-reperfusion injury by activating Nrf2. In: *Hypertension* 63 (1), S. 80–87. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01639.

Kim, Hyeonhui; Kim, Minki; Im, Sun-Kyoung; Fang, Sungsoon (2018): Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. In: *Laboratory animal research* 34 (4), S. 147–159. DOI: 10.5625/lar.2018.34.4.147.

Kim, Jin Hee; Lee, Sang-Rok; Li, Li-Hua; Park, Hye-Jeong; Park, Jeong-Hoh; Lee, Kwang Youl et al. (2011): High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. In: *PloS one* 6 (4), Artikel e18556. DOI: 10.1371/journal.pone.0018556.

Kimura, Kenichi; Ooms, Astrid; Graf-Riesen, Kathrin; Kuppusamy, Maithreyan; Unger, Andreas; Schuld, Julia et al. (2021): Overexpression of human BAG3P209L in mice causes restrictive cardiomyopathy. In: *Nature communications* 12 (1), Artikel 3575. DOI: 10.1038/s41467-021-23858-7.

- Kohl, Peter (2003): Heterogeneous cell coupling in the heart: an electrophysiological role for fibroblasts. In: *Circulation research* 93 (5), S. 381–383. DOI: 10.1161/01.RES.0000091364.90121.0C.
- Kohl, Peter; Gourdie, Robert G. (2014): Fibroblast-myocyte electrotonic coupling: does it occur in native cardiac tissue? In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 70 (100), S. 37–46. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.12.024.
- Koval, Michael; Molina, Samuel A.; Burt, Janis M. (2014): Mix and match: investigating heteromeric and heterotypic gap junction channels in model systems and native tissues. In: *FEBS letters* 588 (8), S. 1193–1204. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.02.025.
- Krämer, M.; Motaal, A. G.; Herrmann, K-H; Löffler, B.; Reichenbach, J. R.; Strijkers, G. J.; Hoerr, V. (2017): Cardiac 4D phase-contrast CMR at 9.4 T using self-gated ultra-short echo time (UTE) imaging. In: *Journal of cardiovascular magnetic resonance : official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* 19 (1), S. 39. DOI: 10.1186/s12968-017-0351-9.
- Krüger, O.; Plum, A.; Kim, J. S.; Winterhager, E.; Maxeiner, S.; Hallas, G. et al. (2000): Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. In: *Development* 127 (19), S. 4179–4193. DOI: 10.1242/dev.127.19.4179.
- Kumai, M.; Nishii, K.; Nakamura, K.; Takeda, N.; Suzuki, M.; Shibata, Y. (2000): Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. In: *Development* 127 (16), S. 3501–3512. DOI: 10.1242/dev.127.16.3501.
- Kumar, Nalin M.; Gilula, Norton B. (1996): The Gap Junction Communication Channel. In: *Cell* 84 (3), S. 381–388. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81282-9.
- Kung, Geoffrey L.; Vaseghi, Marmar; Gahm, Jin K.; Shevtsov, Jane; Garfinkel, Alan; Shivkumar, Kalyanam; Ennis, Daniel B. (2018): Microstructural Infarct Border Zone Remodeling in the Post-infarct Swine Heart Measured by Diffusion Tensor MRI. In: *Frontiers in physiology* 9, S. 826. DOI: 10.3389/fphys.2018.00826.
- Kuzmich, A. I.; Vvedenskiĭ, A. V.; Kopantsev, E. P.; Vinogradova, T. V. (2013): Quantitative comparison of expression for genes linked in bicistronic vectors via ires or 2A-peptide of porcine teschovirus-1 sequence. In: *Bioorganicheskaiia khimiiia* 39 (4), S. 454–465. DOI: 10.1134/s1068162013040122.
- Lampe, Paul D.; Cooper, Cynthia D.; King, Timothy J.; Burt, Janis M. (2006): Analysis of Connexin43 phosphorylated at S325, S328 and S330 in normoxic and ischemic heart. In: *Journal of cell science* 119 (Pt 16), S. 3435–3442. DOI: 10.1242/jcs.03089.

- Larsen, Reinhard (2016): Physiologie des Herzens und des Kreislaufs. In: Tobias Fink, Tilmann Müller-Wolff und Reinhard Larsen (Hg.): Anästhesie und Intensivmedizin für die Fachpflege. 9. Auflage. Berlin: Springer, S. 646–663.
- Leancă, Sabina Andreea; Crișu, Daniela; Petriș, Antoniu Octavian; Afrăsânie, Irina; Genes, Antonia; Costache, Alexandru Dan et al. (2022): Left Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction: From Physiopathology to Treatment. In: *Life (Basel, Switzerland)* 12 (8). DOI: 10.3390/life12081111.
- Leithe, Edward; Mesnil, Marc; Aasen, Trond (2018): The connexin 43 C-terminus: A tail of many tales. In: *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes* 1860 (1), S. 48–64. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.05.008.
- Li, Hong; Brodsky, Sergey; Kumari, Sindu; Valiunas, Virginijus; Brink, Peter; Kaide, Jun-Ichi et al. (2002): Paradoxical overexpression and translocation of connexin43 in homocysteine-treated endothelial cells. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 282 (6), H2124-33. DOI: 10.1152/ajpheart.01028.2001.
- Lin, Xianming; Crye, Mark; Veenstra, Richard D. (2003): Regulation of connexin43 gap junctional conductance by ventricular action potentials. In: *Circulation research* 93 (6), e63-73. DOI: 10.1161/01.RES.0000093379.61888.35.
- Lindsey, Merry L.; Bolli, Roberto; Canty, John M.; Du, Xiao-Jun; Frangogiannis, Nikolaos G.; Frantz, Stefan et al. (2018): Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 314 (4), H812-H838. DOI: 10.1152/ajpheart.00335.2017.
- Lissoni, Alessio; Hulpiau, Paco; Martins-Marques, Tânia; Wang, Nan; Bultynck, Geert; Schulz, Rainer et al. (2021): RyR2 regulates Cx43 hemichannel intracellular Ca²⁺-dependent activation in cardiomyocytes. In: *Cardiovascular research* 117 (1), S. 123–136. DOI: 10.1093/cvr/cvz340.
- Lübckemeier, Indra; Requardt, Robert Pascal; Lin, Xianming; Sasse, Philipp; Andrié, René; Schrickel, Jan Wilko et al. (2013): Deletion of the last five C-terminal amino acid residues of connexin43 leads to lethal ventricular arrhythmias in mice without affecting coupling via gap junction channels. In: *Basic research in cardiology* 108 (3), S. 348. DOI: 10.1007/s00395-013-0348-y.
- Ma, Yonggang; Iyer, Rugmani Padmanabhan; Jung, Mira; Czubryt, Michael P.; Lindsey, Merry L. (2017): Cardiac Fibroblast Activation Post-Myocardial Infarction: Current Knowledge

Gaps. In: *Trends in pharmacological sciences* 38 (5), S. 448–458. DOI: 10.1016/j.tips.2017.03.001.

Maguire, Colin T.; Wakimoto, Hiroko; Patel, Vickas V.; Hammer, Peter E.; Gauvreau, Kimberlee; Berul, Charles I. (2003): Implications of ventricular arrhythmia vulnerability during murine electrophysiology studies. In: *Physiological genomics* 15 (1), S. 84–91. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00034.2003.

Mahoney, Vanessa M.; Mezzano, Valeria; Mirams, Gary R.; Maass, Karen; Li, Zhen; Cerrone, Marina et al. (2016): Connexin43 contributes to electrotonic conduction across scar tissue in the intact heart. In: *Scientific reports* 6, S. 26744. DOI: 10.1038/srep26744.

Mannell, Hanna; Kameritsch, Petra; Beck, Heike; Pfeifer, Alexander; Pohl, Ulrich; Pogoda, Kristin (2021): Cx43 Promotes Endothelial Cell Migration and Angiogenesis via the Tyrosine Phosphatase SHP-2. In: *International journal of molecular sciences* 23 (1). DOI: 10.3390/ijms23010294.

Marsh, Spencer R.; Williams, Zachary J.; Pridham, Kevin J.; Gourdie, Robert G. (2021): Peptidic Connexin43 Therapeutics in Cardiac Reparative Medicine. In: *Journal of Cardiovascular Development and Disease* 8 (5). DOI: 10.3390/jcdd8050052.

Martin, Tamara P.; MacDonald, Eilidh A.; Elbassioni, Ali Ali Mohamed; O'Toole, Dylan; Zaeri, Ali Abdullah I.; Nicklin, Stuart A. et al. (2022): Preclinical models of myocardial infarction: from mechanism to translation. In: *British journal of pharmacology* 179 (5), S. 770–791. DOI: 10.1111/bph.15595.

McArthur, Lisa; Chilton, Lisa; Smith, Godfrey L.; Nicklin, Stuart A. (2015): Electrical consequences of cardiac myocyte: fibroblast coupling. In: *Biochemical Society transactions* 43 (3), S. 513–518. DOI: 10.1042/BST20150035.

Meier, Carola; Rosenkranz, Katja (2014): Cx43 expression and function in the nervous system-implications for stem cell mediated regeneration. In: *Frontiers in physiology* 5, S. 106. DOI: 10.3389/fphys.2014.00106.

Mizuguchi, H.; Xu, Z.; Ishii-Watabe, A.; Uchida, E.; Hayakawa, T. (2000): IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 1 (4), S. 376–382. DOI: 10.1006/mthe.2000.0050.

Montgomery, Jade; Ghatnekar, Gautam S.; Grek, Christina L.; Moyer, Kurtis E.; Gourdie, Robert G. (2018): Connexin 43-Based Therapeutics for Dermal Wound Healing. In: *International journal of molecular sciences* 19 (6). DOI: 10.3390/ijms19061778.

Musil, L. S.; Goodenough, D. A. (1991): Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. In: *The Journal of cell biology* 115 (5), S. 1357–1374. DOI: 10.1083/jcb.115.5.1357.

Nakamura, Michinari; Sadoshima, Junichi (2018): Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. In: *Nature reviews. Cardiology* 15 (7), S. 387–407. DOI: 10.1038/s41569-018-0007-y.

Nielsen, Morten Schak; Axelsen, Lene Nygaard; Sorgen, Paul L.; Verma, Vandana; Delmar, Mario; Holstein-Rathlou, Niels-Henrik (2012): Gap junctions. In: *Comprehensive Physiology* 2 (3), S. 1981–2035. DOI: 10.1002/cphy.c110051.

Niemann, Pia; Schiffer, Miriam; Malan, Daniela; Grünberg, Sabine; Roell, Wilhelm; Geisen, Caroline; Fleischmann, Bernd K. (2022): Generation and Characterization of an Inducible Cx43 Overexpression System in Mouse Embryonic Stem Cells. In: *Cells* 11 (4). DOI: 10.3390/cells11040694.

Ottersbach, Annika; Mykhaylyk, Olga; Heidsieck, Alexandra; Eberbeck, Dietmar; Rieck, Sarah; Zimmermann, Katrin et al. (2018): Improved heart repair upon myocardial infarction: Combination of magnetic nanoparticles and tailored magnets strongly increases engraftment of myocytes. In: *Biomaterials* 155, S. 176–190. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.11.012.

Pape, Hans-Christian; Kurtz, Armin; Silbernagl, Stefan; Gay, Rüdiger; Rothenburger, Astried (Hg.) (op. 2014): Physiologie. Unter Mitarbeit von Hans-Christian Pape, Armin Kurtz, Stefan Silbernagl, Rainer Klinke und Bernhard Brenner. 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:24-epflicht-1916950>.

Perez-Pinera, Pablo; Ousterout, David G.; Brown, Matthew T.; Gersbach, Charles A. (2012): Gene targeting to the ROSA26 locus directed by engineered zinc finger nucleases. In: *Nucleic acids research* 40 (8), S. 3741–3752. DOI: 10.1093/nar/gkr1214.

Prather, Randall S.; Shen, Miaoda; Dai, Yifan (2008): Genetically modified pigs for medicine and agriculture. In: *Biotechnology & genetic engineering reviews* 25, S. 245–265. DOI: 10.7313/upo9781904761679.011.

Priori, Silvia G.; Blomström-Lundqvist, Carina; Mazzanti, Andrea; Blom, Nico; Borggrefe, Martin; Camm, John et al. (2015): 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death. In: *European heart journal* 36 (41), S. 2793–2867. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv316.

Pschyrembel Online | Reentry-Mechanismus (2022). Online verfügbar unter <https://www.pschyrembel.de/Reentry-Mechanismus/K0JJE>, zuletzt aktualisiert am 03.2022, zuletzt geprüft am 30.08.2023.

Pschyrembel Online | Transversalsystem (2018). Online verfügbar unter <https://www.pschyrembel.de/Transversalsystem/B0HA4>, zuletzt aktualisiert am 01.2018, zuletzt geprüft am 30.08.2023.

Quinn, T. Alexander; Camelliti, Patrizia; Rog-Zielinska, Eva A.; Siedlecka, Urszula; Poggioli, Tommaso; O'Toole, Eileen T. et al. (2016): Electrotonic coupling of excitable and nonexcitable cells in the heart revealed by optogenetics. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (51), S. 14852–14857. DOI: 10.1073/pnas.1611184114.

Reaume, A. G.; Sousa, P. A. de; Kulkarni, S.; Langille, B. L.; Zhu, D.; Davies, T. C. et al. (1995): Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. In: *Science (New York, N.Y.)* 267 (5205), S. 1831–1834. DOI: 10.1126/science.7892609.

Rhett, J. Matthew; Jourdan, Jane; Gourdie, Robert G. (2011): Connexin 43 connexon to gap junction transition is regulated by zonula occludens-1. In: *Molecular biology of the cell* 22 (9), S. 1516–1528. DOI: 10.1091/mbc.E10-06-0548.

Richardson, William J.; Clarke, Samantha A.; Quinn, T. Alexander; Holmes, Jeffrey W. (2015): Physiological Implications of Myocardial Scar Structure. In: *Comprehensive Physiology* 5 (4), S. 1877–1909. DOI: 10.1002/cphy.c140067.

Rivaud, Mathilde R.; Delmar, Mario; Remme, Carol Ann (2020): Heritable arrhythmia syndromes associated with abnormal cardiac sodium channel function: ionic and non-ionic mechanisms. In: *Cardiovascular research* 116 (9), S. 1557–1570. DOI: 10.1093/cvr/cvaa082.

Rodjakovic, Daniel; Salm, Lilian; Beldi, Guido (2021): Function of Connexin-43 in Macrophages. In: *International journal of molecular sciences* 22 (3). DOI: 10.3390/ijms22031412.

Rodríguez-Sinovas, Antonio; Sánchez, Jose Antonio; Valls-Lacalle, Laura; Consegal, Marta; Ferreira-González, Ignacio (2021): Connexins in the Heart: Regulation, Function and Involvement in Cardiac Disease. In: *International journal of molecular sciences* 22 (9), Artikel 4413, S. 1–64. DOI: 10.3390/ijms22094413.

Roell, Wilhelm; Klein, Alexandra M.; Breitbach, Martin; Becker, Torsten S.; Parikh, Ashish; Lee, Jane et al. (2018): Overexpression of Cx43 in cells of the myocardial scar: Correction of

post-infarct arrhythmias through heterotypic cell-cell coupling. In: *Scientific reports* 8 (1), Artikel 7145. DOI: 10.1038/s41598-018-25147-8.

Roell, Wilhelm; Lewalter, Thorsten; Sasse, Philipp; Tallini, Yvonne N.; Choi, Bum-Rak; Breitbach, Martin et al. (2007): Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. In: *Nature* 450 (7171), S. 819–824. DOI: 10.1038/nature06321.

Ruangvoravat, C. P.; Lo, C. W. (1992): Connexin 43 expression in the mouse embryo: localization of transcripts within developmentally significant domains. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 194 (4), S. 261–281. DOI: 10.1002/aja.1001940403.

Rubart, Michael; Tao, Wen; Lu, Xiao-Long; Conway, Simon J.; Reuter, Sean P.; Lin, Shien-Fong; Soonpaa, Mark H. (2018): Electrical coupling between ventricular myocytes and myofibroblasts in the infarcted mouse heart. In: *Cardiovascular research* 114 (3), S. 389–400. DOI: 10.1093/cvr/cvx163.

Rutherford, Sally L.; Trew, Mark L.; Sands, Gregory B.; LeGrice, Ian J.; Smaill, Bruce H. (2012): High-resolution 3-dimensional reconstruction of the infarct border zone: impact of structural remodeling on electrical activation. In: *Circulation research* 111 (3), S. 301–311. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.260943.

Sáez, Juan C.; Schalper, Kurt A.; Retamal, Mauricio A.; Orellana, Juan A.; Shoji, Kenji F.; Bennett, Michael V. L. (2010): Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells. In: *Experimental cell research* 316 (15), S. 2377–2389. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.05.026.

Sasse, Philipp; Malan, Daniela; Fleischmann, Michaela; Roell, Wilhelm; Gustafsson, Erika; Bostani, Toktam et al. (2008): Perlecan is critical for heart stability. In: *Cardiovascular research* 80 (3), S. 435–444. DOI: 10.1093/cvr/cvn225.

Sauer, B.; Henderson, N. (1988): Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (14), S. 5166–5170. DOI: 10.1073/pnas.85.14.5166.

Servier Medical Art (2022): SMART - Servier Medical ART. Online verfügbar unter <https://smart.servier.com/>, zuletzt aktualisiert am 21.11.2022, zuletzt geprüft am 30.08.2023.

Severs, Nicholas J.; Bruce, Alexandra F.; Dupont, Emmanuel; Rothery, Stephen (2008): Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. In: *Cardiovascular research* 80 (1), S. 9–19. DOI: 10.1093/cvr/cvn133.

- Shafiei, Afsaneh; Pilehvar-Soltanahmadi, Younes; Ziaee, Shayan; Mofarrah, Mohsen; Zarghami, Nosratollah (2018): Association between Serum Kalirin Levels and the KALRN gene rs9289231 Polymorphism in Early-Onset Coronary Artery Disease. In: *The Journal of Tehran University Heart Center* 13 (2), S. 58–64, zuletzt geprüft am 30.08.2023.
- Shin, Kyung-Tae; Nie, Zheng-Wen; Zhou, Wenjun; Zhou, Dongjie; Kim, Ju-Yeon; Ock, Sun A. et al. (2020): Connexin 43 Knockdown Induces Mitochondrial Dysfunction and Affects Early Developmental Competence in Porcine Embryos. In: *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 26 (2), S. 287–296. DOI: 10.1017/S1431927620000033.
- Smet, Maarten Aj de; Lissoni, Alessio; Nezlobinsky, Timur; Wang, Nan; Dries, Eef; Pérez-Hernández, Marta et al. (2021): Cx43 hemichannel microdomain signaling at the intercalated disc enhances cardiac excitability. In: *The Journal of clinical investigation* 131 (7). DOI: 10.1172/JCI137752.
- Smith, J. H.; Green, C. R.; Peters, N. S.; Rothery, S.; Severs, N. J. (1991): Altered patterns of gap junction distribution in ischemic heart disease. An immunohistochemical study of human myocardium using laser scanning confocal microscopy. In: *The American journal of pathology* 139 (4), S. 801–821.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D. et al. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Analytical biochemistry* 150 (1), S. 76–85. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- Snider, Paige; Standley, Kara N.; Wang, Jian; Azhar, Mohamad; Doetschman, Thomas; Conway, Simon J. (2009): Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin. In: *Circulation research* 105 (10), S. 934–947. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.201400.
- So, Cook-Sup (Hg.) (2013): *Praktische EKG-Deutung. Einführung in die Elektrokardiografie*. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme.
- Sohal, D. S.; Nghiem, M.; Crackower, M. A.; Witt, S. A.; Kimball, T. R.; Tymitz, K. M. et al. (2001): Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. In: *Circulation research* 89 (1), S. 20–25. DOI: 10.1161/hh1301.092687.
- Söhl, Goran; Willecke, Klaus (2003): An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. In: *Cell communication & adhesion* 10 (4-6), S. 173–180. DOI: 10.1080/cac.10.4-6.173.180.

- Söhl, Goran; Willecke, Klaus (2004): Gap junctions and the connexin protein family. In: *Cardiovascular research* 62 (2), S. 228–232. DOI: 10.1016/j.cardiores.2003.11.013.
- Solan, Joell L.; Lampe, Paul D. (2020): Src Regulation of Cx43 Phosphorylation and Gap Junction Turnover. In: *Biomolecules* 10 (12). DOI: 10.3390/biom10121596.
- Sood, Nitesh; Ruwald, Anne-Christine H.; Solomon, Scott; Daubert, James P.; McNitt, Scott; Polonsky, Bronislava et al. (2014): Association between myocardial substrate, implantable cardioverter defibrillator shocks and mortality in MADIT-CRT. In: *European heart journal* 35 (2), S. 106–115. DOI: 10.1093/eurheartj/eh451.
- Soriano, P. (1999): Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. In: *Nature genetics* 21 (1), S. 70–71. DOI: 10.1038/5007.
- Sosinsky, Gina E.; Nicholson, Bruce J. (2005): Structural organization of gap junction channels. In: *Biochimica et biophysica acta* 1711 (2), S. 99–125. DOI: 10.1016/j.bbamem.2005.04.001.
- Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH (Hg.) (2018): Connexine. Online verfügbar unter <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/connexine/15110>, zuletzt aktualisiert am 04.09.2018, zuletzt geprüft am 30.08.2023.
- Srinivas, Miduturu; Verselis, Vytas K.; White, Thomas W. (2018): Human diseases associated with connexin mutations. In: *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes* 1860 (1), S. 192–201. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.04.024.
- Sternberg, Nat; Hamilton, Daniel (1981): Bacteriophage P1 site-specific recombination. In: *Journal of Molecular Biology* 150 (4), S. 467–486. DOI: 10.1016/0022-2836(81)90375-2.
- Sutton, M. G.; Sharpe, N. (2000): Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. In: *Circulation* 101 (25), S. 2981–2988. DOI: 10.1161/01.cir.101.25.2981.
- Suzuki, Ken; Murtuza, Bari; Beauchamp, Jonathan R.; Brand, Nigel J.; Barton, Paul J. R.; Varela-Carver, Anabel et al. (2004): Role of interleukin-1beta in acute inflammation and graft death after cell transplantation to the heart. In: *Circulation* 110 (11 Suppl 1), II219-24. DOI: 10.1161/01.CIR.0000138388.55416.06.
- Svingen, Terje; Letting, Heidi; Hadrup, Niels; Hass, Ulla; Vinggaard, Anne Marie (2015): Selection of reference genes for quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analysis of rat tissues under physiological and toxicological conditions. In: *PeerJ* 3, e855. DOI: 10.7717/peerj.855.

Swynghedauw, Bernard; Baillard, Christophe; Milliez, Paul (2003): The long QT interval is not only inherited but is also linked to cardiac hypertrophy. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 81 (6), S. 336–345. DOI: 10.1007/s00109-003-0437-8.

Szummer, Karolina; Wallentin, Lars; Lindhagen, Lars; Alfredsson, Joakim; Erlinge, David; Held, Claes et al. (2017): Improved outcomes in patients with ST-elevation myocardial infarction during the last 20 years are related to implementation of evidence-based treatments: experiences from the SWEDEHEART registry 1995-2014. In: *European heart journal* 38 (41), S. 3056–3065. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx515.

Tereshchenko, Larisa G.; Faddis, Mitchell N.; Fetics, Barry J.; Zelik, Karl E.; Efimov, Igor R.; Berger, Ronald D. (2009): Transient local injury current in right ventricular electrogram after implantable cardioverter-defibrillator shock predicts heart failure progression. In: *Journal of the American College of Cardiology* 54 (9), S. 822–828. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.06.004.

The Human Protein Atlas (2022): Tissue expression of POSTN. Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000133110-POSTN/tissue>, zuletzt aktualisiert am 19.10.2022, zuletzt geprüft am 30.08.2023.

Thévenin, Anastasia F.; Margraf, Rachel A.; Fisher, Charles G.; Kells-Andrews, Rachael M.; Falk, Matthias M. (2017): Phosphorylation regulates connexin43/ZO-1 binding and release, an important step in gap junction turnover. In: *Molecular biology of the cell* 28 (25), S. 3595–3608. DOI: 10.1091/mbc.E16-07-0496.

Thygesen, Kristian; Alpert, Joseph S.; Jaffe, Allan S.; Chaitman, Bernard R.; Bax, Jeroen J.; Morrow, David A.; White, Harvey D. (2018): Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). In: *Circulation* 138 (20), e618-e651. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000617.

Toldo, Stefano; Mezzaroma, Eleonora; Mauro, Adolfo Gabriele; Salloum, Fadi; van Tassell, Benjamin Wallace; Abbate, Antonio (2015): The inflammasome in myocardial injury and cardiac remodeling. In: *Antioxidants & redox signaling* 22 (13), S. 1146–1161. DOI: 10.1089/ars.2014.5989.

Tong, Dan; Lu, Xuerong; Wang, Hong-Xing; Plante, Isabelle; Lui, Ed; Laird, Dale W. et al. (2009): A dominant loss-of-function GJA1 (Cx43) mutant impairs parturition in the mouse. In: *Biology of reproduction* 80 (6), S. 1099–1106. DOI: 10.1095/biolreprod.108.071969.

Tucker, Nathan R.; Chaffin, Mark; Fleming, Stephen J.; Hall, Amelia W.; Parsons, Victoria A.; Bedi, Kenneth C. et al. (2020): Transcriptional and Cellular Diversity of the Human Heart. In: *Circulation* 142 (5), S. 466–482. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.045401.

- Ursell, P. C.; Gardner, P. I.; Albala, A.; Fenoglio, J. J.; Wit, A. L. (1985): Structural and electrophysiological changes in the epicardial border zone of canine myocardial infarcts during infarct healing. In: *Circulation research* 56 (3), S. 436–451. DOI: 10.1161/01.res.56.3.436.
- van Kempen, Maria J.A.; Fromaget, Catherine; Gros, Daniel; Moorman, Antoon F.M.; Lamers, Wouter H.; van Kempen, M. J. et al. (1991): Spatial distribution of connexin43, the major cardiac gap junction protein, in the developing and adult rat heart. // Spatial distribution of connexin43, the major cardiac gap junction protein, in the developing and adult rat heart. In: *Circulation research* 68 (6), S. 1638–1651. DOI: 10.1161/01.res.68.6.1638.
- Veeraraghavan, Rengasayee; Lin, Joyce; Hoeker, Gregory S.; Keener, James P.; Gourdie, Robert G.; Poelzing, Steven (2015): Sodium channels in the Cx43 gap junction perinexus may constitute a cardiac ephapse: an experimental and modeling study. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 467 (10), S. 2093–2105. DOI: 10.1007/s00424-014-1675-z.
- Verheule, Sander; Kaese, Sven (2013): Connexin diversity in the heart: insights from transgenic mouse models. In: *Frontiers in pharmacology* 4, S. 81. DOI: 10.3389/fphar.2013.00081.
- Verrou, C.; Zhang, Y.; Zürn, C.; Schamel, W. W.; Reth, M. (1999): Comparison of the tamoxifen regulated chimeric Cre recombinases MerCreMer and CreMer. In: *Biological chemistry* 380 (12), S. 1435–1438. DOI: 10.1515/BC.1999.184.
- Waghmare, Sanjeev K.; Estrada, Jose; Reyes, Luz; Li, Ping; Ivary, Bess; Sidner, Richard A. et al. (2011): Gene targeting and cloning in pigs using fetal liver derived cells. In: *The Journal of surgical research* 171 (2), e223-9. DOI: 10.1016/j.jss.2011.07.051.
- Walek, Juliana (2023): Herzgewebe - Histologie und Klinik. Online verfügbar unter <https://www.kenhub.com/de/library/anatomie/herzgewebe>, zuletzt aktualisiert am 21.02.2023, zuletzt geprüft am 30.08.2023.
- Wang, Yuancheng; Wang, Feng; Wang, Riyuan; Zhao, Ping; Xia, Qingyou (2015): 2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori*. In: *Scientific reports* 5, S. 16273. DOI: 10.1038/srep16273.
- World Health Organization (WHO) (2020): The top 10 causes of death. Online verfügbar unter <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>, zuletzt aktualisiert am 09.12.2020, zuletzt geprüft am 30.08.2023.

Wu, Jun-I; Wang, Lu-Hai (2019): Emerging roles of gap junction proteins connexins in cancer metastasis, chemoresistance and clinical application. In: *Journal of biomedical science* 26 (1), S. 8. DOI: 10.1186/s12929-019-0497-x.

Ya, J.; Erdtsieck-Ernste, E. B.; Boer, P. A. de; van Kempen, M. J.; Jongsma, H.; Gros, D. et al. (1998): Heart Defects in Connexin43-Deficient Mice // Heart defects in connexin43-deficient mice. In: *Circulation research* 82 (3), S. 360–366. DOI: 10.1161/01.res.82.3.360.

Yao, Jian-An; Hussain, Wajid; Patel, Pravina; Peters, Nicholas S.; Boyden, Penelope A.; Wit, Andrew L. (2003): Remodeling of gap junctional channel function in epicardial border zone of healing canine infarcts. In: *Circulation research* 92 (4), S. 437–443. DOI: 10.1161/01.RES.0000059301.81035.06.

Yeh, Te-Huei; Tsai, Ching-Hwa; Chen, Yuh-Shyang; Hsu, Wei-Chung; Cheng, Chiung-Hsiang; Hsu, Chuan-Jen; Lee, Shiann-Yann (2007): Increased communication among nasal epithelial cells in air-liquid interface culture. In: *The Laryngoscope* 117 (8), S. 1439–1444. DOI: 10.1097/MLG.0b013e318063e84f.

Zamilpa, Rogelio; Zhang, Jianhua; Chiao, Ying Ann; Castro Brás, Lisandra E. de; Halade, Ganesh V.; Ma, Yonggang et al. (2013): Cardiac wound healing post-myocardial infarction: a novel method to target extracellular matrix remodeling in the left ventricle. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1037, S. 313–324. DOI: 10.1007/978-1-62703-505-7_18.

Zhu, Yi; Gao, Yong; Tao, Caroline; Shao, Mengle; Zhao, Shangang; Huang, Wei et al. (2016): Connexin 43 Mediates White Adipose Tissue Beiging by Facilitating the Propagation of Sympathetic Neuronal Signals. In: *Cell metabolism* 24 (3), S. 420–433. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.08.005.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Connexine im murinen und humanen Herzen.....	10
Tabelle 2: Antiarrhythmika.	20
Tabelle 3: Chemikalien und gekaufte Lösungen.....	26
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien.....	29
Tabelle 5: Verwendete Geräte	30
Tabelle 6: Verwendete Software	32
Tabelle 7: Zusammensetzung von Puffern und Lösungen	33
Tabelle 8: Verwendete Kits	36
Tabelle 9: Zellkulturmedium und Zusätze.....	36
Tabelle 10: Zusammensetzung des Zellkulturmediums.....	37
Tabelle 11: Primersequenzen zur Genotypisierung der transgenen Mauslinien	38
Tabelle 12: AAV2.1-Cre Virus	39
Tabelle 13: Primäre Antikörper für immunhistochemische Färbungen.....	39
Tabelle 14: Primäre Antikörper zur Western blot-Detektion.....	39
Tabelle 15: Sekundäre Antikörper.....	40
Tabelle 16: TaqMan-Assays	40
Tabelle 17: Enzymmix "Neonatal heart Dissociation Kit"	44
Tabelle 18: Runde 1 der programmierten Stimulation	52
Tabelle 19: Runde 2 der programmierten Stimulation	52
Tabelle 20: Runde 3 der programmierten Stimulation	52
Tabelle 21: Burst-Stimulations-Protokoll	53
Tabelle 22: Genotypisierungs-PCR der Gt(ROSA)26Sor ^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)} BF -Mauslinie.....	59
Tabelle 23: Genotypisierungs-PCR Reaktion A der α MHC-MCM-Mauslinie.....	59
Tabelle 24: Genotypisierungs-PCR Reaktion B der α MHC-MCM-Mauslinie.....	59
Tabelle 25: Genotypisierungs-PCR der Periostin-MCM-Mauslinie	60

Tabelle 26: PCR Programm zur Genotypisierung transgener Mauslinien.....	60
Tabelle 27: Bandengrößen der Genotypisierungs-PCRs.....	61
Tabelle 28: CNV-Assay dPCR	62
Tabelle 29: dPCR Programm zur Bestimmung der CNV	62
Tabelle 30: cDNA Synthese	63
Tabelle 31: cDNA Synthese Programm.....	64
Tabelle 32: Genexpression-Assay dPCR.....	64
Tabelle 33: dPCR Programm zur Genexpressionsanalyse.....	64
Tabelle 34: Männliche Chimären nach Blastozysteninjektion.	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines KMs-Netzwerks.....	3
Abbildung 2: Differenzierungsstadien von kFBs in Folge eines Herzinfarktes.	4
Abbildung 3: Aufbau des Herzens und Erregungsleitung.	5
Abbildung 4: Schematischer Aufbau von Connexinen, Hemikanälen (Connexone) und Gap Junctions (GJs).....	9
Abbildung 5: Atherothrombose.....	14
Abbildung 6: Die drei Phasen der Wundheilung post-MI.	15
Abbildung 7: Das infarzierte Herz und post-MI Remodeling.	17
Abbildung 8: Schematische Darstellung ventrikulärer Herzrhythmusstörungen.....	19
Abbildung 9: <i>In vivo</i> Herzinfarktmodelle.	22
Abbildung 10: Taqman-Sonde zur Detektion von endo- und exogenem Cx43.....	41
Abbildung 11: Taqman-Sonde zur Detektion von endogenem Cx43.	41
Abbildung 12: Taqman-Sonde zur Detektion von exogenem Cx43.	41
Abbildung 13: Taqman-Sonde zur Detektion von mCherry.....	41
Abbildung 14: Generierung transgener Mauslinien durch Blastozysteninjektion und Keimbahngängigkeit.	42
Abbildung 15: Prinzip des Tamoxifen-induzierbaren CreER-loxP-Systems.	43

Abbildung 16: Isolation NNKMs aus P2 Mausherzen.	45
Abbildung 17: Kupferstempel.	46
Abbildung 18: Echokardiographie Setup.	49
Abbildung 19: Bestimmung der linksventrikulären Pumpfunktion.	49
Abbildung 20: Bestimmung der Vorderwandbewegung des linken Ventrikels.	50
Abbildung 21: Elektrophysiologische Untersuchung.	51
Abbildung 22: Makroskopische Aufnahme eines Herzens 2 Wochen nach Kryoläsion.	57
Abbildung 23: Bestimmung der Infarktfläche mittels ImageJ Software in Sirius-red / Fast-green gefärbten Herzquerschnitten.	57
Abbildung 24: Schema zur Ohrlochmarkierung der Mäuse.	58
Abbildung 25: Cx43-Überexpressions-Modell.	73
Abbildung 26: Nachweis einer Cre-induzierbaren Cx43-Überexpression in stabil transfizierten, undifferenzierten murinen G4 ES-Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbungen und Western blot-Analysen.	74
Abbildung 27: Induzierbare Cx43-Expression und Ausbildung funktioneller GJs in stabil transfizierten HeLa-Zellen.	76
Abbildung 28: Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)-Experimente zeigen die Ausbildung funktioneller GJs in stabil transfizierten Cx43-überexprimierenden G4 ES-Zellen.	78
Abbildung 29: Nachweis der Keimbahngängigkeit des Transgens mittels Fellfarbe. ...	79
Abbildung 30: Nachweis der Transgenexpression nach AAV2.1-Cre Virus-Transduktion NNKMs der Gt(ROSA)26Sor ^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP)} BF-Mauslinie (K31) mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen.	81
Abbildung 31: Transduktionseffizienz des AAV2.1-Cre Virus und Western blot-Analysen transduzierter NNKMs.	82
Abbildung 32: Kopienzahlbestimmung des Transgens in DNA Proben von WT-Geschwistertieren, Cx43-heterozygoten- und homozygoten Mäusen der Gt(ROSA)26Sor ^{tm1(CAG-Cx43-P2A-mCherry)} BF-Mauslinien.	83
Abbildung 33: Einkreuzung Tamoxifen-induzierbarer MerCreMer-Mauslinien für die gezielte Überexpression von Cx43 in KMs und mFBs.	84

Abbildung 34: Geschlechtsspezifisches Körpergewicht von Mäusen der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie im Alter von 10 Wochen.	86
Abbildung 35: Kaplan Meier Überlebenskurve von $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mäusen zwei Wochen nach Tamoxifen-induzierter Transgenexpression.....	86
Abbildung 36: Bestimmung des Quotienten von Herzgewicht (HW) und Tibialänge (TL) von $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mäusen zwei Wochen nach Transgeninduktion zum Ausschluss einer Hypertrophie des Herzens..	87
Abbildung 37: Makroskopische Aufnahmen transgener Herzen der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie zwei Wochen nach Tamoxifen-Induktion.	88
Abbildung 38: Digitale PCR für Cx43 und mCherry von Ventrikelgewebe transgener $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ Herzen zwei Wochen nach Tamoxifen-Induktion.	90
Abbildung 39: Western blots von Ventrikellysaten der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie zwei Wochen nach Tamoxifen-Induktion.....	92
Abbildung 40: Charakterisierung des Verteilungsmusters des endogenen und exogenen Cx43-Proteins in den Herzen der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie zwei Wochen nach Tamoxifen-Induktion mit Hilfe von Immunfärbungen.....	94
Abbildung 41: Konfokale Aufnahmen Immunfluoreszenz-gefärbter Herzquerschnitte von $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mäusen zeigten zwei Wochen nach Tamoxifen-Induktion in Folge der Cx43-Überexpression eine Lateralisierung des Proteins in der KM-Membran.	95
Abbildung 42: Bestimmung der linksventrikulären Herzfunktion von $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mäusen zwei Wochen nach Transgeninduktion mit Hilfe von Echokardiographie.....	97
Abbildung 43: Untersuchung der elektrischen Vulnerabilität mittels EPU von $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mäusen zwei Wochen nach Transgeninduktion.	98
Abbildung 44: Kaplan Meier Überlebenskurve von $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mäusen zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.	99
Abbildung 45: Bestimmung des Quotienten von Herzgewicht (HW) und Tibialänge (TL) von $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mäusen zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Transgeninduktion als Indikator für die kompensatorische Hypertrophie des Herzens nach Infarkt.	100

Abbildung 46: Makroskopische Aufnahmen transgener Herzen der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.	101
Abbildung 47: Lokalisation der Cx43-Expression mittels konfokaler Mikroskopie in Immunfluoreszenz-gefärbten Herzquerschnitten der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.	103
Abbildung 48: Makroskopische Bestimmung der Infarktfläche transgener Herzen der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.	105
Abbildung 49: Mikroskopische Bestimmung des Infarktvolumens transgener Herzen der $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.	106
Abbildung 50: Bestimmung der linksventrikulären Herzfunktion von $\alpha\text{MHC}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mäusen zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Transgeninduktion mittels Echokardiographie.....	108
Abbildung 51: Makroskopische und konfokale Aufnahmen eines Cx43-heterozygoten, nicht-infarzierten Herzens der $\text{Periostin}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie eine Woche nach Tamoxifen-Induktion.....	110
Abbildung 52: Makroskopische Aufnahmen verschiedener Organe einer Cx43-homozygoten $\text{Periostin}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Maus eine Woche nach Tamoxifen-Induktion.	111
Abbildung 53: Geschlechtsspezifisches Körpergewicht von Mäusen der $\text{Periostin}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie im Alter von 10 Wochen.	112
Abbildung 54: Kaplan Meier Überlebenskurve von $\text{Periostin}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mäusen zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.....	113
Abbildung 55: Bestimmung des Quotienten von Herzgewicht (HW) und Tibialänge (TL) von $\text{Periostin}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mäusen zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Transgeninduktion als Indikator für die kompensatorische Hypertrophie des Herzens nach Infarkt.....	114
Abbildung 56: Versuchsablauf infarzierter Mäuse der $\text{Periostin}^{\text{CAG-Cx43-P2A-mCherry}}$ -Mauslinie.	115

Abbildung 57: Makroskopische Aufnahmen transgener Herzen der Periostin ^{CAG-Cx43-P2A-mCherry} -Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.	116
Abbildung 58: Digitale PCR für Cx43 und mCherry von Narbengewebe transgener Periostin ^{CAG-Cx43-P2A-mCherry} -Herzen zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.	118
Abbildung 59: Western blot der Periostin ^{CAG-Cx43-P2A-mCherry} -Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.	120
Abbildung 60: RNA-Sequenzierung (RNAseq) des Infarktgebietes infarzierter Periostin ^{CAG-Cx43-P2A-mCherry} -Mäuse zwei Wochen nach Kryoinfarkt.	121
Abbildung 61: Analyse der Transgenexpression in Übersichtsaufnahmen von Herzquerschnitten der Periostin ^{CAG-Cx43-P2A-mCherry} -Mauslinie ein-, zwei- und 12 Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.	124
Abbildung 62: Mikroskopische Dokumentation der Migration von mFBs während der Wundheilung bzw. des kardialen Remodelings mit Hilfe von Übersichtsaufnahmen von Herzquerschnitten der Periostin ^{CAG-Cx43-P2A-mCherry} -Mauslinie ein-, zwei- und 12 Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.	125
Abbildung 63: Konfokale Analyse der Proliferation im BZ- und Infarktgebiet der Periostin ^{CAG-Cx43-P2A-mCherry} -Mauslinie während der Wundheilung bzw. des kardialen Remodelings ein-, zwei- und 12 Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.	126
Abbildung 64: Bestimmung der zellulären Lokalisation der Cx43- und mCherry-Expression mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen in Herzquerschnitten der Periostin ^{CAG-Cx43-P2A-mCherry} -Mauslinie eine Woche nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.	128
Abbildung 65: Bestimmung der zellulären Lokalisation der Cx43- und mCherry-Expression mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen in Herzquerschnitten der Periostin ^{CAG-Cx43-P2A-mCherry} -Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.	130
Abbildung 66: Mikroskopische Untersuchung einer möglichen heterozellulären Kopplung von (m)FBs und KMs via Cx43 mit Hilfe von Immunfluoreszenz-gefärbten	

Herzquerschnitten der Periostin ^{CAG-Cx43-P2A-mCherry} -Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.....	131
Abbildung 67: Makroskopische Bestimmung der Infarktfläche transgener Herzen der Periostin ^{CAG-Cx43-P2A-mCherry} -Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.	132
Abbildung 68: Mikroskopische Bestimmung des Infarktvolumens transgener Herzen der Periostin ^{CAG-Cx43-P2A-mCherry} -Mauslinie zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Tamoxifen-Induktion.	133
Abbildung 69: Analyse der linksventrikulären Pumpfunktion von Periostin ^{CAG-Cx43-P2A-mCherry} -Mäusen zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Transgeninduktion mittels Echokardiographie.....	135
Abbildung 70: Untersuchung der elektrischen Vulnerabilität von Periostin ^{CAG-Cx43-P2A-mCherry} -Mäusen zwei Wochen nach Kryoinfarkt und Transgeninduktion mittels EPU.....	137

Zusammenfassung

Die elektrische Kopplung von Kardiomyozyten (KMs) im Herzen wird durch Connexine (Cx) vermittelt. Diese stellen durch die Bildung von Gap Junctions (GJs) Zell-Zell-Kontakte zwischen benachbarten KMs her. Im Herzmuskel ist Cx43 die vorherrschende Cx-Isoform und daher von großer Bedeutung für die Ausbreitung der elektrischen Erregung (Rodríguez-Sinovas et al. 2021). Nach einem Myokardinfarkt (MI) kommt es zum Absterben der Cx43-exprimierenden KMs, was zur Narbenbildung und Veränderungen der elektrischen Erregungsausbreitung im Herzen führt. Dies begünstigt die Entwicklung von lebensbedrohlichen ventrikulären Tachykardien (VTs).

In der vorliegenden Arbeit wurde die zellbiologische Bedeutung der Cx43-Überexpression im gesunden und infarzierten Mausherzen untersucht. Hierfür wurde ein neues genetisches Modell *in vitro* und *in vivo* etabliert, das eine gezielte zellspezifische und zeitlich-induzierbare Überexpression von Cx43 ermöglicht. Darüber hinaus wurden wichtige Erkenntnisse bezüglich des anti-arrhythmischen Potenzials einer gezielten Cx43-Überexpression in der Herzinfarkttnarbe gesammelt.

Es wurden Cx43-Überexpressions-Zelllinien (CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry) in murinen G4 embryonalen Stammzellen (ES) und in HeLa-Zellen generiert und charakterisiert. Fluoreszenzfarbstoff-Diffusions- und sog. FRAP-Experimente belegten die Fähigkeit des exogenen Cx43 zur Ausbildung intakter GJs.

Durch Blastozysteninjektion transgener G4 ES-Zellen wurde ein *in vivo* Mausmodell (Gt(ROSA)26Sor^{tm1}(CAG Cx43-P2A-mCherryloxP)BF) mit zellspezifischer und zeitlich kontrollierbarer Überexpression von Cx43 generiert. Das Einkreuzen Tamoxifen-induzierbarer α MHC-MerCreMer- und Periostin-MerCreMer-Mauslinien ermöglichte die spezifische Cx43-Überexpression in KMs oder in Myofibroblasten (mFBs) zu einem ausgewählten Zeitpunkt. Nach Tamoxifen-Induktion wurde im Herzen eine deutliche Überexpression von Cx43 und mCherry nachgewiesen, die die Vitalität der Tiere nicht beeinflusste.

Bei KMs-spezifischer Cx43-Überexpression wurde in immunhistologischen Untersuchungen eine Lateralisierung von Cx43 beobachtet. Diese hatte aber weder einen Einfluss auf die Pumpfunktion noch auf die elektrische Vulnerabilität der Mäuse.

Makroskopische und immunhistologische Analysen zeigten, dass eine mFBs-spezifische Cx43-Überexpression nach MI nur in der mFBs-reichen Narbe und der BZ auftritt. Es fanden sich mit Hilfe von Detailaufnahmen Hinweise für eine mögliche heterozelluläre Kopplung von KMs und (m)FBs über Cx43-GJs. Außerdem konnte eine verbesserte Pumpfunktion des

Herzens festgestellt werden. Besonders relevant ist, dass nach mFBs-spezifischer Cx43-Überexpression in elektrophysiologischen Untersuchungen eine deutliche Reduktion der Arrhythmie-Inzidenz *in vivo* festgestellt wurde. Diese Befunde bestätigen die früheren Ergebnisse der Arbeitsgruppe und zeigen das translationale Potenzial der gezielten Überexpression von Cx43 in der Infarktnarbe zur anti-VT Therapie.

Es sind weitere Experimente geplant, um einen besseren Einblick in die Mechanismen der beobachteten Cx43-Effekte zu erhalten.

Appendix

Anhang der im Ergebnisteil verwendeten Publikation:

Niemann, P; Schiffer, M; Malan, D; Grünberg, S; Roell, W; Geisen, C; Fleischmann, BK. (2022): Generation and Characterization of an Inducible Cx43 Overexpression System in Mouse Embryonic Stem Cells. In: *Cells* 11 (4). DOI: 10.3390/cells11040694

Article

Generation and Characterization of an Inducible Cx43 Overexpression System in Mouse Embryonic Stem Cells

Pia Niemann¹, Miriam Schiffer^{1,2}, Daniela Malan¹ , Sabine Grünberg¹, Wilhelm Roell², Caroline Geisen^{1,2,*} and Bernd K. Fleischmann^{1,*} 

¹ Institute of Physiology I, Life and Brain Center, Medical Faculty, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany; s6piniem@uni-bonn.de (P.N.); mschiffer@uni-bonn.de (M.S.); dmalan@uni-bonn.de (D.M.); sabine.gruenberg@uni-bonn.de (S.G.)

² Department of Cardiac Surgery, University Hospital Bonn, 53127 Bonn, Germany; wroell@uni-bonn.de

* Correspondence: cgeisen@uni-bonn.de (C.G.); bernd.fleischmann@uni-bonn.de (B.K.F.); Tel.: +49-0228-6885-200 (B.K.F.)

Abstract: Connexins (Cx) are a large family of membrane proteins that can form intercellular connections, so-called gap junctions between adjacent cells. Cx43 is widely expressed in mammals and has a variety of different functions, such as the propagation of electrical conduction in the cardiac ventricle. Despite Cx43 knockout models, many questions regarding the biology of Cx43 in health and disease remain unanswered. Herein we report the establishment of a Cre-inducible Cx43 overexpression system in murine embryonic stem (ES) cells. This enables the investigation of the impact of Cx43 overexpression in somatic cells. We utilized a double reporter system to label Cx43-overexpressing cells via mCherry fluorescence and exogenous Cx43 via fusion with P2A peptide to visualize its distribution pattern. We proved the functionality of our systems in ES cells, HeLa cells, and 3T3-fibroblasts and demonstrated the formation of functional gap junctions based on dye diffusion and FRAP experiments. In addition, Cx43-overexpressing ES cells could be differentiated into viable cardiomyocytes, as shown by the formation of cross striation and spontaneous beating. Analysis revealed faster and more rhythmic beating of Cx43-overexpressing cell clusters. Thus, our Cx43 overexpression systems enable the investigation of Cx43 biology and function in cardiomyocytes and other somatic cells.

Keywords: Cx43 overexpression system; functional Cx43 gap junctions; embryonic stem cells; AAV2.1-Cre-mediated induction; P2A; mCherry expression



Citation: Niemann, P.; Schiffer, M.; Malan, D.; Grünberg, S.; Roell, W.; Geisen, C.; Fleischmann, B.K.

Generation and Characterization of an Inducible Cx43 Overexpression System in Mouse Embryonic Stem Cells. *Cells* **2022**, *11*, 694. <https://doi.org/10.3390/cells11040694>

Academic Editors: Sebastian Clauß and Ling Xiao

Received: 21 December 2021

Accepted: 9 February 2022

Published: 16 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Connexins (Cx) are a large family of transmembrane proteins that are primarily localized in the plasma membrane, but also in intracellular organelles, such as mitochondria [1,2]. In mice, 20 different isoforms of Cx have been identified [3]; they are widely expressed in all organs and tissues starting from early embryonic development [4]. All Cx share the same structural features consisting of an amino- and carboxy-terminus located in the cytosol, one intracellular loop and four transmembrane domains. Six Cx form a connexon, and two adjacent connexons in the plasma membrane of neighboring cells can form functional intercellular channels, the gap junctions [5]. Numerous gap junctions form clusters, called plaques [6]. Cx biology is complex, as different Cx isoforms can assemble and form heteromeric connexons and/or even heterotypic gap junctions [7]. More recent work proposes the existence of hemichannels, which are thought to open under pathophysiological conditions [8].

Gap junctions are known to have pleiotropic functions, such as the exchange of nutrients, signaling components, and ions below a MW of 1.5 kDa. Therefore, these proteins mediate electrical and metabolic cell-to-cell coupling. This explains their vital role and the early embryonic lethality upon knocking out specific Cx genes, e.g., Cx45 [9].

In addition, germ line and even somatic mutations of Cx encoding genes can result in various diseases. In fact, mutations in 10 different human Cx have been linked to 28 distinct genetic disorders, e.g., Cx26-related deafness [10], Cx46-related cataracts, and Cx32-related X-linked Charcot–Marie–Tooth neuropathy [11].

One of the most widely distributed and studied members of the Cx family is Cx43, which is known to be strongly expressed in the heart [12]. The heart forms an electrical syncytium, and the electrical conduction is critically dependent on the expression and function of Cx43 in cardiomyocytes of the atrium and ventricle, whereas Cx40 is preferentially expressed in atrial cardiomyocytes and Cx45 in cells of the sinus and AV node [13]. In the healthy human heart, Cx43 gap junctions are primarily located at intercalated discs connecting two neighboring cardiomyocytes providing orderly propagation of the electrical conduction throughout the working myocardium. This critical role of gap junctions for heart function is exemplified by mutations of Cx, which are strongly expressed in the heart, causing diseases such as Cx40-related atrial fibrillation [14] and Cx43-related oculodigital dysplasia [15]. Altered expression, distribution, and modulation of Cx43 channels and/or gap junctions are thought to occur in pathophysiological situations and to be potentially involved in the generation of life-threatening ventricular arrhythmias. In addition, myocardial ischemia and infarction have been reported to result in an altered distribution pattern of Cx43, e.g., atypical cellular localization in the lateral cardiomyocyte membrane, named lateralization [16,17]; the pathophysiological significance is still under debate [18–20]. Furthermore, hypoxia and high cytosolic Ca^{2+} have been reported to change cardiac Cx43 gap junction gating and, consequently, electrical conduction properties [21].

Given the lack of highly specific pharmacological agonists and blockers of Cx, small Cx43 mimetic peptides with either blocking (e.g., Gap26, Gap27) or agonist functions (Gap134, α CT1) have been developed and tested for the targeting of heart disease [22]. Besides specificity and efficacy issues, the *in vivo* delivery of these compounds needs to be further developed [23–25]. Most of the actual mechanistic understanding of Cx43 function for heart development and disease has been obtained from knockout (KO) mouse models [21]. These have revealed that null mutations of the Cx43 gene result in morphogenic malformations of the outflow tract of the heart and perinatal death because of asphyxia [26]. This phenotype was primarily caused by Cx43-related defects of neural crest cells [27]. Cell type-specific and inducible deletion of Cx43 in cardiomyocytes resulted in severe ventricular arrhythmias, underscoring its critical role in propagating electrical conduction in the heart. These studies also revealed that only 5–10% of Cx43 protein is required to maintain its normal function [28]. However, many aspects of the biology and function of Cx43 in cardiomyocytes and in the heart are still poorly understood, in particular Cx43's contribution to cardiomyocyte development, its effects in disease and malfunctioning, the relevance of its lateralization, and the formation and functional significance of hemichannels. To address these aspects, we have taken a different approach from KOs by generating an inducible Cx43 overexpression model in pluripotent mouse embryonic stem (ES) cells. This strategy was chosen, since earlier experiments in mice illustrated that ubiquitous overexpression of Cx43 resulted in embryonic and postnatal morbidity and reduced postnatal viability [29]. We reasoned that Cx43 overexpression could also have (adverse) effects on the propagation, development, and differentiation of native cells and/or ES cell-derived cell populations *in vitro*. Therefore, we considered it a clear advantage to be able to induce Cx43 overexpression at later stages of the *in vitro* differentiation of (ES) cells.

2. Materials and Methods

2.1. Generation of the CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-Ai6 Construct

The sequence of the mouse Cx43 cDNA, followed in frame by the DNA sequence of the GSG-P2A peptide and the mCherry cDNA, was synthesized together with flanking FseI sites by GeneArt Gene Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and subcloned into the pMK-RQ standard vector from Thermo Fisher. The customized 1968 bp DNA fragment was cut out by digestion with FseI, isolated and ligated downstream of the

CAG promoter and a floxed stop cassette into the FseI sites of the Ai6 vector (Addgene, Watertown, MA, USA, #22798) [30], thereby exchanging the zsGreen reporter. The Ai6 vector is a Rosa26 (Rs26) targeting vector that allows homologous integration of expression and NeoR/KanR cassettes into the mouse Rs26 locus by co-transfection with specific zinc finger nucleases. The Ai6 vector contains the post-transcriptional regulatory element of woodchuck hepatitis virus (WPRE) to increase transgene expression [31]. All DNAs were prepared using the EndoFree Plasmid Maxi Kit from Qiagen (Venlo, The Netherlands). To verify correct cloning of the CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-Ai6 construct, restriction analyses and sequencing (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) were performed. For molecular cloning procedures and sequence analyses, SnapGene Viewer 5.3.2 (from Insightful Science, available at snapgene.com, San Diego, CA, USA) and Clone Manager Professional 9 (Sci Ed Software LLC, Denver, CO, USA) were used.

2.2. Cell Culture

Undifferentiated murine G4 hybrid embryonic stem (ES) cells [32] were cultivated in KnockOut Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM high glucose, Gibco, Thermo Fisher Scientific, supplemented with 15% *v/v* fetal calf serum (FCS, PAN Biotech, Aidenbach, Germany), 0.1 mM nonessential amino acids (NEAA, Gibco, Thermo Fisher Scientific), 2.4 mM L-glutamine (Thermo Scientific), 100 U/mL/100 µg/mL penicillin/streptomycin (P/S), 500 U/mL leukemia inhibitory factor (LIF), and 0.1 mM β-mercaptoethanol (β-ME, Gibco, Thermo Fisher Scientific)) in tissue culture flasks coated with irradiated neomycin-resistant mouse embryonic fibroblasts (PMEF-NL, Merck, Darmstadt, Germany). ES cells were differentiated using embryoid body (EB) formation via hanging drop method [33]. For differentiation, cells were harvested and resuspended in Iscove's MEM high-glucose medium (IMDM, Thermo Fisher) supplemented with 20% *v/v* FCS, 100 U/mL/100 µg/mL P/S, 0.1 mM NEAA, and 0.1 mM β-ME in the absence of LIF. Irradiated fibroblasts were reduced by differential sedimentation, and the ES cell-enriched suspension was dripped (400 cells per 20 µL drop) on the inner side of the lid of a cell culture dish. After two days of incubation, the hanging drops were rinsed off with 20% IMDM and further differentiated in suspension culture on a shaking plate (horizontal shaker, LAUDA-GFL, Burgwedel, Germany).

HPV18-positive HeLa (RRID: CVCL_0030) human cervical carcinoma cells were maintained in DMEM (pH 7.2), plus additives (20% *v/v* FCS, 120 U/mL/120 µg/mL P/S, 0.1 mM NEAA, 2 mM L-glutamine, 1.2 mM sodium pyruvate (Gibco, Thermo Fisher Scientific), and 0.12 mM β-ME).

NIH/3T3 mouse fibroblasts (3T3, ATCC, Manassas, VA, USA, #CRL1658) were cultivated in DMEM (plus 10% *v/v* FCS, 100 U/mL/100 µg/mL P/S, 0.1 mM NEAA, and 0.1 mM β-ME).

All cells were cultivated at 37 °C and 5% CO₂.

2.3. CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-Ai6 Transfection

For the generation of transgenic cells, either mouse G4 ES cells (5.4×10^6) or 3T3 mouse fibroblasts (4×10^6) were mixed in 800 µL PBS with 30 µg circular CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-Ai6 plasmid DNA and 10 µg zinc finger nucleases pCMV-rosaR4-KKR (Addgene, #37199) and pCMV-rosaL6-ELD mutations (Addgene, #37198) and electroporated (ES cells: 240 V, 500 µF, 1 pulse; 3T3-fibroblasts: 180 V, 950 µF, 1 pulse) using the Gene Pulser Xcell Electroporation Systems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Two days after electroporation, transgenic G4 ES cells and 3T3 cells were selected by adding 225 µg/mL and 800 µg/mL G418 (neomycin, Gibco, Thermo Fisher Scientific), respectively, to the medium for ten (G4 ES cells) or twelve days (3T3 mouse fibroblasts).

HeLa cells (60% confluency) were transfected with the PacI digested linearized CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-Ai6 construct using the TransIT-HeLaMONSTER Transfection Kit (Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions.

Two days after transfection, transgenic HeLa cells were selected by adding 600 µg/mL G418 to the medium for twelve days.

Resistant ES cells and HeLa colonies were isolated and expanded in 24-well plates; in case of the ES cells, these were coated with irradiated neomycin-resistant fibroblasts. Colonies of resistant transgenic 3T3 cells were pooled, and a single cell dilution of 3T3-fibroblasts was performed, as depicted in Figure 3a.

Neomycin-resistant colonies were analyzed for the presence of the expression cassette by PCR (see 2.9) and mCherry fluorescence after AAV2.1-Cre transduction.

2.4. Generation of Transgene-Expressing Cre⁺ Cell Lines

The AAV2.1-Cre virus (pENN.AAV.CMV_s.PI.Cre.rBG, Addgene, #105537-AAV1, 1.2×10^{13} GC/mL) was titrated on a G4 ES cell line (BAG3P209L-eGFP_{flox3}) [34] expressing eGFP after Cre induction; 5.6×10^{10} genome copies/mL per 7500 cells were used. Viral transduction was performed in cell culture medium of CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-Ai6 transfected (Cre⁻) lines of ES, HeLa cells, and 3T3-fibroblasts. Two days post-transduction, the virus was washed off, and at day three post-transduction, mCherry-expressing colonies were observed. These were either picked, or single cell dilutions were performed.

For immunostainings, cells were cultured on fibronectin (0.5 µg/mL, Sigma-Aldrich, Merck) or 0.1% gelatin- (Merck) coated (I) 96 well glass-bottom plates (Greiner, Kremsmünster, Austria) or (II) cover glasses (VWR, Radnor, PA, USA), fixed with 4% Formaldehyde (FA) (PanReac AppliChem, Darmstadt, Germany) for 30 min.

2.5. Generation of AAV2.6-Cx43-P2A-mCherry Virus

The Cx43-P2A-mCherry insert was directly cloned under control of the CAG promoter of the pAAV.CAG.hChr2(H134R)-mCherry.WPRE.SV40 vector (Addgene, #100054; channelrhodopsin-2 cDNA was replaced). The CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-Ai6 plasmid was digested with FseI, blunted, and subsequently cut with BsrGI. The resulting 1935 bp fragment was isolated and inserted into the BamHI (blunted) and BsrGI sites of the AAV vector. The resulting pAAV-CAG-Cx43-P2A-mCherry vector was utilized for rAAV2.6-Cx43-P2A-mCherry virus production.

Plasmid DNAs were prepared using the EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen). All vectors were verified by sequencing (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany).

2.6. Isolation of Murine Neonatal Cardiomyocytes (NNCMs) and Transduction with the AAV2.6-Cx43-P2A-mCherry Virus

Neonatal cardiomyocytes (P1, CD1 background; breeding pairs were supplied by Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) were isolated (Figure 7b) and enriched using the neonatal heart dissociation and isolation kits (Miltenyi) (for details, see: Raulf, Voeltz et al. [35] and manufacturer's instructions).

Then, NNCMS were seeded on fibronectin- (0.5 µg/mL, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany) coated 96 well glass-bottom plates (Greiner) and cultured in a 20% IMDM medium (30,000 NNCMS/well). After 24 h, FCS was reduced to a 2% IMDM medium (IMDM, 2% v/v FCS, 100 U/mL/100 µg/mL P/S, 0.1 mM NEAA, and 0.1 mM β-ME), and the virus was added to the medium (0.55 Virus Genomes (VG)/cell). Two days post-transduction, the medium was changed (2% IMDM), and three days post-transduction, mCherry⁺ cells were observed. Transduction efficiency was calculated as a ratio of double positive NNCMS (α-actinin⁺ and mCherry⁺)/all NNCMS (α-actinin⁺) in four fields of view/well (Nikon Eclipse Ti and Nikon A1R MP system, Nikon, Tokyo, Japan) with DAPI, Cy3, and Cy5 filters; 20× objective; and Lasers (LU-N4 laser unit, 405 nm, 488 nm, 561 nm, 640 nm) using NIS-Elements AR 5.11.01 software (Nikon).

2.7. Karyotyping of Transgenic G4 ES Cell Clones

Suitable G4 ES cell clones were selected based on karyotyping. Cells were incubated with 0.1 µg/mL demecolcine solution (Sigma-Aldrich, Merck) in a G4 ES cell medium for 3 h, trypsinized (Thermo Fisher Scientific) and treated for 20 min with 75 mM KCl solution (Sigma-Aldrich, Merck); a fixation solution containing methanol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and acetic acid (Carl Roth) (3:1) was added to preserve chromatin morphology. The suspension was dripped on glass slides (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany). A Hoechst solution (1 µg/mL in PBS, Sigma-Aldrich, Merck) was used (15 min, RT) for chromosome staining, and microscopic pictures were taken (Axio Observer Microscope, Zen Software 2.6, Carl Zeiss MicroImaging, Inc., Oberkochen, Germany).

2.8. Analysis of Transgene Integration into the Rosa26 Locus by Southern Blot

2.8.1. Extraction of Genomic DNA

Total high-molecular-weight DNA of transgenic and WT ES cells was isolated by standard DNA isolation protocol. This consists of lysis in 17.5 mM sodium dodecyl sulfate (SDS), 50 mM Tris (pH 8.0), 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), proteinase K (200 µg/mL, Carl Roth); phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction (Sigma-Aldrich, Merck, 25:24:1); chloroform-isoamyl extraction (Sigma-Aldrich, Merck, 24:1); precipitation and resuspension of DNA in 10 mM Tris and 1 mM EDTA, pH 8.0 (TE); RNase treatment (1 mg/mL, Qiagen); further extraction; and precipitation and resuspension of DNA in TE buffer.

2.8.2. Preparation of DNA Probes

The 391 bp Cx43 DNA probe was obtained by a PCR reaction using the CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-Ai6 construct DNA as a template and the following primer pair: fw: GAGCTCAAAGTGGCGCAGAC and rev: CCTTCACGCGAT CCTTAACG (PCR program: (I) 95 °C for 15 min; 30 cycles of (II-IV): (II) 95 °C for 20 s, (III) 60 °C for 60 s and (IV) 72 °C for 2 min; (V) 72 °C for 10 min; HOT FIREPol Blend Master Mix Ready to Load (Solis Biotec, Tartu, Estonia)), followed by agarose gel electrophoresis (1% gel) and extraction of the 391 bp DNA band.

For the generation of the Rs26-specific DNA probe (pRs26-5', see Soriano et al. [36]), the plasmid pDonor MCS Rosa26 vector (Addgene, #37200) was digested with EcoRI, and the resulting 450 bp fragment was isolated. pRs26-5' probe sequence:

```
CAGGGAAAACGACAAAATCTGGCTCAATTCCAGGCTAGAACCCTACAAATTC
AACAGGGATATCGCAAGGATACTGGGGCATACGCCACAGGGAGTCCAAGAATGTG
AG GTGGGGGTGGCGAAGGTAATGTCTTTGGTGTGGGAAAAGCAGCAGCCATCTGA
GAT AGGAACTGGAAAACCAGAGGAGAGGCGTTCAGGAAGATTATGGAGGGGAG
GACTG GGCCCCCAGGAGCGACCAGAGTTGTCACAAGGCCGCAAGAACAGGGGAG
GTGGGG GGCTCAGGGACAGAAAAAAAAGTATGTGTATTTTGGAGAGCAGGGTTGGG
AGGCCTC TCCTGAAAAGGGTATAAACGTGGAGTAGGCAATACCCAGGCAAAAAGG
GGAGACC AGAGTAGGGGGAGGGGAAGAGTCTGACCCAGGGAAGACATTAATAAAA
GGTAGTGG GGTCGACTAGATGAAGGAGAGCCTTTCTCTCTGGGCAAGAGCGGTG
CAATGGTGTGTA AAGGTAGCTGAGAA
```

2.8.3. Blotting

For Southern blot analysis, 10 µg genomic DNA were digested with AflIII or double digested with EcoRV and HindIII and the addition of 2.5 mM of spermidine at 37 °C overnight. Enzymes were inactivated by incubation for 20 min at 60 °C and 80 °C, respectively, and digested DNAs were separated overnight (30 V) in 0.8% agarose gels containing 0.01% ethidium bromide. A Lambda HindIII digested DNA marker (Promega, Madison, WI, USA) was used to determine DNA fragment sizes. After 15 min in 0.25 N HCl, 5 min in distilled water, and two 15 min periods in 0.5 M NaOH, the DNA was transferred to a positively charged nylon membrane treated with distilled water and 0.5 M NaOH (BrightStar-Plus, Ambion, Thermo Fisher Scientific) via capillary blotting method (transfer

buffer: 1M NaCl and 400 mM NaOH) for 3 h at room temperature. Following this, the membrane was neutralized for 15 min in $2\times$ SSC buffer (0.3 M NaCl and 0.03 M sodium citrate tribasic dihydrate) and dried for 15 min at 80 °C (Heratherm incubator, Thermo Fisher Scientific) to immobilize the DNA. The membrane was then prehybridized for 3 h in a glass hybridization tube (Analytik Jena GmbH, Jena, Germany) placed in a hybridization oven (Analytik Jena GmbH) at 60 °C in an ULTRAhyb ultrasensitive hybridization buffer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). DNA probes were labelled with $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (PerkinElmer 6000 Ci/mmol 20 mCi/mL Lead, 500 μCi , Waltham, MA, USA) using the Prime-It II random primer labeling kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Labelled probes were purified with Bio-Spin P30 Tris Chromatography Columns (Bio-Rad) added to the prehybridized membrane, and hybridization was performed under stringent conditions (68 °C) overnight. Filters were washed four times (each 30 min, 55 °C) in $2\times$ SSC containing 0.1% SDS and were exposed to hyperfilm MP8 films (GE Healthcare GmbH, Solingen, Germany) using intensifier screens (Amersham, GE Healthcare). The hyperfilms were exposed for 6–8 days before they were developed and fixed (Kodak GBX Fixer and Replenisher, Sigma-Aldrich, Merck; Kodak GBX Developer and Replenisher, Sigma-Aldrich, Merck; both 1:5 diluted with distilled water).

2.9. Selection of Suitable G4 ES and 3T3 Cell Clones Using PCR Analysis

Cells of the different G4 ES and 3T3 clones were lysed, and DNA was extracted using the Gentra Puregene Cell Kit (Qiagen). DNA was amplified applying $5\times$ HOT FIREPol Blend Master Mix Ready to Load (Solis Biodyne) or GoTaqG2 Hot Start Green Master Mix (Promega) and following primer pairs for G4 ES cell clones: (I) integration into the 5' end of Rs26 locus: fw (endogenous Rs26 sequence): GCCGCCTAAAGAAGAG-GCTG, rev (CAG promoter of the insert): GGCGGGCCATTTACCGTAAG; (II) integration into the 3' end of Rs26 locus: fw (plasmid specific sequence): AGCCTCTGTCCACATACAC, rev (endogenous Rs26 sequence): GTGCAGTGTGAGGGCAATC; (III) WT Rs26 allele: fw: AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA, rev: CCGAAAATCTGTGGGAAGTC; (IV) detection of Cx43: fw: TGTGGCTGTCGGTGTCTTTC, rev: GAGCCAAGTACAGGA GTGTG; (V) mCherry: fw: AGACCGCCAAGCTGAAGGTG, rev: TCAGCTTCAGCCT CTGCTTGATCT and for 3T3-fibroblasts: (IV) Cx43: fw: TGTGGCTGTCGGTGTCTTTC, rev: GAGCCAAGTACAGGAGTGTG; (VI) Cx43-mCherry: fw: TGTGGCTGTCGG TGCTTTC, rev: TCAGCTTCAGCCTCTGCTTGATCT.

To test the functionality of the Cre-loxP system RNA of Cre⁻ as well as Cre⁺ G4 ES cell clones 29 and 31 were isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), and cDNA was synthesized with the SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). CAG-driven expression of the transgene using a forward primer that binds to the first exon of the CAG promoter in combination with a reverse primer binding to Cx43 sequence demonstrated functionality of the Cre-loxP system: fw: CTGACTGACCGCGTTACTC, rev: AGCTGACTCAACCGCTGTCC.

Agarose gel electrophoreses were run to separate PCR products, which were visualized by ethidium bromide (Carl Roth) using an UV light imager Intas GelSTICK Touch (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Germany) in combination with Intas GDS Touch 2 software 1.1.5.4 (Intas Science Imaging Instruments GmbH).

2.10. Copy Number Determination by qPCR

To analyze actual transgene copy numbers of G4 ES cells, the genomic DNA of three Cre⁻ clones was isolated (EchoLUTION CellCulture DNA kit, BioEchoLife Sciences GmbH, Cologne, Germany) according to manufacturer's instructions. Then, qPCR was performed as triple determination with 200 ng of genomic DNA, TaqMan Gene Expression Master-Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), a Tfrc-VIC housekeeper TaqMan probe (TaqMan Copy Number Reference Assay, mouse, Tfrc, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, #4458366), and a custom-made mCherry binding TaqMan probe (Thermo Fisher Scientific). A CFX 96 Real-Time System (Bio-Rad) and 96 well PCR plates

(Bio-Rad) with seals (Bio-Rad) (PCR program: (I) 95 °C for 10 min, 35 cycles of (II–IV): (II) 95 °C for 15 s, (III) 60 °C for 30 s, (IV) 72 °C for 30 s) were used. CT values for the target (mCherry) and reference (Tfrc, two copy numbers) gene were computed with Bio-Rad CFX Manager 3.1 software (Bio-Rad). The ΔCTTR values ($\text{CT}_{\text{target}} - \text{CT}_{\text{reference}}$) and copy numbers ($2^{-\Delta\text{CTTR}} \times 2$) of the mCherry-containing transgene were calculated.

2.11. RT qPCR

To test for Cx43 (endogenous and endogenous + exogenous), Cx45, Cx40, and Cx30.2 expression, the RNA of G4 ES cells and G4 ES cell-derived EBs (Cre⁻ and Cre⁺) was extracted using the RNeasy Micro Kit (Qiagen), and cDNA was synthesized as described in 2.10. Then, qPCR was performed as triple determination with 25 ng of cDNA, TaqMan probes (Thermo Fisher Scientific) for endogenous Cx43 (exon 1, Mm00439105, Gja1), total (endogenous + exogenous) Cx43 (exon 2 cDNA coding sequence, custom-made), Cx45 (Mm01253027, Gjc1), Cx40 (Mm07294003, Gja5), Cx30.2 (Mm01204089, Gjc3), and the TaqMan Gene Expression Master-Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) were used. As internal control GAPDH (Thermo Fisher Scientific, #4352339E) was applied. Then, qPCR was performed on a CFX 96 cyclor (Bio-Rad) as described in 2.10 (39 cycles of (II–IV)). CT values for the Cx isotypes and the reference (GAPDH) cDNAs were computed with Bio-Rad CFX Manager 3.1 software (Bio-Rad) to calculate the ΔCTTR values ($\text{CT}_{\text{target}} - \text{CT}_{\text{reference}}$).

2.12. Immunofluorescence Staining and Microscopy

Cells on coverslips and EBs were fixed for 30 min with 4% FA (PanReac AppliChem). EBs were embedded in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) and cryosectioned (10 µm, Cryostat (Leica, CM 3050S, Wetzlar, Germany)). Prior to staining, cells and EB slices were permeabilized with 0.2% Triton X (Sigma-Aldrich, Merck) in PBS (PBS Tablets, Gibco, Thermo Fisher) for 10 min. For immunostainings, the following antibodies (diluted in 5% donkey serum (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), 2 h at RT or overnight at 4 °C) were used: Cx43 (1:3000, custom-produced rabbit polyclonal antibody, PSL GmbH, Heidelberg, Germany; immunizing peptide sequence: CDQRPSRASSRASSRPRPDDLEI [15,37,38]), P2A (1:700, mouse monoclonal IgG1 kappa antibody, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA, #NBP2-59627), mCherry (1:5000, chicken polyclonal IgY antibody, Novus Biologicals, #NBP2-25158), α -actinin (1:200, Sigma-Aldrich, Merck, #A7811), and cCasp3 (1:50, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, #9661). After several washing steps, secondary antibody incubation was performed (diluted in 1 µg/mL Hoechst/PBS (Sigma-Aldrich, Merck) for 1 h at RT): donkey anti-rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor 488/Cy2-conjugated (1:400, AffiniPure, Jackson ImmunoResearch, #711-545-152/#711-225-152); donkey anti-chicken IgY (IgG) (H + L) Cy3 conjugated antibody (1:3000, AffiniPure, Jackson ImmunoResearch, #703-165-155); donkey anti-mouse (IgG) (H+L) Alexa Fluor 647 conjugated antibody (1:3000, AffiniPure, Jackson ImmunoResearch, #715-605-151); and donkey anti-rabbit (IgG) (H + L) Alexa Fluor 647 conjugated antibody (1:3000, AffiniPure, Jackson ImmunoResearch, #711-605-152). After washing, EB slices and cells were mounted with Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Warrington, PA, USA). Cells seeded on 96 well glass plates were mounted with PBS. Imaging was performed (I) prior fixation with a fluorescence microscope (Axio Vert A1, Carl Zeiss) using a Cy3 filter, 10× and 20× air objectives, and (II) after fixation and staining, pictures were taken with a confocal microscope (Nikon Eclipse Ti and Nikon A1R MP system, Nikon) with DAPI, Cy2, Cy3, and Cy5 filters, 20×, 40×, and 60× water objectives, Lasers (LU-N4 laser unit (405 nm, 488 nm, 561 nm, 640 nm)) using NIS-Elements AR 5.11.01 software (Nikon).

2.13. Western Blot Analysis of Cx43, P2A, and mCherry Protein Expression of Transgenic Cell Lines

Cells were lysed on ice in freshly prepared RIPA buffer (1 mM EDTA (Applichem); 50 mM Tris HCl (pH 7.5) (Carl Roth); 150 mM NaCl (Carl Roth); 0.25% sodium deoxy-

cholate (Sigma-Aldrich, Merck); 1% IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich, Merck); 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich, Merck); Protease and Phosphatase Inhibitor (Thermo Fisher). SDS mini gels were cast (10% separating gel: 10% acrylamide (Bio-Rad) in 375 mM Tris HCl (pH 8.8), 0.1% SDS (Carl Roth), 0.05% APS (Bio-Rad), 0.05% TEMED (Sigma-Aldrich, Merck); 5% stacking gel: 5% acrylamide in 125 mM Tris HCl (pH 6.8), 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.1% TEMED). Protein lysates were mixed 1:1 with 2× Laemmli Buffer (Bio-Rad) supplemented with β-ME (Sigma-Aldrich, Merck) and denatured for 10 min at 100 °C. Protein samples and Precision Plus Protein WesternC Standards (Bio-Rad) separated by gel electrophoresis (ProSieve EX Running Buffer, Lonza, Basel, Switzerland) were transferred onto a methanol-activated (Carl Roth) 0.22 μm PVDF-FL membrane (Biozym) by tankblot (ProSieve EX Western Blot Transfer Buffer, Lonza). Non-specific binding sites of membranes were blocked for 1 h with 5% skim-milk powder (VWR) solved in TBST (20 mM Tris (Sigma-Aldrich, Merck), 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20 (Applichem)). Membranes were incubated with Cx43 (1:3000, custom-produced rabbit polyclonal antibody, PSL GmbH, Heidelberg, Germany; 1:8000, rabbit polyclonal antibody, Sigma-Aldrich, Merck, #C6219), P2A (1:700, mouse monoclonal IgG1 kappa antibody, Novus Biologicals, #NBP2-59627), or mCherry (1:5000, chicken polyclonal IgY antibody, Novus Biologicals, #NBP2-25158) antibodies over night at 4 °C. After washing with TBST (3 × 5 min, RT), they were incubated for 1 h at RT with a donkey anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 488 conjugated antibody (1:3000, AffiniPure, Jackson ImmunoResearch, #711-545-152), a goat anti-mouse IgG peroxidase conjugated antibody (1:3000, Sigma-Aldrich, Merck, #A2304), a donkey anti-chicken IgG (H+L) Alexa Fluor 647 conjugated antibody (1:3000, AffiniPure, Jackson ImmunoResearch, #703-175-155), and an Alexa 555 conjugated-GAPDH loading control monoclonal antibody (1:5000, Thermo Fisher, #MA5-15738). Blots with peroxidase-conjugated secondary antibodies were incubated with Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher). First and secondary antibodies were diluted in 5% skim milk powder solved in TBST. All blots were detected with the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). Image Lab 5.2.1 software (Bio-Rad) was used for semi-quantitative analysis of Cx43 protein expression, which was normalized to GAPDH as housekeeper.

2.14. Dye Transfer Experiments in HeLa Cells

Cells were seeded on 0.1% gelatin- (Merck) coated cover glasses (VWR) placed in 24-well plates containing 20% DMEM medium plus additives, as described above. A small blue fluorescent Alexa Fluor 350 Hydrazide dye (349 Da, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, #A10439) and a large red fluorescent dextran-coupled Alexa Fluor 647 dye (10 kDa, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, #D22914) were diluted to a concentration of 0.5 μg/μL in intracellular solution (40 mM KCl (Sigma-Aldrich, Merck), 90 mM KAsp (Sigma-Aldrich, Merck), 10 mM NaCl (Carl Roth), 3 mM Mg-ATP (Sigma-Aldrich, Merck), 1 mM MgCl (Sigma-Aldrich, Merck) and 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich, Merck) and adjusted to pH 7.4 with KOH (Sigma-Aldrich, Merck)). HeLa cells were dialyzed with a patch clamp pipette (BF 150-86-10, Science Products, Hofheim, Germany) and filled with the above-mentioned solutions under microscopic control. When the patch pipette touched the cell, a bright field and a fluorescence picture were taken (a DAPI filter (F36 500 HC, Nikon) for Alexa Fluor 350 or a Cy5 filter (F 46-009 ET, Nikon) for Alexa Fluor 647 (20× Objective Fluor, Nikon)). The membrane resistance was monitored through an EPC10 amplifier (HEKA Elektronik GmbH, Reutlingen, Germany) until reaching whole cell configuration in the voltage clamp mode (holding potential: −40 mV). Fluorescence pictures were taken after obtaining whole-cell configuration at 0.5 min, 5 min, and 10 min. Pictures were taken with the Grasshopper 3 Camera (GS3-U3-23S6C-C, Teledyne Flir LCC, Wilsonville, OR, USA) controlled by the Micro-Manager 2.0 beta software (Image J, Bethesda, CA, USA).

2.15. Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)

3T3-fibroblasts and G4 ES cells were incubated for 20 min at 37 °C with calcein AM (0.38 μM, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, #C3100MP) diluted in 10% DMEM medium

(3T3, see above) or 15% KnockOut-DMEM (G4 ES cells, see above). Fluorescence intensity of a cluster of calcein⁺ 3T3-fibroblasts or G4 ES cells was measured using a confocal microscope (Nikon Eclipse Ti, 40× objective; CFI Apo Lambda S LWD 40XWI, NA 1.25, Nikon). Next, a single fibroblast or G4 ES cell in the cluster was bleached with a 561 nm laser pulse (5 s, 2.5 mW), fluorescence intensity was measured, and pictures were taken over 10 min at 15 s intervals. Fluorescence intensities were converted into values between 1 (fluorescence intensity before bleaching) and 0 (fluorescence intensity immediately after bleaching).

2.16. Video Microscopy of Cell Clusters of Dissociated Beating EBs

Cre⁺ and Cre⁻ beating EBs were harvested at d12/d13 of differentiation. After partial dissociation with trypsin for 20 min at 37 °C, cell clusters were seeded on 0.1% gelatin- (Merck) coated 24-well plates filled with 20% IMDM medium. One day later, frequency measurements were performed via video microscopy of beating clusters on a Nikon Eclipse Ti2 inverted microscope system with a 4× objective (Fluor, Nikon) using a brightfield setting. EB clusters plated in the 24 wells were heated by an Ibidi temperature controller (Ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany), and CO₂ was maintained at 5% through an Ibidi gas mixer (Ibidi GmbH). Spontaneous contractions were recorded with a Grasshopper 3 Camera (GS3-U3-23S6C-C, Teledyne Flir LCC) analyzed online and offline using a custom-designed software (LabView, National Instruments, Austin, TX, USA), as described earlier in Makowka, Bruegmann et al. [39]. Time points of individual beats were recorded by a PowerLab system through the sound recorder of the PC (PowerLab 4/35 and Labchart 8 software, AD Instruments, Sydney, Australia) and used to calculate the frequency in offline analysis. For statistical analysis, the mean of beats per min (bpm) and its standard deviation (SD) of 5 min recording (sampling every second) was calculated. The mCherry expression of Cre⁺ cell clusters was verified before the experiment with a Cy3 filter (F 46-004 ET, Nikon) using a prime BSI camera (Teledyne Photometrics, Tuscon, AZ, USA) controlled by the NIS-Elements AR 5.21.03 software (Nikon).

2.17. Statistical Analyses

Relative Cx43 expression data of Western blots were either compared using an unpaired two-tailed *t*-test (Cre⁺ vs. Cre⁻ ES cells) or an ordinary one-way ANOVA test followed, in case of significance, by a Tukey's multiple comparisons test (comparison of WT-, Cre⁻-, and Cre⁺ 3T3-fibroblasts). Ordinary one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons tests (comparison of WT-, Cre⁻-, and Cre⁺ 3T3-fibroblasts) or an unpaired two-tailed *t*-test (Cre⁺ vs. Cre⁻ ES cells) were determined to evaluate statistical differences of FRAP experiments. Beating frequencies and standard deviations of beating frequencies were compared using an unpaired two-tailed *t*-test. Cx isoform expression of RT qPCR analysis was compared using an unpaired two-tailed *t*-test (Cre⁺ vs. Cre⁻ EBs). All error bars are provided as SEMs. Statistical significance was considered a *p*-value of ≤0.05. All statistical analyses were calculated using GraphPad Prism 9.3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Generation and Characterization of Inducible Cx43 Overexpression in Mouse G4 ES Cell Lines

We have opted to generate an inducible Cx43 overexpression system in pluripotent mouse embryonic stem (ES) cells using a fluorescent reporter (mCherry), marking the overexpressing cells and a small detectable peptide (P2A), which is fused to the C-terminus of exogenous Cx43 (Figure 1b). For this purpose, we have generated mouse G4 ES cells, in which the CAG promoter drives the inducible overexpression of Cx43. The CAG promoter was chosen because of its strong expression in muscle cells [34,40,41] at all stages of mouse embryonic development and after birth. The inducibility of the expression cassette is provided by a loxP flanked stop cassette with three SV40 polyadenylation signals that can be removed by Cre protein activity (Figure 1a). As depicted in Figure 1a, a DNA fragment composed of the murine Cx43 cDNA followed by the GSG-P2A DNA-sequence

and the mCherry cDNA in frame was cloned downstream of the stop cassette of the Ai6 vector (CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-Ai6) (Figure 1a,b). This vector contains Rosa26 (Rs26) genomic sequences to drive homologous recombination of the expression cassette into the endogenous Rs26 locus of G4 ES cells, allowing targeted single integration (Supplementary Figure S1a) [42].

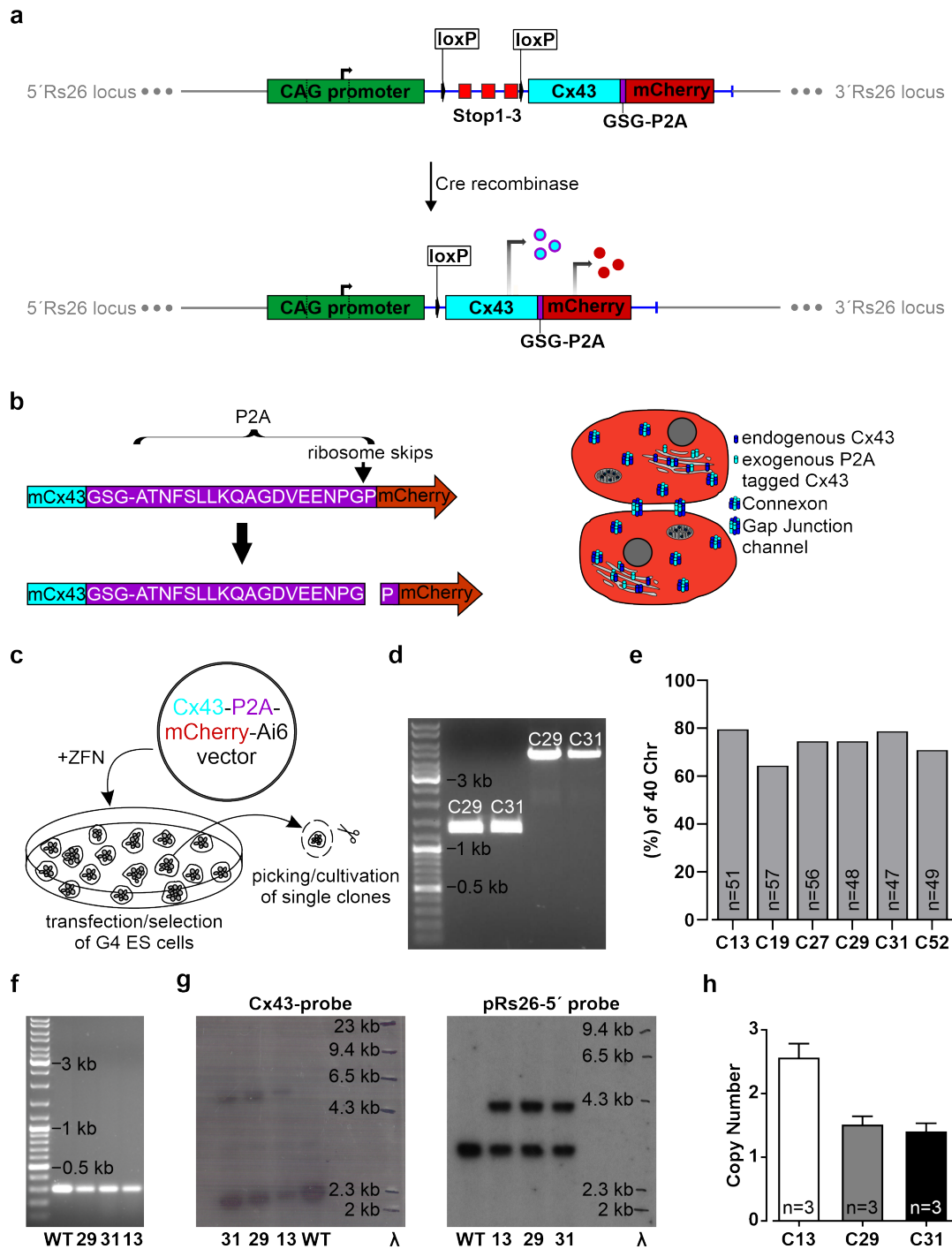


Figure 1. Generation and characterization of transgenic mouse G4 ES cells with inducible overexpression of connexin (Cx) 43. (a) Scheme of the homologous integrated CAG-floxed-Cx43-P2A-mCherry-fragment into the mouse Rs26 locus, enabling the inducible overexpression of Cx43-P2A and the fluorescent protein mCherry. Upon Cre recombinase activity, the loxP flanked stop sites are excised and exogenous Cx43, which is C-terminal-tagged with 21 amino acids of P2A, and mCherry are expressed

under control of the CAG-promoter. (b) Principle of Cx43 and mCherry co-expression by using the self-cleaving peptide P2A (left side). Transgene expression and Cx43 gap junction formation are depicted schematically in two adjacent cells (right side). (c) Scheme of the co-transfection of murine G4 ES cells with the expression vector and zinc finger nucleases and the selection approach of suitable clones. (d) PCR analysis of the Rs26 locus revealed correct integration of the transgene. The expected 1325 bp and 4636 bp fragments for the 5'/Rs26- and the 3'/Rs26 integration, respectively, could be detected. (e) Karyotyping of G4 ES cell clones (C) 13, 19, 27, 29, 31, and 52 yielded varying percentages of cells with 40 chromosomes (Chr). (f) PCR analysis showed at least one WT allele of the Rs26 locus, indicating a single integration of the transgene. (g) Southern blot analysis with $\alpha^{32}\text{PdCTP}$ labeled probes confirmed the integration of the exogenous Cx43 expression cassette (exogenous Cx43: 5583 bp; endogenous Cx43: 2304 bp, left picture) into the Rs26 locus (integration of the transgene into Rs26: 4171 bp; WT Rs26: 3050 bp, right picture). (h) qPCR-based determination of the copy number of the transgene in individual clones: G4 ES cell clones 29 and 31 were found to carry a single copy, whereas clone 13 most likely carries a second copy outside of the Rs26 locus.

To obtain a single integration into the genomic Rs26 locus, G4 ES cells were co-transfected with this construct and specific zinc finger nucleases (Figure 1c and Supplementary Figure S1a). We have characterized the transfected cells and assessed successful single integration of the transgene into the Rs26 locus of individual cells with various approaches: First, ten (52 clones in total) independent transgenic G4 ES cell clones were isolated after ten days of selection with neomycin and further cultivated (Figure 1c). The mCherry DNA could be detected in nine out of ten analyzed ES cell clones (Supplementary Figure S1b). PCR analysis of the Rs26 locus integration site using primer pairs that bind to the endogenous Rs26 sequence at the 5'- or 3'-end and to sequences within the construct (Supplementary Figure S1e) demonstrated the correct integration of the construct into the Rs26 locus of clones 13, 19, 27, 29, 31, 52 (Supplementary Figure S1c; as representative examples, clones 29 and 31 are shown in Figure 1d). Karyotyping of these six different cell clones revealed best results for clones 13, 29, and 31, as the large majority of counted cells (80% of clone 13, 75% of clone 29 and 79% of clone 31) contained 40 chromosomes (Figure 1e).

In order to investigate whether one or both Rs26 alleles were affected by integration of the insert, a Rs26-specific primer pair was used. PCR analysis resulted in a 297 bp band, indicating one unaffected Rs26 allele (Figure 1f). We also performed Southern blot analysis, proving the integration of the entire expression cassette (Figure 1g, left picture; Supplementary Figure S1f) into one allele of the Rs26 locus (Figure 1g, right picture; Supplementary Figure S1f) and confirming one WT allele for each tested clone and one integration of the transgene. Then, we used qPCR to confirm single integration of the transgene in individual clones (Figure 1h). These experiments revealed that G4 ES cell clones 29 and 31 carry one copy of the transgene. We also found that clone 13 most likely carries a second copy (Figure 1h) that appeared integrated outside of the Rs26 locus, as one remaining WT Rs26 allele could be detected by Southern blot analysis (using the pRs26-5' probe) (Figure 1g; Supplementary Figure S1f), as well as by qualitative PCR (Figure 1f; Supplementary Figure S1e). We therefore used for the further experiments clones 29 and 31.

Next, we assessed the functionality of the Cre-loxP system by transducing the undifferentiated murine G4 ES cells of clones 29 and 31 with AAV2.1-Cre (Figure 2a). Cell suspensions of both transgenic clones were mixed with AAV2.1-Cre and plated on irradiated fibroblasts. After three days several, mCherry-expressing colonies were visible, demonstrating that the floxed stop cassette was excised by the Cre recombinase activity. Since not all cells were successfully transduced, we obtained a mixed cell population containing mCherry positive (Cre^+) and mCherry negative (Cre^-) colonies (Figure 2b, middle picture). To obtain homogenous Cre^+ transgenic cell lines, we isolated single Cre^+ subclones and expanded these in culture (Figure 2b, middle and right pictures). All these cells were found to be mCherry⁺, whereas the control cells (Cre^-), not AAV2.1-Cre transduced, were

mCherry⁻ (Figure 2b). The functionality of the Cre-loxP system was further corroborated by RT-PCR. Using a primer pair matching exon 1 of the chicken beta actin (CAG promoter) and the Cx43 cDNA, we could show that the stop cassette was removed and the chimeric intron was spliced out (band of 417 bp; Supplementary Figure S1d,e). Thus, both transgenic G4 ES clones C29 and C31 were functioning; for the following experiments, we used the (Cre⁻) and (Cre⁺) cells of clone 31.

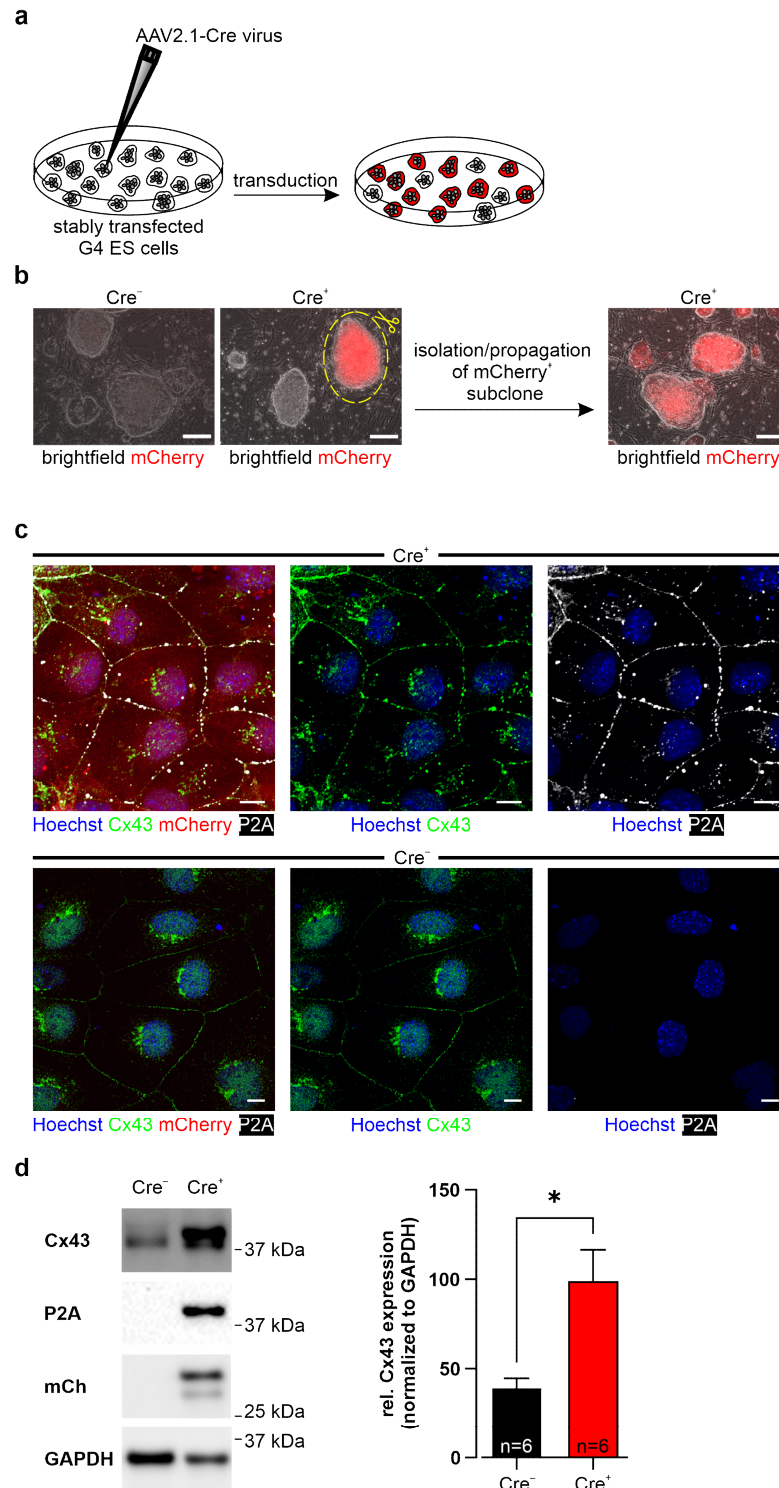


Figure 2. Inducible Cx43 overexpression in stably transfected, undifferentiated murine G4 ES cells.

(a) Stably transfected (CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-Ai6) G4 ES cells of clones 29 and 31 (Cre^-) were transduced with an AAV2.1-Cre virus (Cre^+) to induce transgene expression. (b) Transgenic G4 cells prior to AAV2.1-Cre transduction were mCherry^- (left picture, shown for C31), and three days after transduction, most of the colonies were mCherry^+ (middle picture). Single subclones with strong mCherry expression were isolated, and cells were further cultivated (middle and right pictures, shown for C31). Scale bars 100 μm . (c) Immunostainings of Cre^+ G4 ES cells (subclone 31, upper panel) showed, in contrast to Cre^- control cells (C31, lower panel), prominent expression of mCherry and of membrane-associated exogenous Cx43 (P2A^+). Total Cx43 (green), P2A-tagged exogenous Cx43 (white), mCherry (red), and Hoechst (blue). Scale bars 10 μm . (d) Western blot analysis of Cre^- and Cre^+ cells of C31 proved inducible Cx43 overexpression; note also mCherry^- and P2A expression in the AAV2.1-Cre treated cells. * p value ≤ 0.05 .

We explored the Cx43, mCherry, and P2A expression patterns in ES cells using immunostainings (Figure 2c) and Western blot analysis (Figure 2d and Supplementary Figure S7a). These experiments evidenced that P2A-tagged Cx43 and mCherry could be detected in the Cre^+ but not in the Cre^- control ES cell lines (Figure 2c,d). Based on staining for P2A, we found that the cellular distribution pattern of the exogenous Cx43 protein was almost identical to the endogenous one: for both components, cytoplasmic and membrane location were observed (Figure 2c). Importantly, quantification of Cx43 expression in Western blot analysis proved an approximately 2.5-fold overexpression following Cre-induction upon normalization with GAPDH (Figure 2d; $n = 6$). In contrast, immunostainings and Western blot analysis in Cre^- control cells showed lack of P2A and mCherry expression, underscoring appropriate function of the loxP stop cassette without major leakiness (Figure 2c,d). Taken together, we could generate an inducible Cx43 overexpressing G4 ES cell line carrying a single copy of the CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry construct, which is integrated into the Rosa26 locus.

3.2. Formation of Functional Cx43 Gap Junction Channels after Expression of the Inducible Construct in HeLa Cells, 3T3-Fibroblasts, and Undifferentiated G4 ES Cells

Even though we could demonstrate inducible overexpression of Cx43 protein in pluripotent cells, this was no proof for functional gap junction formation. This is a critical issue, as tagged gap junction channels were reported to show altered cell biological properties [43,44]. Therefore, we established a transgenic HeLa cell line using the construct described above to assess gap junction functionality. We chose HeLa cells because they do not express endogenous gap junction channels. WT HeLa cells were transfected with the CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-Ai6 construct and subsequently selected with neomycin for twelve days. Single HeLa cell clones were picked, and transgenic HeLa cell lines (Cre^-) established by propagating the cells. Next, cells of a transgenic HeLa cell line (Cre^-) were transduced with the AAV2.1-Cre virus, and mCherry^+ HeLa colonies could be observed after three days. To establish Cx43 expressing Cre^+ HeLa cell lines, we performed single cell dilution (Figure 3a). The lines were further characterized by immunostainings and Western blot analysis for Cx43, P2A, and mCherry (Figure 3b,c). We found that Cre^+ HeLa cells co-expressed P2A-tagged Cx43 protein, which was localized in the cytoplasm and the cell membrane. We also observed that the Cre^- transgenic control cells neither displayed mCherry fluorescence nor Cx43 or P2A expression (Figure 3b). These findings were underscored by the Western blot analysis (Figure 3c).

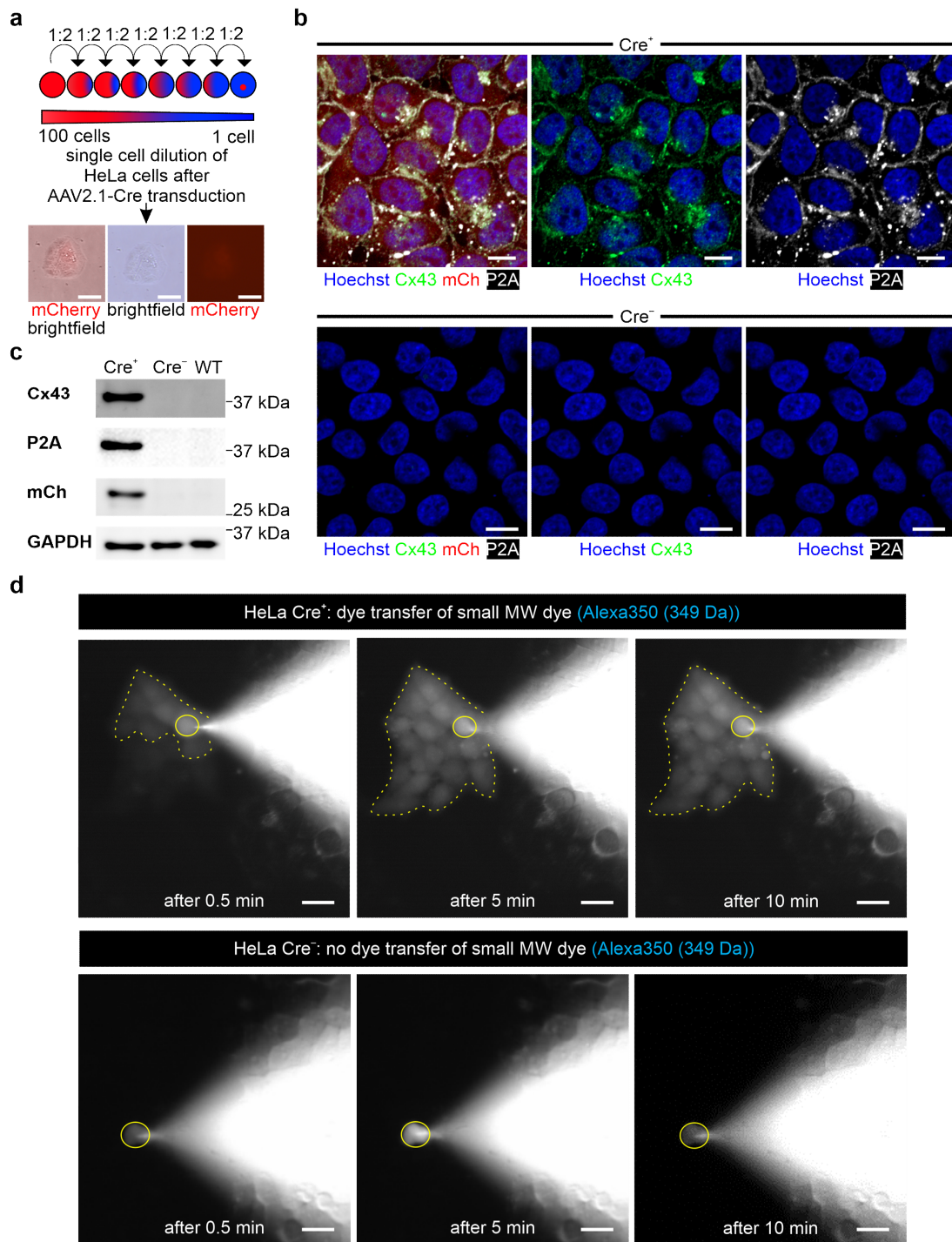


Figure 3. Inducible Cx43 expression and functional gap junction formation in stably transfected HeLa cells. (a) Scheme of single cell dilution of stably transfected (CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-Ai6, Cre⁻) and transduced (AAV2.1-Cre, Cre⁺) HeLa cells. Scale bars 100 μ m. (b) Immunostainings of transgenic HeLa cells confirmed strong expression of exogenous Cx43 and P2A in the plasma membrane of mCherry⁺ cells (Cre⁺, upper panel), whereas not-transduced control cells were Cx43⁻, P2A⁻, and mCherry⁻ (Cre⁻, lower panel). Scale bars 10 μ m. (c) Western blot analysis confirmed expression of Cx43, P2A, and mCherry in Cre⁺ HeLa cells, whereas none of these proteins were detected in Cre⁻ and WT HeLa cells. (d) Single Cre⁺ or Cre⁻ HeLa cells were dialyzed via a patch pipette with the small MW dye Alexa350 (349 Da), and dye passage to closely adjacent cells was observed in Cre⁺ cells (upper panel; n = 4). Cre⁻ HeLa control cells did not show passage of Alexa 350

to adjacent cells (lower panel, $n = 5$). Dialyzed cell marked by a yellow circle; after dye diffusion positive cell colonies marked by a yellow dotted line. Scale bars 100 μm .

Given that we could generate inducible Cx43 expression in HeLa cells, we next explored functional Cx43 gap junction formation using fluorescent dye diffusion. To discriminate between gap junctions and cytosolic bridges, we used two different dyes: Alexa 350 with a MW of 349 Da and Alexa 647 dextran with a MW of 10 kDa, both at a concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Single cells were dialyzed with the respective dye using a patch clamp pipette under microscopic control, and we found that Alexa 350 had diffused within 0.5 min to several Cre^+ HeLa cells, that were in close contact. Within approximately 5 min, the whole cell colony (10–20 cells) was found to be loaded with fluorescent dye (Figure 3d, upper panel, time-dependent dye transfer, $n = 4$). In contrast, in Cre^- HeLa cells, no small MW dye diffusion to adjacent cells could be observed ($n = 5$) (Figure 3d, lower panel). In addition, the large fluorescent Alexa 647 dextran dye diffused to neither the neighboring Cre^+ ($n = 4$) (Supplementary Figure S2a, upper panel) nor the Cre^- HeLa cells ($n = 3$) (Supplementary Figure S2a, lower panel). These experiments proved inducible formation of functional Cx43 gap junction channels.

Besides HeLa cells, we also tested transfection and transduction of 3T3 mouse fibroblasts, which are known to endogenously express a low density of Cx43 gap junction channels. These experiments were performed to investigate inducible Cx43 gap junction channel formation in the presence of endogenous Cx43 gap junctions. 3T3 cells were stably transfected with the CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-Ai6 vector and selected with neomycin for twelve days. Through single cell dilution, a new transgenic 3T3 line was established (Cre^-), as proven by PCR analysis (Supplementary Figure S3a). Cells were transduced with AAV2.1-Cre, and three days after transduction, mCherry⁺ 3T3 cells could be detected (Supplementary Figure S3b). Immunostainings of the Cre^+ and Cre^- 3T3-fibroblasts proved, as would be expected, large amounts of Cx43 and P2A (Figure 4a, upper panel) in the mCherry⁺ cells but no P2A and only low amounts of endogenous Cx43 in the controls (Figure 4a, lower panel). The mCherry and Cx43 overexpression in Cre^+ 3T3-fibroblasts compared to control cells was confirmed by Western blot analysis ($n = 4$) (Figure 4b). We also studied functional Cx43 gap junction formation using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP), which enables, in contrast to dye diffusion, quantification of the diffusion velocity of the calcein AM dye. Cells were first loaded with calcein AM, followed by the bleaching of a single fibroblast in a cell cluster using a 561 nm laser for 5 s with an intensity of 2.5 mW. Thereafter, recovery of the fluorescence intensity in the bleached fibroblast was determined every 15 s over a period of 10 min (Figure 4c,d). Our experiments showed that Cre^+ 3T3-fibroblasts displayed significantly faster fluorescence recovery after photobleaching compared to Cre^- cells (Tukey's multiple comparisons test after 4 min: $p(\text{Cre}^- \text{ vs. } \text{Cre}^+) < 0.0001$; after 10 min: $p(\text{Cre}^- \text{ vs. } \text{Cre}^+) = 0.0007$; $n = 6$) and 3T3 WT cells (Tukey's multiple comparisons test after 4 min: $p(\text{WT vs. } \text{Cre}^+) < 0.0001$; after 10 min: $p(\text{WT vs. } \text{Cre}^+) = 0.001$; $n = 6$), respectively. In contrast, WT and Cre^- cells displayed very similar FRAP characteristics (Tukey's multiple comparisons test after 4 min: $p(\text{WT vs. } \text{Cre}^-) = 0.9523$, ns; after 10 min: $p(\text{WT vs. } \text{Cre}^-) = 0.9651$, ns; $n = 6$) (Figure 4c,d; Supplementary Videos S1, S3, and S4). We also noticed that mCherry fluorescence was bleached and could not be recovered, as this protein is too big (28 kDa) to diffuse via gap junctions (Supplementary Figure S3c; $n = 6$, Supplementary Video S2). These experiments proved an increase in functional gap junction channels by overexpression of exogenous Cx43 in the presence of endogenous Cx43 gap junctions.

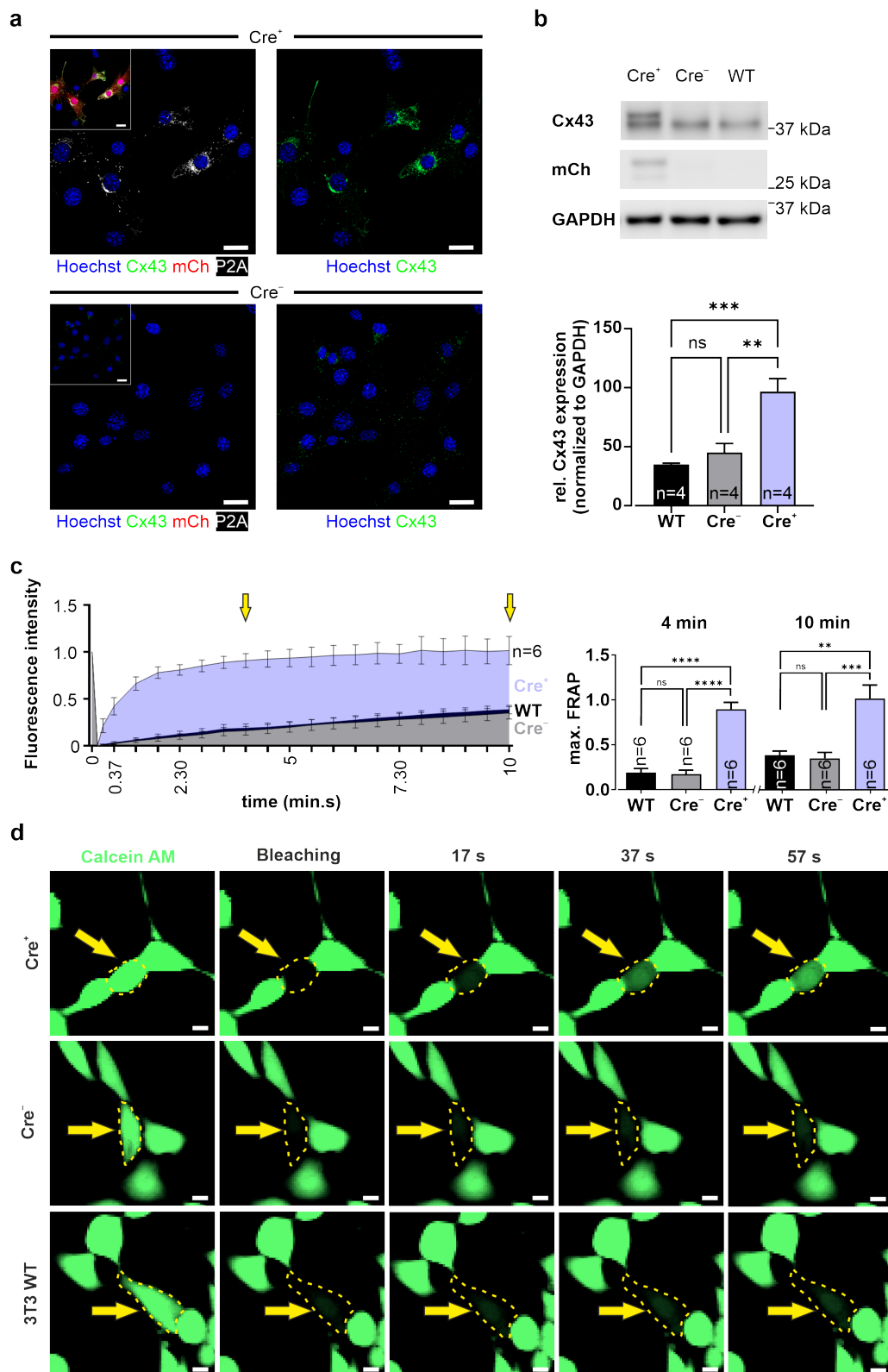


Figure 4. Inducible overexpression of functional Cx43 gap junctions in stably transfected 3T3 cells. (a) Immunostaining of stably transfected (CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry-Ai6, Cre⁻) and transduced (AAV2.1-Cre, Cre⁺) mCherry⁺ 3T3-fibroblasts showed strong Cx43 and P2A expression (upper panel). In contrast, Cre⁻ 3T3 cells exhibited much lower Cx43 expression and expressed neither mCherry fluorescence nor P2A. Upper and lower left pictures: Hoechst (blue) and P2A (white); insets:

Hoechst (blue), Cx43 (green), mCherry (red), and P2A (white). Scale bars 20 μm . **(b)** Western blot analysis of transgenic Cre^+ cells proved Cx43 and mCherry (over-)expression but not in control cells. Quantification of Cx43 expression proved its strong overexpression in Cre^+ 3T3 cells. **(c)** Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) measurements illustrated significantly faster calcein AM dye recovery in transgenic Cre^+ 3T3-fibroblasts (clone 2) than in either WT or Cre^- 3T3-fibroblasts (clone 2); FRAP recovery rates were quantified at 4 and 10 min after bleaching (quantification times are marked by yellow arrows). **(d)** Original fluorescence pictures of 3T3 Cre^+ , Cre^- , and WT fibroblasts, respectively, after calcein AM (0.38 μM) dye loading; bleaching (for 5 s with a 561 nm laser with 2.5 mW intensity) of a single fibroblast (bleached cell marked by a yellow dotted line and a yellow arrow); and dye recovery at 17 s, 37 s, and 57 s after bleaching; calcein AM dye (green). Scale bars 20 μm . ** p value ≤ 0.01 , *** p value ≤ 0.001 , **** p value ≤ 0.0001 , ns (not significant) p value > 0.05 .

We also tested the functional exogenous Cx43 gap junction formation in undifferentiated Cre^+ G4 ES cells using FRAP and compared the results with Cre^- control ES cells. Our experiments revealed, at 4 min after bleaching, a significantly faster dye recovery in the Cre^+ G4 ES cells than in the controls (two-tailed unpaired t -test after 4 min: $p(\text{Cre}^+ \text{ vs. } \text{Cre}^-) = 0.0005$; $n = 5$), whereas at later time points, the controls also showed a clear fluorescence recovery (two-tailed unpaired t -test after 10 min: $p(\text{Cre}^+ \text{ vs. } \text{Cre}^-) = 0.4905$; $n = 5$) (Figure 5, Supplementary Videos S5 and S7) due to prominent endogenous Cx43 expression (Figure 2c, lower pictures). Owing to its large size, mCherry fluorescence could not be recovered, as already mentioned above (Supplementary Figure S4a, Supplementary Video S6).

3.3. In Vitro Differentiation of Cx43-overexpressing ES Cells into Spontaneously Beating Cardiomyocytes

A key advantage of using pluripotent cells as a Cx43 overexpression system is that they can be differentiated in vitro, and the consequences of overexpression can be tested regarding development, differentiation, and function in different somatic cell types. As a proof of concept, we have focused on the in vitro differentiation into cardiomyocytes using the well-established hanging drop protocol (Figure 6a; adapted from Boheler, Czyz et al. [33]). Embryoid bodies (EBs) were generated from either Cre^+ or Cre^- CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry G4 mouse ES cells (Figure 6a,b). Western blot analysis and immunofluorescence stainings proved that P2A, mCherry, and Cx43 are overexpressed only in Cre^+ EBs (Figure 6c,d, middle panel, Supplementary Figure S7a). Furthermore, immunostaining against the muscle-specific marker cardiac α -actinin indicated a similar degree of cardiomyocyte differentiation, suggesting that cardiomyocyte development and differentiation was not greatly altered by Cx43 overexpression (Figure 6d, left panel). This was supported by the finding that both mCherry^+ (Cre^+) and mCherry^- (Cre^-) EBs started to beat spontaneously at days 10–12 of differentiation (Supplementary Videos S8 and S9), underscoring the viability of the cardiomyocytes despite Cx43 overexpression. This was further investigated by performing immunostainings with the apoptosis marker cleaved caspase 3. Apoptotic areas were preferentially detected, as expected, in central areas of Cre^+ , as well as Cre^- EBs, but there was no obvious difference in apoptosis rates in transgenic and control EBs (Figure 6d, right panel; $n = 5$). We next wondered whether Cx43 overexpression resulted in functional differences and therefore measured spontaneous beating rates in EB-derived cell clusters using microscopy-based video recordings. Our measurements revealed that the Cre^+ cell clusters displayed significantly higher beating rates (beating frequency = 75.9 bpm; $n = 16$) than did Cre^- controls (beating frequency = 60.3 bpm; $n = 19$; unpaired t -test: $p < 0.0001$) (Figure 7a; Supplementary Videos S10 and S11). In addition, we also found that the Cre^+ cell clusters were beating more regularly than the Cre^- controls, as their beating rates at 1 Hz over a 5 min period yielded a standard deviation (SD) of 1.9 vs. 5.3, respectively (unpaired t -test: $p < 0.0001$; $n(\text{Cre}^+) = 16$, $n(\text{Cre}^-) = 19$) (Figure 7a). We therefore wondered whether this could be due to changes in the expression of cardiac Cx isoforms. RT qPCR analysis of Cre^+ and Cre^- undifferentiated ES (data not shown) and EB-derived cells revealed expression of Cx43 and Cx45, but not of Cx30.2

and Cx40 (Supplementary Figure S5a). Besides the expected upregulation of total (endogenous + exogenous) Cx43 in Cre⁺ EBs (unpaired *t*-test: $p = 0.0028$; $n = 4$), there were no prominent changes in the other Cx isoforms (Supplementary Figure S5a). Thus, these experiments proved intact *in vitro* differentiation characteristics of Cre⁺ cardiomyocytes despite Cx43 overexpression.

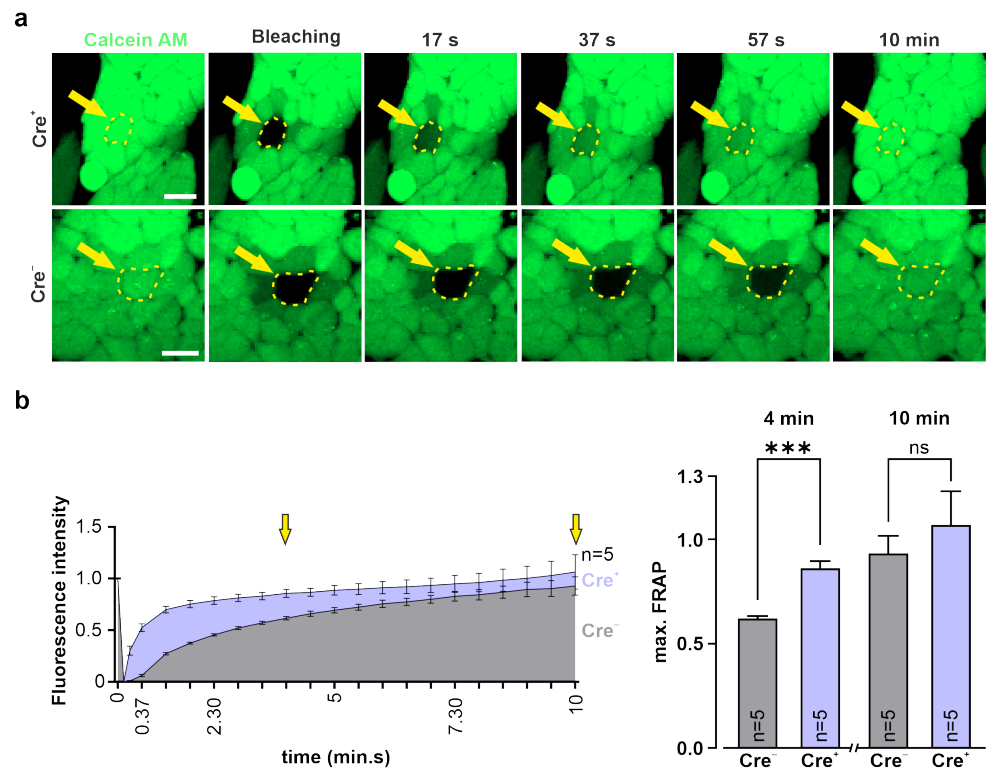


Figure 5. Functional gap junction formation in Cre⁺ G4 ES cells. Fluorescence recovery after photo-bleaching (FRAP) experiments in G4 ES cells. (a) Original fluorescence pictures of Cre⁺ and Cre⁻ G4 ES cells after calcein AM (0.38 μ M) dye loading; bleaching (for 5 s with a 561 nm laser with 2.5 mW intensity) of a single G4 ES cell of the cell cluster (bleached cell marked by a yellow dotted line and a yellow arrow); and dye recovery at 17 s, 37 s, 57 s, and 10 min after bleaching; calcein AM dye (green). Scale bars 20 μ m. (b) FRAP experiments of G4 ES cells showed, 4 min after bleaching, significantly faster calcein AM dye recovery in transgenic Cre⁺ G4 ES cells (clone 31) than in Cre⁻ G4 ES cells (clone 31); after 10 min, there was no significant difference in the dye recovery of both cell lines detected (quantification times are marked by yellow arrows). *** p value ≤ 0.001 , ns (not significant) p value > 0.05 .

3.4. Establishment of a Virus-Based Cx43 Overexpression System

Viruses are powerful tools for the targeting of cells and tissues. We wanted to have another tool for Cx43 overexpression *in vitro* and *in vivo* and have therefore generated an AAV2.6-Cx43-P2A-mCherry virus. This harbored the identical expression cassette, which was used above (Supplementary Figure S6a) under direct control by the CAG-promoter. We have chosen the AAV2.6 type, as this serotype is known to transduce not only muscle cells, but also other cell types, such as those of the central nervous system [45]. We tested the feasibility and utility of this virus in neonatal mouse cardiomyocytes (NNCMs), which are frequently used as an *in vitro* model because adult cardiomyocytes dedifferentiate rapidly in culture and therefore cannot be used for this type of experiment [46]. Enriched NNCMs (Figure 7b) were treated with the virus for two days and three days post-transduction; mCherry⁺ NNCMs were observed (Figure 7c, upper picture). The transduction efficiency of the AAV2.6-Cx43-P2A-mCherry virus amounted to 47.7% in NNCMs ($n = 3$, 531 mCherry⁺ NNCMs out of a total of 1113 NNCMs) (Figure 7c, graph). Cell clusters were observed

to beat spontaneously before and after viral transduction, underscoring the viability of NNCMs (Supplementary Videos S12 and S13). Immunofluorescence stainings confirmed P2A-tagged Cx43 overexpression in mCherry⁺ NNCMs (Figure 7d, upper panel). Cellular distribution of Cx43 was mainly restricted to the membrane in both control (Figure 7d, second and fourth panel) and transduced cardiomyocytes (Figure 7d, upper and third panel); to a small degree, cytosolic localization was also detected. Positive cardiac α -actinin staining of mCherry⁺ cells corroborated the successful viral targeting of NNCMs (Figure 7d, third panel). These experiments demonstrated the successful development of a virus-based transduction system that allows targeted overexpression of Cx43, as well as mCherry and P2A labelling.

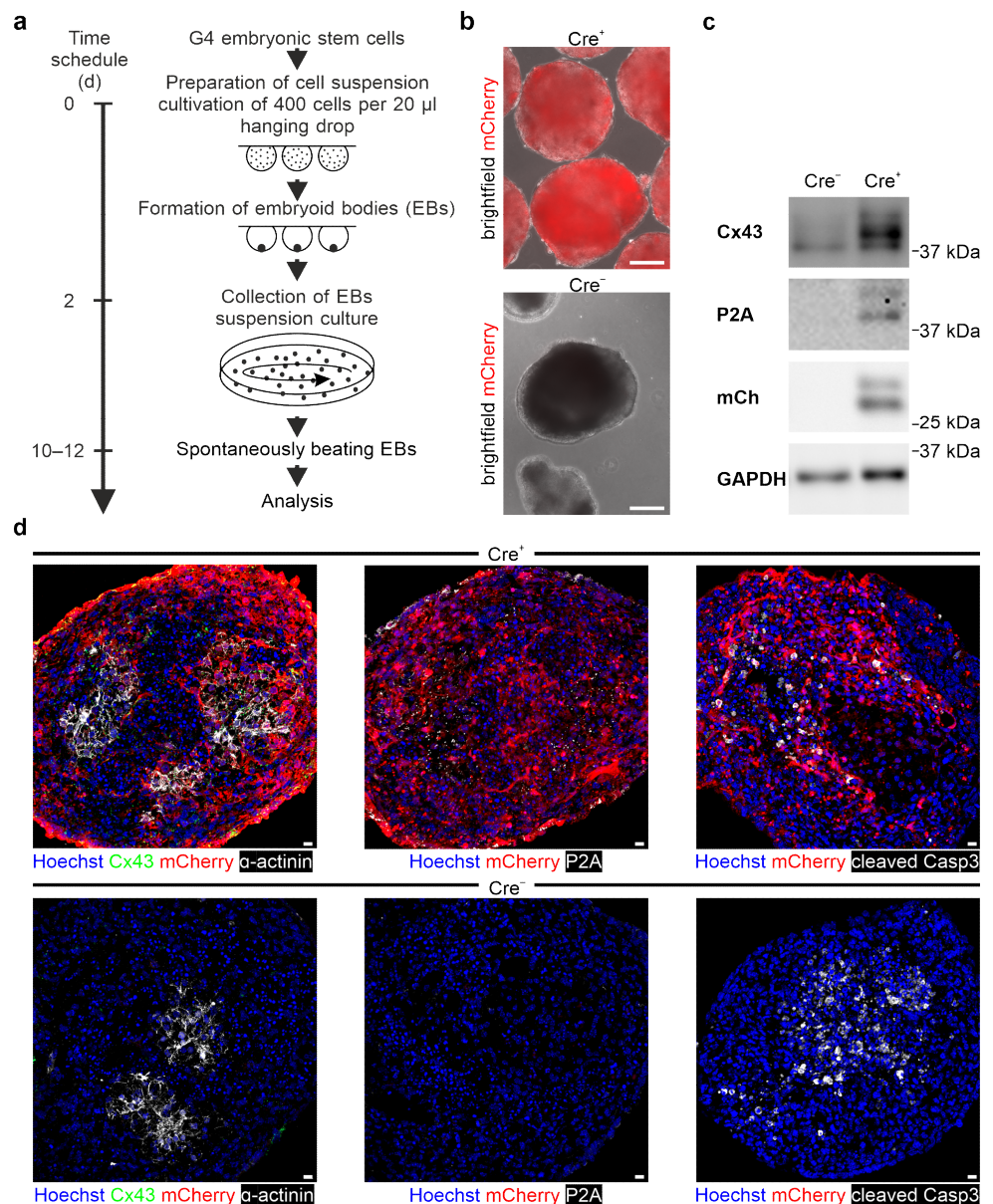


Figure 6. Inducible Cx43 (over-)expression in stably transfected murine G4 ES cells (clone 31), in vitro differentiation into cardiomyocytes. (a) In vitro differentiation scheme of murine ES cells into spontaneously beating EBs (adapted from Boheler et al. [33]). (b) The mCherry⁺ EBs derived from the transgenic Cre⁺ G4 ES cells of clone 31 (upper picture) and transgenic mCherry⁻ control EBs (lower

picture). Scale bars 100 μm . (c) Western blot analysis of EBs from Cre^+ and Cre^- G4 ES cells confirmed inducible Cx43 overexpression, as underscored by P2A-tagged Cx43 and mCherry expression. (d) Immunostainings of EBs illustrated clusters of cardiac $\alpha\text{-actinin}^+$ (white) cardiomyocytes in both Cre^+ (upper left picture) and Cre^- control EBs (lower left picture). Immunostainings yielded strong Cx43 (green, upper left picture), P2A (white), and mCherry (red) (over-)expression (upper middle picture) in Cre^+ EBs. Similar apoptotic areas preferentially in the center of Cre^+ and Cre^- control EBs (right pictures) were found. Scale bars 10 μm .

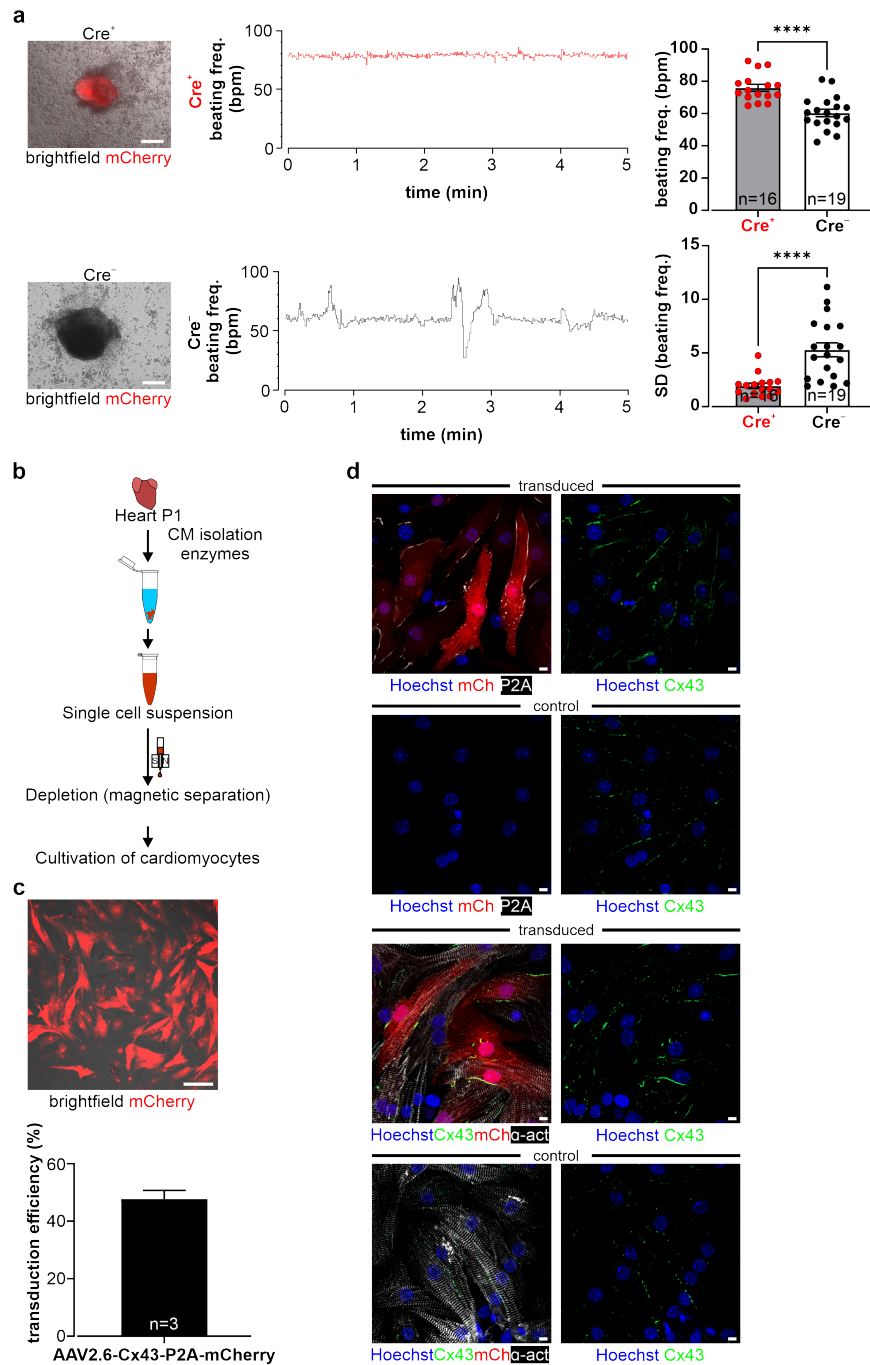


Figure 7. Functional impact of Cx43 overexpression in murine G4 ES cell-derived EBs; targeting of

murine neonatal cardiomyocytes (NNCMs) with an AAV2.6-Cx43 overexpression virus. (a) Fluorescent and brightfield pictures of Cre⁺ and Cre⁻ EB-derived cell clusters at one day after dissociation and plating. Scale bars 100 μ m. Video-based monitoring of spontaneous beating rates showed that Cre⁺ cell clusters (red) exhibited significantly higher and more stable beating rates compared to Cre⁻ controls (black). **** p value ≤ 0.0001 . (b) Scheme depicting the isolation and enrichment of NNCMs. (c) NNCMs were cultivated and transduced with the AAV2.6-CAG-Cx43-P2A-mCherry (AAV2.6-Cx43) virus; note strong mCherry fluorescence (picture). Transduction efficiency of AAV2.6-Cx43 virus in NNCMs (graph). (d) Immunostainings of transduced NNCMs showed Cx43 (green), P2A (white), and mCherry (red) expression (upper panel), whereas non-transduced NNCMs displayed less Cx43 and neither P2A nor mCherry (second panel) expression. The mCherry⁺ (red) and cardiac α -actinin⁺ (white cross-striation) immunostainings (third panel) proved successful targeting of NNCMs with the AAV2.6-Cx43 virus; non-transduced NNCMs showed α -actinin, but less Cx43 staining and no mCherry signal. NNCMs lack intercalated discs; note the diffuse expression pattern of Cx43 in the cell membrane. Scale bars 10 μ m.

4. Discussion

Herein we report the generation of a new genetic model that allows inducible overexpression of Cx43 in mouse ES cells. Cx43 is widely distributed in mammals, and we have chosen the ES cell system because in vitro differentiation of pluripotent cells allows us to assess the effects of Cx43 overexpression in different somatic cell types, such as cardiomyocytes and astrocytes. We have also established an AAV virus, which enables Cx43 overexpression of cells, tissues, and organs in vitro and in vivo.

We have opted for an inducible genetic system because CMV-driven ubiquitous Cx43 overexpression in mice was reported to cause morbidity and postnatal mortality due to neural tube and conotruncal heart defects [29], a phenotype which was reminiscent of Cx43 KO models [21,47]. We tested our genetic construct in ES cells, as well as HeLa cells and 3T3-fibroblasts, and observed no leakiness in the absence of Cre, whereas AAV-Cre-mediated excision of the floxed stop cassettes resulted in Cx43 overexpression in cells with and without endogenous Cx43 expression. A double reporter system was implemented to detect both Cx43 overexpressing cells based on mCherry fluorescence and the location and distribution pattern of exogenous Cx43 molecules based on their fusion to the small self-cleaving peptide P2A [48], which is detectable by antibodies (Figure 2c,d). P2A is a powerful tool, as it allows co-translational expression of P2A-linked genes in equal amounts in contrast to IRES sites [49]. Earlier work reported that the tagging of Cx43 is challenging, as fusion of proteins to its N-terminus resulted in the expression of non-functional hemichannels and gap junctions [43], fusion to its C-terminus in altered gating properties [50], and altered regulation of connexons and gap junctions [44,51]. We therefore chose to fuse the small P2A peptide to the C-terminal site of Cx43, and our data clearly show that this did neither alter the expression pattern nor the biology of the exogenous protein. This was underscored by dye diffusion in HeLa cells and FRAP experiments in 3T3-fibroblasts and G4 ES cells, proving the formation of functional Cx43 gap junction channels. As perturbation of the C terminus of Cx43 could lead to alterations of interactions with proteins involved in plaque dynamics [52], this aspect needs to be explored in the future by performing specific biochemical assays [53,54]. Similarly, phosphorylation is known to be a key modulator of Cx43 gap junction function, and, therefore, the phosphorylation pattern of exogenous Cx43 should be investigated using phospho-specific antibodies [55]. When analyzing the exogenous Cx43 distribution pattern with confocal microscopy, we also found that it overlapped with endogenous Cx43 (Figure 2c, upper panel; Figure 4a, upper panel). Super-resolution microscopy and biochemical approaches are required to determine whether exogenous P2A⁺- and endogenous P2A⁻-Cx43 molecules assemble to form connexons and functional gap junctions.

Because of the reported adverse effects of Cx43 overexpression in vivo, we have explored this aspect in our system and differentiated mouse ES cells into spontaneously beating EBs in vitro upon Cre-induction. We could not observe prominent cell biological

differences, as neither cardiac α -actinin immunostainings (Figure 6d, left panel), nor the degree of apoptosis (Figure 6d, right panel), nor the time point of initiation of spontaneous beating differed strongly between Cx43 overexpression and control EBs. Interestingly, when quantifying beating rates in Cx43 overexpression and control cell clusters, we noticed that mutant clusters were beating at faster rates and in a clearly more rhythmic fashion. At this point, we can only speculate on the mechanism and propose that the ubiquitous Cx43 overexpression provides better overall conduction between cardiomyocytes and also with non-cardiomyocytes within EBs, as we did not detect changes in the expression of other cardiac Cx isoforms. Recent experiments in human-induced pluripotent cell-derived cardiac microtissues found that Cx43 gap junctions are critical for the maturation of cardiomyocytes in these constructs and that this depends on the diffusion of cAMP through Cx43 gap junction channels [56]. It is possible that also, in our case, the observed higher beating rates are related to more mature cardiomyocytes, which is difficult to assess based on purely morphological criteria. As expected for cultured cardiomyocytes, endogenous and exogenous Cx43 was found to be distributed in ES cell-derived cardiomyocytes and in NNCMs diffusely on the cell surface, whereas in the mature heart, its location is primarily restricted to intercalated discs.

Taken together, we have generated and characterized an inducible Cx43 overexpression system in murine ES cells and an AAV-Cx43 overexpression system enabling the investigation of both the cell biological and functional consequences of overexpressing Cx43 in vitro and in vivo. We envision for both systems multiple applications. Our group could show that grafting of Cx43-expressing muscle cells into the infarct area or overexpression of Cx43 in resident myofibroblasts of the scar strongly reduced the incidence of post-infarction ventricular tachycardias in mice in vivo [37,57]. Despite the great translational potential of these strategies for specific patient cohorts, potential cell biological (e.g., cell differentiation, maturation, viability) and functional (e.g., expression of ion channels and transporters) drawbacks of Cx43 (over)expression in cardiomyocytes and non-cardiomyocytes need to be investigated. The in vitro ES cell differentiation system is ideally suited for this purpose. Similarly, it has been suggested that some forms of epilepsy could benefit from the increased opening of Cx43 gap junction channels in astrocytes [58]. Therefore, novel Cx43 gap junction activators and openers could be studied in ES cell-derived astrocytes in regard to their effects on Cx43 gap junction channels. In addition, potential adverse effects of such Cx43 modulators could be investigated in terms of safety pharmacology in transgenic ES cell-derived cardiomyocytes. The transgenic G4 ES cells containing the CAG-floxSTOP-Cx43-P2A-mCherry construct can be used to generate transgenic mice. Such a mouse model would allow for the testing of the therapeutic potential of Cx43 overexpression in any cell type, depending on crossings with Cre-deleter mouse lines. For instance, for us and other groups working on cardiac arrhythmias, it would be of great interest to induce homogenous overexpression of Cx43 in border zone cardiomyocytes or myofibroblasts of the scar area and to study the effects on ventricular arrhythmias after myocardial infarction.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11040694/s1>: Figure S1: Identification of suitable transgenic cell clones after transfection of the expression plasmid and subsequent selection in murine G4 ES cells, Figure S2: Dye diffusion experiments in HeLa cells using the large MW dye Alexa647-dextran, Figure S3: Generation of Cre⁺ 3T3-fibroblast lines, fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiment, Figure S4: Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments in G4 ES cells, Figure S5: Expression of different Cx isoforms in embryoid bodies (EBs) derived from transgenic Cre⁺ and Cre⁻ G4 ES cells of clone 31, Figure S6: AAV2.6-CAG-Cx43-P2A-mCherry virus, Figure S7: Western blot of undifferentiated G4 ES cells and EBs using a Cx43 antibody (Sigma-Aldrich, Merck, #C6219), Video S1: FRAP experiments of Cre⁺ 3T3-fibroblasts_Calcein-AM, Video S2: FRAP experiments of Cre⁺ 3T3-fibroblasts_mCherry, Video S3: FRAP experiments of Cre⁻ 3T3-fibroblasts_Calcein-AM, Video S4: FRAP experiments of WT 3T3-fibroblasts_Calcein-AM, Video S5: FRAP experiments of Cre⁺ G4 ES cell_Calcein-AM, Video S6: FRAP experiments of Cre⁺ G4 ES

cell_mCherry, Video S7: FRAP experiments of Cre⁻ G4 ES cell_Calcein-AM, Video S8: Beating Cre⁺ EB, Video S9: Beating Cre⁻ EB, Video S10: Beating Cre⁺ cell cluster after partial dissociation of EBs and plating, Video S11: Beating Cre⁻ cell cluster after partial dissociation of EBs and plating, Video S12: Beating monolayer of neonatal cardiomyocytes (NNCMs) (P1) one day post isolation, Video S13: Beating monolayer of NNCMs (P1) three days post transduction with AAV2.6-Cx43-P2A-mCherry virus.

Author Contributions: P.N. performed molecular biology, transduction and transfection of cells, Western blots, immunostainings, microscopy, and analysis of the data. M.S. performed and analyzed FRAP experiments, D.M. performed dye diffusion, and D.M. and P.N. performed video microscopy-based analysis of beating cell clusters. S.G. was involved in molecular biology and cell culture work. C.G., W.R., and B.K.F. designed the study. P.N., C.G., and B.K.F. wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript. C.G. and B.K.F. have equally contributed to this work.

Funding: This study was part of SFB 1425, funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—project # 422681845 (W.R. and B.K.F.).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank P. Freitag (Bonn, Germany) for excellent technical assistance and M. Hesse (Bonn, Germany) and P. Sasse (Bonn, Germany) for advice on vector construct design and dye diffusion experiments, respectively, and E. Carls (Bonn, Germany) and M. Hesse for carefully proofreading the manuscript. We also thank A. Nagy and M. Gertsenstein (Toronto, Canada) for providing the G4 mouse ES cell line and K. Hoppe-Seyler (DKFZ, Heidelberg, Germany) for providing the human cervical carcinoma cell line HeLa. We also thank the Virus Core Facility of the Medical Faculty of Bonn.

Conflicts of Interest: The authors declare no competing interest.

References

- Boengler, K.; Stahlhofen, S.; van de Sand, A.; Gres, P.; Ruiz-Meana, M.; Garcia-Dorado, D.; Heusch, G.; Schulz, R. Presence of connexin 43 in subsarcolemmal, but not in interfibrillar cardiomyocyte mitochondria. *Basic Res. Cardiol.* **2009**, *104*, 141–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, H.; Brodsky, S.; Kumari, S.; Valiunas, V.; Brink, P.; Kaide, J.-I.; Nasjletti, A.; Goligorsky, M.S. Paradoxical overexpression and translocation of connexin43 in homocysteine-treated endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2002**, *282*, H2124–H2133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Söhl, G.; Willecke, K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res.* **2004**, *62*, 228–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Boengler, K.; Rohrbach, S.; Weissmann, N.; Schulz, R. Importance of Cx43 for Right Ventricular Function. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 987. [[CrossRef](#)]
- Laird, D.W. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J.* **2006**, *394*, 527–543. [[CrossRef](#)]
- Leithe, E.; Mesnil, M.; Aasen, T. The connexin 43 C-terminus: A tail of many tales. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2018**, *1860*, 48–64. [[CrossRef](#)]
- Koval, M.; Molina, S.A.; Burt, J.M. Mix and match: Investigating heteromeric and heterotypic gap junction channels in model systems and native tissues. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 1193–1204. [[CrossRef](#)]
- Sáez, J.C.; Schalper, K.A.; Retamal, M.A.; Orellana, J.A.; Shoji, K.F.; Bennett, M.V.L. Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells. *Exp. Cell Res.* **2010**, *316*, 2377–2389. [[CrossRef](#)]
- Kumai, M.; Nishii, K.; Nakamura, K.; Takeda, N.; Suzuki, M.; Shibata, Y. Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development* **2000**, *127*, 3501–3512. [[CrossRef](#)]
- Denoyelle, F.; Lina-Granade, G.; Plauchu, H.; Bruzzone, R.; Chaïb, H.; Lévi-Acobas, F.; Weil, D.; Petit, C. Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature* **1998**, *393*, 319–320. [[CrossRef](#)]
- Srinivas, M.; Verselis, V.K.; White, T.W. Human diseases associated with connexin mutations. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2018**, *1860*, 192–201. [[CrossRef](#)]
- Van Kempen, M.J.; Fromaget, C.; Gros, D.; Moorman, A.F.; Lamers, W.H. Spatial distribution of connexin43, the major cardiac gap junction protein, in the developing and adult rat heart // Spatial distribution of connexin43, the major cardiac gap junction protein, in the developing and adult rat heart. *Circ. Res.* **1991**, *68*, 1638–1651. [[CrossRef](#)]

13. Frank, M.; Wirth, A.; Andrié, R.P.; Kreuzberg, M.M.; Dobrowolski, R.; Seifert, G.; Offermanns, S.; Nickenig, G.; Willecke, K.; Schrickel, J.W. Connexin45 provides optimal atrioventricular nodal conduction in the adult mouse heart. *Circ. Res.* **2012**, *111*, 1528–1538. [CrossRef]
14. Gollob, M.H.; Jones, D.L.; Krahn, A.D.; Danis, L.; Gong, X.-Q.; Shao, Q.; Liu, X.; Veinot, J.P.; Tang, A.S.L.; Stewart, A.F.R.; et al. Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 2677–2688. [CrossRef]
15. Dobrowolski, R.; Sasse, P.; Schrickel, J.W.; Watkins, M.; Kim, J.-S.; Rackauskas, M.; Troatz, C.; Ghanem, A.; Tiemann, K.; Degen, J.; et al. The conditional connexin43G138R mouse mutant represents a new model of hereditary oculodentodigital dysplasia in humans. *Hum. Mol. Genet.* **2008**, *17*, 539–554. [CrossRef]
16. Severs, N.J.; Bruce, A.F.; Dupont, E.; Rothery, S. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc. Res.* **2008**, *80*, 9–19. [CrossRef]
17. Dhein, S.; Salameh, A. Remodeling of Cardiac Gap Junctional Cell-Cell Coupling. *Cells* **2021**, *10*, 2422. [CrossRef]
18. Bao, M.; Kanter, E.M.; Huang, R.Y.-C.; Maxeiner, S.; Frank, M.; Zhang, Y.; Schuessler, R.B.; Smith, T.W.; Townsend, R.R.; Rohrs, H.W.; et al. Residual Cx45 and its relationship to Cx43 in murine ventricular myocardium. *Channels* **2011**, *5*, 489–499. [CrossRef]
19. Danik, S.B.; Liu, F.; Zhang, J.; Suk, H.J.; Morley, G.E.; Fishman, G.I.; Gutstein, D.E. Modulation of cardiac gap junction expression and arrhythmic susceptibility. *Circ. Res.* **2004**, *95*, 1035–1041. [CrossRef]
20. Rivaud, M.R.; Delmar, M.; Remme, C.A. Heritable arrhythmia syndromes associated with abnormal cardiac sodium channel function: Ionic and non-ionic mechanisms. *Cardiovasc. Res.* **2020**, *116*, 1557–1570. [CrossRef]
21. Rodríguez-Sinovas, A.; Sánchez, J.A.; Valls-Lacalle, L.; Consegal, M.; Ferreira-González, I. Connexins in the Heart: Regulation, Function and Involvement in Cardiac Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4413. [CrossRef]
22. Marsh, S.R.; Williams, Z.J.; Pridham, K.J.; Gourdie, R.G. Peptidic Connexin43 Therapeutics in Cardiac Reparative Medicine. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2021**, *8*, 52. [CrossRef]
23. O’Quinn, M.P.; Palatinus, J.A.; Harris, B.S.; Hewett, K.W.; Gourdie, R.G. A peptide mimetic of the connexin43 carboxyl terminus reduces gap junction remodeling and induced arrhythmia following ventricular injury. *Circ. Res.* **2011**, *108*, 704–715. [CrossRef]
24. Reynolds, J. Zealand Announces Results of a Phase II Proof-of-Concept Trial with Danegaptide for Cardiac Reperfusion Injuries. *FierceBiotech*. 3 March 2016. Available online: <https://www.fiercebiotech.com/biotech/zealand-announces-results-of-a-phase-ii-proof-of-concept-trial-danegaptide-for-cardiac> (accessed on 20 December 2021).
25. Wang, J.; Ma, M.; Locovei, S.; Keane, R.W.; Dahl, G. Modulation of membrane channel currents by gap junction protein mimetic peptides: Size matters. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2007**, *293*, C1112–C1119. [CrossRef]
26. Reaume, A.G.; de Sousa, P.A.; Kulkarni, S.; Langille, B.L.; Zhu, D.; Davies, T.C.; Juneja, S.C.; Kidder, G.M.; Rossant, J. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* **1995**, *267*, 1831–1834. [CrossRef]
27. Lo, C. Gap Junction Communication and the Modulation of Cardiac Neural Crest Cells. *Trends Cardiovasc. Med.* **1999**, *9*, 63–69. [CrossRef]
28. Van Rijen, H.V.M.; Eckardt, D.; Degen, J.; Theis, M.; Ott, T.; Willecke, K.; Jongsma, H.J.; Opthof, T.; de Bakker, J.M.T. Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43. *Circulation* **2004**, *109*, 1048–1055. [CrossRef]
29. Ewart, J.L.; Cohen, M.F.; Meyer, R.A.; Huang, G.Y.; Wessels, A.; Gourdie, R.G.; Chin, A.J.; Park, S.M.; Lazatin, B.O.; Villabon, S.; et al. Heart and neural tube defects in transgenic mice overexpressing the Cx43 gap junction gene. *Development* **1997**, *124*, 1281–1292. [CrossRef]
30. Madisen, L.; Zwingman, T.A.; Sunkin, S.M.; Oh, S.W.; Zariwala, H.A.; Gu, H.; Ng, L.L.; Palmiter, R.D.; Hawrylycz, M.J.; Jones, A.R.; et al. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 133–140. [CrossRef]
31. Zufferey, R.; Donello, J.E.; Trono, D.; Hope, T.J. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* **1999**, *73*, 2886–2892. [CrossRef]
32. George, S.H.L.; Gertsenstein, M.; Vintersten, K.; Korets-Smith, E.; Murphy, J.; Stevens, M.E.; Haigh, J.J.; Nagy, A. Developmental and adult phenotyping directly from mutant embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 4455–4460. [CrossRef] [PubMed]
33. Boheler, K.R.; Czyz, J.; Tweedie, D.; Yang, H.-T.; Anisimov, S.V.; Wobus, A.M. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ. Res.* **2002**, *91*, 189–201. [CrossRef] [PubMed]
34. Kimura, K.; Ooms, A.; Graf-Riesen, K.; Kuppasamy, M.; Unger, A.; Schuld, J.; Daerr, J.; Lothar, A.; Geisen, C.; Hein, L.; et al. Overexpression of human BAG3P209L in mice causes restrictive cardiomyopathy. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1–17. [CrossRef] [PubMed]
35. Raulf, A.; Voeltz, N.; Korzus, D.; Fleischmann, B.K.; Hesse, M. Visualization of Cell Cycle Variations and Determination of Nucleation in Postnatal Cardiomyocytes. *J. Vis. Exp.* **2017**, *120*, e55204. [CrossRef] [PubMed]
36. Soriano, P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* **1999**, *21*, 70–71. [CrossRef] [PubMed]
37. Roell, W.; Klein, A.M.; Breitbach, M.; Becker, T.S.; Parikh, A.; Lee, J.; Zimmermann, K.; Reining, S.; Gabris, B.; Ottersbach, A.; et al. Overexpression of Cx43 in cells of the myocardial scar: Correction of post-infarct arrhythmias through heterotypic cell-cell coupling. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–14. [CrossRef] [PubMed]
38. Wilgenbus, K.K.; Kirkpatrick, C.J.; Knuechel, R.; Willecke, K.; Traub, O. Expression of Cx26, Cx32 and Cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. *Int. J. Cancer* **1992**, *51*, 522–529. [CrossRef]

39. Makowka, P.; Bruegmann, T.; Dusend, V.; Malan, D.; Beiert, T.; Hesse, M.; Fleischmann, B.K.; Sasse, P. Optogenetic stimulation of Gs-signaling in the heart with high spatio-temporal precision. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–9. [[CrossRef](#)]
40. Hesse, M.; Raulf, A.; Pilz, G.-A.; Haberlandt, C.; Klein, A.M.; Jabs, R.; Zaehres, H.; Fügemann, C.J.; Zimmermann, K.; Trebicka, J.; et al. Direct visualization of cell division using high-resolution imaging of M-phase of the cell cycle. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1–12. [[CrossRef](#)]
41. Biankin, S.A.; Collector, M.I.; Biankin, A.V.; Brown, L.J.; Kleeberger, W.; Devereux, W.L.; Zahnow, C.A.; Baylin, S.B.; Watkins, D.N.; Sharkis, S.J.; et al. A histological survey of green fluorescent protein expression in ‘green’ mice: Implications for stem cell research. *Pathology* **2007**, *39*, 247–251. [[CrossRef](#)]
42. Friedrich, G.; Soriano, P. Promoter traps in embryonic stem cells: A genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev.* **1991**, *5*, 1513–1523. [[CrossRef](#)]
43. Contreras, J.E.; Sáez, J.C.; Bukauskas, F.F.; Bennett, M.V.L. Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 11388–11393. [[CrossRef](#)]
44. Brokamp, C.; Todd, J.; Montemagno, C.; Wendell, D. Electrophysiology of single and aggregate Cx43 hemichannels. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47775. [[CrossRef](#)]
45. Li, C.; Samulski, R.J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2020**, *21*, 255–272. [[CrossRef](#)]
46. Zhu, Y.; Do, V.D.; Richards, A.M.; Foo, R. What we know about cardiomyocyte dedifferentiation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2021**, *152*, 80–91. [[CrossRef](#)]
47. Ya, J.; Erdtsieck-Ernste, E.B.; de Boer, P.A.; van Kempen, M.J.; Jongasma, H.; Gros, D.; Moorman, A.F.; Lamers, W.H. Heart Defects in Connexin43-Deficient Mice // Heart defects in connexin43-deficient mice. *Circ. Res.* **1998**, *82*, 360–366. [[CrossRef](#)]
48. Kim, J.H.; Lee, S.-R.; Li, L.-H.; Park, H.-J.; Park, J.-H.; Lee, K.Y.; Kim, M.-K.; Shin, B.A.; Choi, S.-Y. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e18556. [[CrossRef](#)]
49. Mizuguchi, H.; Xu, Z.; Ishii-Watabe, A.; Uchida, E.; Hayakawa, T. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol. Ther.* **2000**, *1*, 376–382. [[CrossRef](#)]
50. Bukauskas, F.F.; Jordan, K.; Bukauskiene, A.; Bennett, M.V.; Lampe, P.D.; Laird, D.W.; Verselis, V.K. Clustering of connexin 43-enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 2556–2561. [[CrossRef](#)]
51. Hunter, A.W.; Jourdan, J.; Gourdie, R.G. Fusion of GFP to the carboxyl terminus of connexin43 increases gap junction size in HeLa cells. *Cell Commun. Adhes.* **2003**, *10*, 211–214. [[CrossRef](#)]
52. Hunter, A.W.; Barker, R.J.; Zhu, C.; Gourdie, R.G. Zonula occludens-1 alters connexin43 gap junction size and organization by influencing channel accretion. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 5686–5698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Rhatt, J.M.; Jourdan, J.; Gourdie, R.G. Connexin 43 connexon to gap junction transition is regulated by zonula occludens-1. *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 1516–1528. [[CrossRef](#)]
54. Musil, L.S.; Goodenough, D.A. Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J. Cell Biol.* **1991**, *115*, 1357–1374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Solan, J.L.; Lampe, P.D. Src Regulation of Cx43 Phosphorylation and Gap Junction Turnover. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Giacomelli, E.; Meraviglia, V.; Camprostrini, G.; Cochrane, A.; Cao, X.; van Helden, R.W.J.; Krotenberg Garcia, A.; Mircea, M.; Kostidis, S.; Davis, R.P.; et al. Human-iPSC-Derived Cardiac Stromal Cells Enhance Maturation in 3D Cardiac Microtissues and Reveal Non-cardiomyocyte Contributions to Heart Disease. *Cell Stem Cell* **2020**, *26*, 862–879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Roell, W.; Lewalter, T.; Sasse, P.; Tallini, Y.N.; Choi, B.-R.; Breitbach, M.; Doran, R.; Becher, U.M.; Hwang, S.-M.; Bostani, T.; et al. Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature* **2007**, *450*, 819–824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Binder, D.K.; Steinhäuser, C. Astrocytes and Epilepsy. *Neurochem. Res.* **2021**, *46*, 2687–2695. [[CrossRef](#)]