

**Charakterisierung und Funktionsanalyse
von Mensch-Connexin31- und Maus-Connexin45-Mutanten
und die Wirkung auf ihren Wildtyp**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Seong-won Nam

aus

Seoul, Korea

Bonn, September 2003

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



1. Referent: Herr PD Dr. Otto Traub
2. Referent: Herr Prof. Dr. Klaus Willecke

Tag der Promotion: _____

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Otto Traub bedanken. Durch seine Unterstützung, Hilfsbereitschaft, Beratung und Diskussionen hat er die Durchführung dieser Arbeit experimentell und wissenschaftlich betreut.

Herrn Prof. Dr. K. Willecke danke ich für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Dr. Simone Diestel danke ich für die experimentelle Unterstützung, ihre Diskussionsbereitschaft und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Für die freundliche Arbeits- und Laboratmosphäre danke ich allen Mitarbeitern an dem Institut für Genetik der Universität Bonn.

Unseren Eltern und Meiner Frau Mi-Young danke ich, dass Sie mir das Studium der Biologie ermöglichten und mich jederzeit unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1 Aufbau und Funktion von Gap Junction-Kanälen	3
1.2 Genfamilie und Topologie des Connexinproteins	6
1.3 Bildung und Abbau von Gap Junction-Kanälen	9
1.4 Posttranslationale Modifikationen der Connexine	10
1.5 Permeabilität und Modell des Öffnung- und Schließ-Mechanismus von Gap Junction-Kanälen	13
1.6 Die Vielfältigkeit der Gap Junction-Kanäle und ihre dominanten Effekte	14
1.7 Connexinexpression in der Haut und in dem Herz	16
1.8 Durch Connexindefekte verursachte Erbkrankheiten	18
1.8.1 Mutationen im menschlichen Cx31-Gen	19
1.8.2 Mutationen in Maus Cx45 und „Knock-out“ Modell	20
1.9 Ziele dieser Arbeit	21
2. Material	23
2.1 Chemikalien	23
2.2 Einwegartikel	23
2.3 Lösungen und Puffer	23
2.4 Oligonukleotide	29
2.5 Plasmide	30
2.6 Verwendete Größenstandards	32
2.7 Bakterienstamm	32
2.8 Verwendete Zelllinien	32
2.9 Antikörper	33
3. Methoden	34
3.1 DNS-Präparation	34
3.2 DNS <i>in vitro</i> Rekombination	35
3.3 RNS-Präparation	38
3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
3.5 Anwendungen der Polymerasekettenreaktion	38
3.5.1 Einführung der Schnittstellen mittels der PCR-Fragmente	38
3.5.2 Semiquantitative Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	39
3.6 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	41

3.7 Kultur und Transfektion von Kulturzellen	41
3.8 Nachweis von Proteinen	43
3.8.1 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse	43
3.8.2 Herstellung von Zelllysaten	44
3.8.3 Subzelluläre Fraktionierung von Zellen	44
3.8.4 Proteinbestimmung	45
3.8.5 Metabolische Markierung von Proteinen	45
3.8.5.1 Markierung mit ³⁵ S-Methionin	45
3.8.5.2 Markierung mit ³⁵ S-Methionin für Pulse-Chase-Experimente	46
3.8.6 Immunpräzipitation	46
3.8.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
3.8.8 Immunoblot-Analyse	48
3.9 Mikroinjektion	49
3.9.1 Mikroinjektion von Neurobiotin	49
3.9.2 Mikroinjektion von Lucifer Yellow	50
3.9.3 DiI/Calcein-Kopplung	50
4. Ergebnisse	51
4.1 Herstellung und Charakterisierung der Doppeltransfektanten von menschlichem Cx31 und seinen Mutanten	51
4.1.1 Herstellung der Doppeltransfektanten von menschlichem Cx31 und ihren Mutanten	52
4.1.1.1 Umklonierung der Cx31G12R-, Cx31C86S-cDNS in den Expressionsvektor pcDNA3.1zeo und Transfektion in HeLa hCx31-Zellen	52
4.1.1.2 Herstellung des Fusionsproteins hCx31-eGFP und der Doppeltransfektante	53
4.1.2 Charakterisierung der Doppeltransfektanten	54
4.1.2.1 Charakterisierung der Doppeltransfektanten auf Transkriptebene	54
4.1.2.2 Charakterisierung der Doppeltransfektanten auf Proteinebene	56
4.1.2.3 Lokalisierung der Connexine in den Doppeltransfektanten	58
4.1.2.4 Funktionsanalyse der Connexine in den Doppeltransfektanten	61
4.1.3 Interaktion zwischen den Connexinen	66
4.1.3.1 Nachweis der heteromeren Kanäle in Doppeltransfektanten	66
4.1.3.2 Kompensation des mutierten Cx31 durch Cx43 Wildtyp	69
4.2 Herstellung und Charakterisierung der Doppeltransfektante von Maus Cx45 und seiner Deletionsmutante C122	74

4.2.1 Herstellung der Doppeltransfektante von Maus Cx45 und seiner Deletionsmutante C122	75
4.2.2 Charakterisierung der Doppeltransfektanten	76
4.2.2.1 Expression der Connexine in Doppeltransfektanten	76
4.2.2.2 Lokalisierung der Connexine in Doppeltransfektanten	78
4.2.2.3 Funktionsanalyse der Connexine in Doppeltransfektanten	86
4.2.2.4 Halbwertszeit	89
5. Diskussion	92
5.1 Mutanten von hCx31 und dominante Effekte.....	92
5.2 Mutationen des menschlichen Cx31-Gens und Hautkrankheit <i>Erythrokeratodermia variabilis</i>	95
5.3 Deletionsmutante C122 von mCx45 und dominante Effekte.....	97
5.4 Die Rolle der Carboxy-terminalen Domäne des Cx45 für den Membrantransport	100
6. Ausblick	102
7. Zusammenfassung	104
8. Literaturverzeichnis	106
9. Anhang	121

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	mg	Milligramm
Abb.	Abbildung	ml	Milliliter
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser	mM	Millimolar
abs.	absolut	min	Minuten
Ac	Acetat	MOPS	3-(N-Morpholino) Propansulfonsäure
ad	addieren	mRNS	Boten-RNS
Amp	Ampicillin (Resistenzgen)	N	Normalität
APS	Ammoniumpersulfat	nA	Nanoampere
AS	Aminosäure	ng	Nanogramm
ATP	Adenosintriphosphat	nm	Nanometer
bp	Basenpaare	n.b.	nicht bestimmmt
BSA	Rinderserumalbumin	Neurobiotin	N-(2-aminoethyl)-biotinamid
Bq	Becquerel, Einheit der Radioaktivität	OD _x	optische Dichte bei Wellenlänge x in nm
C	Cytosin	p	Plasmid
CL	Zytoplasmatische Schleife	pM	Pikomolar
cm	Zentimeter	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
CMV	Cytomegalovirus	PCR	Polymerasekettenreaktion
cpm	Zerfälle pro Minute	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
CT	Carboxy-Ende eines Peptids	RNase	Ribonuklease
CTP	Cytosintriphosphat	RNS	Ribonukleinsäure
Cx	Connexin	rRNS	Ribosomale RNS
cDNS	kopierte Desoxyribonukleinsäure	RT	Raumtemperatur
Da	Dalton	s	Sekunden
DAB	Diaminobenzidin	SDS	Natriumdodecylsulfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	SSC	Trinatriumcitrat
DMPC	Dimethylpyrocarbonat	Std.	Stunde
DMSO	Dimethylsulfoxid	SV40	Simian Virus 40
DNase	Desoxyribonuklease	T	Thymin
DNS	Desoxyribonukleinsäure	Tab.	Tabelle
dNTP	2'-desoxy-Nukleosid-5'- Triphosphat	TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
DT	Doppeltransfektante	TE	Tris-EDTA Puffer
DTT	Dithiothreitol	TEA	Triethanolamin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TRIS	TRIS-(hydroxymethyl)- aminomethan
EtBr	Ethidiumbromid	tRNS	Transfer-RNS
EtOH	Ethanol	U	Enzymeinheit (Unit)
FCS	fötale Kälberserum	ÜN	über Nacht
G	Guanin	UpM	Umdrehungen pro Minute
GTP	Guanosintriphosphat	UV	Ultraviolett
°C	Grad Celsius	V	Volt
g	Gramm	Vol.	Volumen
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat	WT	Wildtyp
IF	Immunfluoreszenz	v/v	Volumen pro Volumen
kb	Kilobasenpaare (1000 bp)	w/v	Gewicht pro Volumen
kDa	Kilodalton (1000 Da)		
Konz.	Konzentration		
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium		
Lsg.	Lösung		
l	Liter		
M	Molar		
MCS	Vielfachklonierungsstelle		
MG (MW)	Molekulargewicht		
µg	Mikrogramm		
µl	Mikroliter		
mA	Milliampere		

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Strukturmodell von Gap Junction-Kanälen in einem Gap-Junction-Plaquer	4
Abb. 1-2: Aufbau eines Connexin-Proteins und Topologie in der Zellmembran	8
Abb. 1-3: Strukturelle Vielfalt von Gap Junction-Kanälen.....	15
Abb. 1-4: Typische Symptome der Hautkrankheit, <i>Erythrokeratoderma variabilis</i>	19
Abb. 4-1: Darstellung des Cx31-Proteins und der Positionen der hier untersuchten Mutationen	51
Abb. 4-2: Semiquantitative PCR-Analyse der positiven hCx31/G12R Doppeltransfektanten.	54
Abb. 4-3: Semiquantitative PCR-Analyse der positiven hCx31/C86S Doppeltransfektanten.	55
Abb. 4-4: Autoradiogramm der Immunoblot-Analyse von den Doppeltransfektanten HeLa hCx31/G12R	56
Abb. 4-5 : Graphische Darstellung der Proteinmenge nach der western Blot-Analyse	56
Abb. 4-6: Autoradiogramm der Immunoblot-Analyse von den Doppeltransfektanten HeLa hCx31/C86S	57
Abb. 4-7: Graphische Darstellung der Proteinmenge nach der western Blot-Analyse	58
Abb. 4-8: Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse der Doppeltransfektanten	59
Abb. 4-9: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Lucifer Yellow-Diffusion in Doppeltransfektanten nach Mikroinjektion	62
Abb. 4-10: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Neurobiotin-Diffusion in Doppeltransfektanten nach Mikroinjektion	63
Abb. 4-11: Ergebnisse der Mikroinjektion in Doppeltransfektanten	64
Abb. 4-12: HeLa hCx31eGFP Klon21 unter dem Lichtmikroskop bei UV-Licht	66
Abb. 4-13: Immunfluoreszenz-Analyse von HeLa hCx31eGFP/G12R Klon26	67
Abb. 4-14: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Lucifer Yellow-Diffusion in Doppeltransfektanten nach Mikroinjektion	69
Abb. 4-15: Semiquantitative PCR-Analyse der positiven rCx43/G12R Doppeltransfektanten	69
Abb. 4-16: Immunopräzipitation-Analyse von HeLa rCx43/G12R Transfektanten	70
Abb. 4-19: Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse der Doppeltransfektanten	71
Abb.4- 20: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Lucifer Yellow und Neurobiotin-Diffusion in Doppeltransfektanten nach Mikroinjektion	72
Abb. 4-21: Darstellung des Cx45-Proteins und der Deletionsmutante C122	74
Abb. 4-22: Autoradiogramm der Immunoblot-Analyse von Cx45, C122 und Doppeltransfektanten	77
Abb. 4-23: Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse der Doppeltransfektanten	80
Abb. 4-24: Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse der Doppeltransfektanten	81
Abb. 4-25: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Lucifer Yellow und Neurobiotin-Diffusion in Doppeltransfektanten nach Mikroinjektion	87

Abb. 4-26: Halbwertszeit-Bestimmung von HeLa Cx45, C122 und Doppeltransfektanten	90
Abb. 5-1: Atomresolutionkomputer-Model des Rückgrats von Aminoterminus und 1.transmembraner Domäne des Cx32	94
Abb. 5-2: Korrelation der Kopplung der LY und NB mit den relativen Mengen von G12R in Doppeltransfektante HeLa rCx43/G12R	95
Abb. 5-3: Korrelation der Kopplung der LY und NB und quantitativen IF-Signalmengen mit den relativen Mengen von C122 in Doppeltransfektant HeLa mCx45/C122	98

Tabellenverzeichnis

Tab.1-1: Bisher isolierte Mensch- und Maus-Connexine und Beispiele für ihre Expressionsorte	7
Tab. 1-2: Connexinexpression in der Haut	16
Tab. 1-3: Im Cx31-Gen gefundene Mutationen mit den dazugehörigen Phänotypen	19
Tab. 4-1: Mikroinjektionsanalysen der verschiedenen Doppeltransfektanten	62
Tab. 4-2: Mikroinjektionsanalysen der HeLa rCx43/G12R Doppeltransfektanten	72
Tab. 4-3: Zusammenfassung der Ergebnisse der HeLa hCx31 Doppeltransfektanten	73
Tab. 4-4: Auswertung der relativen Protein-Mengen aus dem Autoradiogramm	78
Tab. 4-5: Quantifizierung der Immunfluoreszenz-Signale von Cx45, C122 und Doppeltransfektanten	85
Tab. 4-6: Mikroinjektionsanalysen der verschiedenen Doppeltransfektanten	87
Tab. 4-7: Kopplungsanalyse von Calcein der verschiedenen Doppeltransfektanten	88
Tab. 4-8: Zusammenfassung der Ergebnisse der HeLa Cx45, C122 und Doppeltransfektanten	91

1. Einleitung

Im Verlauf der Evolution wurden aus einzelnen Zellen mehrzellige Organismen entwickelt, die einerseits große Vorteile beim Nahrungserwerb und bei der Anpassung an neue Lebensräume verschafften, andererseits mussten große Probleme bei dem Zusammenwirken der Zellen bewältigt werden. Deshalb weisen alle Vielzeller zwei wesentliche Kennzeichen auf: Spezialisierung und Kooperierung der Zellen. Um diesen neuen Anforderungen gerecht zu werden, sind während der Evolution die Zellverbindungen („Junctions“) entstanden. Die Zellverbindungen werden nach ihrer Funktion in drei Klassen eingeteilt;

1. undurchlässige Verbindungen – Tight Junctions
2. Haftverbindungen – Adhäsionsverbindungen, Desmosomen
3. kommunizierende Verbindungen – Gap Junctions, chemischen Synapsen

Bei diesen verschiedenen Zellverbindungen stellen die Gap Junctions eine der häufigsten Zellverbindungen dar, die nicht nur bei der Koordination des Nervensystems, sondern auch bei anderen Geweben und während der Embryogenese eine unabdingbare Rolle spielen.

1.1 Aufbau und Funktion von Gap Junction-Kanälen

Es ist schon lange bekannt, dass die Zellen der mehrzelligen Organismen mit den Nachbarzellen direkt und indirekt interagieren und zwischen ihnen ein Stoffaustausch stattfindet. Am Anfang konnte nur bei Herzmuskelzellen (Weidmann, 1952, 1966; Barr et al., 1965) und Neuronen (Furshpan und Potter, 1959, 1968; Robertson, 1963) elektrische Kopplung durch Ionendurchfluß zwischen den Zellen nachgewiesen werden. Später wurden der Austausch größerer Metabolite (Subak-Sharpe et al. 1966, 1969) und von Farbstoffen (Loewenstein et al., 1965) auch in nicht erregbaren Zellen beobachtet. Die für elektrische Kopplung verantwortliche Strukturen wurden erstmals elektronenmikroskopisch als Verengung des interzellulären Spalts mit einer 2 -3 nm engen Kluft zwischen den Membranen (engl.; gap) als lokale, plaqueähnliche Region nachgewiesen (Revel und Karnovsky, 1967). Anschließend wurden durch

Gefrierbruchtechniken innere Membranstrukturen von Gap Junction-Plaques gezeigt (Chalcroft und Bullivant, 1970; Goodenough und Revel, 1970). Diese elektronenmikroskopischen Ergebnisse führten zu dem heute noch im wesentlichen gültigen Modell der Gap Junctions (Abb.1-1). Gap Junctions sind Ansammlungen von Transmembrankanälen, die die Zytoplasmen der benachbarten Zellen direkt verbinden. Dabei stellt jede Zelle jeweils Halbkanäle (Connexone) zur Verfügung, die aneinander andocken, und zusammen einen kompletten Kanal bilden. Ein Connexon hat einen Außendurchmesser von ca. 7-8 nm und ragt 1 nm über die Zellmembran in den Interzellularraum hinaus (Simpson et al., 1977). Jeder Halbkanal besteht aus sechs Membranprotein Untereinheiten, den Connexinen. Die Connexine sind konzentrisch angeordnet und bilden als Hexamer in Form einer Rosette das Connexon (Goodenough, 1976). Im geöffneten Zustand beträgt der Durchmesser eines Gap Junction-Kanals 1 bis 1,5 nm (Casper et al., 1977; Makowski et al., 1977; Loewenstein, 1981)(Abb.1-1).

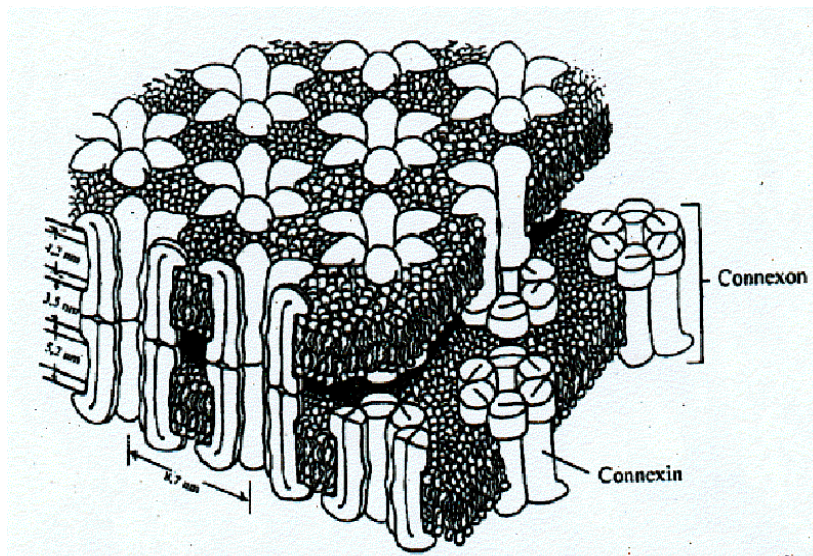


Abb. 1-1 Struktur-Modell von Gap Junction-Kanälen (Makowski et al., 1977, modifiziert)

Kürzlich veröffentlichte Studien über 3D-Strukturen der Gap Junction-Kanäle aus Connexin43 zeigen, dass sie einen Außendurchmesser von 6-7 nm und Öffnungsdurchmesser von ca. 4 nm haben (Unger et al., 1999). Die zentrale Pore verengt sich in der Nähe des Membranaustritts des Connexons in den extrazellulären Spalt auf 1-1,5 nm, und weitet sich dann wieder im Kontaktbereich der Halbkanäle zu

ca. 2 nm. Die Länge eines Halbkanals beträgt 8,5-12,5 nm, der zu 1,5-6 nm in das Zytoplasma und zu 1,5-2 nm in den extrazellulären Raum hineinragen(s. Abb.1-2). Es wurde weiterhin gezeigt, dass die Connexinuntereinheiten der beiden Connexone nicht direkt aufeinander liegen, sondern die Halbkanäle jeweils um 30° gedreht zueinander ausgerichtet sind, so dass eine Connexinuntereinheit jeweils mit zwei gegenüberliegenden Untereinheiten interagiert (Perkins et al., 1997; Yeager & Nicholson, 1996).

In den früheren Studien wurde gezeigt, dass die Gap Junction ähnliche Strukturen in unterschiedlichen Geweben von fast allen mehrzelligen Tieren, von Ciliaten bis zum Menschen, zu finden waren (Loewenstein, 1967; Friend und Gilula, 1972; Flower, 1977). Damit wurde deutlich, dass die Gap Junction-Kanäle eine Voraussetzung für die Mehrzelligkeit des Organisms sind. Gap Junction-Kanäle sind nicht nur für Ionen, sondern auch für größere Moleküle mit einem Molekulargewicht von bis zu ca. 1000 Dalton durchlässig, damit der Austausch von Aminosäuren, Zuckern und Nukleotiden, sowie sekundären Botenstoffen wie cAMP, IP₃ oder Ca²⁺-Ionen (Sáez et al., 1989; Niessen et al., 2000) zwischen den Zellen ermöglicht wird. Aufgrund dieser Fähigkeit spielen Gap Junctions eine wichtige Rolle zur Homöostase in Geweben und erfüllen damit vielfältige physiologische Aufgaben. In elektrischen Synapsen von Neuronen werden die elektrischen Signale von Gap Junctions übertragen (Bennet, 1997), so dass sie die schnelle Weiterleitung elektrischer Signale im Herzmuskel und damit die koordinierte Herzkontraktion ermöglichen (Gros & Jongsma, 1996). Im peripheren Nervensystem wird der Austausch von Nährstoffen zwischen den Myelinscheideschichten einer Schwannschen Zelle nur durch Gap Junctions vermittelt. Während Gap Junctions dem Nährstoffaustausch zwischen peripheren Zellen und dem unterversorgten Zentrum in schwach durchbluteten Geweben wie der Linse oder dem Knorpel dienen (Goodenough, 1992), helfen sie in Drüsen wie dem Pankreas bei der Koordination von Zellen bei der Sekretion (Ngezahayo & Kolb, 1994). Gap Junctions spielen ebenfalls eine wichtige Rolle während der Embryogenese. Schon früh wurden ionische und Farbstoff-Kopplung im Embryo festgestellt. Andererseits werden im früheren Maus-Embryo keine ionische Kopplung zwischen den extraembryonalen Geweben und Embryo detektiert (Lo & Gilula, 1979; Kalimi & Lo, 1988). Die

Kopplung ist auf Embryo-Kompartimente begrenzt, um damit die regulierte Entwicklung des Embryos in verschiedenen Phänotypen zu gewährleisten. Außerdem wird den Gap Junctions eine Bedeutung bei der Wachstumskontrolle und damit auch in der Tumorgenese zugeschrieben (Lee et al., 1991; Trosko et al., 1993).

1.2 Genfamilie und Topologie des Connexinproteins

Gap Junction-Kanäle von Wirbeltieren sind in Form von Multimeren aus einen oder mehreren unterschiedlichen Proteinen der Connexin Multigenfamilie zusammengesetzt (Goodenough et al., 1996; Kumar and Gilula, 1996). Bis heute sind 19 verschiedene Connexine aus dem Maus-Genom und 20 Connexine aus dem menschlichen Genom beschrieben (Eiberger et al., 2001; Willecke et al., 2002). Nach der Homologie und Länge der zytoplasmatischen Schleife werden die Connexine in drei Gruppen unterteilt (α -, β -, γ - Connexine; s. Tab. 1-1).

Die Connexin-Gene kommen auf den verschiedenen Chromosomen verteilt vor, während vereinzelte Connexine wie Cx30.3, Cx31, Cx31.1, Cx37 und Cx57 auf dem Chromosom 4 vorkommen, wobei der funktionale Zusammenhang der Lokalisierung zur Zeit noch unklar ist. Neben der Diversität von Connexin-Sequenzen weisen die Connexingene eine ähnliche Struktur auf. Sie bestehen aus den vom Intron getrennten kurzen Exon1 und größeren Exon2, auf dem, die gesamte kodierende Region lokalisiert ist. Nur zwei Ausnahmen von dieser Struktur sind bekannt, das Cx36-Gen, bei dem Exon1 einen Teil der kodierenden Sequenz enthält und Cx45, das aus drei Exons besteht (Willecke et al., 2002).

Viele Connexine werden gewebespezifisch exprimiert, wobei die meisten Connexine in verschiedenen Geweben gleichzeitig exprimiert werden. Connexin43 kommt in fast allen Organen und Geweben vor, während Connexin46 und Connexin50 nur in der Augenlinse nachgewiesen wurden. In den meisten Geweben werden mehrere Connexine innerhalb eines Zelltyps exprimiert, wie z.B. in der Leber Cx26 und Cx32 (Nicholson et al., 1987; Traub et al., 1989). Aus Experimenten an transgenen Mäusen, bei denen einzelne Connexingene gezielt ausgeschaltet wurden, wurde festgestellt, dass der Verlust eines Connexins durch andere Connexine kompensiert werden kann.

Connexin		Gruppe	Masse (kDa)	Peptid- Länge	Maus-Chro- mosom	Gewebe
Maus	Mensch					
mCx26	hCx26	β 2	26,4	226	14	Cochlea,Haut,Leber,Plazenta
mCx29	hCx30.2	γ	28,9	258	5	Myelinisierte Zellen
mCx30	hCx30	β 6	30,4	261	14	Haut,Gehirn,Cochlea
mCx30.2	hCx31,9	β	30,2	278	-	
mCx30.3	hCx30.3	β 5	30,4	266	4	Haut
mCx31	hCx31	β 3	30,9	270	4	Haut,Plazenta
mCx31.1	hCx31.1	β 4	31,2	271	4	Haut
mCx32	hCx32	β 1	32,0	283	X	Leber,Schwannsche Zellen
mCx33	-	α 6	32,9	286	X	Hoden
mCx36	hCx36	α 9	36,1	321	2	Nervenzellen
mCx37	hCx37	α 4	37,6	333	4	Endothel
mCx39	hCx40.1	-	40,0	364	-	
mCx40	hCx40	α 5	40,4	358	3	Purkinje Fasern,Endothel
mCx43	hCx43	α 1	43,0	382	10	Arbeitsmyokard,Fibroblasten
mCx45	hCx45	γ	45,7	396	11	Myokard,Glatte Muskulatur, Nervenzellen
mCx46	hCx46	α 3	46,3	417	14	Linse
mCx47	hCx47	γ	46,6	437	11	Zentralnervensystem
mCx50	hCx50	α 8	49,6	441	3	Linse
mCx57	hCx62	α 10	57,1	550	4	Ovar

Tab. 1-1 Übersicht bisher identifizierter Connexine

hCx25 und hCx59 wurden noch identifiziert, die zu keiner orthologen Maus Connexinen zugeordnet wurden. Referenzen: Cx26 (Zhang & Nicholson,1989;Hennemann et al.,1992),Cx29 (Söhl et al.,2001),Cx30 (Dahl et al.,1996),Cx30.2(Harris,2001;Willecke et al.,2002),Cx30.3 (Hennemann et al.,1992),Cx31 (Hoh et al.,1991;Hennemann et al.,1992),Cx31.1 (Haefliger et al.,1992;Hennemann et al.,1992),Cx32 (Heynkes et al.,1986;Kumar & Gilula,1986;Paul,1986;Hennemann et al.,1992),Cx33 (Haefliger et al.,1992),Cx36 (Condorelli et al.,1998;Söhl et al.,1998),Cx37 (Willecke et al.,1991;Haefliger et al.,1992;Reed et al.,1993),Cx39 (Harris,2001;Willecke et al.,2002), Cx40 (Beyer et al.,1992;Haefliger et al.,1992;Hennemann et al.,1992; Jiang et al.,1994),Cx43 (Beyer et al.,1987;Fishman et al.,1990;Gimlich et al.,1990;Musil et al.,1990;Beyer & Steinberg,1991;Laing et al.,1991;Nishi et al.,1991;Hennemann et al.,1992),Cx45 (Beyer,1990;Hennemann et al.,1992;Jiang et al.,1994),Cx46 (Paul et al.,1991),Cx47 (Teubner et al.,2001),Cx50 (White et al.,1992;Church et al.,1995),Cx57 (Manthey et al.,1999)

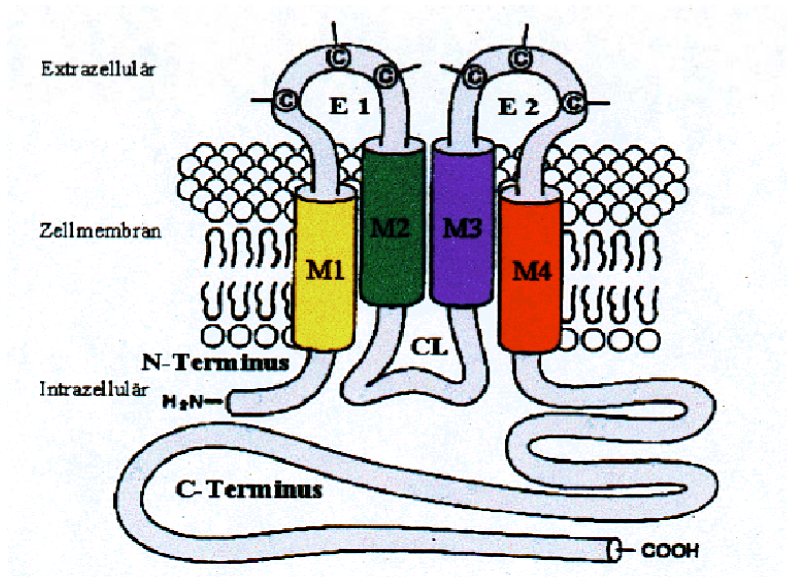


Abb.1-2 Topologiemodell der Connexin-Untereinheiten.

M1 bis M4 kennzeichnen die vier Transmembranregionen, E1 und E2 die extrazellulären Schleifen, C den Carboxy-Terminus und N den Aminoterminus (Kumar, 1996).

Anhand der Sequenzanalyse und bindungsspezifischen Antikörpern wurde schon früh angenommen, dass die Connexine eine helikale Strukturen besitzen, die als Transmembrandomäne vorkommt (Zimmer et al., 1987; Yancy et al., 1989; Zhang & Nicholson, 1994). Diese vier Transmembrandomänen werden durch zwei extrazelluläre und eine intrazelluläre Schleife verbunden. N- und C-Terminus sind auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert(s. Abb. 1-2). Dieses Topologiemodell der Connexine wurde durch die hochauflösende Struktur-Untersuchung bestätigt (Yeager & Nicholson, 1996; Unger et al., 1999). Die Aminosäuresequenzen der vier Transmembranbereiche und der extrazellulären Schleifen sind zwischen verschiedenen Connexinen hoch konserviert, während die zytoplasmatische Schleife und die carboxyterminale Region große Variabilität der Sequenzen aufweisen. In der dritten Transmembrandomäne weist jede vierte Aminosäure einen Aminosäurerest mit polarer Seitenkette auf, was ihr einen amphiphatischen Charakter verleiht. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die dritte Transmembrandomäne an der Bildung einer hydrophilen Kanalpore beteiligt sein könnte. Durch Austausch der konservierten Cysteinreste wurde die Struktur der extrazellulären Schleifen aufgeklärt (Rahmen & Evans, 1991; Foote et al., 1998). Bei

allen Connexinen finden sich in beiden extrazellulären Schleifen jeweils drei Cysteinreste, die miteinander Disulfidbrücken bilden. Die dadurch erreichte Stabilisierung der Tertiärstruktur ermöglicht das Aneinanderdocken zweier Connexine.

1.3 Bildung und Abbau von Gap Junction-Kanälen

Connexine werden nicht als Monomere zur Plasmamembran transportiert, sondern sie werden vor dem Transport als Hexamere oligomerisiert (Musil et al., 1993). Unter Verwendung von Inhibitoren des Proteintransports wurde untersucht, wo die Oligomerisierung stattfindet. Nach der Synthese werden Connexine durch das endoplasmatische Reticulum und den Golgi-Apparat transportiert und lagern sich im trans-Golgi-Netzwerk zu Halbkanälen zusammen. Andere Untersuchungen haben dagegen gezeigt, dass Connexine schon im endoplasmatischen Reticulum oligomerisiert werden können (Kumar et al., 1995; Falk et al., 1997). Neuere Studien deuten darauf hin, dass die Oligomerisierung von Connexinen im ER beginnt und im trans-Golgi-Netzwerk beendet wird (Diez et al., 1999; George et al., 1999). Im trans-Golgi-Kompartiment werden die Connexone in Transportvesikel verpackt und zur Zellmembran transportiert. Die einzige Ausnahme ist Connexin26, das mit einem alternativen Weg vom ER über die Mikrotubuli direkt zur Zellmembran geführt wird (Evans & Martin, 2002). Die Connexone werden durch Vesikelfusion in die Zellmembran eingebracht und bilden dort einen Pool von frei diffundierenden Halbkanälen, die in einen Gap Junction-Plaques einwandern und mit einem gegenüberliegenden Halbkanal zu einem kompletten Gap Junction-Kanal docken können.

Gap Junction-Plaques sind sehr dynamische Strukturen, die ständig einem dynamischen Umbau unterliegen, wobei die Kanäle und Connexine über Vesikel aus den Plaques entnommen und dem Abbau zugeführt werden (Laird et al., 1995).

Während die Halbwertszeit von Cx43 in Cardiomyozyten- und Nieren-Zellen der Ratte 1-2,5 Stunden bestimmt wurde (Musil et al., 1990; Laird et al., 1991), betragen die Halbwertszeiten von Cx32 und Cx26 in kultivierten Maus Hepatozyten 1,3 bis 3 Stunden (Traub et al., 1987; Traub et al., 1989). Als Abbauweg wurde sowohl ein proteasomaler als auch ein lysosomaler Abbau beschrieben. Die Beteiligung des Lysosoms bei der

Degradation von Connexinen wurde in verschiedenen Zelltypen gezeigt (Ginzberg & Gilula, 1979; Larsen et al., 1979; Vaughan & Lasater, 1990). Andererseits wurde festgestellt, dass chemische Inhibitoren des Proteasoms Cx43 in der Zelle akkumulieren lassen und die Halbwertszeit von Cx43 in Gewebekulturzellen verlängern (Laing & Beyer, 1995). Laing und Mitarbeiter konnten weiterhin zeigen, dass die Degradation von Cx43 in CHO-Zellen durch das thermolabile ubiquitin-aktivierende Enzym beeinträchtigt wird. Womit die Hypothese aufgestellt wurde, dass der Abbauweg von Cx43 Ubiquitin-abhängig ist. Eine neuere Studie zeigte, dass die Degradation des Cx43-Proteins in verschiedenen Zelltypen durch Proteasomen-Inhibitoren reduziert werden kann (Musil et al., 2000).

Bei der Degradation von Connexinen scheint die Phosphorylierung eine Rolle zu spielen. Es wurde festgestellt, dass Mutanten von Cx45 und Cx31, bei denen gezielt phosphorylierbare Serinreste ausgetauscht worden waren, schneller abgebaut werden als das Wildtyp-Protein (Hertlein et al., 1998; Diestel, 2001).

1.4 Posttranslationale Modifikationen der Connexine

Schon früher wurde berichtet, dass Connexin32 in primären Hepatocyten der Maus phosphoryliert ist (Traub et al., 1987,1989; Takeda et al., 1987,1989). Nachdem die Connexingene nach und nach kloniert und sequenziert wurden, wurde spekuliert, dass alle Connexine Phosphoproteine seien. Aber alle Versuche, phosphoryliertes Connexin26 aus den Hepatozyten zu isolieren, schlugen fehl (Traub et al., 1989; Saez et al., 1990). Phosphoryliertes Connexin43 wurde als Protein in verschiedenen Geweben, wie in Fibroblasten der Wühlmaus (Crow et al., 1990), in der Linse von Hühnern (Musil et al., 1990; Laird & Revel, 1990) und anderen Zellen (Musil et al., 1990; Brissette et al., 1991; Musil & Goodenough, 1991; Oh et al., 1991; Berthoud et al., 1992, 1993) identifiziert, wobei phosphoryliertes Cx43 durch die Verschiebung des Molekulargewichts auf dem SDS-Polyacrylamidgel deutlich zu erkennen war. Dieses Phänomen wurde für Cx32 (Saez et al., 1986; Traub et al., 1987; Takeda et al., 1989), Cx46 (Jiang et al., 1993), oder Cx45 (Liang et al., 1994) nicht beobachtet. Der Grund der molekularen Verschiebung ist noch ungeklärt, möglicherweise beruht sich auf einer Konformationsänderung des phosphorylierten Cx43.

An der Phosphorylierung der verschiedenen Connexine sind unterschiedliche Proteinkinasen beteiligt. Cx32 kann von der cAMP-abhängigen Proteinkinase an der Sequenz $^{230}\text{Lys-Arg-Gly-}^{233}\text{Ser}$ in C-terminus phosphoryliert werden (Saez et al., 1990). In Hepatozyten der Ratte stimulierte Norepinephrin, ein indirekter Aktivator von Proteinkinase C die Phosphorylierung des Cx32, während Staurosporin, ein Proteinkinase C-Inhibitor diesen stimulierenden Effekt inhibierte (Takeda et al., 1989). Weiterhin wurde festgestellt, dass das aus Leber isolierte Cx32 von der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (Saez et al., 1990) oder von Epidermis-Wachstumsfaktorrezeptor, Tyrosinkinase (Diez et al., 1995) phosphoryliert werden kann. Maus Cx50 war das zweite Gap Junction-Protein, welches sich *in vitro* von cAMP-abhängigen Proteinkinasen phosphorylieren lässt (Vooter & Kistler, 1989). Zusätzlich kann Cx50 in Linsenfaser Zellen auch von der cAMP-unabhängigen, Ca^{2+} -unabhängigen, aber Mg^{2+} -abhängigen Linsenfaser-Proteinkinase phosphoryliert werden (Arneson et al., 1995). Eine erhöhte Phosphorylierung des Cx43-Proteins wurde nach der Behandlung mit TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-Acetat), einem Aktivator der PKC, in unterschiedlichen Zelltypen beobachtet (Brissette et al., 1991; Oh et al., 1991; Berthoud et al., 1992, 1993; Saez et al., 1993; Laing et al., 1994; Lampe et al., 1994). In diesen Zellen war die unphosphorylierte Isoform von Cx43 dominant und es wurde nur durch die Aktivierung der Proteinkinase C phosphoryliert. Die Konsensussequenz der Proteinkinase C wurde auf den Serinresten 368 und 372 lokalisiert (Sáez et al., 1993). Außerdem wurde gezeigt, dass der Epidermale Wachstumsfaktor die Phosphorylierung des Cx43 an den Serinresten erhöht (Lau et al., 1992). Diese erhöhte Phosphorylierung war unabhängig von der TPA-sensitiven Proteinkinase C, jedoch in diesem Fall wurde Cx43 durch eine Mitogen-Aktivierungsprotein(MAP)-Kinase an den Positionen der Serinreste Ser^{279} und Ser^{282} phosphoryliert, wodurch die Kommunikation über Gap junctions gehemmt wurde (Warn-Cramer et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass außer der Proteinkinase C und MAP-Kinase Cx43 von p34^{cdc2} -Kinase phosphoryliert wird, die in Kontrolle des Zellzyklus involviert ist (Lampe et al., 1996; Sáez et al., 1997). Schließlich wurde festgestellt, dass das virale Onkogen-Protein, $\text{pp60}^{\text{v-src}}$ die Phosphorylierung des Cx43 am Tyrosin 265 -Rest induziert (Swenson et al., 1990; Crow et al., 1992; Loo et al., 1995). Andererseits induzierte $\text{pp60}^{\text{v-src}}$ keine Phosphorylierung bei Cx32 (Swenson et al., 1990).

Die funktionelle Rolle der Phosphorylierung ist noch umstritten. Es wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung des Cx32 aus Hepatozyten bzw. Pankreas Acinarzellen der Ratte sowohl erhöhte als auch reduzierte zelluläre Kommunikation verursacht (Sáez et al., 1986; Somogyi et al., 1989). Bei Cx43 wurde festgestellt, dass erhöhte Phosphorylierung an Serin-, bzw. Threonin-Resten zur Reduktion der Gap Junction-Kopplung führte (Brissette et al., 1991; Oh et al., 1991; Berthoud et al., 1992, 1993; Lau et al., 1992). Weiterhin scheint die Phosphorylierung bei der Degradation der Connexin-Moleküle eine Rolle zu spielen. Phosphorylierung des Hühnchen Cx45.6-Proteins verhinderte die Degradation des Connexin-Proteins (Yin et al., 2000). Auf den gleichen Effekt weisen Studien von Hertlein et al. (1998) und Diestel (Diss. 2001) hin, die eine Rolle der Phosphorylierung bei der Degradation im Cx45-Protein bzw. Cx31 der Maus ergaben. Bei herzkranken Kindern wurden Mutationen im Cx43-Gen identifiziert, bei denen Serin-Reste bei Position 364 durch Prolin ausgetauscht wurden, wodurch die Phosphorylierung verhindert wurde (Britz-Cunningham et al., 1995).

Außer der Phosphorylierung sind Acylierung und Disulfidbrückenbildung andere bekannte posttranslationale Modifikationen. Es wurde gezeigt, dass Palmitinsäure bei der Bildung der Gap Junction-Kanäle aus Connexin32 und Connexin43 beteiligt ist (Traub et al., 1989; Hertzberg et al., 1989). Es kann spekuliert werden, dass die Acylierung der Connexine die Verankerung der Proteine und damit die Oligomerisierung der Connexine erleichtern könnte. Außerdem wurden intramolekulare Disulfidbindungen des Cx43 (Aoumari et al., 1991; John & Revel, 1991) und des Cx32 (Rahman et al., 1993) nachgewiesen. Die Konservierung der 6 Cysteinreste, davon 3 auf der extrazellulären Schleife, weist darauf hin, dass die Disulfidbrückenbildung in allen Connexinen vorkommt (Hoh et al., 1991).

Über andere posttranslationale Modifikationen ist bisher nur wenig bekannt, aber in bisherigen Untersuchungen wurde festgestellt, dass Connexine keine Glykoproteine sind (Gilula, 1974; Hertzberg & Gilula, 1979; Rahman et al., 1993; Wang et al., 1995).

1.5 Permeabilität und Modell des Öffnung- und Schließ-Mechanismus von Gap Junction-Kanälen

Die Permeabilität für Ionen und größere Moleküle wie Metabolite und Botenstoffe ist eine der wichtigsten Funktionen von Gap Junctions. Die erste Charakterisierung des Gap Junction-Kanals wurde mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Zuckern und Peptiden durchgeführt, die in Zellen eines einschichtigen Zellrasens mikroinjiziert wurden. Es ergab sich, dass Gap Junction-Kanäle in Säugerzellen für Moleküle bis zu einer relativen Molekülmasse von ca. 750 Da oder einer Größe von 1,6-2 nm durchlässig waren (Flagg-Newton et al., 1979). In anderen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die ermittelte Permeabilität nicht direkt von der Größe oder rel. Molekülmasse der Farbstoffe abhängt, die man von größenlimitierten Poren erwartet hätte (Elfgang et al., 1995; Cao et al., 1998). Mit einer einheitlichen Klasse von Permeaten (z.B. Tetraalkylammoniumionen) wurde festgestellt, dass die limitierenden Porendurchmesser eine Sequenz von Cx43 > Cx32 > Cx26, Cx40, Cx45 > Cx37 ergeben (Harris, 2001). Durch die Bestimmung der Permeabilität für Fluoreszenzfarbstoffe mit gleicher Größe (Veenstra et al., 1995) und gleicher Ladung (Nicholson et al., 2000) wurde gezeigt, dass sich keine direkte Korrelation der Eigenschaften des Farbstoffes mit Eigenschaften der Gap Junction-Kanäle beim Farbstofftransfer ergab. Dieses legt den Schluss nahe, dass die Porenwand der Gap Junction-Kanäle mit den Permeaten spezifisch in Wechselwirkung treten kann und dass Gap Junctions sehr spezifisch zwischen bestimmten Metaboliten und Botenstoffen unterscheiden können.

Eine andere Methode zur Bestimmung der Eigenschaften von Gap Junction-Kanälen ist die elektrophysiologische Bestimmung der Leitfähigkeit der Kanäle. Erst mit Hilfe der *Double Whole-Cell Recording*-Methode wurden sehr heterogene Einzelkanalleitfähigkeiten von ca. 20 pS bis zu 300pS gemessen (Neyton & Trautmann, 1985; Veenstra & DeHaan, 1986), wobei die Stromfluktuationen von mehreren Kanälen sich gegenseitig überlagern, so dass eine eindeutige Zuordnung zu einem bestimmten Kanal nicht möglich wäre. Mit der *induced cell-pair* Technik (Bukauskas, 1994, 1995), bei der zwei Zellen aneinander geschoben und die Ströme bei Neuf ormation von Gap Junction-Kanälen gemessen werden, lässt sich dann eine genaue

Zuordnung der gemessenen Leitfähigkeitsstufen zu den Leitfähigkeitszuständen des Kanals treffen.

Die Einzelkanalleitfähigkeit kann durch Öffnen und Schließen der Kanäle schnell verändert werden, was eine feine Regulation der interzellulären Kommunikation durch Gap Junctions erlaubt. Desweiteren sind Gap Junction-Kanäle spannungsabhängig, wobei die Stärke der Spannungsabhängigkeit mit dem jeweiligen Connexintyp variiert (Spray, 1994). Als Mechanismus für die Regulation der Gap Junction-Kanäle werden mehrere Modelle diskutiert. Bei dem *Ball-and-chain* Modell würde der Carboxyterminus durch intrazelluläre Ansäuerung oder Phosphorylierung an eine bestimmte Domäne binden und den Kanal verschließen (Delmar et al., 1998; Homma et al., 1998). Bei dem Irisblenden Modell würde eine Drehung der Connexone zu einer Änderung im Neigungswinkel der Connexine und somit zu einem Verschluss der Pore durch die Transmembrandomänen führen (Unwin & Ennis, 1983; Perkins et al., 1998).

1.6 Die Vielfältigkeit der Gap Junction-Kanäle und ihre dominanten Effekte

Durch verschiedene Kombinationen der Connexine kann eine große Vielfalt von Gap Junction-Kanälen gebildet werden. Aber es ist nicht in allen Fällen möglich, dass Halbkanäle unterschiedlicher Connexinzusammensetzung sich zu einem funktionellen heterotypischen Gap Junction-Kanal zusammenlagern, der aus zwei verschiedenen Connexonen gebildet wird. In *Xenopus laevis* Oocytenpaaren konnte durch Injektion der Cx26- und Cx32-cRNS oder Cx37- und Cx40-cRNS die Bildung heterotypischer Kanäle nachgewiesen werden (Barrio et al., 1991; Hennemann et al., 1992). Untersuchungen von heterotypischen Kanälen haben ergeben, dass vor allem die zweite extrazelluläre Schleife für die Kompatibilität von Connexinen verantwortlich ist. Bei den beiden Kompatibilitätsgruppen stimmen jeweils die Ladungen der Aminosäuren an Position Lysin 167 und Asparagin 175 auf Cx32 überein (Dahl et al., 1992; Bruzzone et al., 1994). Die Kompatibilitätsgruppen stimmen aber nicht mit den α - und β -Gruppen überein (Elfgang et al., 1995). Eine besondere Stellung nimmt dabei Cx31 ein, da es als einziges bisher bekanntes Connexin nur homotypische Kanäle ausbilden kann. Bei der Untersuchung von Cx45 und seiner Deletionsmutante wurde festgestellt, dass die

defekte Funktion der mutierten Connexone durch Bildung der heterotypischen Kanäle mit Cx45-Wildtyp aufgehoben wurde (Hülser et al., 2001).

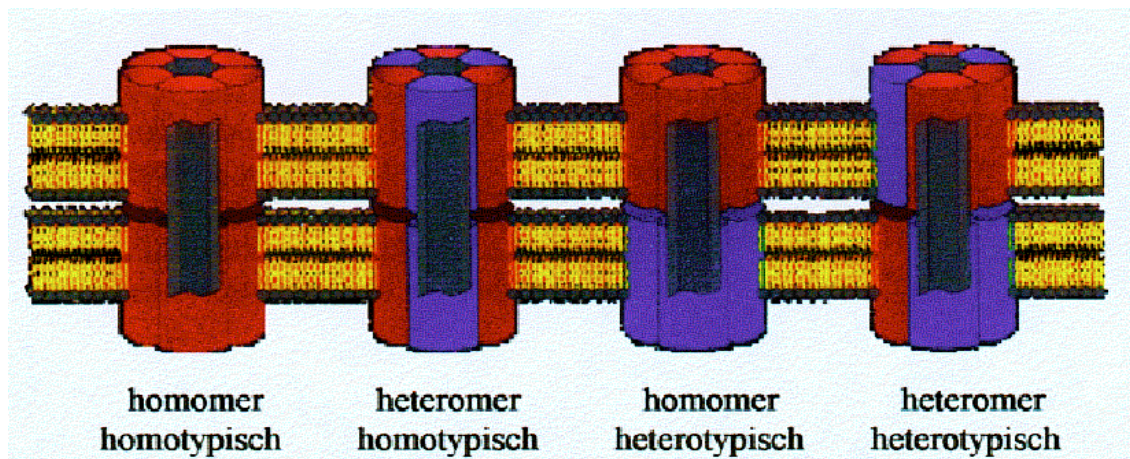


Abb.1-3 Strukturelle Vielfalt von Gap Junction-Kanälen

Die verschiedenen Möglichkeiten der Connexon-Zusammensetzung und die unterschiedliche Kombination der Connexone untereinander bedeuten theoretisch vielfältige Kombinationsmöglichkeiten für den Aufbau von Gap Junctions (Kumar und Gilula, 1996).

Neben der heterotypischen Interaktion können auch heteromere Interaktionen von Connexinen stattfinden. Heteromere Connexone sind solche, die aus zwei oder mehr verschiedenen Connexintypen bestehen. Es sind allerdings wenige Daten darüber bekannt, welche Connexintypen bei der Bildung heteromerer Connexone zueinander kompatibel sind. Die verschiedenen Möglichkeiten der Connexon und Gap Junction-Zusammensetzung wurden in Abb. 1-3 schematisch dargestellt.

Die Connexininkompatibilität können bei der funktionellen Kompartimentierung der Gewebe eine Rolle spielen, zumal verschiedene Connexinisoformen in benachbarten Bereichen eines Gewebes gleichzeitig exprimiert werden. So bilden die Fasern im Leitungsbündel des Herzens Gap Junction-Kanäle aus Cx40 und sind somit vom Myokard mit Kanälen aus inkompatiblen Cx43 Kanälen elektrisch isoliert (Gros & Jongma, 1996). Werden beide β -Connexine Cx26 und Cx32 in einer Zelle koexprimiert, befinden sie sich auch in einem Plaque, dagegen wurde beobachtet, dass Cx26 oder Cx32 mit dem α -Connexin, Cx43 separate eigene Plaques ausbildet (Falk, 2000). Andererseits wurden gezeigt, dass zwei in einer Zelle koexprimierte Connexine wie Cx26/Cx32, Cx46/Cx50 und Cx37/Cx43 Halbkanäle bilden, die aus verschiedenen Connexinuntereinheiten zusammengesetzt sind (Stauffer, 1995; Jiang & Goodenough,

1996; Brink et al., 1997; Bevans et al., 1998; He et al., 1999). Die physiologische Bedeutung dieser diversen Kanalbildung ist bis heute noch nicht geklärt.

1.7 Connexinexpression in der Haut und in dem Herz

Die Connexinexpression in der Haut ist nicht nur abhängig vom Zelltyp sondern auch entwicklungsabhängig. Das Expressionsmuster der Connexine unterscheidet sich auch zwischen Maus und Menschen (s.Tab.1-2).

Durch immunhistochemische Analysen von Maus- und Rattenhaut wurde gezeigt, dass mit der Differenzierung der Epidermis eine Veränderung der Connexinexpression eintritt. In embryonalen Basalzellen werden Cx43 und Cx45 exprimiert. In differenzierenden Zellen der Granulosa- und Spinosaschichten wurden hauptsächlich Cx26 und Cx31 nachgewiesen, während Cx37 in den allen Schichten gefunden wird. Bei adulten Tieren werden Cx43 und Cx40 in der Basalschicht exprimiert, während differenzierende Keratinocyten der Strata granulosum und spinosum Cx31, Cx31.1, Cx30.3 und Cx37 exprimieren.

	Nagetieren		Human
	Embryo	Adult	
Epidermis : Str. basale	Cx43>Cx31,Cx45	Cx43>Cx40	Cx26,(Cx43)
Str. spinosum	Cx31>Cx26>Cx43	Cx31>Cx43	Cx43>Cx31>Cx37
Str. granulosum	Cx31>Cx26	Cx31	Cx43>Cx31>Cx37
Haarfollikel: IRS	Cx31>Cx43	Cx31,(Cx26)	Cx26>Cx43
ORS	Cx43,Cx45	Cx43,Cx40	Cx43>Cx26
Talgdrüsen	Cx31>Cx40,Cx43		Cx43
Ekrine Schweißdrüsen	Cx31,Cx26		Cx31,Cx26,(Cx43)
Dermale Fibroblasten	Cx43		Cx43,Cx40

Tab. 1-2 Connexinexpression in der Haut

Str.:Stratum, IRS:Zellen der inneren Wurzelschicht, ORS:Zellen der äußeren Wurzelschicht

Referenzen: Abdulla,1998;Butterweck et al.,1994;Choudhry et al.,1997; Goliger & Paul,1994;Guo et al.,1992; Kamibayashi et al.,1993,1995;Luke et al.,1999;Risek et al.,1992;Richard et al.,1997;Salomon et al.,1994;Sawey et al.,1996;Tada et al.,1997

In menschlicher Haut sind Cx43 und Cx31 die am meisten exprimierten Connexine mit starker Expression im Stratum spinosum und granulosum. In geringen Mengen werden auch Cx37 und Cx31.1 in der Stratum spinosum und granulosum kolokalisiert mit Cx43 und Cx31 gefunden. Cx26 wird nur gering im Stratum basale exprimiert, wobei die Cx32 und Cx40 in der menschlichen Haut keine Rolle zu spielen scheinen (Salomon et al., 1994).

Für die fehlerfreie Funktion des Herzens muss eine koordinierte, elektrische Aktivierung der Herzmuskelzellen gesichert sein. Die Erregung, die zur Kontraktion der Kardiomyozyten führt, entsteht im primären Schrittmacher, dem Sinusknoten. Dabei wird das negativ geladene Zellinnere der Sinusknotenzellen depolarisiert und diese elektrische Erregung wird als fortschreitende Erregungswelle über die Atrien auf den Atrioventrikular-Knoten und anschließend das His-Bündel weitergeleitet. Von dem His-Bündel gelangt sie über Tawara-Schenkel zu den Purkinje-Fasern, die zeitgleiche, simultane Kontraktion von rechter und linker Ventrikel aufgrund der schnellen Leitungsgeschwindigkeit ermöglichen.

Die Weiterleitung des elektrischen Impulses zwischen den Herzmuskelzellen wird über Gap Junctions gewährleistet. Cx43 wird vor allem in der Arbeitsmuskulatur von Vorhöfen und Hauptkammern nachgewiesen, während Cx40 in den Vorhöfen, im His-Bündel und den Tawara-Schenkeln zu finden ist, wobei Cx40 und Cx43 in den Purkinje-Zellen, Cx43 und Cx45 in der Übergangszone vom His-Bündel zur Scheidewand (Septum) koexprimiert werden (Gourdie et al., 1993; Gros et al., 1994; Delorme et al., 1995; van Kempen et al., 1995, 1996; Coppen et al., 1998). Außerdem ist Cx45 das einzige nachgewiesene Connexin zur Zeit der ersten Kontraktion des embryonalen Herzens (Delorme et al., 1997). Aufgrund seiner niedrigen Leitfähigkeit mit 32 pS, der starken Spannungsabhängigkeit und der selektiven Permeabilität wurde spekuliert, dass Cx45 für die langsame Erregungsweiterleitung im Embryoherz verantwortlich ist (Veenstra et al., 1994; Barrio et al., 1997).

1.8 Durch Connexindefekte verursachte Erbkrankheiten

Seitdem das Connexin32 mit einer Erbkrankheit in Verbindung gebracht wurde, wurden einige Mutationen in anderen Connexin-Genen gefunden, die ebenfalls Erbkrankheiten verursachen können.

Die durch Mutationen des Cx32-Gens verursachte Krankheit ist die X-chromosomale Form der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit (CMTX) (Bergoffen et al., 1993; Bruzzone et al., 1994). Dabei rufen die Cx32-Mutationen die defekte Diffusion von Metaboliten in Schwannzellen hervor, die zur Demyelinisierung und axonaler Degradation peripherer Nerven führen.

Bei Patienten mit einer schweren Herzmissbildung (viszeroatrialer Heterotaxie) wurden verschiedene Mutationen im Cx43-Gen gefunden, die zum Austausch phosphorylierbarer Aminosäuren führen (Britz-Cunningham et al., 1995; Fletcher et al., 1995; Paul et al., 1995). Der direkte Zusammenhang zwischen dem Phänotyp und der Cx43-Mutation wurde durch Cx43 *knock-out*-Mausmodell unterstützt (Reaume et al., 1995).

Durch Mutationen in den Connexingenen Cx46 und Cx50 werden autosomal-dominante Formen des Linsenkataraktes hervorgerufen (Berry et al., 1999; Mackay et al., 1999).

Bei Patienten mit autosomaler, nicht-syndromischer sensorineuraler Taubheit wurden Mutationen im Cx26-Gen gefunden, wobei die Taubheit von einer palmoplantaren Keratodermie bei Austauschmutanten R77W von Cx26-Gen in einer Familie begleitet wird (Richard et al., 1998). Es wurde auch gezeigt, dass das mutierte Connexin einen dominant-negativen Effekt auf das Cx26-Wildtyp ausübt. Weiterhin wurde eine Mutation, D66H in drei unabhängigen Familien mit Vohwinkels Syndrom gefunden, wobei palmoplantare Keratodermien und Hörverlust auftritt (Maestrini et al., 1999; Kelsell et al., 2000).

Bei den Patienten mit der Hautkrankheit Erythrokeratoderma variabilis (EKV) wurden verschiedene Cx31-Mutationen gefunden (Richard et al., 1998).

Kürzlich wurde eine Mutation im Cx30.3-Gen bei einem Patienten mit EKV gefunden (Macari et al., 2000; Richard et al., 2003).

1.8.1 Mutationen in menschlichen Cx31-Gen

Seit die ersten Mutationen im Cx31-Gen von den Patienten mit der Hautkrankheit *Erythrokeratodermia variabilis* im Jahr 1998 gefunden wurden (Richard et al., 1998), wurden seitdem noch auch andere Mutationen identifiziert (s.Tab. 1-3). Die Lokalisierung von verschiedenen Mutationen ist nicht nur auf eine Domäne des Cx31-Proteins begrenzt, sondern



Abb. 1-4 Typische Symptome der Hautkrankheit, *Erythrokeratodermia variabilis*. (Richard et al.,1998)

Aminosäureveränderung	Mutation	Lokalisierung auf Cx31	Phänotyp
G12R	34:G→C	NT	EKV, Lokale Hyperkeratose, PPK
G12D	35:G→A	NT	EKV,Hyperkeratose
G12S	34:G→A	NT	EKV, Lokale Hyperkeratose, PPK
R42P	125:G→C	ES 1	EKV, Lokale Hyperkeratose, PPK
C86S	256:T→A	TM 2	EKV, Lokale Hyperkeratose, PPK
F137L	409:T→C	TM 3	EKV, Hyperkeratose, PPK
R180X	538:C→T	ES 2	Sensorineurale Taubheit
R183K	547:G→A	ES 2	Sensorineurale Taubheit
652Δ12	del12AS	CT	EKV

Tab. 1-3 Im Cx31-Gen gefundene Mutationen und ihre Phänotypen (nach Richard et al.,2000, modifiziert), EKV;Erythrokeratodermia variabilis, PPK ;Palmoplantare Keratodermien

verteilen sie sich auf die unterschiedlichen Domänen. Da der Aminoterminus als ein Regulator für die Polarität der Permeabilität von Cx26-Aminosäure-Austauschmutanten dargestellt wurde (Oh et al., 2000), ist es denkbar, dass die Austauschmutationen mit geladenen Aminosäuren an dem Aminoterminus (G12R, G12D) eine Veränderung des Öffnungszustandes der Kanäle veranlassen. Tatsächlich wurde festgestellt, dass bei Transfektanten mit einer Mutation des Cx31-Gens, G12D keine Kopplung (Richard et al., 2003) und bei Mutanten mit einem G12R-Austausch erhöhte Kopplung beobachtet wird, die zur Lethalität der Transfektante führt (Diestel et al., 2002). Inwieweit die Veränderung der Kanal-Öffnung an dem Auftreten der Hautkrankheit EKV beteiligt ist, ist noch unklar. Weitere Mutationen wurden auch auf allen vier Transmembrandomänen gefunden. Es wurde postuliert, dass die erste Transmembrandomäne die Pore des Kanals auskleidet (Oh et al., 1997) und die zweite Transmembrandomäne für die spannungsabhängige Regelung der Gap Junction-Kanäle wichtig ist (Suchyna et al., 1993; Goodenough et al., 1996). So kann die in der Transmembranregion gefundene Mutation von Cx31 die Regulation der spannungsabhängigen Öffnung verändern. Drei weitere Mutationen von Cx31 (R42P, R180X und E183K) auf den extrazellulären Schleifen können die Disulfidbrücken-Bildung zwischen den Halbkanälen und damit die Bildung von funktionsfähigen Kanälen beeinflussen (White et al., 1994; 1995). Bei der Hautkrankheit EKV handelt es sich um eine genetisch bedingte autosomal dominante Hautkrankheit, die durch transiente rote Flecken an diversen Stellen und palmoplantare Hyperkeratose gekennzeichnet ist (Richard et al., 1998). Bei der Cx31-defizienten Maus wurde kein veränderter Phänotyp der Haut festgestellt (Plum et al., 2000), so dass vermutet wurde, dass die Funktion von Cx31 durch andere Connexine kompensiert werden kann.

1.8.2 Mutationen in Maus Cx45 und “Knock-out“ modell

Connexin45 wird besonders stark in allen mesodermalen und ektodermalen embryonalen Geweben exprimiert, während in der späteren embryonalen Entwicklung die Expression von Cx45 stark zurück geht (Krüger et al., 2001), so dass Cx45 in Herz, Haut, Niere, Knochen und Rückenmark im erwachsenen Stadium ausgeprägt wird

(Coppen et al., 1998, 1999; Butterweck et al., 1994; Steinberg et al., 1994; Chang et al., 1999).

Um die spezifische Funktion des Cx45, besonders die funktionelle Rolle der Phosphorylierung zu überprüfen, wurden verschiedene Serin-Austausch- und Deletionsmutanten hergestellt. Dabei wurde festgestellt, dass der C-Terminus eine wichtige Rolle für den Transport von Cx45 spielt, weil die Deletionsmutante C122, bei der 26 Aminosäuren am C-Terminus fehlen, nicht mehr in der Membran nachgewiesen werden kann, während der Austausch von 9 Serin-Resten gegen nicht phosphorylierbare Aminosäuren keine Wirkung auf den Transport zeigt. Andererseits spielt die Phosphorylierung bei der Degradation von Cx45 eine Rolle. Bei den Serin-Austauschmutanten an den Positionen 381 und 382 oder 384 und 385 reduziert sich die Halbwertszeit des mutierten Cx45 um bis zu 50% (Hertlein et al., 1998). Bei der Cx45-defizienten Maus wurde beobachtet, dass die Abwesenheit des Cx45 im Herz zum frühen Tod führte. Cx45 könnte eine wichtige Rolle in der Koordination der frühen peristaltischen Bewegungen des primären tubulären Herzens spielen, da Cx45 in diesem Stadium der Entwicklung das einzige bisher nachgewiesene Connexin ist (Delorme et al., 1997). Auch wurden eine Blockierung der Reizweiterleitung im embryonalen Herz und eine abnormale Herzentwicklung als Ursachen vermutet (Krüger et al., 2000).

1.9 Ziele dieser Arbeit

Verschiedene Mutationen des Cx31-Gens wurden von der Haut bei Patienten mit der Hautkrankheit Erythrokeratoderma variabilis (EKV) identifiziert (Richard et al., 2000). Um die genetische Auswirkung der Mutation auf den Phänotyp der EKV zu untersuchen, wurde ein Zellkultur-Modell mit den HeLa-Zellen, die mit der jeweiligen mutierten cDNS transfiziert wurde, etabliert und die Eigenschaften der mutierten Connexin-Kanäle charakterisiert. Dabei wurde festgestellt, dass Mutationen in der amino-terminalen Domäne der hCx31-cDNS einen erhöhten Farbstofftransport und sogar einen lethalen Effekt in HeLa Zellen hat (Diestel et al., 2002). Da mehrere Connexine in den Epidermis koexprimiert werden, sollten die dominanten Effekte bzw. die Kompensation von koexprimierenden Connexinen anhand dieses Zellkulturmodells

untersucht werden, um den Zusammenhang zwischen den Mutationen auf dem Connexin-Gen und den Phänotyp der EKV festzustellen. Dazu sollten Doppeltransfektanten mit verschiedenen Connexinen als Zellkulturmodell hergestellt werden und sowohl auf RNS- wie auf Protein-Ebene charakterisiert und die Funktion von Connexin-Kanälen mit Kopplungsmessungen analysiert werden.

Um die Bedeutung der carboxyterminalen Serinreste von Maus-Cx45 zu analysieren, wurden verschiedene Austauschmutanten der Serinreste hergestellt und charakterisiert (Hertlein et al., 1996). Bei einer Deletionmutante des Maus Cx45, C122, in dem 26 Aminosäuren an dem Carboxyterminus des mCx45-Gens deletiert sind, wurde festgestellt, dass der größte Teil der C122-Proteine nicht an den Membranen, sondern perinukleär im Zytoplasma lokalisiert sind und keine Kopplung festgestellt werden kann. Es wurde berichtet, dass der funktionelle Defekt der C122-Proteine durch Bildung der heterotypischen Kanäle zwischen Cx45 WT und C122 bei Kokultivierung von HeLa Cx45- und HeLa C122-Transfektanten aufgehoben wurde (Hülser et al., 2001). Um die funktionelle Wiederherstellung und einen dominanten Effekt zu untersuchen, sollten Doppeltransfektanten mit Cx45- und C122-cDNS hergestellt und die Eigenschaft von heteromeren Connexin-Kanälen analysiert werden.

2. Material

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in Analyse-Qualität (p.a.) von den Firmen Difco, Fluka, GiBCo BRL, Roche Diagnostics, Merck, Serva und Sigma bezogen. Enzyme und Nukleotide wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech, Roche Diagnostics und Promega geliefert. Radiochemikalien und Nylonmembranen stammten von Amersham Pharmacia Biotech.

2.2 Einwegartikel

Sterile Plastikmaterialien wurden von den Firmen Falcon, Nunc, Sarstedt und Costar bezogen. Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße stammten von der Firma Sarstedt.

2.3 Lösungen und Puffer

2.3.1 Allgemeine Stammlösungen und Puffer

PBS ⁻ (pH 7,2)		137 mM	NaCl
		2,7 mM	KCl
		8,1 mM	Na ₂ HPO ₄
		1,5 mM	KH ₂ PO ₄

PBS ⁺	PBS ⁻ mit	0,7 mM	CaCl ₂
		0,5 mM	MgCl ₂

TBS-Puffer (pH 7,4)	50 mM	Tris-HCl
	150 mM	NaCl

2.3.2 Lösungen für die Nukleinsäureanalytik

DMPC-Wasser	0,2% (v/v) Dimethylpyrocarbonat üN rühren lassen und 1 Stunde autoklavieren
DNS-Ladepuffer (6x)	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 30% Glycerin
Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml)	1% Ethidiumbromid lichtgeschützt lagern
Lysispuffer (pH 7,5) (analytische Plasmidpräparation)	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 62,5 mM EDTA 0,4% Triton X-100 2,5 M LiCl
Lysozym-Stammlösung	1% in H ₂ O bidest, immer frisch ansetzen
MOPS (10x, pH 7,0)	200mM Morpholinopropansulfonsäure 50mM Natriumacetat 10mM EDTA 1 Stunde autoklavieren, lichtgeschützt lagern
RNase-2000-Stammlösung	100 mg RNase A in 49 ml TE-Puffer lösen, 1 ml RNase T1 zugeben, 15 Min. kochen, Lagerung bei -20°C
TBE-Puffer (10x)	1 M Tris 0,83 M Borsäure 10 mM EDTA
TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA

2.3.3 Lösungen für die Bakterienkultur

Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml Ampicillin in H ₂ O bidest lösen sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C
DnD	1,53g Dithiotreithol 9 ml DMSO 100µl 1M Kaliumacetat auf 10 ml mit H ₂ O bidest auffüllen, pH 7,5 sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C
LB-Medium (pH 7,4)	1% (w/v) NaCl 1% (w/v) Hefe-Extrakt 0,5% (w/v) Trypton 20 Min. Autoklavieren
LB-Nährböden	zu LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar geben, autoklavieren, bei Bedarf nach Abkühlen auf ca. 50°C Selektionsantibiotikum hinzufügen, in 10 cm-Petrischalen gießen, Lagerung bei 4°C
SOB-Medium	2% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl auf Endvolumen mit H ₂ O bidest auffüllen, pH 6,9, 20 Min. autoklavieren, anschließend Zugabe von 10 mM MgSO ₄ (sterilfiltriert) und 10 mM MgCl ₂ (sterilfiltriert)
TFB I (pH 5,8)	30 mM Kaliumacetat 50 mM MnCl ₂

	100 mM RbCl
	10 mM CaCl ₂
	15% (v/v) Glycerin
	sterilfiltrieren
TFB II (pH 7,0)	10 mM MOPS
	75 mM CaCl ₂
	10 mM RbCl
	15% (v/v) Glycerin
	sterilfiltrieren
YT ⁺⁺ (pH 7,5)	0,8% Trypton
	0,5% Hefe-Extrakt
	0,5% NaCl
	20 Min. autoklavieren, anschließend Zugabe von
	20 mM MgSO ₄ (sterilfiltriert) und
	10 mM KCl (sterilfiltriert)

2.3.4 Lösungen für die Proteinanalytik

Casein-Lösung	1% Caseinhydrolysat in PBS ⁺
	0,1% NaN ₃
	sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C
Coomassie-Färbelösung	0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva)
	10% (v/v) Essigsäure
	50% (v/v) Methanol
Coomassie-Entfärber	10% (v/v) Essigsäure
	30% (v/v) Methanol

Deckgläschen anätzen	mit Aceton waschen, anschließend 3 - 4 Stunden mit 2% Na ₂ CO ₃ bei RT inkubieren, mehrmals mit H ₂ O bidest waschen, trocknen und sterilisieren	
Elektroblot-Puffer	20 mM	Tris
	150 mM	Glycin
	20% (v/v)	Methanol
Elektrophorese-Puffer (10x) für Proteingele	0,25 mM	Tris
	1,92 M	Glycin
	10% (w/v)	SDS
Fixierlösung	50% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Essigsäure
Homogenisierungspuffer	10 mM	EDTA
	10 mM	Tris
	320 mM	Sucrose
	in H ₂ O bidest, sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C.	
	Vor Gebrauch wird 1x Complete™-Protease-Inhibitor-Cocktail	
	(Roche) zugesetzt (42µl/ml)	
Lösung A	30% (w/v)	Acrylamid
	0,8%	N, N'-Methylen-bis-acrylsäureamid
Lösung B (pH 8,8)	1,5 M	Tris
	0,4% (w/v)	SDS
Lösung D (pH 6,8)	0,5 M	Tris
	0,4% (w/v)	SDS
Natriumphosphatpuffer (pH 7,2)	je 10 mM Na ₂ HPO ₂ und NaH ₂ PO ₂	

PBS ⁺ /BSA	0,1% (w/v)	BSA
	0,02% (w/v)	NaN ₃ in PBS ⁺
Ponceau S-Färbelösung	0,2% (w/v)	Ponceau S
	3% (v/v)	Trichloressigsäure
Ripa-Lysis-Puffer (pH 7,2)	10 mM	Natriumphosphatpuffer (pH 7,2)
	0,1%	SDS
	40 mM	NaF
	2 mM	EDTA
	1%	Triton X-100
	1%	Deoxycholsäure
Ripa-Waschpuffer (pH 7,2)	10 mM	Natriumphosphatpuffer (pH 7,2)
	1 M NaCl	
	10 mM EDTA	
	40 mM NaF	
	0,2% Triton X-100	
Roti [®] -Block (Roth)	1:10 mit H ₂ O bidest verdünnen	
SDS-Probenpuffer(pH 6,8)	62,5 mM	Tris
	3% (w/v)	SDS
	5% (v/v)	β-Mercaptoethanol
	10% (v/v)	Glycerin
p-Phenylendiamin (pH 8,0)	100 mg	p-Phenylendiamin
	90 ml (v/v)	Glycerin
	lösen in 10 ml PBS ⁻	
Tris-SDS-Puffer (pH 7,4)	0,06 M	Tris
	3% (w/v)	SDS

2.3.6 Lösungen für die Mikroinjektion

Diaminobenzidin-Färbelösung	0,06% Diaminobenzidin in 15 ml TBS-Puffer lösen, sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C, vor Gebrauch 0,01% (v/v) H ₂ O ₂ zugeben
DiI-Stammlösung	1% in DMSO, Lagerung lichtgeschützt bei -20°C
Glucoselösung (isotonisch)	0,3 M D(+)-Glucose, sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C
Glutaraldehyd	1% (v/v) in PBS ⁻ , frisch ansetzen
Lucifer Yellow	4% (w/v) in 1 M LiCl lösen, vor jedem Gebrauch zentrifugieren (Beckman, 30 Sek., RT)
Neurobiotin	6% (w/v) Neurobiotin 0,4% (w/v) Rhodamin-3 -Isothiocyanat-Dextran in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,6
Triton X-100-Lösung	2% (v/v) in PBS

2.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma ARK Scientific synthetisiert und anschließend in TE-Puffer gelöst (Endkonzentration 100 pmol/ μ l). Sie wurden bei -20°C gelagert.

2.4.1 Oligonukleotide für die RT-PCR

Name	Sequenz 5' - 3'
SV40-hin	TTG GAG GCC TAG GCT TTT GC
CMV-hin	GCT TGG TAC CGA GCT CGG AT
hCx31-rück	TAG CAG ACG TTGGTG CAG CC
rCx43-rück	AAG CTT CCC CAA GGC ACT CC
β -Actin-hin	CGT GGG CCG CCC TAG GCA CCA G
β -Actin-rück	TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG G

2.4.2 Oligonukleotide mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen

Name	Sequenz 5' - 3'	zusätzliche schnittstelle
hCx31Bgl-hin	CCC GAA GAT CTC TCA GGT AGG CAC GGC CC	<i>Bgl</i> II
hCx31Hind-rück	GGC CCA AGC TTG ATG GGG GTC AGG TTG GGT G	<i>Hind</i> III
mCx45Hind-hin	TCT GAA AGA AGC TTT TGG GTA AC	<i>Hind</i> III
mCx45Age-rück	CGT TGA CCG GTA ATC CAG ACG GAG GTC TTC CCA T	<i>Age</i> I

Das Erkennungsmotiv für die Restriktionsendonuklease ist fettgedruckt.

2.5 Plasmide

2.5.1 Klonierungsvektoren

Vektor	Referenz
pBEHpac18	Vara et al. (1986)
pcDNA3.1Zeo(+)	Invitrogen
pBluescript	Stratagene
pMJGreen	pBEHpac18+pEGFP-N1 von Clontech
pcDNA6Myc-HisB	Invitrogen

2.5.2 Rekombinante Plasmide für die Transfektionen

Name	Klonierungsstrategie
pcDNA3.1Zeo(+)/G12R	G12R wurde aus dem Vektor pBEHpac18 (Diestel, 2001) mit <i>EcoRI</i> ausgeschnitten und in den mit <i>EcoR I</i> linearisierten, dephosphorylierten Vektor pcDNA3.1Zeo(+) kloniert.
pcDNA3.1Zeo(+)/C86S	C86S wurde aus dem Vektor pBEHpac18 (Diestel, 2001) mit <i>EcoRI</i> ausgeschnitten und in den mit <i>EcoR I</i> linearisierten, dephosphorylierten Vektor pcDNA3.1Zeo(+) kloniert.
pcDNA3.1Zeo(+)/C122	C122 wurde aus dem Vektor pBEHpac18 (Hertlein, 1998) mit <i>EcoRI/XbaI</i> durch Partialverdau ausgeschnitten und in den <i>EcoRI/XbaI</i> linearisierten dephosphorylierten Vektor pcDNA3.1Zeo(+) kloniert.
pMJGreen/hCx31	An das hCx31 wurde in der PCR-Reaktion mittels des Startermoleküls hCx31Bglhin und hCx31Hindrück ein eGFP und eine <i>Bgl II</i> und ein <i>Hind III</i> -Schnittstelle eingefügt. Das PCR-Produkt wurde mit <i>Bgl II</i> und <i>Hind III</i> gespalten und in den mit <i>Bgl II</i> und <i>Hind III</i> linearisierten Vektor pMJGreen (pBEHpac18+pEGFPN1) kloniert.
pcDNA6Myc-HisB/mCx45	An das mCx45 wurde in der PCR-Reaktion mittels des Startermoleküls mCx45Hindhin und mCx45Agerück ein His-Epitop und eine <i>Hind III</i> und eine <i>Age I</i> -Schnittstelle eingefügt. Das PCR-Produkt wurde mit <i>Hind III</i> und <i>Age I</i> gespalten und in den mit <i>Hind III</i> und <i>Age I</i> linearisierten Vektor pcDNA6Myc-HisB (Invitrogen) kloniert.

2.6 Verwendete Größenstandards

2.6.1 Nukleinsäureanalytik

Standard	Fragmentgröße in kb
λ -DNS(EcoRI/HindIII)	21,2; 5,1; 5,0; 4,3; 3,5; 2,0; 1,9; 1,6; 1,4; 0,95; 0,83; 0,56; 0,125
100bp-Leiter	2,0; 1,5; 1,4; 1,3; 1,2; 1,1; 1,0; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1

2.6.2 Proteinanalytik

Standard	Größe in kDa
Coomassie-Marker	68; 45; 29; 25,5; 14; 12,4
SeeBlue™Pre-Stained-Standard (Novex)	250; 98; 64; 50; 36; 30; 16; 6; 4
Roti®-Mark Prestained (Roth)	245; 123; 77; 42; 30; 25,4; 17

2.7 Bakterienstamm

E. coli XLI-blue Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, Δ (mcr)A183, Δ (mcrCB-hsd
SMR-mrr)l73,supE44, relA1,
lac[F'proABlacI^qZ Δ M15Tnl0(Tet^r12,5 μ g/ml)]

2.8 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
HeLa	Aneuploide, epitheloide Cervixcarcinom-Zelllinie aus menschlichem Gewebe	Geyet al., 1952
HeLa hCx31/38	HeLa-Linie, die konstitutiv das hCx31-Gen exprimiert, resistent gegen Puromycin	Diestel et al., 2001

HeLa mCx45	HeLa-Linie, die konstitutiv das mCx31-Gen exprimiert, resistent gegen Puromycin	Hertlein et al., 1998
HeLa rCx43	HeLa-Linie, die konstitutiv das rCx43-Gen exprimiert, resistent gegen Puromycin	Elfgang et al., 1995

2.9 Antikörper

primäre Antikörper	Verdünnung für Immunfluoreszenz	Verdünnung für Immunoblot	Hersteller
à Cx31	1:100	1:500	Butterweck et al., 1994
à Cx31CL	1:100	1:500	Biotrend
à Cx45	1:100	1:300	Butterweck et al., 1994
à Cx43	1:50	1:400	Butterweck et al., 1994

sekundäre Antikörper

goat à rabbit Cy 3	1:5000	-	Dianova
--------------------	--------	---	---------

3. Methoden

3.1 DNS-Präparation

3.1.1 Analytische Plasmidisolierung

Diese Methode dient dazu, Plasmid-DNS relativ schnell zu isolieren, um viele Klone testen zu können. Der Reinheitsgrad der gewonnenen DNS ist ausreichend, um Restriktionsanalysen und Sequenzreaktionen durchführen zu können.

1 ml einer üN-Kultur wurden in einem Reaktionsgefäß sedimentiert (Mikrofuge, 13000 UpM, 30 Sek., RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl Lysispuffer resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden 40 µl Lysozymlösung hinzupipettiert. Durch Kochen (60 Sek.) und eine weitere Inkubation (15 Min., 4°C) wurden die Bakterien lysiert. In der anschließenden Zentrifugation (Sigma, 13000 UpM, 15 Min., 4°C) wurden die Bakterientrümmen und die chromosomale DNS von der Plasmid-DNS abgetrennt. Die Plasmid-DNS wurde durch Zugabe von 500 µl Ethanol (absolut, -20°C) gefällt. Nach einer erneuten Zentrifugation (Sigma, 13000 UpM, 15 Min., 4°C) wurde das DNS-Pellet einmal mit Ethanol (70%, -20°C) gewaschen und ein weiteres Mal zentrifugiert (Sigma, 13000 UpM, 5 Min., 4°C). Anschließend wurde die Plasmid-DNS bei 60°C getrocknet, in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und zur Lösung der DNS und zur Inaktivierung von DNAsen 10 Min. bei 60°C inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.1.2 Präparative Plasmidisolierung

Zur Isolierung größerer Mengen DNS mit höchstem Reinheitsgrad, der für Transfektionen und auch für einige der Sequenzreaktionen notwendig ist, wird die präparative Plasmidisolierung mittels eines Plasmid Midi-Präparationssatzes (Qiagen) durchgeführt.

50 ml einer μ N-Flüssigkultur wurde auf zwei 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Isolierung der Plasmid-DNS erfolgte nach den Herstellerangaben.

3.1.3 DNS-Isolierung aus einem Agarosegel

Nachdem die DNS in der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt worden ist, wurde die gewünschte DNS-Bande mit einem Skalpel unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung erfolgte mittels eines Gel-Extraktionssatzes (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

3.1.4 Phenol-Chloroform Extraktion und Natriumacetat-Ethanol-Fällung

Die DNS-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol(50:49:1) versetzt, kurz auf dem Strudelmischer gründlich gemischt und zentrifugiert (Sigma, 14000 UpM, 2 Min., 4°C). Die obere Phase mit der DNS wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Zehntel des Volumens Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5-fachem Volumen an Ethanol (absolut, -20°C) versetzt. Bei der nachfolgenden Inkubation (10 Min., -70°C) erfolgte die Fällung der DNS. Nach erneuter Zentrifugation (Sigma, 14000 UpM, 30 Min., 4°C) wurde die DNS mit 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen. Das DNS-Pellet wurde an der Luft getrocknet und in der gewünschten Menge TE-Puffer oder H₂O bidest aufgenommen.

3.2 DNS *in vitro* Rekombination

3.2.1 Restriktionsendonukleolytische Spaltung der DNS

Die Spaltung der DNS erfolgte durch den Einsatz ausgewählter Restriktionsendonukleasen entsprechend den Angaben des Herstellers.

3.2.2 Dephosphorylierung von DNS

Die Dephosphorylierung der DNS-Strangenden soll eine mögliche Religation des linearisierten Vektors verhindern.

1 µg DNS wurde mit 2 µl 10x Dephosphorylierungspuffer und 0,1 U alkalischer Phosphatase (CIP, Roche) versetzt, mit H₂O bidest auf 20 µl aufgefüllt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch zehnmütige Inkubation bei 65°C inaktiviert.

Um den Puffer und das Enzym zu entfernen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Natriumacetat-Ethanol-Fällung durchgeführt (s. 3.1.4).

3.2.3 Ligation überhängender, kohäsiver Enden

Alle Ligationen wurden mit der T4-DNA-Ligase (Roche) durchgeführt. Die Ligationsansätze wurden folgendermaßen angesetzt:

25 - 50 ng linearisierter Vektor

50 - 200 ng Insert (Verhältnis Vektor: Insert = 1:2, 1:3 und 1:4)

1 µl 10x Ligationspuffer

1 µl T4-DNA-Ligase

ad 10 µl mit H₂O bidest

Der Ansatz wurde mindestens 5 Stunden bei 16°C inkubiert.

3.2.4 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

Die Aufnahme freier Fremd-DNS durch Bakterien wird als Transformation bezeichnet, der genaue Mechanismus dieses Vorganges ist noch ungeklärt. Durch eine besondere Behandlung nach Hanahan (1983) kann die Transformationseffizienz von *E. coli*-Bakterien um ein Vielfaches gesteigert werden. Auf diese Weise ist es möglich, Plasmid-DNS beliebig zu vermehren. Die behandelten Bakterien werden als transformationskompetent bezeichnet.

3.2.4.1 Transformationskompetente, einfrierbare Bakterien

Eine Bakterienkultur wurde $\bar{u}N$ in 2,5 ml YT^{++} -Medium (37°C) inkubiert. Anschließend wurde eine 1:100-Verdünnung in frischem YT^{++} -Medium hergestellt. Es erfolgte eine Inkubation, bis eine OD_{600} von 0,8 erreicht war. Der gesamte Ansatz wurde in 100 ml vorgewärmtes YT^{++} -Medium gegeben und bis zu einer OD_{600} von 0,5 weiter inkubiert. Nach schnellem Abkühlen auf Eis wurden die Bakterien sedimentiert (Heraeus, 5000 UpM, 5 Min., 4°C) und in 10 ml TFB I-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien 10 Min. (4°C) inkubiert und erneut zentrifugiert (Heraeus, 5000 UpM, 5 Min., 4°C). Die Bakterien wurden in 2 ml TFB II resuspendiert, im Ethanol-Trockeneisbad schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.2.4.2 Hocheffiziente, transformationskompetente Bakterien

Eine einzelne Bakterienkultur wurde in 2,5 ml SOB-Medium inokuliert und $\bar{u}N$ in einem Schüttler inkubiert (Heraeus, 225 UpM, 37 °C). Mit 2 μ l dieser $\bar{u}N$ -Kultur wurden 20 ml SOB-Medium angeimpft. Die Kultur wurde so lange inkubiert, bis eine OD_{600} von 0,5 erreicht war. Anschließend wurde die Kultur 15 Min. auf Eis gestellt und zentrifugiert (Heraeus, 6000 UpM, 5 Min., 4 °C). Nach Abnehmen des Überstands wurde das Bakteriensediment in 7 ml TFB resuspendiert, weitere 15 Min. auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (Heraeus, 6000 UpM, 5 Min., 4 °C). Die sedimentierten Bakterien wurden in 2 ml TFB resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 70 μ l DnD und eine Inkubation auf Eis (15 Min.). Nach der Zugabe von weiteren 70 μ l DnD wurde die sofortige Transformation mit 200 μ l der hergestellten hocheffizienten Bakterien durchgeführt.

3.2.4.3 Transformation

Ein gesamter Ligationsansatz (10 μ l) oder 10 bis 20 ng Plasmid-DNS wurden mit 50 μ l kompetenten Bakterien versetzt und bei 4°C 15 bis 30 Min. inkubiert. Bei dem

darauffolgenden Hitzeschock (60 Sek., 42°C) wurden die Plasmide in die Bakterien aufgenommen. Nach Zugabe von 450 µl LB-Medium wurden die Bakterien 30 Minuten bis 1 Stunde bei 37°C und 220 UpM zur Ausprägung der Resistenz inkubiert. Anschließend wurden 100 µl bzw. 400 µl der Bakteriensuspension auf zwei LB-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert und üN angezogen (37°C).

3.3 RNS-Präparation

Die RNS-Isolierung aus Kulturzellen erfolgte nach einer Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) mittels des TriStar™-Reagenz (Hybaid AGS).

Die Zellen wuchsen auf einer 60 mm-Schale zwei Tage bis zur Konfluenz. Nachdem sie in 2,5 ml TriStar™-Reagenz aufgenommen und in ein 15 ml-Röhrchen überführt worden sind, erfolgte die RNS-Isolierung nach Herstellerangaben.

3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.4.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und -reinheit

Die Nukleinsäuren wurden in TE-Puffer oder in H₂O bidest verdünnt. Die Extinktion wurde bei 260 und 280 nm gemessen. Eine O.D. von 1 entspricht bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml DNS und 40 µg/ml RNS.

Da Proteine eine Absorption bei 280 nm aufweisen und es zu einer Überlagerung der Spektren kommen kann, muß mit dem Quotienten aus 260 nm und 280 nm der Reinheitsgrad der Nukleinsäuren bestimmt werden. Der Reinheitsgrad der Nukleinsäuren weist bei einem Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 ein Maximum auf.

3.5 Anwendungen der Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.5.1 Einführung der Schnittstellen mittels der PCR-Fragmente

Um gewünschte Restriktionsendonukleasen-Schnittstellen in ein Gen einzuführen, werden zwei Startermoleküle (Starter A von dem Sinnstrang und Starter B von dem Gegensinnstrang) an der entsprechenden Sequenz mit den gewünschten Schnittstellen abgeleitet.

Die PCR-Reaktionen wurden mit der fehlerkorrigierenden DNS-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Pfu, Stratagene) durchgeführt, da diese eine hohe 3'-5'-fehlerkorrigierende Aktivität besitzt.

Für die eine PCR-Reaktion wurden jeweils 100 ng DNS, 5 μ l 10x Pfu-Puffer, 1 μ l Primer (20pmol), 1 μ l dNTP's (10 mM), 1 μ l Pfu Polymerase (2,5 U/ μ l) eingesetzt. Der Ansatz wurde mit H₂O bidest, auf 50 μ l aufgefüllt.

Die PCR-Reaktion erfolgte nach folgendem Protokoll:

94°C 5 Min. Denaturierung der DNS

94°C 1 Min. Denaturierung der DNS

64°C 45 Sek. Anlagerung der Startermoleküle ~ 30 Zyklen

72°C 90 Sek. Elongation

72°C 20 Min. Endsynthese

4°C ~ Lagerung

Der gesamte PCR-Ansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert (s. 3.1.3). Nachdem die Konzentration des Eluats auf einem weiteren Gel abgeschätzt worden war, wurde Gen mit den gewünschten Schnittstellen zur weiteren Klonierung eingesetzt.

3.5.2 Semiquantitative Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR ermöglicht den Nachweis geringer Transkriptmengen in Zellen und Gewebe. Außerdem bietet sie die Möglichkeit, relative Unterschiede in der Genexpression zu quantifizieren.

Nach der Isolierung der Gesamt-RNS wird die mRNA in ein doppelsträngiges Hybrid aus einem mRNA-Strang und einem cDNA-Strang überführt. Dieses erfolgt mit Hilfe von Startermolekülen (Zufalls-, Oligo-d(T)- oder spezifische Startermoleküle) und der Reversen Transkriptase. Das erhaltene RNS/DNS-Hybrid wird für eine PCR-Reaktion mit spezifischen Startermolekülen eingesetzt. Wird die Zyklenzahl der PCR-Reaktion so gewählt, daß sich die Amplifikation der Fragmente im linearen Bereich befindet, korreliert die Intensität der Bande des gewünschten PCR-Produktes mit der Ausgangsmenge des untersuchten Transkriptes.

Die Zellen wuchsen auf 60 mm-Kulturschalen zwei Tage bis zur Konfluenz. Die Gesamt RNS wurde mittels des TriStar™-Reagenziensatzes (Hybaid AGS) nach Herstellerangaben isoliert. Für die reverse Transkription wurden 2 µg Gesamt-RNS mit 0,05 U Zufallsstartermolekülen (1µl) versetzt und die RNS wurde in einem Gesamtvolumen von 15,6 µl 10 Min. bei 70°C denaturiert. Zur Anlagerung der Startermoleküle wurde der Ansatz bei RT langsam abgekühlt. Anschließend wurden 5 µl 5x AMV-Puffer, 2,5 µl dNTP's (10 mM), 0,4 µl RNasin® (40 U/µl) und 1,5 µl (10 U/µl) AMV-Reverse Transkriptase hinzugefügt. Die reverse Transkription erfolgte bei 37°C für 1 Stunde. Bei der darauffolgenden Inkubation von 5 Min. bei 90°C wurde die reverse Transkriptase inaktiviert. Die Lagerung der umgeschriebenen RNS erfolgte bei -70°C.

Für die PCR-Reaktion wurden 1 µl des RNS-cDNA-Hybrids, 5 µl 10x PCR-Puffer (Promega), 3 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl dNTP's (10 mM), je 2 µl des spezifischen Sinn- bzw. Gegensinnstartermoleküls (20 pmol/µl), 1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) eingesetzt. Der Ansatz wurde mit H₂O bidest auf 50 µl aufgefüllt. Nach kurzem Anzentrifugieren des Ansatzes erfolgte die PCR-Reaktion nach folgendem Protokoll:

94°C 2 Min	Inaktivierung der AMV-RT	
94°C 1 Min.	Denaturierung	
60°C 1 Min.	Anlagerung der Startermoleküle	~ (s.Tabelle unten)
72°C 90 Sek.	Elongation	

72°C 15 Min. Endsynthese

4°C ∞ Lagerung

Amplifiziertes Produkt	Basenpaarlänge des PCR-Produktes	Spezifischer Sinnstarter	Spezifischer Gegensinnstarter	Optimale Zyklenzahl
hCx31 wt	316 bp	SV40-hin	hCx31-rück	35
G12R	252 bp	CMV-hin	hCx31-rück	35
C86S	252 bp	CMV-hin	hCx31-rück	35

Als interner Standard wurde β -Actin gewählt, um Variationen in der Effizienz der reversen Transkription und des RNS-Abbaus bei verschiedenen Proben in Betracht zu ziehen.

3.6 Agarosegel-Elektrophorese von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden im Agarosegel unter konstanter Spannung aufgetrennt. Je nach Länge der zu trennenden Nukleinsäurefragmente wurden Agarosekonzentrationen von 0,8% bis 2% eingesetzt. Die Nukleinsäurefragmente wurden durch Zugabe von Ethidiumbromid (0,5 μ g/ml), welches in die DNS interkaliert, unter UV-Licht sichtbar gemacht. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben mit 1/5 Vol. 6x Ladepuffer versetzt. Zur Größenbestimmung der zu trennenden Fragmente wurde ein, ebenfalls mit entsprechender Konzentration Ladepuffer versetzter, DNS-Größenstandard aufgetragen.

3.7 Kultur und Transfektion von Kulturzellen

Alle Arbeiten zur Kultivierung von Zellen wurden in Steril-Bänken mit Laminarluftstrom (BDK) nach gängigen Methoden der Zellkultur durchgeführt. Die Zellen wurden in Brutschränken (Heraeus) bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre und bei 10% CO₂ inkubiert.

3.7.1 Kultivierung von adhärennten Zellen

HeLa-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco BRL) kultiviert, welches mit 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin und 10% fötalem Kälberserum (= D10-Medium) supplementiert wurde.

3.7.2 Transfektion von Kulturzellen

3.7.2.1 Stabile Transfektion mittels Lipofektion

Die Transfektion von HeLa-Zellen wurde mit einem kationischen Liposomen-Reagenz (Tfx20, Promega) (Felgner et al., 1989) durchgeführt.

Am Tag vor der Transfektion wurden die zu transfizierenden Zellen so auf eine 100 mm Kulturschale ausplattiert, daß sie am Tag der Transfektion eine Dichte von 60% aufwiesen. 10 µg der zu transfizierenden DNS wurden mit 6 ml Medium gut gemischt. Anschließend wurden 60 µl gut gemischtes Tfx-20-Reagenz hinzugegeben (Verhältnis Tfx-20: DNS = 3:1). Der Ansatz wurde auf dem Strudelmischer gemischt und 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde die Schale mit den zu transfizierenden Zellen zweimal mit PBS⁻(37°C) gewaschen und mit dem Transfektionsansatz (45 Min., 37°C, 10% CO₂) inkubiert. Anschließend wurden zusätzliche 6 ml Medium auf die Schale pipettiert. Nach 16 Stunden Inkubation (37°C, 10% CO₂) wurden die Zellen gewaschen und frisches D10 Medium hinzugegeben. 48 Stunden nach Transfektionsbeginn erfolgte die Selektion der transfizierten Zellen.

3.7.2.2 Stabile Transfektion mittels der Kalziumphosphat-Präzipitation

Bei der Kalziumphosphat-Präzipitation wird die DNS mit Hilfe von Kalziumphosphatkristallen in die Zelle eingebracht (Chen und Okayama, 1987). Am Tag vor der Transfektion wurden die zu transfizierenden Zellen auf eine 100 mm Kulturschale so ausplattiert, daß am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 60% erreicht war. Zur Transfektion wurden 20 µg zirkuläre Plasmid-DNS mit 500 µl CaCl₂-Lösung vermischt. Dazu wurden tropfenweise unter ständigem Schütteln 500 µl 2x BBS-Puffer gegeben und der gesamte Ansatz wurde anschließend gut gemischt. Nach

einer Inkubation von 15 Min. bei RT wurde das Kalziumphosphat/DNS-Gemisch tropfenweise in das Medium der zu transfizierenden Zellen (Verhältnis Kalziuruphosphat/DNS: Medium = 1: 10) pipettiert. Die Zellen wurden 16 Stunden bei 5% CO₂ (37°C) inkubiert. Dadurch bildete sich ein feinkörniges Präzipitat, welches von den Zellen gut aufgenommen werden konnte. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS- (37°C) gewaschen und weiter in D10-Medium kultiviert. 48 Stunden nach Transfektionsbeginn erfolgte die Selektion der Zellen.

3.7.2.3 Selektion der transfizierten Kulturzellen

Die Zellen wurden durch Trypsinbehandlung abgelöst, zentrifugiert (Heraeus, 800 UpM, 10 Min., RT) und in verschiedenen Konzentrationen auf 100 mm-Kulturschalen mit dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert (Puromycin: 1 µg/ml Medium, Zeozin: 125 µg/ml Medium, Puromycin/Zeozin: 1 µg/ml bzw. 100 µg/ml Medium). Das Medium wurde nach Bedarf gewechselt.

Resistente Klone wurden 2 - 3 Wochen nach der Transfektion durch Abschaben mit einer 200 µl Pipette vereinzelt und in eine 48-Well-Schale (Falcon) mit dem entsprechenden Selektionsmedium überführt und expandiert.

3.8 Nachweis von Proteinen

3.8.1 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse

Die Kulturzellen wurden auf zuvor angeätzten, sterilen Deckgläschen zwei Tage bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS⁺ (4°C) gewaschen und mit absolutem Ethanol (Merck, -20°C, 5 Min.) bei RT fixiert. Anschließend erfolgten ein weiterer Waschschrift mit PBS⁺ und zwei Waschschrift mit PBS⁺/0,1% BSA. Die Zellen wurden 1 Stunde mit 20 µl der Antikörperlösung inkubiert (RT). Nach dreimaligem Waschen mit PBS⁺/0,1% BSA erfolgte eine weitere Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1 Stunde, abgedunkelt, RT). Danach wurden die Zellen viermal mit PBS⁺ und zweimal mit H₂O bidest gewaschen und auf vorbereiteten Objektträgern

mit einem Tropfen Permafluor (Beckman-Coulter) oder p-Phenylendiamin eingebettet. Falls die Einbettung mit p-Phenylendiamin erfolgte, wurden die Präparate später mit Entellan (Merck) montiert.

3.8.2 Herstellung von Zelllysaten

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 - 90% in Kulturschalen zwei Tage inkubiert. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBS⁻ (RT) gewaschen, die Kulturschalen auf Eis gestellt und es folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS⁻ (4°C). Anschließend wurden die Zellen mit 33 μ l (35 mm-Kulturschale) bzw. 100 μ l (60 mm-Kulturschale) SDS Probenpuffer oder Tris-SDS-Puffer lysiert, mit einem sterilen Gummischaber von der Kulturschale abgelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden in einem Ultraschallbad (4°C) behandelt und gegebenenfalls wurden 5 μ l für eine Proteinbestimmung abgenommen. SDS-Probenpuffer-Lysate konnten direkt für eine SDS PAGE eingesetzt werden, Tris-SDS-Lysate wurden mit 0,33 Vol. 4x SDS Probenpuffer versetzt und anschließend im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.8.3 Subzelluläre Fraktionierung von Zellen

Nach der Herstellung von Zellhomogenaten aus Kulturzellen können diese durch verschiedene Zentrifugationsschritte in subzelluläre Fraktionen aufgetrennt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellen in eine Membran-, eine Kern- und eine cytoplasmatische Fraktion aufgetrennt.

Die Kulturzellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 - 90% zwei Tage in 100 mm Kulturschalen herangezogen. Zur Herstellung der Homogenate wurden die Schalen auf Eis gestellt, das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit PBS⁻ (4°C) gewaschen. Nach Zugabe von 1 μ l Homogenisierungspuffer wurden die Zellen vorsichtig mit einem Gummischaber von der Kulturschale abgelöst. Nach Überführung in ein 2 ml Reaktionsgefäß wurden die Zellen mit einer 1 ml Spritze und einer 22-

Gauge-Kanüle durch 25-maliges Aufziehen und Herausdrücken homogenisiert. Von dem Homogenat wurden 30 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und davon 5 µl zur Proteinbestimmung abgenommen. Der Rest des Homogenates wurde ebenfalls in ein neues Gefäß überführt, da durch die Homogenisierung mit der Kanüle das Röhrchen beschädigt sein könnte.

Von dem Zellhomogenat wurde zunächst die Kernfraktion durch Zentrifugation abgetrennt (Sigma, 2000 UpM, 10 Min., 4°C). Das dabei entstandene Pellet enthielt außer den Zellkernen größere Zelltrümmer, intakt gebliebene Zellen und auch geringe Teile der Membranfraktion. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen H₂O bidest versetzt, gemischt und 20 Min. bei 12000 UpM zentrifugiert (Sigma, 4°C). In dem Pellet befand sich nun die Membranfraktion. Der Überstand, in dem sich die cytoplasmatischen Proteine befanden, wurde auf vier Reaktionsgefäße gleichmäßig aufgeteilt und durch Lyophilisieren eingeeengt. Die Pellets wurden jeweils in 50 µl 1 mM EDTA (pH 7,4) aufgenommen, im Ultraschallbad (4°C) homogenisiert und 5 µl wurden zur Proteinbestimmung in ein Proteinbestimmungsröhrchen überführt. Von der cytoplasmatischen Fraktion wurden jeweils 20 µl zur Proteinbestimmung eingesetzt. Die Proben wurden bis zur SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese bei -70°C gelagert.

3.8.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung von Zelllysaten erfolgte mittels eines Bichinchoninic-Säure Reagenziensatzes (Sigma) nach Herstellerangaben. Das Prinzip beruht auf der konzentrationsabhängigen Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) durch Proteine und einer damit verbundenen Farbreaktion.

3.8.5 Metabolische Markierung von Proteinen

3.8.5.1 Markierung mit ³⁵S-Methionin

Die Zellen wurden zwei Tage auf 35 mm-Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 80 - 90% herangezogen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS⁻ (37°C) und einmal Waschen mit Methionin-freiem Medium (MEM with Earle's salt, ohne L-Methionin und L-Glutamin, GibCO) wurden die Zellen 1 Stunde mit 0,5 ml Methionin-freiem Medium, welches mit 10% FCS (dialysiert gegen 0,9% NaCl) und Glutamin supplementiert war, bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden 100 µCi (³⁵S-Methionin)/ml Medium hinzugegeben und die Zellen weitere 4 Stunden unter ständigem leichtem Schwenken inkubiert (37°C, 10% CO₂). Im Anschluß daran wurden die Zellen lysiert. Zur Lyse der Zellen wurden sie nach der radioaktiven Markierung zweimal mit DMEM-Medium, PBS⁻ (RT) gewaschen, die Kulturschalen wurden anschließend auf Eis gestellt und ein weiteres Mal mit PBS⁻ (4°C) gewaschen. Die Lysis der Zellen erfolgte durch Zugabe von 250 µl (35 mm-Kulturschale) bzw. 500 µl (60 mm-Kulturschale) Ripa-Lysis-Puffer und Abschaben der Zellen mit einem Gummischaber. Anschließend wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und 20 Min. bei 4°C inkubiert. Währenddessen wurden die Lysate alle 5 Min. gründlich gemischt. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation (Sigma, 13000 UpM, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und konnte entweder direkt zur Immunpräzipitation eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

3.8.5.2 Markierung mit ³⁵S-Methionin für Pulse-Chase-Experimente

Die Behandlung der Zellen erfolgte auf die gleiche Weise wie unter 3.9.5.1. Nach Zugabe von 100 µCi (³⁵S-Methionin)/ml Medium wurden die Zellen 1 Stunde unter leichtem Schwenken inkubiert (37°C, 10% CO₂) (= Pulse). Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 1x Methionin-supplementiertem D10-Medium gründlich gewaschen und in D10 Medium weiter kultiviert (37°C, 10% CO₂) (= Chase). Die Lysis der Zellen erfolgte nach 0, 1, 2, 4, 6 und 8 Stunden.

3.8.6 Immunpräzipitation

250 μ l des Überstandes (s. 3.9.5.3) der metabolisch mit ^{35}S -Methionin oder ^{32}P -ortho-Phosphat markierten Zellen wurden mit 40 μ l Sepharose CL-4B (in TBS, Amersham Pharmacia Biotech) gemischt und 2 Stunden bei 4°C drehend inkubiert. Nach der Zentrifugation (Sigma, 5500 UpM, 2 Min., 4°C) wurden 5 μ l des Überstandes zur Proteinbestimmung abgenommen und der Rest des Überstandes zu einem Gemisch aus 10 μ l Protein A-Sepharose CL-4B (in TBS, Amersham Pharmacia Biotech) und Antikörper gegeben. Der Ansatz wurde gemischt und üN drehend inkubiert (4°C). Die entstandenen Protein A-Antikörper-Antigen-Komplexe wurden sedimentiert (Sigma, 6000 UpM, 2 Min., 4°C) und dreimal mit je 500 μ l Ripa-Waschpuffer und einmal mit H₂O bidest (jeweils 4°C) gewaschen. Zwischen den Waschschritten erfolgte je eine Zentrifugation von 2 Min. bei 6000 UpM (Sigma, 4°C). Nach dem letzten Waschschriff mit H₂O bidest erfolgte eine Zentrifugation bei 6500 UpM. Anschließend wurde das Pellet in 15 μ l SDS-Probenpuffer aufgenommen, kräftig gemischt und 5 Min. bei 60°C inkubiert. Es wurde ein weiteres Mal kräftig gemischt und das Pellet bei 13000 UpM 2 Min. abgetrennt. Der gesamte Überstand wurde direkt zur SDS-PAGE eingesetzt.

3.8.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine werden in einem SDS-haltigen Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Gele wurden nach Laemmli (1970) hergestellt und ermöglichen die Auftrennung von Proteinen im Bereich von 10 - 100 kDa. Man unterscheidet Trenn- und Sammelgel.

Die Trenngele bestanden aus 10%, die Sammelgele aus 5% Polyacrylamid. Die Geldicke betrug immer 1,5 mm. Die aufzutragenden Proben waren direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen worden oder wurden vor dem Auftragen mit 0,33 Vol. 4x SDS-Probenpuffer versetzt. Direkt vor dem Auftragen wurden die Proben mit Ultraschall behandelt. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA/Gel (Sammelgel) bzw. 25 mA/Gel (Trenngel) und kontinuierlicher Kühlung (10°C). Nach der Auftrennung der Proteine wurde das Gel entweder direkt für den Elektrolot verwendet oder, wenn die Proteine zuvor metabolisch mit ^{35}S -Methionin oder ^{32}P -ortho-

Phosphat markiert worden waren, jeweils 20 Min. in Fixierlösung und Amplify (Amersham Pharmacia Biotech) unter Schwenken inkubiert. In diesem Fall wurden die Gele im Anschluß direkt getrocknet (Gel-dryer, Model 583, Bio-rad) und autoradiographiert.

3.8.8 Immunoblot-Analyse

Nachdem die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt worden sind, können sie im elektrischen Feld (Elektroblot) auf eine Trägermembran transferiert werden (Sambrook et al., 1989). Das Gel wurde direkt nach der SDS-PAGE für den Elektroblot eingesetzt. Die Proteine wurden bei konstanter Spannung von 100 V auf eine Nitrocellulosemembran (0,45 µm, Schleicher und Schüll) übertragen (4°C, 2 Stunden). Das Gel wurde zur Kontrolle nach dem Blot 2 Stunden mit Coomassie-Färbelösung angefärbt (Wippe, RT). Anschließend erfolgte das Entfernen der unspezifischen Farbreaktionen durch Inkubation mit Coomassie-Entfärber (üN, Wippe, RT). Die Entfärbelösung wurde noch weitere zwei Male gewechselt. Der Molekulargewichtsstandard wurde nach dem Elektroblot von dem Rest der Membran abgeschnitten und entweder direkt getrocknet (farbig markierter Standard) oder 5 Min. in Ponceau S-Färbelösung inkubiert, um die Proteine anzufärben. Um in diesem Fall unspezifische Färbungen zu entfernen, wurde der Marker zweimal mit H₂Odeion gewaschen. Bei beiden Verfahren wurden nach dem Trocknen die Proteinbanden mit einem Bleistift markiert. Der andere Teil der Membran wurde 2 Stunden unter ständigem Schwenken mit Roti[®] Block (Carl Roth) abgesättigt (RT). Anschließend erfolgte eine Inkubation in einem Antikörper/Roti[®]-Block-Gemisch (üN, Wippe, RT). Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran am darauffolgenden Morgen zweimal jeweils für 30 Min. mit Roti[®]-Block gewaschen (Wippe, RT). Bei der anschließenden Inkubation mit ¹²⁵I-Protein A in Roti[®]-Block (2 Stunden Wippe, RT) konnte das Protein A an den Antikörper binden. Unspezifische Bindungen wurden durch viermaliges Waschen (jeweils 30 Min., Wippe, RT) entfernt. Nach dem Trocknen der Membran erfolgte die Autoradiographie.

3.9 Mikroinjektion

Zum Nachweis funktionsfähiger Gap Junction-Kanäle werden Fluoreszenzfarbstoffe (Lucifer Yellow, Molecular Probes) oder Indikatormoleküle (Neurobiotin, Vektor Laboratories) in eine Zelle injiziert und die Ausbreitung dieser Substanzen in die Nachbarzellen wird entweder direkt verfolgt oder indirekt über eine Farbreaktion nachgewiesen.

Die Mikroinjektion wurde an dem inversen Mikroskop IM53 von Zeiss (Fluoreszenzeinrichtung Zeiss HBO 100 W) durchgeführt. Die Injektionskapillaren (Borosilikatglas Kwik-Fil, World Precision Instruments) wurden mit einem Kapillarenziehgerät (P-97, Sutter Instruments) zu einem Spitzendurchmesser von 1 - 2 μm gezogen. Die Kapillaren wurden luftblasenfrei mit der zu injizierenden Substanz und einer Elektrolytflüssigkeit gefüllt. Anschließend wurden die Kapillaren in einen Mikroelektrodenhalter (EH-IS, Sachs) eingesetzt. Der Mikroelektrodenhalter war an einem steuerbaren Mikromanipulator befestigt (Injectman, Eppendorf). Die Injektion erfolgte durch Iontophorese. Während der Injektion standen die Zellkulturschalen auf einer beheizbaren Platte (37°C, Heizgerät TRZ 3700, Zeiss).

Die Zellen wuchsen auf 60 mm-Kulturschalen 2 Tage bis zur Konfluenz.

3.9.1 Mikroinjektion von Neurobiotin

Die Injektion von Neurobiotin erfolgte durch Anlegen eines Stroms von -20 nA für ca. 10 Sek. Als Elektrolytlösung wurde 1 M KCl verwendet. Der Erfolg der Injektion wurde durch gleichzeitige Injektion von Rhodamin-Isothiocyanat-Dextran kontrolliert (Filter BP 530-585, FT 600, LP 615), welches nicht durch Gap Junction-Kanäle difundieren kann. Nach 15 Min. wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden dreimal mit PBS⁻ (RT) gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen 5 Min. mit 1%iger Glutaraldehydlösung inkubiert (RT). Nach dreimaligem Waschen mit PBS⁻ (RT) wurden die Zellmembranen 2 Stunden mit 2%iger Triton X-100-Lösung permeabilisiert. Die Triton X-100-Lösung wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS⁻ (RT) entfernt.

Das Neurobiotin wurde anschließend mit einer Farbreaktion sichtbar gemacht. Dazu wurden die Zellen 90 Min. mit Meerrettich-Peroxidase-Avidin-Lösung (5 µg/ml) inkubiert. Die unspezifisch gebundene Peroxidase wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS⁻ (RT) entfernt. Die Farbreaktion erfolgte dann mit einer DAB-Färbelösung (30 Sek., RT) und wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS⁻ (RT) gestoppt. Die gefärbten Zellen konnten anschließend unter dem Mikroskop ausgezählt werden.

3.9.2 Mikroinjektion von Lucifer Yellow

Zur Injektion von Lucifer Yellow wurde als Elektrolytflüssigkeit LiCl verwendet. Die Injektion von Lucifer Yellow erfolgte durch Anlegen eines Stroms von +20 nA für ca. 10 Sek. Nach 2 Min. wurde die Zahl der durch Diffusion gefärbten Nachbarzellen im UV-Licht (Filter BP 395-440, FT 460, LP 470) direkt ausgezählt.

3.9.3 DiI/Calcein-Kopplung

Heterotypische Kopplung zwischen verschiedenen Gap Junction-Kanälen sollen anhand der Calcein-Diffusion mit DiI markierten Zellen bestimmt werden (modifiziert nach Goldberg et al., 1995). Dafür wurden die Zellen zweimal mit PBS⁻ gewaschen und 30 Min. mit 1 ml der DiI/Calcein-Lösung (9 µM DiI und 5 µM Calcein/ml 0,3 M Glucoselösung) inkubiert (37°C, 10% CO₂). Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit isotonischer Glucoselösung gewaschen, trypsinisiert, zentrifugiert (Hereaus, 800 UpM, RT) und nach dem Resuspendieren markierten Zellen auf eine 35 mm-Kulturschale so ausplattiert, dass die zu markierten Zellen von nicht markierten Zellen umgeben waren.

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung und Charakterisierung der Doppeltransfektanten von menschlichem Cx31 und seinen Mutanten

Verschiedene Punktmutationen im Cx31-Gen wurden in Patienten mit der Hautkrankheit Erythrokeratoderma variabilis (EKV) nachgewiesen (Richard et al. 1998, 2000). Die Mutationen wurden auf den verschiedenen Domänen des Cx31-Gens verteilt gefunden. In dieser Arbeit wurden 2 Punktmutationen des Cx31-Gens, G12R und C86S näher untersucht (s. Abb. 4-1). Weil beide Mutationen an gleichen Stellen ebenfalls im Cx26- und Cx32-Gen vorkommen, war anzunehmen, dass die evolutionäre Konservierung dieser Aminosäuren auf eine strukturelle Notwendigkeit zurückzuführen ist. Um den Zusammenhang zwischen diesen Mutationen und der Hautkrankheit EKV zu untersuchen, sollte die mutierte menschliche Cx31-cDNS in HeLa-Zellen transfiziert werden und die Funktionsunterschiede der Connexine im Vergleich zu dem Cx31-Wildtyp-Protein ermittelt werden. Dazu wurden die mutierten menschlichen Cx31-cDNSs, hCx31G12R und hCx31C86S mittels der zielgerichteten Mutagenese mit PCR-Fragmenten hergestellt und in den eukaryontischen Expressionsvector pBEHpac18 kloniert. Nachdem die mutierte cDNS von Cx31 in HeLa-Zellen stabil transfiziert wurde, konnte festgestellt werden, dass die mutierten hCx31G12R-Proteine an die Plasmamembranen transportiert werden und erhöhten Neurobiotin-Transfer ermöglichen. Weiterhin hat die Expression der mutierten hCx31G12R-Proteine einen letalen Effekt auf HeLa-Zellen, so dass positive Klone nach der Expression der mutierten Cx31-Proteine allmählich abgestorben sind (Diestel et al., 2002).

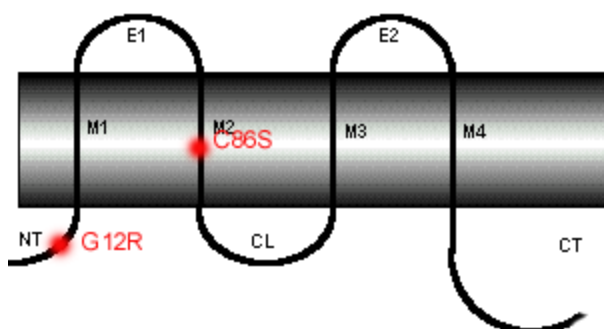


Abb.4-1 Darstellung des Cx31-Proteins und der Positionen der hier untersuchten Mutationen.

Infolgedessen war es unerlässlich, Doppeltransfektanten von menschlichem Cx31-Wildtyp und mutiertem hCx31 herzustellen, um überlebende positive Klone mit mutiertem hCx31 zu bekommen, damit weitere Eigenschaften von mutierten Kanälen, und ein möglicher gegenseitiger Einfluss von hCx31-Wildtyp-Proteinen auf mutierte hCx31-Proteinen untersucht werden konnten. Da das Cx31 in den Epidermis-Zellen mit Cx43 koexprimiert wird und die Hautkrankheit EKV genetisch rezessiv vererbt wird (Richard et al., 2000), wurde auch die Doppeltransfektante von Cx43 und mutiertem Cx31G12R hergestellt, um transdominante Effekte der Mutante auf die Funktion von Cx43-Wildtyp-Proteinen und eine mögliche Kompensation des Cx43 für das mutierte Cx31 zu untersuchen.

4.1.1 Herstellung der Doppeltransfektanten von menschlichem Cx31 und seinen Mutanten

4.1.1.1 Umklonierung der Cx31G12R-, Cx31C86S-cDNS in den Expressionsvektor pcDNA3.1zeo und Transfektion in HeLa hCx31-Zellen

Da die HeLa hCx31-Transfektante ein Puromycin-Resistenzgen trägt und mit Puromycin selektioniert worden ist, wurde die kodierende Sequenz der hCx31G12R- bzw. hCx31C86S in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1zeo mit einem Zeocin-Resistenzgen der Firma Invitrogen kloniert.

Dazu wurden die kodierenden Sequenzen des menschlichen Cx31-Gens mit den entsprechenden Punktmutationen mittels der Restriktionsendonuklease *EcoRI* aus dem Plasmid pBEHpac18 ausgeschnitten und in den mit *EcoRI* gespaltenen Expressionsvektor pcDNA3.1zeo ligiert. Die Inserts wurden zur Überprüfung der gewünschten Mutationen (G12R, C86S) nach der PCR-Mutagenese von der Firma SeqLab sequenziert. Die richtige Orientierung der Inserts wurde durch Restriktionen mit mehreren verschiedenen Restriktionsendonukleasen überprüft. Die detaillierten Plasmidkarten zu den umklonierten Sequenzen befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

Als Ausgangszellen für die Doppeltransfektante wurde der Klon hCx31/38 (Diestel et al. 2002) stabil mit dem eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1zeo/hCx31G12R bzw. pcDNA3.1zeo/hCx31C86S mit Hilfe der Lipofektin-Methode transfiziert.

Als Transfektionskontrolle wurde zusätzlich der Vektor pcDNA3.1zeo ohne Insert gleichzeitig in dieselbe HeLa-Transfektante HeLa hCx31/38 transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit Puromycin (Konz. 1µg/ml) und Zeocin (Konz. 100µg/ml) doppelt selektioniert. Bereits nach 2 Wochen konnten Klone identifiziert und vereinzelt in dem Selektionsmedium mit Puromycin und Zeocin weiter kultiviert werden.

4.1.1.2 Herstellung des Fusionsproteins hCx31-eGFP und der Doppeltransfektante

Da die untersuchten Mutationen von menschlichem Cx31 Punktmutationen waren, konnten die mutierten Cx31-Proteine nicht von Wildtyp Proteinen aufgrund ihrer molekularen Größe unterschieden werden. Deshalb wurde ein Fusionsprotein hCx31-eGFP mit Hilfe eines Startermolekülpaars und einer PCR-Reaktion hergestellt. Die gesamte kodierende Region der menschlichen Cx31-cDNS wurde mit Hilfe der Startermoleküle hCx31*Bgl*III und hCx31*Hind*III unter Einführung der *Bgl*III- und *Hind*III-Schnittstelle amplifiziert. Gleichzeitig wurde das Stopcodon von Cx31 deletiert, so dass durch eine durchgehende Translation die Fusion des Cx31-Proteins mit dem eGFP ermöglicht wird. Nach einer Spaltung der PCR-Produkte mit *Bgl*III und *Hind*III wurden die Fragmente in den eukaryontischen Expressionsvektor pMJgreen kloniert.

Das so konstruierte Plasmid pMJGreen/hCx31eGFP wurde stabil mit Hilfe der Lipofektin-Methode in die HeLa Wildtyp-Zellen transfiziert.

Nachdem positive Klone unter dem Lichtmikroskop mit UV-Licht (488 nm) identifiziert werden konnten, wurden diese Klone in dem Selektionsmedium mit Puromycin kultiviert und die zweite Transfektion vorbereitet. Als Ausgangszellen für die Doppeltransfektante wurde der Klon hCx31-eGFP/21 stabil mit dem eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1zeo/hCx31G12R mit Hilfe der Lipofektin-Methode transfiziert. Als Kontrolle für die Transfektion wurde der Vektor pcDNA3.1zeo ohne Insert parallel in dieselbe HeLa-Transfektante HeLa hCx31-eGFP transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit Puromycin (Konz. 1µg/ml) und Zeocin (Konz. 100µg/ml) doppelt selektioniert.

4.1.2 Charakterisierung der Doppeltransfektanten

4.1.2.1 Charakterisierung der Doppeltransfektanten auf Transkriptionsebene

Da die Proteine der untersuchten Punktmutanten des menschlichen Cx31 nach der molekularen Größe nicht von Wildtyp-Proteinen unterschieden werden konnten, wurde zur Identifizierung positiver Klone und der Bestimmung der Transkriptmenge eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Die Transkripte in den transfizierten Zellen wurden isoliert und mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNS umgeschrieben. Da die cDNS von Cx31-Wildtyp und Mutanten mit unterschiedlichen Vektoren in die Zellen transfiziert wurde, konnten mit Hilfe des spezifischen Hin-Startermoleküls, das an der Sequenz direkt hinter dem SV-Promotor (pBEHpac18) bzw. CMV-Promotor (pcDNAzeo3.1) bindet, und des spezifischen Rück-Startmoleküls, das an der Sequenz der kodierenden Region der Cx31-cDNS bindet, jeweils ein Fragment der cDNS amplifiziert werden. Um die Transkriptmenge quantitativ bestimmen zu können, wurde erst die PCR-Reaktion mit Plasmid-DNS mit den gleichen Startmolekülen, wie sie in der isolierten RNS verwendet wurde, durchgeführt, damit die Bindungsaffinität der Hin-Startmolekülen an einander angegeglichen wurde. Als interne Kontrolle der Transkription diente β -Actin.

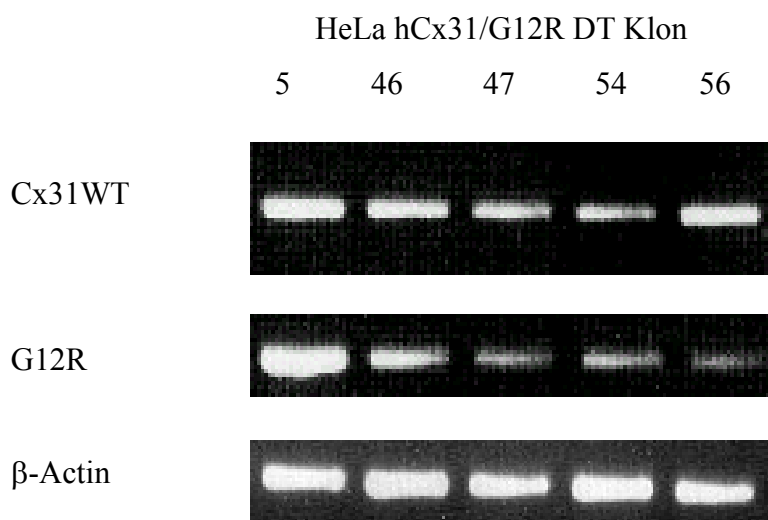


Abb.4-2 Semiquantitative PCR-Analyse der positiven hCx31/G12R Doppeltransfektanten

Bei den Doppeltransfektanten hCx31/G12R wurden 5 positive Klone identifiziert (Abb. 4-2). Die Bandenintensität der Doppeltransfektanten wurde densitometrisch ausgewertet und mit der β -Actin-Bandenintensität abgeglichen. Die abgeglichenen Transkriptmengen der Doppeltransfektanten wurden zu der Cx31 WT-Transkriptmenge in Relation gesetzt. Dabei wurde die Transkriptmenge des Cx31 WT 100% gesetzt. Von den positiven Klonen wurden zwei Klone mit verschiedenen Transkriptmengen von G12R für die weitere Charakterisierung ausgewählt. Klon 5 enthält 110% G12R-Transkript von im Vergleich zu dem hCx31 WT-Transkript. Der andere ausgewählte Klon 56 transkribiert 30% im Vergleich zu dem hCx31 WT.

Bei den Doppeltransfektanten hCx31/C86S wurden 3 positive Klone identifiziert (Abb. 4-3). Die Bandenintensitäten der Doppeltransfektanten wurden densitometrisch ausgewertet und mit der β -Actin-Bandenintensität abgeglichen. Von den positiven Klonen wurden ebenfalls zwei Klone mit verschiedenen Transkriptmengen der C86S-mRNS für die weitere Charakterisierung ausgewählt. Eine der ausgewählten Doppeltransfektanten (Klon 7) enthält 101% Transkript von C86S im Vergleich zu dem hCx31 WT-Transkript. Der andere ausgewählte Klon 9 transkribiert 15% im Vergleich zu dem hCx31 WT.

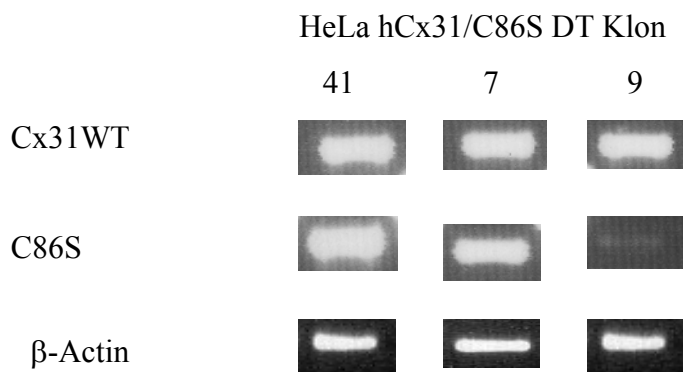


Abb.4-3 Semiquantitative PCR-Analyse der positiven hCx31/C86S Doppeltransfektanten

4.1.2.2 Charakterisierung der Doppeltransfektanten auf Proteinebene

Nach der Bestimmung der Transkriptmengen wurde die Expression der Doppeltransfektanten untersucht, um festzustellen, ob die Transkripte der Doppeltransfektante mit der Proteinmengen korrelieren. Als negative Kontrolle wurde gleiche Menge von HeLa WT-Lysate und als positive Kontrolle von Einfachtransfektanten HeLa hCx31/38-Lysate aufgetragen.

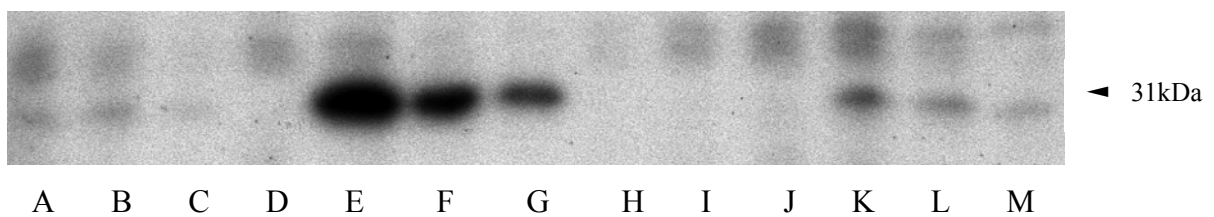


Abb. 4-4 Autoradiogramm der Western Blot-Analyse von den Doppeltransfektanten HeLa hCx31/G12R

A: 50µg HeLa hCx31/38; B: 25µg HeLa hCx31/38; C: 12,5µg HeLa hCx31/38;
 D: 50µg HeLa WT; E: 50µg HeLa hCx31/G12R, Klon 5; F: 25µg HeLa hCx31/G12R, Klon 5;
 G: 12,5µg HeLa hCx31/G12R, Klon 5; H, I, J: negatives Klon von HeLa hCx31/G12R
 K: 50µg HeLa hCx31/G12R, Klon 56; L: 25µg HeLa hCx31/G12R, Klon 56; M: 12,5µg HeLa hCx31/G12R, Klon 56

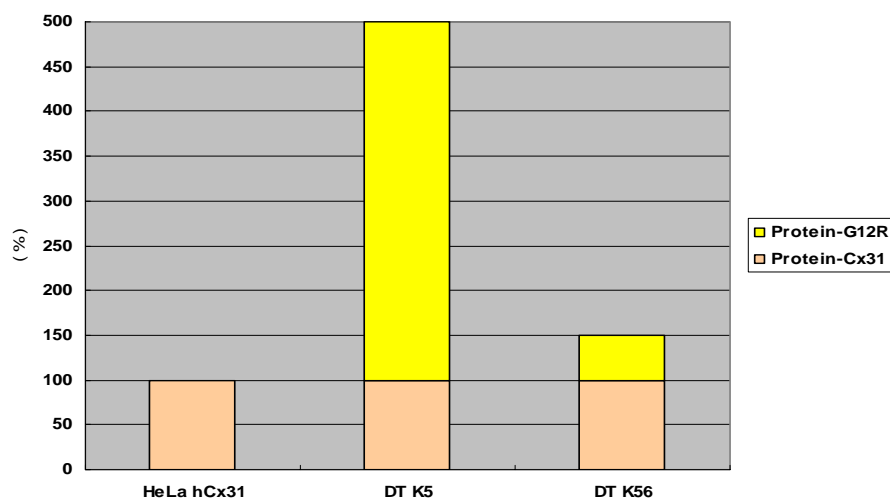


Abb. 4-5 Graphische Darstellung der Proteinmenge nach der Western Blot-Analyse

Abb. 4-4 zeigt das Autoradiogramm der Western Blot-Analyse von den Doppeltransfektanten HeLa hCx31/G12R. Während die Negativkontrolle von HeLa WT keine spezifischen Signale aufwies, zeigt das Autoradiogramm bei der HeLa hCx31 Transfektante eine Bande bei 31 kDa. Um die Proteinmengen zu vergleichen, wurde diese Proteinbandenintensität der hCx31-Transfektante 100 % gleichgesetzt.

Bei allen Doppeltransfektanten von HeLa hCx31/G12R wurde die erwartete 31 kDa-Bande detektiert. Während bei Klon 5 500 % Proteinbandenintensität im Vergleich zu den hCx31-Transfektanten detektiert wurde, wies Klon 56 nur 150 % Bandenintensität auf. Die Werte dieses Immunoblots korrelieren mit den in der RT-PCR ermittelten Werten der Transkriptmengen. Die Umrechnung der Bandenintensität sind in Abb. 4-5 als Diagramm zusammengefasst.

Ebenfalls bei den Doppeltransfektanten HeLa hCx31/C86S wurden die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse im Immunoblot bestätigt. Mit 170 % Proteinmenge bei Klon 7 bzw. 120 % Proteinmenge bei Klon 9 korrelieren die Werte mit den Transkriptmengen (s. Abb. 4-6). Die Umrechnung der Bandenintensität ist in Abb. 4-7 als Diagramm zusammengefasst.

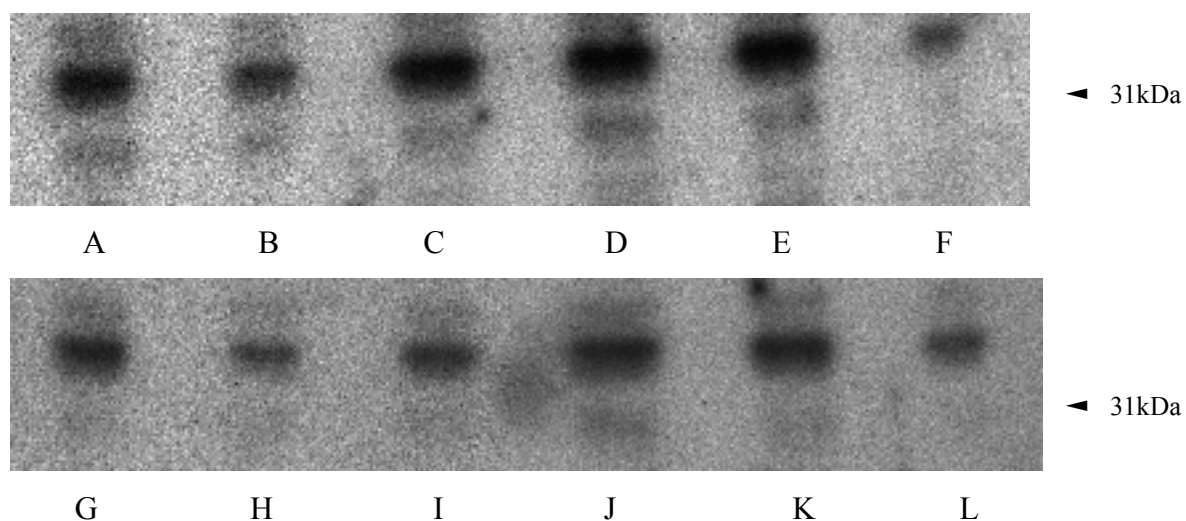


Abb.4-6 Autoradiogramm der Western Blot-Analyse von den Doppeltransfektanten HeLa hCx31/C86S A,G: 50µg HeLa hCx31/38; B,H: 12,5µg HeLa hCx31/38; C,I: 25µg HeLa hCx31/38; D: 50µg HeLa hCx31/C86S, Klon 7; E: 25µg HeLa hCx31/C86S, Klon 7; F: 12,5µg HeLa hCx31/C86S, Klon 7; J: 50µg HeLa hCx31/C86S, Klon 9; K: 25µg HeLa hCx31/C86S, Klon 9; L: 12,5µg HeLa hCx31/C86S, Klon 9

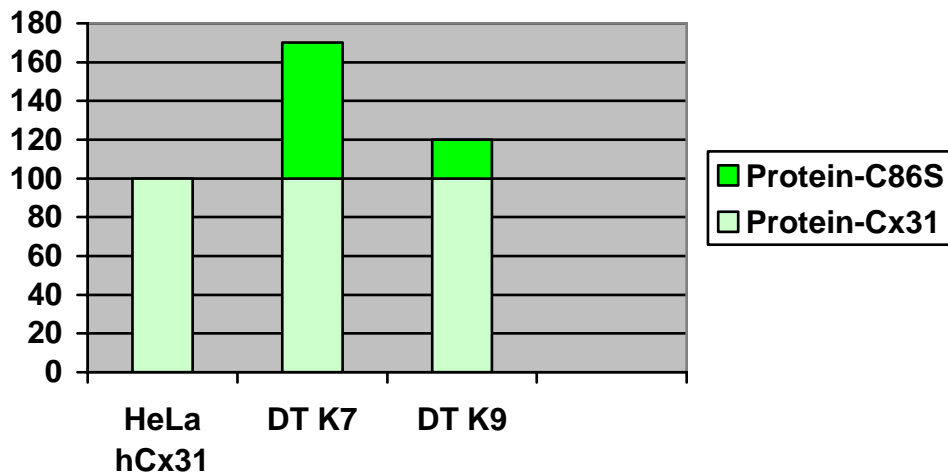
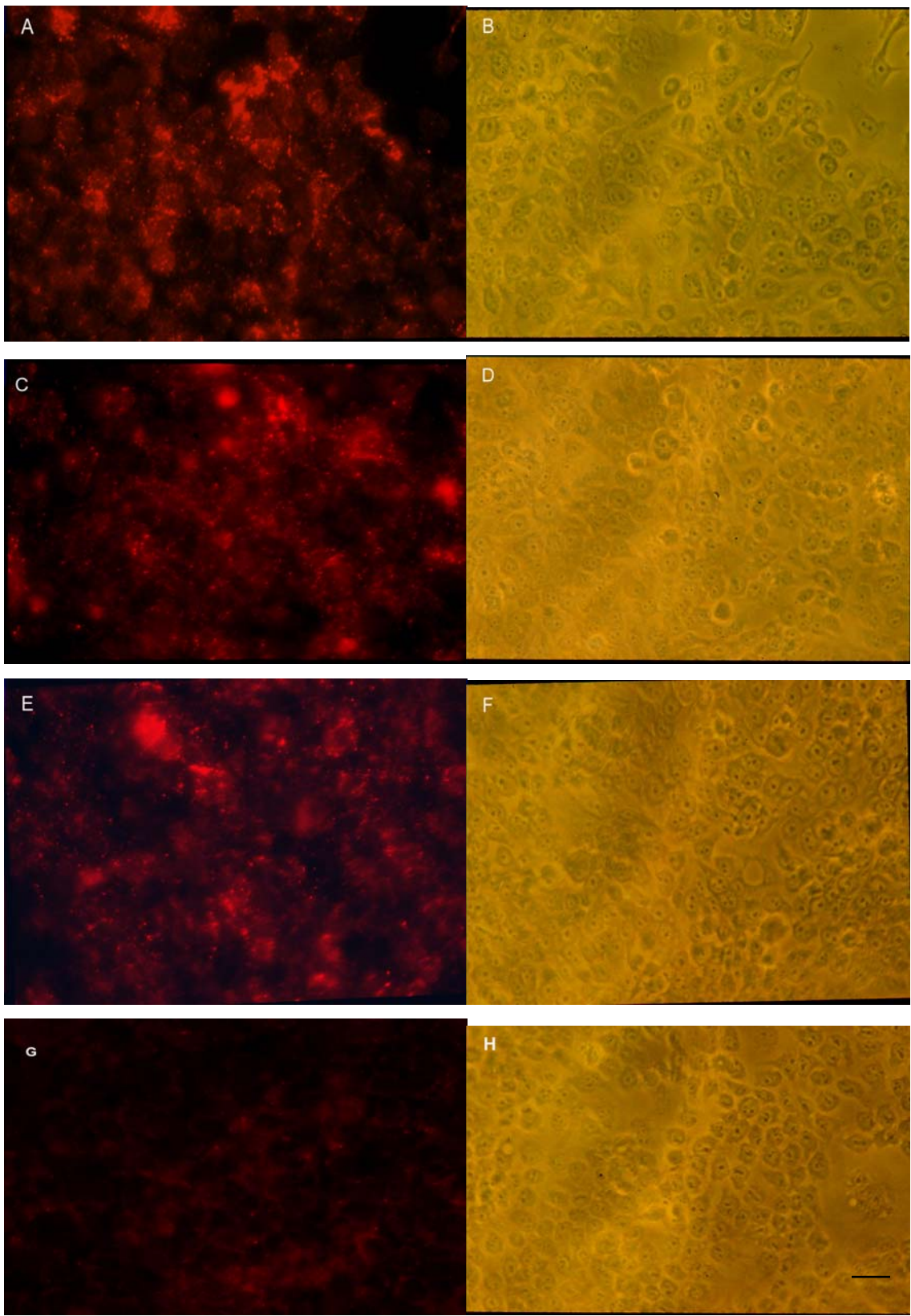


Abb. 4-7 Graphische Darstellung der Proteinmenge nach der Western Blot-Analyse

4.1.2.3 Lokalisierung der Connexine in Doppeltransfektanten

Es wurde schon früher anhand der indirekten Immunfluoreszenz festgestellt, dass die hCx31 WT- und Mutant G12R-Proteine an den Kontaktmembranen lokalisiert sind (Diestel et al., 2002). Die Lokalisation der mutierten Cx31, G12R- und C86S-Proteine wurden durch Immunfluoreszenzanalyse der Doppeltransfektanten überprüft.

Alle Doppeltransfektanten zeigten die für Connexine typischen punktuellen Signale an den Kontaktmembranen benachbarter Zellen (Abb. 4-8). Damit ist gezeigt, dass die Cx31 WT-, sowie die mutierten Proteine auch in den Doppeltransfektanten an die Membranen transportiert wurden. Obwohl mehr Transkripte und Cx31-Proteinmenge bei den Doppeltansfektanten im Vergleich zu HeLa hCx31/38 Transfektanten nachgewiesen waren, konnten in der Immunfluoreszenz-Analyse dennoch keine stärkeren Signale beobachtet werden.



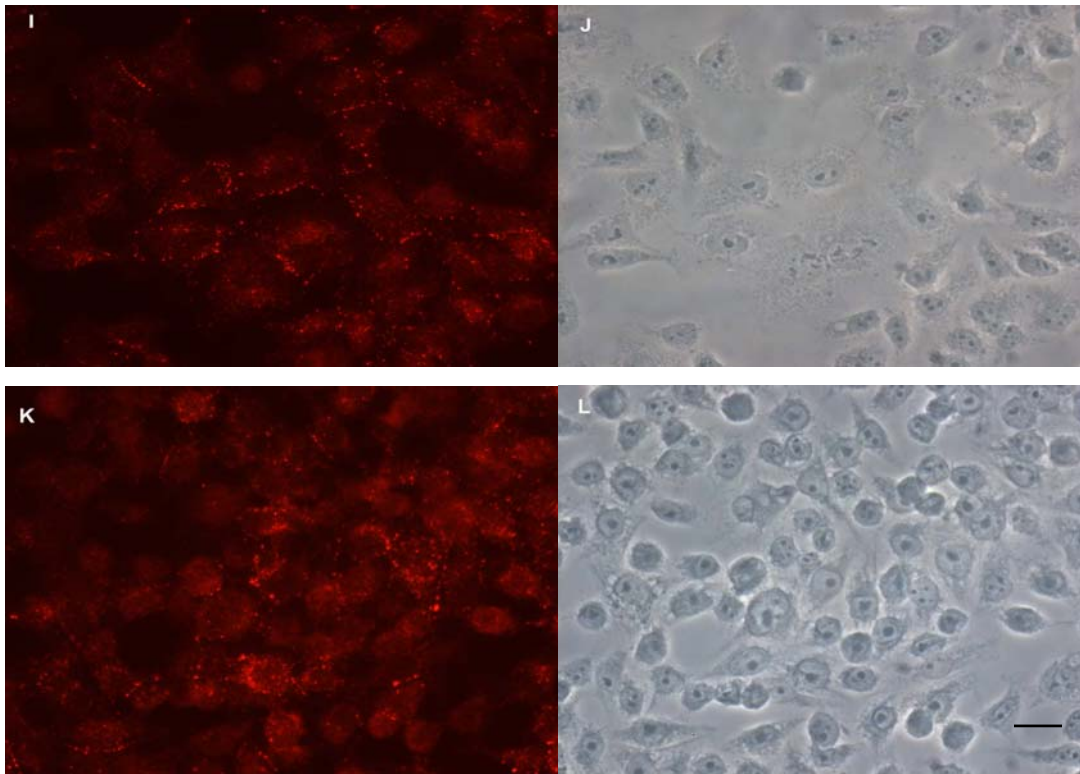


Abb.4-8 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse der Doppeltransfektanten

Immunfluoreszenz mit Antikörper gegen Cx31 und mit sekundären Cy3 Antikörper.

A,B: HeLa hCx31 WT, **C,D:** HeLa hCx31/G12R Doppeltransfektant Klon5

E,F: HeLa hCx31/G12R Doppeltransfektant Klon56

G,H: HeLa WT, **I,J:** HeLa hCx31/C86S Doppeltransfektant Klon7

K,L: HeLa hCx31/C86S Doppeltransfektant Klon9

Balken = 20 μm

4.1.2.4 Funktionsanalyse der Connexine in Doppeltransfektanten

Die Funktion der Gap Junction Kanäle wurde mittels Mikroinjektion von Farbstoffen untersucht. Anhand der Ausbreitung von Farbstoffen in die umliegenden Zellen kann das Maß der Durchlässigkeit von den Gap Junction-Kanälen ermittelt werden.

In die verschiedenen Transfektanten wurde der Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow (MG= 443 Da; Ladung= -2) in eine Zelle injiziert und 3 min. später wurden die gekoppelten Zellen ausgewertet. Alle Doppeltransfektanten transferierten Lucifer Yellow in die benachbarten Zellen im Vergleich zu der HeLa hCx31-WT Transfektante vermehrt (Tab. 4-1, Abb. 4-9). Diese Erhöhung der Kopplung von Doppeltransfektanten ist höher als der Wert, der sich von Western Blot-Analysen bestimmten Cx31-Protein-Menge ergeben sollte. Insbesondere betrug bei Klon 56 der Doppeltransfektanten hCx31/G12R die Gesamtproteinmenge 150% im Vergleich zur HeLa hCx31 Transfektante, während die Kopplung mit Lucifer Yellow auf 294% erhöht war. Bei Klon 9 der Doppeltansfektante hCx31/C86S ergab sich Proteinmenge 120% und Kopplung mit Lucifer Yellow 205%.

Bei Injektion von Neurobiotin (MG= 287 Da; Ladung= +1) wurde die Doppeltransfektante 15 min. lang injiziert und nach Farbreaktion mit Diaminobenzidin wurden die gefärbten Zellen ausgewertet. Die Ausbreitung von Neurobiotin war größer als bei Lucifer Yellow, aber wie bei Lucifer Yellow wurde bei den Doppeltransfektanten eine erhöhte Kopplung beobachtet im Vergleich zur HeLa hCx31 Transfektante (Tab. 4-1, Abb. 4-10). Bei Klon 56 der Doppeltransfektante hCx31/G12R betrug die Kopplung 210% und bei Klon 9 der Doppeltansfektante hCx31/C86S ergab sich eine Kopplung 154% im Vergleich zur Einfachtransfektante. Somit war der Anstieg der Kopplung bei den Doppeltransfektanten bei Lucifer Yellow und Neurobiotin vergleichbar. Diese Erhöhte Kopplung mit Lucifer Yellow und Neurobiotin deutet darauf hin, dass die Cx-Kanaleigenschaft in Doppeltransfektanten von Cx31 WT und G12R, C86S verändert sind. Um die veränderte Kanaleigenschaft zu verdeutlichen, wurden andere Farbstoffe, Ethidiumbromid (MG= 314 Da; Ladung= 1+) und Propidiumiodid (MG= 414 Da; Ladung= 2+) in die Doppeltransfektante injiziert, welche nicht zwischen HeLa Cx31 Transfektanten diffundieren (Elfgang et al., 1995).

	RT-PCR(%)	Proteinmenge(%)	LY		NB	
			gekoppelte Zellen	%	gekoppelte Zellen	%
HeLa hCx31	100	100	3,1±1,45	100	15,3±2,86	100
HeLa hCx31/G12R Klon 5	100/110	500	6,6±2,35	211,3	25,1±5,96	164
HeLa hCx31/G12R Klon 56	100/30	150	9,1±2,13	293,5	32,1±7,83	209,8
HeLa hCx31/C86S Klon 7	100/101	170	5,4±1,90	172,6	23,7±4,09	151,7
HeLa hCx31/C86S Klon 9	100/15	120	6,4±1,78	204,8	24,1±5,08	154,1

Tab.4-1 Mikroinjektionsanalysen der verschiedenen Doppeltransfektanten

Alle gekoppelten Zellen werden nach 3 Min. bzw. 15 Min von der Injektion des Lucifer Yellow (LY) bzw. Neurobiotin (NB) ausgewertet. Alle gekoppelten Zellen bei HeLa hCx31-Transfektant werden 100% gesetzt. Angabe der Werte in % ± SEM.

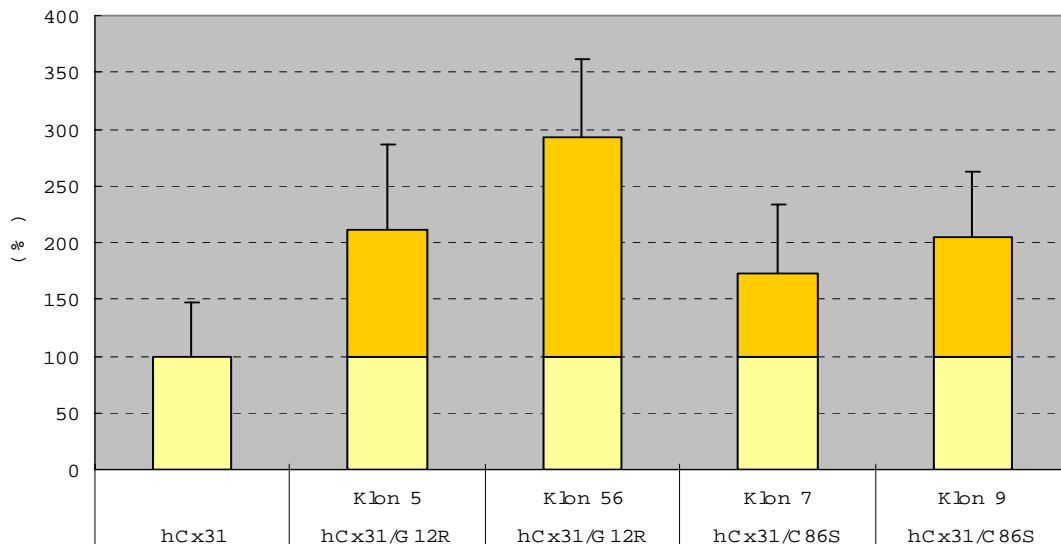


Abb.4-9 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Lucifer Yellow-Diffusion in Doppeltransfektanten nach Mikroinjektion. Der Anteil von G12R bzw. C86S wird mit hellerer Farbe dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Mittelwertabweichung an.

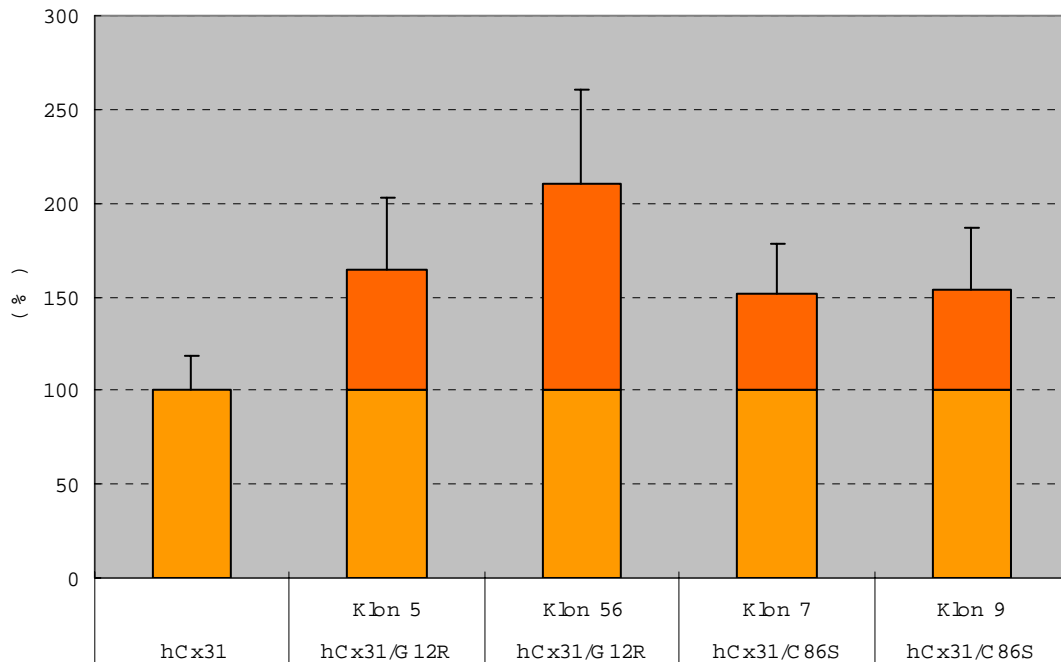
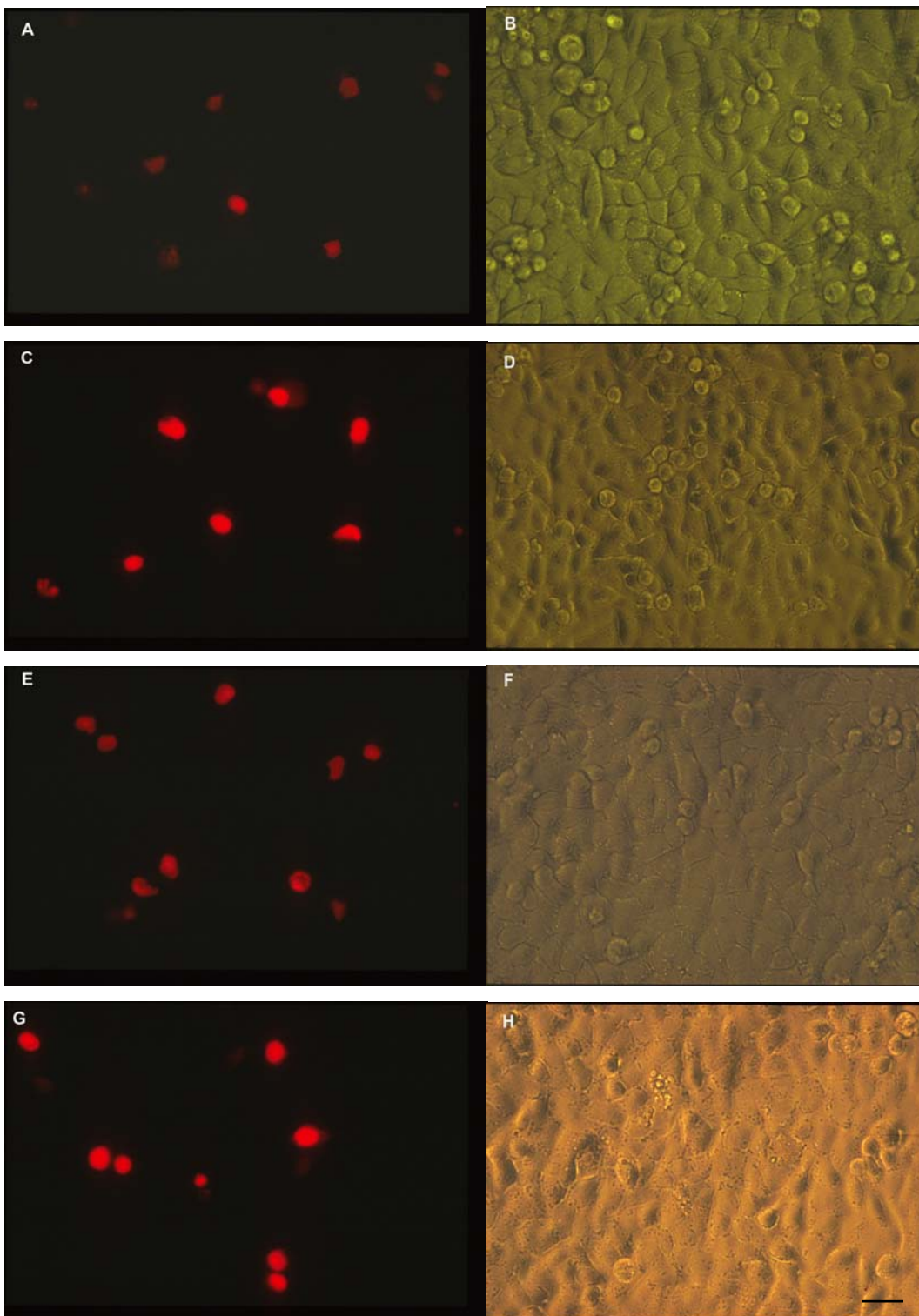


Abb.4-10 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Neurobiotin-Diffusion in Doppeltransfektanten nach Mikroinjektion.

Der Anteil von G12R bzw. C86S wird mit hellerer Farbe dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Mittelwertabweichung an.

Im Gegensatz zu den HeLa hCx31-Einfachtransfektanten wurde eine Farbstoffkopplung von Ethidiumbromid und Propidiumiodid bei den Doppeltransfektanten HeLa hCx31/G12R, HeLa hCx31/C86S festgestellt (Abb. 4-11).

Bei der Mikroinjektionsanalyse mit unterschiedlichen Farbstoffen wurde festgestellt, dass die Connexin-Kanäle in Doppeltransfektanten verändert sind und erhöhte Kopplung aufweisen. Dieser dominant-positive Effekt (gain of function) von mutierten Cx31-Proteinen auf die Funktion der hCx31-WT-Proteine könnte dadurch zustande kommen, dass die hCx31-WT- und die mutierten Proteine entweder heteromere Kanäle in Doppeltransfektanten ausbilden oder bei der Gap Junction-Plaquesbildung die WT- und mutierten Proteine sich gegenseitig beeinflussen.



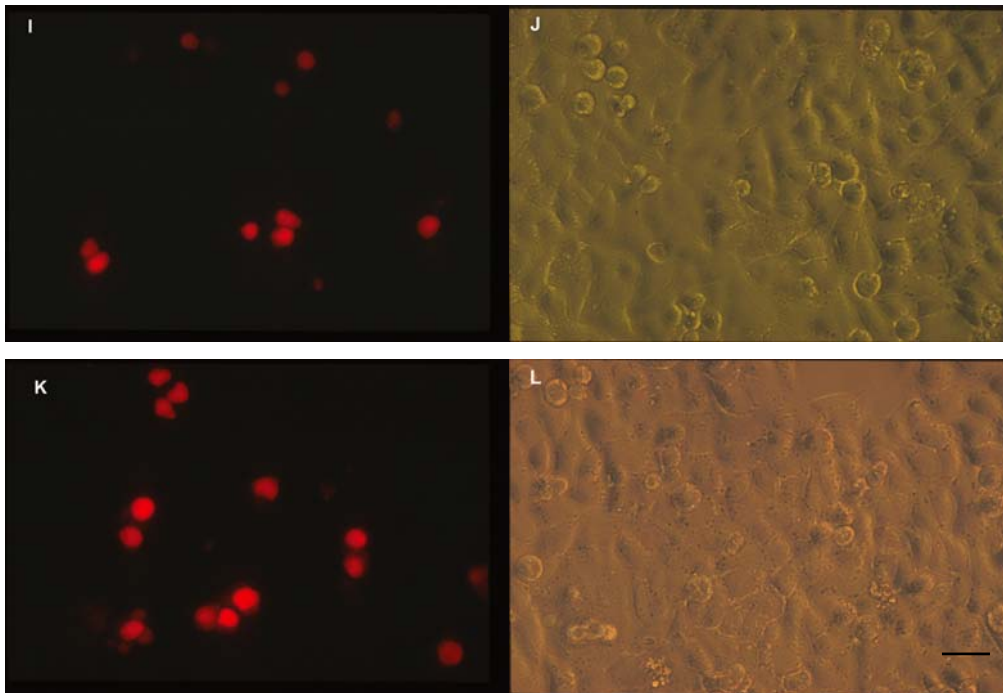


Abb.4-11 Mikroinjektion der Doppeltransfektanten

A,B: Ethidiumbromid-Injektion bei HeLa hCx31WT

C,D: Propidiumiodid-Injektion bei HeLa hCx31WT

E,F: Ethidiumbromid-Injektion bei HeLa hCx31/G12R DT Klon 5

G,H: Propidiumiodid-Injektion bei HeLa hCx31/G12R DT Klon 5

I,J: Ethidiumbromid-Injektion bei HeLa hCx31/G12R DT Klon 56

K,L: Propidiumiodid-Injektion bei HeLa hCx31/G12R DT Klon 56

Balken = 20µm

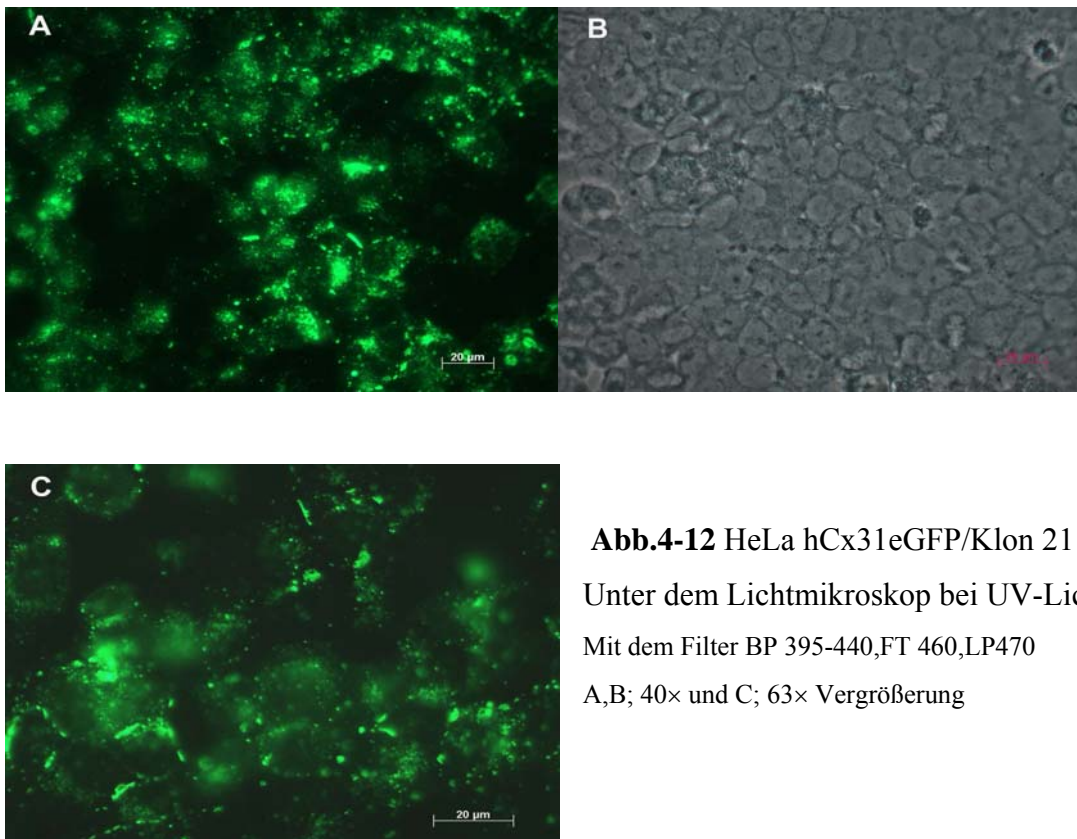


Abb.4-12 HeLa hCx31eGFP/Klon 21
 Unter dem Lichtmikroskop bei UV-Licht
 Mit dem Filter BP 395-440,FT 460,LP470
 A,B; 40× und C; 63× Vergrößerung

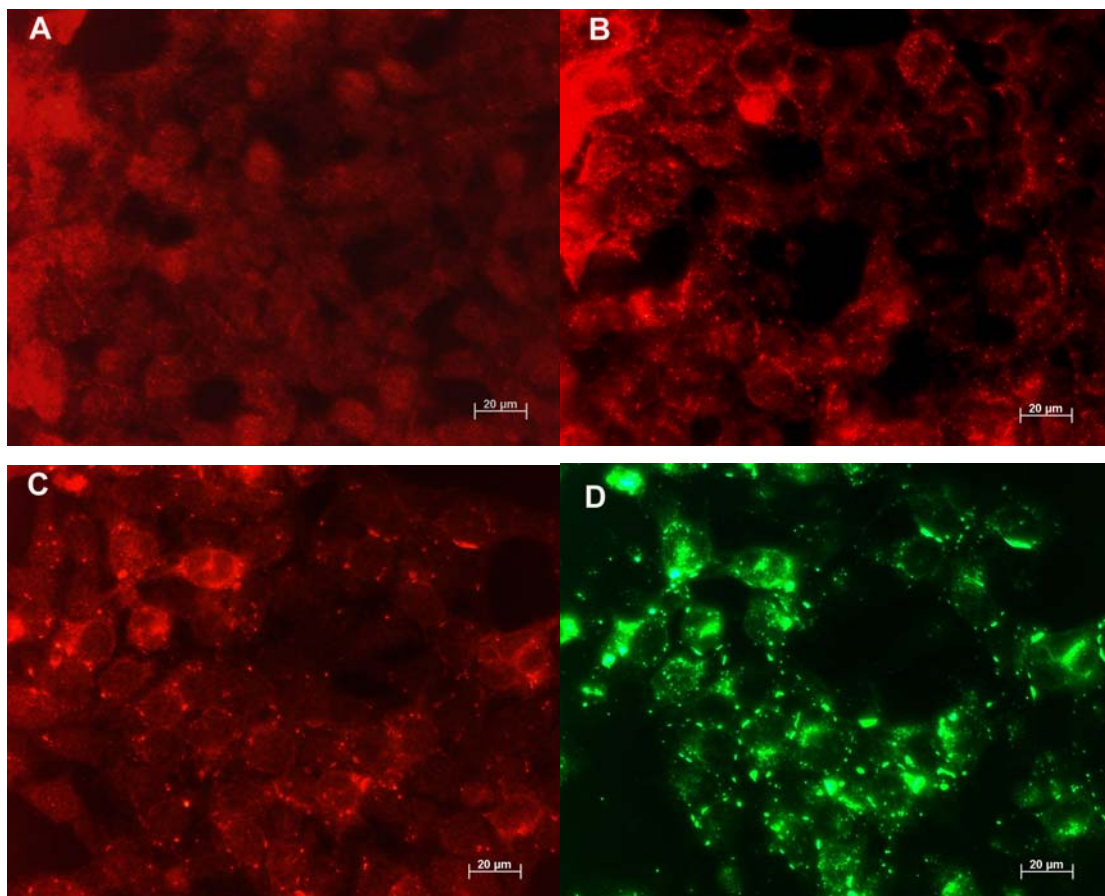
4.1.3 Interaktion zwischen den Connexinen

4.1.3.1 Nachweis der heteromeren Kanäle in Doppeltransfektanten

Da bei mutiertem hCx31 nur ein Nukleotid bzw. eine Aminosäure ausgetauscht war, und sich die mutierten Cx31/G12R- und Cx31 WT-Proteine nach der molekularen Größe nicht voneinander unterscheiden lassen, wurde ein Fusionsprotein hCx31-eGFP wie oben geschrieben (s. 4.1.1.2) hergestellt. Positive Klone wurden unter dem Lichtmikroskop mit UV-Licht (488 nm) identifiziert, von diesen wurde ein Klon (Klon 21) für die Herstellung der Doppeltransfektante ausgewählt (Abb. 4-12). Vor der Herstellung der Doppeltransfektante mit G12R-cDNS wurde die Funktion der Gap Junction-Kanäle von HeLa-hCx31-eGFP-Zellen, Klon 21 durch Mikroinjektionsanalyse mit Lucifer Yellow untersucht. Bei Klon 21 wurde die gleiche Kopplung wie bei HeLa hCx31-Zellen beobachtet (Abb. 4-14). Es zeigt sich, dass sich die Eigenschaften der Cx-

Kanäle von hCx31-eGFP-Fusionsproteinen nicht wesentlich geändert haben im Vergleich zu hCx31-WT-Proteinen.

Um mögliche heteromere Kanäle in den Doppeltransfektanten nachzuweisen, wurde die G12R-cDNS in die HeLa hCx31-eGFP Transfektante, Klon 21 transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit Puromycin (Konz. 1µg/ml) und Zeocin (Konz. 100µg/ml) doppelt selektiert. Die Immunfluoreszenz von positiven Klonen zeigt, dass ein Teil der GFP-Signale mit den IF-Signalen von Cx31-WT- und G12R-Proteinen in Doppeltransfektanten kolokalisiert sind (Abb. 4-13).



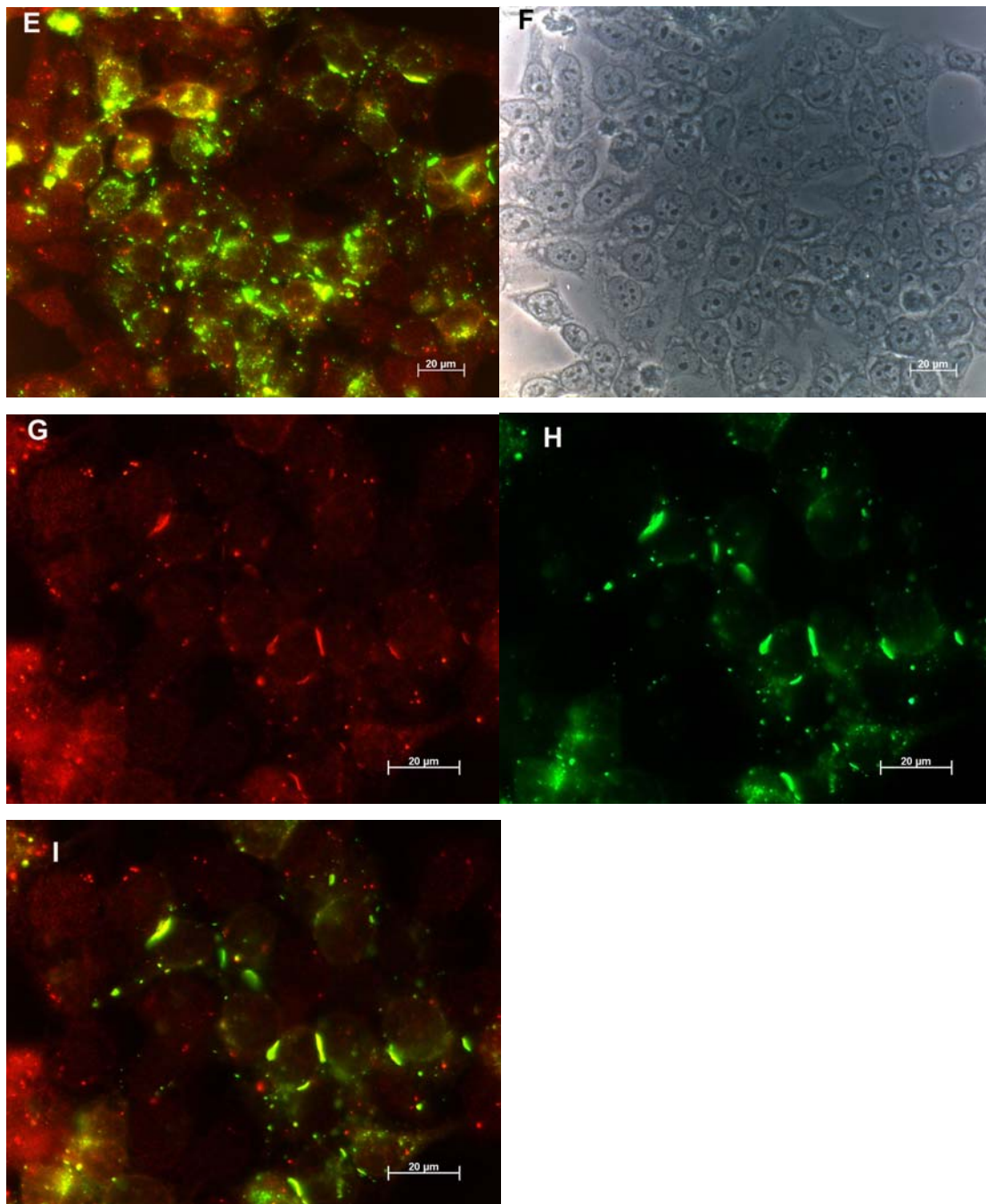


Abb.4-13 Immunfluoreszenz-Analyse von HeLa hCx31eGFP/G12R Klon26

A: HeLa WT; B: HeLa hCx31 WT; C-I: HeLa hCx31eGFP/G12R Klon 26

D,H: Mit dem Filter BP 546, FF 580, CP 590; A,B,C,G: Immunfluoreszenz mit Antikörper gegen Cx31 und mit sekundärem Cy3 Antikörper mit dem Filter BP 450-490, FF 510, CP 515-565

E,I: Doppelbelichtung der Immunfluoreszenz; A-F: 40× und G-I: 63× Vergrößerung

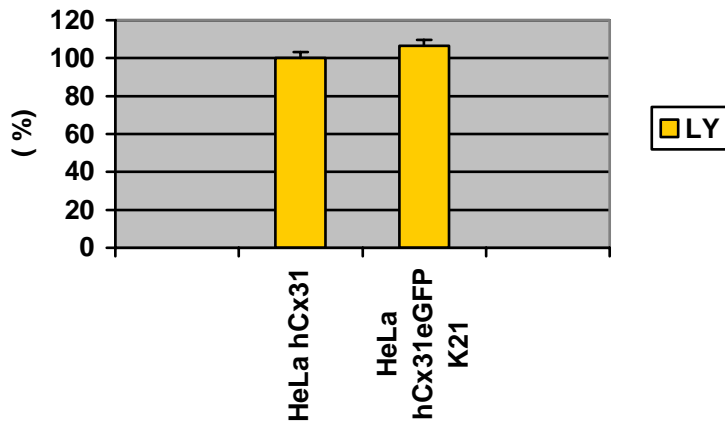


Abb.4-14 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Lucifer Yellow-Diffusion in HeLa-Transfektanten nach Mikroinjektion.

Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

4.1.3.2 Kompensation des mutierten Cx31 durch Cx43 Wildtyp

Da die Cx31- und Cx43-Proteine in den Keratinozyten koexprimiert werden, wurden Doppeltransfektanten von Cx43-WT und Cx31-G12R hergestellt und charakterisiert, um den Effekt von Cx31-Mutationen in den HeLa-Zellen zu untersuchen. Für die Herstellung der Doppeltransfektante wurde die HeLa rCx43-Transfektante als Ausgangszelle stabil mit dem eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1zeo/hCx31 G12R transfiziert. Nach der Selektion mit Puromycin und Zeocin wurden positive Klone durch semiquantitative RT-PCR identifiziert (Abb. 4-15).

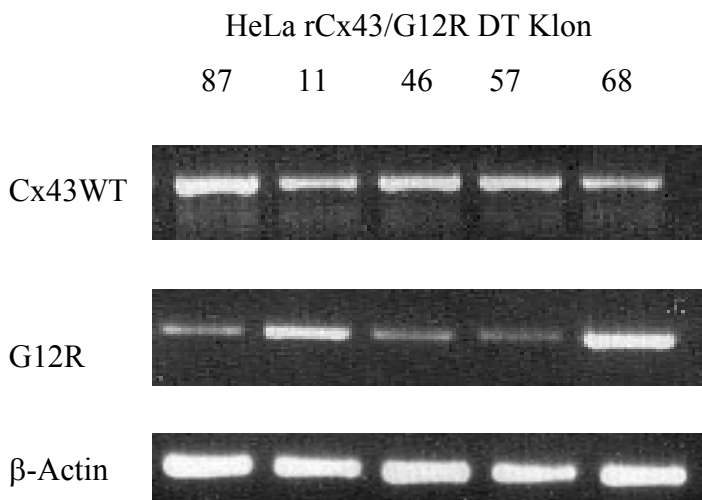


Abb. 4-15 Semiquantitative PCR-Analyse der positiven rCx43/G12R Doppeltransfektanten (DT).

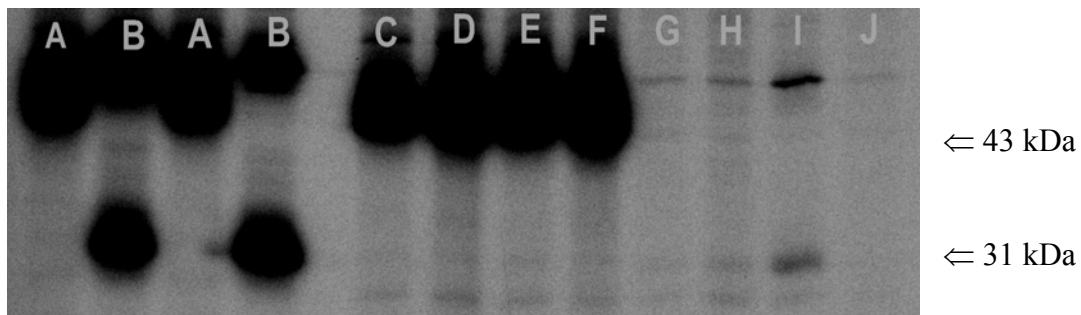


Abb. 4-16. Immunopräzipitations-Analyse von HeLa rCx43/G12R Transfektanten

A: HeLa rCx43; B: HeLa hCx31/38; C,G: HeLa Cx43/G12R Klon11; D,H: HeLa Cx43/G12R Klon46;
E,I: HeLa Cx43/G12R Klon57; F,J: HeLa Cx43/G12R Klon68

A,C,D,E,F: mit Antikörper gegen Cx43 C-Terminus

B,G,H,I,J: mit Antikörper gegen die Cx31 cytoplasmatische Schleife

Die exprimierten Proteine Cx43-WT und G12R wurden mit Hilfe der Immunopräzipitations-Methode nach ^{35}S -Methionin-Markierung identifiziert (Abb. 4-16).

Zur Lokalisierung der Cx43- und hCx31G12R-Proteine wurde eine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt (Abb. 4-19). Die Doppeltransfektante zeigte die Immunfluoreszenz-Signale an Kontaktmembranen benachbarter Zellen sowohl mit dem Antikörper gegen Cx43, als auch gegen Cx31. Das deutet darauf hin, dass die rCx43- und hCx31G12R-Proteine sich den Membrantransport nicht behindern. Um zu testen, inwiefern die Cx43- und die Cx31-, G12R-Proteine die Funktion der Cx-Kanäle gegenseitig beeinflussen, wurde die Durchlässigkeit mittels Mikroinjektionsanalyse mit Lucifer Yellow und Neurobiotin überprüft. Alle Doppeltransfektanten tauschen Lucifer Yellow und Neurobiotin mit den benachbarten Zellen aus. Bei den Doppeltransfektanten wurde beobachtet, dass die Kopplung sich mit den relativen Transkript-Mengen von G12R erhöht (Abb. 4-20). Allerdings zeigte sich nach der Immunopäzipitations-Analyse, dass die Protein-Mengen von G12R nicht mit den Transkripten-Mengen korrelierten, sondern bei Klon 57, der am wenigsten Transkript an G12R-mRNS aufwies, die höchste Menge an G12R-Protein festgestellt wurde.

Obwohl die durch G12R verursachte erhöhte Kopplung nicht so eindeutig wie bei der Doppeltransfektante hCx31/G12R erhöht war, wurde je nach der Expressions-Menge von G12R eine gesteigerte Kopplung beobachtet.

Die Ergebnisse der Analysen zur Charakterisierung der verschiedenen Doppeltransfektanten sind in Tab. 4-3 zusammengefasst.

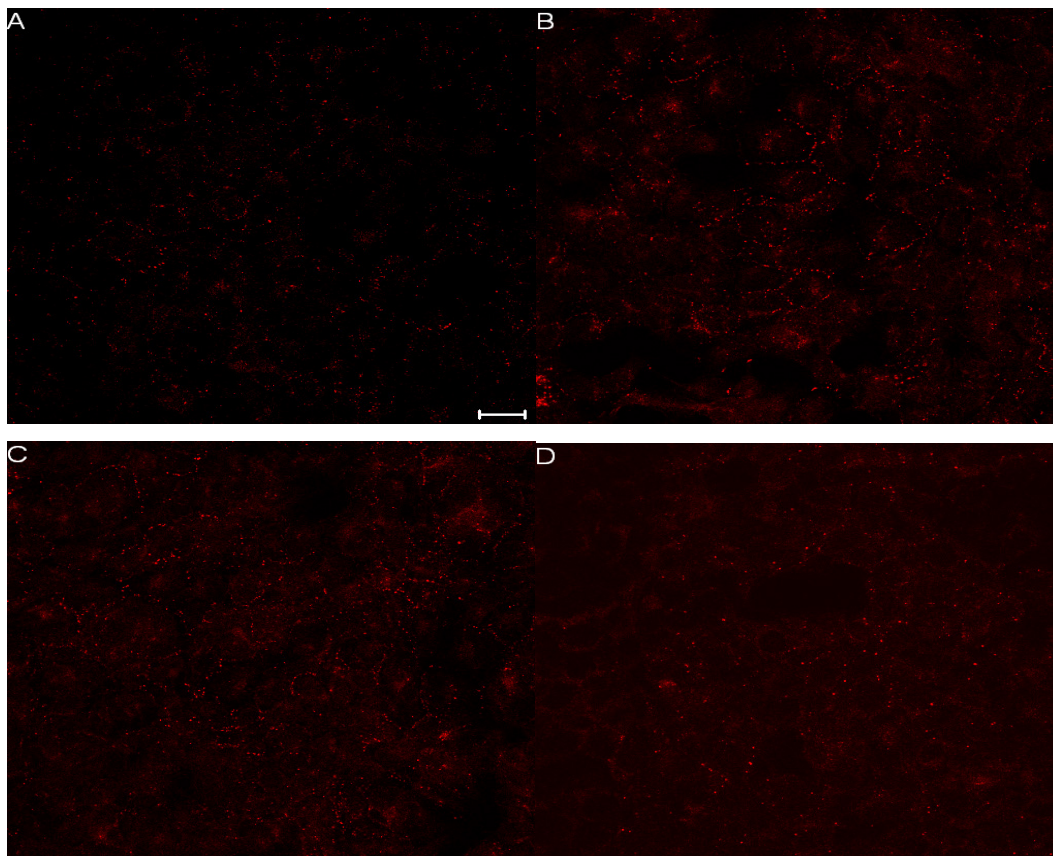


Abb. 4-19 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse der Doppeltransfektanten

Immunfluoreszenz mit Antikörper gegen Cx31 und mit sekundärem Cy3 Antikörper.

A: HeLa hCx31 WT mit Antikörper gegen Cx31 und mit sekundärem Cy3 Antikörper

B: HeLa rCx43 WT mit Antikörper gegen Cx43 und mit sekundärem Cy3 Antikörper.

C: HeLa Cx43/G12R Doppeltransfektante mit Antikörper gegen Cx43 und mit sekundärem Cy3 Antikörper. **D:** HeLa Cx43/G12R Doppeltransfektante mit Antikörper gegen Cx31 und mit sekundärem

Cy3 Antikörper. Balken = 20 μ m

	RT-PCR (%)	{Cx43}/G12R Protein	Lokalisation	LY		NB	
				Zellen	%	Zellen	%
rCx43	100	{+++++}	KM	8,80±2,7	100	72,35±27,5	100
rCx43/G12R K57	100/40	++	KM	18,75±6,1	213	103,9±17,9	144
rCx43/G12R K11	100/138	+	KM	10,65±3,3	121	92,8±20,2	128
rCx31/G12R K68	100/210	(+)	KM	6,1±1,7	69	59,8±13,8	82,7

Tab. 4-2. Mikroinjektionsanalysen der HeLa rCx43/G12R Doppeltransfektanten

Alle gekoppelten Zellen werden 3 Min. bzw. 15 Min nach der Injektion des Lucifer Yellow (LY) bzw. Neurobiotin (NB) ausgewertet. Alle gekoppelten Zellen der HeLa Cx43-Transfektante werden als 100% gesetzt. Angabe der Werte in % ± SEM. Die Proteinmenge wurden nicht mit %, sondern mit dem Zeichen + ausgewertet, da bei der Analyse zwei verschiedenen Antikörpern gegen Cx43 und Cx31CL verwendet wurden. KM = Kontaktmembran

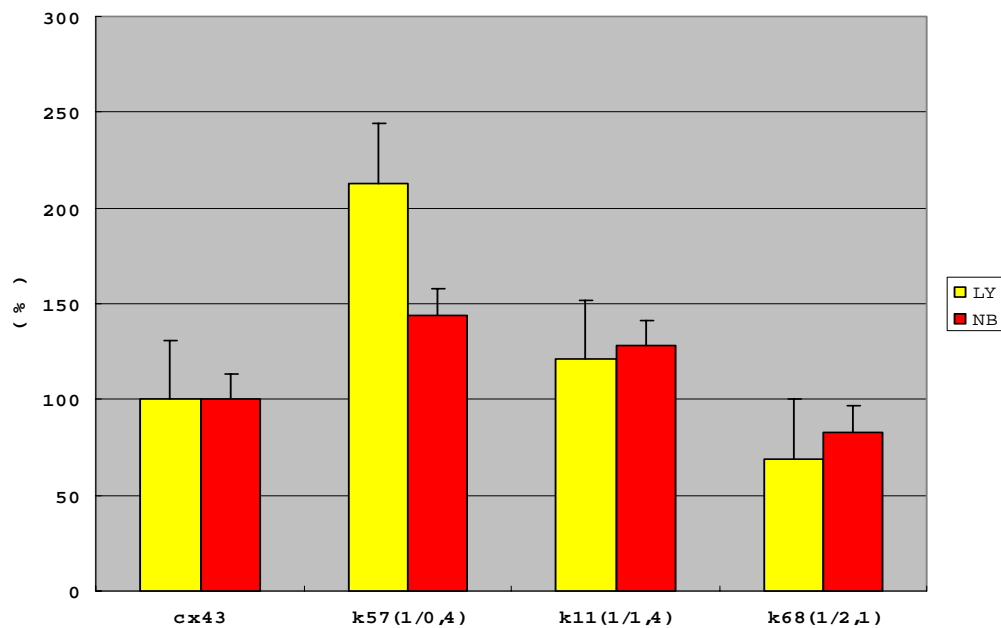


Abb.4-20 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Lucifer Yellow und Neurobiotin-Diffusion in Doppeltransfektanten nach Mikroinjektion. Die Fehlerbalken geben die Mittelwertabweichung an.

Transfektanten	Transkript- Verhältnis (%), (Cx31,43/G12R)	Proteinmenge (%)	Lokalisa- tion	Farbstoff-Kopplung			
				LY (%)	NB (%)	Ethidium- bromid	Propidi- umiodid
HeLa hCx31	100	100	KM	100	100	-	-
HeLa hCx31/G12R K5	100 / 110	500	KM	211,3	164	+	+
HeLa hCx31/G12R K56	100 / 30	150	KM	293,5	209,8	+	+
HeLa hCx31/C86S K7	100 / 100	170	KM	172,6	151,7	+	+
HeLa hCx31/C86S K9	100 / 15	120	KM	204,8	154,1	+	+
HeLa rCx43	100	100	KM	100	100	n.b.	n.b.
HeLa rCx43/G12R K57	100 / 40	100 / ++	KM	213	144	n.b.	n.b.
HeLa rCx43/G12R K11	100 / 138	100 / +	KM	121	128	n.b.	n.b.
HeLa rCx43/G12R K68	100 / 210	100 / (+)	KM	69	82,7	n.b.	n.b.

Tab.4-3 Zusammenfassung der Ergebnisse der HeLa hCx31 Doppeltransfektanten

Die Proteinmenge wurden nicht mit %, sondern mit dem Zeichen + ausgewertet, da bei der Analyse zwei verschiedenen Antikörpern gegen Cx43 und Cx31CL verwendet wurden. KM = Kontaktmembran, + = Farbstofftransfer, - = kein Farbstofftransfer

4.2 Herstellung und Charakterisierung der Doppeltransfektante von Maus Cx45 und seiner Deletionsmutante C122

Es wurde nachgewiesen, dass alle Connexine außer Cx26 posttranslational phosphoryliert sind. Aber über die funktionelle Rolle der Phosphorylierung ist wenig bekannt. Deshalb wurden verschiedene Mutationen an den potentiellen Phosphorylierungsstellen in unserem Labor hergestellt und die mutierte cDNS in HeLa Zellen transfiziert, um die funktionelle Rolle der Phosphorylierung zu untersuchen (Hertlein et al., 1998). Eine der hergestellten Mutanten war C122, bei der 26 Aminosäuren mit 9 Serinresten an dem C-Terminus des mCx45 deletiert sind (s. Abb.4-21). Nach der Immunfluoreszenz-Analyse und subzellulären Fraktionierung wurde festgestellt, dass der größte Teil der C122-Proteine nicht an die Kontaktmembranen transportiert wird, sondern im perinukleären Raum lokalisiert ist. Bei der Mikroinjektionsanalyse mit Lucifer Yellow wurde keine Kopplung beobachtet, während sich eine geringe Kopplung mit Neurobiotin ergab. Dieser funktionelle Defekt von C122-Proteinen konnte durch Kokultivierung mit Cx45-WT-Transfektanten aufgehoben werden, das heißt, dass die C122-Proteine heterotypische Kanäle mit Cx45-WT-Proteine bilden können und dadurch die Kommunikationsfähigkeit der C122-Proteine wiederhergestellt werden kann (Hülser et al.,2001).

Um diesen Effekt heterotypischer Anordnung von Cx45-WT-Proteinen auf die Funktion der C122-Proteine und vice versa auch bei homomerer und heteromerer Anordnung der Connexine zu studieren, wurden HeLa Doppeltransfektanten von Cx45WT und C122 hergestellt und charakterisiert.

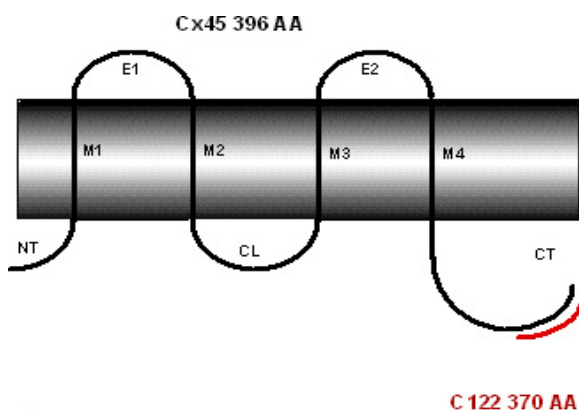


Abb.4-21 Darstellung des Cx45-Proteins und der Deletionsmutante C122. Bei dem C122 wurden 26 Aminosäuren am C-Terminus (rot gezeichnet) deletiert.

4.2.1 Herstellung der Doppeltransfektanten von Maus Cx45 und seiner Deletionsmutante C122

4.2.1.1 Umklonierung der C122-cDNS in den Expressionsvektor pcDNA3.1zeo und Transfektion in HeLa mCx45-Zellen

Die HeLa mCx45-Transfektante wurde mit Puromycin selektioniert. Deshalb wurde ein anderer eukaryontischer Expressionsvektor mit einem Zeocin-Resistenzgen pcDNA3.1zeo der Firma Invitrogen für die Selektion der Doppeltransfektanten verwendet. Die kodierenden Sequenzen des Maus Cx45 mit dem Stop-Codon, das die Deletion der 26 Aminosäuren am C-Terminus ermöglicht, wurden mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XbaI* partiell aus dem Plasmid pBEHpac18 ausgeschnitten und in den mit gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen pcDNA3.1zeo einkloniert. Die detaillierten Plasmidkarten zu den umklonierten Sequenzen befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

Als Ausgangszellen für die Doppeltransfektante wurde die HeLa mCx45-Transfektante (Hertlein et al. 1998) stabil mit dem eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1zeo/C122 mit Hilfe der Lipofektin-Methode transfiziert. Als Kontrolle für die Transfektionsmethode wurde der Vektor pcDNA3.1zeo ohne Insert mit gleicher Methode parallel in dieselbe HeLa-Transfektante HeLa mCx45 transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit Puromycin (Konz. 1µg/ml) und Zeocin (Konz. 100µg/ml) doppelt selektioniert. Nach 2 Wochen wurden Klone identifiziert und vereinzelt in dem Selektionsmedium mit Puromycin und Zeocin weiterkultiviert.

4.2.1.2 Einführung des His-Epitops und Herstellung der Doppeltransfektanten

Zum Nachweis der heteromeren Kanäle in Doppeltransfektanten wurde die Kopräzipitation mit His-Epitopen verwendet (Martinez et al., 2002). Um die heteromeren Kanäle in Doppeltransfektanten von mCx45 und der Deletionsmutante C122 nachzuweisen, sollte dieselbe Methode mit Hilfe der His-Epitope durchgeführt

werden. Für die Einführung des His-Epitops (6x Histidin) an den C-Terminus des mCx45-WT-Proteins sollte die mCx45-cDNS aus dem Plasmid pBEHpac18 in den Vektor pcDNA6HisB (Invitrogen) umkloniert werden.

Die gesamte kodierende Region der Maus Cx45-cDNS wurde mit Hilfe der Startermoleküle mCx45Hindhin und mCx45Agerück unter Einführung der *HindIII*- und *AgeI*-Schnittstelle amplifiziert. Gleichzeitig wurde das Stopcodon von Cx45 deletiert, so dass durch eine durchgehende Translation die Fusion des Cx45-Proteins mit dem His-Epitop ermöglicht wurde. Nach einer Restriktion der PCR-Produkte mit *HindIII* und *AgeI* wurden die Fragmente in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA6HisB kloniert. Um die korrekte Klonierung zu überprüfen, wurden der C-Terminus des Inserts und die His-Epitop-Sequenz nach der PCR-Reaktion von der Firma Agewa sequenziert und die richtige Einführung der Inserts wurde durch Restriktionen mit mehreren verschiedenen Restriktionsendonukleasen überprüft. Die detaillierten Plasmidkarten zu den umklonierten Sequenzen befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

Das so konstruierte Plasmid pcDNA6/mCx45His wurde stabil mit Hilfe der Lipofektin-Methode in die HeLa Wildtyp-Zellen, und HeLa C122-Transfektante transfiziert. Die Cx45WT-transfizierten Zellen wurden mit Blasticidin (Konz. 4 µg/ml) und C122-Doppeltransfektanten mit Puromycin (Konz. 1 µg/ml) und Blasticidin (Konz. 4 µg/ml) doppelt selektioniert. Nach 2 Wochen wurden Klone identifiziert und vereinzelt in dem Selektionsmedium mit Blasticidin bzw. Puromycin und Blasticidin kultiviert.

4.2.2 Charakterisierung der Doppeltransfektanten

4.2.2.1 Expression der Connexine in Doppeltransfektanten

Da die C122-Proteine wegen der Deletion von 26 Aminosäuren am C-terminalen Ende 42 kDa im Gegensatz zu 45 kDa der Cx45-WT-Proteine betrug, konnten die positiven Klone der Doppeltransfektanten durch Westernblot-Analyse identifiziert werden. Außerdem sollten die Expressionsverhältnisse von den positiven Klone densitometrisch bestimmt werden.

Als negative Kontrolle wurden gleiche Mengen von HeLa WT-Lysate und als positive Kontrolle HeLa mCx45-Lysate von Einfachtransfektanten aufgetragen.

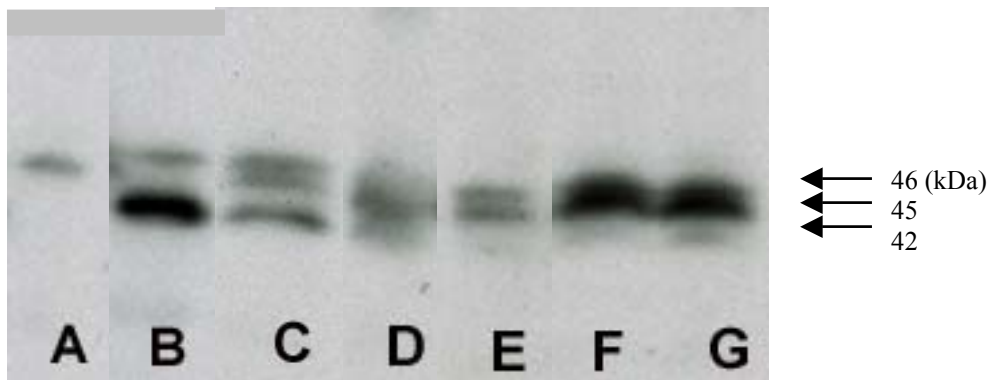


Abb.4-22 Autoradiogramm der Immunoblot-Analyse von Cx45, C122 und Doppeltransfektanten.

Aufgetragen wurden jeweils 50µg des Zelllysates in Tris/SDS-Puffer. Der Nachweis erfolgt mit dem Cx45-Antikörper, dessen Epitop an C-Terminus des Cx45-Proteins liegt.

A: HeLa WT mit 46 kDa unspezifischer Bande (Hertlein et al., 1998); B: HeLa C122 mit 42 kDa Bande; C: Kokultur von HeLa Cx45 und C122; D: HeLa Cx45/C122 DT Klon 3; E: HeLa Cx45/C122 DT Klon 51; F: HeLa Cx45/C122 DT Klon 30; G: HeLa Cx45/C122 DT Klon 45

Abb. 4-22 zeigt das Autoradiogramm der Western Blot-Analyse von den Doppeltransfektanten HeLa mCx45/C122 mit Antikörper gegen Cx45. Während die Negativkontrolle von HeLa WT eine unspezifische Bande aufweist, zeigt das Autoradiogramm der Western Blots mit Kokulturen von HeLa Cx45 und C122 Transfektante die beiden Proteine Cx45 und C122.

Bei allen Doppeltransfektanten von HeLa mCx45/C122 wurden die erwarteten 45 kDa- und 42 kDa Banden detektiert, wobei der Klon51 sehr wenig C122 exprimiert. Um die Proteinmengen zu vergleichen, wurde die Proteinbandeintensität der Cx45-Bande von Doppeltransfektanten jeweils 100 % gesetzt. Während Klon 3 60 % C122-Proteinbandeintensität im Vergleich zu der Cx45-Bande aufweist, enthält Klon 51 nur 18 % C122-Bandeintensität. Die Umrechnung der Bandenintensität ist in Tab. 4-4 zusammengefasst.

Im Rahmen seiner Diplomarbeit hat Martin Otto die Doppeltransfektanten von mCx45 und C122 ebenfalls hergestellt. Um jedoch andere Expressionsverhältnisse zwischen

Cx45 und C122 zu erhalten, wurde nicht C122 in die Cx45-Transfektanten, sondern umgekehrt Cx45-cDNS in die C122-Transfektanten transfiziert und auf diese Weise wurden positive Klone mit anderen Proteinmengen-Verhältnissen erhalten und Oligomerisierungsstudien durchgeführt (M. Otto, 2002). In dieser Arbeit wurden die Klone ebenfalls charakterisiert. Die Umrechnung der Bandenintensität der von M. Otto hergestellten Klone sind auch in Tab. 4-4 zusammengefasst.

	Detektierte Proteine (kDa)	Proteinmengenverhältnis (Cx45/C122)
HeLa Cx45	45	1/-
HeLa C122	42	-
HeLa Cx45/C122 DT k51	45 + 42	1 / 0,2
HeLa Cx45/C122 DT k3	45 + 42	1 / 0,6
HeLa C122/Cx45 DT k93	45 + 42	1 / 1,25
HeLa C122/Cx45 DT k27	45 + 42	1 / 3,3
HeLa C122/Cx45 DT k77	45 + 42	1 / 5

Tab.4-4 Auswertung der relativen Protein-Mengen aus dem Autoradiogramm nach Abgleich mit der Proteinmenge bezogen auf HeLa Cx45 (entspricht 1).

4.2.2.2 Lokalisierung der Connexine in Doppeltransfektanten

Bei der früheren Arbeit von Birgit Hertlein wurde festgestellt, dass der größte Teil der C122-Proteine nicht an die Membran transportiert wird, sondern in dem perinuklearen Raum lokalisiert ist (Hertlein et al., 1998). Um zu testen, in wiefern die Cx45-WT- und C122-Proteine gegenseitig den Transport der Connexine an die Plasmamembran beeinflussen, sollte durch indirekte Immunfluoreszenz-Analyse die Lokalisierung der Connexine untersucht werden.

Während die Cx45-Transfektante die für Connexine typischen punktuellen Signale an Kontaktmembranen benachbarter Zellen und kaum Signale im Cytoplasma zeigte, wurde bei der C122-Transfektante eine starke Fluoreszenz im Cytoplasma und kaum an der Membran beobachtet (Abb. 4-23). Alle Doppeltransfektanten zeigten Signalen an der Kontaktmembran. Mit steigender C122-Proteinmenge wurden jedoch weniger Signale an der Membran und mehr in Cytoplasma festgestellt. Möglicherweise üben die C122-Proteine einen negativen Einfluss auf den Membrantransport von Cx45WT-Proteinen aus.

Um gegenseitige Effekte der Cx45- und C122-Proteine auf den Membrantransport zu verdeutlichen, wurden die Immunfluoreszenz-Signale quantifiziert. Zur Quantifizierung der Signale wurde die Immunfluoreszenz-Analyse mit dem Laser-Scan-Mikroskop von Firma Zeiss angewendet. Um die exakte Messung zu ermöglichen, und um die Ergebnisse der einzelnen Klone miteinander vergleichen zu können, wurden die Klone nicht nur bei gleichen Kulturbedingungen gehalten, sondern auch die Immunfluoreszenz-Analyse mit gleichen Bedingungen am gleichen Tag durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit 2 Programmen ausgewertet, so dass mit dem Programm Image Examiner von Zeiss die Pixelwerte der Signale und mit Programm Scionimage die Partikelanzahl (IF-Signal-Punkte) der Zellen ermittelt werden konnten. Die Auswertung der Quantifizierung wurde in Abb. 4-24 und Tab. 4-5 zusammengefasst.

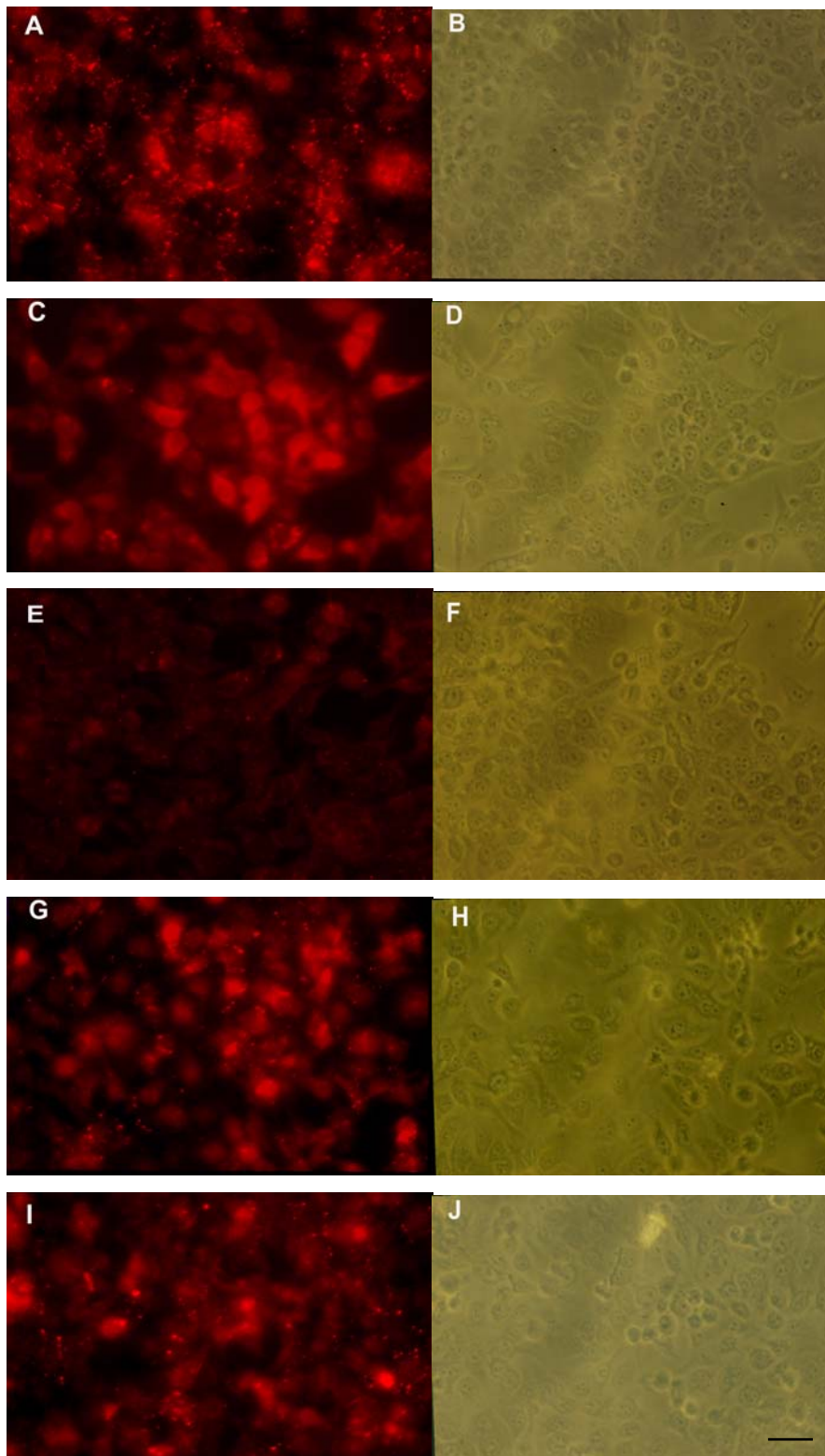
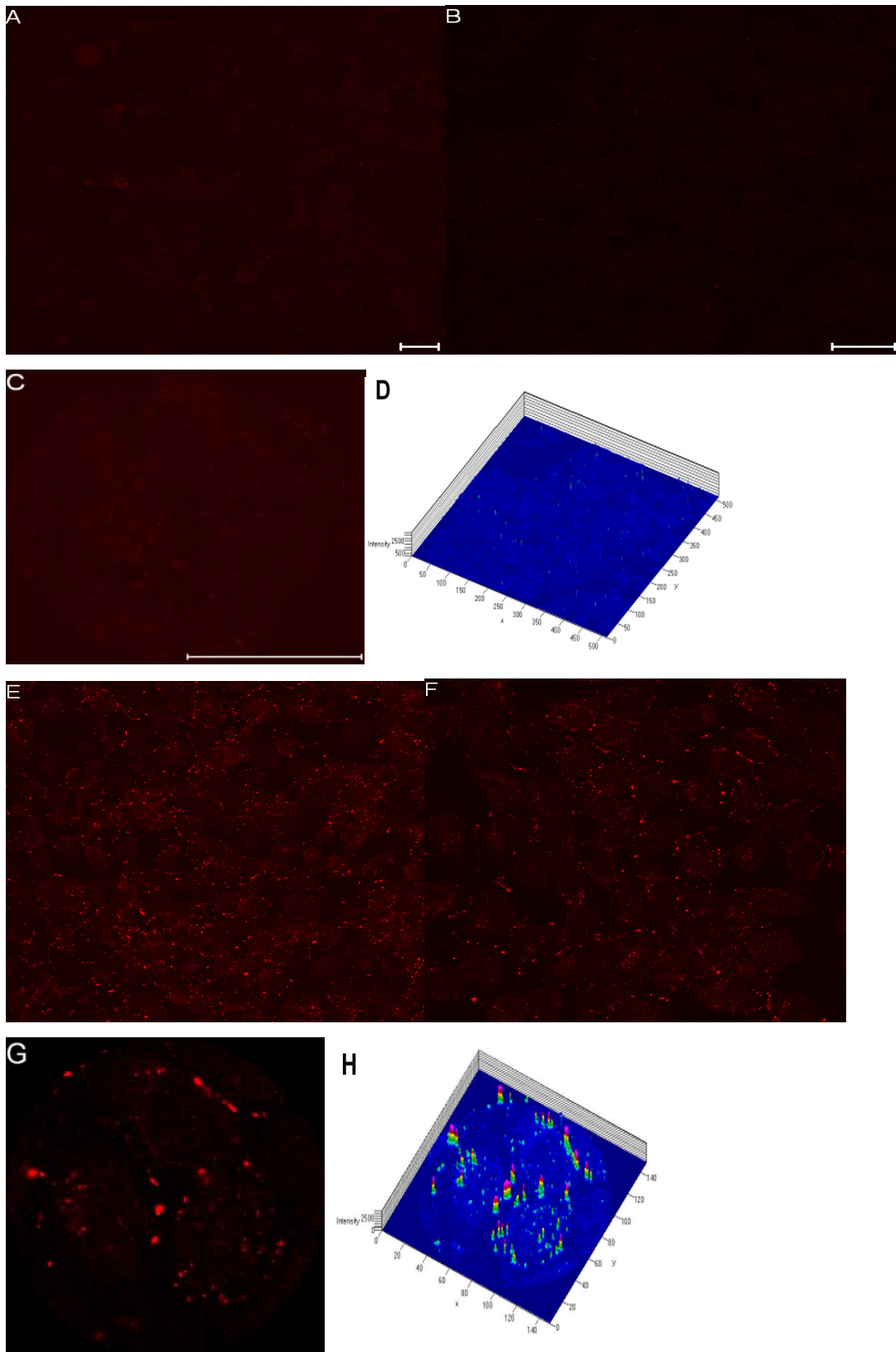
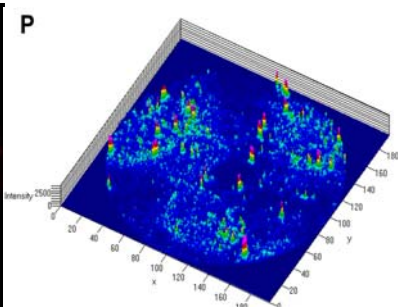
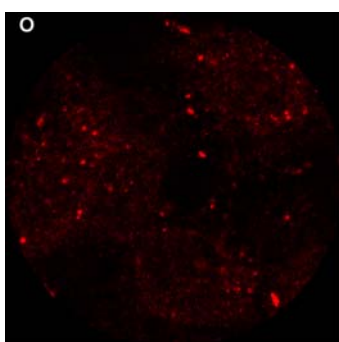
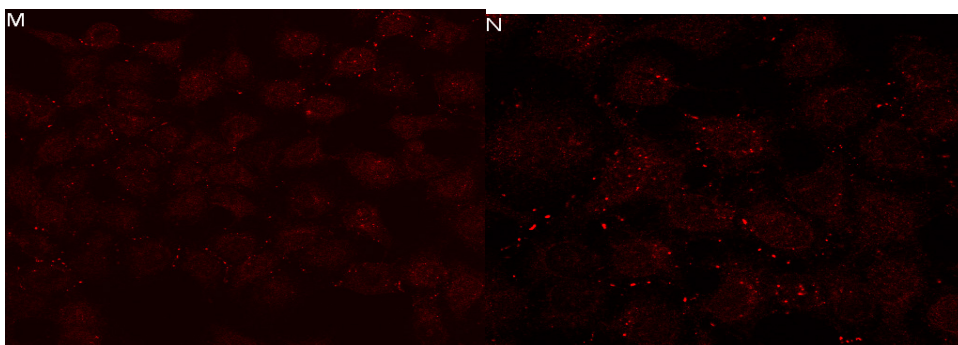
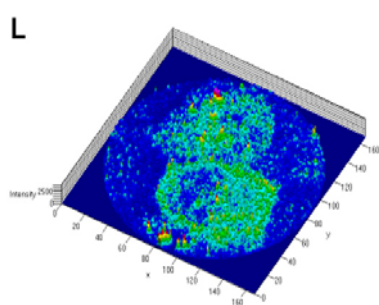
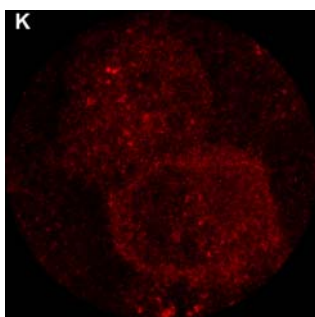
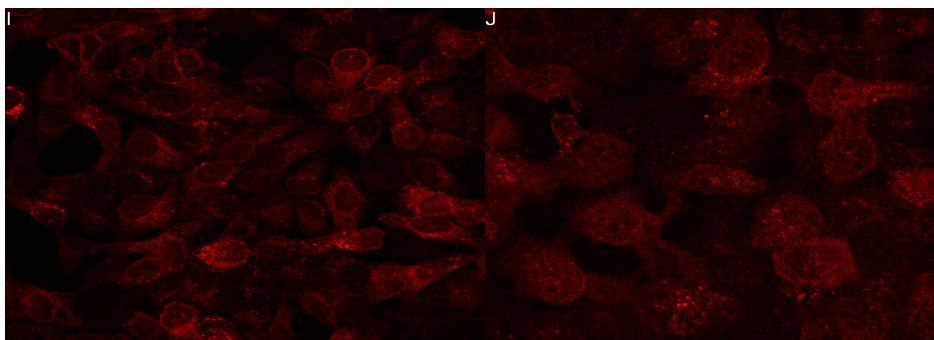


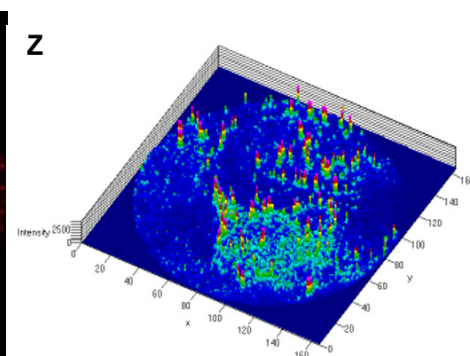
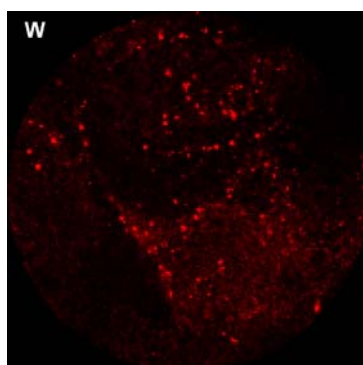
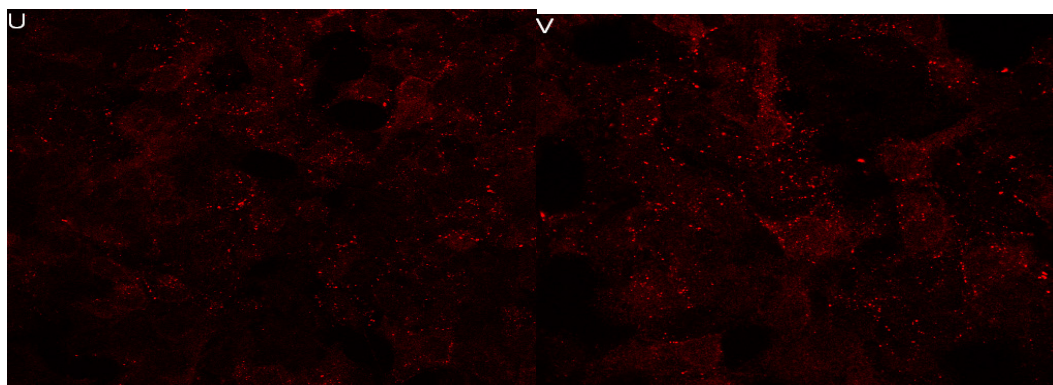
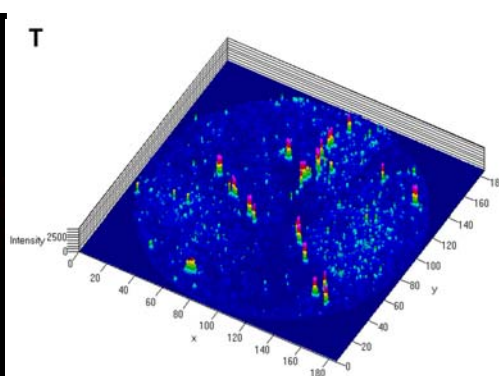
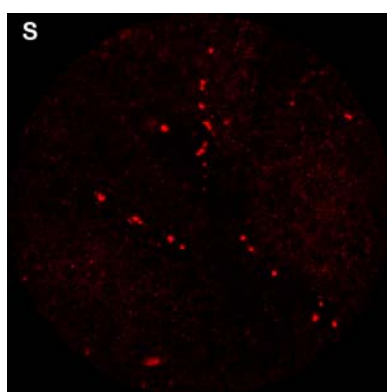
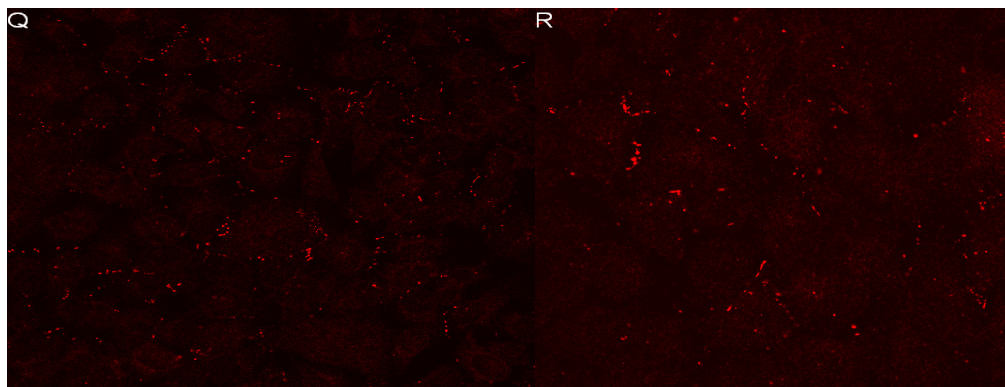
Abb.4-23 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse der Doppeltransfektanten

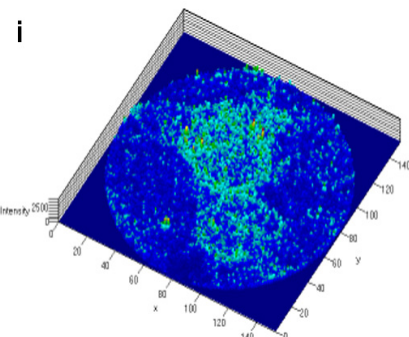
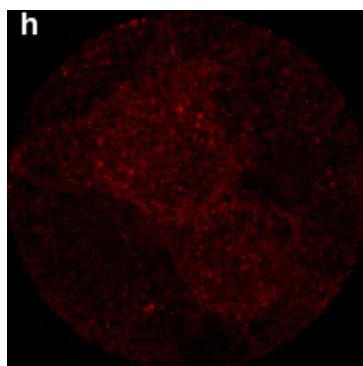
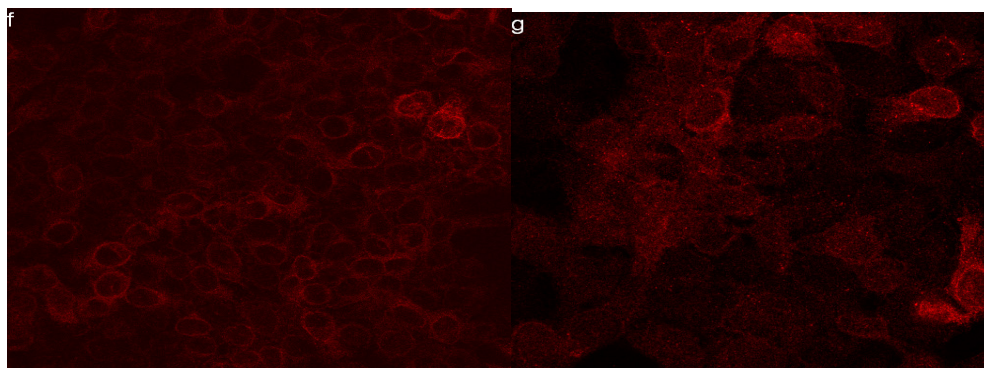
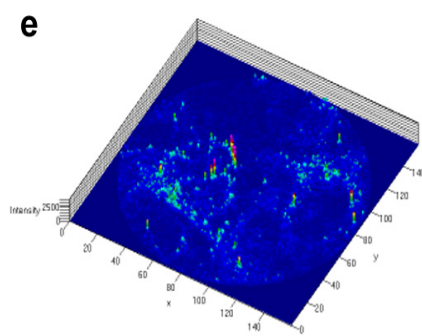
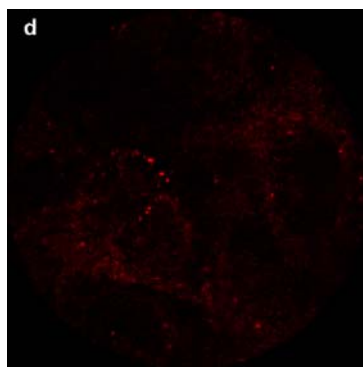
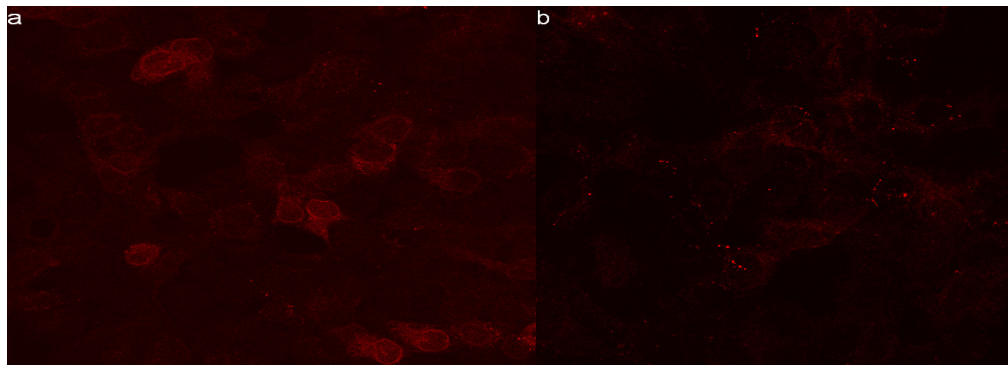
Mit Lichtmikroskop, Axiophot von Firma, Zeiss. (40×) A,B: HeLa Cx45WT, C,D: HeLa C122, E,F: HeLa WT G,H: HeLa Cx45/C122 DT Klon 3, I,J: HeLa Cx45/C122 DT Klon 51. Balken= 20µm

Abb.4-24 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse der Doppeltransfektanten
(Abbildungen und ihre quantitative Auswertung)









Dazu wurden der erste Antikörper, der gegen C-Terminus von Cx45 gerichtet ist, und ein Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper eingesetzt, der mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cy3 gekoppelt ist.

Mit Laserscanmikroskop von Firma, Zeiss. A,B,C,D: HeLa WT, E,F,G,H: HeLa Cx45, I,J,K,L; HeLa C122, M,N,O,P: HeLa Cx45/C122 DT Klon 3, Q,R,S,T: HeLa Cx45/C122 DT Klon 51, U,V,W,Z: HeLa C122/Cx45 DT Klon 93, a,b,d,e: HeLa C122/Cx45 DT Klon 27, f,g,h,i: HeLa C122/Cx45 DT Klon 77
A,E,I,M,Q,U,a,f: 40× Vergrößerung, B,F,J,N,R,V,b,g: 63× Vergrößerung, C,G,K,O,S,W,d,h: starke Vergrößerung des Ausschnittes der 63-fachen Vergrößerung, D,H,L,P,T,Z,e,i: 2,5 dimensionale Darstellung von C,G,K,O,S,W,d,h mit IF-Signalstärke, rot→stärkeres, blau→schwächeres Signal

	Protein-Verhältnis (Cx45/C122)	IF-Partikel- Anzahl (%)	IF-Pixel- Dichte (%)
HeLa Cx45	1	100	100
HeLa C122	-	13,4	11,9
HeLa Cx45/C122 DT K3	1 / 0,6	10,8	16,0
HeLa Cx45/C122 DT K51	1 / 0,2	23,1	40,2
HeLa Cx45	1	100	100
HeLa C122	-	5,9	5,1
HeLa C122/Cx45 DT K93	1 / 1,25	17,1	26,7
HeLa C122/Cx45 DT K77	1 / 5	6,8	5,8

Tab. 4-5 Quantifizierung der Immunfluoreszenz-Signale von HeLa Cx45, C122 und den Doppeltransfektanten. Die IF-Signale von verschiedenen Zellen wurden mit dem Laserscan-Mikroskop mindestens 20 Mal ausgewertet. Die IF-Partikelzahl und –Pixeldichte von HeLa Cx45 wurden 100% gesetzt.

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Immunfluoreszenz-Signale direkt mit den relativen Mengen der C122-Proteine korrelieren und somit die C122-Proteine direkt negativen Effekt auf den Membrantransport von Connexinen in Doppeltransfektanten ausüben.

4.2.2.3 Funktionsanalyse der Connexine in Doppeltransfektanten

Anhand der Ausbreitung der verschiedenen Farbstoffe sollte die Funktion der Gap Junction Kanäle in den Doppeltransfektanten HeLa mCx45/C122 untersucht werden. Da die C122-Proteine nicht an die Membran transportiert werden und einen negativen Effekt auf den Transport der Cx45-WT-Proteine ausüben, wie durch IF-Analyse festgestellt wurde (s. Tab. 4-5), sollte untersucht werden, ob der verminderte Transport der Connexine mit der Funktion der Kanäle direkt im Zusammenhang steht.

Die Funktion der Gap Junction Kanäle in Doppeltransfektanten wurde mit der Mikroinjektion von Farbstoffen (Lucifer Yellow) und Indikatormolekülen (Neurobiotin) untersucht. In die verschiedenen Transfektanten wurden der Fluoreszenz Farbstoff Lucifer Yellow bzw. Neurobiotin in eine Zelle injiziert und nach 3 min. bzw. 15 min. wurden die gekoppelten Zellen ausgewertet (Tab. 4-6, Abb. 4-25).

Alle Doppeltransfektanten transferierten sowohl Lucifer Yellow, als auch Neurobiotin in die benachbarten Zellen, bei den Doppeltransfektanten wurde jedoch eine geringere Kopplung beobachtet als bei der HeLa mCx45 Einfachtransfektante. Bei dem Klon 51 mit Expressionsverhältnis 1:0,2 von Cx45:C122 ergaben sich 71,7 % Kopplung mit Lucifer Yellow und 62,5 % mit Neurobiotin, während Klon 3 mit einem Expressionsverhältnis 1:0,6 von Cx45:C122 nur 18,6 % Kopplung mit LY und 60,3 % mit NB zeigte.

Bei den Doppeltransfektanten, in denen die mCx45-cDNS nachträglich in die HeLa C122-Transfektanten transfiziert wurden, wurde ebenfalls eine Kopplung mit Lucifer Yellow und Neurobiotin beobachtet, im Gegensatz zu der HeLa C122-Transfektante. Klon 93 mit dem Mengenverhältnis 1:1,25 von Cx45:C122 wiesen 61,3 % Kopplung mit Lucifer Yellow und 81,5 % mit Neurobiotin, aber Klon 27 mit Verhältnis 1:3,3 von Cx45:C122 35,2 % (LY) bzw. 42,7 % (NB) Kopplung auf, während sich bei dem Klon 77 mit dem Expressionsverhältnis 1:5 von Cx45:C122 nur 13,2 % Kopplung mit Lucifer Yellow und 12,6 % mit Neurobiotin ergab.

	Protein- Verhältnis	LY		NB	
		gekoppelte Zellen	%	gekoppelte Zellen	%
HeLa Cx45	1	2,7±1,09	100	40,3±12,9	100
HeLa C122	-	0	0	1,5±1,09	3,72
HeLa Cx45/C122 k51	1/0,2	1,9±0,43	71,7	25,2±7,89	62,5
HeLa Cx45/C122 k3	1/0,6	0,5±0,67	18,6	24,3±8,73	60,3
HeLa C122/Cx45 k93	1/1,25	1,6±0,7	61,3	32,8±10,7	81,5
HeLa C122/Cx45 k27	1/3,3	0,9±0,8	35,2	17,2±5,7	42,7
HeLa C122/Cx45 k77	1/5	0,4±0,21	13,2	5,1±1,3	12,6

Tab.4-6 Mikroinjektionsanalysen der verschiedenen Doppeltransfektanten

Alle gekoppelten Zellen wurden 3 Min. bzw. 15 Min nach der Injektion des Lucifer Yellow (LY) bzw. Neurobiotin (NB) ausgewertet. Das Proteinverhältnis wurde als Mengenverhältnis von Cx45/C122 angegeben. Alle gekoppelten Zellen bei HeLa mCx45-Transfektant wurden 100% gesetzt. Angabe der Werte in % ± SEM.

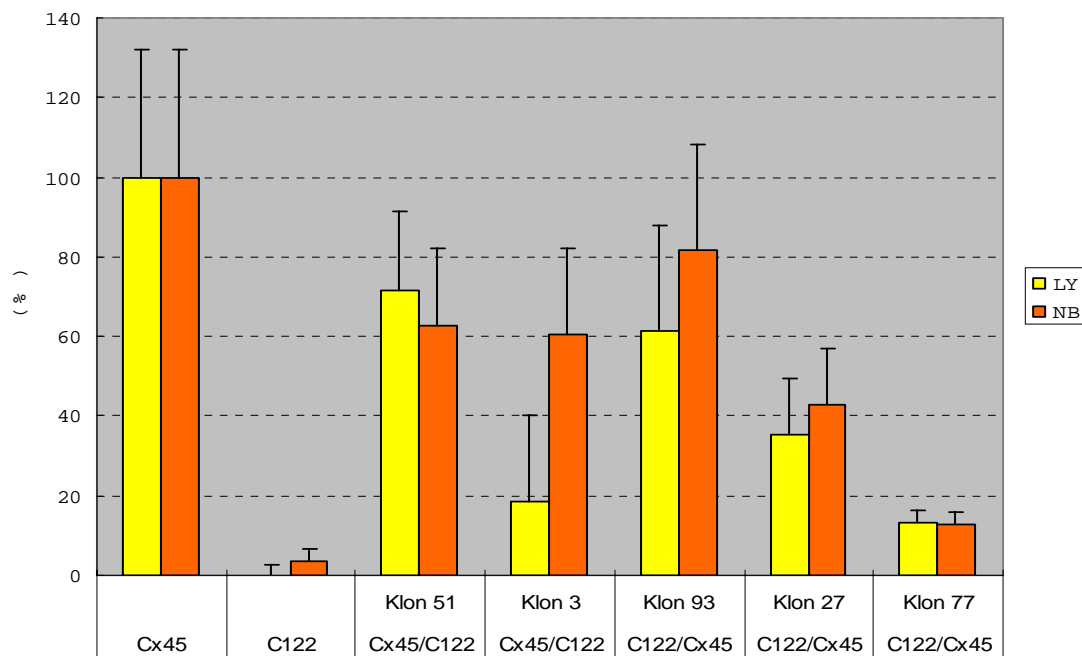


Abb.4-25 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Lucifer Yellow und Neurobiotin-Diffusion in Doppeltransfektanten nach Mikroinjektion. Die Fehlerbalken geben die Mittelwertabweichung an.

Es wurde festgestellt, dass die Cx45-WT- und C122-Proteine heterotypische Kanäle bilden, womit der Kommunikationsdefekt der C122-Proteine durch Cx45-WT-Proteine aufgehoben wurde (Hülser et al., 2001). Um zu testen, ob die Cx-Kanäle in der HeLa Doppeltansfektante mCx45/C122 ebenfalls heterotypische Kanäle mit Cx45-WT- bzw. C122-Proteinen bilden können, wurde die Durchlässigkeit der Kanäle mit Hilfe des Farbstofftransports von Calcein untersucht. Dazu wurden die mit Calcein und DiI markierten Doppeltransfektanten zusammen mit nicht markierten HeLa mCx45- bzw. C122-Transfektanten ausplattiert. Nach 2 Std. Inkubation wurden alle gekoppelten Zellen ausgewertet (Tab. 4-7).

<i>Donor</i>	<i>Protein-Menge(%)</i>	<i>Rezeptor</i>			
		Cx45		C122	
Cx45	100	7,65±2,09	100%	2,45±0,79	32,0%
C122	-	6,4±1,86	83,7%	0,95±0,21	12,4%
Cx45/C122 k3	160	9,5±2,56	124,2%	3,1±0,83	40,5%
Cx45/C122 k51	118	5,1±1,76	66,7%	2,25±0,81	29,4%
		<i>Rezeptor</i>			
		Cx45/C122 k3		Cx45/C122 k51	
Cx45	100	4,4±1,42	57,5%	5,2±1,84	68,0%
C122	-	5,3±1,88	69,3%	2,85±1,02	37,3%

Tab.4-7 Kopplungsanalysen von Calcein der verschiedenen Doppeltransfektanten

Alle gekoppelten Zellen werden 2 Std. nach der Zugabe des Calceins ausgewertet. Die Proteinmenge wurde als Gesamtproteinmenge von Cx45 und C122 angegeben. Alle gekoppelten Zellen bei homotypischen Kanälen der HeLa mCx45-Transfektanten wurden 100% gesetzt. Angabe der Werte in Zellen ± SEM.

Bildung von heterotypischen Cx-Kanälen der Doppeltransfektanten sind sowohl mit den HeLa Cx45-Transfektanten als auch mit den HeLa C122-Transfektanten möglich. Aber bei den Doppeltransfektanten mit HeLa Cx45-Transfektanten wurden weniger Calcein-gefärbte Zellen beobachtet als bei den homotypischen Kanälen von Cx45, während bei den Doppeltransfektanten mit HeLa C122-Transfektanten festgestellt wurde mehr Calcein-Kopplung als bei den homotypischen C122-Kanälen, sowie mehr bei heterotypischen Kanälen mit Cx45-C122.

4.2.2.4 Halbwertszeit

Um zu testen, in welchem Maße der Abbau der C122-Proteine an dem funktionellen Defekt der C122-Kanäle beteiligt ist, sollte die Halbwertszeit der HeLa Cx45/C122-Doppeltransfektanten bestimmt werden (Abb. 4-26). Jede Transfektante wurde mindestens zweimal getestet und mit mehreren Autoradiogrammen einer Versuchsreihe ausgewertet. Mit Hilfe eines Tabellenprogrammes (Excel von Microsoft) wurden die Halbwertszeiten der Transfektanten bestimmt.

Die Halbwertszeit von mCx45 oder C122 in HeLa Einfachtransfektanten betrug 4 Std. bzw. 3,4 Std. Bei Klon 3 der Doppeltransfektante betragen die Halbwertszeiten von mCx45 4,79 Std. und C122 4,78 Std., während bei Klon 51 die Halbwertszeiten von mCx45 und C122 4,37 bzw. 3,99 Std betragen. Das zeigt, dass C122-Proteine in HeLa Einfachtransfektanten sowie in Doppeltransfektanten nicht signifikant schneller abgebaut wurden als Cx45-WT-Proteine.

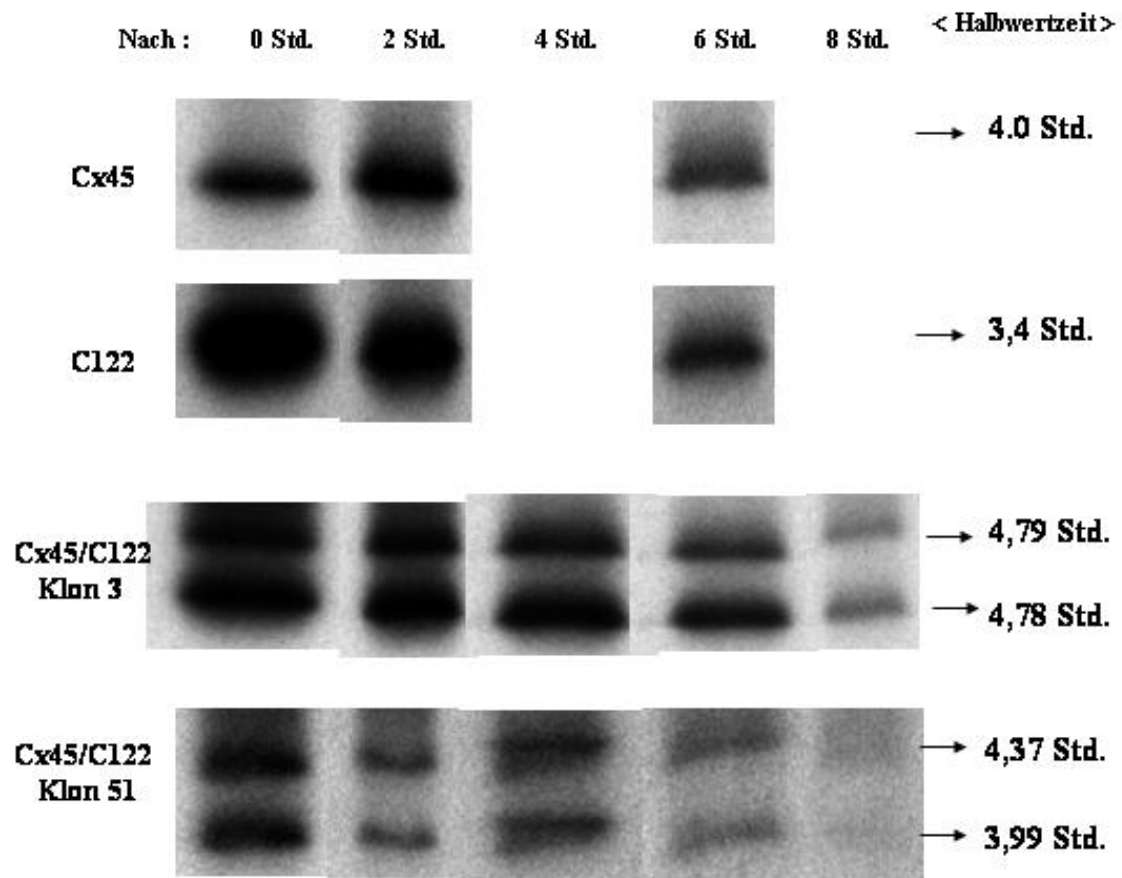


Abb. 4-26 Halbwertszeit-Bestimmung von HeLa Cx45, C122 und Doppeltransfektanten. Die Signale von ^{35}S -Methionin-markiertem und immunpräzipitiertem Cx45, C122 und der verschiedenen Doppeltransfektanten sind nach einstündiger Markierung (pulse) und anschließender Kultivierung für 2, 4, 6 und 8 Std. (chase) in nicht-radioaktivem Medium dargestellt.

	Protein (kDa)	Protein Verhältnis	Lokalisation	IF (%)		LY (%)	NB (%)	Oligomerisierung (%) *						Halbwerts Zeit(Std.)
				Pixel dichte	Partikel anzahl			5	6	7	8	9	10	
Cx45	45	1	KM	100	100	100	100		16	37	30	17		4,0
C122	42	-	Cytoplasma	5,1	5,9	-	3,72			10	46	32	13	3,4
Cx45/C122 K 51	45&42	1/0,2	KM	40,2	23,1	71,7	62,5	1	20	29	32	16	2	4,37 / 3,99
								1	16	29	35	17	3	
Cx45/C122 K 3	45&42	1/0,6	KM	16,0	10,8	18,6	60,3	4	28	23	22	14	6	4,79 / 4,78
								2	25	26	22	16	6	
C122/Cx45 K 93	45&42	1/1,25	KM & CP	26,7	17,1	61,3	81,5		19	19	26	13	22	
									17	21	28	17	16	
C122/Cx45 K 27	45&42	1/3,3	KM & CP	n.b.	n.b.	35,2	42,7	5	23	23	31	14	4	
								3	18	25	32	16	5	
C122/Cx45 K 77	45&42	1/5	KM & CP	5,8	6,8	13,2	12,6	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	

Tab.4-8 Zusammenfassung der Ergebnisse der HeLa Cx45 Doppeltransfektanten

* Die Oligomerisierungsstudien wurden von M.Otto in Rahmen seiner Diplom-Arbeit durchgeführt.

KM = Kontaktmembran, CM = Cytoplasma

5. Diskussion

5.1 Mutanten von hCx31 und dominante Effekte

In der Haut von Patienten mit der Hautkrankheit *Erythrokeratoderma variabilis* wurden diverse Mutationen auf dem menschlichen Cx31-Gen festgestellt (Richard et al., 1998, 2000). Die Mutationen sind auf verschiedenen Domänen des Cx31-Gens gefunden worden. Um den Zusammenhang zwischen der Hautkrankheit EKV und diesen Mutationen festzustellen, muß die Beziehung zwischen der Funktion der Connexine und dem Phänotyp hergestellt werden. Zu dieser Untersuchung der Funktion von menschlichem Connexin 31 Wildtyp und Cx31 Mutanten wurden HeLa-Zellen verwendet, die eine sehr niedrige endogene Expression von Connexinen aufweisen.

Da die Aminosäure Glycin an Position 12 in allen Connexinen der β -Gruppe konserviert ist, ist anzunehmen, dass der Austausch der konservierten Aminosäure einen stärkeren Effekt verursachen könnte als der Austausch von anderen variablen Aminosäuren. Aus diesem Grund wurde die Mutante G12R in unserem Labor hergestellt und die Funktion des mutierten Cx31-Proteins untersucht. Interessanterweise wurden die Mutationen an Position 12 auch im Cx32- (G12S) und im Cx26-Gen (G12V) bei anderen genetisch bedingten Krankheiten wie der Charcot-Marie-Tooth Krankheit bzw. sensorineuralen Taubheit festgestellt. Weiterhin wurde eine andere Mutation von Cx31C86S untersucht, weil die Aminosäure Cystein in der hoch konservierten zweiten Transmembran-Domäne des Cx-Gens lokalisiert ist und auch in anderen Cx-Genen konserviert vorkommt. Die in unserem Labor hergestellte Mutante G12R zeigte einen letalen Effekt in HeLa-Zellen (Diestel et al., 2002). Nach der Transfektion der cDNA in HeLa-Zellen wurde festgestellt, daß das mutierte Cx31 G12R-Protein zwar an die Membran transportiert wird und eine erhöhte Kopplung mit Neurobiotin zeigte, aber die Zellzahl 24 Stunden nach der Transfektion kontinuierlich abnahm und schließlich keine positiven Klone mehr ermittelt werden konnten. Nach der Transfektion der mutierten hCx31-cDNS (G12R,C86S) in die HeLa Cx31WT-Transfektante wurden positive Klone mit unterschiedlichen Expressionsverhältnissen von Cx31-WT und mutiertem Cx31 ermittelt. Daraus kann gefolgert werden, dass der letale Effekt der G12R-Mutation in HeLa-Zellen durch koexprimierte hCx31-WT-Proteine kompensiert wurde. Die Immunfluoreszenz-

Analyse zeigte keine Signale im Zytoplasma, sondern alle Signale waren an den Kontaktmembranen lokalisiert. Obwohl die Cx31-Proteine mit den mutierten Cx31, G12R- und C86S-Proteine in Doppeltransfektanten mehr Vorhanden im Vergleich zur hCx31-Einfachtransfektante sein müsste, konnten keine deutlich erhöhten Signale beobachtet werden. Daraus kann man schließen, dass sowohl die Cx31-WT-Proteine als auch die mutierten Cx31-Proteine, G12R und C86S, sowie die möglicherweise vorhandenen heteromeren Oligomere von WT und Mutanten an die Membran transportiert werden, da das Vorhandensein der reinen homomeren Formen von Cx31-Proteinen nach der mathematischen Überlegung eine Wahrscheinlichkeit von 2 bei 2^6 der verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten besitzt, vorausgesetzt, dass die gleiche Menge an Cx31-WT und Mutanten in Doppeltransfektanten exprimiert wird. Um so erstaunlicher ist, dass die verhältnismäßig geringen Mengen von mutiertem Cx31 bei Klon 56 der Doppeltransfektante hCx31/G12R 293 % erhöhte Kopplung bei der LY-Injektion und 210% Kopplung bei der NB-Injektion verursachten. Da die einfache Transfektante mit G12R auch erhöhte Kopplung mit 203% bei NB-Injektion zeigte (Diestel et al., 2002), läßt sich schließen, dass das mutierte Cx31, G12R einen dominant positiven Effekt in den Doppeltransfektanten auf die Funktion der WT-Proteine ausübten. Zusätzlich machte die Mikroinjektionsanalyse mit Ethidiumbromid und Propidiumiodid deutlich, dass die Cx-Kanäle in Doppeltransfektanten funktionell verändert sind, da sich die Cx-Kanäle von hCx31 sowie mCx31 für Ethidiumbromid und Propidiumiodid undurchlässig erwiesen (Elfgang et al., 1995). Dieser dominant positive Effekt von mutiertem Cx31 bzw. die Veränderung der Kanaleigenschaft durch mutiertes Cx31 ist bei einem Expressionsverhältnis von 1:0,3 bei G12R und 1:0,2 bei C86S in höherem Maße zu beobachten als bei einem Mengenverhältnis von 1:1. Dieses Verhalten des dominanten Effekts ist dadurch zu erklären, dass die Mutation von G12R und C86S eine strukturelle Veränderung der Cx-Kanäle verursachen kann und diese strukturelle Veränderung bei einem Verhältnis von 1:0,3 bei G12R und 1:0,2 bei C86S am höchsten sein könnte oder/und keine Kompensationsmöglichkeit der Strukturänderung möglich ist, im Gegensatz zu einem Verhältnis von 1:1 der Fall war.

Es wurde schon früher gezeigt, dass Aminosäuren am Aminoterminus der Connexine eine wichtige Rolle bei der Ionenpermeabilität spielen (Oh et al., 2000). Weiterhin wurde durch Nuklear-Magnet-Resonanz-Analyse gezeigt, dass Glycin 12 in einem Domäne-Scharnier-Domäne-Motiv liegt (s. Abb.5-1) und dabei am Eingang des Kanals in der Pore lokalisiert ist.

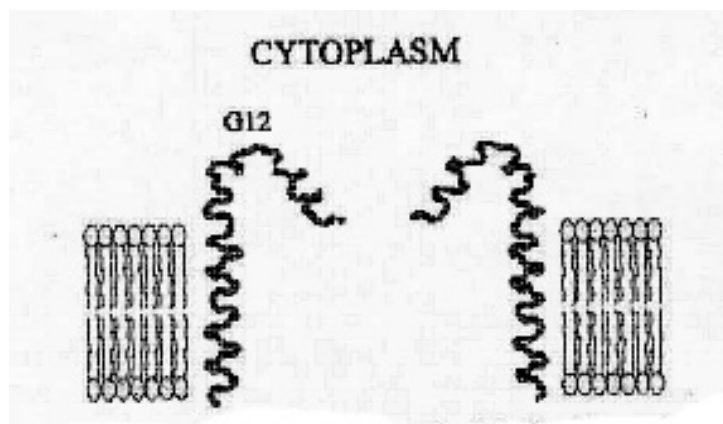


Abb.5-1

Atomresolutioncomputer-Modell des Rückgrats von Aminoterminus und 1. transmembraner Domäne des Cx32 (Purnick et al., 2000).

Deshalb führte die Mutation des Glycin 12 nach Serin, Tyrosin oder Valin bei Cx32 zu einer vollständigen Verhinderung der Kanalströme (Purnick et al., 2000).

Diese strukturelle Veränderung von Connexinen könnte auch bei Cx31 auftreten, wobei die Mutation G12R allerdings zu einer erhöhten Durchlässigkeit im Gegensatz zu der Glycin 12 Mutation bei Cx32 führte. Die Mutation Glycin 12 nach Arginin könnte bedeuten, dass der Aminosäure-Austausch von unpolarem Glycin nach der polaren Aminosäure Arginin mit einer großen Seitenkette entweder den Kanaldurchmesser erheblich vergrößert oder die Kanalpore nicht vollständig geschlossen werden kann. Diese strukturelle Veränderung der Kanäle durch Connexine kann möglicherweise bei der Bildung der Halbkanäle oder kompletter Kanäle bei einem Verhältnis von 1:1 mit WT und Mutante besser kompensiert werden als bei einem Verhältnis von 1:0,3.

Da Cx43 und Cx31 in Keratinozyten, Str. Granulosum und Str. Spinosum zusammen exprimiert werden, wurden die HeLa Doppeltransfektanten mit menschlicher Cx31- und Ratten Cx43-cDNS hergestellt und charakterisiert. Um den Zusammenhang zwischen den Symptomen der Krankheit EKV und Mutationen des Cx31-Gens zu verstehen, müßte erst die Rolle von koexprimierten Connexinen untersucht werden. Da rCx43- mit dem hCx43-Gen 97% Aminosäuresequenz-Homologie aufweist, wurde die HeLa rCx43 Transfektante als Mutterzelle für die Doppeltransfektion verwendet. Nach der Transfektion von hCx31 G12R-cDNS in HeLa rCx43 Transfektante konnten positive Klone ermittelt werden. Es bedeutet, dass der letale Effekt der Cx31-Mutation nur dann

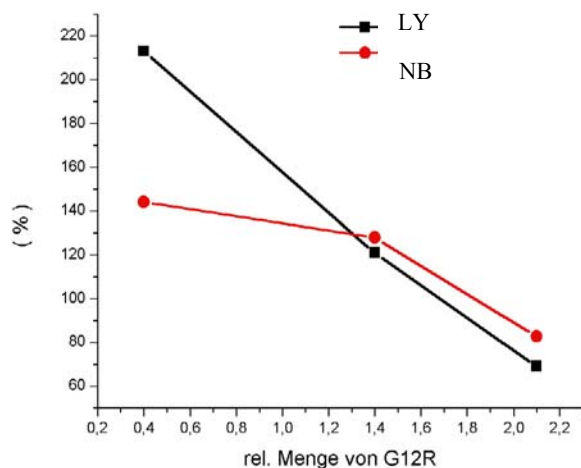


Abb.5-2 Korrelation der Kopplung von LY und NB mit den relativen Mengen von G12R in der Doppeltransfektante HeLa rCx43/G12R. Die rel. Menge von G12R bezogen auf die Cx31 WT-Menge.

auftritt, wenn es allein exprimiert wird. Nach der Funktionsanalyse mittels Mikroinjektion von verschiedenen Farbstoffen ergaben sich nicht so signifikante Unterschiede in rCx43/G12R Doppeltransfektanten im Vergleich zur HeLa hCx31/G12R Doppeltransfektanten.

Die erhöhte Kopplung der Cx31 Mutante wurde durch das Vorhandensein des rCx43 Wildtyp unterdrückt. Dieser transdominante Effekt ist unerwartet, weil die mCx31-Kanäle keine heterotypischen Kanäle mit mCx43 bilden (Elfgang et al., 1995). Die Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass in den Doppeltransfektanten entweder heteromere Kanäle gebildet werden oder sich die Connexone bei der Bildung der Gap Junction-Plaques gegenseitig beeinflussen, so dass die erhöhte Kommunikationsfähigkeit und die Letalität der Cx31-Mutation kompensiert werden. Auf die Möglichkeit, dass das Fehlen von Cx31 durch andere Connexine kompensiert werden kann, deuten auch Ergebnisse einer Cx31 Knock-out-Maus hin, die außer kleineren Gonaden und Sterilität keinen auffälligen Phänotyp zeigte (Plum et al., 2000).

5.2 Mutationen des menschlichen Cx31-Gens und die Hautkrankheit EKV

Es wurde über Mutationen von Connexin-Genen berichtet, die mit Krankheiten direkt in Zusammenhang stehen, wie Cx32-Mutationen mit der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit, die durch die Demyelinisierung eine periphere Neuropathie verursacht, oder Cx43-

Mutationen mit viscerotriauraler Heterotaxie (Herzmalformation), sowie Cx46 und Cx50-Mutationen, die autosomal dominant vererbten Katarakt verursachen und schließlich Cx26-Mutationen mit nicht syndromischer Gehörlosigkeit in Zusammenhang gebracht wurden. Zu diesen Cx-bedingten Krankheiten zählt die Hautkrankheit *Erythrokeratoderma variabilis*, die mit den Cx31-Gen-Mutationen in Zusammenhang gebracht wurde. Bei der Hautkrankheit EKV treten transiente rötliche Flecke auf der Haut (Erythema) und davon unabhängige lokale Hautverdickungen (Hyperkeratosis) auf. Diese Symptome dauern von ein paar Stunden bis Tage und die Formen des Erythemas variieren nach Anzahl, Position und Dauer unterschiedlich. Das Auftreten der Symptome der Hyperkeratosis und Erythema wird nicht nur durch innerliche Faktoren, sondern auch äußerliche Faktoren wie Stress, plötzliche Temperaturveränderungen, mechanische Reize oder Sonneneinwirkung beschleunigt. EKV-Symptome können bereits von Geburt an auftreten und dauern lebenslang. Diese Krankheit variiert innerhalb der Familien-Mitglieder, wird genetisch von Generation zu Generation weiter vererbt.

Um das verantwortliche Gen zu untersuchen, wurden genetische Untersuchungen an mehreren Familien seit dem Jahr 1980 durchgeführt. Verschiedene Mutationen von Cx37, Cx31 und Cx31.1 wurden anhand der Untersuchungen identifiziert, weiterhin wurde eine Mutation bei dem Cx26-Gen bei der autosomal dominant und rezessiv vererbten Keratoderma begleitet mit Gehörlosigkeit gefunden. Bei den Mutationen der Cx-Gene wurden 3 verschiedene Mutationen an dem phylogenetisch konservierten Glycin 12 der N-terminalen Domäne des Cx31-Gens (G12R, G12D, G12S) und Basenaustausch-Mutation an der Aminosäure 86 (Cystein nach Serin) in 2 unabhängigen Familien gefunden (Richard et al., 2000).

In dieser Arbeit wurde ein Teil dieser Mutationen des Cx31-Gens in HeLa-Zellen untersucht und herausgefunden, dass die Funktion bzw. die Durchlässigkeit der mutierten Cx-Kanäle verändert ist. Diese Erhöhung der Durchlässigkeit der Kanäle kann auf strukturelle Veränderungen der N-terminalen Domäne der Connexine zurückzuführen sein. Interessanterweise wurde berichtet, dass bei einer anderen Glycin 12 Mutation, Glycin nach Asparaginsäure, kein Farnstofftransfer beobachtet wurde (Rouan et al., 2003). Das zeigt, dass der Austausch des Glycins nicht nur die Polarität der Poren verursacht, wie vorher spekuliert wurde (Verselis, 1994), sondern die

strukturelle Veränderung möglicherweise zu einer Vergrößerung der Poren oder/und zu einer verhinderten Kanal-Schließmöglichkeit führen könnten. Bei der Doppeltransfektanten mit Cx43-WT und der Cx31-Mutante trat eine Reduktion der erhöhten Durchlässigkeit auf. Daraus kann man schließen, dass die Mutationen des Cx31-Gens nicht direkt den Phänotyp der Hautkrankheit EKV verursachen sondern auch andere Faktoren an den Symptomen beteiligt sein müssen. Aus dem Ergebnis der Doppel-Transfektanten mit Cx43 und der Cx31 Mutante lässt sich schließen, dass die Cx31 Knock-out Maus aufgrund der Kompensation durch Cx43 keine Symptome an der Haut zeigte. Es kann spekuliert werden, dass die veränderte Kommunikation der Zellen durch das mutierte Cx31-Gen bei der Differenzierung der Epidermiszellen, besonders bei der Kornifizierung oder der vaskulären Dilatation der Haut eine Rolle spielen könnte, da es sich bei Keratinozyten um differenzierende Zellen handelt. In dieser Arbeit wurden erste Schritte der Untersuchung der Ursachen der EKV gemacht, es müssen jedoch weitere Untersuchungen folgen, um die Zusammenhänge zwischen den Mutationen des Cx31-Gens und dem Phänotyp der Krankheit restlos zu klären.

5.3 Deletionsmutante C122 von mCx45 und dominante Effekte

Die posttranslationale Modifikation, besonders die Phosphorylierung der verschiedenen Connexine, wie Cx43 (Crow et al., 1990; Musil et al., 1990), Cx32 (Traub et al., 1987) und Cx45 (Laing et al., 1994) wurde schon früher berichtet. Obwohl alle Connexine außer Cx26 Phospho-Proteine sind, weisen die C-terminalen Domänen der Connexine phylogenetisch variable Sequenzen mit variablen Positionen von Serin, Threonin und Tyrosin auf. Um den Einfluß der Phosphorylierung des C-Terminus auf die Funktion von Cx-Kanälen zu untersuchen, wurden verschiedene Mutationen an dem C-Terminus des Cx45 in Bezug auf potentielle Phosphorylierungsstellen in unserem Labor hergestellt und charakterisiert (Hertlein et al., 1998). Eine der Mutanten war die Deletionsmutante C122, bei der 26 Aminosäuren am C-Terminus von mCx45 deletiert sind. Obwohl 9 Serinreste am C-Terminus deletiert sind, wurden noch 11 % Phosphorylierung im Vergleich zu Cx45WT (100%) nachgewiesen. Die C122-Proteine wurden größtenteils nicht an die Membran transportiert, sondern waren im Cytoplasma lokalisiert, wie anhand von Immunfluoreszenz-Analysen und der subzellulären

Fraktionierung festgestellt wurde. Deshalb wurde keine Kopplung mit dem Farbstoff Lucifer Yellow und nur sehr geringe Kopplung mit Neurobiotin nachgewiesen. Diese funktionellen Defekte der C122-Proteine konnten durch Kokultivierung dieser mit Cx45-WT-Transfektanten aufgehoben werden, was darauf hindeutet, dass die C122-Proteine heterotypische Kanäle mit Cx45-WT-Proteinen bilden können und dadurch die Kommunikationsfähigkeit der C122-Proteine wiederhergestellt werden kann (Hülser et al., 2001). Da sich nach unseren Ergebnissen die meisten C122-Proteine im Cytoplasma befinden, ist schwer zu erklären, dass die Funktion der C122-Proteine durch die Bildung von heterotypischen Kanälen mit Cx45-WT wiederhergestellt werden kann. Um diesen dominanten Effekt der Cx45-WT-Proteine auf die Funktion der C122-Proteine bzw. den dominanten Effekt von C122 auf Cx45WT zu untersuchen, wurden HeLa Doppeltransfektanten von Cx45WT und C122 hergestellt und charakterisiert. Um diese gegenseitigen Einflüsse zu untersuchen und um möglichst unterschiedliche Expressionsverhältnisse zwischen Cx45 und C122 zu erhalten, wurden sowohl eine HeLa Cx45-Transfektante als auch eine C122-Transfektante als Ausgangszellen für die Herstellung der Doppeltransfektanten verwendet.

Nach IF-Analysen und Quantifizierung der IF-Signale konnte gezeigt werden, dass je mehr C122-Proteine sich in der Doppeltransfektanten im Verhältnis zu den Cx45-Proteinen befinden, desto weniger Signale lassen sich an den Kontaktmembran

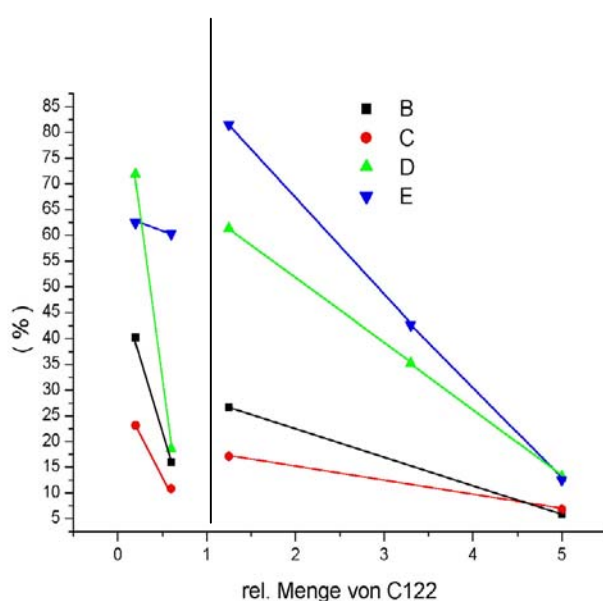


Abb.5-3 Korrelation der Kopplung von LY und NB und den quantitativen IF-Signalmengen mit den relativen Mengen von C122 in der Doppeltransfektante HeLa mCx45/C122.

Die rel. Menge von C122 bezogen auf die Cx45 WT-Menge.

B; Pixeldichte, C; Partikelmenge, D; LY-Kopplung, E; NB-Kopplung

nachweisen lassen. Das bedeutet, dass die C122-Proteine einen dominant negativen Effekt auf den Membrantransport der Cx45-Proteine ausüben, aber andererseits die Expression der Cx45-WT-Proteine einen positiven Effekt auf den C122-Transport verursachen. Das Ergebnis ist ein starker Hinweis auf das Vorhandensein heteromerer Kanäle von Cx45 und C122.

Die HeLa C122-Transfektante wurde deshalb als Ausgangszelle gewählt, weil sie 7 mal mehr Connexin-Protein exprimiert als die HeLa Cx45-Transfektante.

Das Ergebnis der Funktionsanalyse durch Mikroinjektion von Lucifer Yellow und Neurobiotin korreliert mit dem Ergebnis der Immunfluoreszenz-Analysen. Während bei Klon 51 mit einem Proteinverhältnis 1:0,2 der Cx45- und C122-Proteine 72 % Kopplung mit Lucifer Yellow und 63 % mit Neurobiotin im Vergleich zu der Cx45-Transfektante zu beobachten war, ergaben sich nur 19 % Kopplung mit Lucifer Yellow und 60 % mit Neurobiotin bei Klon 3 mit dem Verhältnis 1:0,6 (Cx45:C122). Die Diskrepanz zwischen der Kopplung von Lucifer Yellow und Neurobiotin wurde schon in früheren Untersuchungen gezeigt. Außerdem wurde gezeigt, dass sich die Kanalspezifität mit dem größeren Farbstoff Lucifer Yellow besser charakterisieren lässt (Elfgang et al., 1995). Bei den Doppeltransfektanten Klon 93, 27, 77, bei denen die HeLa C122-Transfektante als Ausgangszelle diente, verringerte sich die Kopplung mit steigender relativen Menge der C122-Proteine.

Der Klon 93 mit einem Proteinverhältnis 1:1,25 von Cx45- und C122-Proteine, und der Klon 27 mit einem Proteinverhältnis 1: 3,3 zeigten 61,3 % Kopplung mit Lucifer Yellow und 81,5 % mit Neurobiotin bzw. 35,2 % (LY) und 42,7 % (NB) im Vergleich zu der Cx45-Transfektante, während sich bei Klon 77 mit einem Verhältnis 1:5 nur 13,2 % Kopplung mit Lucifer Yellow und 12,6 % mit Neurobiotin ergaben (Abb. 5-3).

Aus der Funktionsanalyse der Cx-Kanäle mittels Mikroinjektionsanalyse kann man schließen, dass die C122-Proteine einen dominant negativen Effekt auf die Durchlässigkeit der mCx45-Proteine ausüben, da die Verminderung der Kopplung in den Doppeltransfektanten direkt von der C122-Proteinmenge abhängig ist. Dennoch war der dominant negative Effekt der C122-Proteine nicht linear steigend, wenn man die Kopplungsergebnisse von Klon 3 und Klon 93 miteinander vergleicht. Dies könnte

daran liegen, dass bei Klon 3 die HeLa Cx45-Transfektante als Ausgangszelle für Doppel-Transfektion, bei Klon 93 die HeLa C122-Transfektante genommen wurde.

Es wurde bestätigt, dass die C122-Proteine einen dominant negativen Effekt auf die Funktion der Cx45-Proteine ausüben, bzw. dass die Cx45-WT-Proteine den funktionellen Defekt der C122-Proteine aufheben.

5.4 Die Rolle der C-terminalen Domäne des Cx45 für den Membrantransport

Bei der HeLa Transfektante C122 wurde gezeigt, dass der größte Teil der C122-Proteine nicht an die Membran transportiert wird, sondern im Cytoplasma lokalisiert ist, wie anhand von Immunfluoreszenz-Analysen und der subzellulären Fraktionierung festgestellt wurde (Hertlein et al., 1998). Deshalb wurde vermutet, dass es sich nicht um einen funktionellen Defekt der C122-Kanäle handelt, sondern um einen defekten Membrantransport. Die Bildung von funktionsfähigen heterotypischen Kanälen mit Cx45-Wildtyp zeigt, dass neben den Transportdefekt um einen funktionellen Defekt handelt. Außerdem wurde durch Elektronenmikroskop-Analyse gezeigt, dass es keine Unterschiede in der Größe zwischen den Gap Junction-Plaques von mCx45 und mutiertem C122 gibt (Hülser et al., 2001).

Durch Immunfluoreszenz-Analysen der Doppeltransfektanten von Cx45 WT und C122 wurde gezeigt, dass je nach C122-Proteinmenge im Verhältnis zu Cx45-Proteinen weniger IF-Signale an der Kontaktmembran nachgewiesen wurden. So wurde bei der HeLa C122 Transfektante nur 5,9% Partikelanzahl und 5,1% Pixeldichte im Vergleich zu Cx45 Wildtyp mit 100% Partikelanzahl und Pixeldichte nachgewiesen. Klon 51 ergab mit einem Proteinverhältnis von 1:0,2 (Cx45/C122) 40,2% Pixeldichte bzw. 23,1% Partikelanzahl, während sich bei Klon 93 mit 1:1,25 und Klon 77 mit 1:5 26,7%, 17,1% bzw. 5,8% Pixeldichte und 6,8% Partikelanzahl nachweisen lässt. Daraus kann man schließen, dass der C-Terminus von mCx45 für den Membrantransport eine wichtige Rolle spielt. Die Funktion des fehlenden Stück des C-Terminus kann durch Bildung von heteromeren Kanälen mit HeLa Cx45-Wildtyp in Doppeltransfektanten teilweise kompensiert werden, so dass die Connexine in den Doppeltransfektanten wieder an die Kontaktmembranen transportiert werden.

Nach heutiger Vorstellung werden die Connexine als Monomere im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und auf dem Weg durch den Golgi-Apparat zu Connexonen oligomerisiert (Musil & Goodenough, 1993; Evans et al., 1999). Im Trans-Golgi-Kompartiment des Golgi-Apparats werden die Connexone in Transportvesikel verpackt und zur Membran transportiert. Die Connexone werden durch Vesikelfusion in die Membran eingebracht und die frei diffundierenden Halbkanäle werden in einen Gap Junction-Plaques integriert und ein kompletter Gap Junction-Kanal gebildet, wobei die Gap Junction-Plaques einem ständigen, dynamischen Umbau unterliegen, bei dem die Halbkanäle über Vesikel aus dem Plaques entnommen und dem Abbau zugeführt werden (Laird et al., 1996).

Nach der Halbwertszeit-Bestimmung wurde festgestellt, dass die Halbwertszeit der Cx45 und C122-Proteine in Doppeltransfektanten einen Unterschied zu der Cx45-Wildtyp und C122-Einfachtransfektante aufweist. Die Halbwertszeit von Cx45 und C122 in HeLa Zellen betragen 4,0 bzw. 3,4 Std., während die Halbwertszeiten von Cx45- und C122-Proteinen 4,79 und 4,78 Std. bei Klon 3 mit einem Proteinverhältnis von 1:0,6 (Cx45/C122) und 4,37 bzw. 3,99 Std. bei Klon 51 mit einem Proteinverhältnis von 1:0,2 festgestellt wurden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Deletion des C-Terminus die verkürzte Halbwertszeit von Cx45 verursacht. Im Gegensatz dazu wurden die Cx45- und C122-Proteine in den Doppeltransfektanten langsamer als bei Cx45-Wildtyp abgebaut werden. Daraus kann man schließen, dass die reduzierten IF-Signale bei der HeLa C122 Transfektante und den Doppeltransfektanten nicht auf einen schnelleren Abbau von Connexin-Proteinen zurückzuführen sind.

Bei der Oligomerisierungsstudie wurde gezeigt, dass die Oligomerisierung der Cx45- und C122-Proteine bei HeLa C122 Transfektanten und Doppeltransfektanten keinen großen Unterschied ergab (s. Tab. 4-8).

Um die funktionelle Bedeutung des Carboxy-Terminus von Connexin-Proteinen zu untersuchen, wurden Deletionsmutanten auch von anderen Connexinen hergestellt. Bei der Deletionsmutante von Cx50 (Cx50A294stop) wurde festgestellt, dass die pH-Abhängigkeit der Cx-Kanäle (pHi-sensitivity) bei der Deletionsmutante verloren wurde, die Connexin-Kanäle des Wildtyps bei dem pH-Wert unter pH 6,3 blockiert wird (Xu et al., 2002; Lin et al., 1998). Durch andere Studien mit der Deletionsmutante von Cx43

(Cx43 Δ 263) wurde gezeigt, dass ohne Carboxy-Terminus eine Interaktion mit c-src unmöglich war, und folglich die Gap Junction-Kommunikation nicht negativ beeinflusst wurde (Giepmans et al., 2001). Bei einer anderen Deletionsmutante von Cx43 (M257, Deletion bei Aminosäure 257) wurde der gleiche Effekt von pH-Unabhängigkeit mit dem pH 6,2 – 7,2 festgestellt, wie er bei der Deletionsmutante von Cx50 festgestellt wurde (Morley et al., 1996).

Der weitere Schritt zur Untersuchung der Funktion des Carboxy-Terminus von Cx45 ist die Herstellung einer Transgenen Maus, mit den Cx43-Deletionsmutanten (Cx43K258stop) mit dem Phänotyp, trockene Haut und geknicktem Schwanz und infolge Hauttrockenheit eine hohe Letalität zeigt (Karen Maas, persönliche Mitteilung, Dissertation in Vorbereitung).

6. Ausblick

Um den Effekt des mutierten Cx31-Gens auf die Funktion der Gap Junction-Kanäle genauer zu untersuchen, sollte zuerst untersucht werden, ob heteromere Kanäle in Doppeltransfektanten existieren. Dafür könnten anhand der in dieser Arbeit hergestellten Doppeltransfektanten von Cx31eGFP und mutierten Cx31 Kopräzipitationsanalysen durchgeführt werden. Zusätzlich könnten elektrophysiologische Untersuchungen nützlich sein, um nicht nur Vorhandensein der heteromeren Kanäle nachzuweisen, sondern auch die Kanaleigenschaften festzustellen. In dem Zusammenhang der Funktion von Gap Junction-Kanälen wäre es interessant, den Effekt der Mutation, G12R in anderen Connexinen der β -Klasse wie Cx26 oder Cx32 in HeLa Zellen zu untersuchen, ob der festgestellte letale Effekt und die erhöhte Durchlässigkeit durch die Mutation in dem Aminoterminus von Cx31 auch in anderen Connexinen verursacht werden.

Parallel zu der funktionellen Untersuchung der Gap Junction-Kanäle könnte die physiologische Untersuchung der transgenen Maus, die das mutierte Cx31-Protein exprimiert, weiteren Aufschluß über den Phänotyp der Hautkrankheit Erythrokeratoderma variabilis liefern. Wenn der Phänotyp der *Erythrokeratoderma variabilis* mit einer Dilatation der Blutgefäße zusammenhängen sollte, sollte nicht nur

das Expressionsverhältnis von Connexinen beachtet werden, sondern auch immunologische Untersuchung durchgeführt werden.

Es wurde festgestellt, dass der Carboxy-Terminus des Cx45 eine unabdingbare Rolle bei dem Transport der Connexin-Proteine zu den Membranen spielt. Erstens sollten anhand der hergestellten Doppeltansfektanten von Cx45 und C122 Kopräzipitationen und elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt werden, um den dominant negativen Effekt des Carboxy-Terminus von Cx45 auf den Membrantransport genauer zu erläutern.

Bisher ist nur wenig bekannt, wie die Connexin-Proteine an die Membran transportiert und in die Membran integriert werden. Nach Oligomerisierungsstudien zeigte die Doppeltransfektante von Cx45 und C122 keine großen Unterschiede bei der Oligomerisierung der Cx45- und C122-Proteine. Deshalb wäre es interessant, mit Cx45 bzw. C122 interagierende Proteine festzustellen, um den Transport des Connexin-Proteins besser zu verstehen. In diesem Zusammenhang wurden die Fusionsproteine Cx45- und C122-HA hergestellt. Anhand der Fusionsproteine sollten Bindungstests mit Mikrosom und Pull-down-Assays durchgeführt werden, um die Interaktion von Connexin-Proteinen mit anderen Proteinen zu untersuchen.

7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte anhand der Mutationen von menschlichem Cx31 und Maus Cx45, zum einen die funktionelle Bedeutung der Mutationen, die auf unterschiedlichen Domänen lokalisiert sind, und ihr dominanter Effekt auf die Funktion der Wildtyp-Proteine untersucht werden, und zum anderen der mögliche Zusammenhang zwischen den Mutationen und den Cx-bedingten Krankheiten hergestellt werden.

Verschiedene Mutationen des Cx31-Gens wurden in der Haut von Patienten mit der Hautkrankheit *Erythrokeratoderma variabilis* identifiziert. Um den Zusammenhang zwischen den Mutationen und den Symptomen herzustellen, wurden Mutanten, bei denen Aminosäuren verändert waren, die bei allen Connexinen der β -Klasse konserviert sind, in die HeLa-Zellen transfiziert und charakterisiert. Es wurde festgestellt, dass die Expression der mutierten hCx31 G12R-Proteine eine Letalität der HeLa-Zellen zufolge hatte (Diestel et al., 2002). Deshalb wurden die mutierte Cx31 G12R- und C86S-cDNS in die HeLa-Zellen mit Cx31-WT transfiziert und die Doppeltransfektanten charakterisiert. In Immunofluoreszenz-Analysen wurde festgestellt, dass sowohl Cx31-WT-, als auch mutierte Cx31-Proteine an den Kontaktmembranen lokalisiert sind. Bei den Doppeltransfektanten mit Cx31-WT und G12R, bzw. C86S wurde nicht nur erhöhte Durchlässigkeit der Farbstoffe Lucifer Yellow und Neurobiotin, sondern auch ein Transfer der Farbstoffe Ethidiumbromid und Propidiumjodid festgestellt, im Gegensatz zu der HeLa hCx31WT Einfachtransfektante. Dieser dominant positive Effekt auf die Durchlässigkeit der Kanäle wurde besonders bei dem Verhältnis 1:0,15-0,3 von Cx31-WT und Mutanten deutlich. Bei den Doppeltransfektanten von HeLa rCx43/G12R wurde festgestellt, dass die Cx43-WT-Proteine teilweise die erhöhte Kopplung der mutierten Cx31-Proteine reduzieren können, wie hinsichtlich des immer noch erhöhten Farbstofftransfers festgestellt wurde. Daraus kann man schließen, dass die Mutationen G12R am N-Terminus und C86S in der 2. Transmembrandomäne des Cx31-Proteins eine Konformationsänderung und damit erhöhte Kopplung verursachen, wobei dieser Effekt durch Cx43-WT kompensiert werden konnte und sogar G12R und C86S einen transdominanten Effekt auf die Funktion der Cx43-Proteine ausüben (gain of function).

C122 ist eine Mutante von Maus Cx45, bei der 26 Aminosäuren mit 9 Seinresten am C-Terminus deletiert sind. Der größte Teil der C122-Proteine in HeLa C122-Transfektanten ist im perinukleären Raum lokalisiert und zeigt keine Kopplung mit dem Farbstoff Lucifer Yellow. Um die funktionelle Rolle von C122 und seinen möglichen dominanten Effekt zu untersuchen, wurde die deletierte Cx45, C122-cDNS in die HeLa-Zellen mit Cx45-WT transfiziert und die Doppeltransfektanten charakterisiert. Bei den Doppeltransfektanten mit Cx45-WT und C122 wurde eine reduzierte Durchlässigkeit des Farbstoffs Lucifer Yellow und Neurobiotin festgestellt, im Vergleich zur HeLa mCx45 Einfachtransfektante. Dieser dominant negative Effekt auf die Durchlässigkeit der Kanäle korreliert direkt mit der C122-Expression. Die Immunfluoreszenz-Analyse zeigte, dass der Membrantransport von Connexin-Proteinen auch direkt abhängig von den C122-Mengen in Doppeltransfektanten ist, wobei die Halbwertszeit und die Oligomerisierung von Cx45 und C122 kaum Unterschiede zeigten. Daraus kann man schließen, dass der C-Terminus von Cx45 für den Transport und die Funktion wichtig ist und einen dominant positiven Effekt auf den Transport von C122 ausüben kann und damit der funktionelle Defekt der C122-Proteine durch HeLa Cx45-WT-Proteine aufgehoben werden kann.

8. Literaturverzeichnis

- Ahmed, S., Diez, J. A., George, C. H., Evans, W. H. (1999). Synthesis and assembly of connexins in vitro into homomeric and heteromeric functional gap junction hemichannels. *Biochem. J.* 339: 247-253
- Barr, L., Dewey, M.M., Berger W. (1965). Propagation of action potentials and the structure of the nexus in cardiac muscle. *J. Gen. Physiol.* 48: 797-823
- Barrio, L.C., Suchyna, T., Bargello, T., Xu, L.X., Roginsky, R.S., Bennett, M.V.L., Nicholson, B.J. (1991). Gap junctions formed by connexin26 alone and in combination are differently affected by applied voltage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8410-8414
- Bennett, M.V. (1997). Gap junctions as electrical synapses. *J. Neurocytol.* 26: 349-366
- Beardslee, M.A., Laing, J.G., Beyer, E.C. und Saffitz, J.E. (1998). Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ. Res.* 83: 629-635
- Bergoffen, J., Scherer, S.S., Wang, S., Scott, M.O., Bone, L.J., Paul, D.L., Chen, K., Lensch, M.W., Chance, P.F. und Fishbeck, K.H. (1993). Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262: 2039-2042
- Berthoud, V.M., Ledbetter, M.S., Hertzberg, E.L. und Sáez, J.C. (1992). Connexin43 in MDCK cells: regulation by a tumor-promoting phorbol ester and Ca^{2+} . *Eur. J. Cell Biol.* 57: 40-50
- Berthoud, V.M., Rook, M., Hertzberg, E.L., Sáez, J.C. (1993). On the mechanism of cell uncoupling induced by a tumor-promoting phorbol ester and Ca^{2+} . *Eur. J. Cell Biol.* 62: 384-396
- Berthoud, V.M., Baßnett, S. und Beyer, E.C. (1999). Cultured chicken embryo lens cells resemble differentiating fiber cells in vivo and contain two kinetic pools of connexin56. *Exp. Eye Res.* 68: 475-484
- Berry, V., Mackay, D., Khaliq S., Francis, P.J., Hameed, A., Anwar, K., Mehdi, S.Q., Newbold, R.J., Ionides, A., Shiels, A., Moore, T. und Bhattacharya, S.S. (1999). Connexin50 mutation in a family with congenital "zonular nuclear" pulverulent cataract of Pakistani origin. *Hum. Genet.* 105: 168-170
- Bevans, C.G., Kordel, M., Rhee, S.K. und Harris, A.L. (1998). Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *J. Biol. Chem.* 273: 2808-2816
- Beyer, E.C., Paul, D.L. und Goodenough, D.A. (1987). Connexin43: A protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J. Cell Biol.* 105: 2621-2629
- Beyer, E.C., Kistler, J., Paul, D.L. und Goodenough, D.A. (1989). Antisera directed against connexin43 peptides react with a 43-kD protein localized to gap junctions in myocardium other tissues. *J. Cell Biol.* 108: 595-605.
- Beyer, E. C. (1993). Gap Junctions. *International Review of Cytology* 137c: 231-242.
- Brink, P.R., Cronin, K., Banach, K., Peterson, E., Westphale, E M., Seul, K.H., Ramanan, S.V. und Beyer, E.C. (1997). Evidence for heteromeric gap junction channels formed from rat connexin43 and human connexin37. *Am. J. Physiol.* 273: C1386-C1396
- Britz-Cunningham, S.H., Shah, M.M., Zuppan, C.W. und Fletcher, W.H. (1995). Mutations of the Connexin43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. *N. Engl. J. Med.* 332: 1323-1329.

- Bruzzone, R., White, T.W., Scherer, S.S., Fishbeck, K.H. und Paul, D.L. (1994). Null mutations of connexin32 in patients with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 13: 1253-1260
- Bruzzone, R. und Ressot, C. (1997). Connexins, gap junctions and cell-cell signalling in the nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 9: 1-6
- Butterweck, A., Elfgang, K., Willecke, K. und Traub, O. (1994). Differential expression of the gap junction proteins connexin45, -43, 40, -31, and -26 in mouse skin. *Europ. J. Cell Biol.* 65: 152-163.
- Cascio, M., Kumar, N., Safarik, R., Gilula, B.(1995). Physical characterization of gap junction membrane connexons (hemi-channels) isolated from rat liver. *J. Biol. Chem.*270: 18643-18648
- Caspar, D.L.D., Goodenough, D.A., Makowski, L. und Phillips, W.C. (1977). Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and X-ray diffraction. *J. Cell Biol.* 74: 605-628
- Catro, C., Gomez-Hernandez, J.M. Silander, K. Und Barrio, L.C. (1999). Altered formation of hemichannels and gap junction channels caused by C-terminal connexin-32 mutations. *J. Neurosci.* 19: 3752-3760.
- Chalcroft, J.P. und Bullivant, S. (1970). An interpretation of liver cell membrane and junction structure based on observation of freeze fracture replicas of both sides of the fracture. *J. Cell Biol.* 47: 49-60
- Chang, M., Werner, R. und Dahl, G. (1996). A role for an inhibitory connexin in testis? *Dev. Biol.* 175: 50-56.
- Choudhry, R., Pitts, J.D. und Hodgins, M.B. (1997). Changing patterns of gap junctional intercellular communication and connexin distribution in mouse epidermis and hair follicles during embryonic development. *Dev. Dyn.* 210: 417-430
- Crow, D.S., Beyer, E.C., Paul, D.L., Kobe, S.S. und Lau, A.F. (1990). Phosphorylation of connexin43 gap junction protein in uninfected and rous sarcoma virus-transformed mammalian fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 10: 1754-1763
- Dahl, E., Winterhager, E., Reuss, B., Traub, O., Butterweck, A. und Willecke, K. (1996). Expression of the gap junction proteins connexin31 and Connexin43 correlates with communication compartments in extraembryonic tissues and in the gastrulating mouse embryo, respectively. *J. Cell Sci.* 109: 191-197
- Delmar, M., Stergiopoulos, K.S., Homma, N., Ek-Viktorin J.F. und Taffet, S.M. (1998). Gap Junctions R.Werner (Ed) IOS Press: 8-12
- Deschenes, S.M., Walcott, J.L., Wexler, T.L., Scherer, S.S. und Fishbeck, K.H. (1997). Altered trafficking of mutant connexin32. *J. Neurosci.* 17: 9077-9084
- Dezawa, M., Mutoh, T., Dezawa, A. und Adachi-Usami, E. (1998). Putative gap junctional communication between axon and regenerating Schwann cells during mammalian peripheral nerve regeneration. *Neuroscience* 85: 663-7
- Di, W. L., Rugg, E. L., Leigh, I. M., Kelsell, D. P. (2001). Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin31. *J. invest. Dermatol.* 117(4): 958-64
- Diez, J.A., Ahmad, S. und Evans, W.H. (1999). Assembly of heteromeric connexons in guinea-pig liver en route to the Golgi apparatus, plasma membrane and gap junctions. *Eur. J. Biochem.* 262: 142-148.
- Duflot-Dancer, A., Mesnil, M. und Yamasaki, H. (1997). Dominant-negative abrogation of connexin-mediated cell growth control by mutant connexin genes. *Oncogene* 15: 2151-2158

- Dunham, B., Liu, S., Taffet, S., Trabka-Janik, E., Delmar, M., Petryshyn, R., Zheng, S. und Vallano, M. (1992). Immunolocalization and expression of functional and nonfunctional cell-to-cell channels from wild-type and mutant rat connexin43 cDNA. *Circ. Res.* 70:1233-1243
- Eckert, R.L. (1989). Structure, function and differentiation of the keratinocyte. *Physiol. Rev.* 69: 1316-1346.
- Edelman, G.M. (1986). Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2: 81-116
- Edelman, G.M. (1988). Morphoregulatory molecules. *Biochem.* 27: 3533-3543
- Eiberger J., Degen, J., Romualdi, A., Deutsch, U., Willecke, K., Söhl, G. (2001). Connexin genes in the mouse and human genome. *Cell Commun. Adhes.* 8: 163-165
- Elfgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, A.R., Hülser, D.F. und Willecke, K. (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.* 126: 805-817
- Elvira, M., Diez, J.A., Wang, K.K.W. und Villalobo, A. (1993). Phosphorylation of connexin32 by protein kinase C prevents its proteolysis by μ -Calpain and m-Calpain. *J. Biol. Chem.* 268:14294-14300
- Elvira, M., Wang, K.K.W. und Villalobo, A. (1994). Phosphorylated and nonphosphorylated connexin32 molecules in gap junction plaques are protected against calpain proteolysis after phosphorylation by protein kinase C. *Biochem. Soc. Trans.* 22: 793-796
- Enkvist, M.O. und McCarthy, K.D. (1994). Astroglial gap junction communication is increased by treatment with either glutamate or high K^+ concentration. *J. Neurochem.* 62: 489-495
- Evans, W.H., Martin, P.E.M. (2002). Gap-Junctions: structure and function. *Mol. Membr. Biol.* 19: 121-136
- Fairwether, N., Bell, C., Cochrane, S., Chelly, J., Mostacciuolo, M.L., Monaco, A.P. und Haites, N.E. (1994). Mutations in the connexin32 gene in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum. Mol. Genet.* 3: 29-34
- Falk, M.M., Bühler, L.K., Kumar, N.M., Gilula, N.B. (1997). Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels. *EMBO J.* 16: 2703-2716
- Felgner, P.L. und Ringold, G.M. (1989). Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 337: 387-8
- Fishman, G.I., Moreno, A.P., Spray, D.C. und Levinwand, L.A. (1991). Functional analysis of human cardiac gap junction channel mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 3525-3529
- Fletcher, W.H., Britz-Cunningham, S.H. und Zuppan, C.W. (1995). Connexin43 mutation in sporadic and familial defects of laterality-Reply. *N. Engl. J. Med.* 333: 941-942
- Flower N.E. (1977). Invertebrate gap junctions. *J. cell Sci.* 25: 163-171
- Foote, C.I., Zhou, L., Zhu, X. und Nicholson, B.J. (1998). The pattern of disulfide linkage in the extracellular loop regions of connexin 32 suggests a model for the docking interface of gap junctions. *J. Cell Biol.* 140: 1187-1197.
- Friend, D.S. & Gilula, N.B. (1972). Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. *J. Cell Biol.* 53: 758-776

- Furshpan, E.J. & Potter, D.D. (1959). Transmission at the giant motor synapses of crayfish. *J. Physiol.* 145: 289-325
- Furshpan, E.J. & Potter, D.D. (1968). Low-resistance junctions between cells in embryos and tissue culture. *Curr. Top. Dev. Biol.* 3: 95-127
- Gabriel, H.D., Jung, D., Butzler, C., Temme, A., Traub, O., Winterhager, E. und Willecke K. (1998). Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26 deficient mice. *J. Cell Biol.* 140: 1453-1461
- Gatz, C. und Quail, P.H. (1988). Tnl0-encoded tet repressor can regulate an operator containing plant promoter. *Proc. Acad. Natl. Sci.* 85: 1394-1397
- Gatz, C., Kaiser, A. und Wendenburg, R. (1991). Regulation of a modified CaMV 35S promoter by the Tnl0-encoded tet-repressor in transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237
- George, C.H., Kendall, J.M. und Evans, W.H. (1999). Intracellular trafficking pathways in the assembly of connexins into gap junctions. *J. Biol. Chem.* 274: 8678-8685.
- Gerdes, H.H. und Kaether, C. (1996). Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Letters* 389: 44-47.
- Ghoshroy, S., Goodenough, D.A. und Sosinski, G.E. (1995). Preparation, characterization, and structure of half gap junctional layers split with urea and EGTA. *J. Membrane Biol.* 146: 15-28
- Giepmans, B. N., Hengeveld, T., Postma, F. R., Moolenaar, W. H. (2001). Interaction of c-Src with gap junction protein connexin-43. Role in the regulation of cell-cell communication. *J. Biol. Chem.* 276(11): 8544-9
- Gimlich, R.L., Kumar, N.M. und Gilula, N.B. (1990). Differential regulation of the levels of three gap junction mRNAs in *Xenopus* embryos. *J. Cell Biol.* 110: 597-605.
- Ginzberg, R.D., & Gilula, N.B. (1979). Modulation of cell junctions during differentiation of the chicken otocyst sensory epithelium. *Develop. Biol.* 68: 110-129
- Goldberg, G.S., Bechberger, J.F. und Naus, C.C. (1995). A preloading method of evaluating gap junctional communication by fluorescent dye transfer *Biotechniques* 18: 490-497
- Goliger, J.A. und Paul, D.L. (1994). Expression of gap junction protein Cx26, Cx31.1, Cx37 and Cx43 in developing and mature rat epidermis. *Devel. Dyn.* 1: 1-13
- Goodenough, D.A., Revel, J.P.(1976). A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver. *J. Cell Biol.* 45: 272-290
- Goodenough, D.A. (1976). In vitro formation of gap junction vesicles. *J. Cell Biol.* 68: 220-231
- Goodenough, D.A., Paul, D.L. und Jesaitis, L. (1988). Topological distribution of two connexin 32 antigenetic sites in intact and split rodent hepatocyte gap junctions. *J. Cell Biol.* 107: 1817-1824.
- Goodenough, D.A. (1992). The crystalline lens. A system networked by gap junctional intercellular communication. *Sem. Cell Biol.* 3: 49-58
- Goodenough, D.A., Goliger, J.A. und Paul, D.L. (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Ann. Rev. Biochem.* 65: 475-502
- Gossen, M. und Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Acad. Natl. Sci.* 89: 5547-5551

Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W. und Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclins in mammalian cells. *Science* 268: 1765-1769

Green, C.R. (1988). Evidence mounts for the role of gap junctions during development. *Bioessays* 8: 7-10

Gros, D.B. und Jongasma, H.J. (1996). Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* 18: 719- 730

Guan, X., Wilson, S., Schlender, K.K. und Ruch, R.J. (1996). Gap junction disassembly and connexin43 dephosphorylation induced by 18 beta-glycyrrhetic acid. *Mol. Carcinog.* 16: 157-164

Guo, H., Acevedo, P., Parsa, F.D. und Bertram, J.S. (1992). Gap junctional protein connexin43 is expressed in dermis and epidermis of human skin: differential modulation by retinoids. *J. Invest. Dermatol* 99: 460-467

Haefliger, J.A., Bruzzone, R., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G. und Paul, D.L. (1992). Four novel members of the connexin family of gap junction proteins. Molecular cloning, expression, and chromosome mapping. *J. Biol. Chem.* 267: 2057-2064.

Hammond, C. und Helenius, A. (1995). Quality control in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 523-529

He, D. S., Jiang, J. X., Taffet, S. M., Burt, J. M. (1999). Formation of heteromeric gap junction channels by connexin 40 and 43 in vascular smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 6495-6500

Hendrix, E.M., Mao, S.J.T., Everson, W. und Larson, W.J. (1992). Myometrial connexin43 trafficking and gap junction assembly at term and in preterm labor. *Mol. Reprod Dev.* 33: 27-38

Hennemann, H. (1992a). Isolierung und Charakterisierung von neuen Connexin-Genen der Maus, die für Gap Junction Proteine kodieren. *Doktorarbeit an der Rheinischen FriedrichWilhelms-Universität Bonn:* 75.

Hennemann, H., Dahl, E., White, J.B., Schwarz, H.J., Lalley, P.A., Chang, S., Nicholson, B.J. und Willecke, K. (1992b). Two gap junction genes, connexin 31.1 and 30.3, are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expressed in skin. *J. Biol. Chem.* 267: 17225-17233.

Hennemann, H., Kozjek, G., Dahl, E., Nicholson, B. und Willecke, K. (1992c). Molecular cloning of mouse connexins26 and -32: similar genomic organization but distinct promoter sequences of two gap junction genes. *Eur. J. Cell Biol.* 58: 81-89.

Hennemann, H., Suchyna, T., Lichtenberg-Frate, H., Jungbluth, S., Dahl, E., Schwarz, J., Nicholson, B.J. und Willecke, K. (1992d). Molecular cloning and functional expression of mouse conexin40, a second gap junction gene preferentially expressed in lung *J. Cell Biol.* 117: 1299-1310

Hentula, M., Peltonen, J., Peltonen, S., (2001). Expression profiles of cell-cell and cell-matrix junction proteins in developing human epidermis. *Arch. Dermatol. Res.* 293(5): 259-67

Hertlein, B., Butterweck, A., Haubrich, S., Willecke, K. und Traub, O. (1998). Phosphorylated carboxyterminal serine residues stabilize the mouse gap junction protein connexin45 against degradation. *J. Membr. Biol.* 162: 247-257.

Hertzberg, E.L., Disher, R.M., Tiller, A.A., Zhou, Y. und Cook R.G. (1988). Topology of the M_T 27.000 liver gap junction protein. Cytoplasmic localization of amino- and carboxyl-termini and a hydrophilic domain which is protease hypersensitive. *J. Biol. Chem.* 263: 19105-19111.

Homma, N., Alvaro, J.L., Coombs, W., Stergiopoulos, K., Taffet, S.M., Lau, A.F. und Delmar, M. (1998). A particle-receptor model for the insulin-induced closure of connexin43 channels. *Circ. Res.* 83: 27-32.

- Hülser, D., Rehkopf, B. und Traub, O. (1997). Dispersed and aggregated gap junction channels identified by immunogold labeling of freeze fracture membranes. *Exp. Cell Res.* 233: 240-251
- Hülser, D.F., Rütz, M.L., Eckert, R. und Traub, O. (2001). Functional rescue of defective mutant connexons by pairing with wild-type connexons. *Eur. J. Physiol.* 441: 521-528
- Jakob, A. und Beyer, E.C. (2001). Mouse Connexin45: genomic cloning and exon usage. *DNA and Cell Biol.* 20: 11-19
- Jiang, J.X. und Goodenough, D.A. (1996). Heteromeric connexons in lens gap junction channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1287-1291
- Jinn, Y., Ichioka, M. und Marumo, F. (1998). Expression of connexin32 and connexin43 gap junction proteins and E-Cadherin in human lung cancer. *Cancer Lett.* 15: 161-169
- Jordan K., Solan, J.L., Dominguez, M., Sia, M., Hand, A., Lampe, P.D. und Laird, D.W. (1999). Trafficking, assembly, and function of a connexin43-green fluorescent protein chimera in live mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 10: 2033-2050.
- Johnson, R.G. und Sheridan, J.D. (1971). Junctions between cancer cells in culture. Ultrastructure and permeability. *Science* 174: 717-719
- Kalimi, G.H. und Lo, C.W. (1988). Communication compartments in the gastrulating mouse embryo. *J. Cell Biol.* 107: 241-255
- Kam, E., Melville, L. und Pitts, J.D. (1986). Patterns of junctional communication in skin. *J. Invest. Dermatol.* 87: 748-753
- Kamibayashi, Y., Oyamada, M., Oyamada, Y. und Mori, M. (1993). Expression of gap junction proteins connexin26 and 43 is modulated during differentiation of keratinocytes in newborn mouse epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 101: 773-778
- Kamibayashi, Y., Oyamada, Y., Mori, M. und Oyamada, M. (1995). Aberrant expression of gap junction proteins (connexins) is associated with tumor progression during multistage mouse skin carcinogenesis in vivo. *Carcinogenesis* 16: 1287-1297
- Kanemitsu, M.Y., Jiang, W. und Eckhart, W. (1998). Cdc2-mediated phosphorylation of the gap junction protein, connexin43, during mitosis. *Cell Growth Differ.* 9:123-21
- Kelsell, D.P., Wilgoss, A.L., Richard, G., Stevens, H.P., Muoro, C.S. und Leigh, I.M. (2000). Connexin mutations associated with palmoplantar keratoderma and profound deafness in a single family. *Eur. J. Hum. Genet.* 8: 141-144
- Kirchhoff, S., Nelles, E., Hagendorff, A., Krüger, O., Traub, O. und Willecke, K. (1998). Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr. Biol.* 8: 299-302
- Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lübbert, H. und Bujard, H. (1996). Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 10933-10938
- Koller, K.J., Whitehorn, E.A., Tate, E., Ries, T., Aguilar, B., Chernov-Rogan, R., Davies, A.M., Dobbs, A., Yen, M. und Barrett, R.W. (1997). A generic method for the production of cell lines expressing high levels of 7-transmembrane receptors. *Anal. Biochem.* 250: 5160

- Kondo, R.P., Wang, S.Y., John, S.A., Weiss, J.N. und Goldhaber, J.I. (2000). Metabolic inhibition activates a non-selective current through connexin hemichannels in isolated ventricular myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32:1859-1872
- Krutovskikh, V.A., Troyanosvsky, S.M., Piccoli, C., Tsuda, H., Asamoto, M. und Yamasaki, H. (2000). Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth in vivo. *Oncogene* 19: 505-513
- Kumar, N.M., Friend, D.S. und Gilula, N.B. (1995). Synthesis and assembly of human $\beta 1$ gap junctions in BHK cells by DNA transfection with the human $\beta 1$ cDNA. *J. Cell Sci.* 108, 3725-3734
- Kumar, N.M. und Gilula, N.B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell* 84: 381-388.
- Kwak, B.R. und Jongsma, H.J. (1996). Regulation of cardiac gap junction channel permeability and conductance by several phosphorylation conditions. *Mol. Cell Biochem.* 157: 93-99
- Kyte, J. und Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- Laing, J.G. Westphale, E.M., Engelmann, G.L., und Beyer, E.C. (1994). Charakterization of the gap junction protein, connexin45. *J. Membr. Biol.* 139: 31-40
- Laing, J.G. und Beyer, E.C. (1995). The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 270: 26399-26403
- Laing, J.G. und Beyer, E.C. (1996). Turnover of the gap junction protein Cx45. In: Molecular approaches to the function of intercellular junctions. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Lake Tahoe, California, S. 33 (Abstr.)
- Laing, J.G., Tadros, P.N., Westphale, E.M. und Beyer, E.C. (1997). Degradation of connexin43 gap junctions involves both the proteasome and the lysosome. *Exp. Cell Res.* 236: 482-492
- Laird, D.W. und Revel, J.P. (1990). Biochemical and immunochemical analysis of the arrangement of connexin 43 in rat heart gap junction membranes. *J. Cell Sci.* 97: 109-117.
- Laird, D.W. Puranam, K.L., Revel, J.P. (1991). Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem. J.* 272: 67-72
- Laird, D.W., Castillo, M. und Kasprzak, L. (1995). Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. *J. Cell Biol.* 131: 1193-1203
- Lampe, P.D., TenBroeck, E.M., Burt, J.M., Kurata, W.E., Johnson, R.G. und Lau, A.F. (2000). Phosphorylation of connexin43 on serine 368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J. Cell Biol* 149: 1503-12
- Larsen, W.J, Tung, H.N., Murray, S.A. und Swenson, C.A. (1979) Evidence for the participation of actin microfilaments and bristle coats in the internalisation of gap junction membrane. *J. Cell. Biol.* 83: 576-587
- Lee, S., Gilula, N.B. und Warner, A.E. (1987). Gap junctional communication and compaction during preimplantation stages of mouse development. *Cell* 51: 851-860

- Lee, S.W., Tomasetto C., Sager, R. (1991). Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2825-2829
- Lin, J. S., Eckert, R., Kistler, J., Donaldson, P. (1998). Spatial differences in gap junction gating in the lens are a consequence of connexin cleavage. *Eur. J. Cell Biol.* 76(4): 246-50
- Liu, S, Taffet, S., Stoner, L., Delmar, M., Vallano, M.L. und Jalife, J. (1993) A structural basis for the unequal sensitivity of the major cardiac and liver gap junctions to intracellular acidification: The carboxyl tail length. *Biophys. J.* 64: 1422-1433
- Liu, T.F. und Johnson, R.G. (1999). Effects of TPA on dye transfer and dye leakage in fibroblasts with a connexin43 mutation at ser368. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 21: 387-90
- Liu, X.Z, Xia, X.J., Xu, L.R., Pandya, A., Liang, C.Y., Blanton, S.H., Brown, S.D.M., Steel, K.P. und Nance, W.E. (2000). Mutations in connexin31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss. *Hum. Mol. Genet.* 9: 63-67
- Lo, C.W. (1988). Communication compartments in insect and mammalian development. In: *Modern Cell Biology*. Hertzberg, E.L. und Johnson, R.G. (Hrsg.). Vol 7, New York, S. 505-514
- Lo, C.W. und Gilula, N.B. (1979). Gap junctional communication in the postimplantation mouse embryo. *Cell* 18: 411-422
- Locke, D., Perusinghe, N., Newman, T., Jayatilake, H., Evans, W. H., Monaghan, P. (2000). Developmental expression and assembly of connexins into homomeric and heteromeric gap junction hemichannels in the mouse mammary gland. *J. Cell Physiol.* 183(2): 228-237
- Loewenstein, W.R., Socol, S.J., Higashino, S., Kanno, Y. und Davidson, N. (1965). Intercellular communication: Renal, urinary bladder, sensory and salivary gland cells. *Science* 149: 295-298
- Loewenstein, W.R (1967). On the genesis of cellular communication. *Devel. Biol.* 15: 503-520
- Loewenstein, W.R (1981). Junctional intercellular communication: The cell-to-cell membrane channel. *Physiol. Rev.* 61: 829-913
- Loo, L.W., Berestecky, J.M., Kanemitsu, M.Y. und Lau, A.F. (1995). pp60^{src}-mediated phosphorylation of connexin43, a gap junction protein. *J. Biol. Chem* 270: 12751-12761
- Lopez-Bigas, N., Rabionet, R., Martinez, E., Banchs, I., Volpini, V., Vance, J.M., Arbones, M.L. und Estivill, X. (2000) An amino acid deletion in the human connexin31 gene (GJB3) is associated with sensorineural deafness and hereditary sensory neuropathy. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 413
- Lu, C. und McMahon, D.G. (1997). Modulation of hybrid $\beta\alpha$ gap junctional channel gating by nitric oxide. *J. Physiol.* 499: 689-699
- Lucke, T., Choudhry, R., Thom, R., Selmer, I.S., Burden, A.D. und Hodgins, M.B. (1999). Upregulation of connexin26 is a feature of keratinocyte differentiation in hyperproliferative epidermis, vaginal epithelium and buccal epithelium. *J. Invest. Dermatol.* 112: 354-361
- Macari, F., Landau, M., Cousin, P., Mevorah, B., Brenner, S., Panizzon, R., Schorderet, D.F., Hohl, D. und Huber, M. (2000). Mutation in the gene for connexin30.3 in a family with erythrokeratoderma variabilis. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 1296-1301
- Mackay D., Ionides A., Kibar Z., Rouleau, G., Berry, V., Moore, A., Shiels, A. und Bhattacharya, S. (1999). Connexin46 mutations in autosomal dominant congenital cataract. *Am. J. Hum. Genet.* 64,1357-1364

Maestrini, E., Korge, B.P., Ocana-Sierra, J., Calzolari, E., Cambiaghi, S., Scudder, P.M., Hovnanian, A., Monaco, A.P. und Munro, C.S. (1999). A missense mutation in connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum.Mol.Genet.* 8:1237-1243

Makowski, L., Caspar, D.L.D., Phillips, W.C. und Goodenough, D.A.(1977). Gap junction structures. II. Analysis of the X-ray diffraction data. *J. Cell Biol.* 74: 629-645

Manthey, D., Bukauskas, F.L.C.G., Kozak, C.A. und Willecke, K. (1999). Molecular cloning and functional expression of the mouse gap junction gene connexin57 in human HeLa-cells. *J. Biol. Chem.* 274, 14716-14723

Martin, P.E., Coleman, S.L., Casalotti, S.O., Forge, A. und Evans, W.H. (1999). Properties of connexin26 gap junctional proteins derived from mutations associated with nonsyndromal hereditary deafness. *Hum. Mol. Genet.* 8: 2369-2376

Martin, P.E., Steggle, J., Wilson, C., Ahmed, S., und Evans, W.H. (2000). Targeting motifs and functional parameters governing the assembly of connexins into gap junctions. *Biochem. J.* 349: 281-287

Martin, P.E., Blundell, G., Ahmed, S., Errington, R. und Evans, W.H. (2001). Multiple pathway in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels. *J. Cell Sci.* 114: 3845-3855

Martinez, A., Hayrapetyan, V., Moreno, A., Beyer, E. (2002). Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ. Res.* 90: 1100-1107

Moreno, A.P., Fishman, G.I. und Spray, D.C. (1992). Phosphorylation shifts unitary conductance and modifies voltage dependent kinetics of human connexin43 gap junction channels. *Biophys. J.* 62: 51-53

Moreno, A.P., Saez, J.C., Fishman, G.I. und Spray, D.C. (1994). Human connexin43 gap junction channels. Regulation of unitary conductances by phosphorylation. *Circ. Res.* 74: 1050-1057

Morley, G. E., Taffet, S. M., Delmar, M. (1996). Intramolecular interactions mediated pH regulation of connexin43 channels. *Biophys. J.* 70(3): 1294-302

Musil, L.S., Cunningham, B.A., Edelman, G.M. und Goodenough D.A.(1990). Differential phosphorylation of the gap junction protein Connexin43 in junctional communication-competent and-deficient cell lines. *J. Cell Biol.* 111: 2077-2088

Musil, L.S. und Goodenough, D.A. (1991). Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation and assembly into gap junctional plaques. *J. cell Biol.* 115: 1357-1374

Musil, L.S., und Goodenough, D.A. (1993). Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 74: 1065-1077

Musil, L.S., Le, A.N., VanSlyke, J.K. und Roberts, L.M (2000). Regulation of Connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J. Biol. Chem.* 275: 25207-25215

Nagai, Y., Kaneda, S., Nomura, K., Yasuda, H., Seno, T. und Yamao, F. (1995). Ubiquitinactivating enzyme, E1, is phosphorylated in mammalian cells by the protein kinase Cdc2. *J. Cell Sci.* 108: 2145-2152

Ngezahayo, A., & Kolb, H.A. (1994). Regulation of pancreatic acinar cell pairs by cholestokinin-octapeptide, vasoactive intestinal peptide (VIP) and a VIP-antagonist. *J.Membr.Biol.* 139: 127-136

- Nicholson, B.J., Dermietzel, R., Teplow, D., Traub, O., Willecke, K. und J.-P. Revel (1987). Two homologous protein components of hepatic gap junctions. *Nature* 329: 732-734.
- Niessen, H., Harz, H., Bedner, P., Kramer, K. und Willecke, K. (2000). Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1,4,5-triphosphate. *J. Cell Sci.* 113: 1365-1372
- Nishi, M., Kumar, N.M. und Gilula, N.B. (1991). Developmental regulation of gap junction gene expression during mouse embryonic development. *Develop. Biol.* 146: 117130
- Oh, S., Abrams, C.K., Verselis, V.K. und Bargiello, T.A. (2000). Stoichiometry of transjunctional voltage-gating polarity reversal by a negative charge substitution in the amino terminus of a connexin32 chimera. *J. Gen. Physiol.* 116: 13-31
- Omori, Y., Mesnil, M. und Yamasaki, H. (1996). Connexin32 mutations from X-linked Charcot-Marie-Tooth disease patients: functional defects and dominant negative effects. *Mol. Biol. Cell* 7: 907-916
- Omori, Y., Duflot-Dancer, A., Mesnil, M. und Yamasaki, H. (1998). Dominant-negative Inhibition of Connexin-mediated tumor suppression by Mutant connexin genes. *Gap junctions*. R. Werner (Ed.) IOS Press: 377-381
- Papavassiliou, A.G., Treier, M., Chavrier, C. und Bohmann, D. (1992). Targeted degradation of c-Fos, but not v-Fos, by a phosphorylation-dependent signal on c-Jun. *Science* 258: 1941-1944
- Paul, D.L., Ebihara, L., Takemoto, L.J., Swenson, K.I. und Goodenough, D.A. (1991). Connexin46, a novel lens gap junction protein, induces voltage-gated currents in nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J. Cell Biol.* 115 : 1077-1089.
- Paul, D.L. (1995). New functions for gap junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 665-672
- Pederson, D., Sheridan, J.D. und Johnson, R. (1980). The development of metabolite transfer between reaggregating Novikoff hepatoma cells. *Exp. Cell Res.* 127: 159-178
- Perkins, G.A., Goodenough, D.A. und Sosinsky, G.E. (1997). Three-dimensional structure of the gap junction connexon. *Biophys. J.* 72: 533-544
- Perkins, G.A., Goodenough, D.A. und Sosinsky, G.E. (1998). Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30 degree rotation for interdigitating two apposing connexons. *J. Mol. Biol.* 277: 171-177
- Pfahnl, A., Zhou, X.W., Werner, R. und Dahl, G. (1997). A chimeric connexin forming gap junction hemichannels. *Eur. J. Physiol.* 433: 773-779
- Pitts, J.D. und Simms, J.W. (1977). Permeability of junctions between animal cells. Intercellular transfer of nucleotides but not of macromolecules. *Exp. Cell Res.* 104: 153-163
- Plum, A., Hallas, G., Dombrowski, F., Hagendorff, A., Schumacher, B., Wolpert, C., Kim, J.S., Lamers, W.H., Evert, M., Meda, P., Traub, O. und Willecke, K. (2000). Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr. Biol.* 10: 1083-1091
- Postma, F.R., Hengeveld, T., Alblas, J., Giepmans, B.N., Zondag, G.C., Jalink, K. und Moolenaar, W.H. (1998). Acute loss of cell-cell communication caused by G protein-coupled receptors: a critical role for c-Src. *J. Cell Biol.* 140: 1199-1209
- Prowse, D.M., Cadwallader, G.P. und Pitts, J.D. (1997). E-Cadherin expression can alter the specificity of gap junction formation. *Cell Biol. Int.* 21: 833-43

- Purnick, P.E., Beniamin, D.C., Verselis, V.K., Bargiello, T.A. und Dowd, T.L. (2000). Structure of the amino terminus of a gap junction protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 381: 181-190
- Rahman, S. und Evans, W.H. (1991). Topography of connexin32 in rat liver gap junctions. Evidence for an intramolecular disulphide linkage connecting the two extracellular peptide loops. *J. Cell Sci.* 100: 567-578.
- Reaume, A.G., de Sousa, P.A., Kulkarni, S., Langille, B.L., Zhu, D., Davies, T.C., Juneja, S.C., Kidder, G.M. und Rossant, J. (1995). cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267: 1831-1834
- Ren, P., Mehta, P.P. und Ruch, R.J. (1998). Inhibition of gap junctional intercellular communication by tumor promoters in connexin43- and connexin32-expressing liver cells: Cell specificity and role of protein kinase C. *Carcinogenesis* 19: 169-175
- Revel, J.P. und Karnovski, M.J. (1967). Hexagonal array of the subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.* 33: C7-C10
- Richard, G., Andreoli, J.M. und Compton, J.G. (1997). Expression of epidermal connexins in erythrokeratoderma variabilis (EKV) and normal skin. *J. Invest. Dermatol.* 108: 587
- Richard, G., White, T.W., Smith, L.E., Bailey, R.A., Compton, I.G., Paul, DL und Bale, S.J. (1998a). Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma. *Hum. Genet.* 103: 393-399
- Richard, G., Smith, L.E., Bailey, R.A., Itin, P., Hohl, D., Epstein, Jr. E.H., DiGiovanna, J.J., Compton, J.G. und Bale, S.J. (1998b). Mutation in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratoderma variabilis. *Nature Genet.* 20: 366-369
- Richard, G. (2000a). Connexins: a connection with the skin. *Exp. Dermatol.* 9: 77-96
- Richard, G., Brown, N., Smith, L.E., Terrinoni, A., Melion, G., Mackie, R.M., Bale, S.J. und Uitto, J. (2000b). The spectrum of mutations in erythrokeratodermias--novel and de novo mutations in GJB3. *Hum. Genet.* 106: 321-329.
- Richard, G., Rouan, F., Diestel, S., Traub, O., White, T.W., Lo, C.W. und Uitto, J. (2000c). Functional mechanisms of dominant connexin mutations in human skin disorders. *Soc. Invest. Dermatol.*, Abstract No 730
- Rieske, E. (1975). Effect of Ca^{++} on synaptic transfer of protein precursors in electrically coupled nerve cells. *Exp. Brain Res.* 23: Suppl. No. 345
- Risek, B., Klier, F.G. und Gilula, N.B. (1992). Multiple gap junction are utilized during rat skin and hair development. *Development* 116: 639-651
- Robertson, J.D. (1963). The occurrence of a subunit pattern in the unit membranes of club endings in mauthner cell synapses in goldfish brains. *J. cell biol.* 19: 201-221
- Rouan, F., White, T. W., Brown, N., Taylor, A. M., Lucke, T. W., Paul, D. L., Munro, C. S., Uitto, J., Hodgins, M. B., Richard, G. (2001). Trans-dominant inhibition of connexin43 by mutant connexin26: implications for dominant connexin disorders affecting epidermal differentiation. *J. Cell Sci.* 114: 2105-13
- Rubin, J.B., Verselis, V.K., Bennett, M.V. und Bargiello, T.A. (1992). Molecular analysis of voltage dependence of heterotypic gap junctions formed by connexins 26 and 32. *Biophys. J.* 62:183-193

Sáez, J.C., Spray, D.C., Nairn, A.C., Hertzberg, E.L., Greengard, P., Bennett, M.V.L. (1986). cAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27-kDa principal gap junction polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 2473-2477

Sáez, J.C., Gregory, W.A., Watanabe, T., Dermietzel, R., Hertzberg, E.L., Reid, L., Bennett, M.V.L. und Spray, D.C. (1989). cAMP delays disappearance of gap junctions between pairs of rat hepatocytes in primary culture. *Amer. J. Physiol.* 257: C1-C11

Sáez, J.C., Nairn, A.C., Czernik, A.J., Spray, D.C., Hertzberg, E.L., Greengard, P., Bennett, M.V.L. (1990). Phosphorylation of connexin32, a hepatocyte gap-junction protein, by cAMP-dependent protein kinase, protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur. J. Biochem.* 192: 263-273

Sáez, J.C., Berthoud, V.M., Moreno, A.P. und Spray, D.C. (1993). Gap junctions. Multiplicity of controls in differentiated and undifferentiated cells and possible functional implications. *Adv. Second messenger Phosphoprotein Res.* 27: 163-198

Salomon D., Saurat, J.H. und Meda, P. (1988). Cell-to-cell communication within intact human skin. *J. Clin. Invest.* 82: 248-254

Salomon, D., Masgrau, E., Vischer S., Ullrich, S., Dupont, E., Sappino, P., Saurat, J.H. und Meda, P. (1994). Topography of mammalian connexins in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 103: 240-247

Sawey, M.J., Goldschmidt, M.H., Risek, B., Gilula, N.B. und Lo, C.W. (1996). Perturbation in connexin43 and connexin26 gap junction expression in mouse skin hyperplasia and neoplasia. *Mol. Carcinog.* 17: 49-61

Shiels A., Mackay, D., Ionides, A., Berry, V. und Moore, A.A. (1998) Missense mutation in the human connexin50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant "zonula pulverulent" cataract on chromosome 1Q. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 526-532

Simon, A.M., Goodenough, D.A., Li, E. und Paul, D.L. (1997). Female infertility in mice lacking connexin37. *Nature* 385: 525-529

Simpson, I., Rose, B. und Loewenstein, W.R. (1977). Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science* 195: 294-296

Smith, F.D., Oxford, G.S. und Milgram, S.L. (1999). Association of the D2 dopamine receptor third cytoplasmic loop with spinophilin, a protein phosphatase-1-interacting protein. *J. Biol. Chem.* 274: 19894-19900

Söhl, G., Degen, J., Teubner, B. und Willecke, K. (1998). The murine gap junction gene connexin36 is highly expressed in mouse retina and regulated during brain development. *FEBS Lett.* 428: 27-31.

Spray, D.C. (1994). Gap junction channels: yes, there are substrates, but what does that mean? *Biophys. J.* 67: 491-492.

Stauffer, K.A. (1995). The gap junction proteins beta 1-connexin (connexin-32) and beta 2-connexin (connexin-26) can form heteromeric hemichannels. *J. Biol. Chem.* 270, 6768-6772

Subak-Sharpe, H., Bürk, R.R., Pitts, J.D. (1966). Metabolic co-operation by cell to cell transfer between genetically different mammalian cells in tissue culture. *Heredity* 21: 342-343

Subak-Sharpe, H., Bürk, R.R., Pitts, J.D. (1966). Metabolic co-operation between biochemically marked mammalian cells in tissue culture. *J. cell Sci.* 4: 353-367

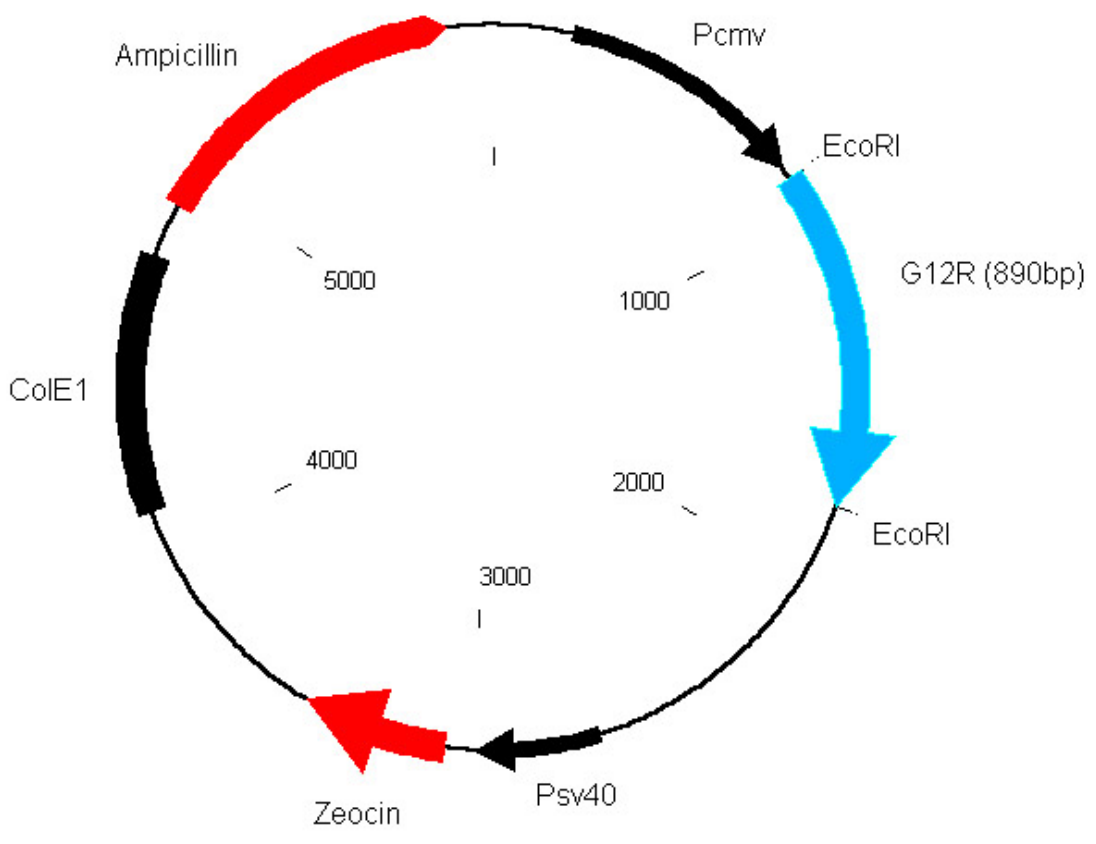
- Sullivan, R. und Lo, C.W. (1995). Expression of a connexin43/beta-galactosidase fusion protein inhibits gap junctional communication in NIH3T3 cells. *J. Cell Biol.* 130: 419-429
- Tada, J. und Hashimoto, K. (1997). Ultrastructural localization of gap junction protein connexin43 in normal human skin, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma. *J. Cutan. Pathol.* 24: 628-635
- Takeda, A., Hashimoto, E., Yamamura, H., Shimazu, T. (1987). Phosphorylation of rat liver gap junction protein by protein kinase C. *FEBS Lett.* 210: 169-172
- Takeda, A., Saheki, S., Shimazu, T., Takeuchi, N. (1989). Phosphorylation of the 27-kDa gap junction protein by protein kinase C in vitro and in rat hepatocytes. *J. Biochem. (Tokyo)* 106: 723-727
- Teubner, B., Degen, J., Söhl, G., Güldenagel, M., Bukauskas, F.F., Trexler, E.B., Verselis, V.K., De Zeeuw, C.I., Lee, C.G., Kozak, C.A. et al. (2000). Functional expression of the murine connexin36 gene coding for a neuron-specific gap junctional protein. *J. Membrane Biol.* 176: 249-262
- Teubner, B., Odermatt, B., Güldenagel, M., Söhl, G., Degen, J., Bukauskas, F.F., Kronengold, J., Verselis, V.K., Jung, Y.T., Kozak, C.A., Schilling, K. und Willecke, K. (2001). Functional expression of the new gap junction gene connexin47 transcribed in mouse brain and spinal cord neurons. *J. Neurosci* 15: 1117-1126
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. und Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19: 94-102
- Traub, O., Look, J., Paul, D. und Willecke, K. (1987). Cyclic adenosine monophosphate stimulates biosynthesis and phosphorylation of the 26 kDa gap junction protein in cultured mouse hepatocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 43: 48-54
- Traub, O., Look, J., Dermietzel, R., Brümmer, F., Hülser, D. und Willecke, K. (1989). Comparative characterization of the 21-kd and 26-kd gap junction protein in murine liver and cultured hepatocytes. *J. Cell Biol.* 108, 1039-1059
- Traub, O. Butterweck, A., Elfgang, C., Hertlein, B., Balzer, K., Gergs, U., Hafmann, B. und Willecke, K. (1995). Immunochemical characterization of connexin31,-37,40,-43 and -45 in cultured primary cells, transfected cell lines and murine tissues in: Kanno, Y., Kataoka, K., Shiba, Y., Shibata, Y., and Shimazu T. (eds.). *Progress in cell research* 4 Elsevier, Amsterdam 343-347
- Trosko, J.E., Madhukar, B.V und Chang, C.C. (1993) Endogenous and exogenous modulation of gap junctional intercellular communication: toxicological and pharmacological implications. *Life Sci.* 53: 1-19
- Tsurumi, C., Ishida, N., Tamura, T., Kakizuka, A., Nishida, E., Okumura, E., Kishimoto, T., Inageki, M., Okazaki, K., Sagata, N. et al. (1995). Degradation of c-Fos by the 26S proteasome is accelerated by c-Jun and multiple protein kinases. *Mol. Cell Biol.* 15: 5682-5687
- Unger, V.M., Kumar, N.M., Gilula, N.B. und Yeager, M. (1999). Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 283: 1176-1180
- Unwin, P.N. und Ennis, P.D. (1983). Calcium-mediated changes in gap junction structure: evidence from the low angle X-ray pattern. *J. Cell Biol.* 97: 1459-1466.
- Unwin, P.N.T. und Zampighi, G. (1980). Structure of the junction between communicating cells. *Nature* 283: 545-549
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M.T., Bujard, H. und Hillen, W. (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 7963-7968

- Valiunas, V., Weingart, R., Brink, P. R. (2000). Formation of heterotypic gap junction channels by connexins 40 and 43. *Circulation Research* 86: 42-49
- Valiunas, V., Gemel, J., Brink, P. R., Beyer, E. C. (2001). Gap junction channels formed by coexpressed connexin40 and connexin43. *Am. J. Physiol.* 281: 1675-1689
- Van Rijen, H.V.M., van Veen, T.A.B., Hermans, M.M.P. und Jongsma, H.J. (2000). Human connexin40 gap junction channels are modulated by cAMP. *Cardiovasc. Res.* 45: 941-951
- VanSlyke, J.K., Deschenes, S.M. und Musil, L.S. (2000). Intracellular transport, assembly and degradation of wildtype and disease-linked mutant gap junction proteins. *Mol. Biol. Cell* 11: 1933-1946
- Vaughan, D.K. und Lasater, E.M. (1990). Distribution of F-actin in bipolar and horizontal cells of bass retinas. *Am. J. Physiol.* 259: C205-C214
- Veenstra, R.D. (1996). Size and selectivity of gap junction channels formed from different connexins. *J. Bioenergetics and Biomembranes* 28: 327-338
- Verselis V.K., Ginter, C.S. und Bargiello, T.A. (1994) Opposite voltage gating polarities of two closely related connexins. *Nature* 368: 348-351
- Vohwinkel, K.H. (1929). Keratoderma hereditarium mutilans. *Arch. Dermatol. Syph* 158: 354-364
- Wagner, P., Fuchs, A., Gotz, C., Nastainczyk, W. und Montenarh, M. (1998). Fine mapping and regulation of the association of p53 with p34cdc2. *Oncogene* 16: 105-111
- Wang, Y. und Rose, B. (1997). An inhibition of gap junctional communication by cadherins. *J. Cell Science* 110: 301-309
- Weidmann, S. (1952). The electrical constants of purkinje fibers. *J. Physiol.* 118: 348-360
- Weidmann, S. (1966). The diffusion of radiopotassium across intercalated disks of mammalian cardiac muscle. *J. Physiol.* 187: 323-342
- Weissberg, P.L., Little, P.J., Cragoe, E.J., Jr. und Bobik, A. (1987). Na⁺/H⁺-antiport in cultured rat aortic smooth muscle: its role in cytoplasmic pH regulation. *An. J. Physiol.* 253: C193-C198
- Wells, K.D., Foster, J.A., Moore, K., Pursel, V.G. und Wall, R.J. (1999). Codon optimization, genetic insulation and an rTA reporter improve performance of the tetracycline switch. *Transgenic Res.* 8: 371-381
- Wenzel, K., Manthey, D., Willecke, K., Grzeschik, K.H. und Traub, O. (1998). Human gap junction protein connexin31: molecular cloning and expression analysis. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 248: 910-915
- White, T.W., Bruzzone, R., Goodenough, D.A. und Paul, D.L. (1992). Mouse Cx50, a functional member of the connexin family of gap junction proteins, is the lens fiber protein MP70. *Mol. Biol. Cell* 3: 711-720.
- Willecke, K., Heynkes, R., Dahl, E., Stutenkemper, R., Hennemann, H., Jungbluth, S., Suchyna, T. und Nicholson, B.J. (1991). Mouse connexin37: cloning and functional expression of a gap junction gene highly expressed in lung. *J. Cell Biol.* 114: 1049-1057.
- Willecke, K., Eiberger J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U., Söhl, G. (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.* 383: 725-737

- Willgoss, A., Leigh, I.M., Barnes, M.R., Dopping-Hepenstal, P., Eady, A.J., Walter, J.M., Kennedy, C.T.C. und Kelsell, D.P. (1999). Identification of a novel mutation R42P in the gap junction protein β -3 associated with autosomal dominant erythrokeratoderma variabilis. *J. Invest. Dermatol* 113: 1119-1122
- Wirtz, E. und Clayton, C. (1995). Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a procaryotic repressor. *Science* 268: 1179-1183
- Xia, J.H., Liu, C.Y., Tang, B.S., Pan, Q., Huang, L., Dai, H., Zhang, B.R., Xie, W., Hu, D.X., Shi, X.L., Wang, D.A., Xia, K., Yu, K.P., Liao, X.D., Feng, Y., Xiao, J.Y., Xie, D.H. und Huang, J.Z. (1998). Mutations in the gene encoding gap junction protein β -3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nature Genet.* 20: 370-373
- Xie, L.Y. und Abou-Samra, A.B. (1998). Epitope tag mapping of the extracellular and cytoplasmic domains of the rat parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *Endocrinol.* 139: 4563-4567
- Xu, X., Berthoud, V. M., Beyer, E. C., Ebihara, L. (2002). Functional role of the carboxyl terminal domain of human connexin50 in gap junctional channels. *J. Membr. Biol.* 186(2): 101-12
- Yancey, S.B., John, S.A., Lal, R., Austin, B.J. und Revel, J.-P. (1989). The 43 kD polypeptide of heart gap junctions: Immunolocalisation, topology and functional domains. *J. Cell. Biol.* 108: 2241-2254.
- Yeager, M. und Nicholson, B.J. (1996) Structure of gap junction intercellular channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6: 183-192
- Yin, X., Jedrzejewski, P.T. und Jiang, J.X. (2000). Casein kinase II phosphorylates lens connexin 45.6 and is involved in its degradation. *J. Biol. Chem.* 275: 6850-6856
- Yoshimura, T., Satake, M., Ohnishi, A., Tsutsumi, Y. und Fujikura, Y. (1998). Mutations of connexin32 in Charcot-Marie-tooth disease type X interfere with cell-to-cell communication but not cell proliferation and myelin-specific gene expression. *J. Neurosci. Res.* 51: 154-161
- Zhang, J.T. und Nicholson, B.J. (1989). Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, Cx26, as deduced from its cDNA. *J. Cell Biol.* 109: 3391-3401.
- Zhang, J.T. und Nicholson, B.J. (1994). The topological structure of connexin 26 and its distribution compared to connexin 32 in hepatic gap junctions. *J. Membrane Biol.* 139: 15-29.
- Zimmer D.B., Green, C.R., Evans, W.H. und Gilula, N.B. (1987). Topological analysis of the major protein in isolated intact rat liver gap junctions and gap junction -derived single membrane structures. *J. Biol. Chem.* 262: 7751-7763.

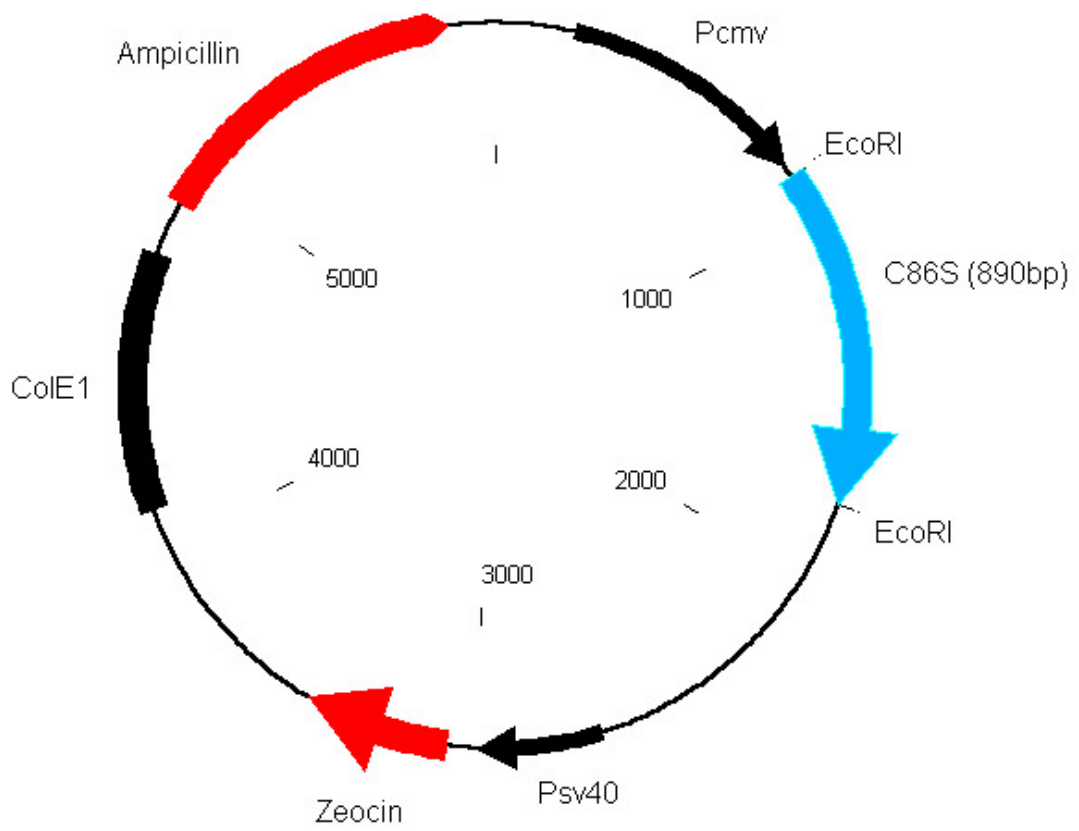
pcDNA3.1zeo/G12R

5890 bps



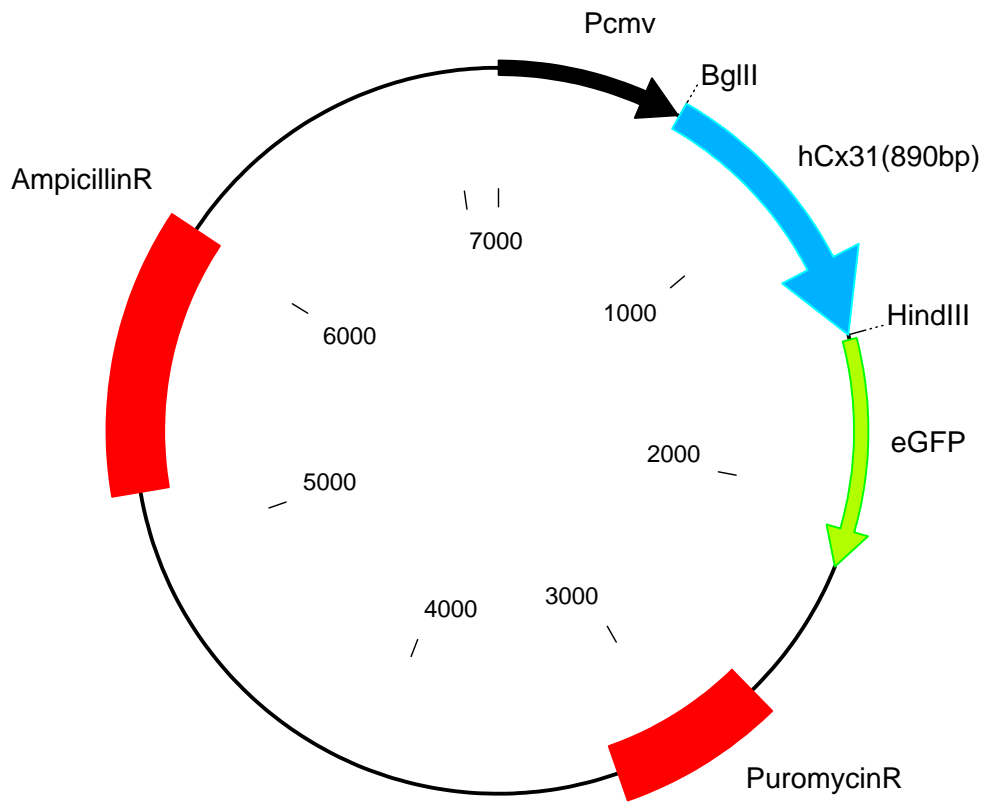
pCDNA3.1zeo/C86S

5890 bps



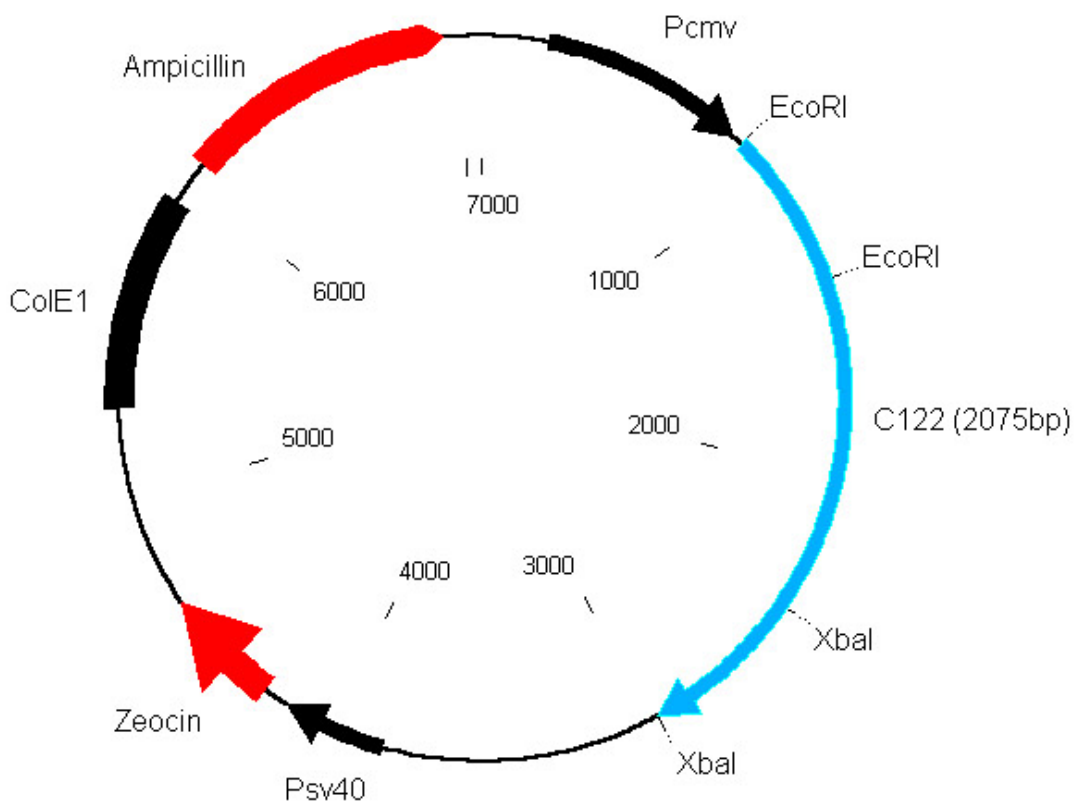
pMJGreen/hCx31

7160 bps



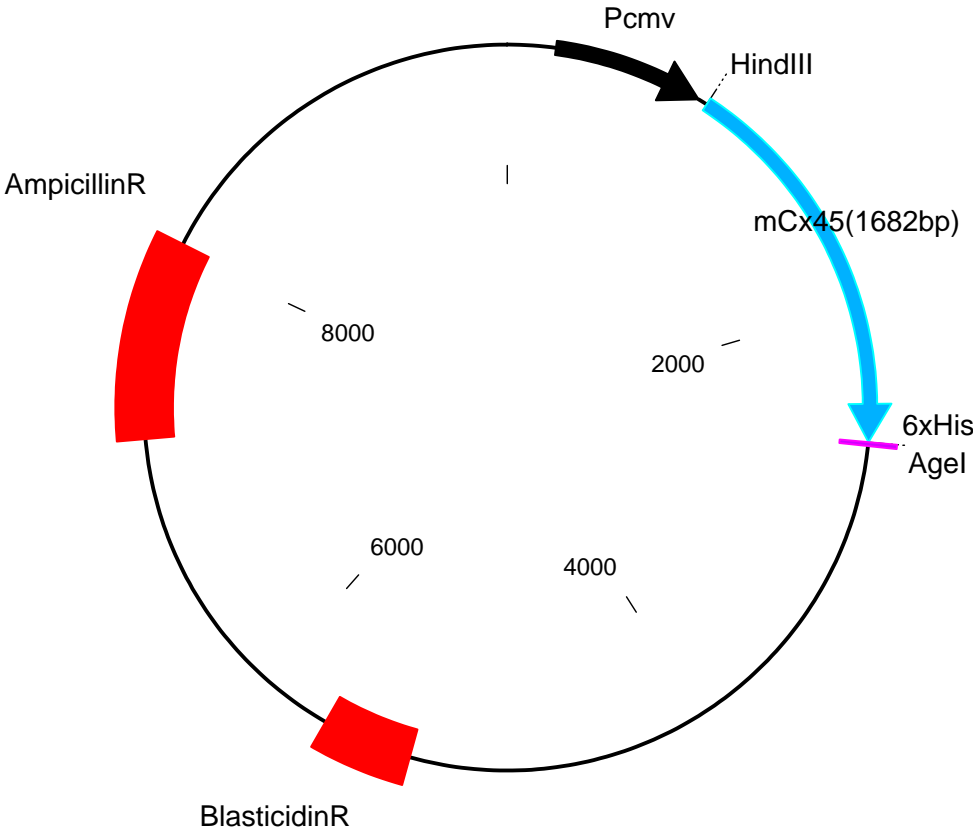
pcDNA3.1zeo/C122

7075 bps



pcDNA6HisB/Cx45

9748 bps



Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt.

Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als dieser eingereicht wurde.

Bonn, den 30. September 2003

Seong-won Nam